T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ROMATOİD ARTRİTLİ HASTALARDA ANTİOKSİDAN TABLO VE ERİTROSİT MEMBRAN Na^+/K^+ ATPaz AKTİVİTESİNİN İNCELENMESİ

Dr. Yasemin TÜRKAN OĞUL

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ

Uzmanlık Tezi

ERZURUM-2006

İÇİNDEKİLER

KONU **SAYFA NO**

İçindekiler ……..…… I

Onay ……..…… IV

Teşekkür Sayfası …….……... V

Özet …….…… VI

Abstract ……..… VII

1. GİRİŞ ……..…… 1

2. GENEL BİLGİLER ……..…… 3

2.1. Romatoid Artrit ……..…… 3

2.1.1. Etyoloji ……..…. 3

2.1.1.1. Genetik Faktörler ……..……. 3

2.1.1.2. Genetik olmayan Faktörler ……..……. 4

2.1.1.2.1. Yaş ve Cinsiyet ……..……. 4

2.1.1.2.2. İnfeksiyonlar …….…… 4

2.1.1.2.3. Isı Şok Proteinleri ……..……. 4

2.1.1.2.4. Romatoid Faktör …….…….. 5

2.1.1.2.5. Diğer Nedenler ……..……. 5

2.1.2. Patogenez ……..…… 5

2.1.3. Klinik Değerlendirme ……..……. 7

2.1.3.1. Tanı ……..…… 7

2.1.4. Bulgular ……..…… 8

2.1.5. Tedavi ……...…… 9

2.2. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller ……..…… 9

2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri ……..… 10

2.2.1.1. Süperoksid Radikali …….…… 11

2.2.1.2. Hidrojen Peroksid 11
2.2.1.3. Hidroksil Radikali 12
2.2.1.4. Singlet Oksijen 12
2.2.1.5. Nitrik Oksid 12
2.2.1.6. Diğer Serbest Radikaller 13
2.2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları 13
2.2.2.1. Serbest Radikallerin Endojen Kaynakları 13
2.2.2.2. Serbest Radikallerin Eksojen Kaynakları 15
2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri 15
2.2.3.1. Membran Lipidlerine Etkileri 16
2.2.3.2. Proteinler Üzerine Etkileri 18
2.2.3.3. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri 18
2.2.4. Serbest Radikal Hasarının Neden Olduğu Klinik Durumlar 19
2.2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri 19
2.2.5.1. Süperoksid Dismutaz 21
2.2.5.2. Glutatyon Peroksidaz 23
2.2.5.3. Katalaz 23
2.3. Hücre Membranı ve Na^+/K^+ ATPaz 24
2.3.1. Hücre Membranı 24
2.3.1.1. Membran Lipidleri 25
2.3.1.2. Membran Proteinleri 27
2.3.1.3. Membranlardan Maddelerin Transportu 29
2.3.2. Na^+/K^+ ATPaz 29
2.3.2.1. Na^+/K^+ ATPaz'ın Yapısı 31
2.3.2.2. Na^+/K^+ ATPaz'ın İşleyişi 35
2.3.2.3. Na^+/K^+ ATPaz'ın Doku Dağılımı ve Aktivitesinin Regülasyonu 35
3. GEREÇ VE YÖNTEM 37
3.1. Gereç 37

3.1.1. Örneklerin Hazırlanması ……..…… 37

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar ……..…… 38

3.2. Yöntemler ……. 39

3.2.1. Na^+/K^+ ATPaz Aktivitesinin Ölçümü ……..…… 39

3.1.2. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi ……..… 41

3.1.3. Cu/Zn Süperoksid Dismutaz Aktivitesinin Ölçülmesi ……..…… 42

3.1.4. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü ……..……. 44

3.1.5. Ksantin Oksidaz Aktivitesinin Ölçümü ……..……. 44

3.1.6. MDA Miktarının Ölçümü ……..…… 45

3.1.7. CRP Miktarının Ölçümü ……..…… 46

3.1.8. Hemoglobin Tayini ……..……... 47

3.3. İstatistiksel Analizler …….……. 47

4. BULGULAR ……. 48

5. TARTIŞMA ……..……...…… 57

6. SONUÇ VE ÖNERİLER ……. 66

7. KAYNAKLAR …….. 67

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Kurulunun 24.5.2004 tarihli toplantısında "Romatoid Artritli Hastalarda Antioksidan Tablo ve Eritrosit Membran Na^+/K^+ ATPaz Aktivitesinin İncelenmesi" isimli çalışmanın Dr. Yasemin (Türkan) Oğul'a tez konusu olarak verilmesine ve tez yöneticiliğinin Prof. Dr. Ahmet Kızıltunç tarafından yapılmasına karar verilmiştir. Karar Temel Tıp Bilimleri Bölüm Kurulunun 31.5.2004 tarihli 4. oturumunda 4 numaralı karar olarak kabul edilmiştir. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 11.6.2004 tarih ve 51 nolu toplantısında 8 numaralı karar olarak onaylanmıştır.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım başta bölüm başkanım Prof. Dr. Ebubekir Bakan ve tez yöneticim Prof. Dr. Ahmet Kızıltunç olmak üzere bölümümüzün diğer kıymetli hocaları Prof. Dr. Yaşar Nuri Şahin, Prof. Dr. Nuri Bakan, Prof. Dr. Leyla Yıldız, Prof. Dr. Fatih Akçay, Doç. Dr. Zuhal Umudum, Doç. Dr. Hülya Aksoy, Doç. Dr. Sait Keleş ve Yrd. Doç. Dr. Abdulkadir Yıldırım'a,

Tezimin numunelerini toplamada yakın ilgisini gördüğüm kıymetli hocam Prof. Dr. Refik Ali Sarı'ya

Tezimi düzenlerken yardım eden sevgili arkadaşım Arş.Gör. Dr. Fatma Özabacıgil'e

Tezimin hazırlanmasında ve hayatımın her anında en büyük destekçim olan eşim Hayri Oğul'a, ayrıca sabrı için minik meleğim Talha'ya, ben meşgulken meleğimle ilgilenen sevgili kardeşim Şule Türkan'a ve çevirilerimi yaparken büyük yardımlarını gördüğüm abim Fikret Türkan'a

Sonsuz teşekkürler ediyorum.

ÖZET

Sağlıklı kişilerde normal metabolizma esnasında üretilen serbest radikaller organizmadaki antioksidanlar tarafından nötralize edilir. Ancak serbest radikallerin aşırı artışı veya antioksidan sistemlerin yetersizliği oksidatif stresle sonuçlanır. Serbest oksijen radikalleri ile temel hücre komponentlerinin oksidatif hasarı, kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz, diabet ve romatoid artrit (RA) gibi bir çok hastalığın patogenezinde önemli bir mekanizma olarak öne sürülmektedir. Bu çalışmada RA'lı hastalarda oksidatif stres, antioksidan enzimler ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz enzim aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmaya, herhangi bir tedavi almayan 28 RA'lı hasta ve kontrol grubu olarak aynı yaş ve cinsiyette 20 sağlıklı birey dahil edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında RA'lı grupta serum C reaktif protein (CRP) düzeyleri (p=0.0001), eritrosit malondialdehit (MDA) düzeyleri (p=0.0001) ve eritrosit ksantin oksidaz (XO) aktiviteleri (p=0.023) yüksek bulundu. Buna karşın eritrosit Cu/Zn süperoksid dismutaz (Cu/ZnSOD) (p=0.009), glutatyon peroksidaz (GPx) (p=0.008) ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz (p=0.0001) aktiviteleri azalmış tespit edildi. Eritrosit katalaz aktivitesi ise değişmedi. RA'lı hasta grubunda eritrosit MDA ile serum CRP düzeyleri arasında (r=0.602, p=0.001) ve eritrosit Cu/ZnSOD ile eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktiviteleri arasında (r=0.471, p=0.011) pozitif korelasyon ve eritrosit MDA düzeyleri ile eritrosit Cu/ZnSOD (r =─0.434, p=0.021) ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz (r = ─0.641, p=0.0001) aktiviteleri arasında negatif korelasyon tespit edildi. Ayrıca serum CRP düzeyleri ile eritrosit Cu/ZnSOD (r=─0.481, p=0.01) ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktiviteleri arasında (r=─0.421, p=0.026) negatif korelasyon saptandı.

Bu çalışmanın sonuçları RA'da oksidatif stresin arttığını, Cu/ZnSOD ve GPx aktivitelerinin azaldığını, katalaz aktivitesinin değişmediğini ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azaldığını ortaya koydu.

Anahtar kelimeler: RA, oksidatif stres, antioksidan enzimler, Na^+/K^+ ATPaz

ABSTRACT

In healthy humans beings, the endogenous free radicals produced in the body are neutralized by endogenous antioxidants. But, the insufficiency of antioxidant defense systems or the acceleration of the oxidative reactions can result in the oxidative stress. Oxidative damage to essential cell components caused by oxygen free radicals has been proposed to be an important mechanism in the pathogenesis of many diseases such as cardiovascular diseases, atherosclerosis, diabetes mellitus, and rheumatoid arthritis (RA). In this study, oxidative stress, antioxidant enzymes and in erythrocyte membrane Na^+/K^+ ATPase activity of patients with rheumatoid arthritis were investigated. Twenty-eight patients with RA not currently under antirheumatic drug treatment and 20 age and gender-matched healthy controls were included in the study.

When compared with the control group, patients with RA had higher serum C reactive protein (CRP) levels (p=0.0001), erythrocyte malondialdehyde (MDA) levels (p=0.0001) and xanthine oxidase (XO) activities (p=0.023). However, erythrocyte Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) (p=0.009), glutathione peroxidase (GSH-Px) (p=0.008) and erythrocyte membrane Na^+/K^+ ATPase activities (p=0.0001) were found to be decreased, and erythrocyte catalase activities unchanged in the study group. In the patient group, correlation analysis revealed positive correlations between erythrocyte MDA and serum CRP levels (r=0.602, p=0.001), and erythrocyte Cu/ZnSOD and erythrocyte membrane Na^+/K^+ ATPase activities (r=0.471, p=0.011). There were negative correlations between erythrocyte MDA levels and erythrocyte Cu/ZnSOD (r =─0.434, p=0.021) and erythrocyte membrane Na^+/K^+ ATPase activities (r =─0.641, p=0.0001). Additionally, there were negative correlations between serum CRP levels and erythrocyte Cu/ZnSOD (r=─0.481, p=0.01) and erythrocyte membrane Na^+/K^+ ATPase activities (r =─0.421, p=0.026).

These results of the present study revealed that increases oxidative stress, decreases Cu/ZnSOD and GPx, unchanges catalase and decreases erythrocyte membrane Na^+/K^+ ATPase activities were observed in RA.

Key words: RA, oxidative stress, antioxidant enzymes, Na^+/K^+ ATPase.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Reaktif Oksijen Türleri (ROT), oksijenin kısmi indirgenmesiyle oluşan ve diğer moleküllerle kolayca reaksiyona girebilen aktif moleküllerdir.[1] Sağlıklı insanlarda da normal metabolizma esnasında az miktarda üretilen ROT'lar sinyal iletimi ve mikrobiyal ajanların öldürülmesi gibi çeşitli hücresel olaylarda fonksiyon görürler.[2] ROT'ların zararlı etkileri organizmada varolan çeşitli antioksidan moleküllerin kombine etkileri ile ortadan kaldırılır. Ancak ROT üretiminin aşırı olması veya antioksidan sistemlerin yetersizliği durumunda oksidatif stres ortaya çıkar.[3] Bu reaktif, kısa ömürlü moleküllerin DNA, proteinler, lipidler ve lipoproteinleri içeren tüm biyolojik moleküllere zarar verebildikleri ve inflamasyon, infeksiyon, kanser ve ateroskleroz gibi bir çok patolojinin ortaya çıkmasında önemli rol oynadıkları bilinmektedir.[4-6]

Romatoid Artrit (RA), dünyadaki genel popülasyonun %1-2'sini etkileyen en yaygın inflamatuar artrittir.[7] Kronik seyirli olan hastalık, uzun dönemde sakatlıklar ve mortalite ile sonuçlanır. Uzun zamandır araştırılmasına rağmen RA etyolojisi henüz kesin biçimde ortaya konamamıştır. Multifaktöriyel bir etyoloji düşünülmektedir ve son çalışmalar doku hasarının mediyatörleri olarak ROT'lar üzerinde yoğunlaşmıştır. ROT'ların RA'da özellikle eklemlerde hücresel hasarı başlatma potansiyeline sahip oldukları öne sürülmektedir.[8-11] Yapılan çalışmaların bir kısmı RA'daki oksidatif stresin ROT'ların aşırı artması ile oluştuğunu öne sürerken bazı çalışmalar antioksidan defans sisteminin yetersizliğinden kaynaklandığını öne sürmektedir.

Reaktif oksijen türleri organizmadaki biyomoleküllerin tümünü etkileseler de ilk hedefleri membran lipidleridir. Hücre membran lipidleri ile reaksiyona girerek peroksidasyon oluştururlar. Kronik inflamasyon sırasında, ROT'un artmış konsantrasyonları büyük miktarlarda lipid peroksidasyon ürünleri oluşturarak dokularda toksik hasara yol açar.[8,12] Malondialdehit (MDA), lipid peroksitlerinin non-enzimatik oksidatif parçalanması sonucu oluşan toksik etkili son ürünlerden birisidir ve oluşan serbest oksijen radikallerinin iyi bir göstergesidir. [13] RA'lı hastaların eritrosit, sinovyal sıvı ve serumlarında MDA düzeyleri artmış olarak rapor edilmiştir.[8,11,14-16]

Lipid peroksidasyonunun, membran geçirgenliğini bozması sonucunda membrana bağlı bulunan enzimler inaktive olabilir.[17] Na^+/K^+ ATPaz membranın içine yerleşmiş olan bir integral membran proteinidir. Enzim üç Na^+ iyonunu hücre dışına

buna karşılık iki K^+ iyonunu hücre içine pompalayarak hücre içi ve dışı iyon konsantrasyonlarını düzenler. Oksidatif strese maruz kalma ile Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azaldığını rapor eden pek çok çalışma, Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin oksidatif stres esnasındaki hücre hasarını belirlemede hayati olduğunu göstermiştir. [18-21] Pompa aktivitesi membran fosfolipidlerindeki değişikliklere duyarlıdır. Oksijen radikalleri aracılığıyla meydana gelen lipid peroksidasyonu neticesinde membran bütünlüğünün bozulması Na^+/K^+ ATPaz'ın inaktivasyonuna yol açabilir.[22] RA'da Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azaldığını bildiren yayınlar mevcuttur. [23,24]

Organizmada ROT üreten en önemli enzimatik kaynaklardan biri Ksantin Oksidaz'dır (XO). Artmış XO aktivitesinin RA patogenezindeki rolünü belirleyen çalışmalar mevcuttur.[14] ROT'un zararlı etkilerini ortadan kaldırmada fonksiyon gören süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin artmış, azalmış ve değişmemiş aktiviteleri RA'lı hastalarda bildirilmiştir.[14,25-27]

Bu çalışma, RA'da oksidatif stresin varlığı, antioksidan enzimlerin düzeyi ve hücre hasarını belirleyebilmek için 28 RA'lı hasta ve aynı yaş grubunda 20 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubunda yapıldı. Elde edilen eritrosit hemolizatında XO, Cu/ZnSOD, GPx ve katalaz aktiviteleri belirlendi. Serum örneklerinde CRP tayini yapıldı. İzole edilen membran örneklerinde Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi belirlendi.

RA'lı hastalarda bu parametrelerin bir veya birkaçının yer aldığı çalışmalar literatürde bulunmasına karşın XO, CRP, antioksidan enzimler ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin birlikte değerlendirildiği bir çalışmaya rastlayamadığımızdan bu çalışmanın RA- oksidatif stres- Na^+/K^+ ATPaz arasındaki ilişkiyi ortaya koymada ve yeni tedavi stratejilerini geliştirmede faydalı olacağı inancındayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ROMATOİD ARTRİT

Romatoid Artrit (RA); etyolojisi tam olarak bilinmeyen, başlıca diartroidal eklemlerin noninfektif, kronik inflamasyonu ve deformiteleri ile karakterize sistemik bir hastalıktır.[7,28,29] Dünyadaki genel popülasyonun yaklaşık % 1'ini etkiler.[30] İnsidansı genel olarak sabit olmasına karşın bazı topluluklarda farklılık gösterebilmektedir. Örneğin hastalığın insidansı Çin'de % 0.3, Kuzey Amerika Kızılderililerinde % 5'tir.[7]

2.1.1. ETYOLOJİ

Uzun yıllardan beri araştırılmasına rağmen RA'nın etyolojisi henüz tam olarak ortaya konulamamıştır. Genetik ve genetik olmayan etkenlerin rol oynadığı multifaktöriyel bir etyolojiden bahsedilmektedir.

2.1.1.1. Genetik Faktörler

Romatoid artrit görülme sıklığının dizigotik ikizlere oranla monozigotik ikizlerde daha yüksek olması ve aile bireylerinde risk artışının daha fazla olması hastalığın etyolojisinde kalıtımsal bir faktörün rol oynadığını düşündürmektedir. Genel popülasyonda görülme oranı % 1 iken monozigotik ikizlerden biri etkilendiğinde diğerinde de görülme oranı % 30-50 olur. Dizigotik ikizlerde görülme oranı ise birinci dereceden akrabalarda görülme oranıyla aynıdır (% 2-5).[7]

Canlıların tüm özellikleri kuşaktan kuşağa genlerle taşınmaktadır. Major histocompatibility complex (MHC) immunite ile ilişkili çok sayıda geni içeren büyük bir kromozomal bölgedir. İnsanlarda MHC, Human Leucocytes Antigens (HLA) olarak isimlendirilir ve 6. kromozomdaki genler ile kodlanır. İki sınıf HLA molekülü tanımlanmıştır. Sınıf 1 molekülleri A, B, C alt gruplarına ayrılır ve temel transplantasyon antijenlerini kodlar. Sınıf 2 molekülleri DP, DQ, DR olarak tanımlanır. RA ile en çok ilişkili HLA molekülü HLA DR4'tür. HLA DR4 pozitif olanlarda RA riski rölatif olarak 4-6 kat daha fazladır. HLA DR4 hücresel tipleme yapıldığında 6 alt gruba ayrılır. Bunlardan özellikle Dw4, Dw14, Dw15 RA ile ilişkilidir ve RA'ya eğilim oluşturur. Dw10 ve Dw13 ise RA'ya karşı koruyucudur. HLA DR1 riski artırırken HLA DR2 ve HLA DR2-DR3 gibi kombinasyonlar riski azaltıcı gözükmektedir. RA'lı hastalarda HLA DQw7'nin pozitif olması durumunda ise hastalığın daha ağır seyrettiği kabul edilmektedir.[7,29]

2.1.1.2. Genetik Olmayan Faktörler

2.1.1.2.1. Yaş ve Cinsiyet

Hastalığın yaş ve cinsiyetle yakın ilişkisi vardır. Hastaların % 80'i 35-50 yaş arasındadır. Genellikle genç erişkin yaş hastalığı olmasına karşın her yaşta ortaya çıkabilir. Bir çok otoimmun hastalık gibi RA da kadınlarda daha sık görülür ve daha şiddetli seyreder. Kadın/erkek görülme oranı 2/1 ile 4/1 arasında değişmekle birlikte ortalama 3/1 olarak kabul edilir. Yaş ilerledikçe cinsiyet farklılığı azalır. Geç başlayan RA'da kadın/erkek oranı 1,4/1'dir.[28] Cinsiyet farklılığının nedeni tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte hormonal faktörlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Östrojenlerin T lenfositler üzerine multipl etkiler gösterdikleri ve nötrofil aktivasyonunu baskıladıkları bilinmesine karşın RA patogenezindeki rolü tam olarak ortaya konulamamıştır.[31]

2.1.1.2.2. İnfeksiyonlar

RA'da eklemlerde inflamasyona yol açan antijenlerin doğası hala bilinmemekle birlikte doku ve sinoviyal sıvılarda virüs ve bakteri gibi eksojen ajanların varlığı uzun süredir araştırılmaktadır. Piyojenik bakterilerin RA'ya neden olmadıkları bu gün genel olarak kabul edilmektedir. Mikoplazmalar olası ajanlar olarak düşünülmelerine rağmen yapılan çalışmalar bu düşünceyi doğrulamamıştır.[32]

Epstein-Barr virüsü ve parvovirüs B19'un etkileri araştırılmış fakat kesin bir bağlantı gösterilememiştir.[7 33 34] Ayrıca rubella, lentivirüs, sitomegalovirüsün etyolojik rolleri araştırılmış net bir bağlantı kurulamamıştır.[7] Diğer birçok viral infeksiyonda olduğu gibi hepatit B infeksiyonlarında da romatoid faktör pozitifleşebilmektedir.[35] Hepatit B infeksiyonu geçirenlerin %10-30'unda artrit gelişmektedir.[7]

Elde edilen bu bulgular ışığında virüslerin uygun genetik ve daha bilemediğimiz bazı faktörlerin de katkısıyla RA'da tetikleyici olabilecekleri düşünülmektedir.[7]

2.1.1.2.3. Isı Şok Proteinleri [Heat Shock Protein (HSP)]

HSP'lerin RA patogenezinde yeri olduğu son yıllarda gündeme gelmiştir. Bu proteinler her türlü strese karşı tüm hücrelerden sentez edilirler ve hücre içi protein kıvrılmaları ve translokasyonlarını kolaylaştırarak ısı, bakteriler ve oksijen radikalleri gibi olaylardan hücrelerin korunmasında görev alırlar. İnsan HSP'leri ile bakteri HSP'leri arasında amino asit diziliminde benzerlikler olabilir. Örneğin bazı

mucobacterium tuberculosis HSP'leri ile insan 70 HSP molekülünün amino asit sıralanışları arasında % 65 benzerlik vardır.[36,37] Bu benzerlik çapraz reaksiyonlara neden olabilir. İnflamatuar artritlerde sinoviyal hücrelerin HSP oluşturdukları ve bunların çapraz reaksiyon veren T hücreler ve antikorlar tarafından tanındığı bildirilmektedir.[7]

2.1.1.2.4. Romatoid Faktör

Romatoid faktör (RF), IgG'nin Fc parçasına karşı gelişmiş antikordur. RF olarak adlandırılan otoantikorlar Ig M, Ig G, Ig A ve Ig E cinsinden olabilir. RA'da RF, periferik kan ve sinoviyal B hücreleri tarafından yapılır. RF'nin otoantikor olarak teşhisi ve karakterize edilmesi otoimmunitenin RA'da bir rol oynayabileceğine doğrudan ilk delil olmuştur. RF ve diğer immunglobulinlerden oluşmuş immun komplekslerin primer patojen olarak RA gelişmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ancak RF yüksek bulunan her olguda RA kliniği gelişmez ve RF, RA yanında diğer romatolojik hastalıklar, kronik inflamatuar hastalıklar, akut viral infeksiyonlar, neoplazmlar gibi başka olaylarda da yükselebilir. Bunun yanında RA'lı olgulardaki B hücreleri tarafından sentez edilen RF'ler normal B hücreleri tarafından sentez edilenlerden farklı yapıya sahiptir.[7,28,29]

2.1.1.2.5. Diğer Nedenler

Diyetle RA arasında bir ilişki olup olmadığı çeşitli çalışmalarla araştırılmıştır. Zeytinyağı ve balıkyağı tüketiminin RA'dan koruyucu etkisine karşın, selenyum ve bakır eksikliğinin ise RA'ya eğilim oluşturabileceği düşünülmektedir. Sosyoekonomik düzey ve mesleki özelliklerin de RA etyolojisindeki rolleri araştırılmıştır. Sosyoekonomik düzey ile bir ilişki kurulamazken granit ve organik solvent işçilerinde RA gelişimi için risk olabileceği ileri sürülmüştür.[28] Sigaranın da çevresel bir risk faktörü olarak RA gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.[38]

2.1.2. PATOGENEZ

Romatoid artrit sistemik bir hastalık olmasına rağmen hastalığın karakteristik özelliği sinovyum fonksiyonlarındaki bozulmadır. RA'da normalde hücre ve damar yapısından fakir olan sinovyum, makroskobik olarak hipervasküler, proliferasyon gösteren, tümör dokusunu andıran bir yapıya dönüşür.[29]

Günümüzde RA patogenezi iki ana hipotezle açıklanmaya çalışılmaktadır. Bunlar; T hücre hipotezi ve makrofaj-fibroblast hipotezidir (mezenkimal teori). Her iki hipotezde de hastalığın başlangıç fazı ne olduğu henüz bilinmeyen bir artrotropik ajanın eklemlere yerleşmesi sonrasında antijen prezentasyonu ve spesifik T hücrelerinin aktivasyonudur. Antijen sunan hücreler tarafından uyarılan CD4 pozitif T hücreleri, bir takım sitokinleri ortaya çıkararak makrofajlar, diğer T hücreleri, B hücreleri ve endotel hücrelerini aktive ederler. Bu başlangıç fazından sonra mezenkimal teoriye göre sinovit, makrofaj ve sinoviyal fibroblastları içeren otokrin ve parakrin yollar ile devam ettirilir, T hücresine gerek yoktur. T hücre hipotezi ise sinovitin kronik evrede bile T hücresine gereksinimi olduğunu savunur.[7]

T helper hücrelerinden gönderilen sinyallerle aktive olan B lenfositleri plazma hücrelerine dönüşerek immunglobulinleri (Ig) yaparlar. Ig'ler sinoviyal membran, sinoviyal sıvı ve eklem kıkırdağındaki antijenlerle birleşir ve immun kompleksleri oluştururlar. İmmun kompleksler eklem boşluğuna serbestçe yayılır ve komplemanı aktive ederek kemotaktik faktörlerin salınmasına yol açar. Kemotaktik faktörler damar geçirgenliğini artırır, polimorfonüveli lökositleri ve monositleri ortama çeker. Bu hücrelerin immun kompleksleri fagosite etmesiyle doku hasarına neden olan prostaglandin, lökotrien, serbest radikal ve proteolitik enzimler yapılır ve serbestleşir.[7]

Romatoid artrit bir mediyatör hastalığıdır ve sitokinler de inflamatuar reaksiyonlara aracılık eden önemli moleküllerdir. Hormon benzeri proteinler olan sitokinler, bağışıklık hücrelerinin haberleşmelerini sağlayarak normal bağışıklık tepkilerinin oluşmasında kritik bir rol oynarlar. Bunun yanında sinovitin başlaması ve sürdürülmesinde de görev alırlar.[7]

Romatoid artritte T lenfositler tarafından üretilen sitokinler [IL-2, IL-3, IL-4, İnterferon (IFNγ)] azalırken, makrofajlar ve sinoviyal fibroblastlar tarafından üretilenler [IL-1, IL-6, IL-8, Tümör Nekrozis Faktör (TNF-α), Granülosit Makrofaj Koloni Stimülan Faktör (GM-CSF) ve Transforming Growth Faktör (TGF-β)] artmaktadır.[39] RA patogenezinde rol oynayan sitokinlerin en önemlileri IL-1 ve TGFα'dır. Her ikisi de sinoviyal makrofajlar tarafından üretilerek sinoviyal fibroblast proliferasyonunu sağlar ve IL-6, GM-CSF, kemokinler (IL-8), metalloproteinaz ve prostaglandinler gibi efektör moleküllerin salgılanmasını uyarırlar.[40] TNFα seviyesi, eritrosit sedimentasyon hızı ve

sinoviyal sıvıdaki lökosit sayısı ile pozitif korelasyon gösterir. IL-1'in miktarının da eklem tahribatıyla uyumlu olduğu saptanmıştır.[7]

Proinflamatuar sitokin ağını dengede tutmak için çeşitli süpresif sitokinler (IL-4, IL-10) devreye girer. Bu süpresif sitokinlerin miktarlarındaki azalma RA'nın kronikleşmesine katkıda bulunur. Çeşitli çalışmalarda RA'lı eklemlerdeki INFγ'nın azaldığı gösterilmiştir.[41] INFγ veya IL-4'ün azalması TGFα'nın etkilerinin ortadan kaldırılamamasına neden olur.[7] İNFγ fibroblast benzeri sinovisitler vasıtasıyla metalloproteinaz üretimini de engeller. Ayrıca vasküler hücre adhezyon molekülü [Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM-1)] ve interselüler adhezyon molekülü [İntercellular Adhesion Molecule (ICAM-1)] gibi adhezyon moleküllerinin hücre yüzeyinde bulunmalarına neden olur ve yaralanma bölgelerindeki inflamasyonun iyileşmesine yardım edebilir.[42,43]

Romatoid artrit patogenezinde önemli diğer bir sitokin olan IL6; IL1 aracılığıyla T hücreleri, monosit ve fibroblastlardan üretilen bir proteindir. B hücrelerinden IgG sentezini sağlar. Karaciğerde üretilen akut faz proteinlerinin [C Reaktif Protein (CRP), α1-antitripsin, haptoglobin] regülasyonunda ana faktördür.[44] RA'lı hastalarda CRP, α1-antitripsin, fibrinojen, haptoglobin ve serum IL-6 düzeyi arasında pozitif bir korelasyon mevcuttur.[45]

Romatoid artrit patogenezinde T hücreleri, B hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve sitokinler gibi bir çok faktörün rol aldığı kompleks bir yapı söz konusudur.

