

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ROMATOİD ARTRİTTE LÖKOSİT PEPTİDİLARJİNİN DEİMINAZ
AKTİVİTESİ VE SERUMDA SİTRULİNLENMİŞ PEPTİTLERE KARŞI
GELİŞEN ANTİKOR SEVİYELERİNİN HASTALIK AKTİVİTESİYLE
İLİŞKİSİ PEPTİDİLARJİNİN DEİMINAZ İLE NİTRİK OKSİT
ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Dr. Ebru YURDAKONAR

Uzmanlık Tezi

Antalya, 2005



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Biyokimya ve Klinik Biyokimya
Anabilim Dalı**

**ROMATOİD ARTRİTTE LÖKOSİT PEPTİDİLARJİNİN
DEİMİNAZ AKTİVİTESİ VE SERUMDA SİTRULİNLENMİŞ
PEPTİTLERE KARŞI GELİŞEN ANTİKOR SEVİYELERİNİN
HASTALIK AKTİVİTESİYLE İLİŞKİSİ PEPTİDİLARJİNİN
DEİMİNAZ İLE NİTRİK OKSİT ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Dr. Ebru YURDAKONAR

Uzmanlık Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. S. Gültekin YÜCEL**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.
(Proje No. 2004.04.0103.011)

Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir.

Antalya, 2005

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince destek ve yardımlarını benden esirgemeyen başta danışman hocam olmak üzere tüm Biyokimya A.D. Öğretim Üyelerine teşekkür eder, onlarla çalışmaktan zevk aldığım tüm asistan arkadaşlarıma ve tez çalışmalarım boyunca çalıştıkları ortamı bizimle paylaşan Merkez Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	
1.1. Romatoid Artrit	4
1.1.1. Genel Bilgi	4
1.1.2. Etyoloji ve Patogenez	4
1.1.3. Romatoid Artrit Gelişimine Yatkınlık	6
1.1.4. Romatoid Artrit Kliniği	7
1.1.5. Romatoid Artrit Tanısı	8
1.2. Romatoid Artrit ve Otoantikorlar	8
1.2.1. Romatoid Faktör	9
1.2.2. Sitrulinlenmiş peptid antikorları	10
1.2.3. Peptidilarginin Deiminaz (PAD)	14
1.2.4. Romatoid Artrit ve Anti CCP Antikorları	15
1.3. PAD'ın Romatoid Artritteki Yeri	16
1.4. Romatoid Artritte Nitrik Oksidin Önemi	17
1.4.1. Nitrik Oksit	17
1.4.2. Artritte Nitrik Oksit	19
1.5. PAD ve NO İlişkisi	20
1.6. Romatoid Artritte Hastalık Aktivite İndeksi	21
1.6.1. SDAI (Simplified Disease Activity İndeks)	21
MATERYAL ve METOD	
2.1. Hastalar	22
2.1.1. Hasta Kabul Kriterleri	22
2.1.2. Numunelerin Toplanması	22
2.2. Periferik Kandan Lökosit İzolasyonu	23

2.2.1. Reaktifler	23
2.2.2 Lökosit İzolasyon Prosedürü	23
2.2.3. Lizat Hazırlama	24
2.3. Protein Miktarının Tayin Edilmesi	24
2.3.1. Mikro BCA Deney Kitinin Prensibi	24
2.3.2. Kullanılan Malzemeler	25
2.3.3. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması	25
2.3.4. Numunelerin Protein Miktar Tayini	26
2.4. Lökositlerde Peptidilarginin Deiminaz (PAD) Enzim Aktivitesinin Ölçümü	26
2.4.1. Kullanılan Malzemeler	26
2.4.2. PAD Aktivitesi Ölçüm Metodu	27
2.4.3. Sitrülin Ölçüm Reaktifleri	27
2.4.4. Sitrulin Standart Solüsyonunun Hazırlanması	28
2.4.5. Sitrülin Ölçüm Metodu	29
2.4.6. PAD Ölçüm Prosedürü	29
2.5. Serumda Anti CCP Ölçümü	30
2.5.1. Kitin içeriği	30
2.5.2. Ölçüm Prosedürü	30
2.5.3. Anti CCP Standart Grafiği	32
2.6. Lökositlerde NO Ölçümü	32
2.6.1. Amperometrik NO Ölçümü	32
2.6.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	32
2.6.3. NO Standart Grafiğinin Hazırlanması	33
2.6.4. Lökositlerde NO Ölçümü	35
2.7. C-Reaktif Protein(CRP), Romatoid Faktör (RF) ve Sedimentasyon Ölçümü	35
2.7.1. C-Reaktif Protein Ölçümü	35
2.7.2. Romatoid Faktör Ölçümü	35
2.7.3. Sedimentasyon Ölçümü	36
2.8. SDAI (Basitleştirilmiş Hastalık Aktivite İndeksi)	36
2.9. İn Vitro Lökosit Havuzunda NO ve PAD Ölçümü	36

2.9.1. Kullanılan Malzemeler	36
2.9.2. Deney Prosedürü	37
2.10. Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler	38
2.11. İstatistiksel Yöntemler	38
BULGULAR	
3.1. Klinik ve Laboratuar Değişkenleri	39
3.1.1. RA’da Anti CCP ve RF Düzeylerinin Değerlendirilmesi	40
3.1.2. Lökositlerde PAD aktivitesi	41
3.1.3. PAD ve Anti CCP Arasındaki İlişki	42
3.1.4. Vakaların Lökositlerinde NO Düzeyleri	43
3.2. İn Vitro İnhibisyon Deneyleri	44
3.2.1. Lökosit Havuzunda NO ve PAD İnhibisyonu	44
TARTIŞMA	47
SONUÇLAR	52
ÖZET	53
KAYNAKLAR	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACR	American Collage of Rheumatology
ADP	Adenozin Difosfat
AFA	Antifillagrin Faktör
AKA	Antikeratin Antikor
Anti CCP	Anti Siklik Sitrilünlenmiş Peptid
APF	Antiperinükleer Faktör
BAEE	Benzoyl-l-arginine Ethyl Ester
BCA	Bisinkoninikasıit
BSA	Bovine Serum Albumine
C5a	Kompleman 5a
CCP	Siklik Sitrülinli Peptid
COX	Siklooksijenaz
CRP	C-Reaktif Protein
DAS 28	Disease Activity Score 28
DMARDs	Disease Modifying Antirheumatic Drugs
DTT	Dithiotreitol
EDRF	Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IL-1β	İnterlökin-1 β
INFγ	İnterferon γ
IGF-1	İnsulin Büyüme Faktörü-1
Leu	Leupeptin
L-NMMA	L-Nitro Mono Metil Arjinin
L-NIL	L-Nitro İminoetil Lizin
MDGA	Hekimin Genel Durum Değerlendirmesi
MHC II	Major Doku Uyum Kompleksi II

