

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

PSÖRİASİSLİ HASTALARDA
DÜŞÜK DANSİTELİ LİPOPROTEİN (LDL)'İN OKSİDASYONA YATKİNLİĞİ
VE BUNUN OKSİDAN-ANTİOKSİDAN DENGESİ İLE İLİŞKİSİ

T 107655

DOKTORA TEZİ

BİRGÜL KURAL (VANIZOR)

Mayıs- 2001
TRABZON

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

PSÖRİASİSLİ HASTALARDA
DÜŞÜK DANSİTELİ LİPOPROTEİN (LDL)'İN OKSİDASYONA YATKINLIĞI
VE BUNUN OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DENGE İLE İLİŞKİSİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Birgül KURAL (VANİZOR)

707655

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 01.05.2001

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 22.05.2001

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Asım ÖREM

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. İlker DURAK

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Orhan DEĞER

Enstitü Müdürü

: Doç. Dr. Abdülkadir REİS

Mayıs-2001

TRABZON

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ

iv

KISALTMALAR

v

1. GİRİŞ

1

2. GENEL BİLGİLER

3

2.1. Lipoproteinler ve Genel Özellikleri

3

2.2. Oksidan-Antioksidan Denge

4

2.2.1. Serbest Radikaller ve Oksidan Ajanlar

4

2.2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

7

2.2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

10

2.2.4. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkisi

15

2.3. LDL Oksidasyonu

16

2.3.1. LDL Oksidasyonunu Etkileyen Faktörler

16

2.3.2. LDL'nin Oksidasyon Mekanizması

18

2.3.3. Okside LDL Şekilleri

19

2.3.4. Okside LDL'nin Kimyasal, Fizikokimyasal ve Biyolojik Özellikleri

20

2.3.5. Okside LDL Antikoru (oLAB)

21

2.3.6. Okside LDL ve Ateroskleroz

22

2.4. Psöriasis

24

2.4.1. Etyolojisi

24

2.4.2. Patofizyolojisi

25

2.4.3. Klinik Belirtileri

26

2.4.4. Tedavi

26

2.5. Psöriasis, Oksidan-Antioksidan Denge ve Aterosklerozla İlişkisi

27

3. MATERYAL ve METOD	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler	28
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.2. Metodlar	30
3.2.1. Deneyin Planlanması ve Nümunelerin Toplanması	30
3.2.2. Otoanalizörlerde Tayin Edilen Parametreler	30
3.2.2.1. Lipid ve Lipoprotein Tayini	30
3.2.2.2. Spesifik Proteinlerin Tayini	31
3.2.2.3. ESH Tayini	31
3.2.2.4. PMN-Lökosit Tayini	31
3.2.3. Manuel Çalışılan Parametreler	31
3.2.3.1. Antioksidan Enzimler	32
3.2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini	32
3.2.3.1.2. Katalaz (Kat) Aktivitesi Tayini	35
3.2.3.1.3. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Tayini	36
3.2.3.1.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini	38
3.2.3.2. Lipid Peroksidasyonu Tayinleri	40
3.2.3.2.1. Plazma Lipid Hidroperoksit (LHP) Tayini	40
3.2.3.2.2. Eritrositlerde TBARS Tayini	42
3.2.3.2.3. LDL'de TBARS Tayini	43
3.2.3.3. Okside LDL Antikoru (oLAb) Tayini	45
3.2.3.4. LDL İzolasyonu ve LDL Oksidasyon Kapasitesi Tayinleri	46
3.2.3.4.1. Lipoproteinlerin İzolasyonu	46
3.2.3.4.2. LDL'nin Diyalizi	48
3.2.3.4.3. Lipoproteinlerde Protein Tayini	49
3.2.3.4.4. LDL Oksidasyonu	51
3.2.3.5. Lipid Elektroforezi	54
3.3. İstatistiksel Analizler	55

4. BULGULAR	56
4.1. Metodların Kalite Kontrolleri	56
4.2. Psoriasisli Hastalarda ve Sağlıklı Kişilerde Ortalama Değerler ve Anlamlılıkları	60
4.3. Psoriasis Hastalarında ve Sağlıklı Kişilerde Parametreler Arası Korelasyonlar	65
4.3.1. Psoriasis Hastalarında Korelasyonlar	65
4.3.2. Sağlıklı Kişilerde Korelasyonlar	77
5. TARTIŞMA	87
5.1. Metodların Tartışması	87
5.1.1. Numune Toplanması ve Ön İşlemler	87
5.1.2. LDL İzolasyonu ve Oksidasyonu Yöntemleri	88
5.1.3. oLAb Tayini	98
5.1.4. Lipid Peroksidasyonu Ürünlerinin Tayini	98
5.1.5. Antioksidan Enzim Tayinleri	100
5.2. Bulguların Tartışması	102
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	113
6.1. Sonuçlar	113
6.2. Öneriler	114
7. ÖZET	115
8. SUMMARY	116
9. KAYNAKLAR	118

ÖNSÖZ

Bu çalışmada;

Bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Asım ÖREM başta olmak üzere, diğer Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof.Dr. Orhan DEĞER'e, Sayın Prof.Dr. E. Edip KEHA'ya, Sayın Prof.Dr. Ekin ÖNDER'e, Sayın Doç.Dr. Haluk TESTERECİ'ye ve Sayın Yrd.Doç. Dr. S. Caner KARAHAN'a,

Tezdeki hastaları klinik değerlendirmesinden dolayı Dermatoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. Gülseren ÇİMŞİT'e

Tez çalışmaları esnasında hiçbir yardım ve desteğini esirgemeyen Yunus Emre YANDI'ya,

Manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerine ve tüm çalışanlarına,

Klinik Biyokimya Rutin Laboratuvarı personellerine,

Tez çalışmamı bitirebilmem için her konuda destek olan ve sabırlı davranan eşime ve ailemin diğer tüm fertlerine teşekkürler ederim.

Bu tez K.T.Ü. Araştırma Fonu tarafından 98.114.001.5 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Birgül KURAL (VANİZOR)

KISALTMALAR

A ⁰	: Sıfırıncı dakikadaki absorbans
DKH	: Dien konjugasyon hızı
ESH	: Eritrosit sedimentasyon hızı
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSSG	: Okside glutasyon
HNE	: Hidroksinonenal
IL	: İnterlökin
Kat	: Katalaz
LHP	: Lipid hidroperoksid
MDA	: Malondialdehit
MDK	: Maksimum dien konsantrasyonu
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
oLab	: Okside LDL antikoru
oLDL	: Okside LDL
PASI	: Psöriasis alan ve şiddet indeksi
PMN	: Polimorfonükleer
PUFA	: Poliansature yağ asitleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBARS	: “Tiobarbutiric acide reaktive substance”
t-lag	: Gecikme süresi
t-maks	: Maksimum absorbansa ulaşma süresi

1. GİRİŞ

Psöriasis (Sedef Hastalığı); hipertansiyon, diabetes mellitus, hiperürisemi ve dislipoproteinemi görülme ihtimalinin artışı ile karakterize kronik inflamatuvar bir deri hastalığıdır (1). Psöriasis hastalarında, özellikle de erkek hastalarda plazma lipid ve lipoprotein, seviyelerinde ve bunların bileşimlerindeki değişikliklerin, damar hastalığı ve kardiyovasküler hastalıkların görülme ihtimalinin artışıyla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (2,3).

Hastalığın kronik inflamasyon ve iyilik dönemlerinde özellikle polimorfonükleer (PMN) lökositlerin kemotaksi ve fagositoz gibi aktiviteleri ile lizozomal enzim aktivitelerinde de artma gözlenir (1). Ayrıca yapılan bir çok çalışma ile psöriasisli hastalarda gerek sistemik dolaşımda gerekse lezyonlu keratinositlerde çeşitli sitokinlerin yapım ve salgısının arttığı gösterilmiştir (4). Bunların derecesine bağlı olarak da ortama farklı miktarda oksidan bileşiklerin sızması muhtemeldir. İnflamasyon sırasında bir çok oksidan ve prooksidan bileşikler oluşmakta ve bunlar antioksidan sistem tarafından toksik olmayan ürünlere dönüştürülmektedir (5). Oksidan-antioksidan dengenin bozulduğu yoğun inflamasyon tablolarında vücuttaki organik bileşikler zarar görmektedir. Bu bileşiklerden biri de lipidlerdir. Lipid ve lipoprotein düzeylerindeki değişimin ve lipoproteinlerin (özellikle LDL'nin) yapısındaki oksidasyonun aterosklerozun patogenezinde çok önemli bir kademeyi oluşturduğu son yıllarda yapılan bir çok çalışmayla ortaya konulmuştur (6). Modifiye lipoproteinler konak hücrelerce immünojen olarak algılanır, ardından da doğal LDL ile değil de modifiye LDL ile reaksiyona girebilen otoantikorlar oluşur. Serumda okside LDL antikorları (oLAb) seviyeleri ölçümünün oksidatif işlem ile ateroskleroz gelişimi arasındaki ilişkinin anlaşılmasını sağlayabileceği ileri sürülmüştür (7).

Psöriasisli hastaların lipid parametreleri ve antioksidan enzim aktiviteleri araştırılmıştır. Ancak yapılan çalışmaların sonuçları arasında farklılıklar vardır. Psöriasislilerde yapılan çalışmalarda serum kolesterol (TK) seviyesi yüksek (8) ya da

değişmemiş (2), trigliserid (TG) seviyesi yüksek (2) ya da değişmemiş (8) ve Apo B seviyesi yüksek (8) ya da değişmemiş (9) olarak tespit edilmiştir. Eritrosit glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi, bir çalışmada (5) kontrole göre yüksek bulunurken diğer bir çalışmada (10) düşük bulunmuş ve bunun nedeninin de deri döküntüsü esnasındaki selenyum kaybı olduğu düşünülmüştür. Ayrıca eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde anlamlı bir azalma gözlenmiş, katalaz (Kat) aktivitelerinde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (11,12).

Bu bilgilerin ışığı altında, psöriasis hastalığındaki mevcut inflamasyon tablosunun, oksidan ve antioksidan sisteme, dolayısıyla plazma lipid ve lipoprotein düzeylerine ve bu lipoproteinlerin kimyasal modifikasyonları üzerine etkisi, eksik literatür bilgisi olarak gözükmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, psöriasisli hastaların lipid ve lipoprotein düzeylerini, oLAB ve LDL oksidasyon direnç kapasitesi seviyelerini ve bunların lipid peroksidasyon ürünleri [lipid hidroperoksit (LHP), malondialdehit (MDA) (TBARS olarak)] ve antioksidan enzimlerin [SOD, Kat, GSH-Px, glutatyon redüktaz (GR)] aktiviteleri üzerine etkilerini belirlemek, aynı zamanda LDL'nin yapısındaki değişikliklerin oksidan-antioksidan sistemle ilişkisini değerlendirerek bu olayların artmış aterosklerozdaki rollerini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lipoproteinler ve Genel Özellikleri

Sulu çözeltilerde çözünmediklerinden dolayı lipidler; dokularda membran lipidleri (fosfolipidler ve kolesterol) ve depo lipidleri (TG), ve plazmada ise lipoproteinler adı verilen suda çözünebilen makromolekül kompleksleri şeklinde taşınır halde bulunurlar (13). Lipoproteinler, hidrofobik lipidleri [TG ve ester kolesterol (EK)] kapsayan bir çekirdek ile protein, serbest kolesterol ve fosfolipidlerden oluşan tek katlı bir yüzey tabakasından meydana gelen küresel yapılardır. Elektroforetik hareketliliklerine, yoğunluklarına ve içerdikleri apolipoproteinlere göre başlıca altı farklı lipoprotein sınıfı lipid taşınmasında çeşitli roller üstlenmektedir. Bunlar şilomikronlar (ŞM), çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), orta dansiteli lipoproteinler (IDL), düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) ve lipoprotein (a) [Lp (a)]'dır. Plazma lipoproteinleri barsak ve karaciğerde sentez edilir. Yapılarında, 10 değişik apoprotein (apo) bulundurulur. Bu apoproteinler, fosfolipidlerle reaksiyona girerek EK ve TG'lerin çözünmesine yardım ederler, lipoproteinlerin enzimlerle olan reaksiyonlarını düzenlerler ve hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak kolesterol ve trigliseridlerin doku ve plazma arasındaki değişiminde etkili olurlar (13,14).

Diyetle alındıktan sonra, barsaklarda kısmen hidroliz olarak yağ asitleri, monoasılgliseroller, fosfolipid ve kolesterol şeklinde barsak mukoza hücrelerinden absorbe edilen lipidler, şilomikronlar şeklinde lenfatik sistem aracılığı ile kana verilir ve metabolize olurlar. Bu yola eksojen lipid metabolizması denir. Karaciğerde sentezlenen VLDL, dolaşım esnasında hidrolizlenme sonucu sırasıyla IDL ve LDL'ye dönüşür ve başlıca ekstrahepatik dokular tarafından katabolize edilir. Bu yola endojen lipid metabolizması denir (15). Plazmadaki kolesterolün yaklaşık %70'i sadece apo B₁₀₀'ü bulunduran LDL tarafından taşınır. Bu nedenle LDL aterojenik lipoprotein olarak bilinir. Yapısında farklı

lipid sınıfından 1300 çeşit poliansature yağ asidi (PUFA) bulundurması ve antioksidanlarıyla oranının 1:165 olması LDL'yi oksidasyona duyarlı kılmaktadır (16). Doğal LDL, normal LDL reseptör yolu ile başlıca ekstra hepatik dokular tarafından katabolize edilirken, oksidatif modifikasyona uğramış LDL (oLDL) bu yoldan bağımsız olarak makrofajlardaki çöpçü reseptörler üzerinden katabolize edilir (17). Barsaklarda ve karaciğerde sentezlenen bir diğer lipoprotein ise HDL'dir. HDL'nin yapısındaki proteininin %90'ından fazlası apo A'dır. HDL, perifer dokulardan karaciğere kolesterolün taşınması ve metal şelasyonu ya da peroksidaz benzeri aktivite ile LDL oksidasyonunu önlemesi nedeniyle antiaterojenik lipoprotein olarak bilinir (18). Bu peroksidaz benzeri aktiviteyi lipoprotein peroksidlerini hidrolizleyen paraoksonaz (PON) ile gösterir. Ancak PON reaktif oksijen ürünleri varlığında aktivitesini kaybetmektedir (19). Lp(a), lipid içeriği bakımında LDL'ye benzemesi ve yapısındaki apoproteinler [apo(a) ve apo B]'den dolayı hem aterosjenik hem de trombojenik özelliğe sahiptir (20).

2.2. Oksidan-Antioksidan Denge

Biyolojik sistemlerde, aerobik metabolizmanın normal ürünü olarak serbest radikaller ve diğer güçlü oksidanlar açığa çıkar. Bu reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve bunların meydana getireceği hasarı önlemek için antioksidan savunma sistemleri devreye girmektedir (21) (Şekil 1).

Sağlıklı organizmalarda, aktif oksijen ürünleri ve geçiş metalleri oksidan olarak rol alırken, SOD, Kat, vitamin E (Vit E) ve Vit C gibi yapılar da antioksidan olarak rol alır. Oksidan-antioksidan dengede oksidan tarafa eğilimin olduğu artmış oksidan stres durumlarında, bu moleküllerde hasarlar meydana gelir. Bu durum bir çok patolojik olayın temelini oluşturur (22).

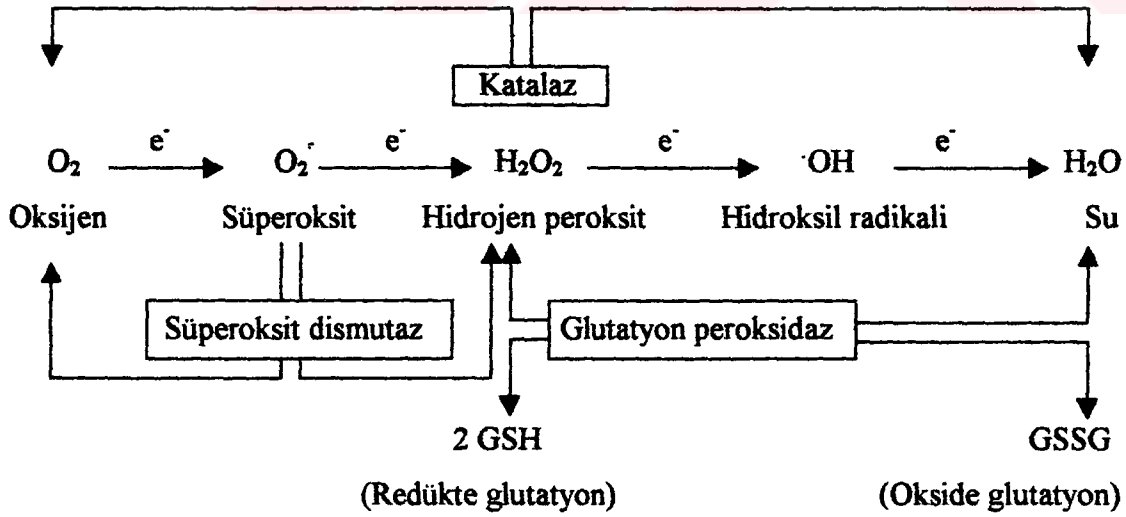
2.2.1. Serbest Radikaller ve Oksidan Ajanlar

Üzerinde bir ya da daha fazla ortaklaşmamış elektron bulunan ve serbest hareket edebilen atom ya da moleküller, serbest radikaller olarak ifade edilmektedir. Normal şartlarda hücreler tarafından tüketilen moleküler oksijenin % 95-98'i dört elektron ilavesi ile suya, geri kalan % 2-5'i ise günlük homeostatik oksidan stres esnasında reaktif serbest radikallere dönüşür (22). Biyolojik sistemlerde en fazla ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Fizyolojik metabolizma ve patolojik değişiklikler, serbest radikal oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Serbest radikal kaynakları Tablo 2’de belirtilmiştir. İyonize radyasyon gibi dış faktörler hariç tutulursa hücrelerde serbest radikallerin üretimi genellikle elektron transfer reaksiyonları sonucu olmaktadır. Bu reaksiyonlar enzim katalizli olabileceği gibi geçiş metal iyonlarının redoks reaksiyonu sonucu, non enzimatik olarak da gerçekleşebilir (24).

Tablo 1. Radikal ve radikal olmayan oksijen türevleri (25).

Radikal oksijen türevleri		Radikal olmayan oksijen türevleri	
Adı	Sembolü	Adı	Sembolü
Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$\cdot OH$	Lipid peroksit	$ROOH$
Nitrik oksit	$NO\cdot$	Hipoklorik asit	$HOCl$
Peroksil	$ROO\cdot$	Ozon	O_3
Alkoksil	$RO\cdot$	Aldehit	$HCOR$



Şekil 1. Moleküler oksijenden reaktiflerin oluşumu ve antioksidan enzimlerin bunlara etkileri.

Tablo 2. Serbest radikal kaynakları (26).

Endojen Kaynaklar		Eksojen Kaynaklar	
Elektron transport zinciri (sit P ₄₅₀ ve sit b ₅)	Endoplazmik retikulum	Redoks döngüsü bileşenleri	Paraquat
	Kloroplast		Diquat
	Mikrozom		Alloksan
	Mitokondri		Doksorubisin
	Nükleer membran		
Fagositik hücreler	Endotel hücreleri	İlaç oksidasyonları	Parasetamol
	Eozinofiller		CCl ₄ (Karbon tetraklorür)
	Monosit ve makrofaj hücreleri		
	Nötrofiller		
Oksidan enzimler ve proteinler	Aldehit oksidaz	Çevresel ajanlar	Azot dioksit (NO ₂)
	Amino asit oksidaz		Hiperoksi
	Dihidroorotat dehidrogenaz		Pestisitler
	Flavoprotein dehidrogenaz		Sigara dumanı
	Galaktoz oksidaz		Anestezikler
	Hemoglobin		Aromatik hidrokarbonlar
	Flavoproteinler	İyonize radyasyon	
	İndolamin dioksidaz		
	Ksantin oksidaz		
	Lipooksijenaz	Güneş ışığı	
	Monoamin oksidaz		
	NADPH oksidaz	Isı şoku	
	Prostaglandin sentetaz		
	Triptofan dioksigenaz		
	Ürat oksidaz	Glutasyon oksitleyici bileşikler	

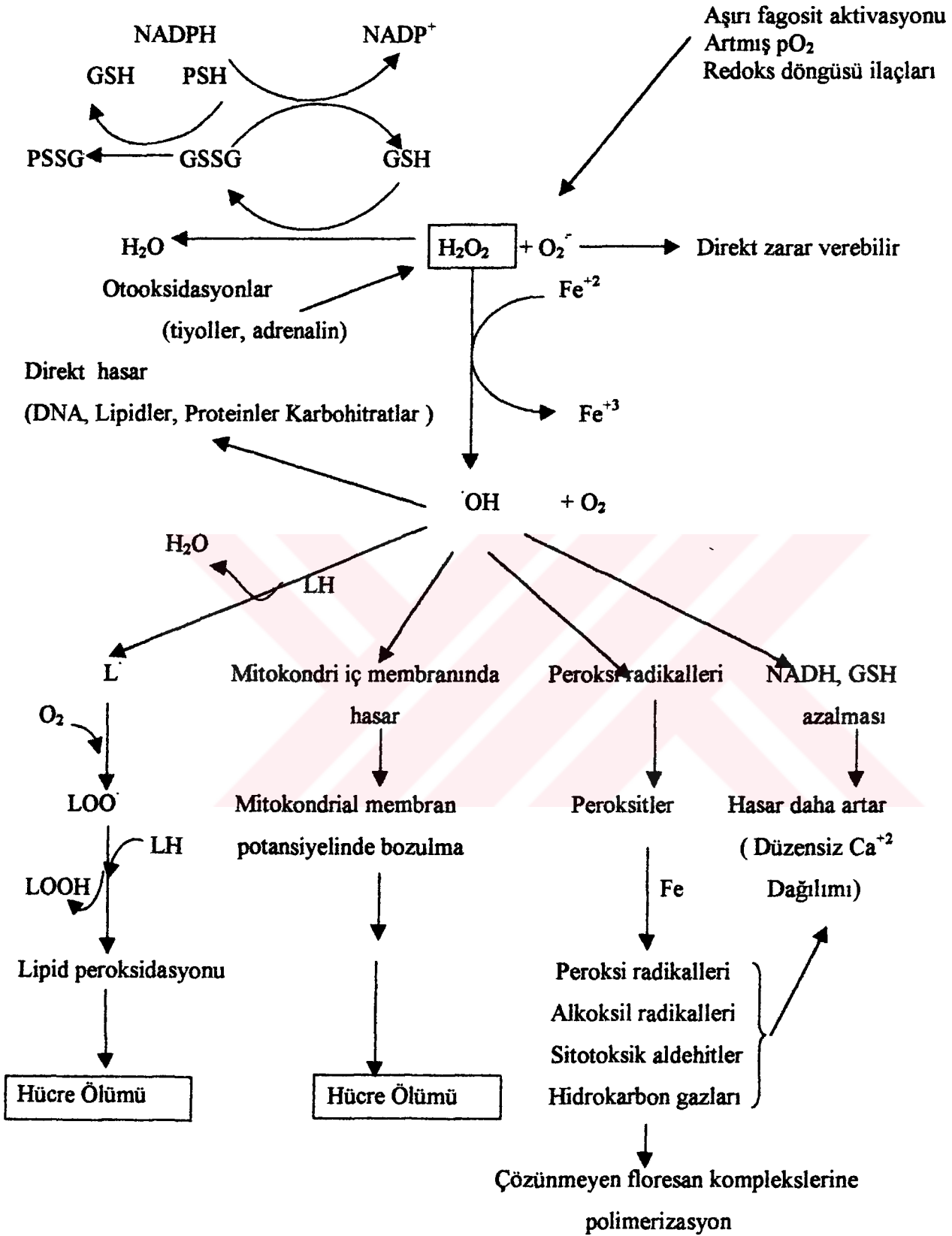
2.2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Serbest oksijen radikalleri, mitokondrial solunum, trombosit aktivasyonu, lökosit fagositozu ve prostaglandin sentezi gibi yaşamsal işlevlerde rol almasına rağmen hücrede lipidler başta olmak üzere, proteinler, DNA ve karbonhidratlar üzerine toksik etkiye sahiptirler (Şekil 2). Bu yolla hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluklara sebep olabilirler. Tablo 3’de hücrelerdeki serbest radikallerin hedefleri ve bunların biyolojik etkileri özetlenmiştir (21,24,27).

Serbest radikallerin proteinler üzerine etkileri, amino asit bileşimlerine bağlıdır. Yapılarında sistein, sistin, metiyonin, histidin, triptofan, tirozin gibi amino asitleri fazlaca bulunduran proteinler radikallerin oksitleyici etkisine daha fazla duyarlıdır. Doymamış çift bağ ihtiva eden ve kükürt içeren moleküllerin de serbest radikallere duyarlılığı çok fazladır. Oksijen radikalleri, peptit bağlarının hidrolizi, disülfid bağı teşekkülü ve çapraz bağlanmalara yol açabilirler. Bazı amino asit kalıntıları, karbonil türevlerine dönüşür. Bu oksidatif değişikliklerden sonra proteinler, proteolitik parçalanmaya karşı daha hassas olurlar. Protein yapısında olan enzimler, aktivite kaybına uğrayabilir veya daha az aktif olurlar. Na-K-ATPaz enziminin tiyol gruplarının oksidasyonu sonucu aktivite kaybı, böylece hücre içi ve dışı iyon dağılımı bozulabilir (26,27) .

Hidroksil radikali özellikle DNA’da deoksiriboz ve bazlarla reaksiyona girerek bazların modifikasyonuna ve zincir ksalmasına yol açar. Ayrıca DNA polimerazı inhibe eder, bu yüzden hücre ölümüne kadar giden süreçleri başlatır, hücre yaşlanmasını hızlandırır ve karsinogenezise yol açabilir (23,28).

Serbest radikaller hücrede enerji metabolizmasını da etkiler. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek, $\text{NADH} + \text{H}^+$ azalmasına ve glikolizle ATP sentezinde azalmaya sebep olurlar. Mitokondrilerde ise radikallerin etkisi ile hem iç membran bütünlüğünün bozulması hem de ATP sentetaz aktivitesinde azalma sonucu ATP seviyesinde bir düşüş olur. Süperoksit radikali hiyaluronik asit parçalanmasına yol açarak inflamatuvar eklem hastalıklarının patolojik sürecinde de görev alabilir (23,29).



Şekil 2. Reaktif oksijen türleri tarafından oluşan hücre hasarı mekanizması (30).

Tablo 3. Hücrelerdeki serbest radikal hedefleri (28).

Hedefleri	Etkileri
Küçük moleküller ve Doymamış tiyol içeren amino asitler	Protein denatürasyonu ve çapraz bağların oluşumu enzim inhibisyonu, organel ve hücre geçirgenlik değişiklikleri
Nükleik asitler	Hücre siklus değişiklikleri, mutasyonlar
Karbohidratlar	Hücre membranı reseptör değişiklikleri
Lipidler	Kolesterol ve yağ asidi oksidasyonu, lipid çapraz bağların oluşması
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerde ve aktivitelerinde azalma
Nörotransmitterler	Serotonin ve epinefrin gibi nörotransmitterlerde ve aktivitelerinde azalma
Antioksidanlar	E vitamini ve β karoten miktarında azalma
Büyük moleküller proteinler	Peptid zincirinde kopma denatürasyonu
DNA	Zincir kopması baz değişiklikleri
Hiyaluronik asit	Sinoviyal sıvı akışkanlığında değişiklik

2.2.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı sistemlerde reaktif oksijen türlerinin seviyelerini düzenleyecek ve bunların oluşturduğu hasarı önleyebilecek bir çok savunma mekanizmaları mevcuttur. Antioksidan savunma sistemi veya kısaca antioksidanlar olarak da bilinen bu mekanizmalar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engeller ve/veya reaktif oksijen türlerini (serbest radikalleri) nontoksik bileşiklere döndürürler. Başlıca, hücrenin sitoplazmasında ve membranında bulunurlar (21).

Hücrede oluşan radikallerin, detoksifikasyon işlemi genellikle enzimlerle gerçekleştirilir. Bunlar, SOD, Kat ve GSH-Px gibi O_2^- ve H_2O_2 temizleyen enzimlerdir. GSH-Px düşük H_2O_2 konsantrasyonlarında aktif iken, katalaz daha çok yüksek H_2O_2 konsantrasyonlarında aktiftir (31).

Antioksidan savunma sisteminin nonenzimatik bölümü, bazı bileşikler ve vitaminlerden oluşur. Bunlar lipid fazda bulunanlar ve sıvı fazda bulunanlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir ve oksidasyon basamaklarının çeşitli safhalarında etkili olurlar. Antioksidanlar, bastırıcı, onarıcı, toplayıcı ve zincir kırıcı olmak üzere dört ayrı şekilde etki gösterirler. Bastırıcı etki; serbest oksijen radikallerin hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya yok eden, toplayıcı etki; serbest oksijen radikallerini tutma veya onları daha zayıf yeni moleküllere çevirme, ve zincir kırıcı; serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek zincir reaksiyonlarını sonlandırma işlemidir (23).

Antioksidan enzimler, metal bağlayan proteinler, toplayıcı, baskılayıcı ve zincir kırıcı antioksidanlar ve diğer antioksidanlar şeklinde dört sınıfa ayrılan antioksidan savunma sistemleri ve etki mekanizmaları Tablo 4'de özetlenmiştir.

Tablo 4. Antioksidan savunma sistemleri ve etki mekanizmaları.

Antioksidan enzimler	Adı	Antioksidan özelliği
	Katalaz	Bir hemoprotein olup hidrojen peroksidi, oksijen ve suya parçalar (31).
	Glutasyon peroksidaz	Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidandır (32).
	Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz	Biyolojik membranlarda ve lipoproteinlerde bulunan 15-lipooksigenaz etkisiyle oluşmuş hidroksi lipidleri indirger (33).
	Glutasyon redüktaz	Hidroperoksitlerin indirgenmesi ile meydana gelen okside glutasyonu (GSSG), tekrar redükte glutasyon (GSH) haline dönüşümünü katalizler (34).
	Glutasyon S-transferaz	Başta araşidonik asit ve linoleik asidin hidroperoksitlerine olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyumdan bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi göstererek savunma oluşturlar (30).
	Süperoksit dismutaz	Sitozolik Cu-ZnSOD ve mitokondrial MnSOD şeklinde iki izomeri olup oksijeni metabolize eden hücrelerde süperoksidin hidrojen perokside dönüşümünü katalizleyerek, süperoksidin zararlı etkilerinden hücreyi korur (29).
	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	Antioksidan savunmada gerekli olan NADPH'ların üretimini sağlar (25).
	Mitokondrial sitokrom oksidaz	Solunum zincirinin son enzimi olup süperoksidi suya dönüştürerek detoksifiye eder (22).

Metal bağlayan proteinler

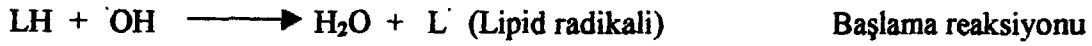
Ferritin	Doku demirini bağlayarak oksidan etkisini kaldırır (27).
Laktoferrin	Sistemik dolaşımdaki serbest demiri bağlar (28).
Seruloplazmin	Ferro demiri ferri demire yükseltgeyerek Fenton reaksiyonu ile serbest radikal üretimini engeller. Plazma antioksidan kapasitesitesinin büyük bir bölümünden sorumludur (36).
Haptogloblin	Yaşlı eritrositlerin parçalanmasından açığa çıkan demiri bağlar (23).
Transferrin	Dolaşımdaki serbest demiri bağlar (23).
Hemogloblin	Demiri taşır (23).
Miyogloblin	Demiri depolar (23).

Albümün	LOOH ve HOCl'i toplar. LDL oksidasyonunu, bakırı bağlayarak ya da bakır bağlanma yerini bloklayarak engeller (27).
Bilurubin	Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır (23).
Dihidrolipoat	Hidroksil radikallerini toplar ve lipoat-dihidrolipoat kompleksi GSSG'yi GSH'a indirger (22).
Fibrinojen	Hidroksil radikali toplayıcısıdır (37).
Karotenoidler	β -karoten, α -karoten, likopen, lutein, beta-kriptoksantin ve diğer yapısal benzer karotenoidler önemli antioksidanlardır. β -karoten, singlet oksijenin en güçlü bastırıcısı ve peroksil radikallerinin toplayıcısıdır (22,29).
Taurin ve hipotaurin	Hücrel antioksidan metabolizmasında rol oynarlar. Hipotaurin hidroksil radikallerini toplayabilme ve lipid peroksidasyonunu inhibe etme kapasitelerine sahiptir (22).
Tokoferoller	α -Tokoferol (Vit E), daha çok singlet oksijeni bastırabilme yeteneğine sahip lipofilik bir antioksidandır. Hücre membranlarının ve çeşitli lipidlerin (özellikle LDL'nin) lipid peroksidasyonunda zincir kırıcı olarak fonksiyon görür (38,39,40).
Askorbat	Süperoksit ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek onları temizleyen güçlü indirgeyici aktiviteye sahip suda çözünen güçlü antioksidandır. Tokoferoksil radikalının, alfa tokoferole indirgenmesini ve antiproteazların oksidan maddeler ile aktivitelerinin kaybolmasını engeller (23,41)
Koenzim Q	Vit E'nin okside şeklini indirgeyen Koenzim Q, özellikle peroksidasyonla üretilen serbest radikalleri toplar. Selenyum ile sinerjik etki gösteren güçlü bir antioksidandır (42,43).
Flavonoidler	Süperoksit, lipid alkoksil, peroksil, nitrik oksit radikallerini temizler. Vit E'nin rejenerasyonuna katılır (44).
Nitrik oksit	Süperoksit radikali toplayarak süperoksidin sitotoksik etkisine bir bariyer oluşturmaktadır. NO miktarı, süperoksit miktarından çok fazla olduğu zaman fizyolojik etkisi görülmektedir (45).
Urik asit	Lipid radikallerine etkisi olmayıp, hidroksil, süperoksit, peroksil radikallerini ve singlet oksijeni temizler (46).

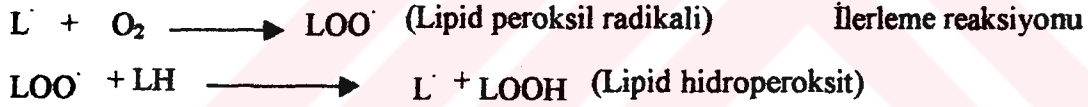
Diger antioksidanlar	Melatonin	Hidroksil radikalini, süperoksit radikalini tutan bir antioksidan olan indolil kasyon radikaline dönüştürerek ortadan kaldıran lipofilik bir antioksidandır (23).
	Glutasyon	Serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan ve proteinlerdeki -SH gruplarını oksidasyona karşı muhafaza eden çok önemli antioksidandır (31,47).
	HDL	Metal şelasyonu ya da peroksidaz benzeri aktivite ile LDL'nin oksidasyonunu engeller. Süperoksit radikallerini toplar (18,19).
	Selenyum	Lipid peroksit ve hidroperoksitleri nötralize eden en önemli doğal endojen antioksidan olan glutasyon peroksidazın yapısında yer alır (31).
	Bakır	Cu-ZnSOD enziminin yapısında bulunarak lipid peroksidlerin birikimini engeller (23,29).
	Çinko	Sitoplazmik antioksidan olan Cu-ZnSOD yapısında yer alan çinko (Zn), bakır ve demir ile yarışır, ve böylece Fenton ve/veya Haber-Weis kimyası ile hidroksil radikali oluşumunu azaltır (48).

2.2.4. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerine Etkisi

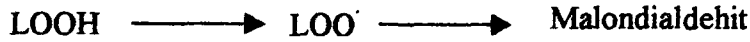
Lipid peroksidasyonu, membran ve lipoproteinlerin yapısında yer alan poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nin oksitleyici ajanların etkilerine maruz kalması sonucu meydana gelir. Bu da geri dönüşüz membran hasarına yol açar. Bu peroksidasyon, kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler (49). Lipid peroksidasyonu, yağ asidinin polialkil zincirindeki metilen karbonunda bir hidrojen atomunun hidroksil radikali tarafından yakalanması ile başlar (Başlama reaksiyonu).



Aerobik koşullarda eşleşmemiş elektron bulunduran bir yağ asidi, moleküler oksijen ile peroksil radikali oluşturmak üzere moleküler düzenlenmeye uğrar (İlerleme reaksiyonu). Peroksil radikali oldukça reaktif olup PUFA'larla etkileşir ve membran yapısında değişikliklere neden olur. Uzama zincirinin uzunluğu, membrandaki yağ asidi oranına ve zincir kırıcı antioksidanların varlığına bağlıdır.



Radikaller, bitişik yağ asitlerinin bir hidrojenini yakalayıp lipid hidroperoksitlerini de meydana getirebilir (23,50).



Lipid peroksidasyonu sonucunda malondialdehit (MDA), 4- hidroksinonenal (HNE), lipid hidroperoksitleri gibi oldukça toksik ve zararlı yan ürünler ortaya çıkar ki bunlar da proaterojenik etkiler gösterirler. MDA, oldukça reaktif bir aldehit olup proteinlerin serbest amino grupları, fosfolipidler veya nükleik asitlerle reaksiyona girerek biyolojik moleküllerde yapısal modifikasyonlara neden olurlar. Membranların yapıları bozulur, geçirgenlikleri değişir ve iyon transportu ve enzim aktivitesi gibi fonksiyonlar etkilenir (51,52).

Serbest radikaller iyomoleküller üzerinde olan bu tip etkilerden dolayı bir çok hastalığın patogeneğinde rol oynayabilir. Diabettes Mellitus (53), hiperlipidemi (54), hipertansiyon (55), ateroskleroz, miyokard enfarktüsü gibi kalp hastalıkları (50), Behçet hastalığı (56), psöriasis (5) ve romatoid artirit (57) gibi kronik inflamatuvar olaylar, çeşitli deri, kan ve göz hastalıkları, Alzheimer (58), kanser ve yaşlılık gibi pek çok hastalıkta serbest radikal üretiminin arttığı ve antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz olduğu bildirilmiştir.

2.3. LDL Oksidasyonu

LDL'nin subendotelyal alanda endotel hücreleri, monositler, makrofajlar, lenfositler ve düz kas hücrelerinden salgılanan radikallerin etkisiyle yapısının oksitlenmesi sonucu okside LDL (oLDL) meydana gelir. Plazmanın yüksek antioksidan kapasitesinden dolayı LDL oksidasyonu genellikle subendotelyal alanda olur. Kan dolaşımındaki oLDL miktarı çok düşüktür. Dolayısıyla oLDL'ler retiküloendotelyal sistem hücrelerince hızlı bir şekilde ortamdan uzaklaştırılır (59,60).

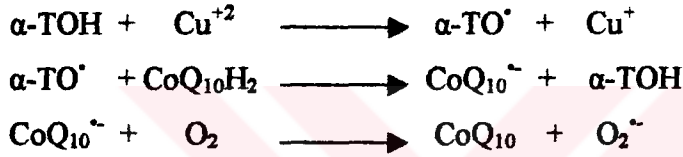
2.3.1. LDL Oksidasyonunu Etkileyen Faktörler

Farklı LDL tiplerinin (LDL alt gruplarının) oksidasyona yatkınlıkları da farklıdır. Bu farklılıkta, LDL'nin lipid muhtevası ve antioksidan kapasitesi başlıca etkenlerdir (55,60). Bunlar içinde küçük ve yoğun olan LDL alt sınıfı oksidatif modifikasyona en yatkın olanıdır (61).

Poliansature yağ asitlerinin monoansature yağ asitlerine oranı oksitlenebilirlikte etkilidir. Monoansature yağ asitlerince zengin LDL, oksidasyona daha az meyillidir. Deneysel çalışmalarla LDL'nin oleik asit muhtevasının artırılması ile oksidasyona duyarlılığının azaldığı belirlenmiştir (62). LDL'nin poliansature yağ asitleri, oksidasyona karşı çok duyarlıdır. Bu şekilde ketonlar, aldehitler ve alkollerin de dahil olduğu yağ asidi türevleri oluşur. Bu türevler son derece reaktiftir ve lizin bakiyeleri ile kovalan modifikasyona girerek LDL'nin apo B'sini asetil LDL reseptörlerince tanınan bir modifiye protein haline çevirirler. Lesitin 2. yağ asidi çıkarıldığı zaman son derece reaktif bir lipid olan lizolesitin meydana gelir. Lizolesitin dolaşımdaki monositler için güçlü kemoatraktandır ve bu işlevi arter duvarında da sürdürebilir. Ayrıca göç etmelerini engelleyip lezyon içerisinde tutarak makrofajların hareketliliğini inhibe edebilir (14,63).

LDL'nin antioksidan miktarının yüksek olması oksidasyona direnci artırır. Düşük konsantrasyonda Vit E, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde LDL oksidasyonunu önleyebilmektedir. Vit E'nin koruyucu etkisi, sadece endotel ve düz kas hücrelerinde değil, monosit-makrofaj hücrelerinde de olmaktadır (41). Vit E ve β -karoteni düşük olan LDL'de otooksidasyon meydana gelebilir; PUFA'lar azalır ve aldehitler artar (64).

Doğal LDL ile karşılaştırılınca α -tokoferol (TOH) ile zenginleştirilmiş LDL, F-10 ortamı ile başlatılmış oksidasyona daha duyarlıdır. α -tokoferol'ün Cu^{+2} 'yi indirgemesiyle meydana gelen Cu^+ , Cu^{+2} 'den daha güçlü oksidandır. Bu indirgenme esnasında meydana gelen $\alpha\text{-TO}^\bullet$ (tokoferoksil radikali) hidrofobik olduğundan LDL'den uzaklaşamaz. Diğer antioksidanların bulunmadığı durumlarda LDL oksidasyonu etkinleşir. Güçlü bir radikal toplayıcı olan koenzim Q ($\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$), $\alpha\text{-TO}^\bullet$ 'a etki ederek onu uzaklaştırmaktadır.



$\alpha\text{-TO}^\bullet$, lipid peroksidasyonunu ilerletirken, her bir $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ molekülü 1-2 serbest radikal zincirini sonlandırdığı ileri sürülmüştür. LDL'nin $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ muhtevası lipoproteininin bakırla oksidasyonunun ilk basamağına hassasiyeti ile ters orantılı olduğu yani $\text{CoQ}_{10}\text{H}_2$ 'nin, sadece Vit E'nin prooksidan aktivitesini önlemekle kalmadığı, aynı zamanda lipoproteininin oksidasyona direncini de arttırdığı bildirilmiştir (42,43).