2.1.3. KLİNİK DEĞERLENDİRME

2.1.3.1. TANI

Romatoid artritin tanı ve sınıflandırılması son olarak 1987'de yenilenen Amerikan Romatizma Derneği'nin (ARA) kriterlerine göre konulmaktadır.[46] Bu kriterler şunlardır:

1. Eklemlerde maksimal rahatlama olana kadar en az bir saat süren sabah tutukluğu
2. En az üç veya daha fazla eklemde doktor tarafından gözlenen yumuşak doku şişliği

3. Proksimal interfalangeal (PİF), metakarpofalangeal (MKF) veya el bileği eklemlerinin şişliği
4. Simetrik şişme
5. Romatoid nodüller
6. RF pozitifliği
7. Radyolojik değişiklikler

İlk dört kriterin en az 6 hafta devam etmesi gereklidir. Dört veya dörtten fazla kriterin varlığı RA tanısı koydurur.

2.1.3.2. BULGULAR

Romatoid artrit, alevlenme ve sessiz dönemlerle seyreden kronik bir hastalıktır. Erken dönemde, interfalangeal eklemlerde sabah katılığı, fleksiyon ve ekstansiyon sonrasında ağrı, sınırları belirgin eklem şişliği, kaba güçte azalma, yaygın artralji ve miyaljiler, subfebril ateş, terleme en sık şikayetlerdir.[47] Bunlara yorgunluk, kilo kaybı, anksiyete ve depresyon da eşlik edebilir.[48]

Romatoid artritteki esas olay eklem tutulumudur. En çok tutulan eklemlerin başında; MKF eklemleri, el bilekleri ve PİF eklemleri gelir. Bu eklemler %70-90 tutulur. Dizler, dirsekler ve metatarsofalangeal (MTF) eklemler de %60'ın üzerinde bir oranda tutulur. Eklem tutulumunun neticesinde özellikle ellerde çok çeşitli deformiteler meydana gelir.[28,29]

Tipik olarak eklemleri tutmasına karşın sistemik bir hastalık olduğu için ekstraartiküler bulgular da ortaya çıkar. Romatoid nodüller, vaskülitik deri lezyonları, perikardit, miyokardit keratokonjonktivitis sika, nöropatiler, anemiler ve amiloidoz gibi çok sayıda eklem dışı bulgu RA'da ortaya çıkabilir.

Laboratuvar incelemelerinde RA'ya özgün bir test yoktur. Eritrosit sedimentasyon hızı ve CRP yüksektir. Bu yükseklik hastalığın aktif dönemine işaret eder. Hastaların % 50'sinde anemi mevcuttur. % 70-80'inde ise RF pozitiftir. Yüksek RF titreleri genellikle kötü prognozu gösterir.[28]

2.1.4. TEDAVİ

Tedavinin ana amacı inflamasyonun olabildiğince erken baskılanması, fonksiyon kaybının en aza indirilmesidir. Tedavi sakatlığı önleyici ve düzeltici olmalıdır.

Genelde tedavinin ilk adımını semptomatik tedaviye yönelik Non Steroid Anti İnflamatuar (NSAİ) ilaçların kullanılması oluşturur. Bu ilaçlar hastalığı tedavi etmezler ancak ağrıyı ortadan kaldırarak hastada kısmi bir rahatlama sağlarlar. Bu amaçla NSAİ ilaçların yanında steroidler de kullanılabilir. Bunlarla birlikte erken dönemde tedavi edici ilaçlar da başlanır.[29] Eklemlerde kalıcı hasar oluşmadan önce erken dönemde agresif bir tedavi uygulanması çok önemlidir. Çünkü belirgin eklem hasarı ilk yılda oluşmaktadır.[49] Temel etkili ilaçlar olarak ilk tercih edilen ilaçlar klorokin veya hidroksiklorokin, metotreksat ve salazoprin'dir. Bunlar tek olarak kullanılabildikleri gibi ikili veya üçlü kombinasyonlar şeklinde de kullanılabilirler. Bu tedaviye yanıt alınamayan olgular da ise altın tuzları, azatioprin, D-penisilamin veya siklosporin kullanılabilir.[29]

Fizik tedavi ağrının giderilmesi, eklemlerin korunması ve stabilizasyonu, kasların güçlendirilmesi, fonksiyonlarının düzeltilmesi ve kontraktürlerin önlenmesinde önemli yere sahiptir. [28]

Gerekli durumlarda eklem rekonstrüksiyonu, eklem replasmanı ve yumuşak doku gevşetme operasyonu gibi cerrahi girişimler kullanılır.[28]

2.2. OKSİDATİF STRES VE SERBEST RADİKALLER

Oksidatif stres, oksidan ajanların üretimi ve organizmanın defans sistemleri arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilir.[50]

Oksidanlar; reaktif oksijen türleri, reaktif nitrojen türleri, sülfür merkezli radikaller ve diğer çeşitli radikalleri kapsar. Bu reaktif türlerin hepsi radikal değildir fakat radikallere dönüşerek biyomoleküllerin oksidasyonuna ve hücre hasarına neden olabilirler.[51]

Serbest radikaller en dış orbitalinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan kısa ömürlü bileşiklerdir. Bu nedenle kararsız bir yapıya sahip olduklarından organik ve inorganik moleküllerle kolaylıkla reaksiyona girebilirler.[52]

Serbest radikaller 3 yolla meydana gelirler.[53]

1. Kovalent olarak bağlı bir molekülün ayrılan her bir parçasında ortak elektronlarının birisi kalacak şekilde homolitik bölünmesi.

   X : Y ⟶ X• + Y•

2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı.

   X : ⟶ X• + e^-

3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi

   X + e^- ⟶ $X^{\bullet -}$

Aerobik canlılarda serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Hayat için gerekli olan kimyasal enerji ve ısı enerjisini sağlamak üzere karbondan zengin substratlar okside edilir. Bu olayda oksijen molekülünün indirgenmesi esnasında serbest oksijen radikalleri oluşabilir.[54]

2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri ve Reaktif Oksijen Türleri

Diradikal olarak isimlendirilen oksijen, iki tane eşleşmemiş elektrona sahiptir. Bundan dolayı diğer serbest radikallerle ve radikal olmayan maddelerle kolaylıkla reaksiyona girer. Oksijen moleküllerinin % 95-99'u oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondrial sitokrom oksidazlar ile suya dönüştürülmekte ve sonuçta ATP elde edilmektedir. Bu reaksiyonlar esnasında kısmi redüksiyonla reaktif ürünler oluşur. Bunlar, süperoksid radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalidir (•OH). Bazen reaktif oksijen metabolitleri içerisine singlet oksijen, hipoklorik asit, peroksinitrit ve hatta nitrik oksit de dahil edilir.[55,56] Bundan dolayı bu reaktif türlerin hepsini reaktif oksijen türleri (ROT) olarak isimlendirmek daha doğru görülmektedir.

Tablo 2.1: Reaktif Oksijen Türleri

Radikaller	**Gösterimi**	**Nonradikaller**	**Gösterimi**
Hidroksil	•OH	Peroksinitrit	$ONOO^-$
Alkoksil	L(R)O•	Hipoklorit	HOCl
Hidroperoksil	HOO•	Hidroperoksid	L(R)OOH
Peroksil	L(R)OO•	Singled Oksijen	ΔO_2
Nitrik oksid	NO•	Hidrojen Peroksid	H_2O_2
Süperoksid	$O_2^{\bullet -}$		

2.2.1.1. Süperoksid Radikali

Oksijen molekülünün bir elektron alıp indirgenmesi veya indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu ile süperoksid ($O_2•^-$) radikali oluşur. [1]

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2•^-$$

$$Fe^{+2} + O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + O_2•^-$$

Süperoksid bir serbest radikal olmakla birlikte kendisi direkt olarak fazla zarar vermez. Asıl önemi, hidrojen peroksit (H_2O_2) kaynağı ve geçiş metali iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır.[53] Spontan olarak veya enzimatik yolla dismutasyona uğrayabilir.[52] pH 4.8'de spontan dismutasyon çok hızlı iken nötral yada alkali pH'da enzimatik dismutasyon daha belirgindir.

$$2\ O_2•^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$O_2•^- + 2H^+ + e^- \longrightarrow H_2O_2$$

Süperoksid hem oksidan hem de redüktan özelliğe sahiptir.[3] Sulu çözeltilerde, askorbik asit ve tiyol gibi molekülleri zayıf olarak okside ederken sitokrom c gibi demir komplekslerini kuvvetli bir biçimde redükte eder. $O_2•^-$'nin protonlanmasıyla oluşan hidroperoksil radikali ($HO_2•$) $O_2•^-$'den daha kuvvetli oksidan ve daha kuvvetli redüktandır. Ancak fizyolojik pH'da çok küçük miktarlarda oluşur.[54]

Süperoksidin fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit ($NO_2•$), hidroksil radikali (•OH) ve nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşürler.[53]

2.2.1.2. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit; $O_2•^-$'nin dismutasyonu ile veya oksijen molekülüne ürat oksidaz, glukoz oksidaz ve D-aminoasit oksidaz gibi enzimler tarafından iki elektronun transferi ile direkt olarak oluşturulabilir. Zayıf oksidan, zayıf redüktan bir ajandır ve geçiş metali iyonlarının yokluğunda rölatif olarak stabildir. Yüksüz, kovalent bir yapıya sahiptir.[54] Membranlardan kolaylıkla diffüze olarak açığa çıktığı bölgeden çok uzak bölgelere yayılabilir.[57] Eşleşmemiş elektronu olmadığı için aslında bir radikal değildir. Esas önemi, $O_2•^-$ radikali veya Fe gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girerek hidroksil (•OH) radikalini oluşturmasıdır. •OH radikalinin oluştuğu bu reaksiyonlar; Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonudur.[58]

Fenton reaksiyonu:

$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow \bullet OH + OH^- + Fe^{+3}$

Haber-Weiss reaksiyonu:

$H_2O_2 + O_2\bullet^- \longrightarrow \bullet OH + OH^- + O_2$

Hidrojen peroksit; katalaz, glutatyon peroksidaz ve diğer bazı peroksidazların etkileriyle hücrelerden uzaklaştırılır.[54]

2.2.1.3. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali; suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması veya geçiş metallerinin varlığında H_2O_2'nin indirgenmesi ile meydana gelir.[54] •OH bilinen en potent okside edici ajanlardan biridir. Lipid peroksidasyonunu başlatabilir, DNA iplikçiklerini kırabilir ve hemen hemen tüm organik molekülleri okside edebilir.[56] Membran fosfolipidlerindeki poliansatüre yağ asitlerinin yan zincirleri ile reaksiyona girerek zincirdeki C atomundan H^+'i ayırır. Böylece lipid peroksidasyonunu başlatarak membranların yapısını bozar.[52] Tiyol ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton koparak yeni radikallerin oluşmasına neden olur.

$R\text{-}SH + \bullet OH \longrightarrow RS\bullet + H_2O$

$-CH_2- + \bullet OH \longrightarrow -CH\bullet - + H_2O$

2.2.1.4. Singlet Oksijen

Singlet oksijen (ΔO_2); oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak bir orbitalden diğerine geçmesi veya farklı orbitallerde farklı yönde dönmesi ile oluşur. Eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için bir serbest radikal değildir. Ancak serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olabileceğinden önem arz eder. ΔO_2, uyarılmış elektronların daha düşük enerji seviyelerine inmesi ile ışık yayar. Kimyasal bir bileşikle etkileşimi sonucu kemiluminesans meydana gelir ve bunun ölçülmesi ile reaktif oksijen türlerinin direkt tayini yapılabilir.[53]

2.2.1.5. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO•) ve nitrojen dioksit ($NO_2\bullet$) eşleşmemiş elektrona sahip olduklarından serbest radikal olarak kabul edilirler. $NO_2\bullet$; yoğun, kahverengi, zehirli bir gaz ve kuvvetli okside edici bir ajandır. NO• ise renksiz bir gaz ve zayıf redüktan ajandır. Zarlardan kolayca difüzyona uğrayabilir. Nörotransmisyon, kan pıhtılaşması ve

kan basıncının kontrolü gibi çeşitli fizyolojik işlevlerde rol oynar. Günümüzde NO•'nun vazodilatör bir faktör olan endotel kaynaklı gevşetici faktör olduğu anlaşılmıştır. Nitrik oksit sentaz tarafından, NADPH bağımlı bir tepkimeyle L-arjininden sentezlenir. Sentezi nitrik oksit sentazın Ca^{+2}-kalmodulinle etkileşmesiyle stimüle edilir. NO• dayanıklı olmayan bir moleküldür ve depolanmaz. $O_2•^-$ ile reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) serbest radikalini oluşturabilir. Güçlü bir oksidan olan peroksinitrit, asit pH'da metal katalizinden bağımsız olarak küçük miktarda •OH radikali oluşturabilir.[54]

$$ONOO^- + H^+ \longrightarrow \bullet OH + NO_2$$

2.2.1.6. Diğer Serbest Radikaller

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R•), peroksil radikalleri (ROO•), alkoksil radikalleri (RO•), tiol radikalleri (RS•) gibi serbest radikaller de meydana gelirler. Özellikle peroksil radikali poliansatüre yağ asitlerinden meydana gelen uzun yarılanma ömürlü önemli bir serbest radikaldir.[53]

2.2.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikaller hücrelerin fonksiyonları esnasında endojen kaynaklı olarak oluşabildikleri gibi eksojen kaynaklı olarak da meydana gelebilirler.

2.2.2.1. Serbest Radikallerin Endojen Kaynakları

Hücrelerin normal fonksiyonları esnasında küçük miktarlarda serbest radikaller oluşur. Bunlar hücrede bulunan enzimlerin etkisi ile oluşabildikleri gibi nonenzimatik yollarla da oluşabilirler.

Endojen serbest radikallerin kaynaklarını şu başlıklar altında toplayabiliriz.

1. Mitokondrial elektron transportu: Serbest radikallerin en büyük kaynağı elektron transport zinciridir. Mitokondri, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye eder. Ancak elektron transport zincirindeki pek çok bileşik (NAD, FAD, Koenzim Q) oksijen ile tepkimeye girerek $O_2•^-$ oluşumuna neden olabilir. Bu olay tek değerlikli oksijen kaçağı olarak isimlendirilir. Normal koşullarda bu kaçak hücrenin savunma sistemi ile ortadan kaldırılırken oksidan streslerin varlığında savunma sistemi yetersiz kalır ve mitokondrial hasar oluşur.[58]

2. Aktive olmuş fagositler: Nötrofil, monosit, makrofaj ve eozinofiller fagositoz sırasında büyük miktarlarda $O_2•^-$ radikali üretirler.[12] Oksijenin redüksiyonuyla oluşan

radikaller ($O_2\bullet^-$, H_2O_2 ve •OH) fagositik hücrelerin toksik özelliklerinden sorumludur. Ancak bunlar hücrelerin antioksidan kapasitelerini aştıkları zaman hücrelere zarar vererek çeşitli hastalıklara yol açarlar. Fagositik hücreler uyarıldıklarında lizozomal enzimlerin serbestleşmesi ve serbest radikallerin oluşumu ile birlikte mitokondri dışındaki oksijen tüketiminde bir patlama meydana gelir. Bu olayda NADPH oksidaz vasıtasıyla iki molekül $O_2\bullet^-$ oluşur.

$$2O_2 + NADPH \xrightarrow{\text{NADPH oksidaz}} 2\,O_2\bullet^- + NADP^+ + H^+$$

Süperoksid fagositik hücreler tarafından bakterisidal olarak kullanılan H_2O_2'ye dönüştürülür. H_2O_2, miyeloperoksidaz enzimi ile birleşerek bir kompleks oluşturur. H_2O_2 varlığında miyeloperoksidaz enzimi florür dışındaki halidlerin (klorür, iyodür, bromür) oksidasyonunu katalizler ve böylece okside halidler meydana gelir. Hipokloröz asitler olan hipoklorit (HOCl), hipoiyodit (HOI) ve hipobromit (HOBr) ile bunların tuzları güçlü oksidanlardır ve çeşitli hücre bileşenleri ile reaksiyona girerek bunları okside ederler. Fagositler oluşan bu oksidan ajanları çeşitli antioksidan sistemlerle ortamdan uzaklaştırırlar. Detoksifiye edilmeyen fagosit kaynaklı oksidanlar ototoksik, immünosupresif ve mutajenik etkiler gösterirler.[1,53]

3. Endoplazmik retikulum ve çekirdek membranlarına bağlı sitokromların (sitokrom P_{450} ve b_5) oksidasyonundan serbest radikaller oluşur. Oluşan radikaller ansatüre yağ asitlerini ve ksenobiyotikleri okside edebilir.[59] Sitokrom P_{450} alkol ve asetonla indüklendiği zaman aşırı miktarda $O_2\bullet^-$ üreten bir izoenzime dönüşür.[53]

4. Enzimatik reaksiyonlar: Birçok enzimin katalitik siklusları esnasında serbest radikaller açığa çıkar. Organizmada serbest radikal üreten en önemli enzimlerden biri ksantin oksidazdır (XO). XO enzimi (E.C.1.1.3.22) oksidoredüktazlar sınıfına giren bir flavoproteindir. Memeli hücrelerinde XO ve ksantin dehidrogenaz (XDH) enziminin ikisine birden ksantin oksidoredüktaz denir. Bu iki enzim aynı genin ürünüdür ve birbirine dönüşebilir. En fazla karaciğer ve barsaklarda olmak üzere böbrekler, beyin, plazma ve eritrositler gibi pek çok dokuda yaygın olarak bulunur. Sitozolik bir enzimdir. Pürin nükleotidlerinin katabolizmasında görev alır ve hipoksantinin ksantine, ksantinin ise ürik aside yükseltgenmesi reaksiyonunu katalizler.[60] Sağlıklı dokularda enzimin çoğu XDH şeklindedir. Ancak iskemi gibi patolojik durumlarda hücre zarının geçirgenliğinin bozulması ve hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun artmasıyla

kalsiyum bağımlı proteazların aktivasyonu neticesinde XDH, XO'ya dönüştürürlür. XDH, hipoksantini ksantine ve ksantini ürik aside dönüştürürken elektron alıcısı olarak daha çok NAD'yi tercih eder. Ancak XO elektron alıcısı olarak oksijeni kullanır.[61] Böylece hipoksantin ksantine ve ksantin de ürik aside dönüşürken $O_2\bullet^-$ ve H_2O_2 meydana gelir.[58] Heriki form da $O_2\bullet^-$ ve H_2O_2 üretebilir ancak XDH elektron alıcısı olrak NAD'yi daha çok tercih ettiği için serbest radikal oluşumunda primer sorumlu olan XO'dur.[61]

Aldehid oksidaz enzimi de $O_2\bullet^-$ oluşumuna neden olur. Ayrıca dihidroorotat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, aminoasid oksidaz ve triptofan dehidrogenaz gibi enzimler de $O_2\bullet^-$ oluşumuna neden olabilirler.[53]

5. Peroksizomlar çok önemli hücre içi H_2O_2 kaynağıdırlar. Buradaki D-aminoasid oksidaz, ürat oksidaz ve L-hidroksiasid oksidaz gibi oksidazlar H_2O_2 üretirler.[62]

6. Küçük moleküllerin otooksidasyonu: Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler, flavinler ve tetrahidropterinler gibi moleküller dioksijenin redüksiyonunu sağlarken primer olarak $O_2\bullet^-$ radikalinin oluşumuna neden olurlar.[58,62]

7. Plazma membranı: Membran fosfolipidlerinin fosfolipaz enzimiyle araşidonik aside dönüşmesi ve araşidonik asidin de lipooksijenaz ve siklooksijenaz gibi enzimlerle oksidasyonuyla serbest radikal ara ürünleri oluşur.[63]

8. Stres: Streste artan katekolaminlerin oksidasyonu da bir serbest radikal kaynağıdır.[53]

2.2.2.2. Serbest Radikallerin Eksojen Kaynakları

İyonize radyasyon, hava kirliliğine neden olan çeşitli kimyasal maddeler, sigara dumanı, antineoplastik ilaçlar (adriamisin, bleomisin, doksorobisin, donorobisin), pestisitler, anestezik ilaçlar, organik çözücüler gibi pek çok eksojen ajan serbest radikal oluşumuna kaynaklık edebilir.[62]

2.2.3. Serbest Radikallerin Etkileri

Oldukça reaktif moleküller olan serbest radikaller hücre bileşenleri ve hücre dışı makro moleküllerle etkileşerek organizmada yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olurlar.[62] Oksijen radikallerinin etkilediği hücre komponentlerinin başlıcaları; hücre

membranlarının ana bileşenleri olan yağ asitleri, proteinler, nörotransmitterler ve nükleik asitlerdir.[52]

2.2.3.1. Membran Lipidlerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Lipidler serbest radikal etkilerine en duyarlı hücre bileşenleridir. Biyolojik sistemlerde poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) serbest radikallerle oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak isimlendirilir. Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan kuvvetli bir oksidan radikalin zar yapısındaki PUFA zincirinin α-metilen gruplarından bir hidrojen atomunu uzaklaştırması ile başlar. Biyolojik sistemlerde bir çok radikalin lipid peroksidasyonuna neden olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte lipid peroksidasyonunu başlatan asıl ajan •OH radikalidir. [52,54]

Hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile karbon üzerinde eşleşmemiş bir elektron bulunduran bir lipid radikali meydana gelmiş olur.

$$LH + {\bullet}OH \longrightarrow L{\bullet} + H_2O$$

Yağ asidinde bir çift bağın varlığı çift bağın bitişiğindeki karbon atomundaki C-H bağını zayıflatır, böylece hidrojenin uzaklaşmasını kolaylaştırır. Bundan dolayı membran lipidlerinin PUFA yan zincirleri peroksidasyona daha duyarlıdır.