MMPs	Matriks Metalloproteinazlar
MNC	Mononükleer Hücre
NF-κB	Nükleer Transkripsiyon Faktör κ B
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
cNOS	Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
ecNOS	Yapısal Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
iNOS	Uyarılabilir Nitrik Oksit Sentaz
ncNOS	Yapısal Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
PAD	Peptidilarjinin Deiminaz
pA	Piko Amper
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PGA	Hastanın Genel Durum Değerlendirmesi
PHA	Fitohemaglutinin
PNL	Polimorf Nüveli Lökosit
RA	Romatoid Artrit
RF	Romatoid Faktör
RT PCR	Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDAI	Simplified Disease Activity İndeks
SJC	Şiş Eklem Sayısı
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
TGFβ	Tümör Büyüme Faktörü β
TNFα	Tümör Nekrotizan Faktör α
TJC	Hassas Eklem Sayısı
TSC	Thiosemikarbazid
WPI	World Precision Instruments
WR	Working Reagent

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
1.2.1. PAD'ın Katalizlediği Posttranslasyonel Arjinin Modifikasyonu Ca^{++} bağımlıdır	14
1.2.2. Arjinin Rezidülerinin Deiminasyonu Molekül İçerisindeki Non Kovalent Bağları Parçalayarak Proteinin Tersiyer Yapısını Değiştirir	15
2.3.1. Protein Standart Grafiği	26
2.4.1. PAD Standart Grafiği	29
2.5.1. Anti CCP Standart Grafiği	32
2.6.1. NO Elektrodunun Kalibrasyon Düzeneği	33
2.6.2. NO Kalibrasyon Grafiği	34
3.1.1. RA ve Kontrol Grubunda Serum RF Düzeyleri	40
3.1.2. RA ve Kontrol Grubunda Serum Anti-CCP Düzeyleri	41
3.1.3. Lökositlerde PAD enzim aktivitesi	42
3.1.4. RA Vakalarında Anti-CCP ve PNL PAD Aktivitesinin Korelasyonu	43
3.2.1. Lökosit Hücre Havuzunda PHA ile Farklı İnkübasyon Sürelerinin NO Düzeyi ve PAD Aktivitesi Üzerine Etkisi	44
3.2.2. Aktif Lökosit Havuzunda NO ve PAD İnhibitörlerinin PAD (A) ve NO (B) Düzeylerine Etkisi	45
3.2.3. Aktif Lökosit Havuzunda NO ve PAD İnhibitörlerinin NO ve PAD Düzeyleri Üzerine Yüzde Etkisi	46

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.4.1. Hazırlanan Sitrülin Standartlarının Konsantrasyonları	28
2.6.1. NO Kalibrasyon Solüsyonlarının Kullanımı	34
3.1. Çalışmaya Katılan Vakalara Ait Değişkenler	39

GİRİŞ

Romatoid Artrit (RA); eklemlerde ağrı, sertlik ve şişliğe neden olarak fonksiyon kaybına yol açan kronik otoimmün bir hastalıktır. En sık karşılaşılan otoimmün romatizmal hastalık olup, bütün dünyada görülme sıklığı yaklaşık %1'dir. Patogenez, genetik ve çevresel bazı faktörlerin tetikleyici olarak rol oynadıkları ispatlandığı halde, hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak hastalığın başlangıcı net olmasa da devamlılığı sağlayan immunolojik olaylar olduğu ve bunun eklem hasarında rol oynadığı iyi bilinmektedir (1).

RA'lı olguların çoğunluğunda hastalık ortaya çıktıktan sonra iki yıl içerisinde belirgin eklem hasarı görülmektedir. Sıklıkla RA tanısının klinik ve radyolojik olarak koyulduğu zaman, eklem kıkırdağında kalıcı hasar oluşmaya başlamıştır. İleriki dönemlerde bu, sekonder artroz şeklinde sekel olarak kalabilir. Erken evrede tanı ve tedavi belirgin eklem hasarını önleyebilir. Hastalığın yol açtığı riskler ve harcamalar düşünülürse, ilk semptomlar ortaya çıktığı an itibariyle RA'nın diğer eklem hastalıklarından ayırıcı tanısının yapılması oldukça önemlidir. Bu şekilde, kalıcı eklem hasarı oluşmadan hastalığın tedavi edilmesi bugün için kabul edilen görüştür. Hastalığın kesin tanısı klinik verilere dayanır. Ancak hastalığa özgü olarak gelişen otoantikorların serolojik bir parametre olarak kullanılması, hem hastalığın tanınmasında hem de diğer patolojilerden ayırt edilmesinde son derece önemlidir. Özellikle RA'nın ilk evresinde bütün semptomlar ortaya çıkmadan önce hastalığın teşhis edilmesi hasta adına büyük yarar sağlayabilir (2,3).