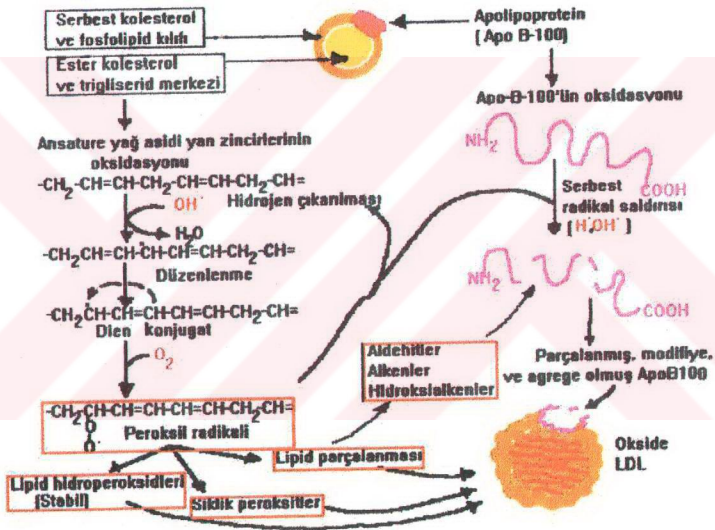
Oksidasyonda ilk önce α ve γ - tokoferol daha sonra da karotenoidler azalır. LDL antioksidanları tamamen kaybettikten sonra hızlı peroksidasyon başlar. LDL'nin oksidasyona direnci, esasen antioksidan muhtevası ile belirlenir (64).

Suda çözünür antioksidanlar olan Vit C ve glutatyon konsantrasyona bağımlı olarak LDL direncini artırmaktadırlar (65). HDL, LDL oksidasyonun azaltıcı yönde etki gösterir. Ancak LDL ile aynı konsantrasyonda kolesterol ihtiva ettiğinde oksidasyona karşı LDL'den daha duyarlıdır (66).

Glikozaminoglikanlar da LDL oksidasyonunda etkili olmaktadır. LDL-glikasyonu oksidasyonu artırır (67). Plazma ve hücre dışı sıvılarda selenyum, bakır, demir gibi metallerin ve bu metalleri bağlayan proteinlerin varlığı, hücrelerin oksidanları salınım hızını etkileyerek LDL oksidasyonunda rol oynamaktadırlar (68).

2.3.2. LDL'nin Oksidasyon Mekanizması

LDL oksidasyonu antioksidanların kaybolması ile başlar. Daha sonra LDL lipidlerindeki PUFA'ların peroksidasyonu sonucu dien konjugatlar, ardında da lipid peroksitlerin parçalanması sonucu aldehitler, alkenler ve hidroperoksitler meydana gelir. LDL yapısında bulunan apo B₁₀₀ ya direkt oksidasyona ya da bu aldehitlerin bir bölümünün, serbest ε-amino lizin grubu ile daha çok kovalan bağlarla etkileşmesi sonucu daha küçük peptitlere parçalanırlar ve agregre olurlar (6,49,50) (Şekil 3).



Şekil 3. LDL'nin oksidasyon mekanizması

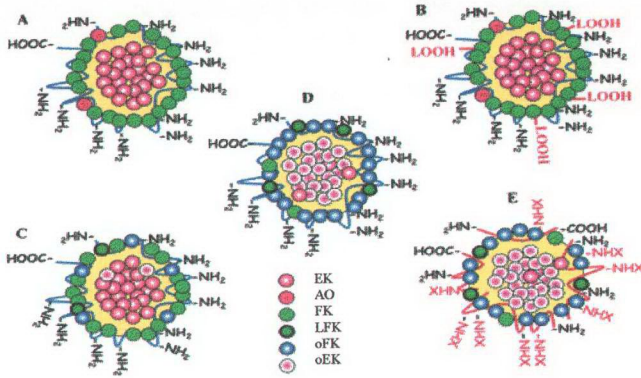
LDL'nı oksidasyonu sonucu açığa çıkan ürünler Tablo 5'de özetlenmiştir.

Tablo 5. Okside LDL'de bulunan oksidasyon ürünleri (69).

Hedef	Oksidasyon ürünleri	Örnekler
Kolesterol (Serbest ve EK)	Oksisterol	7-hidroperoksi kolesterol 7-ketokolesterol 7-hidroksikolesterol
Yağ asitleri	Hidlopeoksitler Hidroksitler Keton F ₂ -izoprostan Aldehitler	Linoleil hidroperoksit Linoleil hidroksit Okzo-detadekadienoat 8-Epi-prostaglandin F _{2a} 9-okzononanoat
Apo B	Parçalanma Çapraz bağlanma Amino asit oksidasyonu Amino asit türevlendirilmesi	3-klorotirozin Ditirozin Hidroksilösin

2.3.3. Okside LDL şekilleri

Okside LDL şekilleri Şekil 4'de gösterilmiştir. Doğal LDL (A), dolaşımda bulunan peroksilipidler ve diğer proteinlerle etkileşmesi sonucu değişikliğe uğramaktadır (B). Ancak (B) yapısı, lipid peroksitleri ve aldehitleri bulundurmaz ve LDL reseptörleri ile parçalanır. Normal veya patolojik olaylar sonucu hafif okside (MM) LDL (C)'de PUFA ve antioksidanların miktarları azalmıştır. Biyolojik olarak aktiftir ve lipid peroksidasyonu ve lipid hidroperoksit dekompozisyonunun erken fazında oluşmaktadır. Apo B'de önemli değişiklikler olmadan lipidler okside olmaktadır. Orta derecede oLDL (D)'de Apo B parçalanmıştır ve Apo B'nin yapısında çapraz bağlı okside polipeptidler oluşmaktadır. PUFA ve antioksidanlar oldukça azalmış, lipid peroksitler artmış ve lizolesitin gibi yeni lipidler oluşmuştur. Aşırı oLDL (E)'de kovalan etkileşimler sonucu amino asit bileşiminde değişmiş, çok sayıda lipid aldehitler ve lizolesitin oluşmuştur. oLDL, çöpçü reseptörler (SR-AI/II) tarafından tanınacak hale gelmiştir ve makrofajlarda lipid birikimi ve köpük hücre oluşumu görülür. Çeşitli hücre tipleri için sitotoksiktir ve kan monositleri için kemotaktiktir (68).



Şekil 4. oLDL şekilleri (68). EK : Ester kolesterol, AO: Antioksidan, FK: Fosfatidil kolin, LFK: Lizofosfatidilkolin, oFK: Okside fosfatidilkolin, oEK: Okside ester kolesterol.

2.3.4. Okside LDL'nin Kimyasal, Fizikokimyasal ve Biyolojik Özellikleri

Kimyasal ve Fizikokimyasal Özellikleri (39,70,71)

- Antioksidanlar kaybolmuştur.
- Fosfatidilkolin ve kolesterol esteri muhtevası azalmış, lizofosfatidilkolin ve oksisterol muhtevası ise artmıştır.
- PUFA'ların bir kısmı veya çoğu kaybolmuş, hidroksi ve hidroperoksi-PUFA muhtevası artmıştır.
- Konjuge dien muhtevası yüksektir.
- MDA, hekzonal, HNE, ve diğer aldehitleri artmıştır. Spesifik antikorlarla algılanan Apo B'deki MDA ve HNE epitopları vardır.
- 360 nm'de eksitasyon ile 430 nm'de güçlü floresans gösterir.
- Apo B yapısı ve fosfolipid tekli tabakası konformasyonal değişime uğrar. Apo B'deki serbest amino grupları kısmen kaybolur ve apo B daha küçük peptidlere parçalanır.
- Elektroforetik hareketliliği ve dansitesi (1,06-1,08) artmıştır.
- Agregasyona meyli ve heterojenitesi artmıştır.

Biyolojik Özellikleri(40,70,71)

- Çöpçü reseptörler ve diğer reseptörler yoluyla makrofajlarca alımı ve parçalanması artmıştır.
- Bir çok hücreye karşı sitotoksiktir.
- Monosit ve düz kas hücreleri için kemotaksisi artmıştır.
- Guanilat siklazın NO aktivasyonunu inhibe eder.
- Asetilkolin, NO ve nitrogliserinle indüklenmiş izole düz kasların gevşemesini engeller.
- Tromborezistans aktivitesini artıran protein kinaz C'yi baskılar, endotel hücre kültüründe hücrelerin doku faktörü aktivitesini artırır.
- Monosit-makrofajlarca PDGF salınımı ve PDGF-mRNA üretimini baskılar.
- Makrofaj glutatyon muhtevası yaklaşık iki kat artar.
- Endotel hücre kültüründe MM-LDL ile muamelesi, çok sayıda biyolojik aktif faktörlerin üretimini uyarır. Bu faktörler ; monosit kemotaktik faktör (MCP-1), endotel-lökosit adezyon molekülleri (monosit bağlayıcı moleküller) (ELAM), monosit büyüme faktörleri (M-CSF), granülosit büyüme faktörleri (G-CSF) ve koagülasyona esansiyel doku faktörleridir.
- Antijenik yapı kazanmıştır.

2.3.5. Okside LDL Antikoru (oLAb)

oLDL seviyesini *in vivo* şartlarda belirlemek çok zordur. Çünkü, LDL oksidasyonu genellikle subendotelyal alanda gelişir ve meydana gelen oLDL, makrofajlarca hızlı bir şekilde toplanarak köpük hücre oluşumuna katılır. oLDL'ye karşı oluşturulan otoantikörler, direk oksidasyonu gösteren parametrelerden biri olarak kullanılmaktadır (69,71). İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalara göre lipoproteinlerde meydana gelen değişiklikler, özellikle de oLDL şeklinde farklılaşma humoral immün cevaba ve otoantikor üretimine neden olur ve dolaşımda oLDL'ye karşı otoantikörler ortaya çıkar. Dolaşımdaki otoantikörler aterosklerotik lezyondaki oLDL'yi tanıyabilmektedir (72). MM-LDL'nin çok güçlü immünojenik özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Modifiye apo B, oLAb epitoplarına karşı oldukça immünojeniktir. oLDL ile aterosklerotik lezyondaki özgül

antikorlar arasında immün kompleks oluştuğunun bulunması *in vivo* olarak oLDL'nin oluşabildiğini göstermektedir (73).

LDL reseptörü eksik fareye kolesterolce zengin diyet uygulandığında, aterogenez derecesi ile otoantikor gelişimi arasında bir ilişki bulunmuştur. Lezyonda oLDL birikimi, otoantikor oluşumunu teşvik etmektedir. Otoantikorların fazla olması da lipid peroksidasyonunun yüksek olduğunu yansıtmaktadır (74). LDL oksidasyonu esnasında çok sayıda reaktif lipid peroksidasyon ürünleri oluşur. Apoproteinlerde ve lipidlerde değişiklikler meydana gelir; Poliansatüre yağ asitlerinin yıkım ürünleri olan çoğu immünojenik özellikle oldukça reaktif aldehitler oluşabilir. MDA-lizin, 4-HNE-lizin, Cu^{+2} -LDL ve hipokloritle oLDL epitoplarına karşı antikorlar tespit edilmiştir. Karotid aterosklerozlu bir hasta grubunda MDA-lizin epitopunu tanıyan otoantikor düzeyinin, kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek olduğu ve bu otoantikorların lezyonun ilerleyişini gösteren bağımsız bir gösterge olabileceği bildirilmiştir. oLab ile karotid aterosklerozun ilerleyişi arasında bir korelasyon görülmüştür (75).

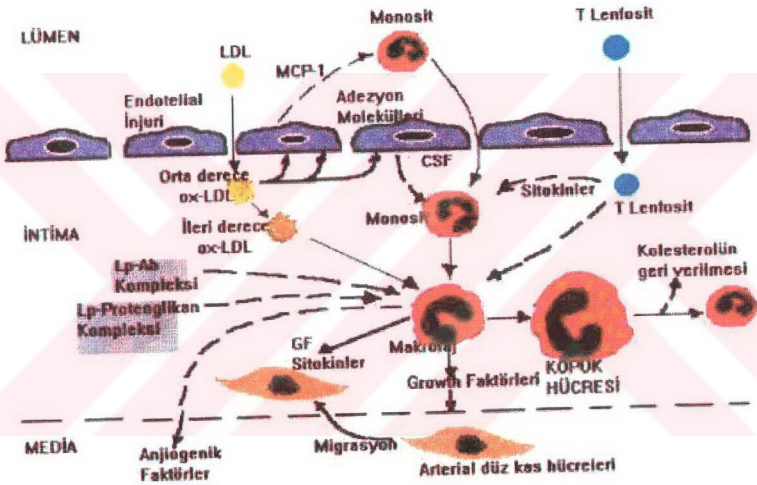
Arteriyel tromboz geçirmiş hastaların aterosklerotik plaklarında oLDL epitoplarını algılayan Ig G seviyesi yüksek bulunmuştur (76). Sistemik lupus eritematozus (77), üremi (78), preeklampsi (79) gibi hastalıklarda, normal ve komplikasyonlu gebelerde gebe olmayanlara göre, oLab serum konsantrasyonunun artmış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca karotid aterosklerozunda (75), koroner arter hastalığında (76), diabette (77), periferik vasküler hastalıkta (80) ve Behçet hastalığında (81) otoantikor seviyesinin arttığı belirtilmiştir.

2.3.6. Okside LDL ve Ateroskleroz

Aterosklerotik işlevin başlangıcında ve gelişiminde endotel fonksiyon bozukluğu önemli rol oynamaktadır. Arter duvarına giren LDL, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofajlar tarafından salgılanan serbest radikaller tarafından okside edilirler. Subendotelial alanda LDL'nin oksidasyonu, endotel hücrelerinden kemotaktik faktörlerin salınımını artırır (MCP-1). Monosit ve T lenfositler subendotelial yüzeye geçerler. MM-LDL'nin uyarımı ile endotel hücrelerinden salınan CSF'ler, monositlerin makrofajlara dönüşmesini uyarır. Artan subendotelial makrofajların etkisiyle LDL'nin oksidasyonu devam eder ve köpük hücre oluşumuna yol açar (69). Modifiye LDL'nin glikasyonu ve agregasyonu ve LDL'nin fosfolipazlar ve proteoglikanlarla etkileşimi, arter duvarı hücrelerince LDL alımını artırır. Köpük hücrelerde bol miktarda kolesterol esterleri

birikir. oLDL'nin makrofajlarca alınımı çöçü reseptörler üzerinden gerçekleşir. Makrofajların göçü yani arter duvarından çıkışı oLDL tarafından engellenir. Sonuçta arter duvarında patolojik seviyede kolesterol birikir. Oluşan aterom plağı, köpük hücrelerinin parçalanması sonucu açığa çıkan hidrolitik enzimlerin etkisiyle yırtılır. Yırtılmış aterom plağı üzerinde, koagülasyon sisteminin devreye girmesi ile tromboz gelişir. Bu da damar tıkanıklığı ile sonuçlanabilir (17,82).

oLDL'nin aterogenez gelişimindeki rolü Şekil 5'de gösterilmektedir.



Şekil 5. oLDL'nin subendotelyal aterosklerotik olaylardaki rolü.

2.4. Psöriasis

Psöriasis, dünya nüfusunun % 1-3'ünde görülen, aktivasyon ve remisyonla seyreden sedefi-beyaz skuam renginden dolayı halk dilinde 'Sedef Hastalığı' olarak bilinen kronik inflamatuvar bir deri hastalığıdır. Artmış epidermal proliferasyon, anormal farklılaşma, inflamasyon ve vazodilatasyon ile karakterizedir. Bölge ve toplumlara göre görülme sıklığı değişmektedir; Kafkas ırkında yaygın iken, Afrikalılarda ve güney Amerikalılarda nadirdir. Kuzey Avrupa ve kuzey Amerika beyaz ırkının yaklaşık % 2'sini etkilemektedir. Siyahlarda nadir görülür. Her yaşta ortaya çıkabilir. Ancak en sık görüldüğü yaşlar, 10-35 yaş arasıdır (4,83).

2.4.1. Etyolojisi

Etyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Ancak, genetik, metabolik ve immünolojik mekanizmalardan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. Psöriasis lezyonlarını tetikleyen uyarılar, çevresel faktörler, fiziksel travma (kaşınma, güneş yanığı, veya ameliyatlardan kaynaklan travmalar), enfeksiyon, HIV virüsü, alkolizm, farmakolojik ajanlar (nonsteroidal anti-inflammatuar ajanlar, β -adrenerjik reseptör antagonistleri, anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, antimalaryaller, lityum, sistemik kortikosteroidler), sitokinler, iklim (kışın artar, yazın azalır) ve hamileliktir (84). Psikolojik stres ve nöro-immünolojik mekanizmalar ise bu lezyonların oluşumunu arttırmaktadır (85). Üst solunum yolu enfeksiyonları, özellikle çocuklarda, psöriasisin şiddetlenmesine neden olur (86). Superantijenler olarak etki eden bakteriyal endotoksinler, T lenfositleri, Langerhans hücrelerini ve keratinositleri aktive ederek patolojik etkilerini gösterirler. Grup A hemolitik streptokoksik enfeksiyonlar, akut guttat psöriasisin başlamasına ve kronik psöriasisin artmasına yol açar. Streptokokal superantijenler, kutanöz lenfosit antijenlerinin ekspresyonunu indükler ve T lenfositlerinin deriye göç etmelerine neden olur (83,84).

2.4.2. Patofizyolojisi

Psöriasisde hedef hücreler; keratinositler, fibroblastlar ve endotel hücreleridir. En önemli patolojik anormallik, keratinositlerin anormal diferansiyasyonu ve inflamatuvar hücrelerin deriye infiltrasyonudur. Psöriasisli fibroblastlar, normal keratinositlerin hiperproliferasyonunu indüklemektedir. Normal epidermiste bazal keratinositler, yaklaşık 13 günde bölünürler ve 26 gün içinde ise olgunlaşır ve dökülürler. Hiperprolifere olmuş psöriasisli keratinositlerin hücre döngüsü 1,5 gün, olgunlaşması ise 4 gün sürer (4,86).

Fibroblastlar, parakrin ya da muhtemelen endokrin mekanizmalarla keratinosit proliferasyonunu düzenleyen çok sayıda sitokin ve büyüme faktörlerini üretirler. Psöriasisde gözlenen inflamasyonda lökotrienler önemli rol oynar (87). Psöriasisli epidermiste keratinositlerde mitojenik aktiviteye sahip güçlü bir kemotaktik bir ajan olan LTB_4 üretimi artmıştır. 12-lipoksigenaz ürünü 12-HETE, psöriasisli lezyonal derideki LTB_4 'den daha yüksektir. Membran fosfolipazlarının aşırı aktivasyonu, psöriasis patofizyolojisinde anahtar rol oynar (88). Psöriasisde epidermal diaçilgliserol (DAG) ve serbest araşidonik asit seviyesi artar. Fosfolipaz C'nin reseptörle uyarılması, tetikleyici rol oynamaktadır. DAG'ın sürekli artması, protein kinaz-C (PKC)'yi sürekli arttırır (89). PKC, IL-8 üretimini uyarır. Psöriasisli deri lezyonlarının epidermal keratinositlerinde, IL-8 ve IL-8R ekspresyonu artmıştır. IL-8, keratinosit hiperproliferasyonundan ve lökosit infiltrasyonundan sorumludur (4,87).

Endotel hücreleri, adezyon moleküllerini eksprese ederek psöriasis fenotipi gelişimine katılır. Psöriasis lezyonlarında anormal olarak düzenlenen TNF- α ve INF- γ gibi büyüme faktörleri ve sitokinler, psöriasisli plaklarda, kapiller ve postvenul endotelial hücrelerinin yüzeyindeki ICAM-1, ELAM-1 ve VCAM-1 adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükleyebilir. Bunu da T-lenfositlerle etkileşimi sağlayarak keratinositlerle ya da T hücrelerinin dermise göç etmesini sağlayarak endotel hücreleriyle yaparlar. Psöriasisli keratinositler, T hücresinin sitokinleriyle etkileşerek kendi sitokinlerini sentezlemek üzere uyarılırlar (4). Psöriasisli epidermis, normal deri ile karşılaştırıldığında, IL-1 α düşük, non-fonksiyonel olan IL-1 β ise yüksek bulunmuştur. Toplam IL-1 biyoaktivitesi azalmaktadır, ve bu azalış psöriasisli deride bulunan IL-1 reseptörü varlığına bağlanmaktadır (90). IL-2, IL-6, IL-8 gibi sitokinler, direkt olarak keratinosit proliferasyonunu uyarır (87). İmmün ve inflamatuvar hücreler, psöriasisli fenotipin epidermal ve dermal değişikliklerine neden olur. Endotel hücre adezyon molekülleri,

travma ile indüklenir. İmmün hücreler, deriye göç etmek ve psöriasis lezyonunu indüklemek için bu mekanizmayı kullanabilir (4).

2.4.3. Klinik Belirtileri

Psöriasisde, deride, klinik seviyede farkedilebilir değişimler meydana gelmektedir. Deri lezyonları, tipik olarak keskin sınırlı eritemli skuamlı papül ve plaklarla karakterizedir. Psöriasisli skuamın rengi gümüş beyazı, gümüşümsü gri veya sedef rengi olarak tanımlanmıştır. Lezyonlar genellikle saçlı deri, diz, dirsek, lumbosakral bölge ekstremitelerin ekstansör yüzü, tırnaklar ve genital bölgede yerleşir. Nadiren kaşıntı ve yanma gibi sübjektif yakınmalara neden olur. Lezyonların boyutu değişkendir ; erken akut dönemde 1 mm'den daha az olabilirken, hızla gelişen hastalıkta 10 cm veya daha fazla olabilir. Bireylerin % 40'ı tam remisyona ulaşabilir. Remisyon dönemi değişken olmakla birlikte genellikle kısa sürelidir (86).

Psöriasisde iki biyolojik belirti gözlenmektedir (84):

- 1) Hızlanmış ve eksik farklılaşma sonucu epidermal hiperproliferasyon,
- 2) Nötrofil mikroabselerinin oluşumu ve artmış T lenfosit toplanması nedeniyle epidermis ve dermisin inflamasyonu.

Hastalığın aktivite ve yaygınlığı, klinik olarak PASI (Psöriasis Area and Severity Index : Psöriasis alan ve şiddet indeksi) kriterleri kullanılmaktadır. Ancak, bazen klinik sonuçlarla uygun olmayan sonuçlar verebildiğinden kesin hastalık kriteri olarak kullanılması uygun değildir (91).

2.4.4. Tedavi

Psöriasis tedavisinde, kortikosteroidler, Vit A ve Vit D türevleri, PUVA, metotreksat, hidroksiüre ve siklosporin kullanılmaktadır. Bu moleküllerin her biri spesifik sitozolik reseptörü ile kompleks oluşturarak, farklı etkileri üretirler. Tedavide genel amaç; DNA sentezini inhibe ederek mitotik aktiviteyi azaltmak ve epidermal yenilenme zamanını normale döndürmektir. Eikosapentaenoik asit (EPA), lökotrienlerin üretilmelerini ve aktivitelerini inhibe eder. Bu nedenle psöriasisde ω -3'ce zengin balık yağının kullanımı önerilmektedir (87,93).

2.5. Psöriasis, Oksidan-Antioksidan Denge ve Aterosklerozla İlişkisi

Psöriasisde, karaciğer ve ekstrahepatik dokularda lipid bileşimlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan lipoprotein reseptörlerinin hücre yüzeyine taşınımı değişmektedir. Psöriasisli deri fibroblastlarında LDL reseptörü aktivitesi düşüklüğüne bağlı olarak, LDL de artış olduğu bildirilmiştir (93). Ayrıca bu hastalarda, VLDL, LDL, TK, TG ve Lp(a) seviyelerinin yüksek, HDL seviyelerinin ise düşük olması en yaygın gözlenen bulgulardır (20,94). Apo B, C-II ve C-III seviyelerinin yükselmesi apolipoprotein sentezi artışına ya da bozulmuş turnoverına bağlanmaktadır. Bunların psöriasisde artması, trigliseridce zengin lipoproteinlerin birikimi ile sonuçlanmaktadır. Lipid profilindeki değişiklik psöriasisde ateroskleroz gelişimi için bir zemin oluşturmaktadır (2). Psöriasisde hiperlipoproteineminin nedeni tam belli değildir. Muhtemelen yağ asidi değişikliklerinden kaynaklanmaktadır. Psöriasisde plazma lipidlerinde ve adipoz dokuda linoleik asit ve α -linolenik asit azalır. Fosfolipid yağ asidi bileşimindeki değişiklikler (araşidonik asit artışı) membranı serbest radikallerle lipid peroksidasyonuna maruz bırakır (3). Buna ilaveten çeşitli hormon ve sitokinlerle uyarılara cevaben fibroblastlar aracılığı ile de reaktif oksijen radikalleri meydana gelmesi psöriasisde lipid peroksidasyonu artırıcı yönde etki gösterir (11).

Yapılan çalışmaların bir çoğunda, deride, epidermisde, PMN-lökositlerde ve eritrositlerde antioksidan aktivitelerin düştüğü tespit edilmiştir (3,10,95). Genetik faktörler, sentez yetersizliği, salınım bozuklukları, selenyum eksikliği gibi etkenler nedeniyle antioksidan seviyelerinin azalması, inflamasyon sonucu artmış serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olması ve bu oksidan/antioksidan dengesizliğinin inflamatuvar hastalıklarda bozulan lipid ve lipoprotein metabolizması üzerine etkisi sonucu meydana gelen değişiklikler psöriasis hastalığında ateroskleroz için risk oluşturmaktadır (3,94).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Derin dondurucu	(-85 °C Ultra /sw Freezer, NUAIRE).
Densitometre	(Anton Paer DMA 35 N)
Elektroforez tankı	(SEBİA K20)
Güç kaynağı	(HELENA Titan Plus)
Hassas terazi	(MP-300, Elektronik Balance, CHYO).
Karıştırıcı	(Autovortex Mixer SA2).
Kuartz küvetler	(SIGMA)
Magnetik karıştırıcı	(IKA Labortechnik).
Nefelometre	(Behring Nephelometer, BN II).
Otoanalizör	(HITACHI, 917)
Otomatik kan sayım cihazı	(Coulter, STKS).
pH metre	(HANNA Instruments 8416)
Rotor	(BECKMAN, Type 90 Ti Rotor, sabit açılı)
Santrifüj	(Labofuge 200, HERAUS).
Sıcaklık ayarlayıcısı	(CPS-Controller, SHIMADZU)
Spektrofotometre	(UV-1601, UV Visible Spectrophotometer, SHIMADZU).
Su banyosu	(BM 402, NÜVE).
Ultrasantrifüj	(BECKMAN, Optima LE80K Ultracentrifuge)
Ultrasantrifüj tüpleri	(BECKMAN, Lot No:9.30-99, Polikarbonat, 10,4 mL)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Adı	Firma	Özellği
Albumin(sığır) (BSA) %98	SIGMA	-
Bakır Sülfat Pentahidrat	MERCK	249,689 g/mol
β -Nikotinamid Dinükleotid Fosfat, (Redükte β - NADPH)	SIGMA	833,4 g/mol
Di Sodyum Hidrojen Fosfat (+7 H ₂ O)	MERCK	268,07 g/mol
Etilendiamin Tetra Asetik Asit, (disodyum tuzu) (EDTA) %99	SIGMA	372,2 g/mol
Flavin Adenin Dinükleotid (FAD)	SIGMA	829,5 g/mol
Folin-Ciocalteu fenol rektifi	SIGMA	2 N
Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	SIGMA	200 U
Glutasyon Redüktaz GR ₁ (bira mayası)	SIGMA	500 U
Glutasyon (GSH) (redükte form)	SIGMA	612,6 g/mol
Glutasyon (GSSG) (okside form)	SIGMA	612,6 g/mol
H ₂ O ₂ , %30 w/w	SIGMA	34,01 g/mol
Hidroklorik Asit	MERCK	36,46 g/mol
İmidazol 1,3-Diazo 2,4-Siklopentadien	MERCK	68,08 g/mol
Ksantin	MERCK	152,11 g/mol
Ksantin Oksidaz	MERCK	50 U
Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH)	SIGMA	765,4 g/mol
Okside LDL antikoru tayin kiti	BIOMEDICA	Cat No:BI-20032
Potasyum Di Hidrojen Fosfat	MERCK	136,09 g/mol
3-(sikloheksilamino)-1-1 propan sülfonik asit (CAPS)	SIGMA	221,3 g/mol
Sodyum Bromür	MERCK	102,9 g/mol
Sodyum Di Hidrojen Fosfat (+2 H ₂ O)	MERCK	358,14 g/mol
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	MERCK	288,38 g/mol
Sodyum Hidroksit	MERCK	40,00 g/mol
Sodyum Karbonat	MERCK	105,99 g/mol
Sodyum Klorür	MERCK	58,44 g/mol
Süperoksit Dismutaz (SOD) (sığır karaciğeri)	SIGMA	3000 U
t-butil hidroperoksit d=0.94 g/mL	SIGMA	166,2 g/mol
1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP)	SIGMA	164,2 g/mol
2-tiobarbütirik asit (TBA)	SIGMA	144,1 g/mol
Tris (hidroksimetil)-aminometan	MERCK	121,14 g/mol
2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolyum klorür (INT)	SIGMA	505,7 g/mol

3.2. Metotlar

3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması

Bu çalışma KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Dermatoloji ABD'na 1999-2000 döneminde başvurur çeşitli yaş ve cinsiyette 35 psöriasis hastası üzerinde yapıldı. Bu hastalarda PASI skorları belirlendi. Aynı dönemde sağlık kontrolü için başvuran benzer yaş gruplarında ve cinsiyette 35 sağlıklı kişi kontrol grubu olarak alındı. Hastanede sağlık kontrolünden geçen kontrol grubunun anamnez, fizik muayene, rutin klinik laboratuvar incelemeleri sonucu hiçbir patolojik bulgu tespit edilemedi.

Bir gecelik (12 saatlik) açlık dönemini takiben, kan örnekleri, brakial venden ; kan hücre sayımı, antioksidan enzimler ve LDL oksidasyonu takibi için antikoagulanlı vakumlu tüplere (1mg/mL EDTA), spesifik proteinler ve serum biyokimyasal parametreleri için ise antikoagulansız vakumlu tüplere alındı. 20 dakikalık oda sıcaklığında inkübasyonu takiben 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmalar elde edildi. LDL izolasyonunda kullanılmak üzere plazma elde etmek için EDTA'lı tüplerle alınan kanlar 4000 rpm'de 20 dakika satrifüjlendi. Plazmaları alındıktan sonra kalan hücreler, eritrositlerde antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyon ürünleri tayininde kullanılmak üzere 3 kez 10 mM PBS (pH 7,4) ile yıkanarak eritrosit paketleri elde edildi.

Günlük rutin analizler dışında kullanılacak örnekler, -85 °C'de saklandı.

3.2.2. Otoanalizörlerde Tayin Edilen Parametreler

3.2.2.1. Lipid ve Lipoproteinlerin Tayini

Total kolesterol (TK), trigliserid (TG) ve LDL-kolesterol (LDL-K) tayini, Hithachi 917 otoanalizöründe, Roche kitleri kullanılarak yapıldı. TK ve TG tayini için enzimatik-kolorimetrik yöntemler kullanıldı. HDL-kolesterol (HDL-K) tayini için dekstran sülfat ile çöktürme işleminde sonra enzimatik kolesterol tayin yöntemi kullanıldı. Tüm analizler günlük kalite kontrol çalışmalarını takiben yapıldı.

3.2.2.2. Spesifik Proteinlerin Tayini

Dade Behring Nephelometre (BN II, Germany) cihazı ile apo AI, apo B, seruloplazmin, C-reaktif protein (CRP) ve fibrinojen tayinleri yapıldı. Testlerin prensibi monoklonal immünopresipitasyon metoduna dayanmaktaydı. Orjinal kitler kullanıldı. Tüm analizler günlük kalite kontrol çalışmalarını takiben yapıldı.

3.2.2.3. ESH Tayini

Eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), klasik Westergren metodu ile tayin edildi.

3.2.2.4. PMN-Lökosit Tayini

Polimorfonükleer lökosit (PMN-Lökosit) sayımları otomatik kan sayım cihazında yapıldı (STKS, Coulter).

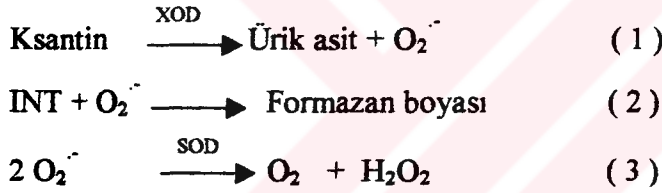
3.2.3. Manuel Çalışılan Parametreler

Plazma lipid hidroperoksit (LHP) düzeyi, eritrosit MDA, antioksidan enzimler, okside LDL antikoru (oLab) ve LDL oksidasyon kapasitesi seviyeleri spesifik metotlarla spektrofotometrik olarak tayin edildi.

3.2.3.1. Antioksidan Enzimler

3.2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini

Süperoksit Dismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD) tayini, Mc Cords ve Fridowich'ın (96) metoduna göre yapıldı. $O_2^{\cdot -}$ radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen (Reaksiyon 3) SOD enziminin aktivitesi, ksantin-ksantin oksidaz (XOD) sistemi tarafından üretilen $O_2^{\cdot -}$ 'nin (Reaksiyon 1), 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorür (INT) ile reaksiyonu sonucu oluşan kırmızı formazan boyasının (Reaksiyon 2), 505 nm'de verdiği optik dansite spektrofotometrik okunarak tayin edildi. Plazma ve eritrositlerde bulunan SOD'un, ortamdaki $O_2^{\cdot -}$ 'ni uzaklaştırması sonucu optik dansitede meydana gelen azalmadan yararlanarak SOD tarafından katalizlenen reaksiyonun % inhibisyonu hesaplandı. %50 inhibisyona karşı gelen SOD miktarı bir enzim ünitesi olarak alındı.



Çözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponu (pH 7,0), 0,01 M;
1,56 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ yaklaşık , yaklaşık 800 mL deiyonize suda çözülerek 1 N NaOH ile pH'sı 7,0 'ye ayarlandı ve hacim 1 L'ye tamamlandı.
2. Ksantin oksidaz, (XOD) , 80 U/L ;
25 µL orijinal XOD (50 U, 20000 U/L) süspansiyonundan alınarak hacim, 10 mL' ye deiyonize su ile tamamlandı. Günlük hazırlandı.
3. CAPS [3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit] (pH 10,2) , 50 mM;
5,5 g CAPS , 450 mL deiyonize suda çözüldü. 1 N NaOH ile pH 10,2'ye ayarlandıktan sonra hacim 500 mL' ye tamamlandı.

4. Substrat Karışımı;

Ksantin, 0,05 mM : 1,9 mg ksantin tartılarak 250 mL CAPS tamponunda çözüldü (+4 °C' de 10 gün kararlıdır). INT, 0,025 mM : 3,16 mg INT tartılarak 250 mL CAPS tamponunda çözüldü (+4 °C' de 10 gün saklanabilmektedir).

5. SOD standartları , Orijinal SOD (3000 U/0,2 mL);

Orijinal SOD'dan fosfat tamponu ile seyreltmeler yapılarak 8 U/mL, 4 U/mL, 2 U/mL, 1 U/mL ve 0,5 U/mL'lik standartlar günlük hazırlandı.

Deneyin yapılışı

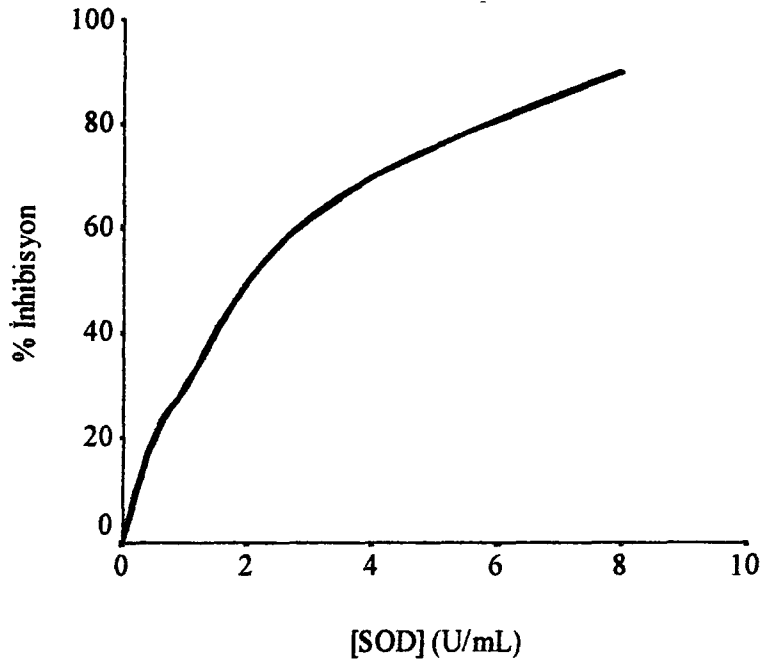
Eritrosit paketleri, reaksiyonu yaklaşık % 30-60 inhibe edecek şekilde fosfat tamponu ile seyreltildi. Plazmalar ise direkt ilave edildi. Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

	Çalışma körü (mL)	Standart (mL)	Seyreltilmiş numune (mL)
Numune	-	-	0,05
Standart	-	0,05	-
Fosfat Tamponu	0,05	-	-
Substrat Karışımı	1,7	1,7	1,7
Küvetler iyice karıştırıldı.			
Ksantin Oksidaz	0,25	0,25	0,25

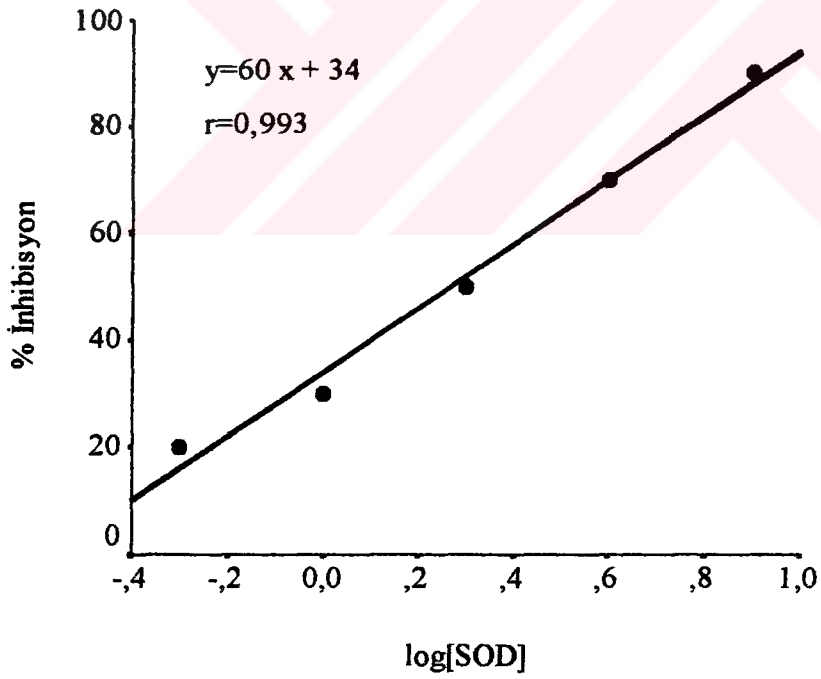
Küvetler tekrar karıştırılarak 30 s'lik bir gecikme fazından sonra 505 nm'de ve 37 °C' de başlangıç absorbansı (A₁) ve 3 dakika sonra son absorbans okundu (A₂).

Sonuçların hesaplanması

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - [(\Delta A_{\text{numune}} (\text{standart})) / (\Delta A_{\text{çalışma körü}})] \times 100$$



Şekil 6. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonuna karşı % inhibisyon grafiği.

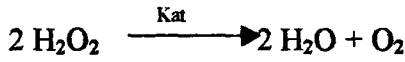


Şekil 7. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği.

% SOD inhibisyonu standart grafiği (Şekil 6) çizildi. Bu grafik, [SOD]'un logaritması alınarak lineer hale getirildi (Şekil 7). Elde edilen semilogaritmik standart grafik yardımı ile numunelerdeki inhibisyon hesaplandı. Sonuçlar seyreltme faktörü ile çarpılarak U/mL olarak SOD değeri belirlendi. Aktiviteler eritrositlerde g Hb başına ifade edildi.

3.2.3.1.2. Katalaz (Kat) Aktivitesi Tayini

Hidrojen peroksidin oksijen ve suya hidrolizini katalizleyen katalaz ($H_2O_2 : H_2O_2$ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.6) aktivitesinin tayininde Aebi'nin metodu kullanıldı (97).



240 nm'de H_2O_2 'nin bozulması neticesinde absorbandsaki düşüş takip edildi.

Cözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponu (pH 7,06), 50 mM;

81 g KH_2PO_4 , 1 L ve 8,90 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 1 L deiyonize suda çözüldü. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı. Gerekğinde asit baz ilavesi ile pH 7,0'a ayarlandı.

2. Hidrojen peroksit, 30 mM ;

0,34 mL % 30'luk H_2O_2 alınarak hacim fosfat tamponu ile 100 mL'ye tamamlandı.

Günlük hazırlandı.

Deneyin yapılışı

Paket eritrositler Hb konsantrasyonu 5 g/dL olacak şekilde seyreltilerek hemolizatlar hazırlandı. Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	1	-
Numune	2	2
H_2O_2	-	1

Hidrojen peroksit ilave edilir edilmez 30 s boyunca 240 nm'de absorbanlardaki düşüş izlendi. Başlangıç absorbanı yaklaşık 0,500 olması gerekir. 0,500 olmazsa H₂O₂ konsantrasyonu yeniden ayarlandı. $\Delta A_{240} / \Delta t = 15 \text{ s}^{-1}$, 0,100 den büyük ve 0,020 den de küçük olmamalıdır (97).

Sonuçların hesaplanması

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

$$k = (2,3 / 15) \times \log(A_1/A_2) = 0,153 \times \log(A_1/A_2) \text{ s}^{-1}$$

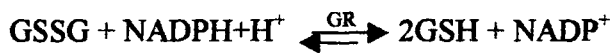
Burada A₁:Başlangıç absorbanı

A₂: 15 s sonraki absorban.

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

3.2.3.1.3.Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesi Tayini

Okside glutatyonun (GSSG) NADPH varlığında redükte glutatyona (GSH) indirgenmesi katalizleyen glutatyon redüktaz (NADPH : okside glutatyon oksidoredüktaz, EC 1.6.4.2) aktivitesi tayini, Goldberg ve Spooner'ın (34) metoduna göre yapıldı.



Reaksiyon çift yönlü olmasına rağmen daha çok sağa doğrudur. Katalitik aktivite, NADPH'nin absorbanındaki oksidasyondan dolayı azalma 340 nm'de takip edilerek kinetik olarak belirlendi.