Eşleşmemiş elektron bulunduran karbon merkezli lipid radikali yapısındaki çift bağların yer değiştirmesi ve moleküler yeniden düzenlenme ile konjuge dienleri oluşturur. Daha sonra bu yapının oksijenle birleşmesiyle peroksil radikali oluşur.

$$L{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO{\bullet}$$

Bu radikal diğer yağ asitlerinden hidrojen atomlarını kopartabilir ve böylece bir zincir reaksiyonu başlatabilir. Peroksidasyon, eğer ortamda zincir reaksiyonunu sona erdirecek bir antioksidan (E vitamini gibi) bulunmazsa substratlar bitinceye kadar devam eder. Diğer yağ asitlerinden hidrojen alan peroksiller lipid hidroperoksidlerine dönüşür.[52,54,64]

$$LOO{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L{\bullet}$$

Lipid hidroperoksidleri fizyolojik sıcaklıklarda oldukça stabil moleküllerdir. Ancak geçiş metalleri ve metal kompleksleri varlığında lipid alkoksil (LO•) ve peroksil (LOO•) radikallerine dönüşürler.

$$LOOH + Fe^{+2} \longrightarrow Fe^{+3} + OH^{-} + LO\bullet$$

$$LOOH + Fe^{+3} \longrightarrow Fe^{+2} + H + LOO\bullet$$

Alkoksil ve peroksil radikalleri başka bir lipid substratından hidrojen çıkararak yeni zincir reaksiyonlarını uyarırlar.[52,54]

$$LO\bullet + LH \longrightarrow LOH + L\bullet$$

$$LOO\bullet + LH \longrightarrow LOOH + L\bullet$$

Lipid hidroperoksidleri yıkıldığı zaman aldehidler oluşurlar. Bu bileşikler metabolize edilmezlerse diffüze olarak hücrenin diğer bölümlerinde de hasara neden olurlar. Aldehidler; sitotoksik, hepatotoksik, mutajenik ve genotoksik özelliklere sahiptir.[52,62-64]

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda tiobarbütirik asidle ölçülebilen malondialdehid (MDA) meydana gelir. MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Böylece iyon transportu, enzim aktivitesi gibi membran özelliklerini bozar. MDA ölçümü lipid peroksid seviyelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılır.[53]

Biyolojik membranlardaki lipid peroksidasyonu iki şekilde meydana gelir. Araşidonik asit metabolizmasını sürdüren sikloksijenaz ve lipoksijenaz enzimlerinin etkisiyle oluşan tipine enzimatik lipid peroksidasyonu, diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise non-enzimatik lipid peroksidasyonu adı verilir.[53]

Lipid peroksidasyonu son derece zararlı bir zincir reaksiyonudur. Membran akışkanlığında kayıp, membran potansiyelinde azalma, hidrojen ve diğer iyonların permeabilitesinde artma ve sonuç olarak membranın rüptürü ile hücre ve organel içeriklerinin ortama boşalmasına neden olur. Bazı peroksid parçalanmalarının sitotoksik özellikleri de vardır.[54]

Hücre membranı yanında mitokondri gibi organellerin membranları da fosfolipidlerinde fazla miktarda doymamış yağ asidi bulundurmaları nedeniyle lipid peroksidasyonuna karşı duyarlıdır. Lizozomal membranların tahribi hidrolitik enzimlerin salınması ve intraselüler sindirimle sonuçlanır.[62]

2.2.3.2. Proteinler Üzerine Etkileri

Lipidlerden daha az olmakla birlikte proteinler de serbest radikallerden zarar görürler. Proteinlerin serbest radikal hasarına karşı duyarlılığı, yapılarını oluşturan aminoasidlerin bileşimlerine, proteinin aktivasyonundan veya fonksiyonlarının düzenlenmesinden sorumlu olan amino asidlerin yerleşimine ve hasar gören proteinin onarılabilme kapasitesine bağlıdır. Proteinler progresif olarak okside edildiklerinde çeşitli değişikliklere uğrarlar. Primer yapıyı oluşturan aminoasidlerdeki değişiklikler proteinlerin izoelektrik noktasını, katlanmalarını ve hidrofobik özelliklerini değiştirir.[65]

Yapılarında doymamış bağ ve sülfür bulunduran moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı daha yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitlerden zengin proteinler serbest radikal hasarından çok daha fazla etkilenirler. Prolin ve lizin aminoasidleri, $O_2\bullet^-$ radikali, H_2O_2 veya •OH radikali oluşturan reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler.[53]

Serbest radikal etkisiyle özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelirler. Yapılarında çok sayıda disülfid bağı bulunduran albumin ve Ig G gibi proteinler serbest radikal hasarına çok duyarlıdırlar. Serbest radikal reaksiyonlarına bağlı olarak yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler.[62] Hem proteinleri de serbest radikal hasarına duyarlıdırlar. Oksihemoglobin $O_2\bullet^-$ veya H_2O_2'ye maruz kaldığında methemoglobin oluşur.[53]

Enzimler protein yapısında olduklarından serbest radikallerden zarar görebilirler. Glutamin sentetaz, pirüvat kinaz, kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz gibi enzimlerin serbest radikal hasarına bağlı olarak fonksiyon kaybına uğrayabildikleri gösterilmiştir.[64,66]

2.2.3.3.Nükleik Asidler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller hücre çekirdeği ve DNA ile etkileşerek genotoksik ve mutajenik değişikliklere yol açarlar. Oksidatif hasar, DNA değişimi yapan mutajen faktörlerin muhtemelen en önemlisidir. Oksidan ajanlar, DNA'da deoksiriboz ve bazların oksitlenmesinden zincir kırılmasına kadar geniş bir yelpazede etki gösterebilir. •OH radikali oluşumu pürin ve pirimidinlerin modifikasyonuna veya DNA ipliklerinin kırılmasına neden olur. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan H_2O_2, membranlardan

kolayca geçebildiğinden dolayı DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta ölümüne neden olabilir. Serbest radikaller ayrıca DNA polimerazı da inhibe ederler.[52,62]

2.2.4. Serbest Radikal Hasarının Neden Olduğu Klinik Durumlar

Oksidatif hasarın etkileri pek çok hastalık grubunda araştırılmıştır. İnflamatuar hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, kistik fibrozis, metabolik hastalıklar, iskemik hastalıklar, AIDS, gastrik ülser, hipertansiyon, diabet, nörolojik hastalıklar, kanser gibi bir çok klinik durumda serbest radikal hasarı gösterilmiştir.[56,67-73]

2.2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikal hasarını önlemek amacıyla vücutta antioksidanlar olarak isimlendirilen savunma sistemleri bulunmaktadır. Antioksidan; düşük konsantrasyonlarda substratının oksidasyonunu geciktiren veya önleyen tüm maddelerdir.[54] Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonlarını engelleyerek lipid peroksidasyonunu inhibe eden ve/veya reaktif oksijen radikallerini tutan maddeler olarak da tarif edilebilir.[9]

Serbest oksijen radikalleri normal aerobik metabolizma esnasında sürekli olarak üretilir ve çeşitli biyolojik antioksidanlar tarafından ortamdan uzaklaştırılırlar. Ancak antioksidan koruma hiçbir zaman %100 etkinlikte değildir, bu nedenle hayatta kalma için tamir mekanizmalarının varlığı önemlidir. Prooksidanlarda artma veya antioksidanların başarısızlığı oksidatif stres durumunu oluşturur ve moleküler hasar ve doku zedelenmesiyle sonuçlanır.[54]

Hücre membranlarında meydana gelen serbest radikal hasarı antioksidanların etki mekanizmalarını anlamada örnek teşkil edebilir. Serbest radikallerin oluşturduğu lipid peroksidasyonunda antioksidanların kullandıkları mekanizmalar şu başlıklar altında toplanabilir:[54,74]

1. Oksijeni uzaklaştırmak veya lokal oksijen konsantrasyonunu düşürmek
2. Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırmak
3. $O_2\bullet^-$ ve H_2O_2 gibi anahtar reaktif oksijen türlerini uzaklaştırmak
4. Hidroksil, alkoksil, ve peroksil türleri gibi serbest radikalleri toplamak
5. Zincir reaksiyonlarını kırmak
6. Singlet oksijeni toplamak

Antioksidan savunma sistemleri; enzimatik ve nonenzimatik veya selüler ve ekstraselüler antioksidanlar olarak farklı şekillerde sınıflandırılabilir.

Selüler antioksidanlar; intraselüler antioksidanlar ve membran antioksidanları olarak sınıflandırılabilir. İntraselüler antioksidanlar, enzimatik antioksidanlardır ve radikal oluşumunu önlemek, oluşan radikallerin etkilerini durdurmak, radikallerin oluşturduğu oksidatif hasarı tamir etmek, hasarlanmış moleküllerin eliminasyonunu artırmak gibi fonksiyonları yerine getirirler.[54]

Membranda yerleşim gösteren antioksidanlar E vitamini ve β-karoten gibi lipofilik moleküller olup serbest radikallerle reaksiyona girerek biyolojik membranları lipid peroksidasyonundan korurlar.[62]

Ürik asit, bilirübin ve askorbik asit sitoplazmik yerleşim gösteren antioksidan etkili moleküllerden bazılarıdır.[62]

Serüloplazmin, transferrin, haptoglobin ve albumin hücre dışı antioksidanlar olarak serbest radikal hasarına karşı hücrenin korunmasına katkıda bulunurlar. Serüloplazmin bakır iyonlarını bağlayarak metal katalizli reaksiyonları kısıtlar ve demirin transferrine bağlanmasını kolaylaştırır. Transferrin demiri bağlayarak, haptoglobin serbest hemoglobini bağlayarak ve albumin ise bakırı bağlayarak antioksidan etki gösterir.[55,64]

Tablo 2.2. İntraselüler Antioksidanlar

Süperoksid dismutaz	$O_2•^-$'i katalitik olarak uzaklaştırır
Katalaz	Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2'yi uzaklaştırır
Glutatyon peroksidaz	Düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2'yi ve organik hidroperoksitleri uzaklaştırır
Sitokrom oksidaz	Oksijenin H_2O'ya indirgenmesi esnasında üretilen $O_2•^-$, •OH ve H_2O_2 gibi aktif oksijen türlerinin oluşumunun önlenmesinde görev alır

Tablo 2.3. Membran Antioksidanları

Vitamin E	Yağda çözünür, zincir kırıcı antioksidandır
β-karoten	Yağda çözünür, radikal tutar ve singlet oksijeni giderir
Koenzim Q antioksidan	Enerji metabolizmasındaki major rolüne ek olarak antioksidan olarak etki gösterebilir

Tablo 2.4. Ekstraselüler Antioksidanlar

Transferin	Ferrik iyonları bağlar
Laktoferrin	Düşük pH'da ferrik iyonları bağlar
Haptoglobin	Hemoglobini bağlar
Hemopeksin	Hemi bağlar
Albumin	Bakırı ve hemi bağlar
Serüloplazmin	Bakır iyonlarını bağlar ve $O_2^{\bullet -}$'yi toplar
Ektraselüler SOD	$O_2^{\bullet -}$'i katalitik olarak uzaklaştırır
Ekstraselüler GPx	H_2O_2'yi ve organik hidroperoksitleri uzaklaştırır
Bilirübin	Peroksil radikallerini tutar
Mukus	•OH radikalini tutar
Ürik asit	Radikal tutucudur
Glukoz	•OH radikalini tutar
Askorbik asid	•OH radikalini tutar

2.2.5.1. Süperoksid Dismutaz (SOD)

Süperoksid dismutaz enzimi ilk defa 1968'de McCord ve Fridrovich tarafından sığır eritrositlerinden izole edilmiştir. Bu enzim tüm aerobik hücrelerde yaygın olarak bulunur ve fizyolojik pH'da $O_2^{\bullet -}$'nin dismutasyonunu katalizleyerek lipid peroksidasyonuna karşı hücreleri korur. $O_2^{\bullet -}$'nin SOD katalizinde dismutasyonu spontan dismutasyonundan yaklaşık 10 000 kat daha hızlıdır.[1,53,75]

$$O_2\bullet^- + O_2\bullet^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

İnsan, bitki ve mikro organizma hücrelerinde enzimin birkaç izoformu tespit edilmiştir. Bu izoformlar yapılarının farklı olmasına ve aktif bölgelerinde farklı geçiş metal iyonu bulundurmalarına karşın aynı reaksiyonu katalize ederler.[76] İnsanlarda SOD enziminin üç ayrı tipi bulunur. Bunlar mitokondrial, sitozolik ve ekstraselüler formlardır. Sitozolik ve ekstraselüler form aktif bölgesinde Cu,Zn bulundururken mitokondriyal form Mn bulundurur.[74,77] E.coli'de aktif bölgesinde Fe bulunduran farklı bir form ortaya konmuştur.[56]

Sitozolik Cu/ZnSOD memeli hücrelerinde en fazla bulunan izomerdir. Enzimin aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur.

Ekstraselüler SOD (EC-SOD) ilk defa Marklund tarafından saflaştırılmıştır. EC-SOD Cu ve Zn içermesine rağmen sitozolik SOD'dan farklıdır. Molekül ağırlığı daha büyük olup glikoprotein yapıdadır. EC-SOD'ların biyolojik rolleri tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Bazı EC-SOD'ların hücre yüzeyinde heparine bağlı olduğu gösterilmiş ve oksidanlara karşı yüzey koruyucu olabileceği düşünülmüştür.[74]

Mn-SOD, mitokondrilerde bulunur ve her biri bir manganez atomu içeren dört alt üniteden oluşur.[78] Bir çok insan kanserlerinde Mn-SOD'un azaldığı gösterilmiştir ve çoğu vakada aktivitedeki bu azalma defektif gen ekspresyonunun sonucu olarak değerlendirilmiştir. Proteinlerin katalitik aktiviteleri ve stabiliteleri de Mn-SOD tarafından değiştirilebilir.[56]

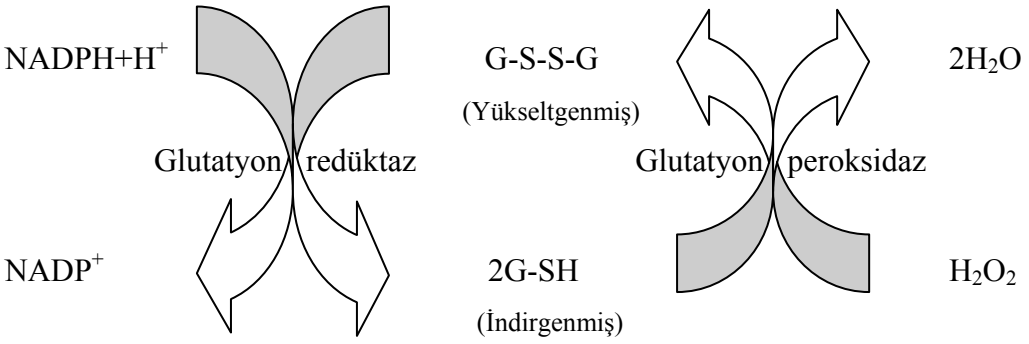
Süperoksid dismutaz $O_2\bullet^-$ radikalini ortamdan uzaklaştırarak hücreleri oksidatif hasardan korur. $O_2\bullet^-$ anyonu, Cu^{+2} ve enzimin bir arjinin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda $O_2\bullet^-$'den bir elektron Cu^{+2}'ye transfer olurken Cu^{+1} ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir $O_2\bullet^-$ Cu^{+1}'den bir elektron alır. Sonuçta iki $O_2\bullet^-$ radikali ortamdan uzaklaştırılırken H_2O_2 meydana gelir.[53]

$$SOD\text{-}Cu^{+2} + O_2\bullet^- \longrightarrow SOD\text{-}Cu^{+1} + O_2$$
$$SOD\text{-}Cu^{+1} + O_2\bullet^- + 2H^+ \longrightarrow SOD\text{-}Cu^{+2} + H_2O_2$$

2.2.5.2. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz, hidroperoksitleri indirgeyerek etki gösteren antioksidan bir enzimdir.[3] Molekül ağırlığı yaklaşık 85.000 Da olan enzim dört selenyum atomu ihtiva eden tetramerik bir yapıdadır. Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz da (PLGSH-Px) selenyum atomu bulunduran monomerik sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksidlerini alkollere indirger. Membran antioksidanlarının en önemlilerinden biri olan E vitamini yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranı peroksidasyondan korur.[53]

GPx, H_2O_2 ve diğer hidroperoksidleri indirgerken glutatyonun redükte formunu kullanır. Redükte glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz aracılığıyla okside glutatyondan (GSSG) elde edilir. (Şekil 2.1) Normal hücrelerde glutatyon redüktaz enziminin aktivitesinden dolayı GSH/GSSG oranı oldukça yüksektir.[53]



Şekil 2.1: Redükte Glutatyonun Oluşumu

Hücrelerdeki H_2O_2'in uzaklaştırılması hem GPx hem de katalaz enzimi aracılığıyla gerçekleştirilir. Ancak GPx düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında etkili iken katalaz daha yüksek konsantrasyonlarda etki gösterir. Bu sebeple GPx hücrelerde oluşan H_2O_2 ve lipid peroksidlerini ortamdan uzaklaştırmada daha etkilidir. Bu şekilde lipid peroksidasyonunu önleyerek biyolojik membranların yapı ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli bir rol üstlenir.[62,77,79]

2.2.5.3. Katalaz

Katalaz, başta karaciğer olmak üzere tüm organlarda bulunan antioksidan bir enzimdir. Plazma, serebrospinal sıvı ve sinoviyal sıvı gibi ekstraselüler sıvılarda katalaz

çok az veya hiç yoktur. Özellikle peroksizomlarda, daha az oranda da sitozol ve mikrozomal bölümde bulunur. Katalaz dört tane alt birimden oluşur ve her alt birim aktif bölgesinde bir hem grubu taşır. H_2O_2'yi, oksijen ve suya parçalayarak antioksidan etki gösterir.[53,74,3]

2.3. HÜCRE MEMBRANI ve Na^+/K^+ ATPaz

2.3.1. HÜCRE MEMBRANI

İster prokaryotik ister ökaryotik olsun tüm hücreler, hücreyi sınırlayan ve hücre içeriğini çevre dokudan ayıran bir plazma membranı tarafından sarılmıştır. Moleküllerin geçişinde seçici bir bariyer olan plazma membranı, spesifik moleküllerin hücre içi veya dışına hareketini düzenleyerek sitoplazmanın kompozisyonunu belirler. Ayrıca membranın yapısındaki bazı proteinler hücreler arası etkileşimleri kontrol etme ve hücreye gelen çevresel sinyalleri alma fonksiyonlarını yürütür.[3,80,81]

Plazma membranının yapısını ortaya koymak için 1972 yılında Singer ve Nicholson tarafından ileri sürülen sıvı-mozaik zar modeli günümüzde hala geçerliliğini korumaktadır.[82] Bu modele göre membranlar; asimetrik, akışkan bir fosfolipid çift tabakasında yayılmış olan integral proteinlerden oluşmuştur ve membranın dış yüzeyine yerleşmiş az sayıda karbohidrat molekülü içerirler. Fosfolipid çift tabakası arasına gömülmüş olan proteinler hücrelerin birbirini tanımasını ve moleküllerin selektif transportunu sağlar. Fosfolipid çift tabaka yapısı kararlı olmasına rağmen, her bir fosfolipid ve sterol molekülü zar düzleminde serbest olarak hareket eder. Çoğu zar proteinleri bir lipid denizinde yüzer gibi davranır. Zar lipidleri gibi proteinler de ikili tabaka düzleminde lateral olarak serbest bir biçimde hareket ederler.

Membranlardaki karbohidratlar, glikolipid ve glikoprotein olarak bulunur ve membran kitlesinin yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Bu karbohidratlar glukoz, galaktoz, mannoz, N-asetilgalaktozamin, N-asetilglukozamin ve sialik asidi içerir. Membran karbohidratları hücrelerin birbirini tanımasını ve adhezyonunu sağlar ayrıca reseptör olarak görev alır.[81]

2.3.1.1. Membran Lipidleri

Memeli hücrelerindeki plazma membranlarının üç major lipid komponenti şunlardır: gliserofosfolipidler (fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin),

sfingolipidler (sfingomiyelin, serebrosidler, gangliosidler) ve kolesterol.[83] Gliserofosfolipidler ve sfingomiyelin, fosfolipidler başlığı altında toplanır.

Fosfolipidler fosforillenmiş bir alkol grubunun oluşturduğu polar bir baş kısmı ve buna bağlı nonpolar iki yağ asidi zincirinden oluşmuştur. Hidrofilik ve hidrofobik kısımlara sahip olmalarıyla çift tabakalı yapıyı oluştururlar. Hidrofilik polar baş kısımları çift tabakanın dış yüzeylerine yerleşirken hidrofobik yağ asidi zincirleri iç kısımda yer alırlar. Fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin ve sfingomiyelin plazma membranlarının 4 major fosfolipidini oluşturur ve çoğu membranlardaki lipidlerin yarıdan fazlasını teşkil eder. Fosfolipidler membran çift tabakasının iki yarısı arasında asimetrik olarak dağılmıştır. Plazma membranının dıştaki yaprağı başlıca fosfatidil kolin ve sfingomiyelin içermesine karşın içteki yaprağı predominant olarak fosfatidil etanolamin ve fosfatidil serin içerir.[84] Fosfatidil inositol de plazma membranının içteki yarısında lokalize olmuş bir fosfolipittir. Kantitatif olarak minor bir membran komponenti olmasına karşın sinyal iletiminde önemli bir rol oynar. Fosfatidil serin ve fosfatidil inositolün baş grupları negatif yüklüdür. Bunlar içteki yaprakta predominant olduklarından plazma membranının sitozolik yüzeyi negatif yüklüdür.[80]

Glikolipidler plazma membranının yalnızca dış yaprağında bulunurlar ve karbohidrat kısımları hücre yüzeyinde yerleşir. Plazma membranın yalnızca %2'sini oluşturduklarından minor membran bileşeni olarak kabul edilirler.[80]

Fosfolipid çift tabaka, membranların temel özelliklerinden olan seçici geçirgenlik ve esneklik özelliklerini sağlar. Fosfolipid çift tabakanın iç kısmı hidrofobik yağ asidi zincirleri tarafından oluşturulduğundan dolayı suda çözünen moleküllere geçirgen değildir. Çoğu fosfolipidin yağ asitleri bir veya daha fazla çift bağa sahiptir. Bu çift bağlar hidrokarbon zincirinde kıvrımlar oluşturur ve bunların bir araya gelip paketler oluşturmalarını önler. Hidrokarbon zincirleri membran içinde serbestçe hareket eder böylece membranların elastikiyeti sağlanmış olur. Fosfolipidlerde bulunan yağ asitlerinin uzunlukları ve doygunluk dereceleri membranın akışkanlığını değiştirir. Zincir uzunluğunun ve doygunluk derecesinin artması akışkanlığı azaltır ve membran daha viskoz bir hal alır.[80]

Membranın yaklaşık %32'si fosfolipidlerden ve %11'i kolesterolden oluşmuştur. Kolesterol membranda esterleşmemiş yani serbest halde bulunur. Membrandaki fosfolipid-kolesterol etkileşimleri membran akışkanlığı bakımından önemlidir. Kolesterol/fosfolipid oranının artması membranın akışkanlığını azaltır.[85] Bunun yanında kolesterol sıcaklığa bağlı olarak membran akışkanlığında farklı etkiler gösterir. Yüksek sıcaklıkta fosfolipid, yağ asidi zincirlerinin dönme hareketlerini kısıtlayarak membranın dıştaki parçasının akışkanlığını ve küçük maddelere geçirgenliğini azaltır. Buna karşın düşük sıcaklıkta yağ asidi zincirlerinin çok düzenli paketler şeklinde bir araya gelmelerini önleyerek membran akışkanlığını artırır ve membranların donmasını önler.[3,80]

Son çalışmalar lipidlerin plazma membranının tüm yüzeyine serbestçe yayılmadığını bunun yerine aralıklı membran bölgelerinin kolesterol ve sfingolipidlerle zenginleştirilmiş olduğunu göstermiştir. Bu sfingolipid ve kolesterol kümelerinin plazma membranı içinde lateral olarak hareket eden ve spesifik membran proteinleri ile ilişkili olabilen tabakalar oluşturduğu düşünülmektedir. Lipid tabakalarının fonksiyonları tam olarak anlaşılamamasına rağmen hücre iletişiminde ve endositozla ekstraselüler moleküllerin hücre içine alınmasında görev alabilecekleri düşünülmektedir.[83,86]

2.3.1.2. Membran Proteinleri

Lipidler membranların temel yapısal elemanı olmasına karşın proteinler spesifik fonksiyonların yerine getirilmesinden sorumludur. Çoğu plazma membranlarının ağırlığının yarısı protein yarısı ise lipidlerden oluşmuştur. Proteinler lipidlerden daha büyük olduklarından dolayı bir protein molekülüne karşılık yaklaşık 50-100 lipid molekülü bulunur.[80]

Membran proteinlerinin birçoğu spesifik hücre membranlarının üzerinde veya içinde yerleşmiş olan enzimlerdir. Diğerleri ise moleküllerin membran içinden transportunu sağlayan veya hormon ve büyüme faktörleri için reseptör olan proteinlerdir.[81]

Membranda bulunan proteinler integral ve periferal membran proteinleri olarak ayrılır. Periferal proteinler, aşırı yüksek veya düşük pH'lı veya yüksek tuz konsantrasyonuna sahip çözeltilerle, lipid çift tabakaya zarar vermeden kolayca zardan

ayrılabilmelerine karşın integral proteinlerin membrandan ayrılabilmeleri için lipid çift tabakasının bozulması gereklidir.[3]

Periferal membran proteinleri lipid çift tabakasının hidrofobik kısmının içine girmez. Primer olarak membranın sitoplazmaya bakan tarafında yerleşmişlerdir ve suda çözünen proteinlerdir. Bu proteinlerin hidrofilik kısımları membran lipidlerinin polar baş gruplarına hidrojen bağları ve elektrostatik etkileşimlerle bağlıdır. Periferal proteinler zara bağlı enzimlerin fonksiyonlarının düzenlenmesini veya integral proteinlerin hücre içi yapılara tutunmalarını sağlarlar.[87]

İntegral membran proteinleri lipid çift tabakasının içine gömülmüş ve membran lipidlerinin hidrokarbon zincirleri ile etkileşim halindedirler. Bunlar ancak hidrofobik etkileşimleri önleyen deterjanlar, organik çözücüler veya denatüre edici ajanlarla membrandan ayrılabilirler.[3,87]Katalitik aktivite için gerekli ligant bağlama bölgesi ve karbohidrat veya lipidlerin bağlanması için spesifik bölgeler içerebilirler. Bazıları kısmen membran içine gömülü oldukları halde birçoğu transmembran proteinidir. Transmembran proteinleri membranın her iki yüzeyi ile ilişkili olacak şekilde lipid çift tabakasını boydan boya katederler. Bunlar genellikle membran içindeki kısımları 20-25 hidrofobik aminoasid (lösin, izolösin, valin ve fenilalanin gibi) içeren, α heliks yapısında ve hücre yüzeylerinde kalan kısımlarına oligosakkarit bağlı olan glikoproteinlerdir.[80,81]

Eritrositler ile yapılan çalışmalar hem periferik hem de integral membran proteinleriyle ilgili çok sayıda bilgi sağlamıştır. İnsan eritrosit membranları yaklaşık bir düzine major protein içerir. Bu proteinler membran örneklerinin jel elektroforezi ile tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre iskeletini oluşturarak hücreye şeklini veren periferal membran proteinleridir. Eritrositlerin major hücre iskelet proteini spektrindir. Diğer periferik membran proteinleri de aktin, ankirin ve band 4.1'dir. Spektrin; jel elektroforezinde band 1 ve band 2 olarak görülen polipeptid zincirlerinden oluşmuştur. Bu zincirler α ve β zincirleri olarak bilinirler. Spektrin, iki heterodimerden oluşan tetramerik bir yapıya sahiptir. Ayrıca yüksek moleküler ağırlıklı oligomerik formlarının da bulunduğu bildirilmiştir.[88] Ankirin; spektrin ve band 3'ü birbirine bağlayarak plazma membranı ve hücre iskeleti arasındaki ilişkiyi sağlar.[80]

Eritrositlerin iki major integral membran proteini olan glikoforin ve band 3 transmembran proteinlerdir. Glikoforin; 131 aminoasid içeren, yarısı protein yarısı karbohidrat olan küçük bir glikoproteindir. Hücre dışında kalan amino terminal ucu, transmembran bölgesi ve hücre içinde kalan karboksil terminal segmenti olmak üzere üç kısımdan oluşur. Membran boyunca uzanan tek bir α heliks ile membranı çaprazlar ve membran yüzeyinde bulunan amino terminal ucu glikozillenmiştir. Glikoforinin aminoasid dizisi ve yapısı iyi bilinmesine karşın fonksiyonu aydınlatılamamıştır.[80]81,85) Band 3 proteini, 929 aminoasitten oluşmuş bir polipeptid zinciridir ve membranı boydan boya geçen 14 α heliks bölgesine sahiptir. %5-8 oranında karbohidrat içerir. Bikarbonat (HCO_3^-) ve klor (Cl^-) iyonlarının membrandan geçişinden sorumludur.[80]

Eritrosit iskeletini oluşturan bu proteinlerin yanında, eritrosit membranı enzim yapısında proteinler de içerir. Na^+/K^+ ATPaz da bu proteinlerden birisidir.