Bugün, RA'lı olguların kanında çeşitli otoantijenlere karşı çok sayıda dolaşan antikor olduğunu bilmekteyiz. Bunlar içinde en iyi bilinen, IgG molekülünün F_c fragmanına karşı gelişen romatoid faktör (RF)'dür. RA'lı hastaların yaklaşık %75'inde RF antikoru pozitifdir. Ancak RF, diğer otoimmün bozukluklarda, infeksiyon hastalıklarında ve hatta sağlıklı bireylerde (%3-5) de bulunabildiğinden RA'ya özgüllüğü sınırlıdır. Buna rağmen RF, Romatoid Artrit'de yaygın olarak tanı amaçlı kullanılan bir parametredir. RF varlığı, ACR

(American College of Rheumatology) tarafından kabul edilen RA tanı kriterlerinden biridir (4).

Bugün, yapısında sitrulin içeren proteinlere karşı geliştiği gösterilmiş bir grup antikorun RA için RF'den çok daha spesifik olduğu anlaşılmıştır. Bu gruptan ilk olarak 1970'de RA'lı hasta serumlarında yanak mukoza hücrelerinin keratohyalin granüllerinde bulunan, farklılaşmış filaggrin proteinine karşı gelişmiş antiperinükleer faktör (APF) tanımlanmıştır. Ardından aynı antijene karşı gelişen anti keratin antikor (AKA) ve antifillagrin antikor (AFA) bulunmuştur. Hücre farklılaşması sırasında, filaggrin alt birimlerine parçalanır. Daha sonra filaggrinin yapısındaki arjinin aminoasit kalıntıları, enzimatik olarak posttranslasyonel modifikasyona uğrar ve sitrulin aminoasidine dönüşür. Sitrulinlenme yada deiminasyon adı verilen dönüşüm, Ca^{++} bağımlı bir enzim ailesi olan, peptidilarjinin deiminaz (PAD) grubu tarafından katalizlenir. Oluşan protein, tersiyer yapısı farklı ve antijenitesi daha fazla olan yeni bir proteindir ve bir otoantijen gibi hareket eder. RA'da periferik kandan sinoviyuma nötrofillerin de göç ettiği bilinmektedir. İnflamasyonun etkisiyle artan nötrofil membran geçirgenliği, hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunu artırır. Buda nötrofillerdeki PAD4 enziminin aktive olmasına neden olur. Aktive PAD4, ekstrasvasküler fibrin proteinini sitrulinler ve oluşan bu modifiye fibrin proteinine karşı, bölgesel özelleşmiş B lenfositler tarafından otoantikor sentezlenir. Sitrulinli peptitlere karşı gelişen bu antikorlar, RA'lı hastaların hem sinoviyal dokularında hemde serumlarında gösterilmiş olup hastalık için oldukça spesifiktir (5-9).

Sitrülinli peptidler ve diğer antijenler, RA'nın erken tanısında ve prognozunda belirteç olarak kullanılabilir. Bugün AFA'lara kıyasla çok daha kolay kullanılan sentetik siklik sitrülinlenmiş peptitlere (CCP) karşı gelişen otoantikorların (anti CCP) ölçümü gündemdedir. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay) yöntemiyle kolayca tayin edilebilmesi, spesifikliği, erozif artrit formunu önceden saptayabilme özelliği ile çok erken dönemde RA tanısına imkan vermesi ve prognozu yansıtması nedeniyle siklik sitrülinli peptidlerin gelecekte

RA için başlıca serolojik belirteç olma potansiyeli yüksektir. RA'da otoantikorların patojenik özellikleri hala tartışılmaktadır (7-9).

Romatoid artrit multifaktoriyal bir hastalıktır. Bu güne kadar yapılan bir çok çalışma, inflamatuvar eklem patogenezinde ve inflamasyonun kronikleşmesinde nitrik oksidin (NO) de rolü olduğunu göstermiştir (10-15). İlk kez 1995'te Sakurai ve ark. RA'da kondrosit ve sinoviyositler ile yapılan immunhistokimya deneylerinde indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) ekspresyonunu göstermişlerdir (10). Normal durumda eklem içindeki major NO kaynağı kondrositler ve sinoviyositik fibroblastlar iken, inflamasyonda eklem içi en önemli NO kaynağının, periferden bölgeye göç eden monositlerin oluşturduğu makrofajlar olduğu anlaşılmıştır (11,12). Yine inflamatuvar eklem alanına göç eden nötrofillerin de özellikle artan iNOS aktiviteleri üzerinden NO sentezini arttırarak patogeneze katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır (13,16). Özellikle IL-1 başta olmak üzere bazı sitokinlerin uyarısıyla kondrositler, bölgesel makrofajlar ve nötrofillerde NO sentezi artar. Artan NO'nun artrit patogenezinde, kondrositlerde apoptozisi arttırarak, siklooksijenaz enzimini (COX) ve matriks metalloproteinazları (MMPs) aktive ederek etki gösterdiği bilinmektedir (11,12,14,15).

Bizim bu çalışmadaki ilk amacımız, aktif dönemdeki ve remisyonadaki romatoid artritli vakaların serumunda, romatoid faktör ile birlikte sitrülünli peptitlere karşı gelişen antikor seviyelerini saptamak, aynı vakaların periferik kan nötrofil ve mononükleer hücrelerinde PAD enzim aktivitesini ve nitrik oksit (NO) düzeyini tayin etmek ve bunların hastalık aktivitesi ile olası ilişkilerini değerlendirmek, ikinci amacımız ise, invitro deney ortamında, lökositlerdeki PAD enzimi aktivitesiyle NO düzeyi arasındaki olası bir ilişkiyi araştırmaktır.

GENEL BİLGİ

1.1 ROMATOİD ARTRİT

1.1.1. Genel Bilgi

Romatoid artrit (RA), primer olarak el ve ayakların küçük eklemlerini tutan simetrik poliartriküler bir hastalıktır. Poliartritle sınırlı olmayıp daima eklem dışı semptom ve bulgular da gösteren bu tablo insanlarda en sık görülen sistemik, otoimmün hastalık olarak bilinmektedir. Normalde çok az sayıda hücrel eleman içeren sinoviyum RA'lı vakalarda, çok sayıda lenfosit ve makrofaj tarafından infiltre edilir. Makrofaj ve fibroblast benzeri sinoviyal hücrelerdeki hiperplazi ve bu hücrelerden salgılanan metalloproteinaz ve serin proteazlar gibi yıkıcı enzimler sayesinde extrasellüler matrikste yıkım başlar ve eklem yapısında hasar ortaya çıkar (1).