Çözeltilerin hazırlanması

1. a)EDTA, 8,25 mM ;

0,31 g EDTA- Na₂.2H₂O 100 mL deiyonize suda çözöldü.

b)EDTA, 15 mM;

0,56 g EDTA -Na₂.2H₂O 100 mL deiyonize suda çözöldü.

2. Flavin adenin dinükleotid, FAD, 155 M;
12,5 mg FAD (disodyum tuzu) 100 mL suda çözüldü.
3. Fosfat tamponu (37 °C, pH 7,2), 0,12 M;
16,33 g KH_2PO_4 750-800 mL suda çözüldü, pH 1 N NaOH ile 7,2'ye ayarlandı ve hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.
4. A) GSSG, 114 mM;
70 mg GSSG 1 mL deiyonize suda çözüldü.
b) GSSG, 65,3 mM;
40 mg GSSG 1 mL deiyonize suda çözüldü.
5. a) Redükte nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat (β -NADPH), 12 mM;
10 mg NADPH (tetrasodyum tuzu) % 1'lik 1 mL NaHCO_3 çözeltisinde çözüldü
b) Redükte nikotinamid-adenin dinükleotid fosfat (β -NADPH), 9,6 mM;
8 mg NADPH (tetrasodyum tuzu) % 1'lik 1 mL NaHCO_3 çözeltisinde çözüldü.
6. İmidazol tamponu(pH 6,9), 0,23 M;
3,9 g imidazol 200 mL deiyonize suda çözüldü. pH'sı HCl ile 6,9'a ayarlandı ve hacim 250 mL' ye tamamlandı.
FAD çözeltisi +4 °C'de 2 hafta kadar saklanabilir. NADPH ve GSSG çözeltileri çalışmadan hemen önce hazırlandı.

Deneyin yapılışı

Eritrositlerde tayin için yapılan pipetlemeler aşağıdaki tabloya göre yapıldı

	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat Tamponu	1,3	1,3
EDTA (b)	0,05	0,05
FAD*	0,05	0,05
GSSG (b)	-	0,05
Numune	0,05	0,05
Küvetler alt üst edilir ve 5 dk beklendi.		
NADPH(b)	0,025	0,025

*GR, bir flavoenzim olduğundan eritrosit hemolizatlarında ortama FAD ilave edilirken plazmada GR aktivitesi tayininde FAD ilavesine gerek yoktur.

Plazmada tayin için yapılan pipetlemeler aşağıdaki tabloya göre yapıldı.

	Kör (mL)	Numune (mL)
İmidazol Tamponu	2,4	2,4
EDTA (a)	0,10	0,10
GSSG (a)	-	0,05
Deiyonize su	0,10	-
Numune	0,05	0,05
Küvetler alt üst edildi ve 5 dk beklendi.		
NADPH (a)	0,10	0,10

NADPH ilavesiyle reaksiyon başlatıldı ve absorbandsaki değişim kaydedildi.

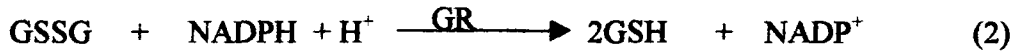
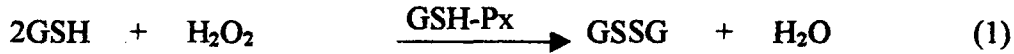
Sonuçların hesaplanması

Glutatyon redüktaz aktivitesi (U/L) = $F_1 \times \Delta A / dk = 4,37 \times 10^3 \times \Delta A / dk$

Eritrositlerde U/g Hb ve plazmada ise U/L olarak aktivite hesaplandı.

3.2.3.1.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivitesi Tayini

Redükte glutatyonun hidrojen peroksitle reaksiyonu sonucu (Reaksiyon 1), okside glutatyonla yükseltgenmesini katalizleyen glutatyon peroksidaz (glutatyon : H_2O_2 oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9) aktivitesi Beutler'in (98) metodu kullanıldı. Bu reaksiyonda oluşan GSSG, NADPH varlığında glutatyon redüktaz (GR) enzimi tarafından GSH'a indirgenir (Reaksiyon 2). GSH-Px aktivitesi, NADPH'daki azalmayı 340 nm'de takip ederek belirlendi.



Çözeltilerin hazırlanması

1. Fosfat tamponu (pH 7,0), 1 M;

13,61 g KH_2PO_4 tartıldı. Yaklaşık 500 mL deiyonize suda çözülerek pH'sı 1 N KOH ile 7,0'a ayarlandı ve 1 L'ye tamamlandı.

2. EDTA, 0,2 M;
0,74 g EDTA 10 mL deiyonize suda çözüldü.
3. Ferrisiyanür-siyanür çözeltisi ;
100 mg NaCl ve 300 mg $K_3Fe(CN)_6$ 1 L deiyonize suda çözüldü Eritrosit hemolizatları bu çözelti ile seyreltildi.
4. H_2O_2 , %30 (w/w), 1 mM;
11,4 µL orijinal (%30 w/w) şişeden alınarak 10 mL fosfat tamponunda çözüldü.
5. Na-azit, 0,4 M;
0,26 g sodyum azit, 10 mL deiyonize suda çözüldü.
6. GSH, 0,1 M,
60 mg GSH 2 mL deiyonize suda çözüldü.
7. GR, 10 U/mL;
50 µL orjinal şişeden alınarak hacim deiyonize su ile 5 mL 'ye tamamlandı.
8. NADPH, 2 mM;
17 mg NADPH 10 mL deiyonize suda çözüldü.
Glutasyon, glutasyon redüktaz, NADPH ve H_2O_2 çözeltileri günlük taze hazırlandı.

Deneyin yapılışı

Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

	Kör (µL)	Numune (µL)
Fosfat Tamponu	100	100
GSH	-	10
EDTA	20	20
Glutasyon Redüktaz	100	100
Na-azit	10	10
NADPH	100	100
Numune	20 (50)*	20 (50)*
Deiyonize su	640	630
37 °C'de 10 dk inkübasyon		
H_2O_2	10	10

* Numune olarak plazma kullanıldığında 50 µL plazma eklendi.

Sonuçların hesaplanması

Bir dakikalık gecikme fazından sonra 6 dk'lık süreyle absorbansdaki değişim takip edildi.

$$\text{Enzim aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A}{dk} \times \frac{V_t \times 10^6}{\epsilon \times \ell \times V_s}$$

Burada V_t : Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V_s : Numune hacmi (mL)

ϵ : Molar absorbtivite katsayısı ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6300 \text{ L/mol/cm}$)

ℓ : Işık yolunun uzunluğu (cm)

Eritrositlerde U/g Hb, plazmada U/L olarak aktivite belirlendi.

3.2.3.2. Lipid Peroksidasyonu Tayinleri

3.2.3.2.1. Plazma Lipid Hidroperoksit (LHP) Tayini

Ruiz ve ark.'nın (99) metoduna göre glutatyon peroksidazla NADPH oksidasyonu sonucu meydana gelen NADPH'daki değişim spektrofotometrik olarak takip edilerek LHP tayini yapıldı.

Çözeltilerin hazırlanması

1. 124 mM Tris-HCl (pH 7,6) / 0,2 mM EDTA;
1,502 g Tris ve 7,44 mg EDTA, yaklaşık 90 mL deiyonize su ile çözüldü. pH'sı 1 N HCl ile 7,6'ya ayarlandı ve deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.
2. GSH, 4,25 mM;
6,53 mg glutatyon 5 mL çözelti (1)'de çözüldü.
3. NADPH, 2 mM;
16,67 mg NADPH, 10 mL çözelti (1)'de çözüldü.
4. GR, 10 kU/L;
220 µL GR (500 U/2,2 mL) alınır ve 5 mL çözelti (1)'de çözüldü.

5. Glutasyon Peroksidaz, 16 kU/L;

160 μ L glutasyon peroksidaz (200 U/mL) alındı ve 2 mL çözelti (1)'de çözöldü.

6. Albumin (BSA), 65 g/L;

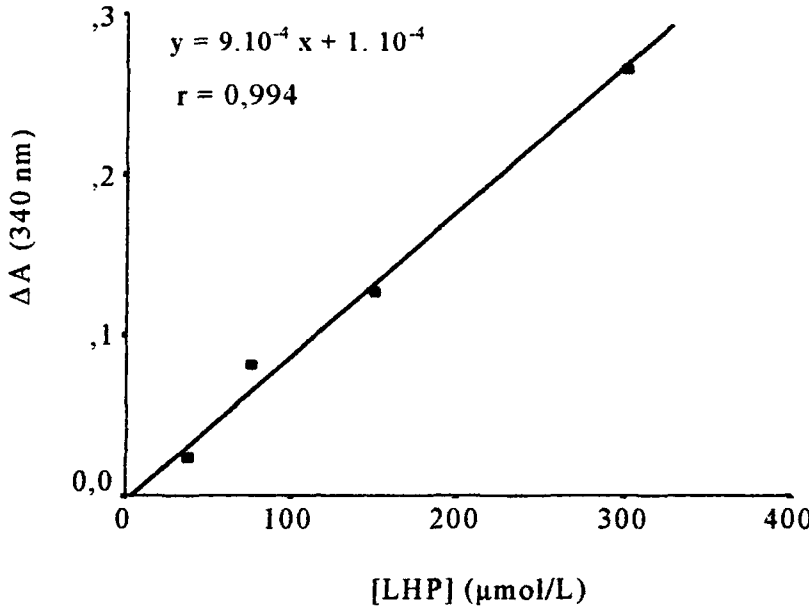
0,325 g BSA, 5 mL izotonik NaCl çözeltisinde çözöldü. Bu çözelti standartları hazırlamada kullanıldı. Standartları hazırlarken BSA kullanılmasının amacı, numune ile benzerliği sağlamaktır.

7. Standartlar: %70 t-butilhidoperoksit, 10 mL çözelti (6)'da çözöldü. Bu elde edilen karışımdan 5 μ L alınarak yine çözelti (6)'da çözöldü ve böylece 300 μ M'lık standartlar hazırlanmış oldu. Bu standart seyreltilerek 150 μ M, 75 μ M ve 37,5 μ M'lık standartlar hazırlandı.Deneyin yapılışı

Pipetlemeler aşağıdaki gibi yapıldı.

	Kör (μ L)	Numune (μ L)
Numune (Standart)	-	200
Çözelti (1)	900	700
	Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi	
NADPH	50	50
GSHP-x	10	10
GSH	100	100
	33 °C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı	
	340 nm'de absorbans takibi (A_1)	
GR	10	10
	33 °C'de 15 dk inkübasyona bırakıldı	
	340 nm'de absorbans takibi (A_2)	

Tüm numunelerde, standartlarda ve körde $\Delta A = A_1 - A_2$ bulundu. Standart grafik (Şekil 8) çizilerek numunedeki LHP miktarı belirlendi.



Şekil 8. LHP standart grafiği

3.2.3.2.2. Eritrositlerde TBARS Tayini

Stocks ve Dormandy'nin (100) metodu kullanıldı. Numunelerde bulunan bir lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA)'ın tiyobarbitürik asit (TBA) ile asidik ortamda ısıtılması sonucu oluşan pembe renkli kompleksin optik dansitesi ölçüldü. Bu nedenle MDA, TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) olarak belirlendi.

Çözeltilerin Hazırlanışı

1. Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS tamponu);
1 L %0,9'luk NaCl çözeltisine daha önceden 1,76 mL 0,5 M KH_2PO_4 ve 6,08 mL K_2HPO_4 karıştırılarak 100 ml hazırlanmış çözelti ilave edilerek ve daha sonrada pH'sı 7,4'e ayarlanarak hazırlandı.
2. Azit (N_3)'li PBS tamponu ;
5 mL 0,4 M NaN_3 , PBS tamponuyla 500 mL'ye tamamlandı.
3. TBA çözeltisi;
25 mL 1 N NaOH çözeltisine 5 g TBA ilave edildi ve 200 mL'ye deiyonize su ile tamamlanmasını takiben ısıtılıp soğutuldu ve deiyonize su ile 500 mL'ye tamamlandı.

4. TCA–Arsenit çözeltisi;

140 g TCA 250 mL deiyonize suda çözülerek üzerine 13 g Na-arsenit ilave edildi ve deiyonize su ile 500 mL'ye tamamlandı.

Deneyin Yapılışı

Eritrosit paketleri, 3 g/dL Hb konsantrasyonu olacak şekilde azitli PBS tamponu ile seyreltilti (Bu da yaklaşık 1 mL eritrosit paketine 9 mL azitli PBS tamponuna karşılık gelmektedir). 37°C'de 10 dk karıştırıldı. Tüplerde otomatik kan sayım cihazı (STKS, Coulter) ile Hb tayini yapıldı. Sonra 5 mL fosfat tamponu eklendi ve 2 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 3 mL hücre süspansiyonuna 2 mL TCA-arsenit çözeltisi eklenerek 10 dk 3000 rpm'de santrifüj edildi. 3 mL süpernatant başka bir tüpe aktarılarak üzerine 1 mL TCA ve 1mL TBA çözeltisi ilave edildi. 15 dk kaynar su banyosunda bekletildi. Soğutulduktan sonra kabarcıklar oluşumunu önleyecek şekilde küvetlere aktararak 532 ve 600 nm'de spektrofotometre ile absorbanslar kaydedildi. Aşağıdaki formüle göre TBARS konsantrasyonları hesaplandı.

$$[\text{TBARS}] = (A_{532} - A_{600}) \times 900 = \text{nmol TBARS} / \text{g Hb}$$

3.2.3.2.3. LDL'de TBARS Tayini

LDL'de lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle ısıtılması sonucu meydana gelen pembe renkli kompleksin optik dansitometresi ölçülerek değerlendirildi (101).

Çözeltilerin hazırlanışı

1. TCA , % 1 ;

1 g TCA , deiyonize su ile çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

2. TBA, % 1;

1 g TBA bir miktar deiyonize suda ısıtılarak çözüldü.

3. MDA standartları;

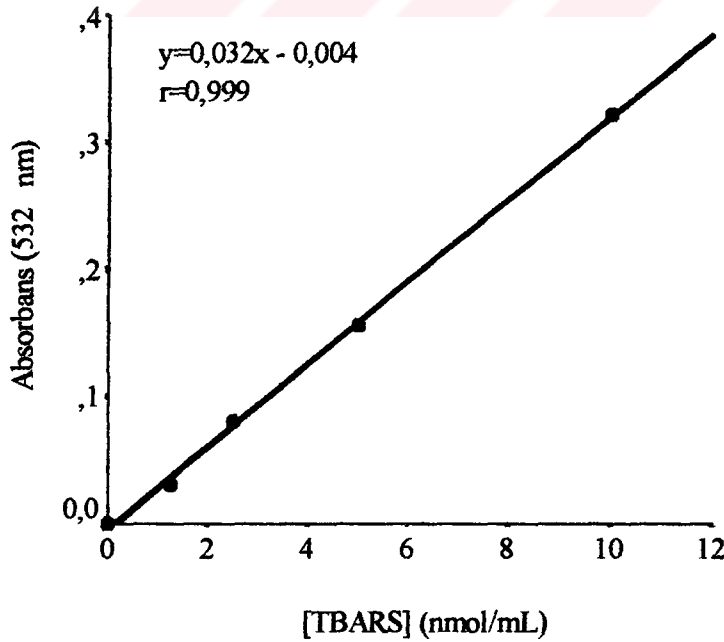
1 mmol 1,1,3,3 tetrametoksipropen 100 mL 0,01 M'lık HCL içerisinde 50°C'da 1 saat bekletilerek bu bileşiğin hidrolizi sonucu MDA çözeltisi elde edildi. Bu konsantre çözelti kullanılarak 10, 5, 2,5 ve 1,25 nmol/mL'lik standartlar hazırlandı.

Deneyin yapılışı

Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler ve deney yapıldı.

	Kör (mL)	Standart (mL)	Numune (mL)
Deiyonize su	0,1	-	-
Standart	-	0,1	-
LDL (50µg/mL)	-	-	0,1
TCA	1	1	1
Voteklendi.			
TBA	1	1	1

95°C'de 45 dk ısıtılıp soğutulduktan sonra 20 dk 3000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant 532 nm'de okundu. Standart grafik çizilerek LDL-TBARS ve oLDL-TBARS seviyeleri belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9. TBARS standart grafiği

3.2.3.3. Okside LDL Antikoru (oLab) Tayini

oLab, tayini için (ELISA) kiti (BIOMEDICA, Cat No:BI-20032, Austuria) kullanılarak yapıldı. Antijen olarak Cu^{+2} ile oksitlenmiş LDL mikro kuyucuklara üzerine adsorbe edilmiştir. Eğer ön seyreltme işlemi yapılmış serumda antikor varsa, antijene spesifik olarak bağlanır. Peroksidaz konjuge olmuş anti-insan Ig G, antijene bağlı antikor ortamına ilave edilir. Sonra bağlanmamış konjugatlar yıkanarak atılır. Tetrametil benzidin (TMB) kromojenik substrat olarak ortama ilave edilir. Oluşan rengin optik dansitesi numunedeki antikorun konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve bir mikro kuyucuk okuyucu sistem tarafından okunur.

Deneyin yapılışı:

↓ 200 μ L ön seyreltme işlemi yapılmış standart, kontrol ve numuneleri eklendi.

90 dakika $37^{\circ}C$ de inkübasyona bırakıldı.

4 kere yıkama yapıldı.

↓ 100 μ L HRP-işaretli konjugat eklendi.

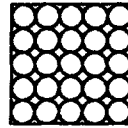
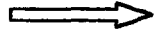
30 dakika $18-24^{\circ}C$ de inkübasyona bırakıldı.

4 kere yıkama yapıldı.

↓ 100 μ L substrat [Tetrametil benzidin (TMB)] eklendi.

15 dakika $18-24^{\circ}C$ de inkübasyona bırakıldı.

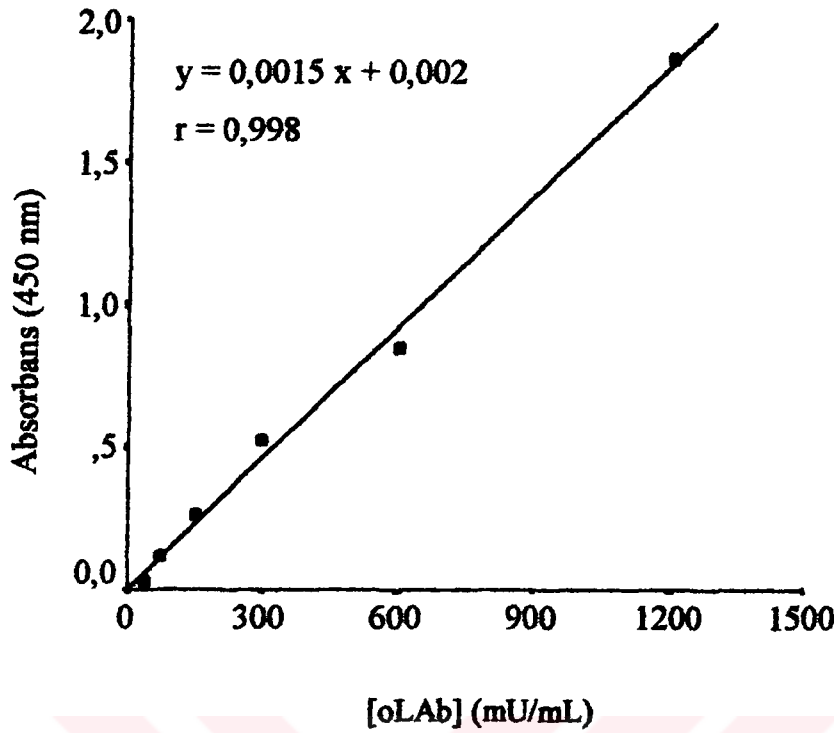
↓ 50 μ L durdurma çözeltisi (H_2SO_4) eklendi.



450 nm'de ELISA okuyucusunda optik dansiteleri okundu.

Sonuçların hesaplanması

Standart grafik (Şekil 10) yardımı ile numunelerdeki oLab miktarı tayin edildi. Numunedeki Ig G konsantrasyonu mU/mL cinsinden tespit edildi.



Şekil 10. oLab standart grafiği.

3.2.3.4. LDL İzolasyonu ve LDL Oksidasyon Kapasitesi Tayinleri

3.2.3.4.1. Lipoproteinlerin İzolasyonu

Lipoproteinlerin izolasyonu kesikli dansite gradient ultrasantrifüjasyonu ile Slavovs ve ark.'nın (102) metodu ile 10,4 mL'lik polikarbonat ultrasantrifüj tüpleri kullanılarak yapıldı. NaBr ile dansite gradienti oluşturularak VLDL, LDL ve HDL izole edildi.

Çözeltilerin hazırlanması (103)

(A) : (d=1,006 g/mL) 11,46 g NaCl + 0,372 g EDTA + 0,13 g NaN₃
deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.

(B) : (d=1,24 g/mL) 34,11 g NaBr, çözelti (A) ile 100 mL'ye tamamlandı.

(C) : (d=1,063 g/mL) 7,60 g NaBr, çözelti (A) ile 100 mL'ye tamamlandı.

(D) : (d=1,019 g/mL) 1,66 g NaBr, çözelti (A) ile 100 mL'ye tamamlandı.

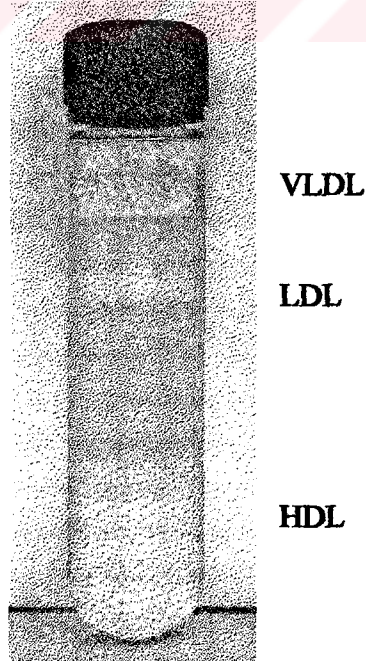
Hazırlanan çözeltilerin yoğunlukları densitometre ile ölçülerek kontrol edildi.

Deneyin yapılışı

20 dk, 4°C'de ve 4000 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen plazmanın yoğunluğu, katı NaBr ile 1,30 g/mL'ye ayarlandı. Bu işlem için terazi kullanıldı. 3,5 mL plazma tartıldı, NaBr ilave edilerek ağırlığı 4,55 g'a (3,5mL x 1,3 g/mL) getirildi ve üzerine tabaka olacak şekilde insulin iğnesi ile sırasıyla değişik yoğunlukta aşağıdaki çözeltiler ilave edildi (102).

	(mL)
Plazma (1,3 g/mL)	3,5
B (1,24 g/mL)	1,4
C (1,063 g/mL)	1,4
D (1,019 g/mL)	1,4
A (1,006 g/mL)	1,9
Deiyonize su	0,3

Hazırlanan santrifüj tüpleri, tabakaların bozulmamasına özen gösterilerek Beckman 90 Ti sabit açılı ultrasantrifüj rotoruna yerleştirildi. 50 000 rpm (155 000 g) ve 4°C'de 3 saat santrifüj edilerek VLDL, LDL ve HDL tabakaları elde edildi (Şekil 11).



Şekil 11. Lipoprotein izolasyonu sonucu elde edilen tabakaların görünümü.

Bu tabakalar pastör pipetleri ile dikkatle alındı ve sadece LDL'de diyaliz işlemi uygulandı.

VLDL ve HDL'de ve diyaliz edilmiş LDL'de protein tayinleri 3.2.3.4.3'de ve TK ve TG seviyelerinin ölçümü ise enzimatik yöntemlerle 3.2.2.1'de belirtildiği gibi yapıldı.

3.2.3.4.2. LDL'nin Diyalizi

EDTA'yı ve diğer safsızlıkları uzaklaştırmak amacıyla LDL'de diyaliz yapıldı. Diyaliz işleminde, selüloz membrandan yapılmış diyaliz torbası kullanıldı. Bu torba yarı geçirgen bir zar olduğundan EDTA ve küçük moleküller dışarı çıkarken tampon içeri girmektedir. Bu yüzden diyaliz esnasında membran yüzey alanı artmaktadır. Denge konsantrasyonuna erişildiğinde, çözünenlerin dağılımı her iki yönde de aynı olmaktadır (104).

Çözeltilerin hazırlanması

- 1) 10 mM EDTA-10 mM PBS, pH 7,4;

Bir miktar % 0,9'luk NaCl içerisine 4,36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1,86 g NaH_2PO_4 ilave edilerek çözüldü. Bu çözeltiye 0,148 g Na_2EDTA ilave edildi. pH'sı kontrol edildi. Son hacim % 0,9'luk NaCl ile 4 L'ye tamamlandı.

- 2) PBS (pH 7,4), 10 mM;

EDTA hariç çözelti (1)'deki gibi hazırlandı.

- 3) 100 mM NaHCO_3 -10 mM Na_2EDTA , pH 7,4 ;

8,4 g NaHCO_3 ve 3,722 g Na_2EDTA bir miktar deiyonize suda çözüldü. pH'sı HCl ile 7,0'a ayarlandı. Deiyonize su ile hacim 1 L'ye tamamlandı.

Diyaliz torbasının hazırlanması

- 1) Diyaliz torbaları, istenilen ebatlarda kesildi (LDL miktarlarına göre , yaklaşık 10-15 cm) ve 1 L'lik beherlere koyuldu.
- 2) 100 mM NaHCO_3 -10 mM Na_2EDTA (pH 7,4) tamponu ile 2 saat 60°C'de sürekli ve yavaşça karıştırıldı. Bu işlem iki kez yapıldı.

- 3) Deiyonize sudan geçirildi ve yine deiyonize su ile 60°C'de sürekli ve yavaşça karıştırılarak 1 saat bekletildi. Bu işleme çözelti berrak oluncaya kadar devam edildi.
- 4) Yavaşça 4°C'ye soğutuldu. Diyaliz torbaları, 1 mL kloroform/L'de saklandı.

Diyaliz işlemi

İzole edilen LDL'den EDTA'yı uzaklaştırmak için ilk önce 10 mM EDTA-10 mM PBS ile 12 saat ve ardından sadece 10 mM PBS ile yine 12 saat her 3-4 saatte bir tamponlar tazelenerek 4°C'de ve karanlıkta magnetik karıştırıcıda diyaliz işlemi yapıldı. İlk aşamada EDTA'lı tampon kullanmada amaç diyaliz işlemi esnasında geçen uzun sürede meydana gelebilecek oksidasyona engel olmaktır.

3.2.3.4.3. Lipoproteinlerde Protein Tayini

İzole edilen HDL, LDL ve VLDL, protein tayini Lowry metodu (105) ile yapıldı. Bu metotta protein önce alkali bakır çözeltisi ile muamele edildi. Alkali ortamdaki Cu^{+2} , proteinlerin peptid bağları ile kompleks oluşturarak Cu^{+} 'e indirgendi. Daha sonra, Folin ve Cioclteu'nun fenol reaktifi ilave edildi. Fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana geldi.

Bu metodun hassasiyeti 2-100 μg arasındadır. Bu nedenle tayine geçmeden önce HDL 40 kat, LDL ve VLDL ise 20 kat % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile seyreltildi.

Çözeltilerin hazırlanması

1. 2xLowry Reaktifi;

- A. 20 g Na_2CO_3 260 mL, 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 mL ve 0,2 g Na-K tartarat 20 mL deiyonize suda çözüldükten sonra üçü karıştırıldı ve böylece bakır reaktifi elde edilmiş oldu.
- B. 10 g SDS 100 mL deiyonize suda çözüldü.
- C. 4 g NaOH 100 mL deiyonize suda çözüldü.

Kullanmadan hemen önce 3:1:1 oranında hacimlerde A:B:C karıştırılarak Lowry reaktifi elde edildi. Bu çözelti 2-3 hafta saklanabilir. Eğer çözeltide

beyaz çökelek oluşursa 37°C’de ısıtılır. Fakat siyah çökelek gözlenirse çözelti atılır.

2. Folin reaktifi, 0,2 N;

2 N’lık Folin reaktifi 1:10 oranında deiyonize su ile seyreltilir. Bu çözelti, karanlıkta ve oda sıcaklığında birkaç ay saklanabilir.

3. Albümin standartları

10 mg albümin 100 mL deiyonize suda çözülerek 100 µg/mL’lik albümin standardı ve bu standarttan da 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL ve 12,5 µg/mL’lik standartlar hazırlandı.

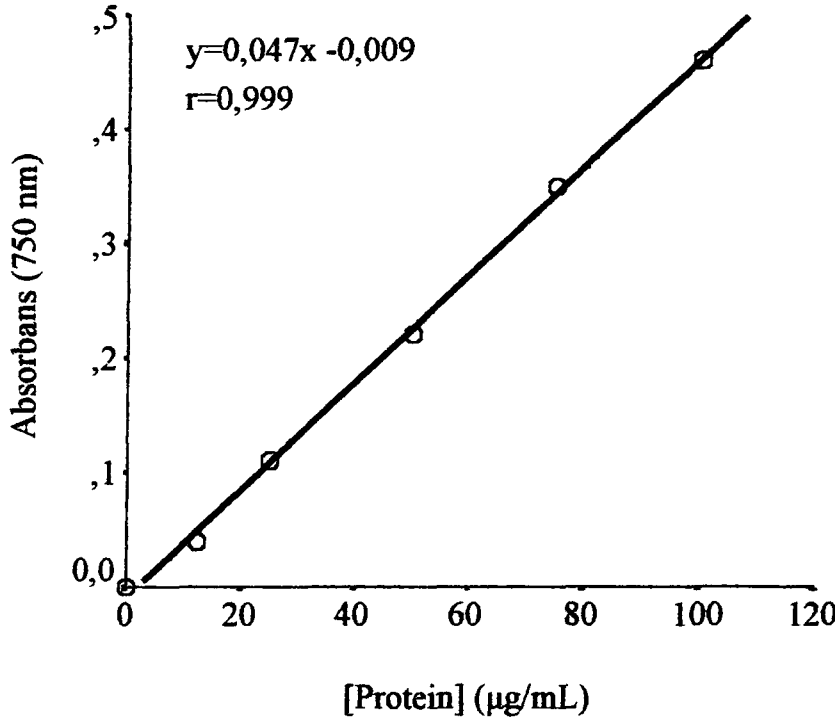
Deneyin yapılışı

Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

	Kör (µL)	Numune (µL)	Standart (µL)
NaCl (% 0,9)	400	-	-
Numune	-	400	-
Standart	-	-	400
2xLowry	400	400	400
	Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi		
Folin reaktifi (0,2 N)	200	200	200
	Oda Sıcaklığında 30 dk bekletildi		
	750 nm’de absorbanları okundu		

Folin reaktifi asidik pH’da kararludur. Oysa indirgenme asidik pH’da yapılmaktadır. Bu nedenle Folin reaktifi alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilir edilmez iyice karıştırıldı. Böylece fosfomolibdik-fosfotungstat reaktifleri parçalanmadan indirgenmesi sağlanmış oldu.

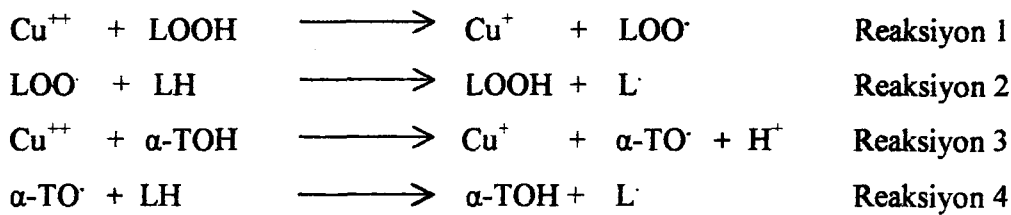
Standart grafik yardımıyla sonuçlar bulundu (Şekil 12).



Şekil 12. Protein standart grafiği

3.2.3.4.4. LDL Oksidasyonu

LDL oksidasyonu, Cu^{+2} 'nin LDL'ye bağlanarak LDL'de kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik değişiklikler meydana getirmesi esasına dayanmaktadır. Cu^{+2} , *in vitro* ortamda ya numunede önceden bulunan hidroperoksitlerle ya da α -tokoferol (α -TOH) ile etkileşerek lipid peroksidasyonunu başlatır. Cu^{+2} , lipid hidroperoksit (LOOH)'lerle reaksiyonu (Reaksiyon 1) sonucu Cu^{+} ve lipid peroksil radikali ($\text{LOO}^{\cdot}$) meydana gelir. Burada oluşan $\text{LOO}^{\cdot}$, diğer lipidlerle reaksiyona girerek lipid radikali ($\text{L}^{\cdot}$) oluşumuna yol açar (Reaksiyon2). Cu^{+2} 'nin α -TOH ile reaksiyonu (Reaksiyon 3) sonucu ise Cu^{+} ve α -tokoferol radikali ($\alpha\text{-TO}^{\cdot}$) oluşur. $\alpha\text{-TO}^{\cdot}$, daha sonra lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Reaksiyon 4). Reaksiyon zincirleri bu şekilde devam eder (106).



LDL oksidasyonunda ilk olay, LDL PUFA'larında hidroperoksit oluşumudur. Bu lipid peroksitler, konjuge dienlerdir ve 234 nm'de absorbensları artar. Bu dalga boyunda takiple çift bağlı PUFA'ların konjuge çift bağlı hidroperoksitlere dönüşümü takip edilir. 234 nm'de dien takibi, LDL oksidasyon direncinin bir ölçüsüdür ve LDL oksidasyonunun başlangıcı olan gecikme fazı uzunluğunun (t-lag) tam belirleyicisidir (107).

Çözeltilerin hazırlanması

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 μM ;

25 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mL PBS tamponu (10 mM, pH 7,4)nda çözülerek 10 mM'lık $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 100 μL alınarak yine 19 mL PBS tamponunda çözüldü ve bu şekilde 100 μM 'lık $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ hazırlanmış oldu.

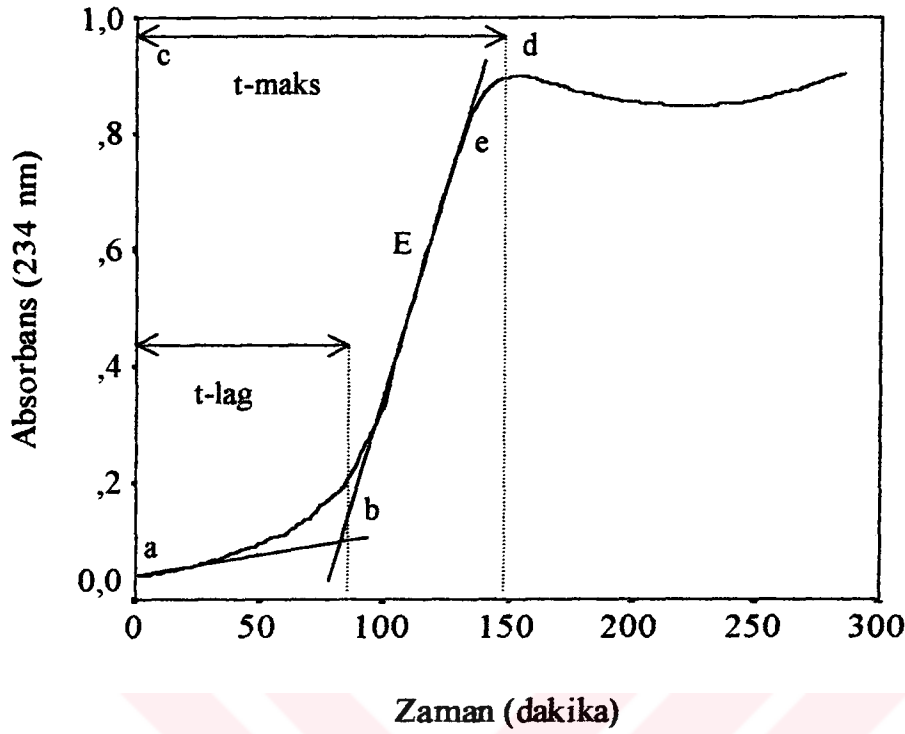
Deneyin yapılışı

50 μg LDL/mL : 1,67 μM Cu^{+2} olacak şekilde 1000 μL 'lik kuartz küvetlere aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı (107).

	Kör (μL)	Numune (μL)
PBS (pH 7,4), 10 mM	984	*
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 μM	16.7	16.7
Numune	-	**
37 °C'de ve 234 nm'de 270 dk LDL oksidasyonu direnci takibi		

1000 μL 'de LDL protein miktarı son konsantrasyonu 50 μg olacak şekilde PBS (*) ve numuneler (**) pipetlendi.

Sonuçların hesaplanması (62,107)



Şekil 13. Bakır ile LDL oksidasyonu kinetiği.

a : Oksidasyon başlangıcında ilk absorbans (A^0)

t-lag : Gecikme süresi, dakika (a-b noktaları arasında geçen zaman)

t-maks : Maksimum absorbansa ulaşma süresi, dakika (c-d noktaları arasında geçen zaman)

E : b-e noktaları arasındaki eğim= $(\Delta A/dk)$

Şekildeki veriler göz önüne alınarak dien konjugasyon hızı (DKH) ve maksimum dien konsantrasyonu (MDK) hesaplandı.

Konjuge dienin molar absorbtivite katsayısı $\epsilon_{234} = 29\,500 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

ℓ : Işık yolunun uzunluğu, cm

Protein konsantrasyonu $[prt] = 0,05 \text{ mg/mL}$ ($50 \mu\text{g/mL}$)

$$\text{DKH} = \frac{(\Delta A/dk) \times 10^6}{\epsilon_{234} \times \ell \times [prt]} \quad (\text{nmol/dk/mg LDL protein})$$

$$\text{MDK} = \frac{(A_c - A_a) \times 10^6}{\epsilon_{234} \times \ell \times [prt]} \quad (\text{nmol/mg LDL protein})$$

3.2.3.5. Lipid Elektroforezi

TITAN GEL Lipoprotein Kiti (Cat No:3045) ile agaroz jel elektroforezi yapılarak serum lipoprotein profilleri izlendi. Ayrıca HDL, VLDL ve LDL'nin saf olup olmadığına ve LDL'nin oksidasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğine okside LDL'nin izole LDL'ye göre hareketliliğine bakılarak tespit edilmeye çalışıldı.

Çözeltilerin hazırlanması

1. Tris / Barbitol Tamponu

100 mL konsantre Tris/Barbitol tamponu (% 0,1 sodyum azid katıldı) 900 mL deiyonize suda çözüldü. Bu çözeltiyi oda sıcaklığında 2 ay saklamak mümkündür.

2. Lipoprotein Boyası (Fat Red 7 B)

Bir şişe Fat Red 7 B, 1 L metanolde 24 saat karıştırılarak çözüldü. 24 saat dinlendirildi ve süzüldü. Karanlıkta ağzı kapalı şişede saklandı. Çalışmaya başlamadan önce 25 mL boya çözeltisine 5 mL su damla damla ve her seferinde karıştırılarak ilave edildi ve böylece çalışma boyası hazırlandı.

3. Boya giderme çözeltisi (% 75 metanol)

75 mL metanol, 25 mL su ile karıştırılarak hazırlandı.

Deneyin yapılışı

1. Jel üzerine tatbik edilecek alanın ıslaklığı kitte mevcut olan kurutma kağıtları ile alındı. (-) çizgileri arasına kalıp koyularak, kabarcık oluşmaması için hafifçe el gezdirildi. 2 µL numuneler kalıptaki boşluklara mikropipetle koyuldu ve 7 dk absorbe olması için beklendi. Daha sonra, fazlalık numune kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı ve hem kurutma kağıdı hem de kalıp kaldırılarak alındı.
2. Elektroforez tankının iç bölmelerine 25'er mL tampon ilave edildi. Agaroz kısım üste ve (+) , (+)'ya ; (-), (-)'ye gelecek şekilde jel yerleştirildi. 80 voltta 45 dk elektroforez yapıldı.
3. Elektroforez işleminden sonra jel 60-70 °C 'de 5 dk kurutuldu.
4. 30 mL çalışma boyası ile jel 2 dk maruz bırakıldı. Jel 2'şer defa 15-30 s yavaşça karıştırılarak boya giderme çözeltisine maruz bırakıldı.
5. 60-70 °C'de 5 dk kurutuldu ve Clinscan 2 (Helena Laboratories) densitometresi kullanılarak 525 nm'de tarama yapıldı.