2.3.1.3. Membranlardan Maddelerin Transportu

Plazma membranı hücre için gerekli maddelerin girişi ve artık ürünlerin atılmasına izin verirken aynı zamanda hücre içi ve dışı ozmotik ve elektriksel dengeyi de sağlar. Bu fonksiyonları gerçekleştirmek için üç çeşit transport sistemini kullanır. Bunlar: pasif difüzyon, kolaylaştırılmış transport ve aktif transporttur.[3]

Moleküllerin plazma membranını geçebildiği en basit mekanizma pasif difüzyondur. Burada molekül, herhangi bir proteinin katkısı olmadan, fosfolipid çift tabaka içinde çözünerek, konsantrasyonunun yüksek olduğu taraftan düşük olduğu tarafa doğru geçer.[87]

Kolaylaştırılmış difüzyonda da moleküller konsantrasyon farkına bağlı olarak hareket ederler, ancak membrandan geçiş proteinler aracılığı ile gerçekleştirilir. Kolaylaştırılmış difüzyona aracılık eden proteinler: taşıyıcı proteinler ve kanal proteinleridir. Taşıyıcı proteinler, spesifik molekülleri bağlar ve yapısal bir değişikliğe uğrayarak molekülü membranın diğer tarafına bırakır. Kanal proteinleri ise membran içinde açık delikler oluşturarak uygun büyüklük ve yükteki tüm moleküllerin geçişine izin verir.[80]

Konsantrasyon gradiyentine karşı moleküllerin taşınması gerektiği zaman aktif transport gerçekleşir. Aktif transportta moleküller enerji harcanarak taşınır. Bu enerji

ATP'den elde edilir ve bazı hücreler ATP içeriklerinin %30-50'sini aktif transport için harcarlar.[89] Aktif transportun en iyi bilinen örneği plazma membranı boyunca Na^+ ve K^+ gradientinin sağlanmasıdır. Hücre dışında Na^+ 145mM ve K^+ 4mM iken; sitoplazmada Na^+ 12mM ve K^+ 140mM'dır. Na^+'un hücre dışına atılması konsantrasyon gradiyentine ve elektriksel potansiyel gradiyentine karşı hareketini gerektirir. Bu olay Na^+/K^+ ATPaz enzimi aracılığı ile gerçekleştirilir.[90-92]

2.3.2. Na^+/K^+ ATPaz

Na^+/K^+ ATPaz; tüm memeli hücrelerinin membranlarında bulunan ve Na^+/K^+ pompası veya Na^+ pompası olarak da isimlendirilen bir integral membran proteinidir.[81] Hücre membranının iki tarafındaki iyon gradientlerinin düzenlenmesi ve korunmasından sorumlu ana proteindir ve bu nedenle membran potansiyelinin ve osmotik dengenin korunması için mutlaka gereklidir.[93]

İlk olarak 1957 yılında Skou tarafından yengeç sinirlerinde bulunmuş ve hücre membranlarında Na^+ ve K^+ iyonları ile simultane bir şekilde uyarılan, kardiak glikozidler tarafından spesifik olarak inhibe edilen bir ATPaz aktivitesi olarak tanımlanmıştır.[94]

Na^+/K^+ ATPaz; P tip ATPazların bir üyesidir. P tip ATPazlar; sarkoplazmik retikulum ve plazma membranında bulunan Ca^{+2} ATPazlar, mide ve kolonda bulunan H^+/K^+ ATPaz ve bazı prokaryotik transport enzimlerini içerir.[95] Bu enzimler benzer yapı ve katalitik siklusları paylaşırlar.[96,97] Bütün P tipi ATPazların amino asit dizilerinde, özellikle de fosforillenen aspartat aminoasidinin çevresinde benzerlikleri vardır ve hepsi fosfat analoğu olan vanadat inhibisyonuna duyarlıdır.[87]

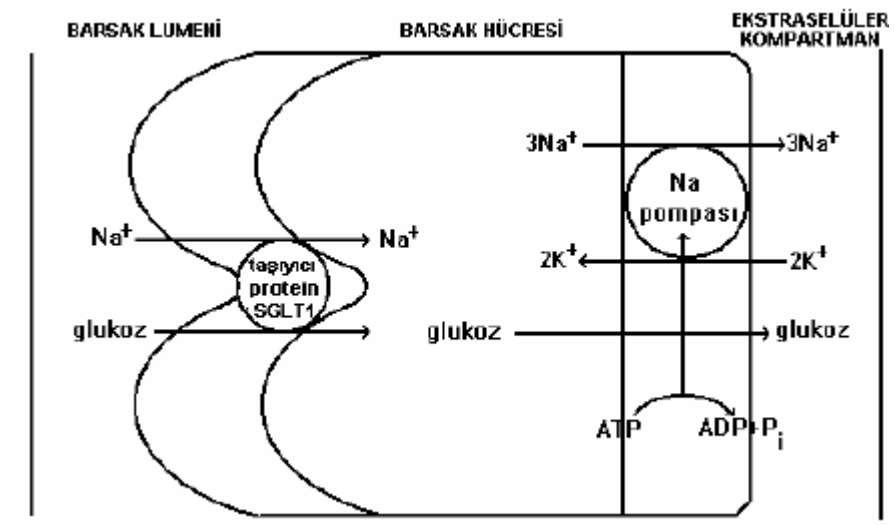
Na^+/K^+ ATPaz ile 3 tane Na^+ iyonu hücre dışına pompalanırken buna karşılık 2 tane K^+ iyonu hücre içine alınır. Bu transport hücre zarında hem kimyasal hem de elektriksel bir gradiend oluşturur.[3] Bu olay esnasında bir ATP hidroliz edilir. Dinlenme halindeki bir insanda kullanılan ATP'nin yaklaşık olarak % 23'ünün Na^+/K^+ ATPaz tarafından tüketildiği tahmin edilmektedir.[95]

Na^+/K^+ ATPaz'ın oluşturduğu kimyasal ve elektriksel potansiyel organizmada bir çok fonksiyonun yürütülmesinde görev alır. Bu fonksiyonları şu başlıklarda toplayabiliriz.

1. Bu elektriksel gradiend istirahat hücre potansiyellerini oluşturur. Kas ve sinir hücrelerinin uyarılabilmeleri için repolarizasyonunu sağlar.[95,98,99] Polarize epitelyal hücrelerin yapı ve fonksiyonlarının düzenlenmesinde de Na^+/K^+ ATPaz önemli bir rol oynar.[100]

2. Osmotik basıncın dengelenmesini ve hücre hacminin korunmasını sağlar. Sitoplazmada makromoleküller, aminoasitler, şekerler ve nükleotidleri içeren organik moleküller yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Eğer bu solid yük dengelenmezse su, osmoz ile hücre içine kontrolsüz olarak dolacak ve hücre şişecektir. Gerekli olan dengeleme Na^+/K^+ ATPaz'la oluşturulan iyon gradienti ile sağlanır. Ayrıca Na^+'un hücre dışına atılması hücre içini negatif yapar, bu da hücre içine Cl^- 'un spontan girişine karşı bir engel oluşturur.[80]

3. Bağırsak epitel hücrelerinde glukoz ve belirli aminoasitlerin emilimini sağlar. Bağırsak epitel hücrelerinin apikal yüzündeki mikrovilluslarda Na^+ hücre içine girerken aynı zamanda glukozu da hücre içine alır. Bu işlem için hücre içi Na^+'un dışarıdan daha düşük olması gerekir, bu da Na^+/K^+ ATPaz tarafından sağlanır.[87](Şekil 2.2)



Şekil 2.2: Na^+/K^+ATPaz Aracılığıyla Bağırsak Epitel Hücrelerinden Glukozun Emilimi

4. Renal Na^+ reabsorbsiyonunun % 99'undan fazlasını sağlar ve renal oksijen tüketiminin çok büyük kısmından sorumludur. Na^+; apikal membrandaki amilorid-duyarlı Na^+ kanalları ile hücre içine girer ve bazolateral membrandaki Na^+/K^+ATPaz yoluyla hücre dışına çıkarken K^+ hücre içine girer. [92,101]

5. Monosakkarit ve aminoasitler gibi bir çok molekülün Na^+'a bağlı taşınmasına indirekt olarak aracılık eder.[102]

2.3.2.1. Na^+/K^+ ATPaz'ın Yapısı

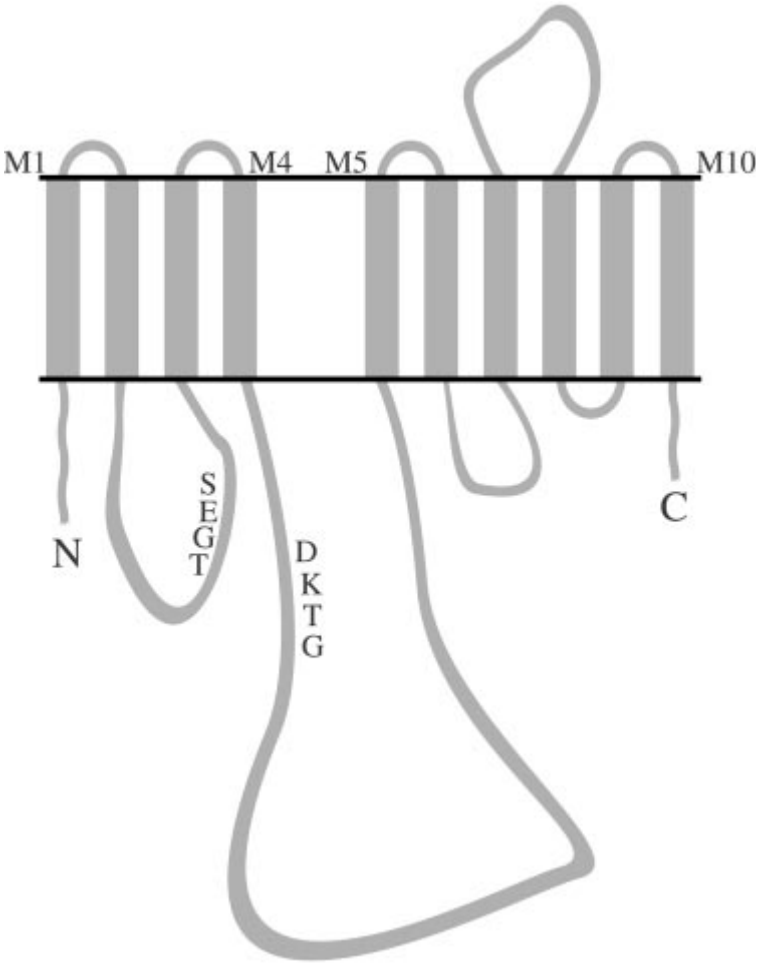
Enzimin 1957 yılında tanımlanmasından sonra işleyişinin anlaşılması ve enzimin saflaştırılması için bir çok çalışma yapılmış ve ilk olarak beyinden daha sonra da tavşan böbreğinden başarıyla saflaştırılmıştır.[103,104]

Na^+/K^+ ATPaz iki alt üniteden oluşmuş heterodimerik bir integral membran proteinidir.[101] Bu alt üniteler enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu olan α alt ünite ve başlıca yapısal fonksiyonları yürüten glikozile β alt ünitedir.[95,105] γ olarak isimlendirilen üçüncü bir alt ünite de daha sonraki yıllarda ortaya konmuştur.[106,107]

Na^+/K^+ ATPaz'ın biyosentezi ile ilgili yapılan deneyler her alt ünitenin kendisine ait bir mRNA'sı olduğunu ve birbirlerinden bağımsız olarak sentez edildiklerini ortaya koymuştur.[108] Endoplazmik retikulumda α ve β alt üniteler sentez sırasında veya sentezden hemen sonra birleştirilmektedir.[109] Her iki alt ünitenin endoplazmik retikulumdan dışarı çıkması diğeriyle birleşmiş olmasına bağlıdır.[110] Birleştirilmeyen alt üniteler endoplazmik retikulumda kalır.[111]

α alt ünitesi yaklaşık olarak 1000 aminoasitten oluşmuştur ve molekül ağırlığı 110 kDa'dur. Enzimin katalitik zincirini oluşturur ve enzimatik aktiviteyi sağlar. ATP bağlanma bölgesi, fosforilasyon bölgesi, katyonların ve kardiyak glikozitlerin bağlanması için gerekli olan aminoasit bölgesini içerir.[95,112-114] α_1, α_2, α_3, α_4 olmak üzere dört farklı izoformu tanımlanmıştır.[105] Bu izoformların aminoasit dizilimleri birbirlerinden küçük farklılıklar gösterir ve bu da küçük fonksiyon değişikliklerine neden olur.[115] α_1 izoformu major formu oluşturur. Bir çok dokuda bulunur, böbrek ve çoğu epitel hücrelerinin major veya tek formudur.[105] α_2 iskelet kasında prodominant olmakla birlikte beyin ve adipoz dokuda da bulunabilir. Ayrıca küçük miktarda kalpte de vardır.[95] α_3 izoformu ise özellikle nöral ve kardiyak dokuda bulunur.[95] α_4 izoformu en çok doku spesifitesi gösteren formdur. Testiste, spesifik olarak da spermatozoada lokalize olur ve inhibe edildiğinde sperm motilitesinin kaybolduğu gösterilmiştir.[105] α alt ünitesi Na^+/K^+ ATPaz'ın ilk olarak aminoasid dizisi belirlenen ve klonlanan parçasıdır.10 transmembran segmenti (M) vardır. Ekstraselüler bölge ile ilişkili 5

parçası bulunur ve bunlar kısa segmentlerdir. Bu sebeple enzim hücre içi enzimi olarak kabul edilir.[105] (Şekil 2.3)



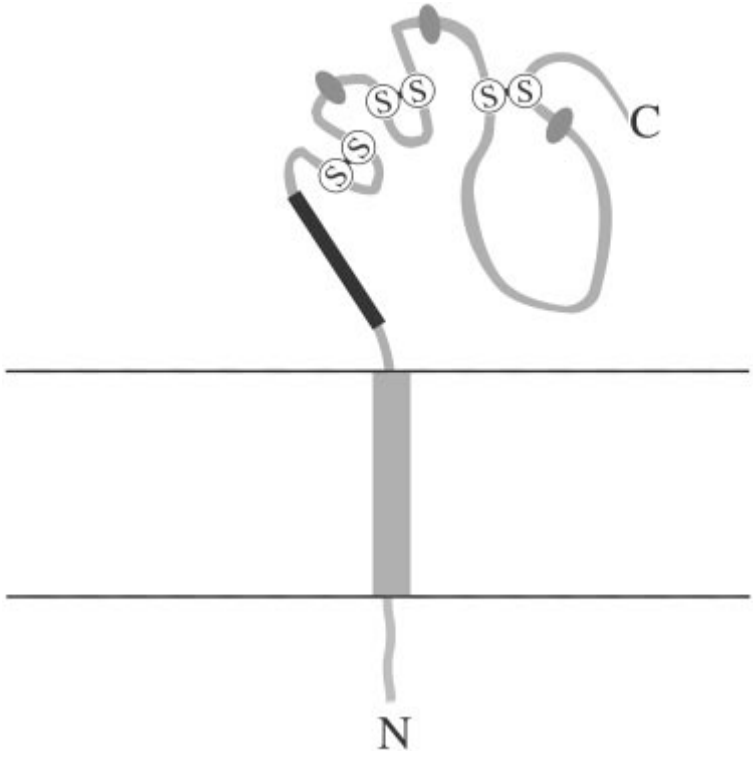
Şekil 2.3: α Alt Ünitesinin Şematik Gösterimi

M7 ve M8 arasında bulunan ekstraselüler kısım (loop) daha uzundur. Bu bölge β alt ünite ile ilişkili önemli bir temas bölgesidir. İntraselüler kısımda ise M4M5 loop 430 aminoasit içeren en uzun bölgedir. Burası nükleotid bağlama bölgesi ve fosforilasyon bölgesini oluşturur.[95,105] N-terminal ucu 90 aminoasit içerir. M2M3 loop ise 120 aminoasitten oluşur ve N-terminal uç ile birlikte enzimin aktivasyonunu başlatır. Yapılan araştırmalar M2M3 bölgesinin pompanın çalışmasında düzenleyici bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. M5M6 loop katyon bağlama bölgesidir.[105]

β alt ünite molekül ağırlığı yaklaşık olarak 55 kDa olan glikozile membran proteinidir. N terminal ucu sitoplazmada bulunur. Membranı bir kez kateden tek bir

transmembran bölgesi ve glikozile büyük bir ekstraselüler segmenti vardır.[95,105,116] 4 izoformu rapor edilmiştir.[105] β_1 ve β_2 memeli hücrelerinde predominant izoformlardır. β_1 yaygın olarak bulunurken β_2 çoğunlukla nöral dokularda bulunur.[95,117] β_3 izoformu iskelet kası, akciğerler ve beyinde gösterilmiştir.[118] α alt ünite iyonlar, ligantlar ve ATP için major bağlanma bölgelerine sahip iken β alt ünite pompanın iyon transport fonksiyonunun düzenlenmesine ve ligantlar için bağlanma bölgelerinin oluşturulmasına katkıda bulunur.[119,120]

β alt ünite 370 aminoasitten oluşmuştur. Yaklaşık olarak 30 aminoasitlik kısmı sitozolde yer alırken 300 aminoasitlik kısmı ekstraselüler bölgededir. Ekstaselüler bölgede 3 tane N-glikozilasyon bölgesi bulunur. Ayrıca 3 disülfür köprüsü yer alır. (Şekil 2.4) Bunlar β alt ünitenin uygun bir biçimde katlanması ve fonksiyon görmesi yanında α alt ünite ile etkileşimi için de gereklidir.[121] Ekstraselüler bölgedeki disülfür köprülerinin bozulması enzimatik aktivitede kayba neden olur.[122]



Şekil 2.4:β Alt Ünitenin Şematik Gösterimi

Yapılan çalışmalar enzimin aktivitesi için her iki alt ünitenin de gerekli olduğunu göstermiştir. β alt ünite pompalama mekanizmasının belli basamaklarında

fonksiyon görebilse de asıl fonksiyonu yapısaldır.[112,123,124] β alt ünite, α alt ünitenin membranda uygun bir biçimde yerleşmesi için gereklidir.[105] Enzimin alt ünitelerinin birbirinden ayrılması aktivitesinin kaybolmasına neden olur.

γ alt ünite molekül ağırlığı yaklaşık olarak 7-12 kDa olan küçük, hidrofobik bir proteolipittir. Na^+/K^+ ATPaz'daki fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Katalitik aktivite veya iyon transportu için gerekli olmadığı yalnızca kinetik bir regülatör gibi fonksiyon gördüğü düşünülmektedir.[106,107]

2.3.2.2. Na^+/K^+ ATPaz'ın İşleyişi

Na^+/K^+ ATPaz her bir ATP hidrolizi ile 2 K^+ iyonunu hücre içine alırken 3 Na^+ iyonunu hücre dışına pompalar. Pompa işlevinde ATP hidrolizi ve iyon transportu aynı anda gerçekleşir. Reaksiyonların tümü pompanın çeşitli konumlarına göre birbirini izler. Pompa işlevi Na^+'a bağlı fosforilasyon ve K^+'a bağlı defosforilasyon olmak üzere iki basamaktan oluşmaktadır.[103]

İlk basamakta enzimin şekli Eı olarak adlandırılmaktadır. Na^+ ve Mg varlığında ATP, ADP'ye hidroliz olurken serbest kalan fosfat, enzimin aspartat rezidüsüne aktarılmaktadır. Fosforlanmış enzim E2 şekline dönüşürken 3 Na^+ iyonu hücre dışına pompalanır.

$$E + ATP \longrightarrow E\text{-}P + ADP$$

İkinci basamakta eğer ortamda K^+ varsa E-P kompleksi hidroliz edilmekte ve defosforilasyon gerçekleşmektedir. İki K^+ iyonu hücre içine alınırken enzim başlangıçtaki E1 şekline geri döner. Sonuçta bir ATP molekülünün hidrolizi ile üç Na^+ iyonu hücre dışına çıkarken iki K^+ iyonu hücre içine girer.

$$E\text{-}P + H_2O \longrightarrow E + Pi$$

2.3.2.3. Na^+/K^+ ATPaz'ın Doku Dağılımı ve Aktivitesinin Regülasyonu

Na^+/K^+ ATPaz tüm hücrelerde bulunmasına karşın dokulardaki yoğunluğu birbirinden büyük oranda farklılık gösterir. En yüksek konsantrasyonda bulunduğu beyin dokusunda, en düşük konsantrasyonda bulunduğu eritrosit hücresine göre 160 000 kat daha yüksek oranda bulunur. Vasküler düz kasta iskelet kası ve kalbe oranla

yaklaşık yüz kat daha düşük konsantrasyonlardadır.[125,126] Na^+/K^+ ATPaz'ın izoformlarının dağılımı da farklı doku ve hastalıklarda değişkenlik gösterir.[127,128] Pompa ekspresyonunun selüler regülasyonu pompanın alt ünitelerinin sentez hızı ile kontrol edilir. Çevresel ve hormonal faktörler başlıca iki mekanizmayla hücrelerdeki Na^+/K^+ ATPaz aktivitesini artırabilir:

1. Kısa süreli regülasyon: Membranda var olan enzimin turnover sayısını artırarak[129]
2. Uzun süreli regülasyon: Enzim alt ünitelerinin sentezini artırarak[130,131]

Kısa süreli regülasyon dakikalar veya saatler içerisinde gerçekleşir. Protein kinaz A (PKA), Protein kinaz C (PKC) veya Protein kinaz G (PKG) ile pompanın fosforilasyonu yoluyla turnover hızı düzenlenerek daha hızlı veya daha yavaş iyon transferi sağlanır.[129] İntraselüler sodyumun arttığı durumlar ile hormon ve büyüme faktörlerinin stimülasyonunun pompa turnoverini artırdığı bilinmektedir.[132-134] İnsülin, İnsulin-like Growth Factor (IGF-1) ve katekolaminler Na^+/K^+ ATPaz aktivitesini artırabilirler.[90,91] Sıçan iskelet kasında yapılan çalışmalar Na^+/K^+ ATPaz üzerine insülinin stimüle edici etkisinin Protein kinaz C aktivasyonuyla düzenlendiğini göstermektedir.[90] Katekolaminler aktif Na^+, K^+ transportunun stimülasyonunu insülinden daha belirgin şekilde indükler.[90]

Uzun süreli regülasyonda ise tiroid hormonları, adrenal steroidler, egzersiz ve K^+ eksikliği rol oynar.[90,91,135] Na^+/K^+ ATPaz aktivitesindeki bu düzenlenme günler içerisinde ortaya çıkar ve enzimin sentez hızındaki değişiklikten kaynaklanır.