1.1.2. Etiyoloji ve Patogenez

Romatoid artrit (RA), toplumun % 0.5-1'ini etkileyen en sık karşılaştığımız inflamatuvar artrit tablosudur (2-4). Vakaların %80'i 35-80 yaş arasındadır. Hastalığın pik yaptığı dönemler ise kadınlar için 55-65 yaş, erkekler içinse 65-75 yaş arasındadır. RA'nın kadınlarda görülme sıklığı diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi erkeklerden daha fazladır (kadın/erkek: oranı: 3/1). Bu oran genç hastalarda 4/1 gibiyken, yaş ilerledikçe hemen hemen eşitlenir (3,4).

Romatoid artrit özellikle bir eklem hastalığı olarak kabul edilse de eklem dışı bazı patolojilere de neden olabilir. Bu da romatoid artrit bazı major organ sistemlerini tutabilen sistemik bir hastalık olduğunu göstermiştir. Bazı vakalarda bu eklem dışı bulgulara katkı sağlayan immün kompleks oluşumu ile birlikte, romatoid faktör (RF) üretimi söz konusudur. Romatoid artrit için en esrarengiz soru, primer hedefin niçin eklemler olduğudur. Bunun anlaşılması, inflamatuvar

hücrelerin ve antijenlerin eklemlere ilgisinin ve eklemi hedef alan spesifik reseptörlerin ve inflamasyonun merkezindeki kemotaktik ajanların neler olduğunun anlaşılmasına bağlıdır (2,3).

Günümüzde major doku uyum kompleksi II (MHC II) ve spesifik RF geninin bulunması ile yapılan detaylı immunogenetik çalışmalar birçok önemli ipucu sağlamıştır. Ancak bugün hala romatoid artritinin sebebi kesin olarak bilinmemektedir. 1990'lı yılların başından bu yana patogeneze alanında, inflamasyonun küçük molekülü aracıları (araşidonik asit ve metabolitleri), sitokinler, büyüme faktörleri, hücre adezyon molekülleri ve matriks metalloproteinazları dikkatle incelenmiştir. Bu ürünler hem sinoviyositlerin aktivasyonuna ve proliferasyonuna hem de periferel kan hücrelerinin aktivasyonuna neden olur. Proteazlar, eklem kıkırdağı, subkondral kemik, tendonlar ve ligamentlerin yıkımına yol açarak patolojinin lokalize bir tümör gibi davranmasına neden olurlar. Günümüze kadar yapılmış birçok çalışma inflamatuvar eklem patogenezinde ve inflamasyonun kronikleşmesinde endotelden salınan gevşeme faktörü (EDRF) olarak da bilinen nitrik oksidin (NO) de rolü olduğunu göstermiştir.(10-15). İlk kez 1995'te Sakurai ve ark., RA'da kondrosit ve sinoviyositler ile yapılan immunhistokimya deneylerinde indüklenebilir nitrik oksit sentazın (iNOS) ekspresyonunu göstermişlerdir (10). Normal durumda eklem içindeki major NO kaynağı kondrositler ve sinoviyositik fibroblastlar iken, inflamasyonda eklem içi en önemli NO kaynağının, periferden bölgeye göç eden monositlerin oluşturduğu makrofajlar olduğu anlaşılmıştır (11,12). Yine inflamatuvar eklem alanına göç eden nötrofillerin de, özellikle artan iNOS aktiviteleri üzerinden NO sentezini arttırarak patogeneze katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır (13,16), Özellikle interleukin-1 (IL-1) başta olmak üzere bazı sitokinlerin uyarısıyla kondrositler, bölgesel makrofajlar ve nötrofillerde NO sentezi artar. Artan NO'nun artrit patogenezinde, kondrositlerde apoptozisi arttırarak, siklooksijenaz enzimini (COX) ve matriks metalloproteinazları (MMPs) aktive ederek etki gösterdiği bilinmektedir (11,12,14,15).

Çalışmalar, geri dönüşümsüz eklem kıkırdak yıkımının romatoid artrit erken döneminde başladığını göstermektedir. Bu nedenle tedaviye, eklem hasarından korunmak için erken dönemde başlanması zorunludur (3).

Romatoid artrit patogenezi, genetik ve çevresel bazı faktörlerin tetikleyici oldukları ispatlandığı halde tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak hastalığın başlangıcı net olmasa da devamlılığı sağlayan immunolojik olaylar olduğu bilinmektedir (3,4).

1.1.3. Romatoid artrit gelişimine yatkınlık

Genetik Faktörler

Romatoid artrit patogenezi bugün de esrarengizliğini korurken, yapılan çalışmalar genetik ve çevresel faktörlerin her ikisinin de sorumlu olduğunu göstermektedir. Genetikçiler yalnız olmamakla birlikte baskın olan risk faktörünün kişinin MHC- II haplotipi olduğuna inanmaktadır. 6. kromozomdaki MHC’de lokalize olan insan lökosit antijen (HLA) geni ve romatoid artrit arasındaki genetik bağlantı ilk kez 1970’li yıllarda tanımlanmış ve romatoid artritli vakaların % 70’inde HLA DR + bulunmuştur (5).

Çevresel Faktörler

Tek yumurta ikizlerinde romatoid artrit eş zamanlı görülme oranının % 100 olmadığının saptanması üzerine genetik olmayan bazı faktörlerin de hastalık etyolojisinde rol aldığı anlaşılmıştır (6).