3.3. İstatistiksel Analizler

Her iki gruptaki değerler aritmetik ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Her iki gruptaki parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Simirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyanlar Student-t testi ile uymayanlar ise Mann Whitney U testi ile ortalamalar arasındaki farkın önemliliği belirlendi. Grup içi parametreler arası ilişki ise Sperman veya Pearson Korelasyon testi ile incelendi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

X : Aritmetik Ortalama

SD : Standart Sapma

% CV : Varyasyon Katsayısı = $(SD / X) \times 100$



4. BULGULAR

4.1. Metotların Kalite Kontrolleri

Otoanalizör kullanılarak değerlendirilen metotların kalite kontrolleri, ilgili otoanalizörlerin günlük kalibrasyon ve kontrol serumları ile yapıldı. Antioksidan enzimler ve oLab'ın tekrarlanabilirlikleri (Within-run) en az beş kez aynı numune çalışılarak varyasyon katsayıları (% CV) ile belirlendi. % CV'nin % 10'nun altında olması deneylerin tekrarlanabildiğini göstermektedir. Kontrol serumu ve standartlar doğruluk tespiti için kullanıldı. Metotların varyasyon katsayıları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan metotların varyasyon katsayıları (% CV) (n=5)

Parametre	Plazma (% CV)	Eritrosit (% CV)
SOD	1,02	7,16
Kat	-	3,63
GSH-Px	6,92	7,34
GR	5,36	3,33
TBARS	-	6,36
LPH	4,39	-
oLab		
Kontrol A (300 mU/mL)	4,4	-
Kontrol B (1000 mU/mL)	5,6	-

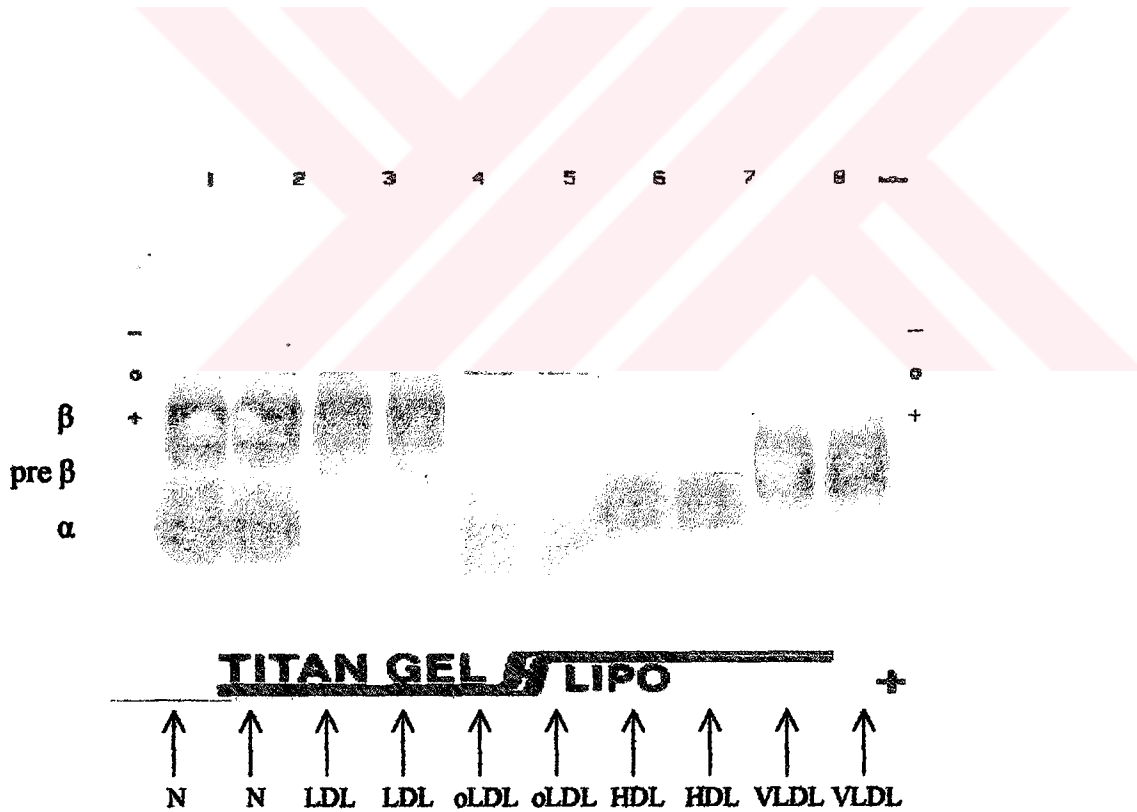
Lipoproteinlerin izolasyonu sonucu elde edilen VLDL, LDL ve HDL'nin ne kadar doğru bir şekilde elde edildiğini belirleyebilmek amacıyla 10 farklı numunenin izole lipoproteinlerinde TK, TG, HDL-K, apo AI ve apo B seviyeleri belirlendi (Tablo 7).

Beklenildiği gibi LDL'de TK ve Apo B, VLDL'de, TG, ve HDL'de ise Apo AI hakimiyeti vardı. HDL'deki TK ile HDL-K karşılaştırıldığında anlamlı farklılıklar olmadığı görüldü ($p<0,05$).

Tablo 7. İzole VLDL, LDL ve HDL'de yapılan analizler ve karşılaştırılması (n=10)

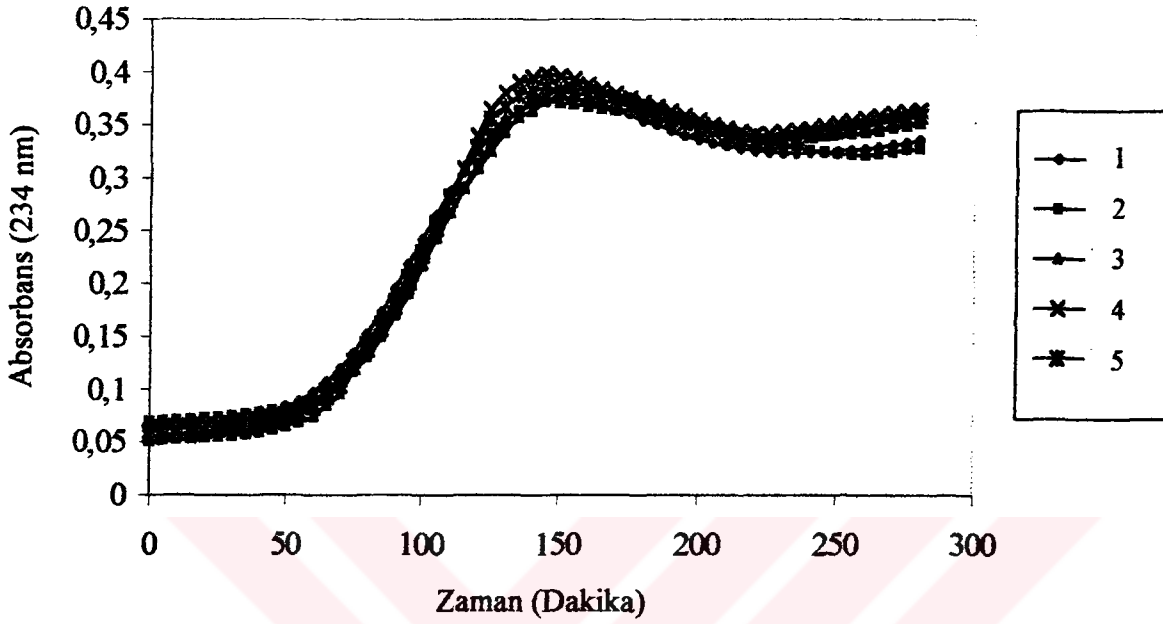
		VLDL (X±SD)	LDL (X±SD)	HDL (X±SD)
TK	(mg/dL)	39 ± 18	135 ± 18	38 ± 9*
TG	(mg/dL)	203 ± 65	18 ± 5	11 ± 4
HDL-K	(mg/dL)	-	2,9 ± 0,9	36 ± 6*
Apo AI	(mg/dL)	-	<5	126 ± 28
Apo B	(mg/dL)	-	110 ± 26	<5

* Mann Whitney U testine göre ($p<0.05$)



Şekil 14. Plazma (N), izole LDL, okside LDL (oLDL), izole HDL ve VLDL'nin elektroforetik hareketliliği.

Şekil 14’de izole lipoproteinler normal plazmaları ile karşılaştırılarak saf olup olmadıkları, tek bant halinde elde edilip edilemedikleri tespit edildi. Lipoproteinlerde tek bant elde edilmiş olması, bu bantların uygun yerlerde görülmesi ve Tablo 7’deki veriler göz önüne alındığında lipoproteinlerin izolasyonunun yapılabildiği görülmektedir.



Şekil 15. Cu^{+2} ile LDL oksidasyonu kinetiği (n=5).

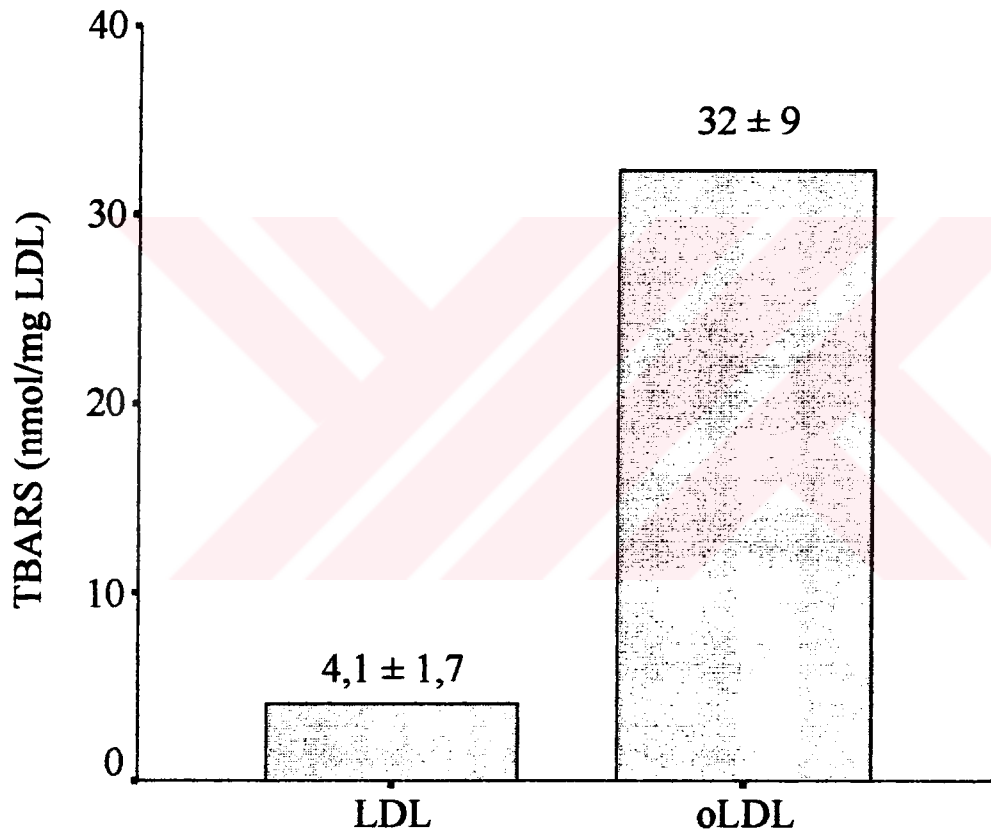
İzole edilen tek bir LDL numunesi, 5 kez çalışılarak aynı oksidasyon grafiklerinin elde edilebilirliği takip edildi (Şekil 15). Aynı oksidasyon derecesinin elde edilip edilmediği belirlenebilmesi için A° , t-lag, DKH, MDK ve t-maks’nin % CV değerleri belirlendi. Bu veriler Tablo 8’de verilmektedir.

Tablo 8. Oksidasyon takibi verileri ve varyasyon katsayıları (%CV).

	A°	t-lag (dakika)	DKH (nmol/dk/mg LDL protein)	MDK (nmol/mg LDL protein)	t-maks (dakika)
1.	0,062	60	3.0	211	150
2.	0,068	64	3.2	213	155
3.	0,053	66	3.1	214	160
4.	0,057	67	3.7	221	145
5.	0,060	65	3.3	219	145
% CV	9,48	4,19	7,42	2,0	4,3

Bu % CV değerlerine göre *in vitro* LDL oksidasyonunun dien konjugasyonu takip edilerek de belirlenebileceğine karar verildi.

Şekil 14'de ayrıca izole edilen LDL ile 24 saat Cu^{+2} ile okside edilen ($50 \mu\text{g LDL}$: $1,67 \mu\text{M Cu}^{+2}$) LDL elektroforetik karşılaştırılarak okside olup olmadığı izlendi. oLDL'de elektroforetik hareketliliğin arttığı gözlemlendi ve β bölgesinde yer alan LDL'den farklı olarak α bölgesi civarına yerleştiği görüldü. Yine oksidasyon takibi için izole LDL ve okside LDL-TBARS seviyeleri belirlendi (Şekil 16). LDL, okside olduktan sonra TBARS seviyelerinde % 789 artış olduğu tespit edildi.



Şekil 16. LDL oksidasyonu öncesi ve sonrası TBARS seviyeleri.

4.2. Psöriasisli Hastalarda ve Sağlıklı Kişilerde Ortalama Değerler ve Anlamlılıkları

Psöriasis hastaları ve sağlıklı kişilerin demografik bulguları Tablo 9’da gösterilmiştir. Gruplar arasında demografik olarak anlamlı bir farklılık görülmedi.

Tablo 9. Psöriasis hastaları ve sağlıklı kişilerde demografik bulgular.

	Psöriasis hastaları	Sağlıklı kişiler
n	35	35
Cins (K/E)	(18/17)	(16/19)
Yaş, yıl	35 ± 8	36 ± 12
BMI*	24 ± 4	23 ± 5
PASI	5,8 ± 5,04	-

*BMI : Body mass index (Vücut kütle endeksi), kg/m²

Tablo 10. Psöriasis hastaları ve sağlıklı kişilerde lipid parametreleri.

	Psöriasis hastaları	Sağlıklı kişiler	P
	X ± SD	X ± SD	
TG (mg/dL)	144 ± 62	105 ± 48	♠0,010
TK (mg/dL)	202 ± 40	184 ± 25	*0,027
HDL-K (mg/dL)	43 ± 7	52 ± 11	*0,001
LDL-K (mg/dL)	133 ± 37	110 ± 25	*0,020
Apo A (mg/dL)	119 ± 20	121 ± 18	*0,628
Apo B (mg/dL)	102 ± 27	96 ± 24	*0,343

* Student-t testine göre

♠ Mann Whitney U testine göre

p < 0,05 ; İstatistiksel olarak anlamlı alındı.

Tablo 10’de de görüldüğü gibi TK, TG ve LDL-K seviyeleri psöriasis hastalarında kontrollerden anlamlı derecede yüksek, HDL-K seviyeleri ise anlamlı derece düşük idi. Apo AI ve Apo B seviyeleri arasında anlamlı farklılık bulunamadı.

Tablo 11. Psöriasis hastaları ve sağlıklı kişilerde akut faz reaktanları.

		Psöriasis hastaları	Sağlıklı kişiler	P
		X±SD	X±SD	
CRP	(mg/dL)	0,77 ± 0,56	0,38 ± 0,10	♠0,004
ESH	(mm/saat)	14,2 ± 9,8	7,1 ± 4,0	♠0,001
Fibrinojen	(mg/dL)	424 ± 100	292 ± 51	*0,001
Seruloplazmin	(mg/dL)	27 ± 4,0	24 ± 3,0	*0,001
PMN-Lökosit	(10 ³ /µ L)	7,9 ± 1,7	5,6 ± 1,8	*0,000

* Student-t testine göre

♠ Mann Whitney U testine göre

p < 0,05 ; İstatistiksel olarak anlamlı alındı.

Tablo 11’de her iki grubun akut faz reaktanları ortalama değerleri ve anlamlılıkları gösterilmektedir. Psöriasis hastalarında CRP, ESH, fibrinojen, seruloplazmin, ve PMN-lökosit seviyeleri kontrollere göre oldukça anlamlı yüksek idi.

Tablo 12. Psöriasis hastaları ve sağlıklı kişilerde antioksidan enzimler.

		Psöriasis hastaları	Sağlıklı kişiler	P
		X ± SD	X ± SD	
Eritrosit				
Kat	(k/ g Hb)	222 ± 41	275 ± 37	*0,001
SOD	(U/g Hb)	902 ± 217	1020 ± 145	*0,011
GSH-Px	(U/g Hb)	5,67 ± 1,57	6,62 ± 1,93	*0,025
GR	(U/g Hb)	9,14 ± 2,97	8,67 ± 1,79	*0,869
Plazma				
SOD	(U/mL)	3,82± 1,05	4,56 ± 0,72	*0,003
GSH-Px	(U/L)	90 ± 16	98 ± 18	*0,144
GR	(U/L)	60 ± 12	55 ± 19	*0,175

* Student-t testine göre

p < 0,05 ; İstatistiksel olarak anlamlı alındı.

Hastalarda eritrosit Kat, SOD ve GSH-Px aktivitelere ilaveten plazma SOD aktivitesi de düşük bulundu. Plazma GSH-Px aktivitesi düşük olmasına rağmen anlamlı değildi. Eritrosit ve plazma GR aktiviteletelerinde anlamlı bir değişiklik olmadı (Tablo 12). Bu tabloya göre genel anlamda psöriasis hastalarında antioksidan aktivitenin azaldığı söylenebilir.

Tablo 13. Psöriasis hastaları ve sağlıklı kişilerde lipid peroksidasyonu parametreleri.

	Psöriasis hastaları	Sağlıklı kişiler	P
	X ± SD	X ± SD	
eTBARS(nmol/g Hb)	129 ± 38	87 ± 21	*0,000
LHP (µmol/L)	108 ± 26	75 ± 22	*0,001
oLAb (mU/mL)	388 ± 176	225 ± 120	♣0,002

* Student-t testine göre

♣ Mann Whitney U testine göre

p < 0,05 ; İstatistiksel olarak anlamlı alındı.

Tablo 13'e göre psöriasis hastalığında lipid peroksidasyonu ürünlerinin arttığı görülmektedir. Eritrosit TBARS, plazma LHP ve *in vivo* LDL oksidasyonu ifade eden oLAb seviyelerinde anlamlı yükseklik görüldü.

İzole lipoproteinlerin TK ve TG değerleri mg lipoprotein başına ifade edildi. Buna göre hastalarda izole edilen LDL TG ve TK düzeyleri ve HDL'de ise TG seviyeleri yüksek bulundu. Ancak, HDL'de TK seviyeleri düşüktü. VLDL'de TG yüksek olmasına rağmen anlamlı değildi. VLDL TK seviyelerinde ise anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 14).

Tablo 15'de Cu⁺² ile LDL oksidasyonu kinetiği verileri karşılaştırıldı. Hastalarda, (A°), DKH ve MDK yüksek, t-lag ve t-maks ise düşük bulundu. t-lag'ın daha kısa sürede olması LDL oksidasyonu kinetik grafiğini sağa doğru kaydırmış, konjugasyonun fazla olması ise ilerleme fazı eğimini yükseltmiştir (Şekil 17). Bu sonuçlar psöriasis hastalığında LDL'nin oksidasyona direncinin düştüğünü göstermektedir.

Cu⁺² ile 24 saatlik LDL oksidasyonu öncesi ve sonrası TBARS değerleri karşılaştırıldığında hastalarda hem oksidasyon öncesinde ve hem de oksidasyon sonrasında lipid peroksidasyonunun daha yüksek olduğu belirlendi (Tablo 16). Ayrıca oksidasyon sonrası TBARS değerleri oksidasyon öncesi TBARS değerleri ile karşılaştırıldığında her iki grupta da oldukça yükselme olduğu görüldü..

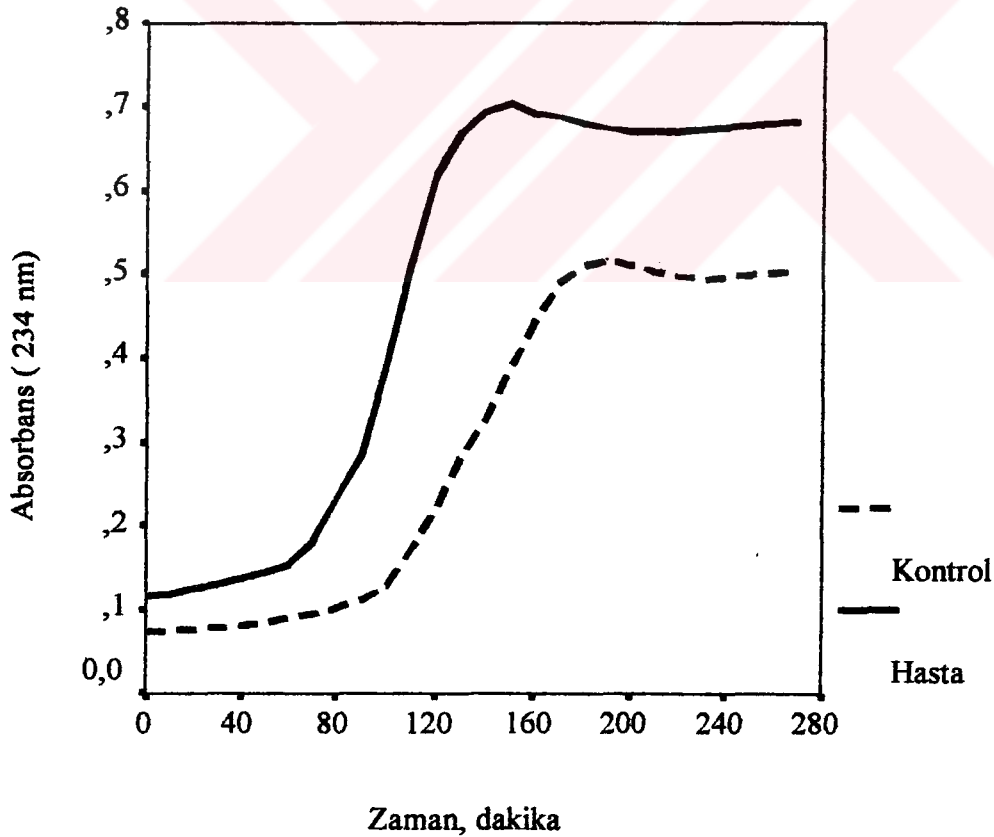
Tablo 14. Psöriasis ve sağlıklı kişilerde izole lipoproteinlerin parametreleri.

	Psöriasis hastaları	Sağlıklı kişiler	P
	X ± SD	X ± SD	
VLDL			
TG (mg/mg protein)	2,8 ± 1,71	1,83 ± 1,01	♣0,090
TK (mg/mg protein)	0,40 ± 0,31	0,38 ± 0,20	♣0,731
LDL			
TG (mg/mg protein)	0,31 ± 0,08	0,26 ± 0,11	*0,048
TK (mg/mg protein)	1,05 ± 0,21	0,91 ± 0,33	*0,047
HDL			
TG (mg/mg protein)	0,0064 ± 0,004	0,0049 ± 0,002	*0,036
TK (mg/mg protein)	0,0120 ± 0,004	0,0149 ± 0,006	*0,036

* Student-t testine göre

♣ Mann Whitney U testine göre

p < 0,05 ; İstatistiksel olarak anlamlı alındı.



Şekil 17. Psöriasis hastalarında ve sağlıklı kişilerde Cu^{++} ile LDL oksidasyonu kinetikleri (Ortalama absorbans değerlerine göre grafik çizilmiştir).

Tablo 15. Psöriasisli hastalar ve sağlıklı kişilerin LDL oksidasyon kapasitesi parametreleri.

	Psöriasis hastaları	Sağlıklı kişiler	P
	X±SD	X ± SD	
A°	0,115 ± 0,05	0,074 ± 0,00	*0,001
t-lag (dk)	74 ± 19	105 ± 24	*0,000
DKH (nmol/dk/mg LDL protein)	7,8 ± 3,8	3,8 ± 2,8	*0,006
MDK(nmol/mg LDL protein)	381 ±126	305 ± 111	♣0,032
t-maks (dk)	155 ± 37	185 ± 28	*0,001

* Student-t testine göre

♣ Mann Whitney U testine göre

p < 0,05 ; İstatistiksel olarak anlamlı alındı.

Tablo 16. Psöriasisli hastalar ve sağlıklı kişilerin LDL'de TBARS takibi.

	Psöriasis hastaları	Sağlıklı kişiler	P
	X±SD	X±SD	
LDL-TBARS (nmol/mg LDL protein)	4,9 ±1,7	3,8 ± 0,72	*0,018
oLDL-TBARS (nmol/mg LDL protein)	51 ± 14	35 ± 11	*0,000
P	♣ 0,001	♣ 0,001	

* Student-t testine göre

♣ Paired t testine göre

p < 0,05 ; İstatistiksel olarak anlamlı bulundu.

4.3. Psöriasis Hastaları ve Sağlıklı Kişilerde Parametreler Arası Korelasyonlar

4.3.1. Psöriasis Hastalarında Korelasyonlar

Tablo 17’de psöriasisli hastalarda *in vivo* LDL oksidasyonu göstergesi olan oLAb, *in vitro* dien konjugasyonu takibi parametreleri ve TBARS seviyelerinin korelasyonları anlamlı bulundu. oLAb; MDK, oLDL-TBARS, TK, LDL-K, Apo B, LHP, eTBARS, fibrinojen, CRP ve PMN-lökosit seviyeleri ile anlamlı pozitif korelasyon, pSOD ile ise negatif korelasyon gösterdi. Dien konjugasyonu takibi parametreleri; LDL oksidasyon direncini ifade eden t-lag; t-maks ile pozitif, VLDL-TK, VLDL-TG ve LDL-TG ile negatif, DKH; MDK, LDL-TBARS, oLDL-TBARS, TK, LDL-K ve LDL-TK ile pozitif, HDL-TK ile negatif, MDK; DKH’na ilaveten LDL-TBARS, oLDL-TBARS, TK, LDL-K, Apo B, LDL-TK ve LHP ile pozitif ve t-maks; t-lag ile pozitif, LDL-TK ile negatif korelasyon verdi. LDL-TBARS ile oLDL-TBARS’a ilaveten LDL-TK arasında, oLDL-TBARS ile ise TK, LDL-K, Apo B, LDL-TK ve eTBARS arasında pozitif korelasyon görüldü. Ayrıca oLDL-TBARS ile sadece pSOD arasında negatif korelasyon bulundu.

Tablo 18’de serum lipid ve izole lipid parametrelerinin birbirleri, lipid peroksidasyonu ürünleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanları ile anlamlı ilişkileri verilmiştir. Sonuçlara göre TK; TG, LDL-K, apo B, LDL-TK, eTBARS, fibrinojen ve CRP ile pozitif, HDL-K, ve pSOD ile negatif korelasyon, TG; LDL-K, Apo B, eTBARS, fibrinojen ve CRP ile pozitif, HDL-K ve eSOD ile negatif, HDL-K, HDL-TK ile pozitif, LDL-K, Apo B ve eTBARS ile negatif, ve Apo B; eTBARS ve CRP ile pozitif, Apo AI ve pSOD ile ise negatif korelasyonlar verdi.

Tablo 19’da lipid peroksidasyonu göstergeleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanlarının birbirleri ile korelasyonları gösterilmektedir. pLHP; lökosit ile pozitif, eTBARS; CRP ile pozitif, pSOD ile negatif, eSOD; eGSH-Px ve CRP ile negatif, eGSH-Px; eGR ile pozitif, pSOD; CRP ile negatif, pGSH-Px; pGR ile pozitif ve fibrinojen, CRP ile pozitif korelasyonlar gösterdi.

Psöriasis hastalarının parametreleri arasında görülen anlamlı ve önemli korelasyonlar Şekil 18 ile Şekil 29 arasında gösterilmektedir.

Tablo 17. Psöriasis hastalarında *in vivo* ve *in vitro* LDL oksidasyonu parametrelerinin birbirleriyle, serum lipid ve izole lipoprotein parametreleri ile, lipid peroksidasyonu (LP) göstergeleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanları ile korelasyonları.

		Serum		LDL oksidasyonu parametreleri				
		oLab	A°	t-lag	DKH	MDK	t-maks	LDL TBARS
LDL oksidasyonu parametreleri	A°	-	-	-	-	-	-	-
	t-lag	-	-	-	-	-	-	-
	DKH	-	-	-	-	-	-	-
	MDK	0,50**	-	-	0,75**	-	-	-
	t-maks	-	-	0,68**	-	-	-	-
	LDL-TBARS	-	-	-	0,38*	0,43**	-	-
Serum lipid parametreleri	oLDL-TBARS	0,34*	-	-	0,51**	0,48**	-	0,74**
	TK	0,69**	-	-	0,45**	0,53**	-	0,50**
	TG	-	-	-	-	-	-	-
	HDL-K	-	-	-	-	-	-	-
	LDL-K	0,64**	-	-	0,50**	0,58**	-	0,47**
	Apo AI	-	-	-	-	-	-	-
İzole lipoprotein lipidleri	Apo B	0,60**	-	-	-	0,39*	-	0,76**
	VLDL-TK	-	-	-0,49**	-	-	-	-
	VLDL-TG	-	-	-0,49**	-	-	-	-
	LDL-TK	-	-	-	0,68**	0,58**	-0,35*	0,36*
	LDL-TG	-	-	-0,38*	-	-	-	0,52**
	HDL-TK	-	-	-	-0,37*	-	-	-
LP	HDL-TG	-	-	-	-	-	-	-
	LHP	0,38*	-	-	-	0,34*	-	-
	eTBARS	0,65**	-	-	-	-	-	0,36*
Antioksidan enzimler	eSOD	-	-	-	-	-	-	-
	eKat	-	-	-	-	-	-	-
	eGSH-Px	-	-	-	-	-	-	-
	eGR	-	-	-	-	-	-	-
	pSOD	-0,67**	-	-	-	-	-	-0,44**
	pGSH-Px	-	-	-	-	-	-	-
Akut faz reaktanları	pGR	-	-	-	-	-	0,36*	-
	Seruloplazmin	-	-	-	-	-	-	-
	Fibrinojen	0,34*	-	-	-	-	-	-
	CRP	0,53**	-	-	-	-	-	-
	ESH	-	-	-	-	-	-	-
	PMN-Lökosit	0,34*	-	-	-	-	-	-

* p < 0,05

** p < 0,01

Tablo 18. Psöriasis hastalarında serum lipid ve izole lipoprotein parametrelerinin birbirleri ile, lipid peroksidasyonu (LP) göstergeleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanları ile korelasyonları.

	Serum lipid parametreleri					İzole lipoprotein lipidleri				
	TK	TG	HDL-K	LDL-K	Apo AI	Apo B	VLDL-TK	VLDL-TG	LDL-TK	HDL-TK
Serum lipid parametreleri										
TG	0,59**									
HDL-K	-0,51**	-0,52**								
LDL-K	0,89**	0,42*	-0,56**							
Apo AI										
Apo B	0,71**	0,40*	-0,37*	0,69**	-0,40*					
VLDL-TK	-	-	-	-	-	-				
VLDL-TG	-	-	-	-	-	-	-			
İzole lipoprotein lipidleri										
LDL-TK	0,44**	-	-	0,54**	-	-	-	-	-	-
LDL-TG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HDL-TK	-0,38*	-	0,39*	-0,46**	-	-	-	-	-0,45**	-
HDL-TG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LP										
eTBARS	0,78**	0,43*	-0,45*	0,74**	-	0,61**	-	-	0,38*	-
eSOD	-	-0,42*	-	-	-	-	-	-	-	-
eKat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
eGSH-Px	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
eGR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSOD	-0,55**	-	-	-0,52**	-	-0,60**	-	-	-	-
pGSH-Px	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pGR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antitoksidan enzimler										
Seruloplazmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrinojen	0,39*	0,49**	-	-	-	-	-	-	-	-
AKUT FAZ REAKTANLARI										
CRP	0,53**	0,47**	-	0,35*	-	0,38*	-	-	-	-
ESH	-	-	-	0,34*	-	-	-	-	-	-
PMN-Lökosit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

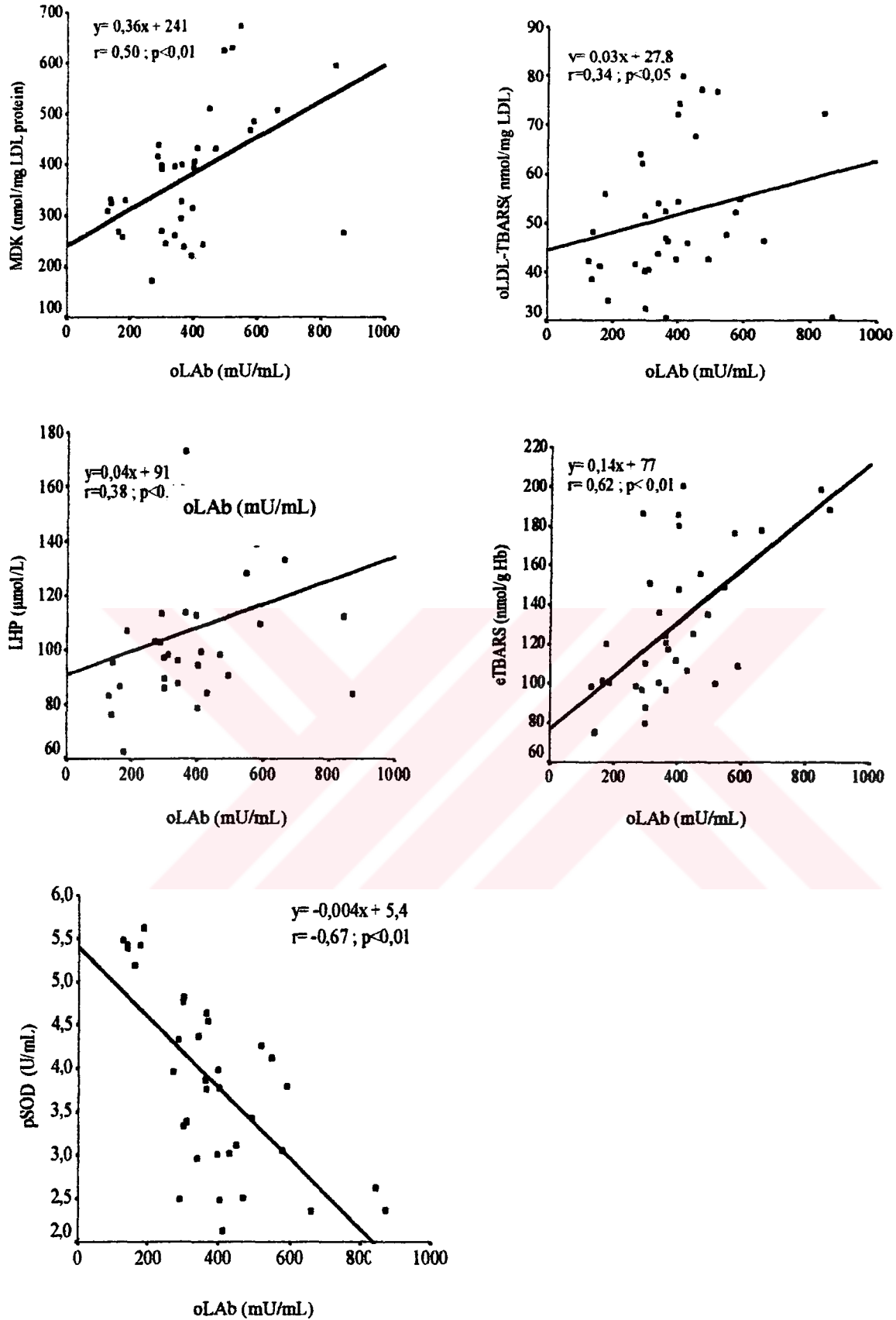
* p < 0,05

** p < 0,01

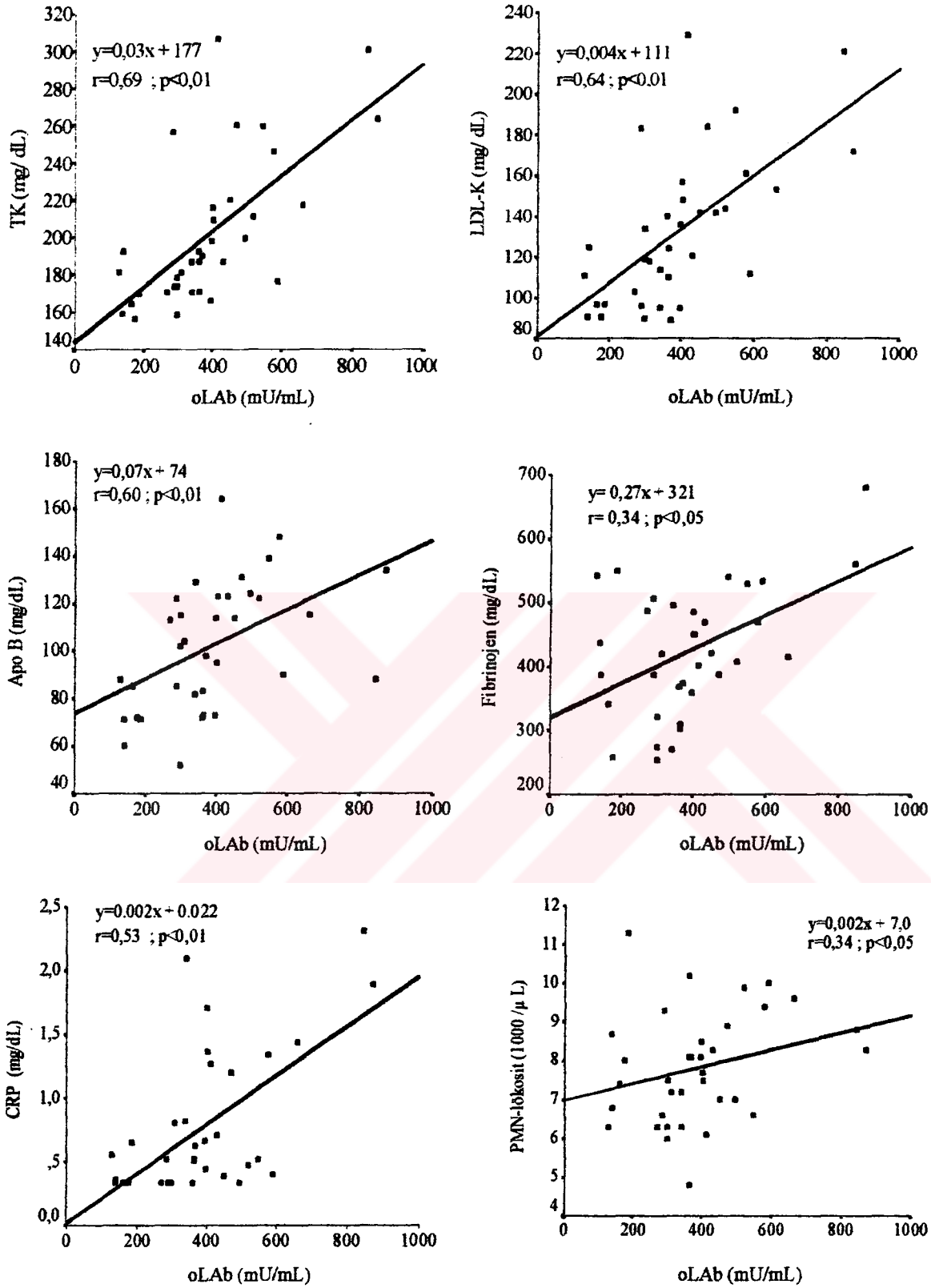
Tablo 19. Psöriasis hastalarında, lipid peroksidasyonu (LP) göstergeleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanlarının birbirleri ile korelasyonları.