Na^+/K^+ ATPaz spesifik olarak oubain ve digoksin gibi kardiyak glikozitler tarafından inhibe edilir. Bu özellik kullanılarak enzimin fizyolojik ve klinik rolünün anlaşılması sağlanmıştır. Na^+/K^+ ATPaz'ın oubain ile inhibisyonu enzim üzerindeki glikozid reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirilir.[103,104,136] Kardiak glikozidler Na^+/K^+ ATPaz'ın defosforilasyon reaksiyonunu inhibe ederler böylece enzim inhibisyonunu sağlamış olurlar.[92]

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Örneklerin Hazırlanması

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Romatoloji Kliniğinde Amerikan Romatizma Derneğinin 1987 kriterlerine göre RA tanısı ile takip edilen 28 hasta çalışma kapsamına alındı.

Hastaların 19 tanesi kadın ve 9 tanesi erkek olup yaş ortalamaları 44.3 ± 12.8 idi. Hastaların tamamı ilk defa RA tanısı alan, daha önce hiçbir tedavi uygulanmayan ve şikayetlerinin başlangıcından itibaren bir yıldan az süre geçmiş olan kişilerdi. Kontrol grubu 14 tanesi kadın ve 6 tanesi erkek toplam 20 tane sağlıklı bireyden oluşturuldu. Yaş ortalamaları 42.1 ± 9.9 idi. Hasta ve kontrollerde solunum hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve endokrinopatiler (diabet, tiroid fonksiyon bozuklukları) yoktu. Sigara ve alkol kullanmıyorlardı.

Hasta ve kontrol grubunun tamamından 12 saatlik açlık sonunda 10 ml venöz kan örneği alınarak K_3EDTA'lı ve antikoagülansız vacutainer tüplere aktarıldı. Alınan kan örnekleri önce 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ve serumları ayrıldı. Serum örneklerinden CRP düzeyleri çalışıldı. Plazmaları ayrıldıktan sonra tüplerde kalan eritrositler 3 kez izotonik NaCl solüsyonuyla yıkanarak eritrosit paketi elde edildi. Bunun 0.2 ml alındı ve üzerine 1.8 ml distile su eklenerek antioksidan enzimleri çalışmak üzere hemolizat oluşturuldu ve -80 ^{o}C'de çalışma zamanına kadar saklandı. Geri kalanından ise eritrosit membranı elde edildi.

Eritrosit membranları Wood ve Beutler'e göre hazırlandı.[137] İzotonik NaCl ile yıkanarak elde edilen eritrosit paketinden 1.5 ml alınarak polietilen santrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine 10 ml buz soğukluğunda hemoliz solusyonu ilave edildi. Ultrasantrifüjde, -4 ^{o}C'de, 16000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir biçimde uzaklaştırıldı. Dipte kalan membranlar bir dakika vortekslendi. Bu işlemler renksiz membranlar elde edilinceye kadar dört sefer aynı şekilde tekrar edildi. En son elde edilen şeffaf membranlara 1 ml Tris-EDTA tamponu eklenerek protein ve inorganik fosfat (Pi) tayini için kullanılmak üzere -80 ^{o}C'de saklandı.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Çalışmamızda kullandığımız cihazlara ve kimyasal maddelere ait bilgiler Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edilen firmalar

Kimyasal madde	**Temin edilen firma**
İzotonik Sodyum klorür (NaCl)	Eczacıbaşı-Baxter
Potasyum klorür (KCl)	Merck
Magnezyum klorür ($MgCl_2$)	Merck
Etilen diamin tetra asetik asit tuzu (Na_2EDTA)	Merck
Tris (hidroksimetil aminometan)	Merck
Oubain ($C_{29}H_{44}O_{12}\ 8H_2$)	Serva
İmidazol (NHCH:NCH:CH)	Merck
Adenozin trifosfat (Na_2ATP)	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck
Trikloro asetik asit (TCA)	Merck
Bovin serum albumin	Merck
Glutatyon, redükte form($GSH,C_{20}H_{32}N_6O_{13}S_2$)	Sigma
Glutatyon redüktaz (GR, EC 1,6,4,2)	Sigma
Ksantin oksidaz (XO, EC 1,1,3,22)	Sigma
Nitro blue tetrazolium ($C_{40}H_{30}C_{12}N_{10}O_6$)	Sigma
NADPH, tetra sodyum tuzu, redükte form	Sigma
Ksantin ($C_5H_4NaO_2$)	Sigma
Bovin serum albumin	Sigma
Hidroklorik asid (HCl)	Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Tiyobarbütirik asid (TBA)	Merck
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Merck
Potasyum siyanür (KCN)	Fischer
Potasyum ferrisiyanid ($K_3Fe(CN)_6$)	Fischer
Potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4)	Fischer

Tablo 3.2: Kullanılan Alet ve Cihazlar

Cihazlar	Ait olduğu firma
Santrifüj (soğutmalı)	Heraeus 4600, Germany
Ultrasantrifüj (soğutmalı)	Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter
Hassas terazi	Sartorius AG Gottingen Tip No: BA 3105, Germany
Distile su cihazı	Easypure RF Compact Ultrapure Water System, USA
Derin dondurucu	Sanyo Ultra Low, Sanyo Electric Co Ltd, Japan
Su banyosu	Nüve BM 101, Nüve Malz. San. Lm ve Tic. AŞ, Ankara
Magnetik karıştırıcı	Labincol 32, Netherlands
Karıştırıcı	Vortex-Genie , Model K550-GE Massachusetts, USA
pH Metre	Jenway 3010 pH Meter, UK
Otomatik pipet	Finpipette Labsystems, Finland
Spektrofotometre	Beckman DU 500, USA

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Na^+/K^+ ATPaz Aktivitesinin Ölçümü

Prensip: Na^+, K^+, Mg^+ iyonlarının varlığında ATP'nin oubain duyarlı hidrolizi sonucu ortaya çıkan inorganik fosfatın (Pi) miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine bağlı olarak Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi belirlendi.

Kullanılan Reaktifler:

● % 0.9 NaCl

● Hemoliz çözeltisi:10^{-4} M Na_2EDTA ve 7.10^{-3} M Tris, pH 7.4

● Standart reaksiyon karışımı: 5 mmol/L KCl, 150 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L $MgCl_2$, 20 mmol/L imidazol, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Oubain. Standart reaksiyon karışımından bir kısım da Oubain kullanmadan aynı şekilde hazırlandı.

● Start reaktifi: 2.5 mmol/L Na_2ATP

● Stop reaktifi: %15 TCA

● Stok fosfat standardı: 878.8 mg/L KH_2PO_4

● Kombine çözelti: 20 mmol/L sodyum molibdat, 82 mmol/L nitrik asid, 100 mg/L trietanolamin

● Bovin serum albumin : Pi tayini için 0.1 mg/ml ve protein tayini için 1 mg/ml

● CBB: Commasie brillant blue, 100mg CBB G-250 % 95 etil alkolde çözülür, 100 ml % 85 fosforik asit eklenir ve hacmi 1 lt'ye tamamlanır.

Deneyin yapılışı: Muriel ve Mourellanan alınan metoda göre ölçüm yapıldı.[138]

Membran süspansiyonundan 0.5 ml alınarak üzerine 600 µL standart reaksiyon karışımı eklendi. İyice karışmaları sağlanan örnekler 37 ^{o}C'lik su banyosunda 10 dakika inkübasyona bırakıldı. 0.1 ml Na_2ATP eklenerek reaksiyon başlatıldı ve 1 saat boyunca 37^{o}C'de inkübe edildi. Sonra soğuk su banyosuna alınan örneklere 1 ml %15 TCA ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatanttan 1 saat içinde Pi tayini yapıldı. Bu işlemler Oubainli ve Oubainsiz standart reaksiyon karışımı için ayrı ayrı yapıldı. Elde edilen fark mg protein başına 1 saatte açığa çıkan µmol Pi miktarını verdi. Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi µmol Pi/mg pr*h olarak ifade edildi.

İnorganik fosfat tayini: Munoz'a göre yapıldı.[139]

Standart grafiğinin çizilmesi:

Stok fosfat standardından sırasıyla 0, 0.25, 0.50, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 ml tüplere konuldu. Üzerlerine 6 ml 0.1 mg/ml bovin serum albumin eklendi. Toplam hacimleri distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. 390 nm'de absorbansları ölçüldü ve buna göre standart Pi grafiği çizildi.

Numunelerin çalışılması:

Numune, numune körü ve reaktif körü olmak üzere üç tüp hazırlandı. Bu tüplere Tablo 2.3'de belirtilen miktarlarda reaktif eklendi. 10 saniyelik inkübasyondan sonra 390 nm'de absorbansları okutuldu. Numunenin absorbansından numune körü ve reaktif körünün absorbansları çıkartıldı ve gerçek absorbanslar elde edildi. Standart Pi grafiğinden faydalanılarak Pi değerleri hesaplandı.

Tablo 3.3: Pi ölçüm prosedürü

	Numune(ml)	Kombine çözelti	Distile su
Reaktif körü	-	3	0.2
Numune körü	0.2	-	3
Numune	0.2	3	-

Protein tayini: Protein tayinleri Bradford metoduna göre yapıldı.[140]

Prensip: Negatif yüke sahip olan Commasie Brillant Blue G-250 (CBB)'nin proteinlerdeki pozitif yüklü bölgelere bağlanması ile oluşan mavi renkli kompleksin 595 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanır.

Standart grafiğinin çizilmesi:

1mg/ml konsantrasyonda hazırlanan bovin serum albuminden sırasıyla 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μL tüplere konuldu. Üzerlerine 5'er ml CBB eklendi. 595 nm'de absorbansları okutuldu ve buna göre standart grafiği çizildi.

Numunelerin protein miktarlarının ölçülmesi:

0.1 ml numune üzerine 5 ml CBB çözeltisi ilave edildi. 10 dakika inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbansları okutuldu. Absorbansları yüksek olan numuneler 1/10 oranında dilüe edilerek çalışıldı. Elde edilen absorbanslardan standart protein grafiği yardımıyla protein miktarları belirlendi.

3.2.2. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Prensip: GPx enzimi H_2O_2'yi suya indirgerken aynı zamanda GSH'ın da GSSG'ye yükseltgenmesini katalize eder. Burada oluşan GSSG, glutatyon redüktaz enzimi ile tekrar GSH'a indirgenir ve aynı zamanda NADPH da NADP'ye dönüşür. Bu reaksiyonlar esnasında NADPH'ın NADP'ye dönüşmesi spektrofotometrik olarak 340 nm'de absorbans azalışı olarak kaydedilir. Birim zamanda elde edilen absorbans azalışı kullanılarak GPx aktivitesi hesaplanır.[141]

Kullanılan Reaktifler:

- Fosfat tamponu: 50 mM EDTA'lı, pH 7.5
- GSH: 150 mM
- Glutatyon redüktaz
- NADPH: 8.4 mM
- NaN_3**:** 1.125 M
- H_2O_2 **:** 2.2 mM

Deneyin yapılışı:

Paglia ve Valentinden alınan metoda göre GPx aktivitesi belirlendi. -80 ^oC'de sakladığımız hemolizatlar çözdürüldükten sonra tablo 2.4'de belirtilen şekilde deney gerçekleştirildi.

Tablo 3.4: GPx çalışma prosedürü

Fosfat tamponu	2.650 ml
GSH	0.100 ml
NADPH	0.100 ml
NaN_3	0.010 ml
Glutatyon redüktaz	0.010 ml
Numune	0.020 ml
Tüpler iyice karıştırıldı ve 37 ^oC'de 30 dakika inkübe edildi	
H_2O_2	0.100 ml

Reaktiflerin tamamının eklenmesinden sonra numunelerin 340 nm'de 3 dakikalık absorbans değişimleri spekrofotometrede ölçüldü.

Hesaplama:

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A \times 10^6}{\varepsilon} \times DF$$

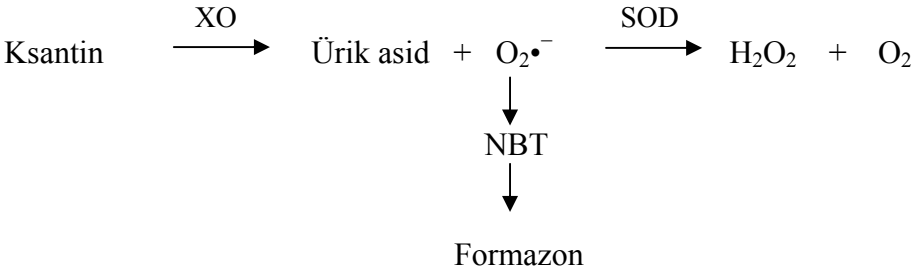
ΔA: Dakikadaki absorbans değişimi
ε : NADPH'ın 340 nm'deki molar absorbtivite katsayısı ($6{,}22 \times 10^3$)
DF: Dilüsyon faktörü
10^6: Molü mikromole çevirmek için katsayı

Spesifik aktivite:

$$\text{GPx (IU/grHb)} = \frac{\text{GPx (U/L)}}{\text{Hemoglobin (gr/lt)}}$$

3.2.3. Cu/Zn Süperoksid Dismutaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Prensip: Reaksiyon ortamına eklenen XO enzimi ile üretilen $O_2\bullet^-$ radikallerinin nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgemesi ile meydana gelen mor renkli bir bileşik olan formazonun absorbansının 560 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.[142] Bu reaksiyonun şiddeti numunede bulunan Cu/ZnSOD enziminin aktivitesine bağlıdır. Ortamda ne kadar çok enzim bulunursa NBT ile reaksiyona girecek $O_2\bullet^-$ anyonu o kadar azalır dolayısıyla meydana gelen rengin şiddeti azalır.



Kullanılan Reaktifler:

● Ölçüm reaktifi: 0.3 mM Ksantin, 0.6 mM EDTA, 150 μM NBT, 0.4 M Na_2CO_3, 1gr/L BSA

● Ksantin oksidaz: 167 U/L

● $(NH_4)_2SO_4$: 2M

Deneyin Yapılışı:

-80 ^oC'den alınarak çözdürülen numunelerden Sun ve ark..'dan alınan metoda göre Cu/ZnSOD enzim aktivitesi çalışıldı.[142] Kör tüpü ve numune tüplerine Tablo 2.5'te belirtilen reaktifler aktarılarak ölçüm yapıldı.

Tablo 3.5: Cu/ZnSOD Çalışma Prosedürü

	Numune tüpü	Kör tüpü
Ölçüm reaktifi	2.45 ml	2.45 ml
Numune	0.100 ml	—
Bidistile su	—	0.100 ml
XO	0.050 ml	0.050 ml
Tüplerin iyice karışması sağlandı ve 25 ^oC'de 20 dakika inkübe edildi		

20 dakika sonunda inkübasyondan alınan numunelerin 560 nm'deki absorbansları ölçüldü.

Hesaplama:

NBT'nin indirgenme hızındaki % 50'lik inhibisyon 1 SOD ünitesi olarak kabul edildi. Aşağıdaki formüller kullanılarak Cu/ZnSOD aktivitesi hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kör absorbansı} - \text{Numune absorbansı}}{\text{Kör absorbansı}} \times 100$$

$$\text{Enzim Aktivitesi (U/L)} = \frac{\% \text{ İnhibisyon}}{50 \times \text{Numune hacmi (L)}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/gHb)} = \frac{\text{SOD (U/L)}}{\text{Hemoglobin (gr/L)}}$$

3.2.4. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Prensip: Deney ortamına eklenen H_2O_2'nin numune içinde bulunan katalaz tarafından ortamdan uzaklaştırılması esasına göre ölçüm yapılır. H_2O_2'nin spektrofotometrik olarak 240 nm'deki absorbans azalışı kaydedilir.[143]

Kullanılan Reaktifler:

- Fosfat Tamponu: 50 mM, pH 7
- H_2O_2

Deneyin Yapılışı: Numuneler -80 ^{o}C'den alınarak çözdürüldükten sonra deney tüplerinin her birine 0.100 ml olacak şekilde aktarıldı. Fosfat tamponunun 240 nm'deki absorbansı H_2O_2 ile 0.500'e ayarlandı. Numunelerin üzerine 2.99 ml fosfat tamponu eklenerek 240 nm'de absorbansları okutuldu. Kör olarak fosfat tamponu kullanıldı.

Hesaplama: Bir dakikada 1μmol H_2O_2'yi ortamdan uzaklaştıran katalaz aktivitesi 1 ünite olarak kabul edildi.

3.2.5. Ksantin Oksidaz Aktivitesinin Ölçümü

Prensip: Substrat olarak ortama eklenen ksantinin numune içinde bulunan XO enzimi ile ürik aside dönüştürülmesi ve spektrofotometrik olarak absorbansının 293 nm'de ölçülmesi esasına göre XO aktivitesi tayin edildi.[144]

Kullanılan Reaktifler:

- Ksantin: 4 mM
- Ürik asit standardı: 10 mM
- Fosfat Tamponu: 50 mM, pH 7.5
- TCA: %100

Deneyin Yapılışı: Numuneler -80 ^{o}C'den alınarak çözdürüldü. Tablo 2.7'de belirtilen miktarlarda reaktifler tüplere aktarılarak deney gerçekleştirildi.

Tablo 3.6: Ksantin Oksidaz Ölçüm Prosedürü

	Numune körü	Numune	Standart körü	Standart
Fosfat tamponu	2.80 ml	2.80 ml	2.85 ml	2.80 ml
Ksantin	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Numune	–	50 µL	–	–
Standart	–	–	–	50 µL
37 ^{o}C'de 30 dakika inkübe edilir.				
Numune	50 µL	–	–	–
TCA	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml

TCA ilavesinden sonra tüpler iyice karıştırılarak 4500 rpm'de 15-20 dakika santrifüjleme yapıldı. Berrak süpernatanın 1 ml'si alınarak yavaşça küvete aktarıldı ve 293 nm'de absorbansları okutuldu.

Hesaplama: Kullandığımız ürik asit standardının konsantrasyonu ve absorbans değerinden faydalanılarak hesaplama yapıldı.

3.2.6. MDA Miktarının Ölçümü

Prensip: Tiyobarbutirik asit ve MDA'nın 95 ^{o}C'de inkübasyonu esnasında oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de verdiği absorbansın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.[145]

Kullanılan Reaktifler:

- Fosfat Tamponu: pH 7.4
- Butylated hydroxytoluene (BHT): %0.88
- TCA: %30
- EDTA: 0.1 M
- Tiyobarbitürik asit (TBA): %1
- NaOH: 0.05 N

Deneyin Yapılışı: -80 ^{o}C'de saklanan numuneler buradan alınarak çözdürüldü. Daha sonra Tablo 2.8'de gösterilen miktarlarda reaktifler eklenerek MDA tayini yapıldı.

Tablo 3. 7: MDA Ölçüm Prosedürü

	Numune	Kör
Fosfat tamponu	0.8 ml	0.8 ml
Numune	0.2 ml	–
BHT	0.025 ml	0.025 ml
TCA	0.5 ml	0.5 ml
Tüpler iyice karıştırıldı. 4 ^{o}C' de 2 saat inkübe edildikten sonra 2000 g'de 15 dk santrifüj edildi ve kapaklı tüplere aşağıdaki pipetlemeler yapıldı.		
Süpernatant	1 ml	1 ml
EDTA	0.075 ml	0.075 ml
TBA	0.25 ml	0.25 ml
95 ^{o}C'de 15 dk inkübe edildi.		

15 dakikalık inkübasyon sonrası tüpler oda ısısına gelecek şekilde soğutuldu. 532 nm ve 600 nm'de olmak üzere iki farklı dalga boyunda köre karşı numunelerin absorbansları okutuldu. 600 nm'de ölçülen absorbanslar 532 nm'deki absorbanslardan çıkarıldı ve sonuçlar hesaplandı.

Hesaplama:

$$\text{MDA } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{Absorbans} \times 10^{6}}{1.52 \times 10^{5}} \times \text{SK}$$

1.52×10^{5}: Molar absorbtivite katsayısı
SK: Seyreltme katsayısı
10^{6}: Molü mikromole çevirme katsayısı

3.2.7. CRP Miktarının Ölçümü

Serum CRP tayini hazır ticari kitler kullanılarak Dade Behring BN ProSpec. analizöründe nefelometrik olarak yapıldı.

3.2.8. Hemoglobin Tayini

Prensip: Hemoglobindeki Fe^{+2} ferrisiyanid tarafından methemoglobindeki Fe^{+3}'e yükseltgenir. Daha sonra potasyum siyanür ile methemoglobin stabil siyanomethemoglobine dönüştürülür. Siyanomethemoglobinin 540 nm'deki

absorbansının ortamdaki hemoglobin miktarı ile doğru orantılı olmasından faydalanılarak hemoglobin miktarları belirlenir.[146]

Kullanılan Reaktifler:

● Drabkin Reaktifi.1.2 mM $K_3Fe(CN)_6$, 1.6 mM KCN, 23.8 mM $NaHCO_3$

● Siyanomethemoglobin standardı: 80 mg/dL

Deneyin yapılışı:

0.2 ml eritrosit süspansiyonu alınarak buz soğukluğunda 1.8 ml distile su ile 1/10 oranında seyreltilerek hemoliz edildi. Daha sonra Tablo 2.9'da belirtilen şekilde hemoglobin tayini yapıldı.

Tablo 3.8: Hemoglobin Ölçüm Prosedürü

	Numune	Standart	Kör
Drabkin reaktifi	5 ml	5 ml	5 ml
Hemolizat	0.02 ml	-	-
Standart	-	0.02 ml	-
Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon yapılır.			

İnkübasyon sonrası 540 nm dalga boyunda köre karşı absorbanslar okutuldu.

Hesaplama:

$$\text{Hemoglobin (gr/dL)} = \frac{\text{Numunenin absorbansı}}{\text{Standardın absorbansı}} \times C \times SK \times 10^{-3}$$

C: 80 mg/dL
SK: seyreltme katsayısı
10^{-3}: mg/dL'yi gr/dL'ye çevirme katsayısı

3.3. İstatistiksel Analizler

Araştırma sonuçları ortalama değer ± standart sapma (x ± SD) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki farkın önemlilik derecesi İndependent T Test ile belirlendi. İstatistik hesaplamalar için SPSS 11.5 istatistik paket programı kullanıldı ve $p<0.05$ değeri anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamıza Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları ABD Romatoloji Kliniğinde RA tanısı konan 28 hasta ve herhangi bir hastalığı bulunmayan 20 sağlıklı gönüllü dahil edildi. 12 saatlik açlık sonrası hastalardan kan örnekleri alındı. K_3EDTA'lı tüplere alınan tam kandan elde edilen eritrosit hemolizatlarında MDA seviyeleri, Cu/ZnSOD, GPx, katalaz ve XO aktiviteleri ölçüldü. İzole edilen eritrosit membran örneklerinde Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi belirlendi. Serum örneklerinde ise CRP düzeyleri tespit edildi. Elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 4.1'de özetlendi.

Tablo 4. 1. Hasta ve Kontrol Numunelerinde Ölçülen Parametrelere ait Ortalama, Standart Sapma ve İstatistiksel Olarak Anlamlılık Değerleri.

Parametreler	**Kontrol Grubu** n=20, x ± SD	**RA'lı Grup** n=28, x ± SD	**p**
MDA (nmol/grHb)	6.54 ± 0.36	8.84 ± 0.60***	0.0001
Cu/ZnSOD (U/grHb)	1.72 ± 0.24	1.41 ± 0.48**	0.009
GPx (U/grHb)	63.38 ± 16.97	51.23 ± 13.23**	0.008
Katalaz (k/grHb)	42.79 ± 9.32	37.45 ± 9.49	0.059
XO (U/grHb)	3.16 ± 0.43	3.49 ± 0.52*	0.023
CRP (mg/dL)	0.51 ± 0.34	6.91 ± 4.42***	0.0001
Na^+/K^+ ATPaz (μmolPi/mg prt*h)	1.45 ± 0.08	1.17 ± 0.10***	0.0001

*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

Kontrollerle kıyaslandığında RA'lı hasta grubunda eritrosit MDA düzeyleri (p=0.0001) ve serum CRP düzeyleri (p=0.0001) anlamlı derecede yüksek bulundu. Eritrosit XO aktivitesi de hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek (p=0.023) tespit edildi. Eritrosit Cu/ZnSOD (p=0.009), eritrosit GPx (p=0.008) ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz (p=0.0001) aktiviteleri hasta grubunda kontrollere oranla anlamlı derecede düşük bulundu. Eritrosit katalaz aktivitesinde ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.