Romatoid artrit kadınlarda baskın olan kronik inflamatuvar hastalıklardan birisidir. Kadın/Erkek oranı 2:1 ile 4:1 arasındadır. Cinsiyet farkının temelinde kesin olarak bilinmese de hormonların immun fonksiyona olan etkileri olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, romatoid artritli erkeklerde özellikle testosteronun daha düşük ve oral kontraseptif kullanan kadınlarda romatoid artrit

gelişme riskinin daha nadir olduğunu göstermiştir. Bu bilgiler hastalık gelişiminde hormonal faktörlerin önemli rol alabileceğini desteklemektedir. Gebelik de romatoid artrit gelişimi için bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir. Ancak çalışmalar gebelik süresince romatoid artrit başlangıcının çok nadir olduğunu, doğumdan sonra ise arttığını göstermiştir. Sigara kullanımı özellikle erkeklerde artan RF sentezi ve romatoid artrit gelişme riski ile ilişkilidir (7). Bakteriler ve viruslar gibi pek çok infeksiyon ajanının romatoid artrit tetiklediği öne sürülmüştür. Fakat infeksiyon ajanlarıyla romatoid artrit gelişimi arasında bir ilişki bulunamamıştır (7).

1.1.4. Romatoid Artrit Kliniği

Romatoid artrit esas olarak periferik eklemleri tutan kronik, ilerleyici, sistemik inflamatuvar bir patolojidir. Hafiften ağıra kadar çeşitli derecelerde fonksiyon kaybına neden olması ve bunların ömür boyu sürebilmesi nedeniyle önemli sosyal, psikolojik ve ekonomik sorunlara yol açar. Yavaş veya ani ve şiddetli başlangıçlı olabilir. Tüm vakalardaki genel semptomlar simetrik eklem ağrısı ve şişliği halsizlik ve sabah tutukludur. Hastalığın seyri değişkenlik gösterir. Bazı vakalarda hafif kısa süreli oligoartriküler eklem tutulumu ve minimal harabiyetle giderken bazı vakalarda ciddi eklem harabiyetine yol açan ilerleyici poliartrit tablosu gösterir. Vakaların çoğu ise bu iki ucu arasında kalır ve sinsi başlangıçlıdır. Gidişat ise çoğunlukla tedavinin devamını gerektirmeyecek kısmi veya tam remisyonlarla karakterizedir. Remisyon süreleri toplamı hastalık süresinden uzundur. Romatoid artritin eklem semptomları, hastalığın başlangıcında özellikle küçük eklemleri tutan simetrik inflamatuvar bir poliartrit ile karakterizedir. Sıklıkla etkilenen eklemler el ve ayak parmakları başta olmak üzere el bileği, diz ve ayak bileğidir. Hastalıkta eklem dışı tutulumlar özellikle başka ağır patolojilere sahip vakalarda görülebilir ve oküler, pulmoner, hematolojik, vasküler, kardiyak, nörolojik ve mukozal dokuları etkileyebilir. 1980'li yıllardan bu yana bilinen bu patolojinin diğer kronik artritlerden ayrılması uzun yıllar almıştır (8).

1.1.5. Romatoid Artrit Tanısı

Klinik Tanı

Romatoid artrit tanısı tipik ve ilerlemiş vakalarda önemli bir zorluk göstermezken, erken ve atipik vakalarda kesin tanıyı koymak mümkün olmayabilir. Hastalığın tanısı esas olarak klinik bulgulara dayanır. Bugün için en sık kullanılan Amerikan Romatizma Derneğinin (ACR) 1987’de yeniden düzenlediği tanı kriterleridir (9).

1987 ACR Tanı Kriterleri

1. Sabah tutukluğu (60 dakikadan uzun süreli)
2. 3 veya daha fazla eklemden artrit
3. El eklemlerinde artrit
4. Simetrik artrit
5. Romatoid nodül varlığı
6. RF pozitifliği
7. El ve el bileği direkt grafilerinde erozyon veya dekalsifikasyon varlığı.

1.2. ROMATOİD ARTRİT VE OTOANTİKORLAR

Romatoid artritte immun yanıtın direkt olarak kişinin kendi antikorlarına karşı gelişmiş olabileceği romatoid artritli vakaların kanında RF’nin bulunması ile fark edilmiştir. İlk olarak Waaler daha sonrada Rose tarafından tanımlanan bu faktörün, 1950’lerin ortasında Kunkel ve arkadaşları tarafından bir otoantikor olduğu öne sürülmüştür. Buda romatoid artritin otoimmün bir hastalık olduğunu göstermiştir (1).

1.2.1. Romatoid Faktör

Romatoid faktörün bir antikor olarak tanımlanması ve romatoid artritli hastaların kanlarında romatoid faktörün (RF) saptanması otoimmunitenin romatoid artrit patogenezinde rol oynayabileceğinin ilk kanıtı olmuştur. RF, ilk olarak 1939'da Waaler tarafından tanımlanmış ve ilerleyen yıllarda bunun romatoid artritli vakaların sinoviyumlarında T lenfositlerce aktive edilmiş B lenfositler tarafından sentezlenen ve salınan, IgG'nin Fc fragmanına karşı gelişmiş bir antikor olduğu anlaşılmıştır. Bu bilgiler romatoid artritin, otoantikorların aracılık ettiği otoimmun bir hastalık olabileceğini düşündürmüştür. Hastalığa yakalanan vakaların % 80 kadarının RF seropozitif olması bu düşüncüyü güçlendirmiştir. 1960'larda RF'nin RA patogenezindeki primer rolünün immun kompleks aracılı bir hastalık başlatmak olduğu öne sürülmüştür. RF'nin semptomlar başlamadan önce pozitifleşmesi hastalık başlangıcında bir rolü olmadığını düşündürse de hastalığın sürdürülmesinde immun sistemin büyük rolü olduğu bilinmektedir. Özellikle ciddi seyreden ve eklem dışı komplikasyonları (vaskülit, romatoid nodül) olan romatoid artritli hastalarda daha yüksek bulunması bunu desteklemektedir (3,4,6-9,17).