LP		Antioksidan enzimler						Akut faz reaktanları				
LP	eTBARS	eSOD	eKat	eGSH-Px	eGR	pSOD	pGSH-Px	pGR	Seruloplazmin	Fibrinojen	CRP	ESH
Antioksidan enzimler												
eSOD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
eKat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
eGSH-Px	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
eGR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pSOD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pGSH-Px	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pGR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Seruloplazmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrinojen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Akut faz reaktanları												
PMN-Lökosit	0,35*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

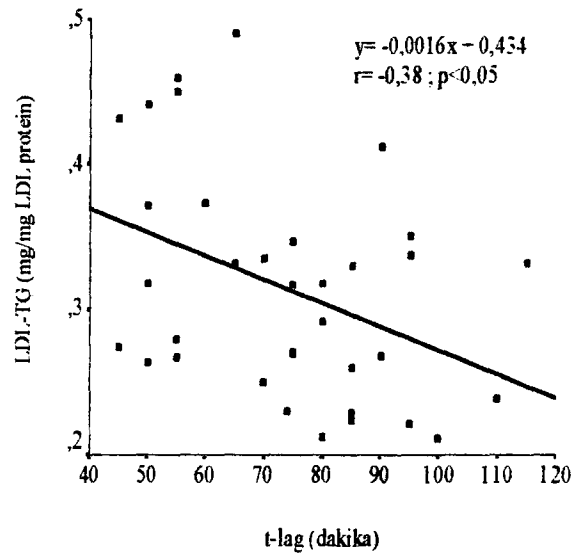
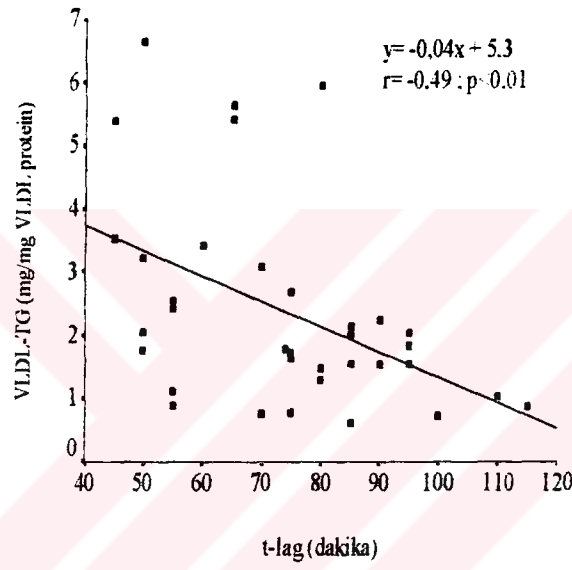
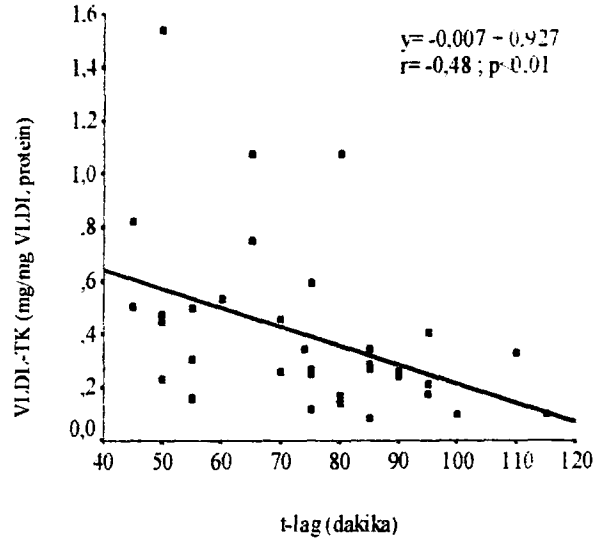
* p<0,05 ** p<0,01



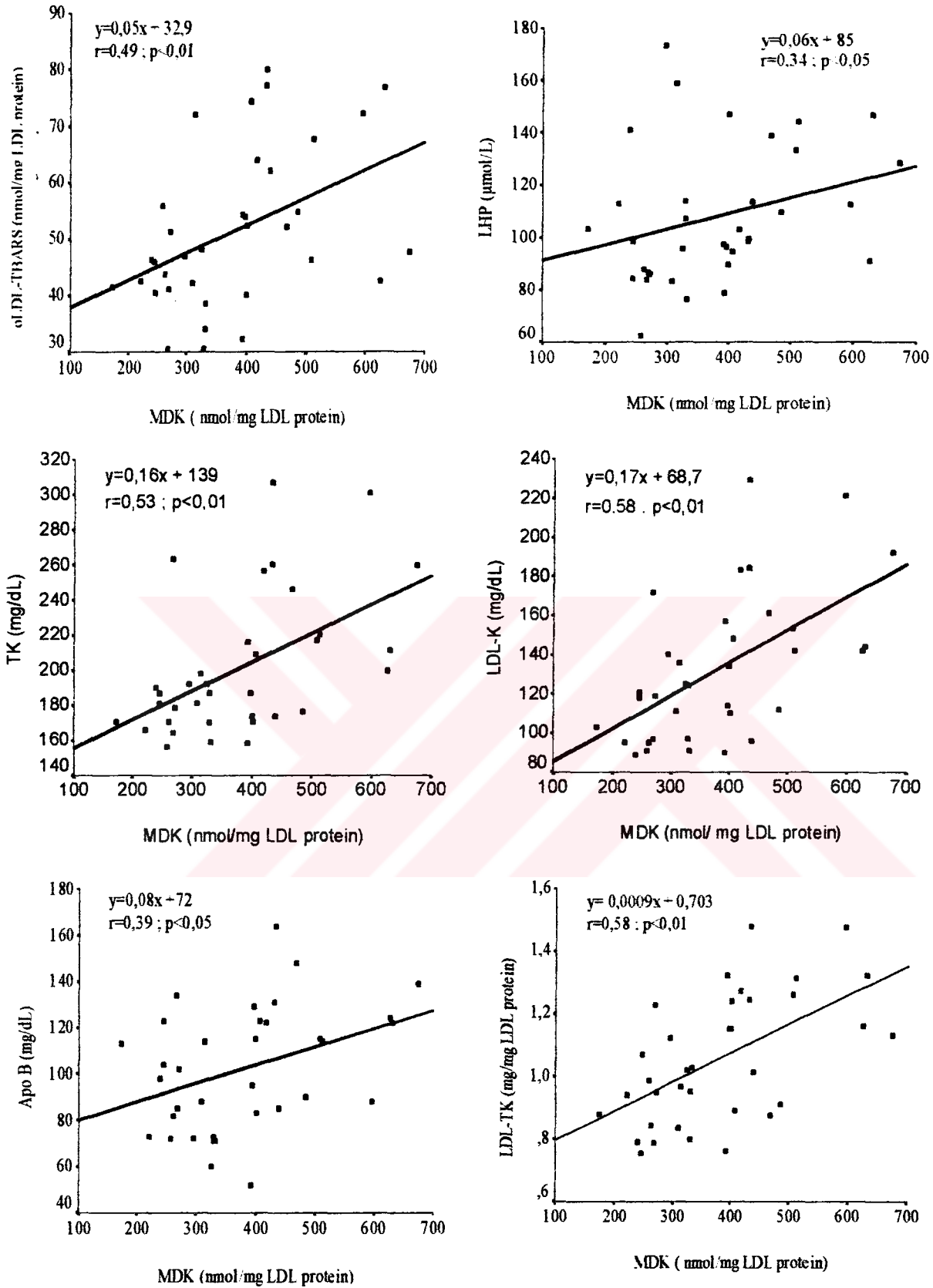
Şekil 18. Psöriasis hastalarında oLAb ile lipid oksidasyonu göstergeleri ve pSOD arasındaki korelasyon grafikleri



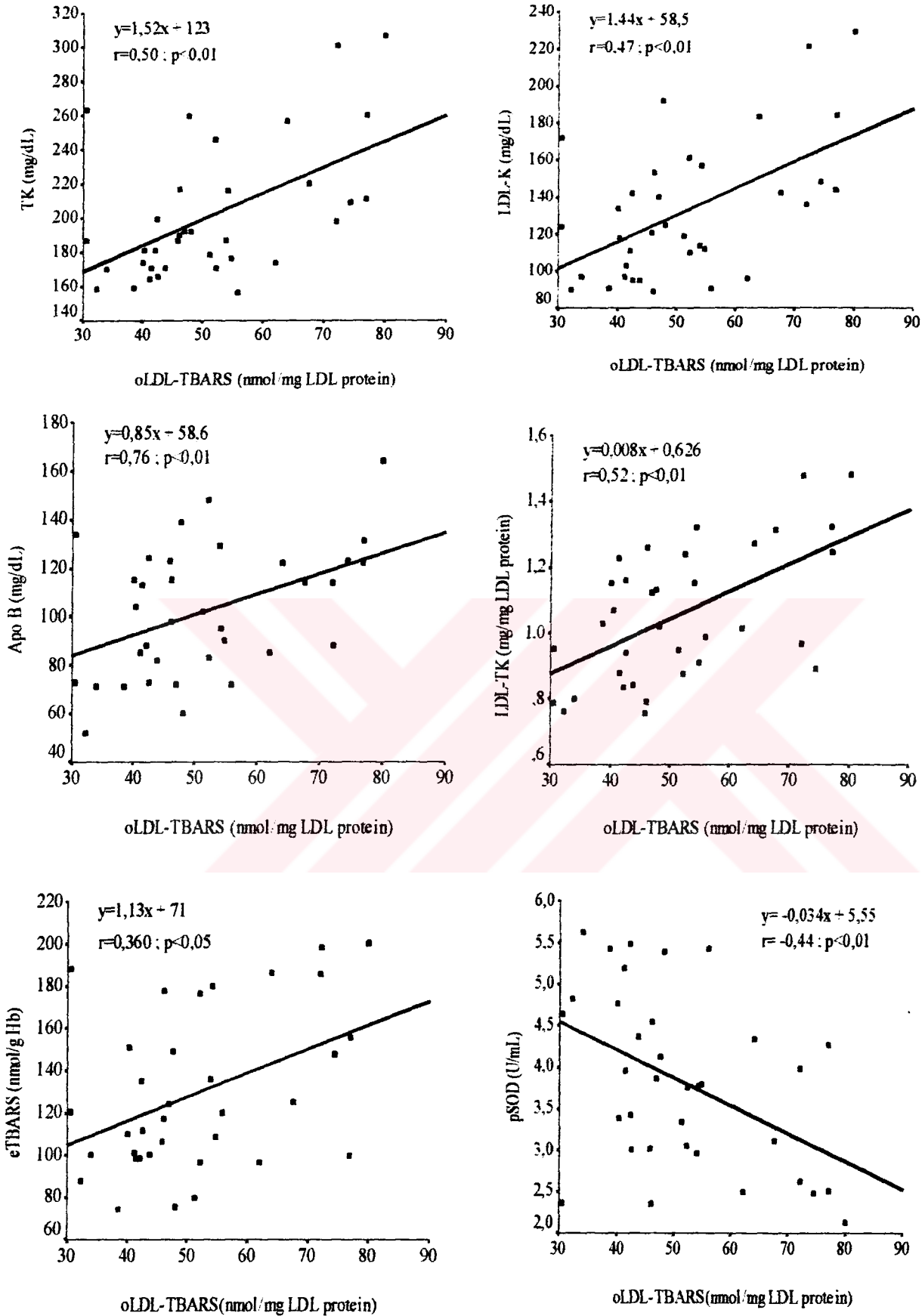
Şekil 19. Psöriasis hastalarında oLAb ile lipid parametreleri ve akut faz reaktanları arasındaki korelasyon grafikleri.



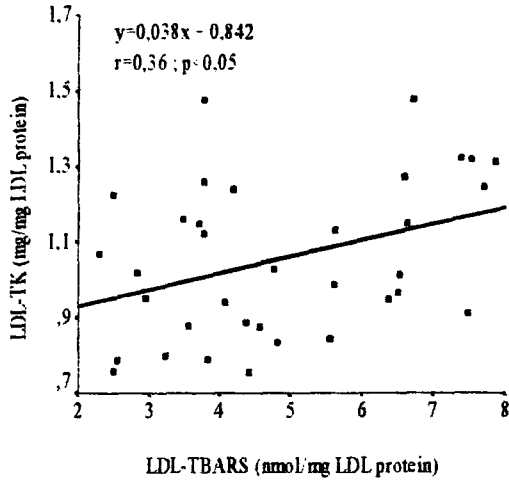
Şekil 20. Psöriasis hastalarında t-lag ile VLDL-TK, VLDL-TG ve LDL-TG seviyeleri ile korelasyon grafikleri.



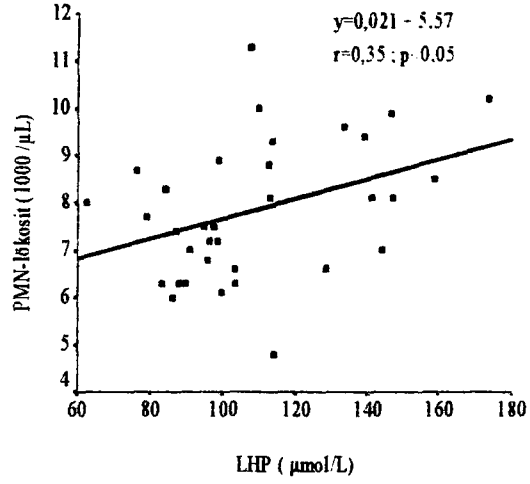
Şekil 21. Psöriasis hastalarında MDK ile lipid ve lipid peroksidasyonu parametreleri ve izole LDL-TK seviyeleri arasındaki korelasyon grafikleri.



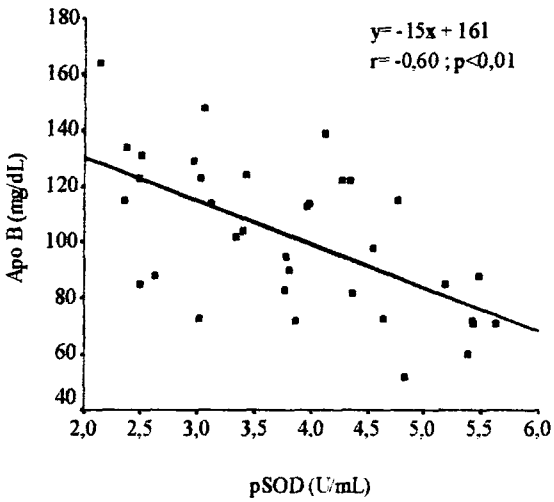
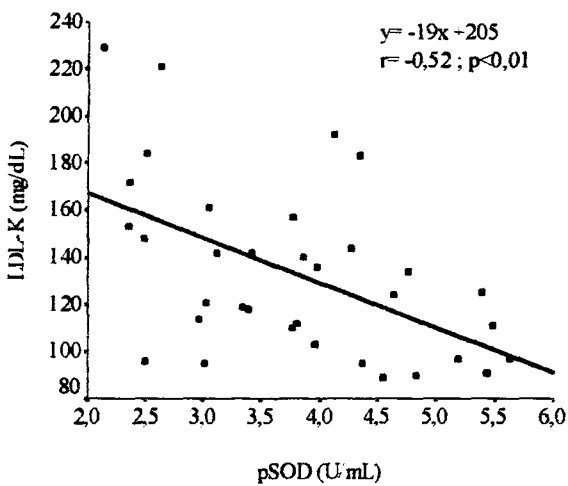
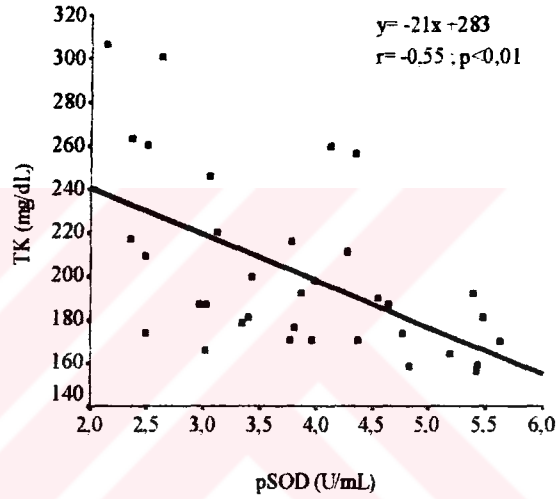
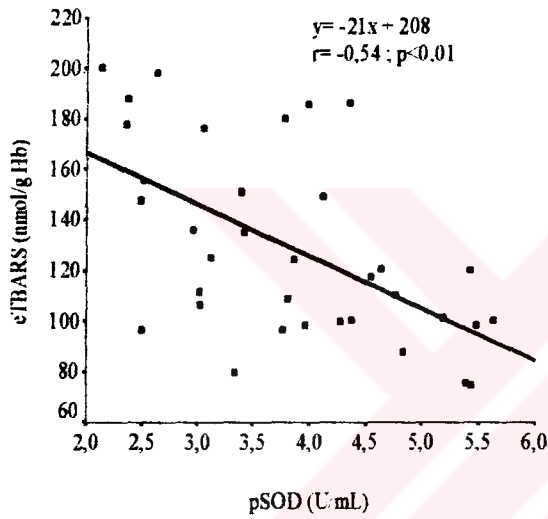
Şekil 22. Psöriasis hastalarında oLDL-TBARS ile lipid parametreleri, izole LDL-TK, eTBARS ve pSOD arasındaki korelasyon grafikleri.



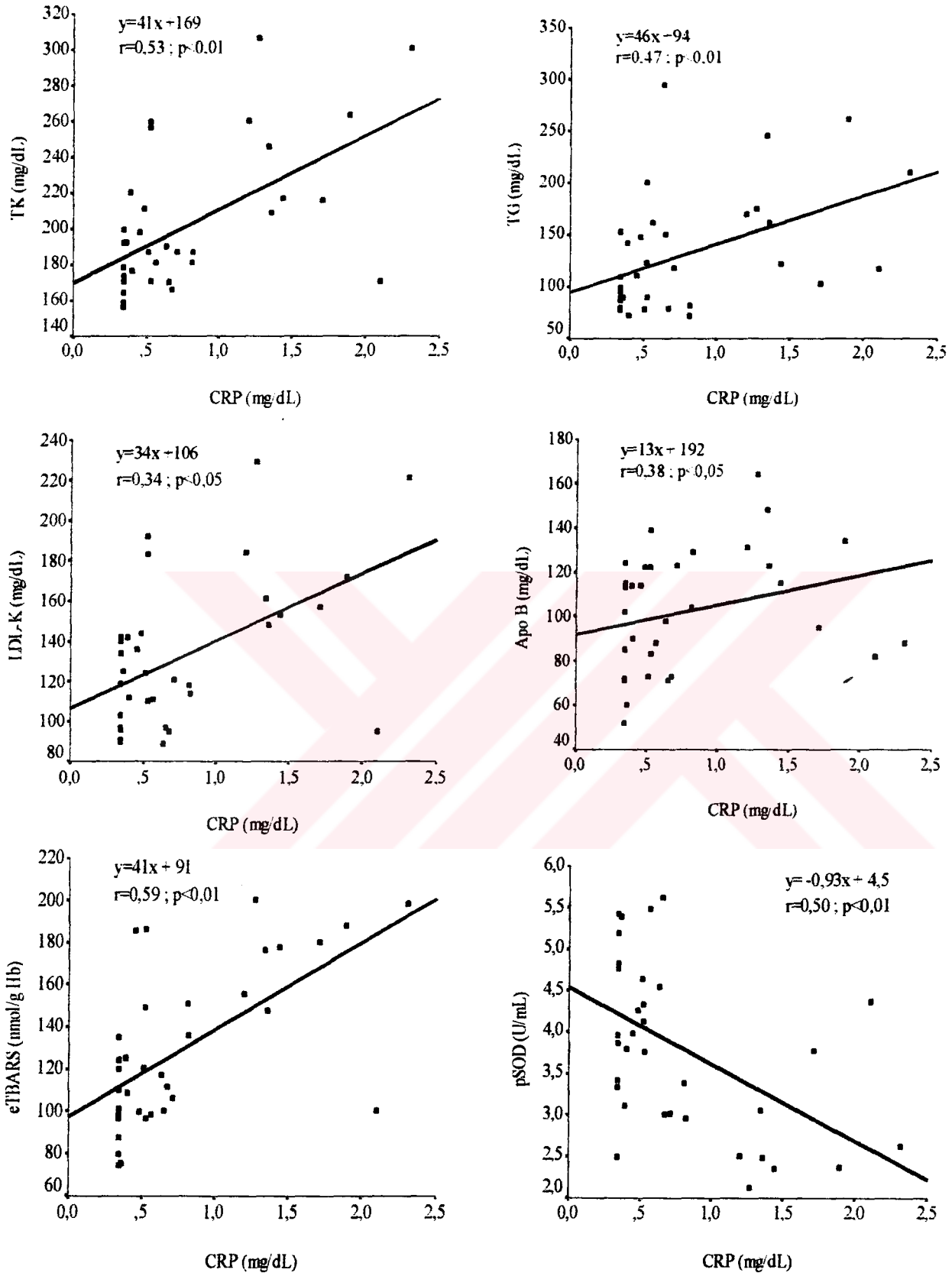
Şekil 23. Psöriasis hastalarında LDL-TBARS ile izole LDL-TK arasındaki korelasyon grafiği.



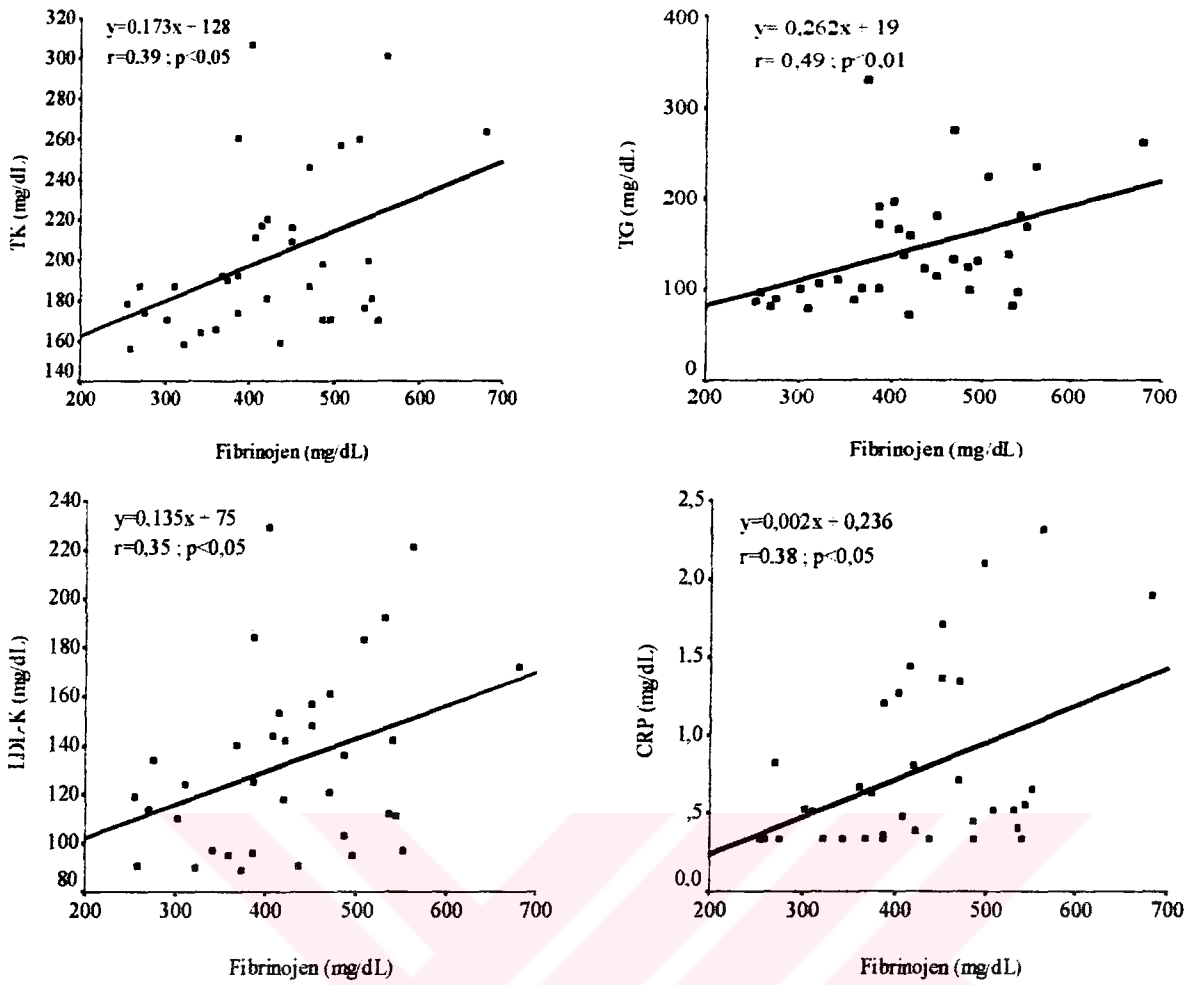
Şekil 24. Psöriasis hastalarında LHP ile PMN-lökosit arasındaki korelasyonu



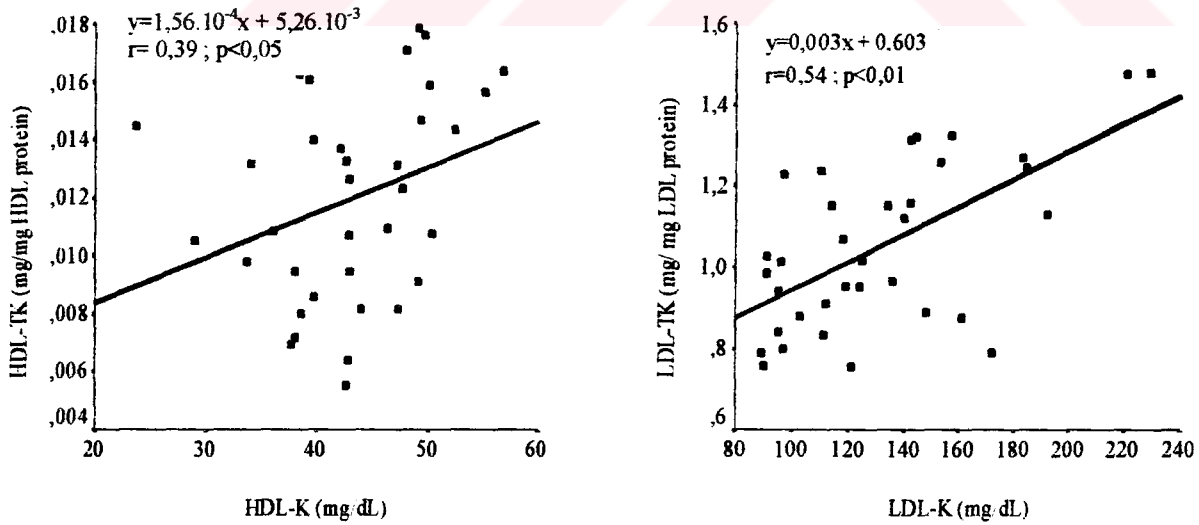
Şekil 25. Psöriasis hastalarında pSOD ile lipid parametreleri ve eTBARS arasındaki korelasyon grafikleri.



Şekil 26. Psöriasis hastalarında CRP ile lipid parametreleri, eTBARS ve pSOD arasındaki korelasyon grafikleri.



Şekil 27. Psöriasis hastalarında fibrinojen ile lipid parametreleri ve CRP arasındaki korelasyon grafikleri.



Şekil 28. Psöriasis hastalarında serum HDL-K'ü ile izole HDL-TK arasındaki korelasyon grafiği

Şekil 29. Psöriasis hastalarında serum LDL-K'ü ile izole LDL-TK arasındaki korelasyon grafiği.

4.3.2. Sağlıklı Kişilerde Korelasyonlar

Tablo 20’de sağlıklı kişilerde *in vivo* ve *in vitro* LDL oksidasyonu parametrelerinin birbirleri ile, serum ve izole lipid parametreleri ile antioksidan enzimler ve akut faz reaktanları ile korelasyonları verilmiştir. oLAb; oLDL-TBARS, fibrinojen, ve CRP seviyeleri ile anlamlı pozitif korelasyon, pSOD ile ise negatif korelasyon gösterdi. Dien konjugasyonu takibi parametreleri; LDL oksidasyon direncini ifade eden t-lag; t-maks ile pozitif, VLDL-TG, LDL-TG ve LHP ile negatif, DKH; MDK ile pozitif, HDL-K ve eGSH-Px ile negatif, MDK; DKH’na ilaveten LDL-K, fibrinojen ve CRP ile pozitif, HDL-K ve eGSH-Px ile negatif ve t-maks; t-lag, Apo AI ve HDL-TK ile pozitif, LDL-TG ile negatif korelasyon verdi. Ayrıca oLDL-TBARS, LDL-TBARS ile pozitif, Apo AI ile negatif korelasyon gösterdi.

Tablo 21’de serum lipid ve izole lipid parametrelerinin birbirleri, lipid peroksidasyonu ürünleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanları ile anlamlı ilişkileri verilmiştir. TK; LDL-K, apo B, LDL-TK, eTBARS, fibrinojen ve CRP ile pozitif, HDL-K, ve pSOD ile negatif korelasyon, TG; LDL-K, apo B, eTBARS, ile pozitif, HDL-TK ile negatif, TG; Apo B, eTBARS ve PMN-lökosit ile pozitif, HDL-K; Apo AI ve LDL-TG ile pozitif, LDL-K ile negatif, LDL-K; Apo B, LDL-TK, ve TBARS ile pozitif, HDL-TK ile negatif, Apo AI; eTBARS ile pozitif ve Apo B; eTBARS ve LDL-TK ile pozitif, HDL-TK ile ise negatif korelasyonlar verdi.

Tablo 22’de lipid peroksidasyonu göstergeleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanlarının birbirleri ile korelasyonları verilmiştir. pLHP; seruloplazmin ile pozitif, eSOD; pSOD ile pozitif eTBARS ile negatif, ve seruloplazmin; fibrinojen ile negatif korelasyon gösterdi.

Sağlıklı kişilerde elde edilen korelasyon grafikleri, Şekil 30 ile Şekil 37 arasında gösterilmektedir.

Tablo 20. Sağlıklı kişilerde *in vivo* ve *in vitro* LDL oksidasyonu parametrelerinin birbirleriyle, serum lipid ve izole lipoprotein parametreleri ile, lipid peroksidasyonu (LP) göstergeleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanları ile korelasyonu.

		Serum		LDL oksidasyonu parametreleri						
		oLAb	A°	t-lag	DKH	MDK	t-maks	LDL TBARS	oLDL TBARS	
LDL oksidasyonu	A°	-								
	t-lag	-	-							
	DKH	-	-	-						
	MDK	-	-	-	0,85**					
	t-maks	-	-	0,66**	-	-				
	LDL-TBARS	-	-	-	-	-	-			
	oLDL-TBARS	0,35*	-	-	-	-	-	0,83**		
	TK	-	-	-	-	-	-	-	-	
Serum lipid parametreleri	TG	-	-	-	-	-	-	-	-	
	HDL-K	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LDL-K	-	-	-	-	0,39*	-	-	-	
	Apo AI	-	-	-	-	-	0,36*	-	-0,41*	
	Apo B	-	-	-	-	-	-	-	-	
İzole lipoprotein lipitleri	VLDL-TK	-	-	-	-	-	-	-	-	
	VLDL-TG	-	-	-0,38*	-	-	-	-	-	
	LDL-TK	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LDL-TG	-	-	-0,65**	-	-	-0,33*	-	-	
	HDL-TK	-	-	-	-0,46**	-0,46**	0,41*	-	-	
LP	HDL-TG	-	-	-	-	-	-	-	-	
	LHP	-	-	-0,37*	-	-	-	-	-	
	eTBARS	-	-	-	-	-	-	-	-	
	eSOD	-	-	-	-	-	-	-	-	
	eKat	-	-	-	-	-	-	-	-	
Antioksidan enzimler	eGSH-Px	-	-	-	-0,38*	-0,38*	-	-	-	
	eGR	-	-	-	-	-	-	-	-	
	pSOD	-0,64**	-	-	-	-	-	-	-	
	pGSH-Px	-	-	-	-	-	-	-	-	
	pGR	-	-	-	-	-	-	-	-	
Akut faz reaktanları	Seruloplazmin	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Fibrinojen	0,36*	-	-	-	0,35*	-	-	-	
	CRP	0,34*	-	-	-	0,35*	-	-	-	
	ESH	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PMN-Lökosit	-	-	-	-	-	-	-	-	

* p<0,05

** p<0,01

Tablo 21. Sağlıklı kişilerde serum lipid ve izole lipid parametrelerinin birbirleri ile, lipid peroksidasyonu (LP) göstergeleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanları ile korelasyonları.

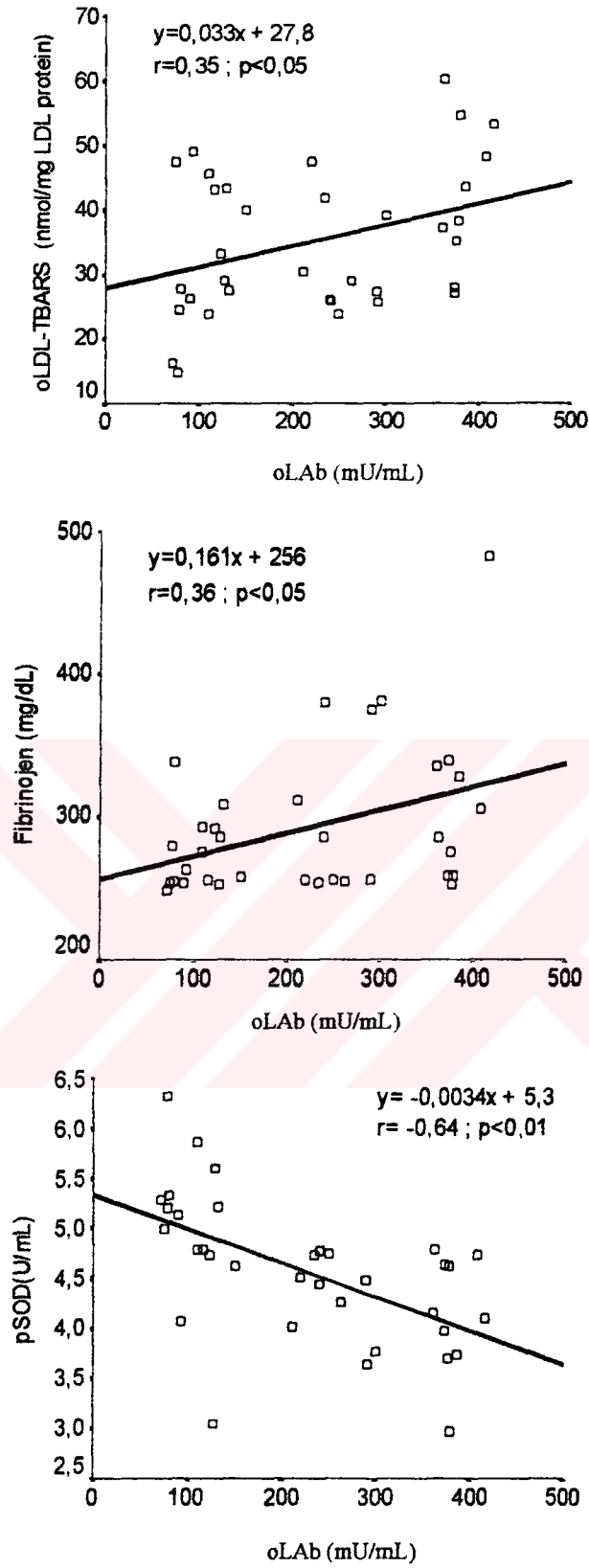
	Serum lipid parametreleri					İzole lipid parametreleri				
	TK	TG	HDL-K	LDL-K	Apo AI	Apo B	VLDL-TK	VLDL-TG	LDL-TK	HDL-TK
Serum lipid parametreleri										
TG	-	-								
HDL-K	-	-	-0,38*							
LDL-K	0,79**	-	0,56**							
Apo AI	-	-								
Apo B	0,72**	0,53**		0,67**	-					
VLDL-TK	-	-				-				
VLDL-TG	-	-								
LDL-TK	0,56**	-		0,46**		0,37*	0,57**			
LDL-TG	-	-								
HDL-TK	-0,56**	-		-0,51**		-0,44**			-0,42*	
HDL-TG	-	-	0,34*							
LP										
LPH	-	-								
eTBARS	0,48**	0,38*		0,40*	-0,35*	0,48**				
eSOD	-	-							-0,34*	
eKat	-	-								
eGSH-Px	-	-								
eGR	-	-								
pSOD	-	-								
pGSH-Px	-	-								
pGR	-	-								
Seruloplazmin	-	-								
Fibrinojen	-	-								
CRP	-	-								
ESH	-	-								
PMN-Lökosit	-	0,38*								
		**								
		* p<0,05								
		** p<0,01								

Tablo 21. Sağlıklı kişilerde, lipid peroksidasyonu (LP) göstergeleri, antioksidan enzimler ve akut faz reaktanlarının birbirleri ile korelasyonları.

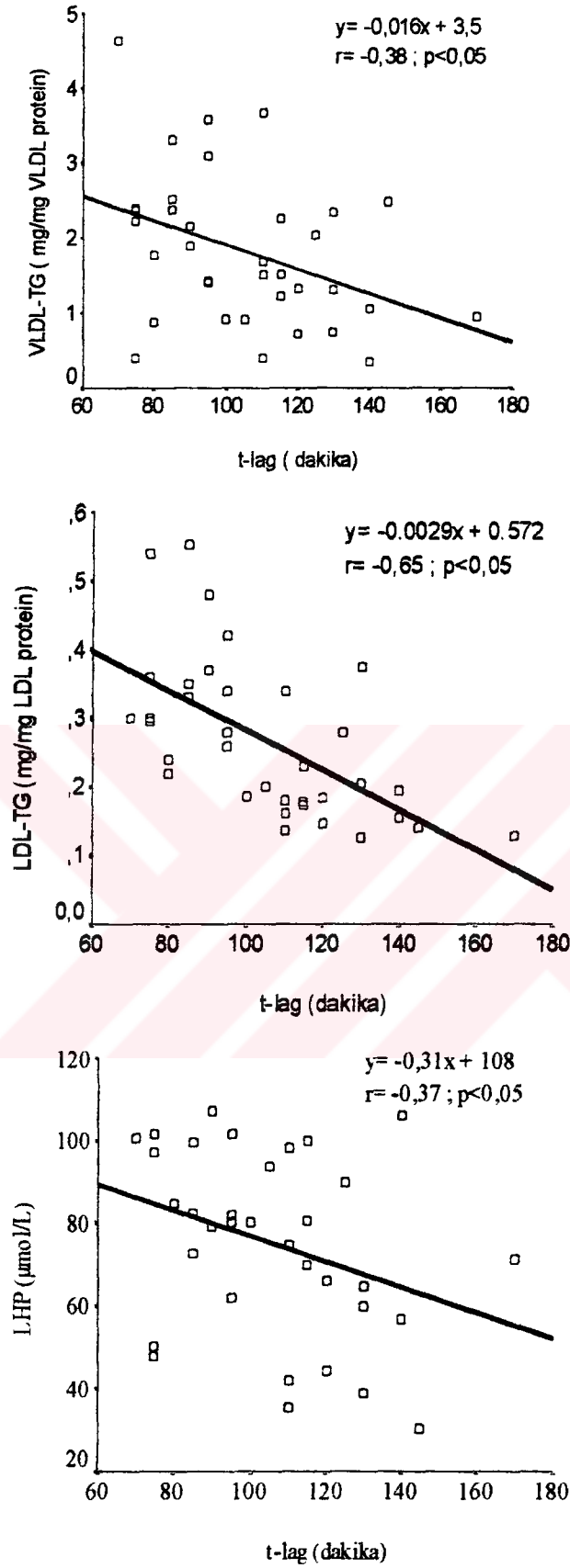
LP		Antioksidan enzimler						Akut faz reaktanları					
LP	eTBARS	LHP	eSOD	eKat	eGSH-Px	eGR	pSOD	pGSH-Px	pGR	Seruloplazmin	Fibrinojen	CRP	ESH
Antioksidan enzimler	eSOD	-	-0,40*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	eKat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	eGSH-Px	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	eGR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	pSOD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	pGSH-Px	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Akut faz reaktanları	pGR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Seruloplazmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fibrinojen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ESH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* p<0,05

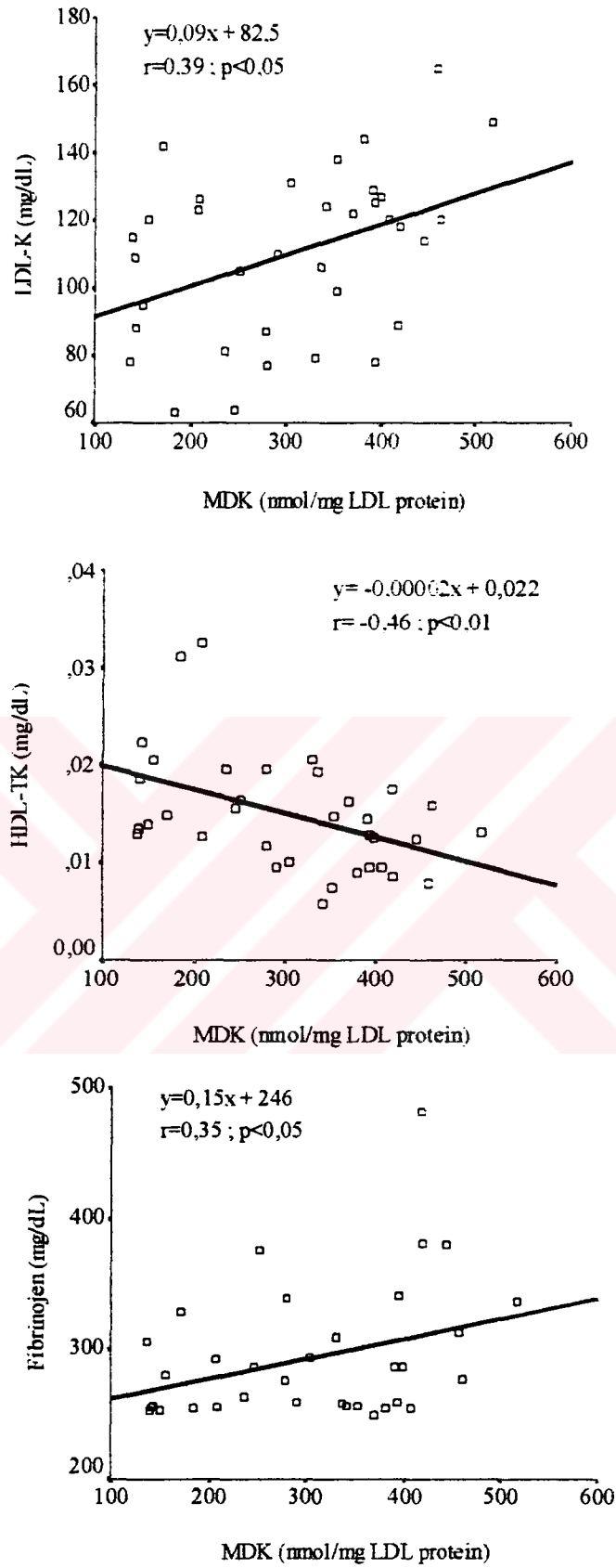
** p<0,01



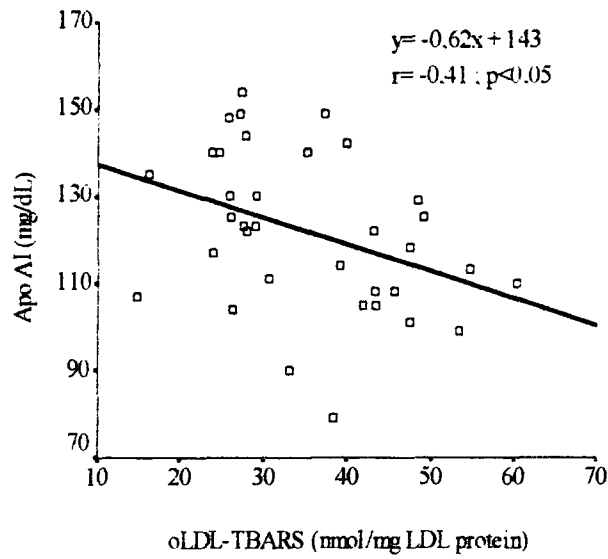
Şekil 30. Sağlıklı kişilerde oLAb ile oLDL-TBARS, pSOD ve fibrinojen arasındaki korelasyon grafikleri.



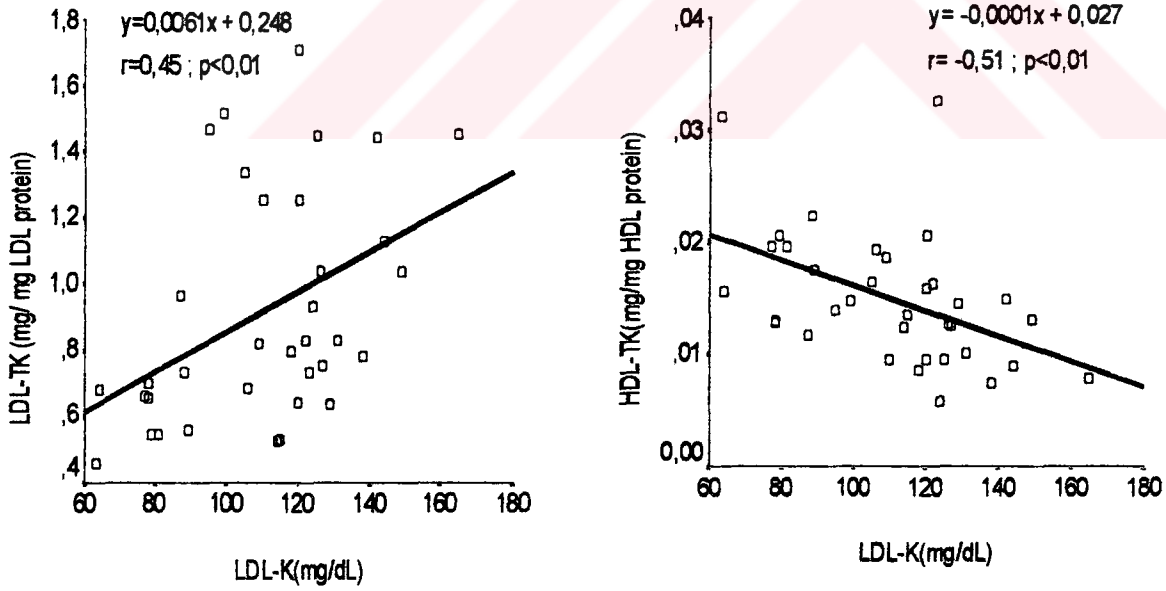
Şekil 31. Sağlıklı kişilerde t-lag ile VLDL-TG, LDL-TG ve LHP arasındaki korelasyon grafikleri.