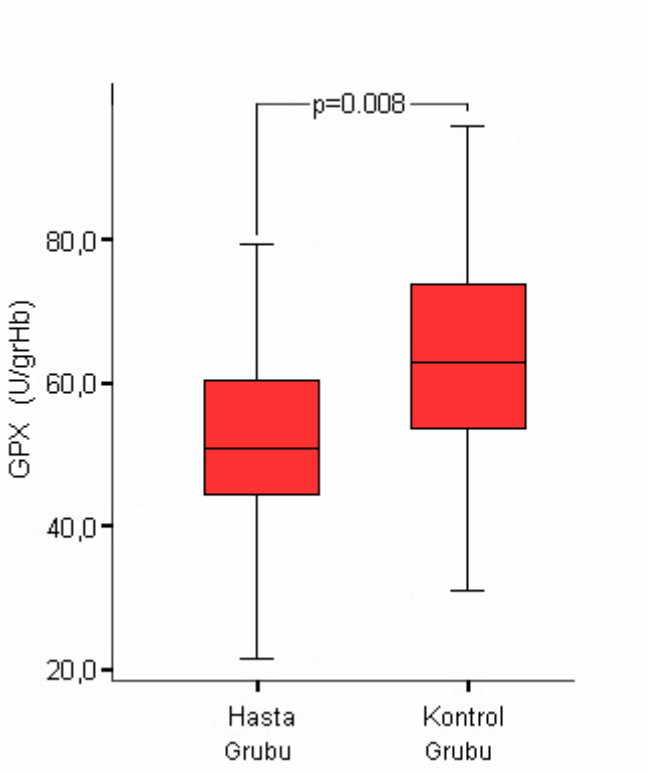
Hasta grubunda parametreler arasında korelasyon analizleri yapıldı. Elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2: RA'lı Hastalarda Çalışılan Parametrelerin Pearson Korelasyon Katsayıları

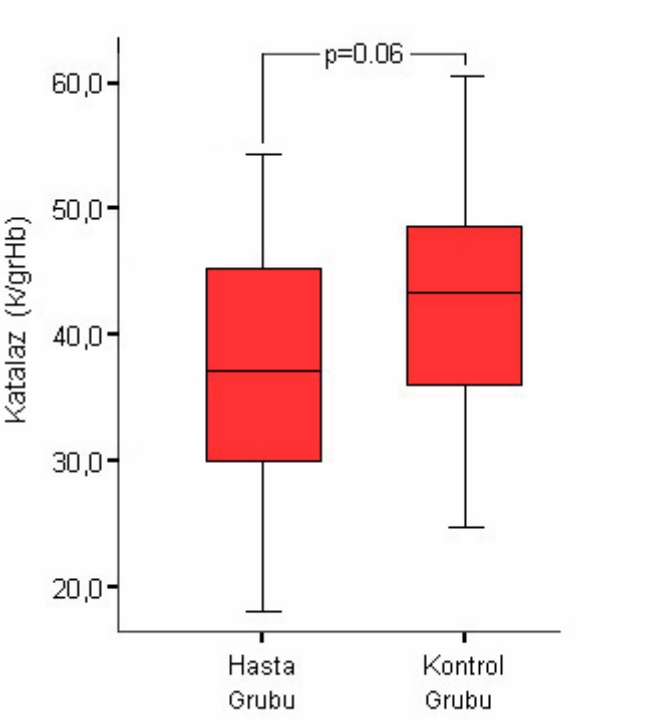
		XO	MDA	Katalaz	GPx	Cu/ZnSOD	Na/K ATPaz
MDA	r	─0.050					
	p	0.800					
Katalaz	r	─0.174	─0.031				
	p	0.377	0.877				
GPx	r	0.204	0.233	─0.045			
	p	0.298	0.233	0.818			
Cu/ZnSOD	r	0.113	─0.434(*)	0.380(*)	─0.163		
	p	0.567	0.021	0.046	0.407		
Na/K ATPaz	r	0.140	─0.641(***)	─0.007	─0.277	0.471(*)	
	p	0.477	0.0001	0.973	0.154	0.011	
CRP	r	─0.047	0.602(**)	─0.008	0.271	─0.481(*)	─0.421(*)
	p	0.810	0.001	0.969	0.164	0.010	0.026

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

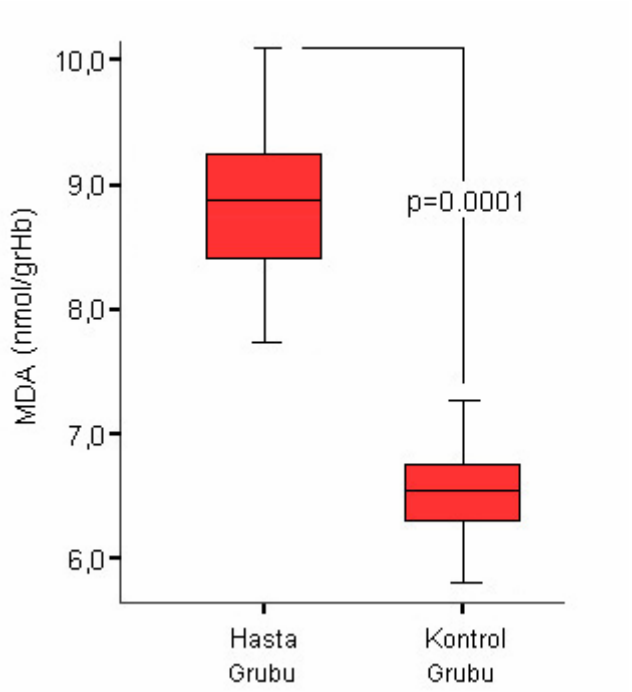
Romatoid artritli hasta grubundaki korelasyon analizinde eritrosit MDA ile serum CRP düzeyleri arasında (r = 0.602, p=0.001) ve eritrosit Cu/ZnSOD ile eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktiviteleri arasında (r =0.471, p=0.011) pozitif korelasyon bulundu. Ayrıca eritrosit MDA düzeyleri ile eritrosit Cu/ZnSOD (r = ─0.434, p=0.021) ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktiviteleri arasında (r = ─0.641, p=0.0001), serum CRP düzeyleri ile eritrosit Cu/ZnSOD (r=─0.481, p=0.01) ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktiviteleri arasında (r=─0.421, p=0.026) negatif korelasyon tespit edildi.



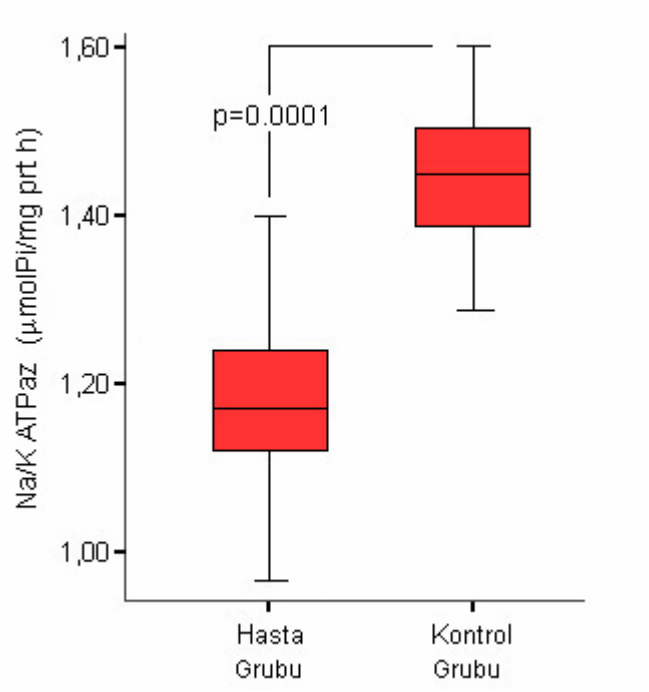
Şekil 4.1 : Çalışma Gruplarındaki Eritrosit GPx Aktivitelerinin Dağılımı



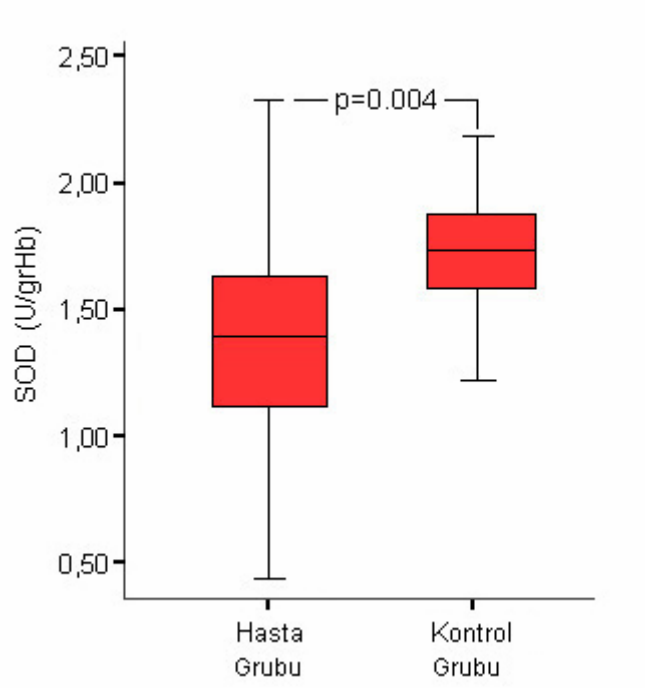
Şekil 4.2 : Çalışma Gruplarındaki Eritrosit Katalaz Aktivitelerinin Dağılımı



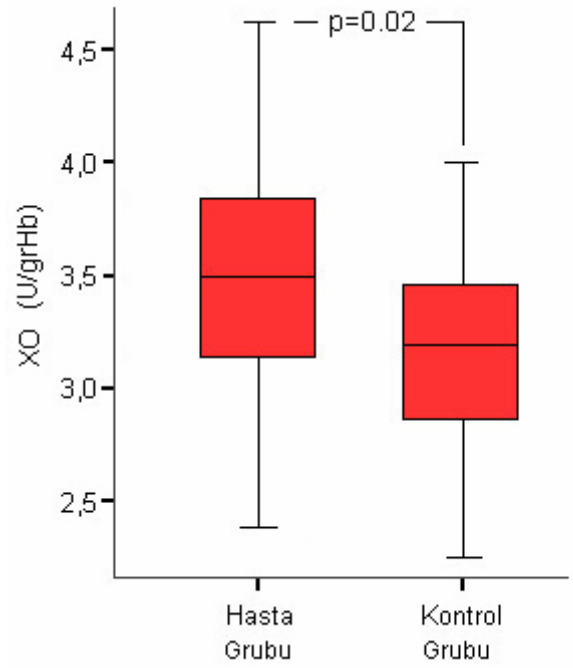
Şekil 4.3 : Çalışma Gruplarındaki Eritrosit MDA Düzeylerinin Dağılımı



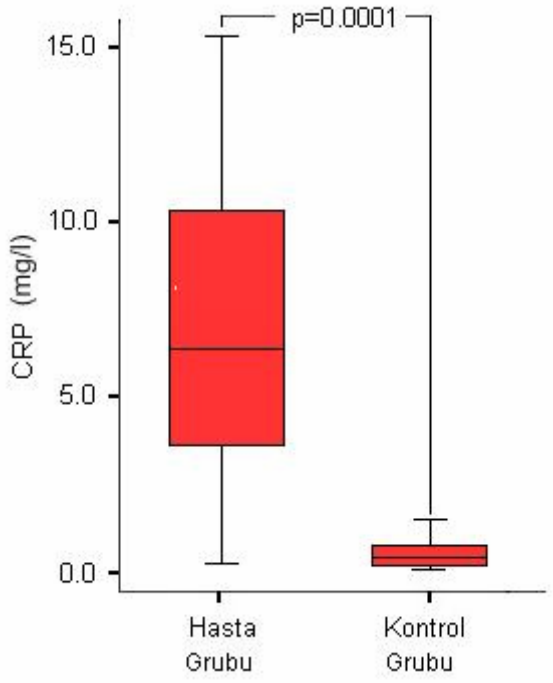
Şekil 4.4 : Çalışma Gruplarındaki Eritrosit Membran Na^+/K^+ ATPaz Aktivitelerinin Dağılımı



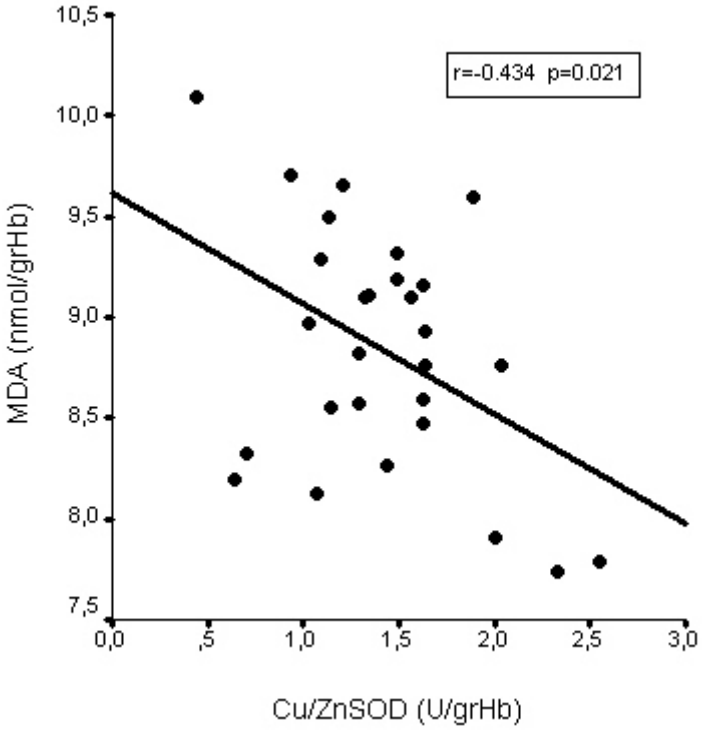
Şekil 4.5 : Çalışma Gruplarındaki Eritrosit Cu/ZnSOD Aktivitelerinin Dağılımı



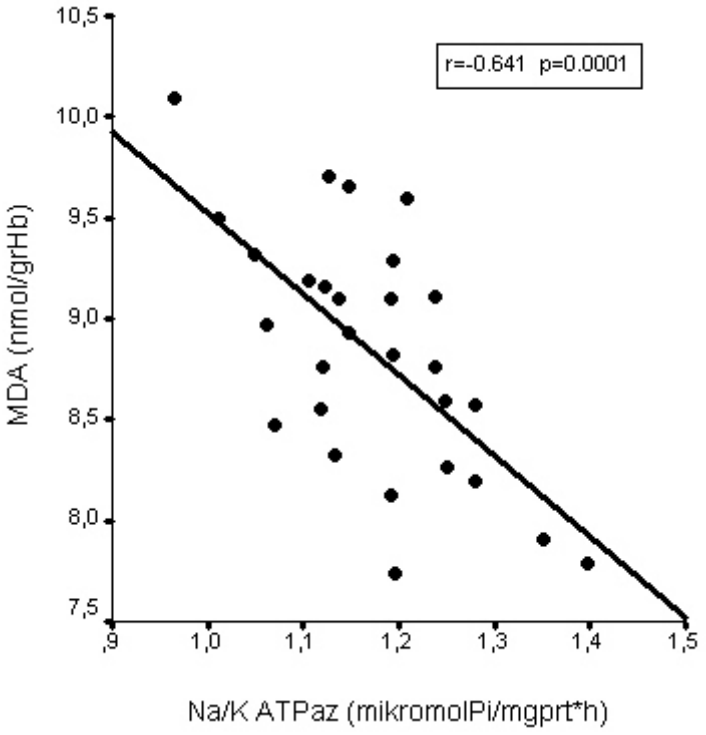
Şekil 4.6 : Çalışma Gruplarındaki Eritrosit XO Aktivitelerinin Dağılımı



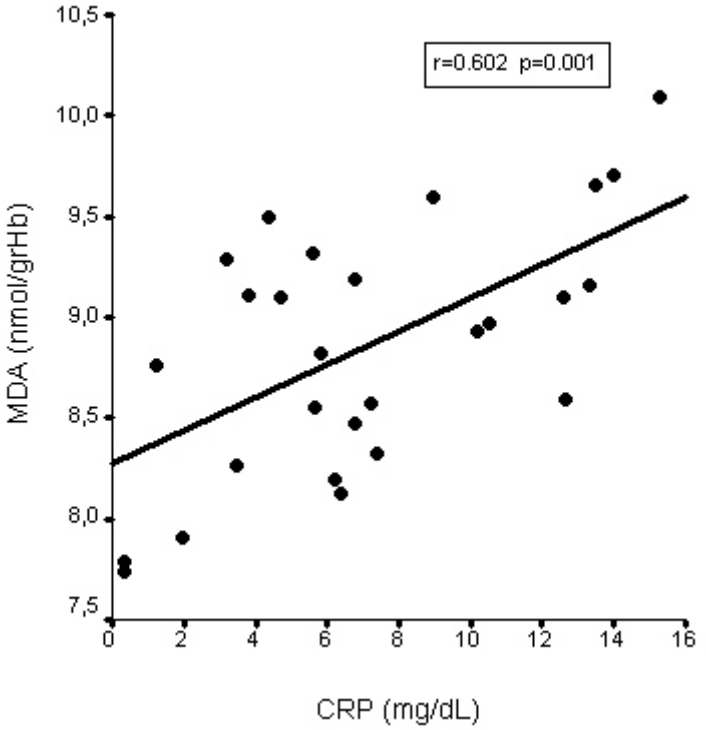
Şekil 4.7 : Çalışma Gruplarındaki Serum CRP Düzeylerinin Dağılımı



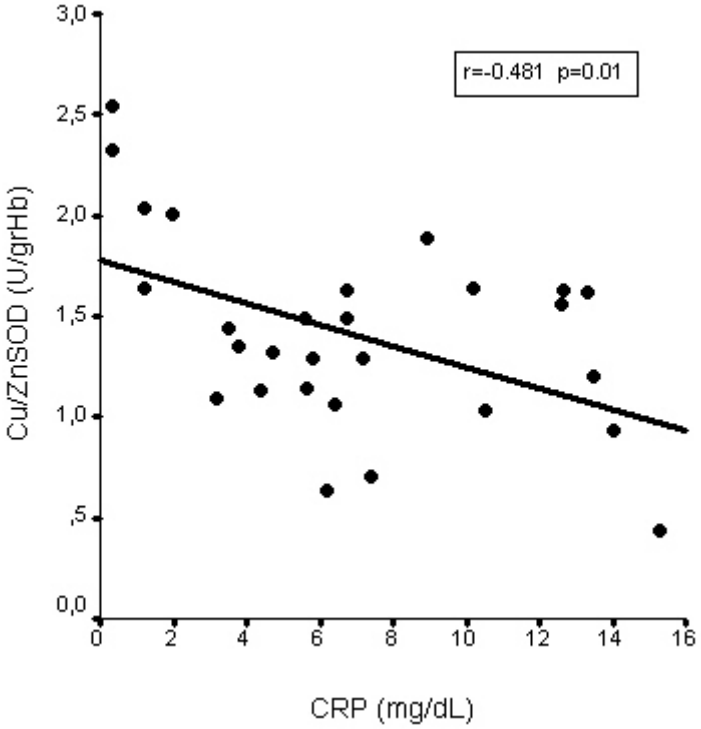
Şekil 4.8 : RA'lı Hastalarda Eritrosit MDA Düzeyleri ve Eritrosit Cu/ZnSOD Aktiviteleri Arasındaki Korelasyon Eğrisi



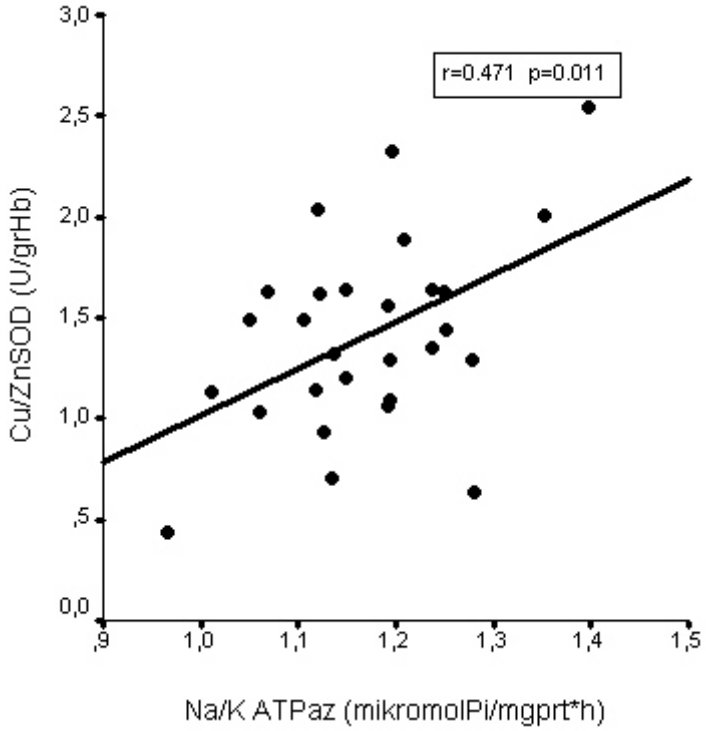
Şekil 4.9 : RA'lı Hastalarda Eritrosit MDA Düzeyleri ve Eritrosit Membran Na^+/K^+ ATPaz Aktiviteleri Arasındaki Korelasyon Eğrisi



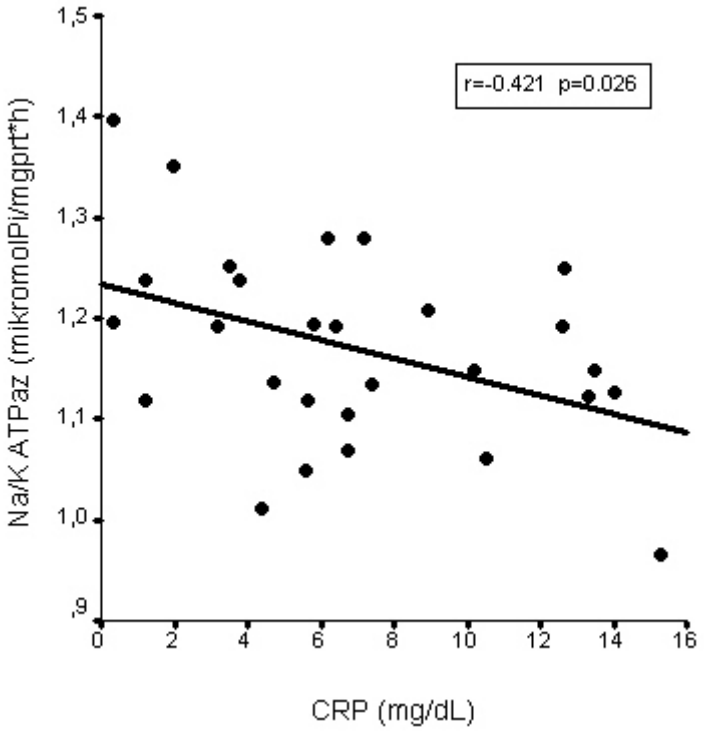
Şekil 4.10 : RA'lı Hastalarda Eritrosit MDA Düzeyleri ve Serum CRP Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Eğrisi



Şekil 4.11 : RA'lı Hastalarda Eritrosit Cu/ZnSOD Aktiviteleri ve Serum CRP Düzeyleri Arasındaki Korelasyon Eğrisi



Şekil 4.12 : RA'lı Hastalarda Eritrosit Cu/ZnSOD Aktiviteleri ve Eritrosit Membran Na^+/K^+ ATPaz Aktiviteleri Arasındaki Korelasyon Eğrisi



Şekil 4.13 : RA'lı Hastalarda Serum CRP Düzeyleri ve Eritrosit Membran Na^+/K^+ ATPaz Aktiviteleri Arasındaki Korelasyon Eğrisi

5. TARTIŞMA

Romatoid artrit; etyolojisi bilinmeyen, başlıca diartroidal eklemlerin kronik inflamasyonu ile karakterize olan sistemik bir hastalıktır.[7,28,29] Hastalık uzun dönemde belirgin sakatlık, fonksiyonel kapasitede kayıp ve mortalite ile sonuçlanır. RA'nın patofizyolojik temeli henüz tam olarak ortaya konulamamasına rağmen son yıllardaki çalışmalar serbest radikallerin hücresel hasarını başlatma potansiyeline sahip olduklarını düşündürmüştür.[8-11,51,147]

Süperoksid, H_2O_2, ve •OH gibi serbest radikaller normal metabolik yollar aracılığıyla sağlıklı kişilerde az miktarda üretilir.[17] Üretilen bu radikaller intraselüler sinyal yolları ve bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi gibi fizyolojik olaylarda fonksiyon görür ve mikrobial ajanlara karşı vücudun savunma sisteminin bir parçasını oluşturur.[2] Ancak bunların artmış düzeyleri hücre ve dokularda hasara neden olur. Potansiyel olarak hasarlayıcı etkilerinden dolayı, organizmayı bu aşırı reaktif mediyatörlerin zararlı etkilerinden korumak için çeşitli antioksidan mekanizmalar geliştirilmiştir. Antioksidan mekanizmaların oksidan ajanları nötralize etme kapasitesinin yeterli olmadığı durumlarda hücre membranları, lipidler, nükleik asitler, proteinler ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin hasarı meydana gelebilir.[148,149] Bu temel hücre komponentlerinin oksidatif hasarı kardiyovasküler hastalıklar, ateroskleroz, diabet ve inflamatuar romatizmal hastalıklar gibi bir çok hastalığın patogenezinde önemli bir mekanizma olarak öne sürülmektedir.[4,6]

Serbest radikallerin membranlarda ortaya çıkardığı değişiklikler oksidatif strese karşı en erken bulgu olarak düşünülmektedir. Bu reaktif maddelerin kontrolsüz aktivasyonu membran lipid peroksidasyonu ve/veya membran proteinlerinin modifikasyonlarına neden olabilir. [17,22,150] Membrana bağlı bir enzim olan Na^+/K^+ ATPaz, bir ATP hidrolizi ile 3 Na^+ ve 2 K^+ iyonunu konsantrasyon gradiyentlerine karşı transport ederek hücre ve dokuların iyon dengesinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır.[151] Bu enzimin fonksiyonunun kaybı permeablitenin bozulması ve hücre hasarı ile sonuçlanır. Bu nedenle Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin ölçümü normal hücresel fonksiyonları göstermede önemlidir.