Bu hipoteze göre RF ve belkide komplemana bağlı başka otoantikorlar tarafından immun kompleksler oluşturulmakta ve kompleman 5a (C5a) gibi kemotaktik faktörler salınmaktadır. Bunların etkisiyle başta nötrofiller olmak üzere romatoid eklem gelen inflamatuvar hücreler burada aktive olup salgıladıkları proteolitik enzimlerle eklem hasarına katkıda bulunmaktadır (1).

Bugün gelinen nokta bu bilgileri doğrular niteliktedir. Ancak bu tablonun RA için özel olmadığı, immunité aracılı enfeksiyon hastalıklarının çoğu için geçerli olduğu da bilinmektedir (1-3).

RA'lı hastaların kanında çeşitli otoantijenlere karşı gelişmiş çok sayıda dolaşan antikor tespit edilmiştir. RF bunların en iyi bilineni ve klinikte en sıklıkla kullanılanıdır. Ancak bu antikorum kronik inflamatuvar hastalıkların çoğunda hatta

ileri yaştaki sağlıklı bireylerde bile saptanmış olması RA için spesifitesini kısıtlamaktadır (4,5).

1.2.2. Sitrulinlenmiş peptid antikoları

Günümüzde RA için RF'den çok daha spesifik bir otoantikor ailesi tanımlanmıştır (6). Bu antikoların, yapısında sitrulin içeren proteinlere karşı geliştiği gösterilmiştir.

İlk olarak 1970'de RA'lı hasta serumlarında yanak mukoza hücrelerinin perinükleer granüllerine bağlanan antiperinükleer faktör (APF) antikoları tanımlanmıştır. Bu antikolar, diferansiye yanak mukoza hücrelerinin sitoplazmasındaki granüllerin protein kısmına karşı oluşan antikolardır. APF, nispeten duyarlılığı yüksek (RA'lı olguların %49-91'inde) ve kuvvetli özgüllük (%73-99) gösteren bir antikordur. Toplumda az sayıda bireyden donör olarak faydalanılarak perinükleer faktör eksprese edebilen diferansiye yanak mukoza hücreleri elde edilebilir. Antikolun düzeyleri indirekt immünfloresans yöntemiyle ölçülmektedir. APF oldukça duyarlı ve özgül bir test olmasına rağmen kolay tayin edilemediği için rutin tanı kriteri olarak tercih edilmemektedir (1,7-9,17-19).

Sitrülinlenmiş peptid antikol ailesinin diğel bir üyesi bir epitel proteini olan filaggrine karşı oluşmuş anti keratin antikol (AKA)'dur. AKA'da APF antikoları gibi aynı antijene karşı oluşur. RA'lı hastaların %36-59'unun serumunda bu antikolara rastlanır. RA için oldukça özgül (%88-99) otoantikolardır. AKA, indirekt immünfloresans yöntemi ile tayin edilir. APF'de olduğu gibi bu antikoların tayininde de benzer zorluklarla karşılaşıldığından her ikisi de RA için potansiyel tanı göstergesi olabilmelerine rağmen teknik güçlüklerden dolayı tercih edilmemektedir. Hem AKA hem de APF yanak mukoza hücrelerinin keratohyalin granüllerinde bulunan farklılaşmış filaggrin proteinine karşı oluştuğundan antifilaggrin antikol (AFA) olarak da tanımlanırlar. Hücre farklılaşması sırasında filaggrin alt birimlerine parçalanır. Daha sonra filaggrinin yapısındaki arjinin aminoasit kalıntıları enzimatik olarak

posttranslasyonel modifikasyona uğrar ve sitrulin aminoasidine dönüşür. AFA, AKA ve APF modifiye olan filaggrin proteinine karşı gelişir. AFA, RA için oldukça özgül (%99) bir test olmasına rağmen diğer parametrelerde olduğu gibi analiz yöntemindeki teknik zorluklardan dolayı uygulanması yaygınlık kazanmamıştır (20-23).

Filaggrin antijenini saf olarak elde etmek çok zordur. Sitrulinin antijenik yapısı için mutlaka gerekli olduğu anlaşıldıktan sonra sitrulinli peptidlerin antijen olarak kullanılması fikri öne sürülmüştür. Bu amaçla başta dokuz farklı sitrulin peptidi birleştirilerek test duyarlılığı %76'ya ve özgüllüğü %96'ya yükselmiştir. Bu test daha sonra geliştirilmiş ve daha basit yapıda olan, RA otoantikorları tarafından en iyi şekilde tanınan, tek bir siklik peptid kullanılmaya başlanmıştır (8,17).

Sitrülinli peptidler ve diğer antijenler RA'nın erken tanısında ve prognoz da belirteç olarak kullanılabilir. Bunlar içerisinde özellikle siklik sitrulin peptidleri (CCP), ELISA yöntemiyle kolayca tayin edilebilmesi nedeniyle ön planda yer alır. Spesifikliği, eroziv formu önceden saptayabilme özelliği ve çok erken dönemde RA tanısına imkan vermesi nedeniyle siklik sitrulin peptidlerinin gelecekte RA için başlıca serolojik belirteç olma potansiyeli yüksektir. Ayrıca anti-CCP diğer parametrelere göre birkaç nedenden dolayı daha avantajlıdır (24-28).

- Anti-CCP, APF ve AKA kadar özgül bir testtir. Diğer parametrelere göre analiz kolaylığı ve avantajı vardır. İmmunfloresans metoduna bağlı teknik zorluklar anti-CCP için ELISA yöntemi ile aşılmıştır (29-31) .
- Anti-CCP antikorları, duyarlılığı hafif düşük olmasına rağmen RA'da çok erken evrede serumda saptanabilmektedir. Bu otoantikorlar, RA için prognoz takibinde kullanılabilecek iyi bir parametre olarak gözükmektedir (31).