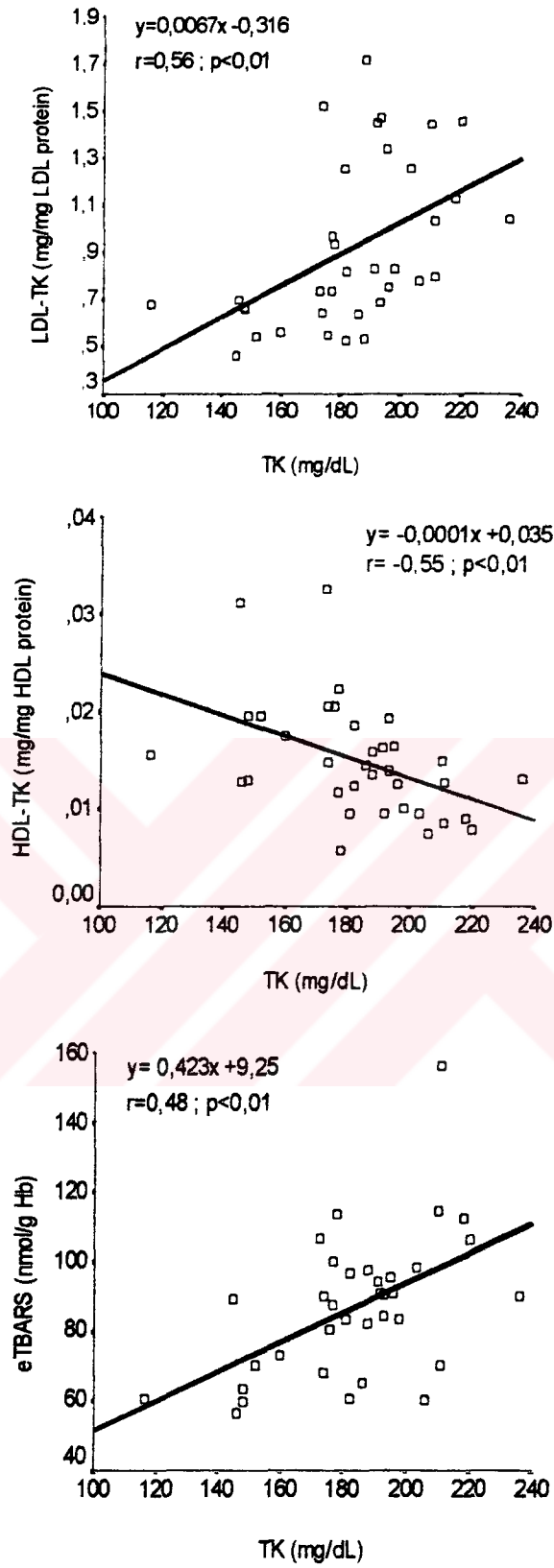
Şekil 32. Sağlıklı kişilerde MDK ile LDL-K, HDL-TK ve fibrinojen arasındaki korelasyon grafikleri.



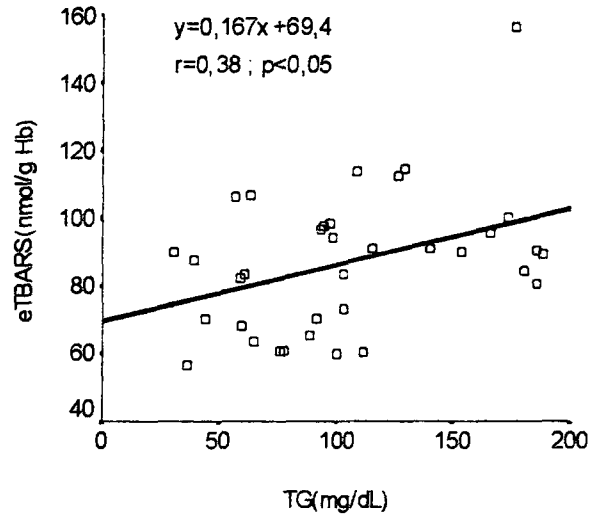
Şekil 33. Sağlıklı kişilerde oLDL-TBARS ile Apo AI arasındaki korelasyon grafiği.



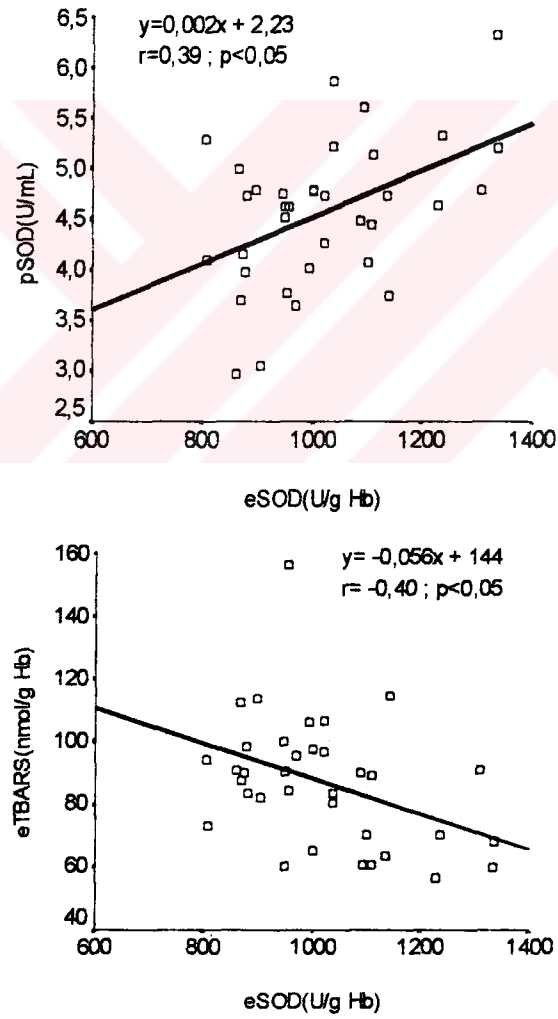
Şekil 34. Sağlıklı kişilerde LDL-K ile LDL-TK ve HDL-TK arasındaki korelasyon grafikleri.



Şekil 35. Sağlıklı kişilerde TK ile LDL-TK, HDL-TK, eTBARS arasındaki korelasyon grafikleri.



Şekil 36. Sağlıklı kişilerde TG ile eTBARS arasındaki korelasyon grafikleri.



Şekil 37. Sağlıklı kişilerde eSOD ile pSOD ve eTBARS arasındaki korelasyon grafikleri.

5.TARTIşMA

5.1. Metotların Tartışması

5.1.1. Numune Toplanması ve Ön İşlemler

Dermatoloji Anabilim Dalı tarafından klinik teşhisi gerçekleştirilen psöriasis hastaları ve gönüllü sağlıklı kişilerin bir gecelik açlık kanları hemen işleme tabi tutuldu. PMN-lökosit sayımı, ESH, rutin biyokimya ve spesifik proteinleri aynı gün içinde günlük kalite kontrolleri takiben değerlendirildi. Rutin biyokimya ve spesifik proteinler için gelen kanlar analiz edilmeden önce serumları elde edilmek amacıyla 3000 rpm'de 15 dk santrifüj işlemi uygulandı. Serumun bir kısmı oLAB için -80°C'de saklandı.

Antioksidanların tayini için alınan EDTA'lı kanlar yine 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek plazmaları elde edildi. Eritrosit paketlerini elde etmek amacıyla plazmaları alındıktan sonra kalan eritrositler üç kez PBS ile yıkandı. Plazma ve eritrositler -80°C'de saklandı. Eritrositlerin çalışma öncesinde seyreltilerek saklanması enzim aktivitelerinde düşüşe yol açmaktadır (97). Bu nedenle eritrositler paket halinde saklandı. Burada elde edilen plazma ve eritrositlerde SOD, Kat, GSH-Px, GR aktiviteleri bakıldı. Ayrıca eritrositlerde TBARS ve plazmada lipid hidroperoksitler de tayin edildi.

LDL oksidasyonu-dien konjugasyonu takibi için EDTA'lı tüplere kan alındı. Bu kanlar plazmaları elde edilmek amacıyla 4000 rpm (1500 g)'de ve 4°C 15 dk santrifüj edildi (108). Bu plazmalar aynı gün LDL izolasyonunda kullanıldı. Princen ve ark. (109), sıvı azot altında saklanan plazmadan elde edilen LDL ile aynı numunenin taze plazmasından elde edilen LDL karşılaştırıldığında t-lag ve DKH'ında, ve -80 °C'de 18 aya kadar saklanan plazmanın bu parametrelerinde de anlamlı farklılıklar

bulunamadığını bildirmişlerdir. Simons ve ark. (40) ise plazmayı 1 mg/mL EDTA ve 20 µM BHT ilave ederek -70 °C'de saklamışlardır.

5.1.2. LDL İzolasyonu ve Oksidasyonu Yöntemleri

Lipoproteinleri; ultrasantrifüjasyonla, çeşitli çöktürme yöntemleriyle, kromatografi ile ve elektroforez ile ayırmak mümkündür. Bu çalışmada ultrasantrifüjasyonla lipoproteinler elde edilmeye çalışıldı.

Lipoproteinler, bileşimleri nedeniyle farklı yoğunluklarda bulunurlar. Şilomikronlar <0,940, VLDL 0,940-1,006, IDL 1,006-1,019, LDL 1,019-1,063 ve HDL ise 1,063-1,21 g/mL arasında yoğunluklara sahiptirler. Bu yoğunluklar göz önüne alınarak ultrasantrifüjasyon yöntemiyle lipoproteinleri ayırmanın mümkün olduğu bildirilmektedir. Ultrasantrifüjasyonda amaç sadece lipoproteinleri teker teker elde etmek değil, aynı zamanda plazma proteinlerini de çöktürmektir (110). Bu çökme bizim tarafımızdanda gözlemlendi. Ancak ultrasantrifüjasyon esnasında da fosfolipid hidroperoksitler meydana gelebildiği ve doğal LDL'de 5000 mol peroksit/mol LDL bulunduğu tespit edilmiştir (111).

LDL izolasyonunda en yaygın kullanılan metot ardışık ultrasantrifüjasyondur. Bu işlemde lipoproteinler her biri ayrı ayrı santrifüjleme işleminin ardından farklı yoğunluklar oluşturularak elde edilmektedir (110). Klasik preparatif ultrasantrifüjasyon zaman alıcı ve pahalıdır. Ayrıca, 18-24 saatlik ayırımında aktarma esnasında lipoproteinlerin yüzeyindeki apolipoproteinlerde kayıp meydana gelmektedir. Buna ilaveten mikrobiyolojik lipoprotein parçalanması ve lipoprotein peroksidasyonu da söz konusudur (112). Leonhardt ve ark. (113), preparatif ultrasantrifüjasyonla lipoproteinleri ayırmışlar ve rotor hızının lipoproteinler üzerine etkisini belirlemek amacıyla 120, 90, 60 ve 30x 10³ rpm'de sırasıyla 100 dk , 3 saat, 6,7 saat ve 27 saat'lık ultrasantrifüjasyon işlemini uygulamışlardır. Rotor hızının artışıyla VLDL-kolesterolün arttığını, VLDL-trigliserid ve LDL-kolesterolün ise düştüğünü gözlemişlerdir. LDL- ve HDL-trigliserid ve HDL-kolesterol düzeylerinde ise anlamlı farklılıklar bulamamışlardır. Çok hızlı ultrasantrifüjasyonun albüminin VLDL ve LDL'den tamamiyle uzaklaştırılmasında etkili olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca bu tip kısa süreli ayırımlarda askorbat, ürat ve muhtemelen albümin gibi safsızlıklar tespit edilmiştir (107). Tong ve ark. (114), meydana gelebilecek oksidasyonu azaltmak için lipoproteinleri 4 °C'de kısa süreli ayırma işlemini yapmışlar ve bu şekilde ayrılan

LDL'de kolesterol seviyesinin, uzun süreli ve 20 °C'de yapılan izolasyona göre daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir.

Dansite gradient ultrasantrifügasyonu son zamanlarda gittikçe önem kazanmaktadır. Tek bir izolasyon işlemi ile VLDL, LDL ve HDL'yi elde etmek mümkündür. Ancak gradient oluşturmak, çok iyi teknik gerektirmektedir. Gradient oluşturmada daha çok NaCl, KBr ve NaBr gibi tuz çözeltileri kullanılmaktadır. Çalışmaya başlamadan önce gradientleri doğru oluşturabilmek için kullanılan katı tuzların kurutulması gerekmektedir (110). Bu çalışmada, Scalavons ve ark.'ının (102) geliştirdiği kesikli (diskontinyus) dansite gradienti ile ultrasantrifügasyon uygulandı. Çalışmalarında plazmanın yoğunluğunu katı KBr ile 1,30 g/mL'ye getirip üzerine 1,24 g/mL, 1,063 g/mL, 1,019 g/mL ve 1,006 g/mL'lik tuz çözeltileri ve su ilave ederek iki farklı gradientle tabakalandırmışlardır. I. Gradientte tabakalandırma sırasına göre 5:3:3:3:4:0,5 oranları, II. gradientte ise 5:4:4:3:2:0,5 oranları kullanılmış ve 313 500 x g'de 7°C'de 80 dk'lık ayırım yapmışlardır. I. Gradientin VLDL ve LDL, II. gradientin ise HDL izolasyonunda iyi sonuç verdiğini belirtilmiştir. Bu iki gradient bizim tarafımızdan da denendi ve I. gradientte LDL'nin VLDL'den daha iyi ayrıldığı görüldü. Amaç LDL izolasyonu olduğu için bu gradientle lipoproteinlerin ayırımı yapıldı. Santrifüjle ayırmaya rotor hızının, sıcaklığın ve zamanın etkisi vardır. Rotor hızı, zamanla ters orantılıdır. Tüm bunlar göz önüne alınarak bu çalışmada 50 000 rpm'de ve 4 °C'de 3 saatlik izolasyon gerçekleştirildi. Gradient oluşturmada kullanılan çözeltiler, yoğunluk oluşturunca olarak NaBr, lipoproteinleri oksidasyondan korumak amacıyla EDTA ve NaN₃ ihtiva etmekteydi. Bu çözeltilerin yoğunlukları dansitometre ile kontrol edildi.

Oksidasyona başlamadan önce EDTA gibi oksidasyonu önleyici ve LDL harici bileşikler uzaklaştırmak için, çeşitli uygulamalarda diyaliz yöntemleri rapor edilmiştir. Princen ve ark. (109), izolasyon ve oksidasyon arasındaki süreyi kısaltmak amacıyla diyaliz işlemi yapmamış ancak LDL, EDTA ihtiva ettiği için oksidasyonda yüksek bakır konsantrasyonu kullanmışlardır. Bruce ve ark. (115), kloronfenikol ve EDTA ihtiva eden PBS ile diyaliz etmişler ve ardında da jel filtrasyonundan geçirmişlerdir. Valkonen ve ark. (116), oksidasyondan önce, LDL'yi dekstran sülfat afinite kolomundan geçirerek EDTA'yı uzaklaştırmışlardır. Napoli ve ark. (67), 4 mM EDTA ve 8 µM BHT ihtiva eden PBS'ye karşı oksijensiz azot altında diyaliz işlemini uygulamışlardır. Esterbauer ve ark. (39), 1 mg/mL EDTA ihtiva eden plazmaya 20 µM BHT ilave etmişler ve izolasyondan sonrada LDL'yi 0,16 M NaCl ve 0,1 mg/mL kloramfenikol ihtiva eden

vakumla gazı uzaklaştırılmış 0,01 M fosfat tamponunu (pH 7,4) kullanarak +4 °C'de 48 saat süreyle diyaliz etmişlerdir. Jun-Jun ve ark. (117), LDL'yi önce 1 mg/mL EDTA ve 0,1 mg/mL NaN₃ ihtiva eden PBS'de diyaliz, ardından 0,45 µm selüloz filtresinde sterilizasyon yaparak azot gazında, karanlıkta ve 4°C'de saklamışlar ve kullanmadan hemen önce yine karanlıkta ve 4°C'de EDTAsız PBS'ye karşı 48 saat süreyle diyaliz işlemini yapmışlardır. Bizim laboratuvar şartlarımız göz önüne alınarak, LDL'ler, 12 saat EDTA'lı ve ardından 12 saat EDTA'sız PBS ile karanlıkta ve +4 °C'de diyalize tabi tutuldu. İlk 12 saatte düşük konsantrasyonda EDTA kullanılmasının nedeni uzun süren diyaliz işleminde meydana gelebilecek oksidasyonu azaltmaktır.

Diyaliz işlemini takiben izolasyonun ne ölçüde yapılabildiğini belirleyebilmek amacıyla izole lipoproteinlerde TK, TG, HDL-K, LDL-K, Apo AI ve Apo B seviyeleri tespit edildi. VLDL'nin TG'ce, LDL'nin TK ve Apo B'ce, HDL'nin ise Apo AI'ce yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 7). Bunlara ilaveten VLDL'nin pre β, LDL'nin β ve HDL'nin ise α bölgesine tek bant halinde göç etmesi (Şekil 15), izolasyonun doğru bir şekilde yapılabildiğini bize düşündürmektedir.

LDL oksidasyonuna geçmeden önce protein konsantrasyonuna göre bakır konsantrasyonu ayarlanacağı için Lowry metodu ile protein tayini yapıldı (105).

In vitro LDL oksidasyonunda en yaygın kullanılan oksidan Cu⁺² iyonlarıdır. Cu⁺² ile uyarılmış LDL oksidasyonu esnasında dış fosfolipid tabakasına ilaveten lipoprotein hidrofobik lipid merkezinde de hidroperoksitler meydana gelebilir (111). LDL'nin bakır bağımlı oksidasyonu, süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinden bağımsızdır. Süperoksit dismutaz ve katalaz, Cu⁺²'nin LDL ile indirgenmesi inhibe etmez. Bakırın LDL oksidasyonunu başlatabilmesi için Cu⁺²'nin Cu⁺¹'e indirgenmiş olması gerekiyor. Cu⁺² 'yi indirgeyen faktörlerin α-tokoferol ve hidroperoksitler olduğu ileri sürülmektedir (59,106). LDL'de önceden oluşmuş lipid hidroperoksitlere rastlanmaktadır. Ancak, lipoproteinde oksidasyon, lipid hidroperoksitler olmaksızın da meydana gelebilmektedir. α-tokoferol, antioksidan olmaktan ziyade LDL'de lipid peroksidasyonunu başlatıcı bir prooksidan olarak etki gösterebilir. Cu⁺² ile α-tokoferolün direkt etkileşmesi sonucu Cu⁺¹ oluşturması ile lipid peroksidasyonun başladığı ve lipid hidroperoksit varlığında bu Cu⁺¹, lipid alkoksil radikali oluşturarak lipid peroksidasyonunun devam ettiği ifade edilmiştir (59). Bakır LDL'ye bağlı halde iken ortamda serbest bakır olmadığı durumlarda bile LDL peroksidasyonunu başlatabilmektedir. Doğal LDL ile karşılaştırılınca α-tokoferol (TOH) ile zenginleştirilmiş LDL, F-10 ortamı ile başlatılmış oksidasyona daha

duyarlıdır. α -tokoferol'ün Cu^{+2} 'yi indirgemesiyle meydana gelen Cu^+ , Cu^{+2} 'den daha güçlü oksidandır. Bu indirgenme esnasında meydana gelen $\alpha\text{-TO}^\bullet$ (tokoferol radikali) hidrofobik olduğundan LDL'den uzaklaşamaz. Diğer antioksidanların bulunmadığı ya da yetersiz bulunduğu durumlarda LDL oksidasyonu etkinleşir (118).

Bakır, *in vitro* LDL oksidasyonuna daha aktif katılırken demirle LDL oksidasyonu bir çok biyolojik faktöre ihtiyaç duyduğundan daha çok *in vivo* olarak gerçekleşmektedir. Cu^{+2} , kendi başına LDL'yi oksitleyebilme özelliğine sahipken, demir bağımlı LDL oksidasyonu fizyolojik tiyol bileşiklerine ve süperoksidin varlığına ihtiyaç duyar. Ekstraselüler sistein ya da diğer sülfidril bileşikleri, redoksça aktif metal iyonları ihtiva eden ortamda LDL'nin hücre aracılıklı oksidasyonu için esansiyeldir. Apo B'nin yapısındaki serbest sülfidril grupları, bakır-bağımlı LDL oksidasyonunda önemli bir faktör değil iken demir bağımlı oksidasyonda önemli bir faktördür (59). Ayrıca LDL, demir bileşiklerinin aksine bakır ve hemine maruz kaldıklarında makrofajlarca kabul edilebilen LDL halini almaktadır (119). Deneysel ortamlarda LDL, Cu^{+2} 'yi Cu^+ 'e indirger ancak Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyemez (59).

Hücrelerle ve bakırla LDL oksidasyonu Tablo 23'de özetlenmiştir. Bakırla okside edilmiş LDL, hücrelerle okside olmuş LDL'ye birçok bakımdan benzemesine rağmen, süperoksit dismutaz ve bazı lipooksigenazlarla inhibisyona hassasiyetleri bakımından farklılık göstermektedir (120).

Tablo 23. Hücrelerle LDL oksidasyonunun bakırla LDL oksidasyonu ile karşılaştırılması (120).

Hücrelerle	Bakırla
1. nM konsantrasyonda bakır gereklidir.	1. μM konsantrasyonda bakır gereklidir
2. SOD ile sınırlı inhibisyon.	2. SOD ile oldukça etkili inhibisyon.
3. Eikosatetraenoik asit ile inhibisyona uğrar.	3. Eikosatetraenoik asit inhibisyon etkisi göstermez.
4. Yavaş oksidasyon gösterir.	4. Hızlı oksidasyon gösterir.
5. Nispeten düşük seviyede TBARS	5. Nispeten yüksek seviyede TBARS

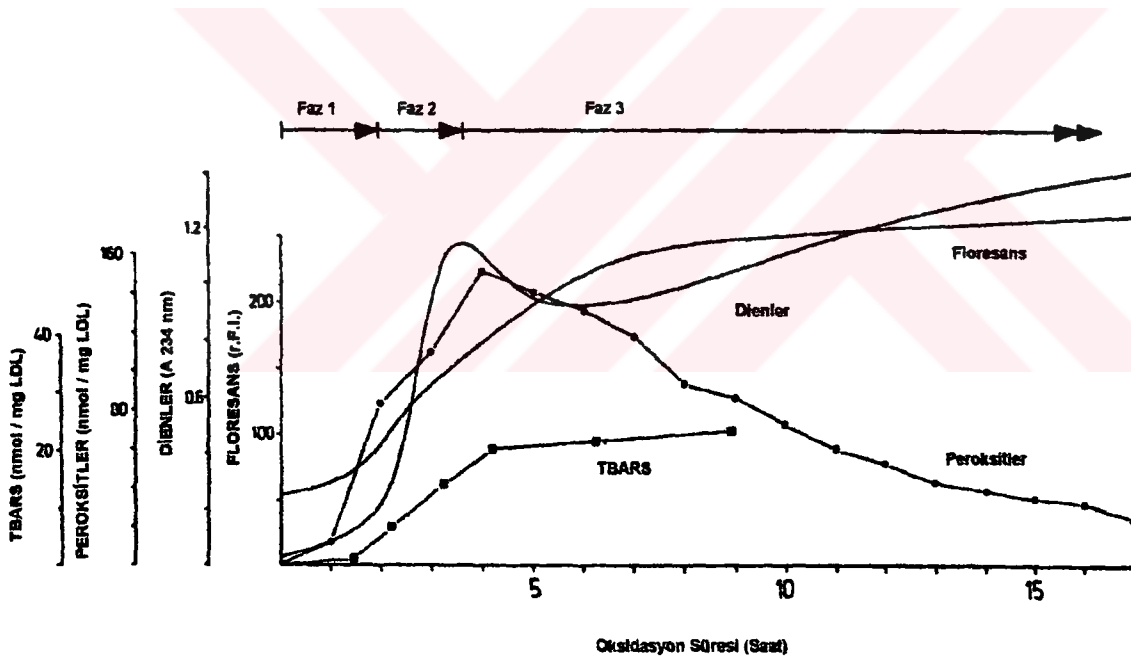
Tablo 24. *In vitro* LDL oksidasyonu tayin yöntemleri (107).

Ölçüm	metot
<i>Takibi gerektirenler</i>	
Floresans	Florometre ile ölçülür. 430 nm'deki floresans Apo B'de bulunan florofofor nedeniyle oksidasyonla artar. Zamana karşı floresansla gecikme ve ilerleme fazları takip edilir. Rutin analize uygundur. İyi sonuç verir.
Konjuge dienler	UV spektrofotometresi ile ölçülür. Oksidasyon esnasında PUFA'lar konjuge çift bağlı yağ asidi hidroperoksitlerine dönüşür. 234 nm de zamana karşı absorbans takip edilerek gecikme fazı, ilerleme hızı ve maksimum dien miktarı belirlenir. Rutin analize uygundur. İyi sonuç verir.
Oksijen alınımı	Oksijen elektrodu ile ölçülür. Gecikme ve ilerleme fazları takip edilir. Fazla miktarda LDL gerektirir (0,5-1,0 mg/mL).
<i>Takibi gerektirmeyenler</i>	
Akışkanlık	Floresans polarizasyonu ile ölçülür. Cu^{+2} ile okside LDL de akışkanlık, doymamış kolesterol esterlerinin kaybı sonucu azalır.
Aldehitler	TLC/HPLC ya da GC ile ölçülür. 4-HNE ve hegzanal, önemli aldehitlerdir.
Antioksidanlar	HPLC ile ölçülür. Vit E, karotenoidler ve ubikinol 10, gecikme fazı esnasında kaybolur.
Amino asitler	Trinitrobenzensülfonik asit ile kolorimetrik ölçülür. Lizinin ϵ -amino grupları aldehitlere bağlanır.
Apo B yapısı	Döngüsel dikroizm ile ölçülür. Cu^{+2} ile oksidasyon esnasında β -yapısı azalır, heliks yapısı ise değişmez.
Apo B yıkımı	SDS elektroforezi ile belirlenir. Apo B (500 kDa), ilerleme fazı esnasında birçok küçük parçalara ayrılır.
Bazal dien konjugasyonu	Lipidler, kloroform-metanol ile ekstrakte edilir. Azot altında kurutulduktan sonra sikloheksanda çözülüp 234 nm'de 300 nm referans alınarak spektrofotometrik ölçüm yapılır. Dolaşımdaki oLDL direkt ölçülebilmektedir. Metot basittir, hızlı ve iyi sonuç vermektedir. Ayrıca kliniğe de uygulanabilmektedir (121).

F ₂ -izoprostanlar	Araşidonik asidin non-enzimatik peroksidasyon ürünü olan F ₂ -izoprostanlar, spesifik ve kararlı ürünler olmaları, seviyeleri dietlipidi muhtevassından etkilenmemeleri, tüm biyolojik sıvılarda ve dokularda tayin edilebilir miktarlarda bulunmaları ve ng seviyelerinde bile tespit edilebilmeleri son zamanlarda <i>in vivo</i> lipid peroksidasyonun en iyi göstergelerinden biri olarak kullanılmalarını yaygınlaştırmıştır. GC ve ELISA ile ölçülebilmektedir (122).
Hidroksi ve hidroperoksi PUFA'lar	GC/MS ile ölçülür. Hidroperoksi PUFA'lar, hidroksi yağ asitlerine dönüştürülerek direk olmayan yolla ölçülür.
Lipid-protein etkileşimi	ESR ya da NMR ile ölçülür. Spin işaretlemelerle fosfolipidlerin hareketliliğinin okside LDL'deki azalışı belirlenir. NMR verileri ile, Apo B bağlı Cu ⁺² 'nin paramagnetik etkisini ifade etmek zordur.
Lipid hidroperoksitler	Kemilüminesanslı HPLC ile ölçülür. Oldukça özgül ve hassastır. Kolesterol ester-OOH (CE-OOH) ve fosfolipid-OOH (PL-OOH) düzeyleri belirlenir.
Lipid peroksitler	Kolorimetrik-iyodometrik ölçülür. Peroksitler ilerleme fazında artar, ayrışma fazında ise düşer. Lüminometre ile foton emisyon sayımı yapılır.
Lizofosfatidler	TLC ile ölçülür. Fosfolipaz A ₂ aktivitesine bağlı artış olur.
Okside kolesterol	GC/MS ile ölçülür. Serbest ve esterleşmiş kolesterolü ayırmaz.
Poliansature yağ asitleri	GC ile ölçülür. Cu ⁺² ile 24 saat oksidasyondan sonra pek çok PUFA (22:6, 20:4, 18:2) kaybolur.
Serbest radikaller	ESR ile ölçülür. Tokoferoksil radikallerin üretimi sinyal olarak iletilir.
TBARS	Fotometrik ya da florometrik olarak belirlenir. Sıklıkla kullanılmaktadır.
Yüzey yükü	Agaroz jel elektroforezi ile takip edilir. LDL'nin net negatif yükü oksidasyon esnasında amino grupları kaybı nedeniyle artar. Dolayısıyla kısmi elektroforetik hareketlilik artar.

MDA ile 4-HNE, Apo B'nin amino asit kalıntılarına kovalan bağlanarak etkilerini gösterirler. Lizin, histidin veya glisin gibi amino asitlerle etkileşime girerek karbonil türevlerini meydana getirirler. *In vitro* bakırla LDL oksidasyonunda doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile ortaya çıkan MDA ve 4-HNE, Apo B ile etkileşime girerek MDA-lizin, ve 4-HNE-lizin komplekslerini meydana getirirler. Hidrofobik özelliğinden dolayı MDA, oLDL'yi 4-HNE'a göre elektroforezde daha uzağa difüze eder. HOCL ile oksidasyon, *in vivo* LDL oksidasyonunda önemli bir mekanizmadır (51,52,123).

Lipid peroksidasyonunu ve dolayısıyla da LDL oksidasyonunu ölçmek için pek çok değişik yöntem mevcuttur. Bu yöntemler Tablo 24'de özetlenmiştir. Bunlar arasında en eski ve en çok kullanılanı TBARS testidir. Ancak bu test son zamanlarda yerini lipid hidroperoksitler, F_2 -prostanoidler gibi daha spesifik yöntemlere bırakmıştır (122).



Şekil 38. Cu²⁺ ile uyarılmış LDL oksidasyonu mekanizması (0,05 mg LDL protein/mL) (60). TBARS'da, lipid hidroperoksitlerde, 234 nm'de konjuge dijenlerde ve 430 nm'de floresansda artış olur. (r.F.I.) : Rölaf floresans indeksi.

Tablo 25. LDL oksidasyonu fazları esnasında meydana gelen değişiklikler.*Gecikme(lag) fazı*

Minimal düzeyde lipid peroksidasyonu olur.

LDL'nin endojen antioksidanları kaybolur. İlk önce α -tokoferol ve en sonunda ise β -karoten uzaklaşır.

Bu fazın uzunluğu, LDL oksidasyon direncinin objektif endeksidir.

İlerleme (propagation) fazı

Lipid peroksidasyonunun başlangıcından kısa bir süre sonra TBARS ve diğer aldehitlik lipid peroksidasyon ürünlerinin konsantrasyonu yükselmeye başlar.

LDL'de

- 430 nm'de floresansda, 234 nm'de dienlerde
- elektroforetik hareketlilikte kısmen,
- lizofosfolipidlerde ve
- Apo B'nin parçalanmış türevlerinde artış görülür.

Geçiş ürünleri olan lipid hidroperoksitlerin oluşum oranı, dekompozisyon oranlarını geçene kadar konsantrasyonları artar.

Ayrışma (Decomposition) fazı

PUFA'ların çoğu (% 70-80'ı) oksitlendiğinde ayrışma fazı hakim olur ve lipid hidroperoksit konsantrasyonu tekrar düşmeye başlar.

Konjuge dien piki ile çakışan lipid hidroperoksit piki oluşumunu takiben dekompozisyon fazına geçilir.

Lipid hidroperoksitlerin aldehitlere β -kırılma reaksiyonları, ayrışma fazlarının en önemli reaksiyonları olarak görülür.

Lipid hidroperoksitleri ayrıştığında çöpçü reseptörlerce alınabilecek düzeyde değişikliklere uğrarlar.

Bu çalışmada LDL oksidasyon kapasitesini yani oksidasyon direncini belirlemek amacıyla laboratuvar imkanları, rutin analize uygun olması, çalışma süresi, hassasiyeti ve oksidasyon direnci kapasitesinin en iyi göstergesi olması nedenlerinden dolayı 234 nm'de konjuge dien takibi yapıldı. Konjuge dienler, LDL lipidlerinin PUFA zincirlerinin oksidasyonunu sonucu oluşan hidroperoksitlerdir.

Konjuge dien takibi ve dolayısıyla da LDL oksidasyonu üç fazda incelenir (70). Bu fazlar Şekil 38'de, özellikleri ise Tablo 25'de gösterilmiştir. Gecikme fazında (*Faz 1*) antioksidanların kaybı olur ve minimal düzeyde lipid peroksidasyonu meydana gelir. LDL antioksidanlarını kaybedince lipid peroksidasyonu hızı artar ve LDL PUFA'larının % 70-80'ı okside olduğunda lipid peroksit maksimum düzeye ulaşır. Daha sonra, ayrışma reaksiyonu ile LDL'nin lipid peroksit muhtevası düşer. Gecikme ve ilerleme (*Faz 2*) fazları esnasında, TBARS, 430 nm floresans, lipid peroksit, dienler ve REM (nispi elektroforetik hareketlilik) zaman değişimleri birbirine benzemektedir. Ancak peroksit maksimum olduğunda zaman değişimleri farklılık gösterir. Bu da LDL'nin oksidasyona hassasiyetinin gecikme fazı esnasında aynı sonuçları verdiğini göstermektedir. Konjuge dien takibinde ayrışma fazında ikinci artışın nedeni, konjuge lipid hidroperoksit oluşumu değil, ayrışma (*Faz 3*) ürünleridir (107).

In vitro LDL oksidasyonu belirlemek için dien konjugasyonu takibi esnasında hangi bakır konsantrasyonun ve hangi ortamın kullanılacağına karar vermek için literatür bilgileri göz önüne alındı. Çalışmaların çoğunda oksidan olarak CuSO_4 ve CuCl_2 gibi Cu^{+2} bileşikler, protein miktarlarına göre farklı konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Konsantrasyon farklılıkları, izolasyon yöntemlerine ve oksidasyon ortamlarına göre değişmektedir. Literatürlerde, $\mu\text{g/mL}$ LDL protein: μM Cu^{+2} oranları ve oksidasyon sıcaklıkları 300:10, 37°C (124), 300:10,4, 37°C (113), 200:5, 37°C (125), 50:5, 37 °C (126), 50:1,67, 30°C (107), 100:5, 30°C (127) ve 200:1,67, 25°C (128) arasında değişen çalışmalar mevcuttur.

Gieseg ve ark. (129), LDL oksidasyonunun bakır konsantrasyonu ile arttığını, Cu:LDL molar oranının 50:1 olduğunda maksimuma ulaştığını ve LDL başına 10-38 bakır bulunduğunda maksimum lipid peroksidasyon başlangıç hızı elde edildiğini ifade etmişlerdir. Reisky ve ark.(41) bu değeri LDL başına $28 \pm 3,3$ olarak Kuzuya ve ark. (118) ise doygunluk alt sınırını LDL başına 3,2-7,4 Cu iyonu olarak bulmuşlardır. Maksimum bakır konsantrasyonuna ulaşıncaya kadar Cu^{+} oluşumu ile bakır başlangıç konsantrasyonu doğru orantılı olduğu ve Cu^{+2} 'nin LDL'yi indirgeyebilme aktivitesinin,

LDL'nin Cu^{+2} 'yi bağlayabilme yeteneği ile bağlantılı olabileceği ifade edilmiştir (59). Raveh ve ark.'ına (66) göre LDL, 17 tane bakır bağlayabilme özelliğine sahiptir ve LDL bakır iyonları ile doyumluk sınırına ulaştıkça t-lag kısalmakta, DKH ise maksimuma ulaşmaktadır.

Ramos ve ark. (130), LDL'nin erime noktasının $31,1^{\circ}\text{C}$ olduğunu, sıcaklıkla t-lag'ın kısaldığını, DKH'nın arttığını belirtmişlerdir. Buna uygun olarak Schuster ve ark. (131), geçiş sıcaklığının altında MDK'nın azaldığını ve t-lag yükseldiğini bulmuşlardır.

pH'nın da oksidasyona etkisi vardır. Asidik pH'da konjuge dienler, hidroperoksitler ve TBARS artmaktadır. Aldehitler asidik pH'da daha etkili bir şekilde reaksiyona girmektedir. Asidik pH, LDL'nin agregasyonunu etkiler, hücrel alınımini ve lipidlerin ekstraselüler parçalanmasını artırır. Vücuttaki hücrelerin hemen hepsi kapillerin $20\text{-}30\ \mu\text{m}$ 'lık sınırları içerisinde dirler. Ancak aterosklerotik lezyonlardaki hücreler kapillerden çok daha uzaktır. Bu hücreler pKa $3,8$ 'de laktik asit üreterek ATP oluşturmak üzere anaerobik glikolize girerler. Laktik asit, makrofajları çevreleyen ekstraselüler yüzeyi aterosklerotik lezyonlarda daha asidik yapar (132).

Yukarıda belirtilen bilgiler değerlendirilerek uygun bakır konsantrasyonunu belirlemek amacıyla $\mu\text{g/mL}$ LDL protein: μM Cu^{+2} oranları, $300:10$, $300:5$, $200:10$, $200:5$, $100:10$, $100:5$ ve $50:5$ olacak şekilde ön denemeler yapıldı. Yapılan ön denemelerde yüksek oranlarda (özellikle de $50:5$ 'de) yani yüksek bakır konsantrasyonlarında t-lag ya çok kısa ya da hızlı absorbans artışı ile belirlenemeyecek düzeyde idi. Çok düşük bakır konsantrasyonunda ($300:5$), oksidasyon gerçekleşmesine rağmen beklenen dien konjugasyon eğrisi tam elde edilemedi. Yani DKH çok düşüktü ve daha uzun sürede maksimum absorbansa ulaşılabilmişti. Düşük konsantrasyonda bile oksidasyonun gerçekleşmesi, $300:10$ oranının oksidasyonu gözleyebilmek açısından yeterli olması ve literatür bilgileri göz önüne alınarak, $300:10$ oranına karşılık gelen $50:1,67$ oranı ile 37°C ve pH $7,4$ 'de konjuge dien takibine karar verildi. Başlangıçta 5 dk ara ile sürekli takip işlemi yapılyordu. Ancak bilgisayar donanımlı ve sıcaklık ayarlı spektrofotometrenin gelmesi, sürekli başında takip gerektirmediginden ve hassasiyet açısından LDL oksidasyonu direncinin ölçümü için büyük avantaj sağladı. Köre ve numunelere Cu^{+2} ilave edilir edilmez kuvetler alt üst edildi ve hemen oksidasyon başlatıldı. Köre Cu^{+2} ilave edilmesi ile Cu^{+2} nin bizzat kendisinin oksidasyonundan kaynaklanabilecek absorbans artışı yok edilmeye çalışıldı.

LDL konjuge dien takibinin hassasiyetini belirleyebilmek için aynı numune 5 kez çalışıldı. Dien konjugasyonu takibi verilerinde % CV değerleri % 10 sınırlarının altında idi (Tablo 8) ve grafikler birbirleri ile çakışmakta idi (Şekil 14).

5.1.3. oLAb Tayini

In vivo LDL oksidasyonunun belirlenebilmesi için son zamanlarda immünolojik testlerle LDL antikoru tayini geliştirilmiştir (82). Bu testte oLDL'deki epitopa karşı otoantikolar tayin edilmektedir. Bakırla okside LDL'de çeşitli epitoplar bulunmaktadır. Ancak bakırla oLDL'deki okside epitopların yoğunluğu, MDA-LDL ve 4-HNE-LDL'dekinden düşüktür (76).

Okside LDL antikor kiti henüz standardize edilmemiş olmasına rağmen literatürde iki farklı kit (Gull-BIODESIGN ve BIOMEDICA) mevcuttur. Kitin ülkemiz şartlarındaki temin kolaylığına bakılarak çalışmamızda BIOMEDICA firmasının kiti seçildi. Kit kontrolleri ile yapılan çalışmada metodun % CV'si uygun sınırlar içerisinde tespit edildi (Tablo 6).

5.1.4. Lipid Peroksidasyonu Ürünlerinin Tayini

Lipid peroksidasyonun düzeyini belirlemede doku, plazma, ve hücrelerde MDA tayini başta olmak üzere dien konjugatları, aldehitler, lipid peroksidler, etan, pentan gibi hidrokarbon gazlarının miktarı ölçülebilmesine rağmen bu ölçümlerin bir tanesi ile lipid peroksidasyonunun derecesi tam olarak değerlendirmek mümkün değildir. Çünkü çeşitli antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu farklı basamaklarda inhibe etmektedirler (133).

PUFA'larda oksidasyon sonucu asidik ortamlarda serbest malondialdehite dönen ürünler meydana gelir. Lipid peroksidasyonunun belirleyici olan malondialdehidin ve ön bileşiklerinin belirlenmesi için çok sayıda metot geliştirilmiştir. Bunlar içinde en yaygın olanı TBA testidir. Metodun prensibi 3.2.3.2.2'de verilmiştir. Bu testle 2 molekül TBA ve 1 molekül MDA oluşmaktadır. Bu metodun dezavantajı, lipid peroksidasyonu ile ilgili bir çok bileşiğin TBA ile reaksiyona girebilmesi ve kromojen vermesidir. TBA testinde ölçülen MDA'nın büyük bir kısmının uçucu olmayan ve PUFA, endoperoksitler ve diğer bileşenlerin asidik ortamda ısıtılmaları sonucu oluşan ürünler olduğu HPLC ile gösterilmiştir (134). Armstrong ve Browne (135), HPLC ile serbest MDA ölçülmesinin zaman alıcı olmasına rağmen kromatografi esnasında

kromoförlerin uzaklaştırılması mümkün olduğu için spesifik olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca özellikle insan kaynaklı örneklerde tiyobarbitürik asitle reaksiyona girebilen ve benzer dalga boyunda absorbanans veren maddelerin varlığı da gösterilmiştir. Numunede bulunan üre, protein, şeker, sialik asit ve aldehitler MDA-TBA reaksiyonunda yanlış sonuç almaya neden olurlar. Çeşitli hayvan çalışmalarına göre plazma MDA'sı tür, ırk, yaş, cinsiyet, beslenme ve stres ile farklılaşmaktadır (134).

Eritrositlerde TBARS tayini Stoks ve Dormandy'nın (100) metodu ile yapıldı. Metotta, NaN_3 katalaz inhibitörü olarak, Na-arsenit ise meydana gelen MDA kromojenini kararlı hale getirmek için kullanıldı (134). Eritrositlerde TBARS miktarları, nmol/g Hb birimi ile ifade edildi. Metodun % CV'si uygun sınırlar içerisinde idi (<% 10).

LDL'de okside olmadan önceki ve sonraki MDA tayini Yagi ve ark.'nın (101) TBA ile tayin metoduna göre yapıldı. Proteinleri çöktürmek için ve asit ortamı sağlamak için TCA kullanıldı. MDA standartları yardımıyla oksidasyon öncesi LDL ve oksidasyon sonrası oLDL-TBARS seviyeleri nmol/mg LDL protein olarak ifade edildi. oLDL-TBARS, LDL-TBARS'a göre ortalama % 789 arttı (Şekil 16). Taze hazırlanmış LDL'de TBARS değerlerinin genellikle düşük (0.5-5 nmol/mg LDL protein) olduğu ve Cu^{+2} ile 24 saatlik oksidasyon sonunda ise 20-100 nmol/mg LDL protein değerine ulaştığı bildirilmiştir (107,116,128). Bu sonuçlar bizim verilerimize uymaktadır. LDL'nin elektroforezde β , oLDL'nin ise α bölgesine göç etmesi (Şekil 15) ve oLDL-TBARS seviyelerinin LDL-TBARS'a göre oldukça yüksek bulunması, LDL oksidasyonu işleminin başarıyla yapılabildiğini bize düşündürmektedir.