Son yıllarda RA'nın patofizyolojisinde serbest radikallerin etkilerini araştıran çok sayıda çalışma yapılmış ancak birbiriyle çelişkili sonuçlar elde edilmiş ve kesin bir

bilgi sağlanamamıştır.[15,16,152,153] Kronik inflamasyonla seyreden bir hastalık olan RA'nın patofizyolojisinde ROT'ların etkilerinin kesin bir biçimde ortaya konması hem tedaviye yeni yaklaşımlar getirmede fayda sağlayacak hem de oksidatif stresin suçlandığı diğer hastalıkların patofizyolojilerinin aydınlatılmasında yol gösterici olacaktır. Bundan dolayı çalışmamızda RA'lı hastalarda oksidatif stresin varlığı, antioksidan enzimlerin düzeyleri ve bir membran enzim proteini olan Na^+/K^+ ATPaz'ın aktivitesi araştırıldı.

Serbest radikallerin aşırı reaktif yapılarından dolayı bunların in vivo varlıklarının direkt olarak belirlenmesi zordur. Bu sebeple lipidler, proteinler, nükleik asitler gibi çeşitli moleküller üzerindeki etkilerini ve oluşan metabolik ürünleri ölçmek daha pratiktir. RA'lı hastalarda yapılan çalışmaların büyük kısmında oksidatif stres, bu moleküllerde oksidanların oluşturduğu değişikliklerin belirlenmesi ile ortaya konmuştur.[154-156] Bizim çalışmamızda da oksidan ajanların oluşturduğu lipid peroksidasyon ürünü olan eritrosit MDA düzeyi, inflamasyonun bir göstergesi olan serum CRP düzeyi, antioksidan enzimler olan eritrosit Cu/ZnSOD, katalaz ve GPx aktiviteleri, serbest radikal kaynaklarından biri olan eritrosit XO aktivitesi ve membran hasarının bir göstergesi olarak da eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi ölçülerek RA'da oksidatif stresin varlığı araştırıldı.

Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla RA'lı grupta eritrosit MDA ve serum CRP düzeylerinde artma, eritrosit GPx ve Cu/ZnSOD aktivitelerinde azalma, eritrosit XO aktivitesinde artma ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde azalma tespit edildi. Eritrosit katalaz aktivitesinde ise anlamlı bir değişiklik bulunamadı.

Romatoid artritin hastalık süreci şiddetli inflamasyon ile karakterizedir. Eklemlerde inflamasyonun devam etmesini sağlayan iki tekrarlayıcı mekanizma öne sürülmektedir. Bunlardan biri aktive PNL'ler ve diğeri ise eklem hareketi esnasında sinoviyal kavitedeki basıncın yükselmesinden kaynaklanan iskemi ve reperfüzyondur.[157-159] İnflamasyonlu romatoid eklemlerdeki sinoviyal sıvı nötrofiller tarafından istila edilir. Stimüle edilen nötrofil ve makrofajlarda, sitokinler ve komplemanlar gibi inflamatuar mediatörler granüllerden sitoplazma içine salınır ve fagosite edilmiş materyallerin parçalanmasına katkıda bulunurlar.[160] Bu nötrofiller aktive edildiklerinde aynı zamanda, NADPH oksidaz ile oksijeni hızlı ve aşırı bir

biçimde tüketir ve oksijenin indirgenmesi esnasında büyük miktarlarda $O_2\bullet^-$, H_2O_2, HOCl ve •OH üretirler.[154,161,162] Üretilen bu oksidan ajanların organizmada varolan antioksidan mekanizmalar aracılığıyla detoksifiye edilmeleri gerekir. Ancak sinoviyal sıvıda az miktarda katalaz, GPx ve SOD bulunur.[160] Bundan dolayı inflamasyonlu romatoid eklemlerdeki fagositler tarafından üretilen $O_2\bullet^-$ ve H_2O_2 etkin bir biçimde temizlenemez. Eritrositler; aktive nötrofiller tarafından ekstraselüler olarak üretilen $O_2\bullet^-$ ve H_2O_2'i SOD, katalaz ve GPx'in fonksiyon gördüğü mekanizmalarla detoksifiye etme yeteneğine sahiptir.[163,164] Böylece çevre alandaki oksidan reaksiyonları düzenleme ve serbest radikal aracılı sitotoksisiteyi önlemede önemli bir fonksiyon yürütürler. Ancak eritrositlerin kendisi de XO gibi enzimler aracılığıyla oksidan üretimine katkıda bulunabilir. Bu nedenle azalmış antioksidan düzeylerine bağlı olarak eritrositler kolaylıkla hasar görebilirler.[165,166] Oksidan ajanların yeterince detoksifiye edilememeleri sonucunda lipid peroksidasyonuna bağlı olarak MDA'nın miktarı artar ve artmış MDA düzeyleri doku hasarının şiddetini yansıtır. [8] [54] Sahip olduğumuz bu bilgiler ışığında RA'lı hastaların eritrositlerinde meydana gelen oksidatif stres ve bunun sonucunda oluşan fonksiyonel kayıpların hastalığın eklem tutulumunun şiddetini yansıtabileceğini söyleyebiliriz. Bu sebeple eritrositlerdeki oksidan ve antioksidan parametreler incelendi.

Malondialdehid düzeyleri dokulardaki oksidatif stresin hassas göstergelerinden birisidir. MDA, serbest oksijen radikallerinin dokularda oluşturduğu lipid peroksidasyonu esnasında bir dizi reaksiyon sonucu meydana gelen oldukça reaktif metabolik bir üründür.[13] RA'lı hastalarda yapılan pek çok çalışmada yüksek MDA düzeyleri bildirilmiştir. Sarban ve ark.[152] yaptıkları bir çalışma da RA'lı hastalardaki MDA düzeylerini kontroller ve osteoartritli hastalara kıyasla anlamlı derecede yüksek tespit ettiler. Çimen ve ark.[14] ile Kızıltunç ve ark.[167] da RA'lı hastalarda yaptıkları çalışmalarında artmış MDA düzeyleri buldular. Bizim çalışmamızda da RA'lı grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış eritrosit MDA düzeyleri belirlendi.

Romatoid artrit çeşitli proteinlerde fonksiyonel değişikliklere yol açan bir hastalıktır ve bu proteinlerin hastalığın aktivitesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.[27,168] CRP ve RF PNL'lerin fagositik sistemi ile ilişkili aktif komponentlerdir. RA'lı hastalarda CRP ve RF'nin, hastalığın varlığını ve aktivitesini yansıtan sensitif inflamatuar markırlar olduğu bilinmektedir.[160] Bizim çalışmamızda da

inflamasyonun göstergesi olarak serum CRP düzeyleri kullanıldı. Hasta grubumuzdaki serum CRP düzeyleri kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu.

Çeşitli çalışmalarda XO'nun RA'daki artmış oksidan varlığına katkısı olduğu öne sürülmüştür. Gudbjornsson ve ark. [169] inflamasyonlu sinoviyal sıvıda purin metabolitlerinin görülmesinin inflamatuar artritteki eklem hasarının anlaşılmasında değerli olabileceğini rapor etmişlerdir. Çimen ve ark.[14] yaptıkları çalışmada artmış eritrosit XO aktivitesinin RA patolojisindeki primer faktör olduğunu öne sürmüşlerdir. Yine diğer bazı çalışmalarda proinflamatuar sitokinler olan IL-1 ve INFγ'nın XO'yu indüklediği bildirilmiştir.[170-173] Bizim çalışmamızda da RA'lı hastalarda eritrosit XO aktivitesi kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek tespit edildi. Eritrosit XO düzeylerinde tespit ettiğimiz artış, RA'da XO aktivitesinin indüklendiğini ve ROT'un aşırı üretimine katkıda bulunduğunu ortaya koydu. İnflamasyon esnasındaki düzensiz mitokondrial oksidatif fosforilasyon ATP üretiminde azalma ve bunun sonucunda ATP yıkımında artışa neden olur. Ortamda biriken adenozin; ksantin ve hipoksantine yıkılır.[60] Bu ürünler de XO için substrat olarak kullanılabilirler. XO ile bu maddelerin ürik aside yıkımı esnasında $O_2\bullet^-$ üretilir.

RA'lı hastalarda antioksidan olarak en çok araştırılan enzimlerden birisi SOD'dur. SOD, serbest radikallere karşı olan savunma sisteminin ilk basamağını oluşturur ve $O_2\bullet^-$ anyonunun H_2O_2'ye dismutasyonunu katalize eder. Buna karşılık eritrosit SOD ve RA arasındaki ilişki konusunda çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Scutter ve ark.[174] anlamlı bir değişiklik tespit edememesine rağmen Çimen ve ark.[14] eritrosit SOD aktivitelerini yüksek buldular. Banford ve ark.[175] ise RA'lı hastalardaki eritrosit SOD aktivitesinde belirgin azalma tespit ettiler. Sklodowska ve ark.[176]da Juvenil RA'lı hastalarda yaptıkları bir çalışmada eritrosit SOD aktivitelerini düşük buldular. Benzer biçimde Comstock ve ark.[177] da çalışmalarında düşük serum SOD aktiviteleri bildirdiler. Bizim hasta grubumuzdaki eritrosit SOD aktivitesi kontrollere kıyasla anlamlı derecede düşük belirlendi. SOD aktivitesindeki azalma ortamda bulunan bir madde ile enzimin inhibisyonuna veya gen düzeyindeki bir mutasyondan dolayı ekspresyonundaki azalmaya bağlı olabilir. Ancak bunu ortaya koyabilmek için moleküler seviyede çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bir selenoprotein olan GPx, okside glutatyon varlığında H_2O_2'yi indirgemesi yanında lipid olan veya olmayan hidroperoksitleri de indirgeyen antioksidan bir enzimdir. GPx otokatalitik lipid peroksidasyonunun indirgenmesini katalize eder ve böylece oksidatif hücresel hasara karşı hücre membranlarının bütünlüğünü korur.[27] RA'lı hastalarda değişmemiş[14,178] veya azalmış[25,26,179] GPx aktiviteleri bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da kontrollere kıyasla hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. GPx enziminin yüksek konsantrasyonlardaki $O_2\bullet^-$ ile inhibe olduğu bilinmektedir.[180] GPx aktivitesinde tespit ettiğimiz azalma da muhtemelen artmış $O_2\bullet^-$'nin inhibisyonuyla meydana gelmiş olabilir.

Sarban ve ark.[152] RA'lı hastalarda eritrosit katalaz aktivitesinde azalma tespit etmelerine rağmen çalışmamızda SOD ve GPx'in aksine eritrosit katalaz düzeylerinde anlamlı bir değişim yoktu. Oksidatif stres varlığına cevaben antioksidan bir enzim olan katalazın aktivitesinin artması beklenirdi. Ancak bizim çalışmamızda katalaz düzeylerinde anlamlı bir değişiklik tespit edilemedi. Katalaz aktivitesinde değişiklik olmaması muhtemelen ortamdaki H_2O_2'nin GPx tarafından parçalanması ve katalaza ihtiyaç kalmamasındandır. Çünkü GPx enziminin H_2O_2'ye olan Km değeri düşük, katalaz enziminin Km değeri ise yüksektir. Başka bir ifade ile GPx enziminin H_2O_2'ye olan ilgisi katalaza göre daha yüksektir. Bundan dolayı katalaz enzimi artmış H_2O_2 konsantrasyonlarında etkindir.

Eritrositlerde artmış olan XO aktivitesi ile oluşan $O_2\bullet^-$ daha sonra SOD enzimiyle H_2O_2'e dönüştürülür.[181] Ancak SOD'un azlığında H_2O_2'ye indirgenemeyen $O_2\bullet^-$ anyonu ortamda yüksek konsantrasyonlara ulaşmış olur. Oldukça reaktif bir madde olan $O_2\bullet^-$'in ortamdan uzaklaştırılamaması membran lipidlerinde peroksidasyonla sonuçlanır ve MDA düzeyleri artar. Oluşan membran peroksidlerinin yetersiz GPx varlığında ortamdan uzaklaştırılamaması membran lipid peroksidasyonunun devamına ve sonuçta hücre hasarına neden olur.

Oksidatif stres ve özellikle de $O_2\bullet^-$ anyonunun çeşitli dokulardaki Na^+/K^+ ATPaz'ı inhibe ettiği rapor edilmiştir.[18-21] Ayrıca lipid peroksidasyonu, membran proteinlerinin fonksiyon kaybına ve enzimlerin inaktivasyonuna katkıda bulunur. Bir membran proteini olan Na^+/K^+ ATPaz'ın aktivite gösterebilmesi için uygun bir lipid çevrenin gerekli olduğu düşünülmektedir.[182,183] Koter ve ark.[184] yaptıkları bir çalışmada

membran lipid peroksidasyonunda artma ve membran akışkanlığında kayıp ve bunlara bağlı olarak eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde azalma tespit ettiler. RA'lı hastalarda eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesini ve kolesterol miktarını araştıran Masoom-Yasinzai[185] kolesterol miktarındaki azalmaya karşılık Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin artmış olduğunu tespit etti. Buna karşın Kızıltunç ve ark.[23] ile Testa ve ark.[24] RA'lı hastalarda yaptıkları çalışmada azalmış eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz enzim aktivitesi rapor ettiler. Bizim çalışmamızda da eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi anlamlı derecede düşük bulundu. Bu düşüklük muhtemelen lipid peroksidasyonu sonucu membran akışkanlığındaki değişikliğe bağlı olabilir.

Na^+/K^+ ATPaz'ın inaktivasyonu ile; kas ve sinir hücrelerinde elektriksel ve kontraktil disfonksiyonlar oluşur, membran depolarizasyonu artar. Membran permeablitesinin bozulması membranın bariyer özelliğinin ortadan kalkmasına ve hücre hasarına neden olur. Sonuçta sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunun artışıyla hücre ölümü meydana gelir.[17,21,150,186,187] Bu bağlamda Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin belirlenmesi hücre hasarını ortaya koymada en anlamlı belirteçlerden biridir ve Na^+/K^+ ATPaz aktivitesindeki azalma oksidatif stres neticesindeki hücresel hasarın kesin kanıtıdır. Oksidatif strese maruz kalma ile Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azaldığını rapor eden pek çok çalışma da bu enzimin oksidatif stres esnasındaki hücre hasarını belirlemede hayati olduğunu desteklemektedir.[18,188-190] Serbest oksijen radikallerini toplayan moleküllerin (SOD, katalaz, vitamin E, XO inhibitörü olan allapürinol vb) iskemi ve reperfüzyonda meydana gelen veya metal iyonlarının aracılığıyla ortaya çıkan Na^+/K^+ ATPaz inhibisyonunu ortadan kaldırdıkları gösterilmiştir.[20] Ancak Na^+/K^+ ATPaz üzerine Ksantin/XO sisteminin etkisi tam olarak ortaya konamamıştır. Vlessis ve ark.[191] Na^+/K^+ ATPaz'ın XO ile inhibe olduğunu öne sürerken, Kukreja ve ark.[192] etkisiz olduğunu öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda Na^+/K^+ ATPaz aktivitesindeki azalmaya karşın XO aktivitesi artmıştı. Na^+/K^+ ATPaz aktivitesindeki azalma neticesinde hücre zarının permeablitesinin bozulması hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artırır ve bu da XDH'nin proteazlarla XO'ya dönüşümüne neden olur ve $O_2\bullet^-$ anyonunun üretiminde artma meydana gelir.[193,194] Artan $O_2\bullet^-$ membran hasarını devam ettirir ve olaylar kısır bir döngü şeklinde devam eder. Bu olaylar muhtemelen RA'nın kronikleşmesine katkıda bulunur. Ancak yaptığımız korelasyon analizleri Na^+/K^+ ATPaz ile XO arasında direkt bir ilişki olabileceğini gösterecek kadar anlamlı

değildi. Muhtemelen bu mekanizmalara eşlik eden daha kompleks bir organizasyon bulunmaktadır.

Çalışmamızda yaptığımız korelasyon analizlerinde; eritrosit Cu/ZnSOD ile membran Na^+/K^+ ATPaz aktiviteleri ve eritrosit MDA ile serum CRP düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon, buna karşın eritrosit Cu/ZnSOD ile eritrosit MDA, eritrosit Cu/ZnSOD ile serum CRP, eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz ile eritrosit MDA ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz ile serum CRP düzeyleri arasında negatif bir korelasyon tespit edildi. Bu sonuçlar membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin eritrosit Cu/ZnSOD ile direkt bağlantılı olduğunu ancak eritrosit XO'nun primer rol oynamadığını düşündürdü. Çünkü eritrosit Cu/ZnSOD ile eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktiviteleri arasında pozitif bir korelasyon varken eritrosit XO ile böyle bir ilişki yoktu.

Ayrıca Hassan ve ark.[27] ileri sürdüğü gibi eritrosit MDA ile serum CRP düzeyleri arasında da pozitif bir korelasyon vardı. Bu da hastalardaki inflamasyonun şiddeti arttıkça lipid peroksidasyonunun göstergesi olan eritrosit MDA düzeylerinin de buna paralel olarak arttığını doğruladı.

Eritrosit MDA ve serum CRP düzeyleri ile eritrosit Cu/ZnSOD arasındaki negatif korelasyon aşırı derecede üretilen $O_2\bullet^-$'nin düşük eritrosit Cu/ZnSOD aktivitesinden dolayı yeterince detoksifiye edilememesinin lipid peroksidasyonunun ve inflamasyonun primer sebebi olduğunu ve RA'nın ortaya çıkmasındaki en önemli etken olduğunu düşündürmektedir. Eritrosit Cu/ZnSOD ile eritrosit MDA ve serum CRP arasında tespit ettiğimiz korelasyonun aksine eritrosit GPx ile eritrosit MDA ve serum CRP arasında bir korelasyon bulunmaması eritrosit GPx'in oksidatif hasara katkıda bulunsa da RA patolojisinde primer sorumlu olmadığını düşündürmektedir.

Eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz enzim aktivitesi ile eritrosit MDA düzeylerini karşılaştırdığımızda elde ettiğimiz negatif korelasyon, Na^+/K^+ ATPaz enzim aktivitesi için lipid çevrenin uygun olmasının gerekli olduğu ve lipid peroksidasyonuna bağlı olarak aktivitenin azaldığı bilgisini doğrulamaktadır. Serum CRP ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi arasındaki negatif korelasyon inflamasyonun şiddeti arttıkça buna paralel olarak enzimin aktivitesinin azaldığını ortaya koymaktadır.

Bizim çalışmamızda artmış eritrosit MDA düzeyleri, azalmış eritrosit Cu/ZnSOD, eritrosit GPx aktiviteleri ve artmış eritrosit XO aktivitelerinden dolayı RA'da oksidan / antioksidan dengesinin bozulduğu ve oksidatif stresin varlığı gösterilmiştir. RA'da artmış oksidan varlığının temel etken olduğunu öne süren çalışmaların[14,15,195] aksine, eritrosit MDA-eritrosit Cu/ZnSOD, eritrosit MDA-eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz, serum CRP-eritrosit Cu/ZnSOD ve serum CRP-eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz arasındaki negatif korelasyon ve eritrosit Cu/ZnSOD-eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz arasındaki pozitif korelasyon RA'daki oksidan / antioksidan dengesizliğinin ortaya çıkmasında antioksidan defans sistemlerinin yetersizliğinin temel etken olduğunu göstermektedir. Bu oksidan / antioksidan dengesizliği RA'daki doku hasarı ve inflamatuar reaksiyonların sebebi olmalıdır. Eritrosit GPx de lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olmasına rağmen eritrosit Cu/ZnSOD muhtemelen çeşitli reaktif oksijen türlerinin etkilerine karşı primer antioksidandır. Eritrosit MDA düzeyleri ve eritrosit Cu/ZnSOD aktiviteleri arasındaki negatif korelasyon eritrosit Cu/ZnSOD'un azalmasının membran lipitlerinin oksidatif hasarına neden olduğunu ve inflamatuar cevapla sonuçlandığını göstermektedir.

Pek çok çalışma yapılmasına rağmen kesin bir bilgiye ulaşılamaması ve birbiriyle çelişkili sonuçlar elde edilmesi RA patogenezinin çok karmaşık olduğunu ve organizmadaki moleküllerin bu kompleks davranışlarının anlaşılması için çok daha kapsamlı ve yoğun araştırmalar gerektiğini ortaya koymuştur. Oksidatif stresi ortaya çıkaran neden, ister oksidan ajanların artması isterse de antioksidan defans sistemlerinin yetersizliği olsun sonuçta membran lipid peroksidasyonu ile sonuçlanır. Membran lipid peroksidasyonu neticesinde membran hasarının oluştuğunun en iyi göstergesi ise membran proteinlerinin fonksiyon kaybının gösterilmesidir. Eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz enzimi membran fonksiyon kaybını ve hücre hasarını belirlemede kullanılabilecek bir parametredir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışma RA'da oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğunu ve oksidatif stresin varlığını ortaya koymuştur. Ayrıca eritrosit MDA düzeyi, serum CRP düzeyi ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi arasındaki korelasyonlar inflamasyon ve lipid peroksidasyonu neticesinde hücre hasarının meydana geldiğini ve eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz enziminin aktivitesindeki azalmanın hücre hasarını gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak oksidan ve antioksidan

sistemler arasındaki dengenin pek çok hastalıkta etkilenmesi ve araştırmacıların birbirinden çok farklı sonuçlar ortaya koyması RA'nın teşhis, tedavi ve takibinde daha spesifik olan bir protein, enzim veya molekülün markır olarak kullanılacağı çalışmaların moleküler seviyede belirlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu amaçla kullanılabilecek yeni tekniklerden biri olan Proteomik çalışmaları yavaş yavaş tıbbın hizmetine sunulmaktadır. Proteomik çalışmaları ile sadece sözkonusu hastalığa spesifik tek bir markır proteinin keşfedileceğini ümitle beklemekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. RA'lı grupta kontrol grubuna kıyasla eritrosit MDA düzeylerinin yüksek bulunması RA'da oksidatif stresin varlığını ortaya koymuştur.

2. RA'lı grupta kontrol grubuna kıyasla eritrosit Cu/ZnSOD ve GPx aktivitelerinin düşük tespit edilmesi RA'da antioksidan savunma sisteminin zayıfladığını göstermiştir.

3. RA'lı grupta kontrol grubuna kıyasla eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azalmış olarak bulunması RA'daki hücresel hasarın varlığını ortaya koymuştur.

4. RA'lı grupta kontrol grubuna kıyasla eritrosit XO aktivitelerinin artmış olarak bulunması RA'da artmış ROT üretimini göstermiştir.

5. RA'lı grupta eritrosit Cu/ZnSOD ile eritrosit MDA ve serum CRP arasında negatif korelasyon bulunması buna karşın eritrosit XO ile bir korelasyonun olmaması RA'daki oksidatif stresin ortaya çıkmasındaki temel sebebin artmış ROT üretiminden çok azalmış antioksidan düzeyleri olduğunu düşündürmüştür.

6. Eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz ve eritrosit MDA arasındaki korelasyon membran lipid kompozisyonunun değişmesinin eritrosit membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesini azalttığını göstermiştir.