- Anti-CCP antikorları eroziv ve eroziv olmayan RA ayırıcı tanısında çok güçlü bir parametredir. RA'da anti-CCP, RF ile birlikte bakıldığında prognoz takibi açısından çok daha etkili olabilir (31).
- Anti-CCP pozitif olan RA'lı olgularda radyolojik olarak eklem hasarı, negatif olanlara göre daha belirgindir. Bu, anti-CCP antikorlarının prognoz açısından önemli olduğunu göstermektedir. Bu antikorların belirli aralıklarla tayini klinik takipte faydalı olabilir. Yapılan çalışmalar RF'nin anti-CCP'ye göre daha duyarlı (%62) fakat daha az özgül (%84) bir test olduğu göstermiştir (31).
- Bu hastalarda anti-CCP ve IgM-RF beraber bakıldığında, tek başına anti-CCP'ye göre özgüllüğün %98'den %99.6'ya yükseldiği görülmüştür. Anti-CCP reaktivitesi ile erken evredeki artrit arasında anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. RA'nın erken tanısı için yapılan klinik çalışmalarda kalıcı artrit ile en güçlü korelasyonun anti-CCP pozitifliği ve semptomların devamlılığı arasında olduğu gösterilmiştir. Artrit olgularında erken evrede (1 yıldan daha kısa sürede tanı koyulan hastalar) anti-CCP ile korelasyonun anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu da anti-CCP'nin erken evrede tanı kriteri olarak kullanılabilmesini desteklemektedir. Erken dönemde RA tanısı, tedavi stratejisinin belirlenmesine yardımcı olabilir. Gerekirse çok güçlü bir farmakolojik tedavi uygulanarak eklem hasarının ilerlemesi geciktirilebilir ve hastalığın doğal gidişi iyileştirilebilir (31).
- Erken evrede RA'nın poliartritli olgulardan ayırıcı tanısında, anti-CCP'in IgM-RF ile birlikte bakılması tek başına IgM-RF'e göre daha değerlidir. Anti-CCP testinin özgüllüğünü sağlayan bir diğer kriterin, RA inflamasyon bölgesinde antijen cevabına karşı olgunlaşan CCP'ye özgü B lenfosit hücrelerinin varlığı olduğu ileri sürülmektedir. Anti-CCP pozitif RA'lı olguların sinoviyal sıvılarından alınan örneklerde B lenfositlerin spontan olarak anti-CCP antikorları ürettiği görülmüştür. Periferik B

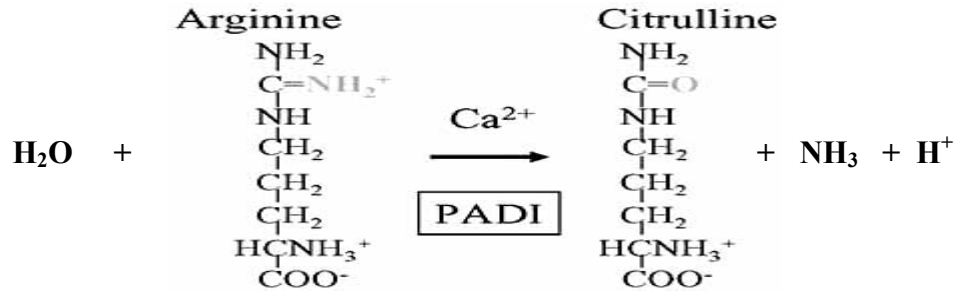
lenfositler veya anti-CCP negatif olguların sinoviyal sıvısındaki B lenfositler ise bu antikörleri üretmez (32-35).

Anti-CCP, RA'da erken tanı koyulması ve sinoviti olan hastalarda erken dönemde RA'nın saptanmasının yanısıra sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi diğer bağ dokusu hastalıklarından da ayırıcı tanısında değerli bir parametredir. Yapılan tüm çalışmalar sitrülün antijenlerinin RA'nın tanısında, prognozunda ve tedavisinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu ileri sürmektedir. RA'da otoantikörlerin patojenik özellikleri hala tartışılmaktadır. Sitrülün peptidleri ve diğer antijenler RA'nın erken tanısında ve prognozunda belirteç olarak kullanılabilir. Bunlar içerisinde özellikle siklik sitrülünli peptidlere karşı gelişen antikörler ELISA yöntemiyle kolayca tayin edilebilmesi nedeniyle ön planda yer alır. Spesifikliğı, eroziv formu önceden saptayabilme özelliğı ve çok erken dönemde RA tanısına imkan vermesi nedeniyle siklik sitrülün peptidlerinin gelecekte RA için başlıca serolojik belirteç olma potansiyeli yüksektir (36-38).

Anti-CCP antikörleri, sitrulin peptidlerine karşı oluşan otoantikörlerdir. Son zamanlarda yapılan klinik çalışmalar Anti-CCP'nin RA için oldukça özgül (%98) ve duyarlı (%68-75) bir test olduğunu göstermektedir. Bunlar sebeple RA için en değerli belirtecin, %98'lik spesifiteyle vakaların %80 kadarının serumlarında saptanabilen anti CCP olduğu düşünülmektedir. Bu antikörün isimlendirilmesi, ölçümü için kullanılan metoda göre yapılmıştır (24,25). RA için oldukça spesifik olan anti CCP antikörleri hastalığın çok erken dönemlerinde saptanabilmekte ve klinik gidişi büyük ölçüde yansıtabilmektedir. Bu sebeplerden ötürü romatologlar tarafından RF'den daha faydalı bir belirteç olarak kabul edilmektedir (24,25).