Lipid hidroperoksidler nispeten kararlı ürünler olduklarından, lipid peroksidasyon derecesi hakkında bilgi verebilmektedir (99). Ölçümlerinde farklı prensiplere dayanan teknikler kullanılmaktadır. Referans metot, lipid hidroperoksitle iyodür oksidasyonuna dayanmaktadır. Ancak, hassasiyetinin oksijen varlığında düşük olması ve sadece saf lipid çözeltileri gerektirmesi, dezavantaj teşkil etmektedir (135). Plazmada ekstraksiyon sonucu 353 nm'de absorblanan maddeler açığa çıkar ki bu da hidroperoksit miktarının fazla bulunmasına yol açar. Fosfolipidler ise yüksek hidroperoksit miktarı ölçümüne neden olabilmektedir (136). Florometrik metotlarda diklorofloresan, hematin varlığında hidroperoksitlere ya da homovanilik asit floresan dimerine oksitlenmektedir (137). Kolorimetrik tayinler, fenol fitalein ya da metilen mavisi oksidasyonuna dayanmaktadır (138). Enzimatik metot da ise siklooksijenaz sentetaz aktivitesi, hidroperoksidler

tarafından uyarılmaktadır. Enzimatik aktivite, oksijen tüketimi ölçülerek belirlenmektedir; oksijen tüketimi, LHP konsantrasyonu ile orantılıdır (139).

Bu çalışmada LHP, Ruiz ve ark.'ının (99) metoduna göre tayin edildi. Metot, glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz reaksiyonuna dayanmaktadır. Glutatyon peroksidaz enzimi, glutatyon varlığında lipid hidroperoksidleri indirgeyerek NADPH'ı okside etmekte ve bu da spektrofotometrik olarak izlenebilmektedir. Çalışmamızda, numuneden kaynaklanabilecek lipid peroksidasyon etkisini azaltmak için standartların hazırlanmasında 65 g/L'lik sığır serum albumin çözeltisi kullanıldı. Deney esnasında meydana gelebilecek lipid peroksidasyonunu engellemek için çalışmamızda ortama BHT ilave edildi. Metod % CV'si kabul edilebilir düzeyde idi.

5.1.5. Antioksidan Enzim Tayinleri

Çalışmamızda eritrositlerde ve plazmada GSH-Px, GR ve SOD aktivitelerine ayrıca eritrosit Kat aktivitesine bakıldı.

Glutatyon peroksidaz enzimi aktivitesi tayininde değişik metotlar mevcuttur. Bu metotların çoğu Paglia ve Valentine'in (140) metodunun değiştirilmesi ile elde edilmiş olup 340 nm'de NADPH azalmasının kinetik olarak izlenmesine esasına dayanmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız Beutler'in metodu (98) da bu metotlardan biri olup reaksiyon hızı H_2O_2 konsantrasyonuna bağlıdır. Yüksek H_2O_2 konsantrasyonunda GSH-Px inhibe olmaktadır (32). Cu^{+2} , Fe^{+2} gibi geçiş metallerinin bulunduğu ortamda H_2O_2 , Fenton reaksiyonu ile parçalanabilmektedir (25). Bu nedenle cam malzemeler deiyonize su ile yıkandı ve çözeltiler deiyonize su ile günlük hazırlandı. Bazı araştırmacılar H_2O_2 yerine substrat olarak daha yüksek aktiviteye sahip kümen hidroperoksiti veya eritrosit ve plazma hariç diğer doku ve hücre ekstraktlarında bulunan ve glutatyon-s-transferazların da substratı olduğundan GSH-Px reaksiyonuna engel teşkil eden t-butil hidroperoksiti kullanmışlardır (141).

Eritrosit ve plazmada glutatyon redüktaz aktivitesi tayininde Goldberg ve ark.'ının (34) metodu kullanıldı. GR bir flavoenzim olduğundan eritrosit hemolizatlarında ortama FAD ilave edildi. Plazmada GR aktivitesi tayininde FAD ilavesine gerek yoktu. Plazmada GR aktivitesi ölçümünde fosfat tamponu yerine imidazol tamponu kullanıldı.

Süperoksit dismutaz aktivitesi özel cihazlarla direkt olarak ölçülebilmektedir. Ancak bu cihazlar her laboratuarda bulunmayabilir. SOD tayini metotları, SOD'un süperoksidin başlattığı reaksiyonu inhibe etme yeteneğine dayanmaktadır. Ölçümlerin

çoğunda, süperoksid, SOD ve indikatör madde arasındaki yarışma söz konusudur (96). Enzimatik yada non enzimatik sistemlerle meydana gelen süperoksit, lüminometrik, polorografik ya da kolorimetrik tekniklerle tayin edilir (142). İmmünolojik metotla da SOD tayinleri yapılabilmektedir. Ancak bunlar pahalıdır ve her laboratuarda yapılabilecek testler değildir (143). Süperoksid radikali, ölçüm ortamı içinde üretilmesi gerektiğinden SOD'un enzimatik aktivitesinin ölçülmesi zordur. SOD tayininde kullanılan nitrobluetetrazolium (NBT) metodu hassas ve hızlı bir metod olup süperoksid radikal üreticisi olarak flavinler kullanılmaktadır ve meydana gelen süperoksit renksiz olan NBT ile reaksiyona girerek mavi renkli formazon indirgenmesi 560 nm'de ölçülmektedir. SOD varlığında NBT'nin indirgenmesi inhibe olmaktadır. Son zamanlarda NBT yerine daha çok süperoksid radikali ile kırmızı renk oluşturan INT, indikatör olarak kullanılmaktadır (144). NAD(P)H oksidasyonuna dayalı metod, çok düşük SOD miktarlarını bile ölçebilen hassas bir metoddur. Biyolojik numunelerde mevcut indirgeyici ajanlar diğer metodlarla interferansa neden olabilirken, NAD(P)H oksidasyonuna dayanan metotta bu etki gözlenmez (142).

Çalışmamızda SOD aktivitesi tayininde, INT yöntemi kullanıldı (96). Ksantin-ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksid, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium klorür (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazon boyasının 505 nm'deki optik dansitesindeki azalma takip edilerek SOD'un oluşturduğu reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi ve % 50 inhibisyon sağlayan SOD miktarı 1 EU olarak alındı.

Katalaz aktivitesi tayininde çalışılan numunenin cinsine göre (doku, kan, mikroorganizma) çeşitli metotlar mevcuttur. Serumda katalaz aktivitesi çok düşük olmasına rağmen Göth'in bir ölçüm metodu geliştirmiştir (145). Ancak bu metot da serum bilirubini sarı renkte olduğundan yüksek absorbans okunmasına yol açtığı bildirilmiştir. Bu çalışmada Aebi (97)'nin metodu kullanıldı. metot H_2O_2 'in katalaz enzimi ile parçalanması sonucu 240 nm'deki absorbans düşüş, spektrofotometrik olarak takip edildi. Enzim aktivitesi H_2O_2 'in ayrışmasına dayandığından, absorbans farkı 0,02 ile 0,100 arasında olmasına yeterli olacak şekilde H_2O_2 konsantrasyonu ayarlandı. Ayrıca GSH-Px tayininde olduğu gibi deneyde kullanılan malzemelerin deiyonize su ile yıkanması ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan suyun deiyonize su olması gerekmektedir. Eritrosit hemolizatları seyreltilmiş halde enzim alt birimleri birbirinden ayrıldığı ve bu nedenle de aktivite kaybı olduğundan seyreltme işlemi çalışmadan

hemen önce yapıldı. metot plazma katalaz aktivitesi ölçümüne uygun olmadığından plazma katalaz aktivitesi tayini yapılmadı.

5.2. Bulguların Tartışması

Psöriasis, bozulmuş lipid metabolizması ve artmış oksidan stress nedeniyle koroner arter hastalığına yatkınlığın arttığı kronik ve tekrarlayan ataklarla seyreden bir deri hastalığıdır (3). Yapılan çalışmalarda, psöriasisli hastalarda ateroskleroz riskinin arttığı ve tıkalı damar hastalığının sağlıklı kişilere göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Psöriasisde artmış ateroskleroz riskinin lipid ve lipoprotein metabolizması değişiklikleri sonucu olabileceği ileri sürülmektedir (94).

Lipid, lipoprotein ve apolipoprotein sentez ve metabolizması, doku ve organlara göre farklılık gösterip metabolizmada görev alan enzimlerden, vücutta cereyan eden bir çok fizyolojik ve patolojik olaylardan etkilenmektedir. Psöriasisin kronik inflamatuvar ve akut ataklarla seyreden bir klinik tablo olması göz önüne alınırsa romatoid artritte olduğu gibi lipid parametrelerin değişim göstermesi de beklenen bir bulgudur. Sonuçta lipoproteinlerin yapısal bileşimleri ve bunların metabolizması olumsuz etkilenir. Lipid anormallikleri sonucu dokularda ve hücre membranlarında patolojik olaylar gelişir (13,14).

Bu çalışmada psöriasis hastalarının lipid parametreleri sağlıklı kontrol grubunun ki ile karşılaştırıldığında TK, TG ve LDL-K seviyeleri anlamlı yüksek, HDL-K seviyeleri ise anlamlı düşük bulundu (Tablo 10). Apo B seviyeleri yüksek olmasına rağmen anlamlı değildi. Bu sonuçlar bir çok çalışma ile uyumluluk gösterirken bazı çalışmalarda farklılık arz etmektedir. Leren ve ark. (93), psöriasisli hasta fibroblast kültürlerinde LDL reseptörü aktivitesinin azalması sonucu TK düzeylerinin yükseldiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca psöriasisli çocuklar üzerinde yapılan bir çalışmada TK seviyesinin yükseldiği saptanmıştır (8). Seishima ve ark. (2) Apo AI düzeyinde düşük olmasına rağmen TK düzeyinde bir değişiklik görememişlerdir. Apo B düzeyi bazı çalışmalarda yüksek bulunurken (8) bazı çalışmalarda da değişmediği gözlenmiştir (9). Bir çok çalışma (1,94) serum TG seviyesinin yüksek olduğunu ifade etmesine rağmen değişmediğini ifade edenler de vardır (8,146). Bu farklılığın nedeni hızlı TG metabolizması değişikliğidir. Diğer bir çok parametrede olduğu gibi HDL-K de çalışmalara göre düşük ya da değişmemiş bulunmuştur. Jones ve ark. (148), psöriasis hastalarında LDL'nin en yoğun alt fraksiyonu olan LDL₃'ün psöriasisli hastalarda

anlamlı bir şekilde attığını HDL₃'ün ise azaldığını bulmuşlar ve bu değişikliğinde koroner arter hastalığının gelişiminde rol alabileceğini belirtmişlerdir. Hastalarda TK, TG ve LDL-K seviyelerinin yüksek, HDL-K düzeylerinin düşük olması, artmış aterojenik meyili göstermektedir.

Kolesterol yüksekliği, çeşitli yollarla süperoksit radikali artışına neden olur. Kolesterol, trombositleri aktive ederek trombin, histamin ve ADP gibi maddelerin salınımında rol alabilir. Histamin ve ADP ise fosfolipaz A₂'yi aktifleştirerek membran fosfolipidlerinin hidrolizlenmesi sonucu araşidonik asit miktarını artırır. Araşidonik asit lökotrinlerin (lipooksijenaz yolu ile), tromboksanların, prostaglandinlerin ve malondialdehidin (siklooksijenaz yolu ile) sentezinde doğal substrattır. Bunların sentezinin ara basamaklarında oksijen radikali üretilir. Poliansature yağ asitleri yeterli antioksidanların bulunmadığı ortamlarda serbest oksijen radikallerinin kolay hedefleri olduklarından araşidonik asit artışı ile bu yolların aktive olmasıyla hücre membranları lipid peroksidasyonuna maruz kalır. Lökotrienlerin sentezi artışı ile psöriasisli lezyonlar için de karakteristik olan inflamasyon ve keratinosit proliferasyonu artar (88,89).

Inflamasyona karşı akut faz cevap esnasında sitokinler, doku ve plazma üzerine etki ederek lipoproteinlerde değişikliklere yol açarlar. Proaterojenik etki gösteren bu değişiklikler, aterosklerozdakilere benzerlik göstermektedir (3). Hipertrigliseridemi, trigliseridce yüksek lipoproteinlerin yükselmesi, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin görülmesi, fosfolipaz A₂ salınımı ve HDL-K düşüklüğü aterojenik lipid metabolizması değişiklikleridir (148). HDL düzeyindeki düşme psöriasisli hastalarda HDL'nin antioksidan ve ters kolesterol taşınımı mekanizmaları ile aterogeneze karşı koruma yeteneğini azaltır.

Salınımı IL-1 ve TNF- α tarafından düzenlenen IL-6'nın, plazma lipoprotein lipaz aktivitesini düşürdüğü, dolayısıyla makrofajlarda lipid alımına ve köpük hücre oluşumuna yol açtığı ve bu yolla aterosklerotik olayları başlattığı bildirilmektedir. IL-2, IL-6 ve IL-8'in direkt olarak keratinosit proliferasyonunu artırarak psöriasisise yol açtığı da rapor edilmiştir (87). Ayrıca IL-6'nın, hepatik akut faz cevabın güçlü bir tetikleyicisi olduğu belirtilmektedir (150).

Psöriasis hastalarında akut faz reaktanları (CRP, ESH, fibrinojen, seruloplazmin ve PMN-lökosit) seviyelerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 11). Bu sonuçları destekleyen bir çok çalışma mevcuttur. Doğan ve ark. (150), serum seruloplazmin, Laurent ve ark. (151), CRP ve fibrinojeni, ve Örem ve ark. (20),

PMN-lökosit, fibrinojen ve ESH seviyelerini psöriasisli hastalarda sağlıklı kontrollerden daha yüksek bulmuşlardır.

Aktif PMN-lökositler, serbest oksijen radikallerinin önemli kaynaklarından biri olarak bilinmektedirler. Bunlar, NADPH/miyeloperoksidaz ve proteolitik enzimler aracılığı ile reaktif oksijen ürünleri salıvererek çevre dokulara zarar verirler. Reaktif oksijen ürünleri, proteaz inhibitörlerini inaktive ederler ve böylece PMN'lerin yıkıcı etkilerini artırır. Eritrositlerin, insanlarda PMN lökositlerce üretilen reaktif oksijen ürünlerinin çevre dokular üzerinde oksidan hasar oluşturmasını önlediği bildirilmektedir. Reaktif oksijen ürünleri, PMN ve monositlerin endotelyuma adezyonunu artırır (95). Psöriasisli hastalarda PMN-lökositlerin aktivasyonu kemotaksisin artmasına, fagositoza ve proteinaz seviyelerinin artmasına neden olur. Bu nedenle PMN-lökositlerin psöriasis patogenesinde önemli rol oynadığı düşünülmüştür (1). Psöriasisli hastalarda inflammatuar tablo, anormal lipid metabolizmasına, antioksidan savunmada azalmaya, lipid peroksidasyonunda artmaya ve dolayısıyla da oksidan-antioksidan dengede bozulmaya neden olmaktadır. Bu değişikliklerde kardiyovasküler olaylar için risk oluşturmaktadır (3).

Aktif otoimmün hastalıklarda yükselen akut faz reaktanlarından biri olan CRP proteinin miyokard infarktüsünün belirleyicisi olarak da kullanılabileceği belirtilmektedir. Ayrıca CRP'nin düşük derecede nonspesifik bir sistemik inflamasyon belirleyicisi olduğu ve IL-6 salınımı yansıttığı rapor edilmiştir (152). Psöriasis gelişiminde rol alan IL-6'nın CRP'de artışa neden olması muhtemeldir.

İnflamasyonda fibrinojenin de yükselmesi prokoagulan ve ateroskleroz atırıcı etkilere neden olmaktadır. IL-6, üç fibrinojen geninin her birinin transkripsiyonunu ve karaciğerden salınımını artırdığı bildirilmiştir (153). ESH'nin da inflammatuar sitokinlerle korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (154).

Seruloplazmin, feroksidaz aktivitesi göstererek serbest demirin transferine bağlanmasını hızlandırır. Böylece geçiş metallerinin H_2O_2 'den daha toksik olan hidroksil radikalini oluşumunu katalizleyen Haber-Weis reaksiyonunu inhibe etmektedir. Ayrıca, demirin ferritinden süperoksid etkisiyle ayrılmasını inhibe eder. Yani seruloplazmin $O_2^{\cdot-}$ 'nin ve ferritin-bağımlı lipid peroksidasyonunun güçlü bir inhibitörüdür (36). Ancak seruloplazmin, asidik ortamlarda makrofajlarla LDL oksidasyonunu katalizleyebilme özelliğine de sahiptir. Seruloplazminin oksidan kapasitesi, bu proteinin yapısında bulunan yedi bakır iyonundan diğer altısına göre

daha az güçte bağlanmış olan bir bakıra atfedilmektedir. Ortamda bulunan peroksinitrit de seruloplazminden bakır salınımını uyarır (70).

Psöriasisli hastalarda eritrosit Kat, eritrosit ve plazma SOD ve eritrosit GSH-Px seviyelerinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı düşük olduğu görüldü. Ancak eritrosit GSH-Px aktivitesi düşük olmasına rağmen anlamlı değildi. Ayrıca plazma ve eritrosit GR seviyelerinde anlamlı bir fark yoktu (Tablo 12). Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'yı yansıtan TBARS değerleri, psöriasisli hastaların eritrositlerinde, LHP değerleri ise psöriasisli plazmada sağlıklı kontrollerinkine göre anlamlı derecede yüksek idi (Tablo 13). Bu sonuçlara göre psöriasisli hastalarda toplam antioksidan enzim kapasitesinin düştüğünü ve oksidan stresin arttığını söylemek mümkündür.

Rocha-Pereira ve ark. (3), psöriasisli hastalarda total antioksidan kapasitesinin (TAS) düştüğünü tespit etmişlerdir. Severen ve ark. (155), antioksidanları tayin etmişler ve psöriasisde total antioksidan aktivitesinin normal olmasına rağmen bilirubin, tokoferol ve urat seviyelerinin yüksek olduğunu belirlemiştir. Théron ve ark.(11), fibroblast ve eritrositlerde CuZn-SOD aktivitesinin yüksek iken, Kat aktivitesinin fibroblastlarda hafif artmış, eritrositlerde anlamlı düzeyde değişmemiş olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca glutasyon seviyesinin normal ve psöriasisli hücrelerde anlamlı bir fark göstermediğini de belirtmişlerdir. Doğan ve ark. (157), PMN lökositlerde, Borolla ve ark. (156) ise doku ekstraktlarında SOD aktivitesinin psöriasislilerde düşük olduğunu bulmuşlardır. Corrocher ve ark. (157), psöriasisde plazma selenyum (Se) seviyesi düşük olmasına rağmen eritrosit GSH-Px aktivitesini yüksek bulmuşlar ve bunu da Se'un depolandığı hücre içinde ölçülmemesine, düşük miktarlarda Se'un bile GSH-Px aktivitesi için kısmen yeterli olabileceğine bağlamışlardır. Offidanı ve ark. (5), eritrosit GSH-Px aktivitelerinin psöriasislilerde yükseldiğini belirtmelerine rağmen bunun aksini belirtenler de vardır. Kokcam ve Naziroğlu (158), psöriasisli hastaların eritrositlerinde ve plazmalarında GSH-Px aktivitesini ve GSH seviyesini düşük, eritrosit MDA seviyesini ise yüksek bulmuşlardır. Jain ve ark. (10) eritrosit GSH-Px aktivitesi psöriasislilerde normallerinkine göre anlamlı düşük olduğunu bulmuşlar ve bu düşüklüğü deri yolu ile Se kaybına bağlamışlardır. Juhlin ve ark. (159), Se ve Vit E verilmesi ile psöriasislilerde eritrosit GSH-Px aktivitesinin yükseldiğini gözlemişlerdir. Se'un derideki fonksiyonu kesin bilinmemekle beraber, normal keratinizasyonunda ve özellikle S-S bağlanmasında önemli olduğu belirtilmiştir. GSH ve GSH-Px, lökotrien üretimine katılmaktadırlar. Bu da Se'u inflamatuvar hastalıklarda önemli kılmaktadır. Psöriasislilerde Se eksikliği ya Se

absorbsiyonunun azalmasına ya da deriden kaybına bağlanmaktadır (10). laboratuvar imkanlarımızın yetersizliğinden dolayı bu hastalarda Se değerlendirilememiştir.

Lipid, protein ve DNA'ca zengin deri, hem endojen hem de eksojen kaynaklar yolu ile oksidan strese maruz kalabilmektedir. Deri lezyonu olanlarda lipid peroksit seviyesinin aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (25).

Literatürlere göre antioksidan enzim düzeylerinde farklılıklar görülmesi beklenen bir bulgudur. Antioksidan enzim aktiviteleri toplumlara, kullanılan metoda ve dokulara göre farklılık göstermektedir. Eritrosit antioksidanları yaşa bağlı olarak da değişebilmektedir. Çevresel faktörler bile dokulardaki enzim aktivitesini etkileyebilir. Bu nedenle, eritrositlerdeki aktiviteler tüm vücudun antioksidan savunma sistemini tam olarak yansıtmaz. Sadece genel bir fikir verir. Doku ve hücreler tarafından üretilen serbest radikaller, eritrositler üzerinde oksidan stres oluştururlar. Yaşam biçiminden ve çevre faktörlerinden en çok etkilenen enzimlerden biri GSH-Px'dır (32). SOD aktivitesi dokulara göre çok farklılık göstermektedir. Hiperkolesterolemilerde, SOD aktivitesinin böbrek dokusunda değişmediği, KC'de ise düştüğü, GSH-Px'in kalp dokusunda ve GR'nin ise böbrek dokusunda arttığı bildirilmiştir (161). Eritrositlerde bulunan SOD, aktivitesi bakır seviyesine de bağımlı olan CuZn-SOD'dur (97). Kat genelde peroksizomlarda olmasına rağmen eritrositlerde sitozolde çözünmüş halde bulunur (48). Yüksek H_2O_2 konsantrasyonunda, Kat'ın etkisi önem kazanmaktadır. Kat ve GSH-Px, eritrositlerde H_2O_2 'nin uzaklaştırılmasında eşit etki göstermektedir. Her ikisinin etki mekanizması da NADPH oluşumuna bağlıdır. NADPH oluşturan sistem (Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz) eksikliğinde eritrositler oksidatif hemolize duyarlı olmaktadır (31). Kan dolaşımındaki eritrositler çevre doku ve hücrelerden sızan serbest radikallerden dolayı oksidan strese en çok maruz kalan hücrelerdir. Eritrositler çeşitli mekanizmalarla H_2O_2 üretmektedirler. Eritrositlerde H_2O_2 'in normal şartlarda suya dönüştürülerek detoksifiye edilmesi eritrosit GSH-Px enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir. Hidroperoksitler ve süperoksit anyonu GSH-Px'ı dönüşümsüz inhibe ederler. SOD katalitik olarak süperoksidi uzaklaştırarak bu etkiyi ortadan kaldırır. SOD, Kat'ı ve GSH-Px'ı süperoksitle inhibisyona karşı korur. Süperoksit ve hidroperoksit, indirgenmiş glutasyonu okside şekline çevirirler (31).

Eritrositlerde SOD aktivitesinin düşük olması nedeniyle eritrosit metabolizması sonucu meydana gelen ve doku ve hücrelerden sızan süperoksit radikalinin yeterli düzeyde temizlenemediği ve bu nedenle de lipid peroksidasyonunun arttığı söylenebilir. Enzim inaktivasyonu, sentez yetersizliği, genetik faktörler ve Se eksikliği gibi etkenler

nedeniyle SOD ve GSH-Px seviyelerinin düşük olması eritrositlerin bu radikal temizleyici fonksiyonu yerine getirememesine neden olabilir.

Psöriasisli hastaların eritrositlerdeki TBARS artışı hücre içi toplam antioksidan kapasitenin yetersizliği sonucu ortamdaki oksijen radikali artışının eritrosit membranlarını peroksidasyona uğratmasından kaynaklanmaktadır. Eritrositlerde TBARS düzeyinin artması bu şahıslarda lipid peroksidasyonunun arttığını ve lipid peroksidasyonunun diğer toksik ürünleri olan 4-HNE, etan, pentan, lipid hidroperoksidlerin ve dien konjugatlarının da artabileceğini göstermektedir.

Psöriasisde LHP'lerin artışında sitokinlerin ve kemokinlerin önemli rolü olduğu bildirilmektedir (160). Plazmada artan LHP'lerin primer hedefi kan damarlarındaki intima tabakasıdır. Kanda LHP'lerin artması endotel hücrelerinin harabiyetine yol açar. Endotel hücrelerinde trombositlerin tutunması prostasiklinler tarafından engellenmektedir. Ancak lipid peroksidleri endotel hücresindeki prostasiklin sentezini inhibe etmektedir (161). Oluşan endotel hasarı ve plazma lipid düzeylerindeki yükselme, subendotelyal alana lipid (özellikle LDL) girişini artırır. Bu aterosklerotik sürecinin ilk dönemlerini oluşturur. Endotel hasarı sonucu, bir çok adezyon molekülünün ve kemotaktik proteinin endotelden salgılanması artar ve sonuçta monositlerin de subendotelyal alanda birikmesi ve makrofajlara dönüşümü gerçekleşir. Makrofajların yüksek oksidan stres oluşturma etkisi aynı ortamda bulunan LDL'lerin oksidatif modifikasyonuna neden olur. Plazmanın yüksek antioksidan gücünden mahrum olan subendotelyal LDL molekülü, ortamdaki artmış serbest oksijen radikallerinin etkisiyle kademeli olarak oksitlenir ve okside LDL oluşur (124,162).

In vivo LDL oksidasyonunu damar hücrelerindeki metal iyonlarının, serbest radikallerin ve lipid hidroperoksidlerin başlattığı kabul edilir. Bu oksidasyon işleminde LDL'nin endojen antioksidan gücü (Vit E içeriği) ve bu alanda üretilen serbest radikal miktarı, aterosklerotik olayın yönünü ve hızını belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Antioksidan savunma sistemi kaybolunca ve sınırlı sayıda lipoperoksid edindikten sonra oksidan süreç devreye girer (60). İlerleme fazı, büyük ölçüde, LDL'deki lesitin lizolesitine parçalanmasına katılan fosfolipaz A₂ etkinliğine bağlıdır. Lipoperoksidlerin parçalanması, MDA ve 4-HNE'inde dahil olduğu reaktif aldehytlerin oluşmasına yol açar. Bu aldehytlerin bir bölümü daha sonra Apo B'nin serbest ε-amino-lizin grubuyla ve daha çok da kovalan bağlarla birleşir (39). LDL lizin artıklarındaki çok küçük değişimlerle bile yüksek düzeyde immünolojik özellik kazanır. Apo B₁₀₀'ün 360 dolayındaki lizin kalıntısının ilerleyici değişimi, LDL reseptörü tarafından daha az

tanınmalarına ve bir eşik lizin sayısı geçirildikten sonra, çöpçü reseptörler tarafından tanınarak makrofajlarca hızla tutulmalarına yol açar. Lizinin %15-20'si bloklansa bile LDL çöpçü reseptörler tarafından alınmaya başlar. Lipid hidroperoksitler daha önce reaktif aldehitlere parçalanmadan Apoproteinle doğrudan etkileşime girebilir (70).

In vitro LDL oksidasyonunu ve oksidasyon direncini göstermek amacıyla lipoproteinlerin izolasyonu yapıldı. VLDL'nin TG'ce, LDL'nin kolesterol ve Apo B'ce, HDL'nin ise Apo AI'ce yüksek olduğu gözlemlendi (Tablo 7). Ayrıca VLDL'nin pre β , LDL'nin β , HDL'nin ise α bölgesine ve 24 saatlik oksidasyon sonucunda elde edilen oLDL'nin α bölgesine göç ettiği gözlemlendi (Şekil 15). Bu sonuçlar, literatürlere uymakta idi (13,15).

İzole edilen LDL'nin Cu^{+2} ile oksidasyon kinetiği incelendiğinde dien konjugasyonu takibi verileri (Tablo 8), literatürde belirtilen değerlerle uyumlu idi. Bu çalışmaya göre sağlıklı kişilerde t-lag 105 ± 24 dk, DKH $3,8 \pm 2,8$ nmol/dk/mg LDL protein, MDK 305 ± 111 nmol/mg LDL protein ve t-maks 185 ± 28 dk olarak bulundu. Literatürlerde yaklaşık ortalama değerler sırasıyla 80-120 dk, 1-10 nmol/dk/mg LDL protein, 80-500 nmol/dk/mg LDL protein ve 180-250 dk arasında değişmektedir (108,109,110,118,119,128).

Oksidasyon kinetiği verileri incelendiğinde hastalarda A° , DKH ve MDK anlamlı yüksek iken, t-lag ve t-maks anlamlı düşük idi. TBARS seviyeleri ise oksidasyon öncesinde ve sonrasında anlamlı yüksek idi. A° 'in yüksek olması oLDL miktarının başlangıçta yüksek olduğunu, t-lag'ın düşük olması oksidasyona direncin düşük olduğunu, DKH ve MDK'nın yüksek olması, lipid peroksidasyonunu arttığını ve t-maks'ın düşük olması ise yine lipid peroksidasyonun daha kısa sürede gerçekleştiğini göstermektedir. Buna ilaveten bu sonuçlar, hastaların LDL kalitesinin ateroskleroz gelişimi yönünde bozulduğunu bize düşündürmektedir.

Jun-Jun ve ark. (117), koroner kalp hastaları üzerinde yaptıkları çalışmada, yoğun LDL'de hafif LDL'ye göre ve toplam LDL'ye göre t-lag'ın daha kısa, DKH ve MDK'ın daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Psöriasisde VLDL ve LDL, 37°C 'de 24 saat CuSO_4 ile oksidasyona tabi tutulduğunda TBARS seviyelerinin, VLDL ve LDL'nin lipid bileşimleri karşılaştırıldığında LDL'de protein, kolesterol, trigliserid, fosfolipid seviyelerinin ve fosfolipid seviyelerinin VLDL'de ise fosfolipid ve trigliserid seviyesinin yüksek olduğunu belirtilmiştir (5). Vahquist ve ark. (94), VLDL, LDL ve HDL'de TG ve TK

seviyelerine bakmışlar ve VLDL ve LDL'de TG'in yüksek olduğunu ve serumda da TG seviyesinin yükseldiğini bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda belli bir standardizasyon elde etmek için mg ilgili protein başına elde edilen veriler psöriasisli hastalarda sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında izole LDL'de TG ve TK seviyelerinin anlamlı yüksek olduğu görüldü. VLDL-TG seviyeleri yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık sınırları içerisinde değildi. HDL ise TG yüksek, TK seviyeleri düşük bulundu. LDL'de TG düzeyinin artması, HDL'de kolesterol düzeyinin düşük olması, LDL'nin oksidasyona yatkınlığını arttırırken, HDL'nin antioksidan etkisini azaltıcı yönde etki gösterdiğini düşündürmektedir. LDL'nin artmış *in vivo* oksidasyonunun göstergesi olarak oLAB düzeylerine bakıldığında, psöriasisli hastalarda artmış olduğu gözlemlendi.

oLDL'ye karşı epitopların aterosklerotik lezyonlarda bulunduğu immünokimyasal metotlarla gösterilmiştir. LDL oksidasyonu antijenik özellikli epitopların oluşumuna yol açar. oLDL, subentotelyal alanda antikor ile birleşerek immün kompleks oluşturur ve bu kompleksin makrofajlardaki Fc reseptörlerince alınımı, çöpçü yollu alınımına benzemektedir. Ancak daha hızlıdır. MDA-LDL fizyolojik olarak meydana gelen okside LDL'dir ve hemen hemen Cu-oLDL kadar oLAB'ı bağlayabilmektedir (73).

Psöriasisli hastalarda oLAB düzeyi sağlıklı kişilerinkine göre anlamlı yüksek bulundu (Tablo 13). oLAB'ın yüksek bulunması immün sistem ile antijen arasındaki etkileşimler sonucu yüksek antikor titresi elde edilmesindendir. Ayrıca oLAB seviyesinin yüksek olması psöriasisde *in vivo* oksidasyonun ve dolayısıyla da ateroskleroz riskinin arttığı fikrini desteklemektedir.

Psöriasisli hastalarda gözlenen HDL-K düşüklüğünün oluşan immün cevabın daha güçlü olmasına neden olabileceği, bunda LDL'nin oksidasyon kapasindeki artışa neden olabileceğini bize düşündürmektedir.

oLAB seviyelerinin hiperkolesterolemili ya da sigara içen düşük HDL-K seviyeli bireylerde, diğer risk faktörlerini taşıyan yüksek HDL-K seviyelerdeki bireylerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (128). HDL ya da onun yapısındaki Apo E, oLDL'ye karşı oluşan immün cevabı inhibe ederek oLAB oluşumunu azaltır. Apo E'si eksik olan farelerde MDA-, HNE- ve Cu- ile oLDL'ye karşı oLAB seviyesinin yüksek olduğu belirtilmiştir. MDA-LDL antikor düzeyleri karotid ateroskleroz, koroner arter hastalığı ve miyokard infarktüsünde de yüksek tespit edilmiştir (117). Cu-oLDL antikorlarının endotel fonksiyonlarını bozduğunu bildirilmiştir (76). Aterosklerozda , preeklamside,

lupus eritematozus gibi kollagen vasküler hastalıklarında antikor seviyesi yükselmektedir (81).

Çalışmamızdaki amaçlardan biri de LDL oksidasyonu incelemek olduğundan özellikle LDL oksidasyonu parametrelerinin birbirleriyle ve diğer incelenen parametrelerle verdiği korelasyonları önem taşımaktadır.

LDL oksidasyonu bir lipid peroksidasyon işlemidir. Dolayısıyla *in vivo* LDL oksidasyonu göstergesi olan oLAB'ın, lipid peroksidasyon göstergesi olan diğer parametrelerden LDL_{TBARS}, LHP ve eTBARS ile anlamlı pozitif korelasyon göstermesi beklediğimiz bulgulardı. Hastalarda görülen bu korelasyonlar LDL_{TBARS} hariç sağlıklı kontrollerde tespit edilemedi. Bu da muhtemelen, kontrollerde lipid ve oksidan stresin düşük, antioksidan etkinin yüksek olmasına ve bunun korelasyonlara yansımamasına bağlanabilir. Plazmada SOD, süperoksit radikalının en güçlü toplayıcısı olduğundan SOD'un yetersiz olduğu durumlarda LDL süperoksid yollu oksidasyona maruz kalmaktadır. Dolayısıyla da LDL oksidasyonu artması sonucu oLAB seviyesi artacaktır. Bu da oLAB ile plazma SOD arasında görülen negatif korelasyonu izah etmektedir. Lethimäki ve ark. (76), anjiyografi ile tespit edilmiş koroner arter hastalarında oLAB düzeyi kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ve yüksek antikor seviyesinin TG ve TK ile anlamlı korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmada oLAB düzeyleri, hastalarda TK, LDL-K ve Apo B arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon görülmesine rağmen, kontrol grubunda bu korelasyonlara rastlanamadı. Ayrıca psöriasis hastalığında PMN-lökosit, CRP ve fibrinojen düzeyleri ile oLAB arasında anlamlı pozitif ilişkiler gözlenmiştir. Bu korelasyonlar bize hastalık süreci içerisinde gözlenen lipid metabolizması bozukluğu, artmış oksidan stres ve azalmış antioksidan kapasite arasındaki ilişkilerin çok yakın olduğunu düşündürmektedir.

Psöriasisli hasta ve kontrol grubunda LDL'nin bakırla oksidasyona direncini ifade eden t-lag, t-maks ile güçlü pozitif, izole VLDL ve LDL-TG değerleri ile ise negatif korelasyon gösterdi. Miyokard infarktüsünde yapılan çalışmada trigliseridce zengin LDL'nin bakır iyonu oksidasyona karşı hassasiyetin arttığı ve bunun da TG zenginliğinin LDL'nin fizikokimyasal özelliklerini değiştirmesi özelliğine dayandığını bildirmişlerdir (163). Shanti ve ark. (164), böbrek nakli yapılan hastalarda LDL'nin TG muhtevası ile t-lag arasında negatif ilişki bulmasına rağmen kontrol grubunda bu anlamlı ilişkiyi görememişlerdir. Costantini ve ark. (108), hipotiroid hastalarında TK ve LDL-K ile t-lag arasında negatif, TBARS arasında pozitif ilişki tespit etmişlerdir. Jun-Jun ve ark. (117), yoğun ve küçük LDL'nin t-lag düzeyinin *in vivo* oLDL ile doğru

orantılı olduğunu bulmuşlar ve bu sonuca göre *in vivo* ve *in vitro* LDL oksidasyonunun birbiri ile orantılı olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuçta hastalarda gözlenen TG artışının izole LDL, VLDL ve HDL'de TG içeriğindeki artışa neden olabileceği ve bunun da LDL'nin oksidasyona yatkınlığını arttıracaklarını söylemek mümkündür. Bu hastalarda TG düzeylerinin düşürülmesi en az TK düzeylerinin düşürülmesi kadar dikkate alınması gereken bir tedavi yaklaşımı olduğu inancındayız.

Hastalarda LDL-peroksidasyonunu ifade eden MDK'nın, ve LDL- ve oLDL-TBARS seviyelerinin TK, LDL-K, Apo B ve LDL-TK ile pozitif korelasyon göstermesi, kolesterol düzeyinin LDL oksidasyondaki yerini vurgulamaktadır. Siekmeier ve ark.'da (128), sigara içen ve içmeyen gruplarda oLDL-TBARS ile TK, TG, LDL-K ve Apo B arasında pozitif korelasyonlar bulmuşlardır. Ayrıca MDK ve plazma LHP seviyesi ile pozitif korelasyon görülmesi, LDL oksidasyonun plazmaya yansıyan oksidatif stresten etkilendiğini göstermektedir. eTBARS ile lipid parametreleri (TK, TG, LDL-K, LDL-TK) ve oLDL-TBARS seviyeleri arasında da pozitif korelasyonlar tespit edildi. *In vivo* LDL oksidasyonunu yansıtan oLab ile olduğu gibi, *in vitro* göstergelerden biri olan oLDL-TBARS ile plazma SOD arasında da negatif korelasyon görüldü.

Psöriasisli hastalarda akut faz reaktanları olan fibrinojen ve CRP seviyelerinin artışına TK, TG ve LDL-K seviyeleri artışının eşlik ettiği görüldü. Pfohl ve ark.(165), Akut miyokard infarktüsünde kolesterolün düştüğünü ancak infarktüsden sonra IL-6 ve IL-8 gibi sitokinlerin salınması ile kolesterol sentezinin up-regülasyona uğrayarak inflamasyona cevaben kolesterol düzeyinin yükseldiğini bulmuşlar ve bu nedenle kolesterolün de bir akut faz reaktanı olabileceğini ileri sürmüşlerdir. IL-6'nın fibrinojen ve CRP seviyelerini arttırdığı düşünülürse, TK ve LDL-K ile pozitif korelasyon göstermesinin olası bir sonuç olduğu söylenebilir. CRP, eTBARS ve fibrinojen ile pozitif korelasyon, eSOD ve pSOD ile ise negatif korelasyon gösterdi (Tablo 22). Diğer bir akut faz reaktanı olan PMN-lökosit seviyeleri ile LHP arasında pozitif korelasyon görülmesi, PMN lökositlerin oksijen metabolitleri salgılayarak lipid peroksidasyonu artırıcı yönde etki verdiği fikrini desteklemektedir.

Psöriasisli hastalarda plazma ve eritrosit GSH-Px ile sırasıyla plazma ve eritrosit GR aktiviteleri arasında pozitif korelasyonlar vardı (Tablo 19). GSH-Px'ın ürünü olan okside glutatyon GR için substrattır. GR aktivitesi düşük olduğunda ortamda yeterli düzeyde peroksitler temizlenemeyecektir. Wilke ve ark.(166), eGSH-Px ile plazma MDA'sı arasında negatif korelasyon bulmuşlardır. Anderson ve ark. (167), CuZn-SOD

ile Kat ve GR, ve Kat ile GR arasında pozitif ilişki bulmuşlardır. Blum ve Fridovich (32), SOD aktivitesi düştüğünde GSH-Px aktivitesinin de düşeceğini belirtmişlerdir. Çünkü süperoksit radikalının SOD tarafından indirgenmesi sonucu oluşan hidrojen peroksit GSH-Px tarafından indirgenmektedir. Gaetani ve ark. (31), GSH-Px ve Kat'ın eritrositlerde hidrojen peroksidi uzaklaştırmada eşit aktiviteye sahip olduklarını ileri sürmüşlerdir. Aktif inflamatuvar deri hastalıklarında lipid peroksit konsantrasyonunun arttığı belirtilmiştir (168).

Sonuç olarak, akut ataklarla seyreden, kronik inflamatuvar bir deri hastalığı olan psöriasis hastalarının, inflamatuvar sürecin bir parçası olan artmış oksidan stres, azalmış antioksidan kapasite, değişen lipid seviyesi ve lipoprotein yapısı sonucu artan modifiye lipoproteinler ve bunlara karşı gelişen otoantikorlar ile aterosklerotik zemine sahip oldukları kanaatine varıldı.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

1. Aktif psöriasisli hastalar, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında;
 - a) Serum TK, TG ve LDL-K seviyeleri psöriasisli hastalarda kontrollerden anlamı derecede yüksek, HDL-K seviyeleri ise düşük bulundu.
 - b) İzole LDL'de TK ve TG seviyeleri yüksekti. İzole HDL'de ise TK düşük, TG yüksekti.
 - c) Akut faz reaktanları (CRP, ESH, fibrinojen, seruloplazmin, ve PMN-lökosit) seviyelerinin yükseldiği gözlemlendi.
 - d) Plazma ve eritrositlerde lipid peroksidasyon ürünlerinde (sırasıyla LHP ve eTBARS) artış tespit edildi
 - e) *In vivo* LDL oksidasyonunu yansıtan oLab ile *in vitro* oksidasyonu yansıtan oLDL-TBARS ve MDK seviyelerinin yüksek, LDL oksidasyon direncini yansıtan t-lag'ın ise düşük olduğu görüldü.
 - f) Antioksidan enzim aktivitelerinin (pSOD, eSOD, eKat ve eGSH-Px) düştüğü bulundu.
2. Psöriasisli hastalarda;
 - a) oLab ile akut faz reaktanları (CRP, fibrinojen ve PMN-lökosit) ve lipid parametreleri (LDL ve Apo B) arasında pozitif ilişki görüldü.
 - b) oLab düzeyi, plazma (LHP), eritrosit (eTBARS) ve LDL peroksidasyon ürünleri (MDK, oLDL-TBARS) ile de pozitif ilişki gösterdi.
 - c) pSOD ile lipid parametreleri (TK, LDL-K), oLab ve oLDL-TBARS seviyeleri arasında negatif ilişkiler olduğu belirlendi.
 - d) t-lag ile VLDL- ve LDL-TG düzeyleri arasında negatif ilişkiler gözlemlendi.