7. Oksidatif stresin varlığı ve antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği pek çok hasatalıkta öne sürüldüğü için RA'ya spesifik tanı markırlarının geliştirilebilmesi için daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Smith C, Marks,DA, Lieberman,M: Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach (ed 2), Lippincott Williams & Wilkins, 2005

2. Hitchon CA, El-Gabalawy HS: Oxidation in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 6:265-78, 2004

3. Murray R, Granner,DK, Mayes,PA, Rodwell,VW: Harper's Biochemistry (ed 26), McGraw-Hill Companies, 2003

4. Fang YZ, Yang S, Wu G: Free radicals, antioxidants, and nutrition. Nutrition 18:872-9, 2002

5. Ozkan Y, Yardım-Akaydın S, Sepici A, et al: Oxidative status in rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol, 2006

6. Kim J, Chehade J, Pinnas JL, et al: Effect of select antioxidants on malondialdehyde modification of proteins. Nutrition 16:1079-81, 2000

7. Harris E: Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis, in Kelley WN HE, Ruddy S, Sledge CB (ed): Textbook of Rheumatology (ed 5). Philadelphia, WB Saunders Company, 1997, pp 833-874

8. Biemond P, Swaak AJ, Koster JF: Protective factors against oxygen free radicals and hydrogen peroxide in rheumatoid arthritis synovial fluid. Arthritis Rheum 27:760-5, 1984

9. Halliwell B, Gutteridge JM: Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. Lancet 1:1396-7, 1984

10. McCord JM: Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. Clin Biochem 26:351-7, 1993

11. Ozgunes H, Gurer H, Tuncer S: Correlation between plasma malondialdehyde and ceruloplasmin activity values in rheumatoid arthritis. Clin Biochem 28:193-4, 1995

12. Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet 344:721-4, 1994

13. Knight JA, Pieper RK, McClellan L: Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. Clin Chem 34:2433-8, 1988

14. Cimen MY, Cimen OB, Kacmaz M, et al: Oxidant/antioxidant status of the erythrocytes from patients with rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol 19:275-7, 2000

15. Gambhir JK, Lali P, Jain AK: Correlation between blood antioxidant levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. Clin Biochem 30:351-5, 1997

16. Kamanli A, Naziroglu M, Aydilek N, et al: Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis. Cell Biochem Funct 22:53-7, 2004

17. Kourie JI: Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. Am J Physiol 275:C1-24, 1998

18. Shattock MJ, Matsuura H: Measurement of Na(+)-K+ pump current in isolated rabbit ventricular myocytes using the whole-cell voltage-clamp technique. Inhibition of the pump by oxidant stress. Circ Res 72:91-101, 1993

19. Mense M, Stark G, Apell HJ: Effects of free radicals on partial reactions of the Na,K-ATPase. J Membr Biol 156:63-71, 1997

20. Kim MS, Akera T: O2 free radicals: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na+-K+-ATPase. Am J Physiol 252:H252-7, 1987

21. Fuller W, Parmar V, Eaton P, et al: Cardiac ischemia causes inhibition of the Na/K ATPase by a labile cytosolic compound whose production is linked to oxidant stress. Cardiovasc Res 57:1044-51, 2003

22. Jamme I, Petit E, Divoux D, et al: Modulation of mouse cerebral Na+,K(+)-ATPase activity by oxygen free radicals. Neuroreport 7:333-7, 1995

23. Kiziltunc A CS, Ugur M: Intercellular adhesion molecule-1 and Na+/K+ ATPase in patients with rheumatoid arthritis. The Pain Clinic 14:339-345, 2002

24. Testa I, Rabini RA, Corvetta A, et al: Decreased NA+, K+-ATPase activity in erythrocyte membrane from rheumatoid arthritis patients. Scand J Rheumatol 16:301-5, 1987

25. Taysi S, Polat F, Gul M, et al: Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol Int 21:200-4, 2002

26. Karatas F, Ozates I, Canatan H, et al: Antioxidant status & lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. Indian J Med Res 118:178-81, 2003

27. Hassan MQ, Hadi RA, Al-Rawi ZS, et al: The glutathione defense system in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. J Appl Toxicol 21:69-73, 2001

28. Ergin S: Romatoid Artrit ve Sjögren Sendromu, in Beyazova M, Kutsal YG (ed): Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon, Güneş Kitapevi, 2000, pp 1549-1576

29. Gümüşdiş G: Romatoid Artrit, in Gümüşdiş G, Doğanavşargil,E (ed): Klinik Romatoloji. İstanbul, Deniz Matbaası, 1999, pp 269-278

30. Wolfe AM: The epidemiology of rheumatoid arthritis: a review. I. Surveys. Bull Rheum Dis 19:518-23, 1968

31. Buyon JP, Korchak HM, Rutherford LE, et al: Female hormones reduce neutrophil responsiveness in vitro. Arthritis Rheum 27:623-30, 1984

32. Barile MF, Yoshida H, Roth H: Rheumatoid arthritis: new findings on the failure to isolate or detect mycoplasmas by multiple cultivation or serologic procedures and a review of the literature. Rev Infect Dis 13:571-82, 1991

33. Cohen BJ, Buckley MM, Clewley JP, et al: Human parvovirus infection in early rheumatoid and inflammatory arthritis. Ann Rheum Dis 45:832-8, 1986

34. Naides SJ, Field EH: Transient rheumatoid factor positivity in acute human parvovirus B19 infection. Arch Intern Med 148:2587-9, 1988

35. Atwater EC, Jacox RF: The latex-fixation test in patients with liver disease. Ann Intern Med 58:419-25, 1963

36. Kaufmann SH: Heat-shock proteins: a link between rheumatoid arthritis and infection? Curr Opin Rheumatol 2:430-5, 1990

37. van Eden W, Thole JE, van der Zee R, et al: Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. Nature 331:171-3, 1988

38. Aho K, Heliovaara M: Risk factors for rheumatoid arthritis. Ann Med 36:242-51, 2004

39. Firestein GS, Zvaifler NJ: How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? Arthritis Rheum 33:768-73, 1990

40. Poubelle P, Damon M, Blotman F, et al: Production of mononuclear cell factor by mononuclear phagocytes from rheumatoid synovial fluid. J Rheumatol 12:412-7, 1985

41. Chen E, Keystone EC, Fish EN: Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 36:901-10, 1993

42. Thornhill MH, Kyan-Aung U, Lee TH, et al: T cells and neutrophils exhibit differential adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells. Immunology 69:287-92, 1990

43. Thornhill MH, Haskard DO: IL-4 regulates endothelial cell activation by IL-1, tumor necrosis factor, or IFN-gamma. J Immunol 145:865-72, 1990

44. Gauldie J, Richards C, Harnish D, et al: Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proc Natl Acad Sci U S A 84:7251-5, 1987

45. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, et al: Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. Arthritis Rheum 31:784-8, 1988

46. Arnet FC ES, Bloch DA, et al.: The American Rheumatism Association, 1987 Revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 31:315-324, 1988

47. Tüzün F EM, Akarırmak Ü: Hareket Sistemi Hastalıkları, in Koniçe M EM (ed): Romatoid Artrit, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd Şti., 1997, pp 85-98

48. Martin L: Rheumatoid arthritis: symptoms, diagnosis, and management. Nurs Times 100:40-4, 2004

49. van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL, et al: Biannual radiographic assessments of hands and feet in a three-year prospective followup of patients with early rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 35:26-34, 1992

50. Halliwell B, Gutteridge,JMC: Free Radicals in Biology and Medicine (ed 3), Oxford Science Publications, 1999

51. Abuja PM, Albertini R: Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clin Chim Acta 306:1-17, 2001

52. Halliwell B: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. Am J Med 91:14S-22S, 1991

53. Akkuş İ: Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri (ed 1). Konya, Mimoza Yayınları, 1995

54. Gutteridge JM: Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 41:1819-28, 1995

55. Dormandy TL: An approach to free radicals. Lancet 2:1010-4, 1983

56. McCord JM: The evolution of free radicals and oxidative stress. Am J Med 108:652-9, 2000

57. Turrens JF, Boveris A: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J 191:421-7, 1980

58. Southorn PA, Powis G: Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc 63:381-9, 1988

59. Konukoğlu D: serbest Radikaller ve Önemleri. Aile Hek Derg. 1:197-200, 1997

60. Borges F, Fernandes E, Roleira F: Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. Curr Med Chem 9:195-217, 2002

61. Martin HM, Hancock JT, Salisbury V, et al: Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. Infect Immun 72:4933-9, 2004

62. Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest 47:412-26, 1982

63. Halliwell B: Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. Free Radic Res 25:57-74, 1996

64. Halliwell B, Chirico S: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. Am J Clin Nutr 57:715S-724S; discussion 724S-725S, 1993

65. Davies KJ, Goldberg AL: Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. J Biol Chem 262:8227-34, 1987

66. Park JR, Tappel AL: Protein damage and lipid peroxidation: effects of diethyl maleate, bromotrichloromethane and vitamin E on ammonia, urea and enzymes involved in ammonia metabolism. Toxicol Lett 58:29-36, 1991

67. Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, et al: Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. Free Radic Biol Med 23:8-18, 1997

68. Wiseman H, Halliwell B: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J 313 (Pt 1):17-29, 1996

69. Good PF, Werner P, Hsu A, et al: Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. Am J Pathol 149:21-8, 1996

70. Jenner P, Olanow CW: Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. Neurology 47:S161-70, 1996

71. McCord JM: Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. Fed Proc 46:2402-6, 1987

72. Halliwell B, Gutteridge JM: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J 219:1-14, 1984

73. Nakazaki M, Kakei M, Koriyama N, et al: Involvement of ATP-sensitive K+ channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. Diabetes 44:878-83, 1995

74. Halliwell B, Gutteridge JM: The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys 280:1-8, 1990

75. Fridovich I: Biological effects of the superoxide radical. Arch Biochem Biophys 247:1-11, 1986

76. Fridovich I: Superoxide dismutases: regularities and irregularities. Harvey Lect 79:51-75, 1983

77. Young IS, Woodside JV: Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 54:176-86, 2001

78. Weisiger RA, Fridovich I: Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. J Biol Chem 248:4793-6, 1973

79. Brigelius-Flohe R: Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radic Biol Med 27:951-65, 1999

80. Cooper G, Hausman,RE: The Cell A Molecular Approach
(ed 3). Washington, ASM Press, 2004

81. Devlin T: Textbook of Biochemistry: with Clinical Corelations (ed 3). New York, A.John Wiley & Sons, INC. Publication, 1992

82. Singer SJ, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175:720-31, 1972

83. Lee A: Membrane structure. Curr Biol 11:R811-4, 2001

84. Dressler V, Haest CW, Plasa G, et al: Stabilizing factors of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. Biochim Biophys Acta 775:189-96, 1984

85. Bloj B, Zilversmit DB: Rat liver proteins capable of transferring phosphatidylethanolamine. Purification and transfer activity for other phospholipids and cholesterol. J Biol Chem 252:1613-9, 1977

86. London E: Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. Curr Opin Struct Biol 12:480-6, 2002

87. Nelson D, Cox,MM: Lehninger Principles of Biochemistry. Çeviri: Kılıç.N Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. Ankara, Palme Yayıncılık, 2004

88. Marchesi VT: The cytoskeletal system of red blood cells. Hosp Pract (Off Ed) 20:113-8, 120, 125-31, 1985

89. Brumen M, Heinrich R, Herrmann A, et al: Mathematical modelling of lipid transbilayer movement in the human erythrocyte plasma membrane. Eur Biophys J 22:213-23, 1993

90. Clausen T: Clinical and therapeutic significance of the Na+,K+ pump*. Clin Sci (Lond) 95:3-17, 1998

91. Doucet A: Function and control of Na-K-ATPase in single nephron segments of the mammalian kidney. Kidney Int 34:749-60, 1988

92. Rodriguez HJ, Hogan WC, Hellman RN, et al: Mechanism of activation of renal Na+-K+-ATPase in the rat: effects of potassium loading. Am J Physiol 238:F315-23, 1980

93. Skou JC, Esmann M: The Na,K-ATPase. J Bioenerg Biomembr 24:249-61, 1992

94. Skou JC: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochim Biophys Acta 23:394-401, 1957

95. Lingrel JB, Kuntzweiler T: Na+,K(+)-ATPase. J Biol Chem 269:19659-62, 1994

96. Rice WJ, Young HS, Martin DW, et al: Structure of Na+,K+-ATPase at 11-A resolution: comparison with Ca2+-ATPase in E1 and E2 states. Biophys J 80:2187-97, 2001

97. Sweadner KJ, Donnet C: Structural similarities of Na,K-ATPase and SERCA, the Ca(2+)-ATPase of the sarcoplasmic reticulum. Biochem J 356:685-704, 2001

98. Chakraborty H, Sen P, Sur A, et al: Age-related oxidative inactivation of Na+, K+-ATPase in rat brain crude synaptosomes. Exp Gerontol 38:705-10, 2003

99. Malek SA, Adorante JS, Stys PK: Differential effects of Na-K-ATPase pump inhibition, chemical anoxia, and glycolytic blockade on membrane potential of rat optic nerve. Brain Res 1037:171-9, 2005

100. Rajasekaran SA, Palmer LG, Moon SY, et al: Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. Mol Biol Cell 12:3717-32, 2001

101. Burtis C, AShwood,ER, Bruns,DE: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (ed 4), Elsevier Saunders, 2006

102. Korner A, Eklof AC, Celsi G, et al: Increased renal metabolism in diabetes. Mechanism and functional implications. Diabetes 43:629-33, 1994

103. Jorgensen PL: Structure, function and regulation of Na,K-ATPase in the kidney. Kidney Int 29:10-20, 1986

104. Sweadner KJ, Goldin SM: Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function, and regulation. N Engl J Med 302:777-83, 1980

105. Kaplan JH: Biochemistry of Na,K-ATPase. Annu Rev Biochem 71:511-35, 2002

106. Beguin P, Wang X, Firsov D, et al: The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. Embo J 16:4250-60, 1997

107. Therien AG, Blostein R: Mechanisms of sodium pump regulation. Am J Physiol Cell Physiol 279:C541-66, 2000

108. Geering K: Biosynthesis, membrane insertion and maturation of Na, K-ATPase. Prog Clin Biol Res 268B:19-33, 1988

109. Geering K, Beggah A, Good P, et al: Oligomerization and maturation of Na,K-ATPase: functional interaction of the cytoplasmic NH2 terminus of the beta subunit with the alpha subunit. J Cell Biol 133:1193-204, 1996

110. Ackermann U, Geering K: Mutual dependence of Na,K-ATPase alpha- and beta-subunits for correct posttranslational processing and intracellular transport. FEBS Lett 269:105-8, 1990

111. Beguin P, Hasler U, Staub O, et al: Endoplasmic reticulum quality control of oligomeric membrane proteins: topogenic determinants involved in the degradation of the unassembled Na,K-ATPase alpha subunit and in its stabilization by beta subunit assembly. Mol Biol Cell 11:1657-72, 2000

112. Pressley TA: Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. Miner Electrolyte Metab 22:264-71, 1996

113. Lingrel JB, Croyle ML, Woo AL, et al: Ligand binding sites of Na,K-ATPase. Acta Physiol Scand Suppl 643:69-77, 1998

114. Hu YK, Kaplan JH: Site-directed chemical labeling of extracellular loops in a membrane protein. The topology of the Na,K-ATPase alpha-subunit. J Biol Chem 275:19185-91, 2000

115. Jewell EA, Lingrel JB: Comparison of the substrate dependence properties of the rat Na,K-ATPase alpha 1, alpha 2, and alpha 3 isoforms expressed in HeLa cells. J Biol Chem 266:16925-30, 1991

116. Yoon KL, Guidotti G: Studies on the membrane topology of the (Na,K)-ATPase. J Biol Chem 269:28249-58, 1994

117. Avila J, Alvarez de la Rosa D, Gonzalez-Martinez LM, et al: Structure and expression of the human Na,K-ATPase beta 2-subunit gene. Gene 208:221-7, 1998

118. Appel C, Gloor S, Schmalzing G, et al: Expression of a Na,K-ATPase beta 3 subunit during development of the zebrafish central nervous system. J Neurosci Res 46:551-64, 1996

119. Jaunin P, Jaisser F, Beggah AT, et al: Role of the transmembrane and extracytoplasmic domain of beta subunits in subunit assembly, intracellular transport, and functional expression of Na,K-pumps. J Cell Biol 123:1751-9, 1993

120. Jaisser F, Jaunin P, Geering K, et al: Modulation of the Na,K-pump function by beta subunit isoforms. J Gen Physiol 103:605-23, 1994

121. Beggah AT, Jaunin P, Geering K: Role of glycosylation and disulfide bond formation in the beta subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. J Biol Chem 272:10318-26, 1997

122. Kawamura M, Nagano K: Evidence for essential disulfide bonds in the beta-subunit of (Na+ + K+)-ATPase. Biochim Biophys Acta 774:188-92, 1984

123. Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlish SJ: Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. Annu Rev Physiol 65:817-49, 2003

124. Kaplan JH, Gatto C, Holden JP, et al: Structural changes associated with the coupling of ATP hydrolysis and cation transport by the Na pump. Acta Physiol Scand Suppl 643:99-105, 1998

125. Aydemir-Koksoy A, Allen JC: Regulation of Na(+) pump expression by vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 280:H1869-74, 2001

126. Kjeldsen K, Bjerregaard P, Richter EA, et al: Na+,K+-ATPase concentration in rodent and human heart and skeletal muscle: apparent relation to muscle performance. Cardiovasc Res 22:95-100, 1988

127. Barr DJ, Green HJ, Lounsbury DS, et al: Na+-K+-ATPase properties in rat heart and skeletal muscle 3 mo after coronary artery ligation. J Appl Physiol 99:656-64, 2005

128. Hinojos CA, Doris PA: Altered subcellular distribution of Na+,K+-ATPase in proximal tubules in young spontaneously hypertensive rats. Hypertension 44:95-100, 2004

129. Bertorello AM, Katz AI: Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. Am J Physiol 265:F743-55, 1993

130. Nemoto J, Muto S, Ohtaka A, et al: Serum transcriptionally regulates Na(+)-K(+)-ATPase gene expression in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 273:C1088-99, 1997

131. Songu-Mize E, Liu X, Stones JE, et al: Regulation of Na+,K+-ATPase alpha-subunit expression by mechanical strain in aortic smooth muscle cells. Hypertension 27:827-32, 1996

132. Girardet M, Geering K, Gaeggeler HP, et al: Control of transepithelial Na+ transport and Na-K-ATPase by oxytocin and aldosterone. Am J Physiol 251:F662-70, 1986

133. McKee M, Scavone C, Nathanson JA: Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. Proc Natl Acad Sci U S A 91:12056-60, 1994

134. Allen JC, Navran SS, Seidel CL, et al: Intracellular Na+ regulation of Na+ pump sites in cultured vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 256:C786-92, 1989

135. Petersen AC, Murphy KT, Snow RJ, et al: Depressed Na+-K+-ATPase activity in skeletal muscle at fatigue is correlated with increased Na+-K+-ATPase mRNA expression following intense exercise. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 289:R266-74, 2005

136. Abeywardena MY, McMurchie EJ, Russell GR, et al: Species variation in the ouabain sensitivity of cardiac Na+/K+-ATPase. A possible role for membrane lipids. Biochem Pharmacol 33:3649-54, 1984

137. Wood L, Beutler E: Temperature dependence of sodium-potassium activated erythrocyte adenosine triphosphatase. J Lab Clin Med 70:287-94, 1967

138. Muriel P, Mourelle M: The role of membrane composition in ATPase activities of cirrhotic rat liver: effect of silymarin. J Appl Toxicol 10:281-4, 1990

139. Munoz MA, Balon M, Fernandez C: Direct determination of inorganic phosphorus in serum with a single reagent. Clin Chem 29:372-4, 1983

140. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-54, 1976

141. Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 70:158-69, 1967

142. Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 34:497-500, 1988

143. Aebi H, Wyss SR, Scherz B, et al: Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. Eur J Biochem 48:137-45, 1974

144. Hashimato S: A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. Anal Biochem.:425-435, 1974

145. Jain SK, McVie R, Duett J, et al: Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. Diabetes 38:1539-43, 1989

146. Fairbanks V, Klee,G: Measurement of hemoglobin concentration in whole blood, in Tietz N (ed): Textbook of Clinical Chemistry, WB Sounders Co, 1986, pp 1532-34

147. Nivsarkar M: Improvement in circulating superoxide dismutase levels: role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in rheumatoid arthritis. Biochem Biophys Res Commun 270:714-6, 2000

148. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P: Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. Circulation 80:1115-27, 1989

149. Opie LH: Reperfusion injury and its pharmacologic modification. Circulation 80:1049-62, 1989

150. Stark G: Functional consequences of oxidative membrane damage. J Membr Biol 205:1-16, 2005

151. Gloor SM: Relevance of Na,K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. FEBS Lett 412:1-4, 1997

152. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, et al: Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Clin Biochem 38:981-6, 2005

153. Jaswal S, Mehta HC, Sood AK, et al: Antioxidant status in rheumatoid arthritis and role of antioxidant therapy. Clin Chim Acta 338:123-9, 2003

154. Babior BM: Phagocytes and oxidative stress. Am J Med 109:33-44, 2000

155. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP: The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. Osteoarthritis Cartilage 11:747-55, 2003

156. Tak PP, Zvaifler NJ, Green DR, et al: Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. Immunol Today 21:78-82, 2000

157. Mapp PI, Grootveld MC, Blake DR: Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. Br Med Bull 51:419-36, 1995

158. Blake DR, Merry P, Unsworth J, et al: Hypoxic-reperfusion injury in the inflamasyonlud human joint. Lancet 1:289-93, 1989

159. Allen RE, Blake DR, Nazhat NB, et al: Superoxide radical generation by inflamasyonlud human synovium after hypoxia. Lancet 2:282-3, 1989

160. Halliwell B GJ: Free radicals, ageing and disease, Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press Oxford, 1996, pp 417-506

161. Eggleton P, Wang L, Penhallow J, et al: Differences in oxidative response of subpopulations of neutrophils from healthy subjects and patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 54:916-23, 1995

162. Lotz M: Neuropeptides, free radicals and nitric oxide, in Hochberg MC SA, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (ed): Rheumatology (ed 3). Toronto, Mosby, 2003, pp 135-146

163. Winterbourn CC, Stern A: Human red cells scavenge extracellular hydrogen peroxide and inhibit formation of hypochlorous acid and hydroxyl radical. J Clin Invest 80:1486-91, 1987

164. Ostrakhovitch EA, Afanas'ev IB: Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. Biochem Pharmacol 62:743-6, 2001

165. Cay M, Naziroglu M: Effects of intraperitoneally-administered vitamin E and selenium on the blood biochemical and haematological parameters in rats. Cell Biochem Funct 17:143-8, 1999

166. Nazıroğlu M ÇM, Aksakal M, Akgül E: The effects of vitamin E on some hematological and biochemical values in lambs. Turk j Vet Anim Sci 20:39-43, 1996

167. Kiziltunc A, Cogalgil S, Cerrahoglu L: Carnitine and antioxidants levels in patients with rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 27:441-5, 1998

168. Carsons S: Newer laboratory parameters for the diagnosis of rheumatic disease. Am J Med 85:34-8, 1988

169. Gudbjornsson B, Zak A, Niklasson F, et al: Hypoxanthine, xanthine, and urate in synovial fluid from patients with inflammatory arthritides. Ann Rheum Dis 50:669-72, 1991

170. Pfeffer KD, Huecksteadt TP, Hoidal JR: Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. Cytokine and steroid regulation. J Immunol 153:1789-97, 1994

171. Page S, Powell D, Benboubetra M, et al: Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines. Biochim Biophys Acta 1381:191-202, 1998

172. Hassoun PM, Yu FS, Cote CG, et al: Upregulation of xanthine oxidase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and hypoxia. Role in acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med 158:299-305, 1998

173. Falciani F, Ghezzi P, Terao M, et al: Interferons induce xanthine dehydrogenase gene expression in L929 cells. Biochem J 285 (Pt 3):1001-8, 1992

174. Scudder PR, Al-Timimi D, McMurray W, et al: Serum copper and related variables in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 37:67-70, 1978

175. Banford JC, Brown DH, Hazelton RA, et al: Serum copper and erythrocyte superoxide dismutase in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis 41:458-62, 1982

176. Sklodowska M, Gromadzinska J, Biernacka M, et al: Vitamin E, thiobarbituric acid reactive substance concentrations and superoxide dismutase activity in the blood of children with juvenile rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol 14:433-9, 1996

177. Comstock GW, Burke AE, Hoffman SC, et al: Serum concentrations of alpha tocopherol, beta carotene, and retinol preceding the diagnosis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 56:323-5, 1997

178. Olivieri O, Girelli D, Trevisan MT, et al: Red blood cell susceptibility to lipid peroxidation, membrane lipid composition and antioxidant enzymes in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 18:1263-4, 1991

179. Ashour M, Salem S, Hassaneen H, et al: Antioxidant status in children with juvenile rheumatoid arthritis (JRA) living in Cairo, Egypt. Int J Food Sci Nutr 51:85-90, 2000

180. Blum J, Fridovich I: Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. Arch Biochem Biophys 240:500-8, 1985

181. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, et al: Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. Br Med Bull 49:506-22, 1993

182. Chong PL, Fortes PA, Jameson DM: Mechanisms of inhibition of (Na,K)-ATPase by hydrostatic pressure studied with fluorescent probes. J Biol Chem 260:14484-90, 1985

183. Sandermann H, Jr.: Regulation of membrane enzymes by lipids. Biochim Biophys Acta 515:209-37, 1978

184. Koter M, Franiak I, Strychalska K, et al: Damage to the structure of erythrocyte plasma membranes in patients with type-2 hypercholesterolemia. Int J Biochem Cell Biol 36:205-15, 2004

185. Masoom-Yasinzai M: Altered fatty acid, cholesterol and Na+/K+ ATPase activity in erythrocyte membrane of rheumatoid arthritis patients. Z Naturforsch [C] 51:401-3, 1996

186. van Echteld CJ, Kirkels JH, Eijgelshoven MH, et al: Intracellular sodium during ischemia and calcium-free perfusion: a 23Na NMR study. J Mol Cell Cardiol 23:297-307, 1991

187. Tani M, Neely JR: Role of intracellular Na+ in Ca2+ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H+-Na+ and Na+-Ca2+ exchange. Circ Res 65:1045-56, 1989

188. Shao Q, Matsubara T, Bhatt SK, et al: Inhibition of cardiac sarcolemma Na(+)-K+ ATPase by oxyradical generating systems. Mol Cell Biochem 147:139-44, 1995

189. Elmoselhi AB, Butcher A, Samson SE, et al: Free radicals uncouple the sodium pump in pig coronary artery. Am J Physiol 266:C720-8, 1994

190. Das DK, Neogi A: Effects of superoxide anions on the (Na + K)ATPase system in rat lung. Clin Physiol Biochem 2:32-8, 1984

191. Vlessis AA, Muller P, Bartos D, et al: Mechanism of peroxide-induced cellular injury in cultured adult cardiac myocytes. Faseb J 5:2600-5, 1991

192. Kukreja RC, Kearns AA, Zweier JL, et al: Singlet oxygen interaction with Ca(2+)-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. Circ Res 69:1003-14, 1991

193. Kishimoto A, Kajikawa N, Tabuchi H, et al: Calcium-dependent neural proteases, widespread occurrence of a species of protease active at lower concentrations of calcium. J Biochem (Tokyo) 90:889-92, 1981

194. Sanhueza J, Valdes J, Campos R, et al: Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia-reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 78:211-8, 1992

195. Baskol G, Demir H, Baskol M, et al: Investigation of protein oxidation and lipid peroxidation in patients with rheumatoid arthritis. Cell Biochem Funct 24:307-11, 2006