3. Genel anlamda psöriasisli hastalarda lipid ve akut faz reaktanları seviyelerinde artışı takiben plazma ve eritrositlerde lipid peroksidasyonunun arttığı antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı yani oksidan-antioksidan dengenin oksidanlar yönünde bozulduğu söylenebilir. Bunlara eşlik eder düzeyde LDL oksidasyonu direncinde azalma ve dolayısıyla *in vivo* oksidasyonda (oLAb) artış gözlenen bulgulardır.

6.2. Öneriler

1. Eser elementlerin bu olaylardaki rolleri değerlendirilmeli ve tedaviye ilave edilmesiyle gözlenebilecek değişiklikler vurgulanmalıdır.
2. Psöriasisli hastaların aktif ve tedavi takiben inaktif dönemlerinde yukarda belirtilen incelemelerin yapılmasıyla lipid metabolizmasında ki değişikliğin aktivite ile ilişkisi ortaya konulmalıdır. Psöriasis hastalığı tedavisi uzun zaman aldığından çalışmamızda bu yapılamamıştır.
3. Gerek diyetle gerekse antioksidan özellikte ilaçların akut dönemde bozulan oksidan-antioksidan dengeye etkisi laboratuvar çalışmaları ile desteklenmelidir.
4. Uzun süreli klinik takiplerle psöriasisli hastaların koroner arter hastalığı riskleri belirlenmelidir.
5. Psöriasis hastalarında gözlenen metabolik değişikliklerin tromboz ve ateroskleroz gelişimine katkıları ileri çalışmalarla ortaya konulmalıdır.

7.ÖZET

Psöriasis, anormal lipid metabolizması, artmış oksidan stress ve kardiyovasküler olayların eşlik ettiği kronik ve tekrarlayıcı yaygın inflamatuvar bir deri hastalığıdır. Bu çalışmada, psoriasiste gecikme süresini kullanarak LDL'nin oksidasyona yatkınlığını, *in vivo* LDL oksidasyonu göstergesi olan okside LDL'ye karşı otoantikorların (oLAB) düzeylerini ve bunların oksidan-antioksidan denge ile ilişkisi ve aterosklerozla bağlantısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *In vitro* bakır katalizli LDL oksidasyonu sırasında konjuge dien oluşumu spektrofotometrik takip edilerek LDL'nin oksidasyona yatkınlığını gösteren gecikme zamanı (t-lag) değerlendirildi.

Çalışma grubu, 35 psoriasisli hasta (18 kadın ve 17 erkek) ve aynı cins ve yaşta 35 sağlıklı gönüllülerden (16 kadın ve 19 erkek) oluşturuldu. Plazma ve lipoprotein lipid parametrelerinin, antioksidan enzimlerin, akut faz proteinlerinin ve oLAB'ın seviyeleri, bakır katalizli LDL oksidasyonu kinetiği, ve eritrositlerde de antioksidan enzim aktiviteleri ve lipid peroksit seviyeleri belirlendi.

Aterojenik lipidler (TK, TG ve LDL-K), lipid peroksidasyonu göstergeleri [(LDL-TBARS, oLDL-TBARS, eritrosit TBARS, plazma lipid hidroperokside(LHP), serum oLAB and maksimum dien konsantrasyonu (MDK)] ve akut faz reaktanları (CRP, ESH, PMN-lökosit, seruloplazmin and fibrinojen) seviyeleri psoriasisli hastalarda sağlıklı kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek iken, eritrositlerde antioksidan enzimler [katalaz (Kat), süperoksit dismutaz (SOD), ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px)] ve plazma SOD aktiviteleri, t-lag ve HDL-K anlamlı düzeyde düşük idi. İzole LDL ve HDL'de TG seviyeleri anlamlı yüksekti.

Korelasyonları genel anlamda ifade etmek gerekirse, oLAB, MDK, ve oLDL-TBARS, hem birbirleri ile ve hem de aterojenik lipid parametreleri ve lipid peroksidasyonu ürünler ile pozitif, antioksidan enzimlerle (özellikle de plazma SOD) negatif korelasyonlar gösterdi. Diğer taraftan t-lag ile VLDL- ve LDL-TG seviyeleri arasında negatif korelasyonlar görüldü. Serum LDL kolesterolü izole LDL kolesterol ve serum HDL kolesterol ise izole HDL kolesterol seviyeleri ile anlamlı pozitif korelasyonlar gösterdi.

İnflamatuvar olayların etkisiyle oksidan stresin artması, antioksidan kapasitenin azalması ve lipid ve lipoproteinlerin yapısındaki değişikliklerine cevaben otoantikorların oluşumu neticesinde psoriasisli hastaların da ateroskleroz riski taşıdıkları sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Psöriasis, LDL oksidasyonu, antioksidanlar, ateroskleroz.

8.SUMMARY

THE SUSCEPTIBILITY OF LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL) TO OXIDATION AND ITS RELATIONS WITH OXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN PSORIATIC PATIENTS

Psoriasis is a common chronic and recurrent inflammatory skin disease that has been associated with abnormal plasma lipid metabolism, increased oxidative stress, and increased frequency of cardiovascular events. The current study was designed to evaluate the susceptibility of low density lipoprotein (LDL) to oxidation by using lag time, the levels of autotibodies against oxidized LDL (auAb-oxLDL) as an indicator of *in vivo* LDL oxidation and its associations with oxidant-antioxidant status in psoriasis. The lag time (t-lag) followed in the formation of conjugated dienes during *in vitro* copper catalyzed-LDL oxidation was determined spectrophotometrically to investigate the susceptibility of LDL to oxidation.

The study group included 35 patients with psoriasis (18 females and 17 males) and 35 sex- and age-matched healthy volunteers (16 females and 19 males). The levels of plasma lipids, lipoproteins, lipid peroxidation products, antioxidant enzymes, acute phase reactants and auAb-oxLDL, the kinetics of copper catalyzed-LDL oxidation and antioxidant enzyme activities and lipid peroxide level in erythrocytes were determined.

The mean levels of atherogenic lipids (TC, TG and LDL-C), lipid peroxidation indicators [LDL-TBARS, oxLDL-TBARS, erythrocyte TBARS, plasma lipid hydroperoxide (LHP), serum auAb-oxLDL and maximum dien concentration (MDC) in LDL)] and acute phase reactants (CRP, ESR, PMN-leukocytes, ceruloplasmin and fibrinogen) in patients with psoriasis were found significantly higher than those of healthy subjects, but antioxidant enzyme activities [catalase (Cat), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in erythrocyte and SOD activity in

plasma], t-lag and HDL-C levels were found significantly lower. TG levels were found to be significantly increased in isolated LDL and HDL.

If correlations are to be explained in general terms, auAb-oxLDL, MDC and oxLDL-TBARS showed positive correlations either with themselves or with atherogenic lipid parameters and lipid peroxidation products but negative correlation with antioxidant enzyme (particularly plasma SOD). On the other hand, negative correlations were observed between t-lag and VLDL- and LDL-TG. There were positive correlations either between serum LDL cholesterol and isolated LDL cholesterol or between serum HDL cholesterol and isolated HDL cholesterol.

It was concluded that psoriatic patients must be considered as a group with an increased atherosclerotic risk because of increased oxidant stress, decreased antioxidant capacity and changes in lipid and lipoprotein structure, and so increased the formation of autoantibodies.

Key words : Psoriasis, LDL oxidation, antioxidants, atherosclerosis.

9.KAYNAKLAR

1. Örem, A., Değer, O., Çimşit, G., Bahadır, S. : Plasma polymorphonuclear leukocyte elastase levels and its relation to disease activity in psoriasis. Clin. Chim. Acta, 264:49-56, 1997.
2. Seishima, M., Seishima, M., Mori, S., Noma, A. : Serum lipid and apolipoprotein levels in patients with psoriasis. Br. J. Dermatol., 130: 738-742, 1994.
3. Rocha-Pereira, P., Santos-Silva, A., Rebelo, I., Figueriredo, A., Quintanilha, A., Teixeira, F. : Dislipidemia and oxidative stress in mild and in severe psoriasis as a risk for cardiovascular disease. Clin. Chim. Acta, 303:33-39, 2001.
4. Ortonne, J. P. : Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. Br. J. Dermatol., 140:1-7, 1999.
5. Offidani, A. M., Ferrette, G., Taus, M., Simonetti, O., Dousset, N., Valdigue, P., Curatola, G., Bossi, G. : Lipoprotein peroxidation in adult psoriatic patients. Acta Derm. Venerol. (Stockh), Suppl. 186: 38-40, 1994.
6. Witztum, J. L., Steinberg, D. : Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J. Clin. Invest., 88:1785-1792, 1991.
7. Yla-Herttuala, S., Planski, W., Butler, S., Picard, S., Steinberg, D., Witztum, J. L. : Rabbit and human atherosclerosis lesions contain Ig G that recognized epitopes of oxidized LDL. Arterioscl. Thromb., 14:32-40, 1994.
8. Simonetti, O., Ferretti, G., Salui, A. : Plasma lipid changes in psoriatic children. Dermatology, 185:96-100, 1992.

9. Martinez, A. A., Rodrigues, P. G., Anfunez, P. A., Gill, M. C. C., Gonzales, F. U., Pérez A. G. : Serum levels of apolipoproteins AI, AII, and B in psoriasis. *Dermatologica*, 179: 179:200-201, 1989.
10. Jain, V. C., Bansol, R. K., Aggarwal, S. K., Chaudhary, J. D., Saini, A. S. : Erythrocyte glutathione peroxidase activity and plasma vitamin E status in patients with psoriasis. *J. Dermatol.*, 15:487-490, 1998.
11. Therond, P., Gerbaud, P., Dimon, S., Anderson, W. B., Brion, D. E., Raynaud, F. : Antioxidant enzymes in psoriatic fibroblasts and erythrocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 106:1325-1328, 1996.
12. Kopff, M., Zakrzewska, I., Stzelezyk, M., Klem, J., Dubiecki, W. : Superoxide dismutase and catalase activity in psoriatic patients treated topically with ointment containing 2-chloro ethyl-3-chloropropyl sulfide. *Pol. J. Pharmacol.*, 46: 439-444., 1994.
13. Thompson, G. R. : Hiperlipidemi el kitabı. (Çev. Enis Tamuğur) Uycan Yay. A.Ş., 1989, s. 23-41.
14. Mahley, R.W. : Aterogenezin hücresel ve moleküler biyolojisi. Kolesterol taşınması ve lipoprotein metabolizması. O. Gökdemir, K. E. Raloğlu (Editörler). Amerikan Hastanesi Lipid Kliniği, İstanbul. 1995, s. 146-150.
15. Stein, E. A., Myers, L.G. : Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In Burtis, C. A., Ashwood, E. R. (Eds), *Tietz Textbook of clinical chemistry*. WB. Saunders Company. Philedelphia, 1994, pp 1002-1093.
16. Esterbauer, H., Puhl, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., Rabl, H. : Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann. Med.*, 23:573-581, 1991.
17. Liu, S.W., Zhou, M., Chen, Y., Wen, W. Y., Sun, M. J. : Lipoperoxidative injury to macrophages by oxidatively modified low desity lipoprotein may play an important role in foam cell formation. *Atherosclerosis*, 121: 55-61, 1996.

18. Yoshikawa, M., Sakuma, N., Hibino, T., Sato, T., Fujinami T. : HDL₃ exerts more powerful anti-oxidative, protective effects against copper-catalyzed LDL oxidation than HDL₂. Clin. Chem. , 30(3): 221-225, 1997.
19. Mackness, M. I., Arrol, S., Abbott, C., Durrington, P.N. : Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high density lipoprotein associated paraoxanase. Atherosclerosis, 104:129-135,1993.
20. Çimşit, G., Örem, A., Değer, O., Alpay, K., Kıran, E., Örem, C. : The variation of serum lipoprotein (a) level with disease activity in psoriasis. Br. J. Dermatol., 138:917-919, 1998.
21. Mc Cord, J. M. : Human disease, free radicals and the oxidant/antioxidant balance. Clin. Biochem., 26:351-357, 1993.
22. Gate, L., Paul, J., Nguye, B. G., Tew, K. D., Tagiero, H. : Oxidative stress induced in pathologies: The role of antioxidants. Biomed & Pharmacother, 53: 169-80., 1999.
23. Akkuş, İ. : Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. Mimoza yayınları, Konya, 1995, s. 1-128.
24. Sinatra, S. T., De Marco, J. : Free radicals, oxidative stress, oxidized low density lipoprotein (LDL), and the heart: Antioxidants and other strageies to limit cardiovascular damage. Connecticut Med. , 59(10):579-587, 1995.
25. Kohen, R. : Skin antioxidants : Their role in aging and in oxidative stress- New approaches for their evaluation. Biomed & Pharmacother, 53 : 181 – 92, 1999.
26. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. : The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Molec. Aspects Med., 8: 89-93, 1985.
27. Knight, J. A. : Free radicals, antioxidants aging and disease. AACC Press, Washington D C, 1999, pp 1-61.

28. Farber, J. L., Kyle, M. E., Coleman, J. B. : Biology of disease. Mechanism of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.*, 62 : 670-679, 1990.
29. Knight, J. A. : Review : Free radicals, antioxidants and the immune system. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 30: 145-158, 2000.
30. Yavuzer, S. : Serbest oksijen radikallerinde karşı savunma sistemleri, Hücre II oksijen ve hücre hasarı, TTB. Tıpta Temel Bilimler Kolu, Sonbahar Okulu, 93, Kızılcahamam, 1993, s.6-9.
31. Gaetani, F. G., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, M. A., Kirkman, N. H. : Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73:334-339, 1989.
32. Fridovich, I., Blum, J. : Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, 240 (2) : 500-508 , 1985.
33. Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C. : Phospholipid hydroperoxidase glutathione peroxidase. *Int. J. Tiss. Reac*, 8:99-103, 1986.
34. Goldberg, D. M., Spooner, R. J. : Glutathione reductase. In Bergmeyer, H. U., *Methods of Enzymatic Analysis*, 3:258-264, 1987.
35. Bannister, J. V., Bannister, W. H. : Isolation and characterisation of superoxide dismutase. *Methods in Enzymology*, 105: 88-93, 1984.
36. Samokyszyn, V. M., Miller, D. M., Reif, D. W., Aust, S. D. : Inhibition of superoxide and ferritin-dependent lipid peroxidation by ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.*, 264: 21-26, 1989.
37. Olinescu, R. M., Kummerow, F. A. : Fibrinogen is an efficient antioxidant. *J. Nutr. Biochem.*, 12:162-169, 2001.
38. Belcher, J. D., Balla, J., Balla, G., Jacob, D.R., Gross, M., Jacob, H. S., Vercellotti, G. M. : Vitamin E, LDL and endothelium, brief oral vitamin supplementation

prevents oxidized LDL-mediated vascular injury *in vitro*. Arterioscler. Thromb. 13: 1779-1789, 1993.

39. Esterbauer, H., Jürgens, G., Quehenberger, O., Koller, E. : Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. J. Lipid Res., 28:495-509, 1987.
40. Simons, L. A., Konigsmark, M. V., Balasubramaniam, S. : What does vitamin E is required to reduce susceptibility of LDL to oxidation? Aust. NZ J. Med, 26: 496-503, 1996.
41. Retsky, K. L., Chen, K., Zeind, J., Frei, B. : Inhibition of copper induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper binding to LDL and 2-oxo-histidine formation. Free Rad. Biol. Med., 26:90-98, 1998.
42. Thomas, S. R., Neužil, J., Stocker, R. : Cosupplementation with coenzyme Q prevents the prooxidant effect of α -tocopherol and increases the resistance of LDL to transition metal-dependent oxidation initiation. Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol., 16:687-696, 1996.
43. Leray, C., Andriamampandry, M. D., Freund, M., Gachet, C., Cazenave, J. P. : Simultaneous determination of homologues of vitamin E and coenzyme Q and products of α -tocopherol oxidation. J. Lipids Res., 39:2099-2105, 1998.
44. Çimen, B.Y. : Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. T. Klin. Tıp Bil., 19:296-304, 1999.
45. Lincoln, J., Hpyle, C. H. V., Burnstock, G. : Nitric oxide in health and disease. In Lucy, J.A. (Ed.), Biomedical research topics, Campridge University Press, 1992, pp.44.
46. Bagnoti, M., Perugini, C., Cau, C., Bordone, R., Albano, E., Belloma G : When and why a water-soluble antioxidant becomes pre-oxidant during copper-induced low density lipoprotein oxidation : a study using uric acid. Biochem. J., 340:143-152, 1999.

47. Fuji, S., Dale, G. L., Beutler, E.: Glutathione-dependent protection against oxidative damage of the human red cell membrane. *Blood*, 63:1096-1101, 1984.
48. Hennig, B., Merarini, P., Toborek, M., Mc Clain, C. J. : Antioxidant-like properties of zinc in activated endothelial cells. *J. Am. Coll. Nutr.*, 18:152-158, 1999.
49. Sevanian, A., Ursini, F. : Lipid peroxidation in membrane and low density lipoproteins : similarities and differences. *Free Rad. Biol. Med.*, 29:306-311, 2000.
50. Esterbauer, H. Wä G., Puhl, H. : Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br. Med. Bul.*, 49:566-576, 1993.
51. Aviram, M. : Malondialdehit affects the physico-chemical and biological characteristics of oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 34:141-143, 1990.
52. Hoff, H. F., O'Neil, J. : Structural and functional cahanges in LDL after modification with both 4-hydroxynonenal and malondialdehyde. *J. Lipid Res.*, 34:1209-1217, 1993.
53. Faure, P., Corticelli, P., Richard, M. J., Arnoud, J., Coudray, C., Holimi, S., Favier, P., Roussed, A. : Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketosis patients: Influence of insulin therapy. *Clin. Chem.*, 39:789-793, 1993.
54. Dejager, S., Bruckert, E., Chapman, M. J. : Dense low density lipoprotein subspecies with diminished oxidative resistance predominate in combined hyperlipidemia. *J. Lipid Res.*, 34:295-307, 1993.
55. Wen, Y., Killalea, S., McGettigan, P., Feely, J. : Lipid peroxidation and antioxidant Vitamins C and E in hypertensive patients. *Lipid peroxidation and hypertension. I.J.M.S.*, 165 (3): 210-212, 1996.

56. Örem, A., Efe, H., Değer, O., Çimşit, G., Uydu, H. A., Vanizor, B. : Relationship between lipid peroxidation and disease activity in patients with Behçet's Disease. *J. Dermatol. Sci.* 16:11-16 , 1997.
57. Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A. : Atherosclerosis; basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. *Circulation*, 91: 2488-2496, 1995.
58. Jeandel, C., Nicolas, M. B., Dubois, F., Nabet, B. F., Renin, F., Cunny, G. : Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology*. 35:275-282, 1989.
59. Lynch, S. M., Frei, B. : Reduction of copper, but not iron by human low density lipoprotein (LDL). Implications for metal ion-dependent oxidative modification of LDL. *J. Biol. Chem.*, 270: 5158-5163, 1995.
60. Jialal, I., Devaraj, S. : Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis : a clinical biochemistry perspective. *Clin. Chem.*, 42:498-506, 1996.
61. Chait, A., Brazg, B., Washington, S., Tribble, D. L. : Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am. J. Med.*, 94:350-355, 1993.
62. Kleinveld, H. A., Naber, A. H. J., Stalenhoef, A. F. H., Democker, P. M. : Oxidation resistance, oxidation rate and extent of oxidation of human low density lipoprotein depend on the ratio of oleic acid content to linoleic acid content: Studies in Vitamin E deficient subjects. *Free Rad. Biol. Med.* 15:273-280, 1993.
63. Maziere, C., Dantin, F., Conte, M.A. , Degonville, J., All, D., Dubois, F., Maziere, J. C. : Polyunsaturated fatty acid enrichment enhances endothelial cell-induced low-density lipoprotein peroxidation. *Biochem. J.*, 336: 57-62, 1998.
64. Halliwell, B. : Oxidation of low-density lipoproteins.: questions of initiation, propagation and the effect of antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61:670S-677S, 1995.

65. Ohta, Y., Shiraishi, N., Nishikawa, T., Nishikimi, M. : Cooper-catalyzed autoxidations of GSH and -ascorbic acid: mutual inhibition of the respective oxidations by their coexistence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1474: 378-382, 2000.
66. Raveh, O., Pinchuck, I., Schnitzer, E., Fainaru, M., Schaffer, Z., Lichtenberg, D. : Kinetics analysis of copper-induced peroxidation of HDL, autoaccelerated and tocopherol-mediated peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.*, 29:131-146, 2000.
67. Napoli, C., Triggiani, M., Palumba, G., Condorelli, M., Chiarello, M., Ambrosi, G. : Glycosylation enhances oxygen radical-induced modifications and decreases acetylhydrolase activity of human low density lipoprotein. *Basic Res. Cardiol.*, 92: 96-105, 1997.
68. Parthasarathy, S., Santanam, N., Tamachandran, S., Meilhac, O. : Oxidants and antioxidant in atherogenesis : an appraisal. *J. Lipid Res.*, 40: 2143-2157, 1999.
69. Jessup, W., Kritharides, L. : Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.*, 11:473-481, 2000.
70. Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jürgens, G. : The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.*, 13:341-390, 1992.
71. Harduin, P., Tailleux, A., Lestavel, S., Clavey, V., Fruchart, J. C., Frievet, C. : Immunological and functional properties of *in vitro* oxidized low density lipoprotein. *J. Lipid Res.*, 36:919-930, 1995.
72. Kim, J. G., Sabbogh, F., Santaram, N., Wilcox, J. N., Medfer, R. M., Parthasarathy, S. : Generation of a polyclonal antibody against lipid peroxide modified proteins. *Free Rad. Biol Med.* 23:251-259, 1997.
73. Maggi, E., Finardi, G., Poli, M., Bollati, P., Fillipponi, M., Stefano, P.L., Paolini, G., Gressi, A., Clot, P., Albaro, E. : Specificity autoantibodies against oxidized LDL as an additional marker for atherosclerotic risc. *Coronary Artery Dis.*, 4:1119-1122, 1993.

74. Orekhov, A. N., Tentov, V. V., Kabokov, A. E., Adamow, I. Y., Pokrovsky, S. N., Smirnov, V. N. : Autoantibodies against modified low density lipoprotein : Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. *Arterioscler. Thromb.* 11:316-326, 1991.
75. Inbarren, C., Folsom, A. R., Jacobs, D. R., Gross, M. D., Belcher, J. D., Eckfeldt, J. H. : Association of serum vitamin levels, LDL susceptibility to oxidation and autoantibodies against MDA-LDL with carotid atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17:1171-1177, 1997.
76. Lehtimäki, T., Lehtinen, S., Solakivi, T., Nikkilä, M., Jaakkola, O., Jokela, H., Ylä-Herttula, S., Luoma, J. S., Koivula, T., Nikkari, T. : Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patient with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19:23-27, 1999.
77. Vaanalo, O., Alghan, G., Jauhiainen, N., Leirizolo-Ripo, M., Aho, K., Palosua, T. : Crossreaction between antibodies to oxidized low density lipoprotein and cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 341:923-925, 1993.
78. Maggi, E., Belezzi, R., Gazo, A., Seccia, M., Bellona, G. : Autoantibodies against oxidatively modified LDL in üremic patients undergoes dialysis. *Kidney Int.*, 46:869-876, 1994.
79. Branch, D. W., Mitchell, M. D., Miller, E., Palinski, W., Witztum, J. L. : Preeclampsia and serum autoantibodies to oxidized low density lipoprotein. *Lancet*, 343:645-646, 1994.
80. Holvoet, P., Perez, G., Zhao, Z., Brouwers, E., Bernar, H., Collen, D. : Malondialdehyde-modified low density lipoproteins in patients with atherosclerotic disease. *J. Clin. Invest.*, 95:2611-2619, 1995.
81. Örem, A., Cimşit, G., Değer, O., Vanizor, B., Karahan, S. C. : Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein in patients with Behçet Disease. *Clin. Lab. Invest.*, 198:243-246, 1999.

82. Hamilton, C. A. : Low-density lipoprotein and oxidized low density lipoprotein : their role in the development of atherosclerosis. *Pharmacol. Ther.* , 74:55-72, 1997.
83. Christophers, E., Kiene, P. : Guttate and plaque psoriasis. *Dermatol. Clin.*,13:731-756, 1995.
84. Kadunce, D. P., Krueger, G. G., Krueger, M. D. : Pathogenesis of psoriasis. *Dermatol. Clin.*, 13:723-737, 1995.
85. Raych, S. P., Rein, G., Farber, E. G. M. : Neuropathogenesis and neuropharmacology of psoriasis. *Int. J. Dermatol.*, 34:685-693.
86. Goodfield, M. : Skin lesions in psoriasis. *Bailhere's Clin. Rheumatol.*, 8:295-316, 1994.
87. Griffiths, T. W., Griffiths, C. E. M., Voorhees, J. J. : Immunopathogenesis and immunotherapy of psoriasis. *Dermatol. Clin.*, 4:739-749, 1995.
88. Greaves, M. W., Camp, R. D. R. : Prostaglandins, leukotrienes, phospholipase, platelet activating factor, and cytokines: an integrated approach to inflammation of human skin. *Dermatol. Res.*, 280:S33-S41, 1998.
89. Bartel, R., Marcelo, C. L., Gosulowsky, D., Voorhees, J. J. : Phospholipase A₂ and C activity in normal and psoriatic uninvolved and lesional epidermal. *J. Invest. Dermatol.*, 86:462-467, 1986.
90. Cooper, K. D., Hammerberg, C., Baadsgaard O. : IL-1 activity is reduced in psoriatic skin. Decreased IL-1 and increased non-functional IL-1. *J. Immunol.* 144:4593-603, 1990.
91. Marks, R., Barton, S. P. : Assessment of disease progress in psoriasis. *Arch. Dermatol.*, 125:235-240, 1989.
92. Futoryan, T., Gilchrest, B. A.: Retinoids and the skin. *Nutrition Reviews.* 52:299-310, 1994.

93. Leren, T. P., Kjell, M. M., Thume P., Berg, K. : Low density lipoprotein receptors in cultured skin fibroblast from psoriasis patients. *Clin. Genetics*, 25:230-241, 1984.
94. Vahlquist, C., Michaelsson, G., Vessby, B. : Serum lipoproteins in middle-aged men with psoriasis. *Acta Derm. Venereol.* 67:12-15, 1987.
95. Fuchs, J., Zollner, T. M., Kaufman, R., Podda, M. : Redox-modulated pathways in inflammatory skin diseases. *Free Rad. Biol. Med.*, 30:337-353, 2001.
96. Mc Cord, J. M., Fridowich, I. : Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244:6049-6055, 1969.
97. Aebi, H. E. : Catalase. In Bergmeyer, H. U., *Methods of Enzymatic Analysis*, 3:273-285, 1987.
98. Beutler, E. : Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. Grune and Stratton, New York and London, 1971, pp.64-68.
99. Ruiz, C., Alergia, A., Barberá, R., Farré, R., Lagarga, M. N. : Determination of lipid hydroperoxides by an NADPH/NADP coupled enzyme reaction system. Evaluation of a method. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 35:893-898, 1997.
100. Stocks, J., Dormandy, T. L. : The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br. J. Hamatol.*, 20:95-111, 1971.
101. Yagi, K. : Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*, Plenum Press, New York, 1994, pp.1-15.
102. Scavens, M. M., Cordonnier, C. M., Mailleux, P. M., Heller, F. R., Dessager, J. P., Harvent, C. M. : Fast separation of the three main plasma lipoprotein classes by ultracentrifugation using vertical rotor and multiple discontinuous density gradient. *Clin. Chim. Acta*, 153:125-135, 1985.

103. Mills, G.L., Lane, P.A., Weech, P. K. : A guide to lipoprotein technique. In Burton, R. H. and Knippenberg, P. H.(Eds), Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Elsevier, Netherlands, 1989, p.73.
104. Stoscheck, C. M. : Quantitation of protein. In Duetscher, M. P.(Ed.), Guide to protein purification. In Alberson, J. N. and Simon, M. I.(Eds.), Methods in Enzymology, Vol. 192, Academic Press, California, 1990, pp.72-74.
105. Lowry, O. H., Rosebrough, N. L., Farr, A. L., Randel, R. I. : Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275, 1951.
106. Proudfoot, J. M., Croft, K. D., Puddey, I. A., Beilin, L. J. : The role of copper reduction by α -tocoferol in low density lipoprotein oxidation. Free Rad. Biol. Med., 23:720-728, 1997.
107. Puhl, H., Waeg, G., Esterbauer, H. : Methods to determine oxidation of low density lipoproteins. Methods in Enzymology, 233:425-440, 1995.
108. Costantini, F., Pierdomenico, S. D., Cesare, D., Remigis, P., Bucciarelli, T., Bittolo Bon, G., Cazzolato, G., Nubile, G., Guagnano, M. T., Sensi, S., Cuccurullo, F., Mezzetti, A. : Effect of thyroid function on LDL oxidation. Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol., 18:732-737, 1998.
109. Princen, H., Duyvenvoorde, W., Buytenhek, R., Blonk, C., Tijburg, L. B. M., Languis, J. A. E., Meinders, A. E., Pijl, H. : No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid and antioxidant levels and on LDL oxidation in smokers. Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol., 18:833-841, 1998.
110. Caslake, M. J., Packard, C. J. : The use of ultracentrifugation for the separation of lipoproteins. In Rifai, N., Warnick, G. R., Dominiczak, M. H., Handbook of lipoprotein testing, AACC Press, Washington, 1997, pp.509-529.
111. Visioli, F., Bordone, R., Perugini, C., Bagnati, M., Cau, C., Belomo, G. : The kinetics of copper-induced LDL oxidation depend upon its lipid composition and antioxidant content. Biochem. Biophys. Res. Commun., 268:818-822, 2000.

112. Potts, J. L., Fisher, R. M., Humphreys, S. M., Gibbons, G. F., Frayn, K. N. : Separation of lipoprotein fractions by ultracentrifugation: investigation of analytical recovery with sequential flotation and density gradient procedures. *Clin. Chim. Acta*, 230:215-220, 1994.
113. Leonhardt, W., Pietzsch, J., Nitzsche, S. : Very fast ultracentrifugation of human plasma lipoprotein: influence of the centrifugal field on lipoprotein composition. *Clin. Chim. Acta*, 224:21-32, 1994.
114. Tong, H., Knapp, H. R., Van Rollins, M. : A low temperature flotation method to rapidly isolate lipoproteins from plasma. *J. Lipid Res.*, 39:1696-1704, 1998.
115. Bruce, D., Fu, S., Armstrong, S., Dean, R. T. : Human apo-lipoprotein B from normal plasma contains oxidised peptides. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 31:1409-1420, 1999.
116. Valkonen, M., Kuusi, T. : Passive smoking induced atherogenic changes in low-density lipoprotein. *Circulation*, 97:2012-2016, 1998.
117. Jun-Jun, W., Xiao, L., Yi-Yi, Z., Lu-yan, L. : Correlation between susceptibility of LDL subfractions to in vitro oxidation and *in vivo* oxidized LDL. *Clin. Biochem.*, 33:71-73, 2000.
118. Kuzuya, M., Yamada, K., Hayashi, T., Funaki, C., Naito, M., Asai, K., Kuzuya, F. : Role of lipoprotein-copper-peroxidation of low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1123:334-341, 1992.
119. Camejo, G., halberg, C., Manschik-Lundin, A., Hurt-Camejo, E., Rosengren, B., Olsson, H., Hansson, G. I., Forsberg, G. B., Ylen, B.: Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanism and effect on the interaction of LDL with human macrophages. *J. Lipids Res.*, 39:755-766, 1998.

120. Parthasarathy, S., Fong, L. G., Quint, M. T., Steinberg, D. : Oxidative modification of LDL: Comparison between cell-mediated and copper-mediated modification. *Eur. Heart J.*, 11:83-87, 1990.
121. Ahotupa, M., Marniemi, J., Lehtimäki, T., Talvinen, K., Raitakari, O. T., Vasankari, T., Viikari, J., Luoma, J., Ylä-Herttuala, S.: Baseline dien conjugation in LDL lipids as a direct measure of *in vivo* LDL oxidation. *Clin. Biochem.*, 31:257-261, 1998.
122. Roberts, L. J., Morrow, J. D. : Measurement of F₂-isoprostanes as an index of oxidative stress *in vivo*. *Free Rad. Biol. Med.*, 28:505-513, 2000.
123. Yan, L. J., Kodge, J. K., Traber, M. G., Matsugo, S., Packer, L. : Comparison between copper-mediated and hypochlorite-mediated modifications of human low density lipoproteins evaluated by protein carbonil formation. *J. Lipid Res.*, 38:992-1001, 1997.
124. Lavy, A., Brook, G. J., Dankner, G., Amotz, A. B., Aviram, M. : Enhanced *in vitro* oxidation of plasma lipoproteins derived from hypercholesterolemic patients. *Metabolism*, 40:794-799, 1991.
125. Loughheed, M., Steinbrecher, U. P. : Mechanism of uptake of copper-oxidized low density lipoprotein in macrophages is dependent on its extent of oxidation. *J Biol. Chem.*, 271:11798-11805, 1996.
126. Gilligan, D. M., Sack, M. N., Guetta, V., Casino, P. R., Quyyumi, A. A., Rader, D. J., Ponza, J. A., Cannon, R. O. : Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilatation in patients with hypercholesterolemia. *JACC*, 24:1611-7, 1994.
127. Fruebis, J., Bird, D. A., Pattison, J., Palinski, W. : Extent of antioxidant protection of plasma LDL is not a predictor of the antiatherogenic effect of antioxidants. *J. Lipid Res.*, 38:2455-2464, 1997.

128. Siekmeier, R., Wülfroth, P., Wieland, H., Grob, W., März, W. : Low-density lipoprotein susceptibility to *in vitro* oxidation in healthy smokers and nonsmokers. Clin. Chem. 42:524-530, 1996.
129. Giese, S. P., Esterbauer, H. : Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. FEBS lett., 343 : 188-194, 1994.
130. Ramos, P., Giese, S. P., Schuster, B., Esterbauer, H. : Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein. J. Lipid Res., 36:2113-2128, 1995.
131. Schuster, B., Prassl, R., Nigon, F., Chapman, M. J., Laggner, P. : Core lipid structure is a major determinant of the oxidative resistance of low density lipoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 28:2509-2513, 1995.
132. Leake, D. S. : Does an acidic pH explain why low density lipoprotein is oxidized in atherosclerotic lesions? Atherosclerosis, 129:149-157, 1997.
133. Krinsky, I. N. : Mechanism of action of biological antioxidants. Experimental Biol. Med., 200:248-254, 1992.
134. Uchiyama, M., Mihara, M. : Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal. Biochem., 86:271-278, 1978.
135. Gebicki, J. M., Guille, J. : Spectrophotometric and high-performance chromatographic assays of hydroperoxides by the iodometric technique. Anal. Biochem., 176:360-364, 1989.
136. Cramer, G. L., Miller, J. F., Pendleton, R. B., Lands, W. E. M. : Iodometric measurement of lipid hydroperoxides in human plasma. Anal. Biochem., 193:204-211, 1991.
137. Cathcart, R., Schwler, E., Ames, B. : Detection of picomole levels of hydroperoxides using of fluorescent dichlorofluorecein assay. Anal. Biochem., 134: 111-116, 1983.

138. Ohiski, N., Ohkawa, H., Müke, A., Tatono, T., Yagi, K.: A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative. *Biochem. Int.*, 10:205-11, 1985.
139. Lands, W. E. M. : Determination of lipid hydroperoxides by enzymatic methods. In Rice-Evans, C., Halliwell, B. (Eds.), *Free radicals methodology and concepts*, London, Richelieu Press., 1988; 218:123-128.
140. Valantine, N. W., Paglia, E. D. : Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70:158-168, 1967.
141. Snigh, V. S., Nair, S., Ahmad, H., Awasthi, C.Y., Kriskan, A. : Glutathione-s-transferases and glutathione peroxidases in Doxorubicin-resistant murine leukemic p388 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 38:3505-3510, 1989.
142. Paoletti, F., Mocali, A. : Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods Enzymol.*, 186:209-20, 1990.
143. Ishigame, K., Nishi, Y. : Superoxide dismutase activity and zinc copper and manganese concentrations in leukocytes. *Clin. Chem.*, 31: 1094-5, 1985.
144. Flohe, L., Otting, F. : Superoxide dismutase assays. *Academic Press, Methods Enzymol.*, 105:93-104, 1984.
145. Góth, L. : A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin. Clin. Acta*, 196:143-152, 1991.
146. Brenner, S., Krakowski, A., Levto, O., Helderberg, D., Werbin, B., Tamir, I. : Serum lipids in patients with psoriasis. *Dermatologica*, 150:96-102, 1975.
147. Jones, S. M., Harris, C. P., Lloyd, J., Stirling, C. A., Reckless, J. P., Mc Hugh, N. J.: Lipoproteins and their subfractions in psoriatic arthritis: identification of atherogenic profile with active joint disease. *Ann. Rheum. Dis.*, 59:904-909, 2000.

148. Khovidhunkit, W., Memon, R. A., Feingold, K. R., Grunfeld, C.: Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. *J. Infect. Dis.*, 181:462-72, 2000.
149. Yudkin, J. S., Kumari, M., Humphries, S. E., Mohamed-Ali, V. : Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*, 148:209-214, 2000.
150. Doğan, P., Soyuer, Ü., Tanrikulu, G.: Superoxide dismutase and myeloperoxidase activity in polymorphonuclear leukocytes, and serum ceruloplasmin and copper levels in psoriasis. *Br. J. Dermatol.*, 120:239-244, 1989.
151. Laurent, M. R., Panayi, G. S., Shepherd, P.: Circulating immune complexes, serum immunoglobulins and acute phase proteins in psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 40:66-69, 1981.
152. Fichtlscherer, S., Zeiher, A. M. : Endothelial dysfunction in acute coronary syndromes: association with elevated C-reactive protein levels. *Ann. Med.*, 32:515-518, 2000.
153. Susan, M., Chester, W. M. C., Susan, M.: Inflammation-mediated rheumatic diseases and atherosclerosis. *Ann. Rheu. Disease*, 59:321-325, 2000.
154. Sharma, R., Rauschhaus, M., Ponikowski, P. P, Varney, S., Poole-Wilson, P. A., Mann, D. L., Coats, A. J. S., Anker, S. D. : The relationship of the erythrocyte sedimentation rate to inflammatory cytokines and survival in patients with chronic heart failure treated with angiotension-converting enzyme inhibitors. *J. Am. College Cardiol.*, 36:523-528, 2000.
155. Severin, E., Nave, B., Stander, M., Ott, R., Traupe, H. : Total antioxidative capacity is normal in sera from psoriasis patients despite elevated bilirubin, tocopherol and urate levels. *Dermatology*, 198:336-339, 1999.
156. Borello, S., Seccia, A., Galeotti, T. : Protective enzymes in human epidermal carcinomas and psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.*, 276:338-340, 1984.

157. Corrocher, R., Ferrari, S., Gironcoli, M., Bassi, A., Gregoli, L. : Effect of fish oil supplementation on erythrocyte lipid pattern, malondialdehyde production and glutathione-peroxidase activity in psoriasis. *Clinica Chimica Acta*, 179:121-132, 1989.
158. Kokcam, I., Naziroğlu, M. : Antioxidants and lipid peroxidation status in the blood of patients with psoriasis. *Clin. Chim. Acta*, 289:23-31, 1999.
159. Juhlin, L., Edqvist, L. E., Ekman, L. C., Ljunghall, K., Olsson, M. : Blood glutathione peroxidase levels in skin disease: effect of selenium and vitamin E treatment. *Acta Derm. Venerol.(Stockh)*, 62:211-214, 1982.
160. Aukrust, P., Berge, R. K., Ueland, T., Aaser, E., Damås, J. K., Wikeby, L., Brunsvig, A., Müller, F., Forfang, K., Frøland, S. S., Gullestad, L. : Interaction between chemokines and oxidative stress: Possible pathogenic role in acute coronary syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 37:485-491, 2001.
161. Mc Gorisk, G. M., Treasure, C.B. : Endothelial dysfunction in coronary heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.*, 11:341-50, 1996.
162. Boren, J., Gustafsson, M., Skalen, K., Flood, C., Innerarity, T. L. : Role of extracellular retention of low density retention in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 11:451-456, 2000.
163. Young, I. S. , Purvis, J. A., Lightbody, J. H., Adgey, A. A. J., Trimble, E. R. : Lipid peroxidation and antioxidant status following thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Euro. Heart J.* , 14:1027-1033, 1993.
164. Shanti, A., Santanam, N., Morales, A. J., Parthasarathy, S., Murphy, A. A. : Autoantibodies to markers of oxidative stress are elevated in women with endometriosis. *Fertil. Steril.*, 71:1115-1118, 1999.

165. Pfohl, M., Schreiber, I., Leibich, H. M., Häring, H. U., Hoffmeister, H. M. : Up-regulation of cholesterol synthesis after acute myocardial infraction-is cholesterol a positive acute phase reactant? *Atherosclerosis*, 142:389-393, 1999.
166. Wilke, B. C., Vidailhet, M., Favier, A., Guillemin, C., Ducros, V., Arnaud, J., Richard, M. J. : Selenium, glutathione peroxidase before and after selenium supplementation. *Clin. Chim. Acta*, 207:137-142, 1992.
167. Andersen, H. R., Nielsen, J. B., Nielson, F., Grandjen, P.: Antioxidant enzyme activities in human erythrocytes. *Clin. Chem.*, 43:562-568, 1997.
168. Niwa, Y., Kanoh, T, Sakane, T., Soh, H., Kawai, S., Miyachi, Y.: The ratio of lipid peroxides to superoxide dismutase activity in the skin lesions of patients with severe skin disease: an accurate prognostic indicator. *Life Sci.*, 40:921-927, 1986.



ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında ARTVİN'in Hopa ilçesinde dünyaya geldi. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1993 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde lisans programını ve 1995 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl aynı Anabilim Dalında doktora programına başladı. 1994-2000 yılları arasında KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. Evli ve bir çocuk annesidir.