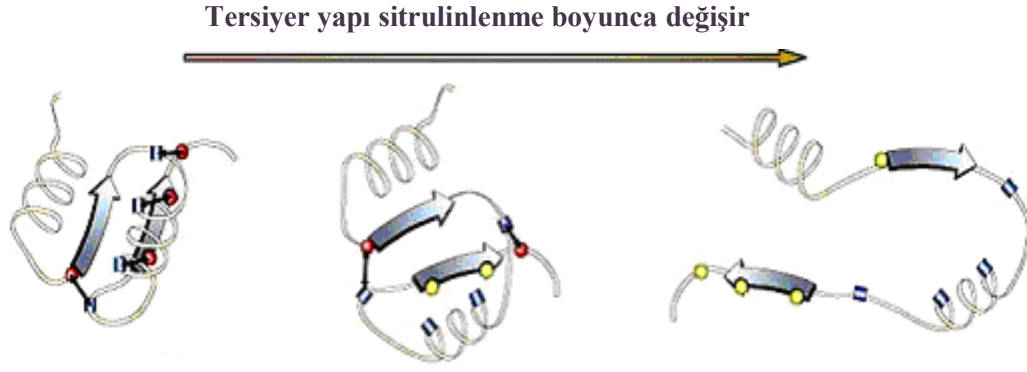
1.2.3. Peptidilarjinin Deiminaz (PAD)

PAD (EC 3.5.3.15) proteinlerin yapısındaki arjinin rezidülerinin guanidino grubunu üreido grubuna hidrolize ederek sitrulin rezidülerine çeviren ve reaksiyon sonunda NH_3 açığa çıkartan bir enzimdir (39-43). Sitrulin standart olmayan bir amino asittir ve translasyon sırasında proteinlerin yapısına katılmaz. Ancak bazı durumlarda proteinlerin yapısındaki arjininlerin posttranslasyonel enzimatik deiminasyonu ile sitruline dönmeleri sonucu sitrulin içeren modifiye proteinler oluşabilir (şekil 2.2.1). Bu reaksiyon sitrulinasyon olarak adlandırılır ve katalizleyen enzim peptidilarjinin deiminaz (PAD)dır (39-43).



Şekil 1.2.1. PAD'ın katalizlediği posttranslasyonel arjinin modifikasyonu Ca^{++} bağımlıdır (34).

Bu enzimin memelilerde, her biri farklı doku dağılımına sahip 4 izoformu bulunmuştur (34). Ca^{++} iyonuna bağımlı olan enzimin PAD1 ve PAD3 izoformları başlıca epidermis ve saç folliküllerinde (34-36), PAD2 kas, beyin dokusu ve hematopoetik hücrelerde, PAD4 ise (insanda PAD5 olarakta bilinir) primer olarak hematopoetik hücrelerde görülmüştür (36).



Şekil 1.2.2. Arjinin rezidülerinin deiminasyonu molekül içerisindeki non kovalent bağları parçalayarak proteinin tersiyer yapısını değiştirir

Northern blot tekniğiyle PAD4 proteininin dokulardaki dağılımı incelendiğinde bu izoformun özellikle kemik iliğinde ve periferik kandaki nötrofil ve monositlerde yüksek miktarlarda sentezlendiği gösterilmiştir (43-47). Sağlıklı bireylerde yapılan immunhistokimyasal çalışmalar sonucunda kandaki nötrofillerde PAD aktivitesinin çoğunun PAD4'e, lenfosit ve monositlerde ise PAD2 ve PAD4'e ait olduğu gösterilmiştir (43-47).

1.2.4. Romatoid Artrit ve Anti CCP Antikorları

RA'lı vakaların sinoviyal doku örneklerinde ve sinoviyal sıvılarındaki anti-CCP miktarları aynı hastaların serum değerlerinden sırasıyla 7,5 ve 1,4 kat daha fazla bulunmuştur (47). Bununla beraber anti-CCP antikorlarını sentezleyen hücreler RA'lı sinoviyal dokuda saptanmıştır. Bu veriler bir araya getirildiğinde RA'lı sinoviyumda anti-CCP'ye spesifik B lenfositlerin gelişimine neden olan sitrulinlenmiş proteinlerin olduğu sonucu çıkmaktadır. Gerçektende bugün RA'lı sinoviyumda sitrulinlenmiş proteinlerin varlığı yapılan immunhistokimyasal çalışmalar ile gösterilmiştir (47-52).

1.3. PAD'IN ROMATOİD ARTRİTTEKİ YERİ

RA'lı sinoviyal dokuda anti CCP ve sitrulinlenmiş proteinlerin varlığının gösterilmesi bu alanda PAD enziminin de olması gerektiğini akla getirmiştir. Bugün RA'lı vakaların sinoviyal dokularında, insitu RT-PCR ve immunhistokimyasal teknikler kullanılarak sitrulinlenmiş proteinlerin yanısıra PAD4 ve PAD2 proteinlerinin varlığı da kanıtlanmıştır. Sinoviyal dokuda bu enzimin kaynağı olarak iki hücre gösterilmiştir; aktive makrofajlar ve nötrofiller (53,54). RA'da, periferik kandan sinoviyal dokuya çok sayıda monosit göç eder. Ekleme ulaşan monositler aktive makrofajlara dönüşerek sinoviyal mambrana yerleşirler. Bu hücrelerin PAD2 ve PAD4 sentezlediği ve RA'lılarda sitrulinlenmiş protein içerdikleri gösterilmiştir (27,35,38,39). İnflamasyona bağlı olarak artan membran geçirgenliği sonucu hücre içi Ca^{++} konsantrasyonu yükselir. Buna bağlı olarak aktive olan PAD enzimi makrofajlarda bulunan vimentin proteinini sitrulinler. Bu dönüşümden sorumlu olan enzimin PAD2 izoformudur. Oluşan modifiye vimentin proteinine karşı, sinoviyal doku B lenfositleri tarafından spesifik otoantikorlar sentezlenir. Anti Sa antikorları olarak tanımlanan bu antikorlar RA'lı hastaların serumlarında da gösterilmiş olup çok yüksek bir spesifiteye sahiptir. Ancak şuan ticari bir kiti olmadığından rutinde kullanılamamaktadır (27,39,40).

RA'da periferik kandan sinoviyuma nötrofillerin de göç ettiği bilinmektedir. İnflamasyonun etkisiyle artan nötrofil membran geçirgenliği hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunu arttırır. Buda PAD4 enziminin aktive olmasına neden olur. Aktive PAD4, ekstrasvasküler fibrin proteinini sitrulinler ve oluşan bu modifiye fibrin proteinine karşı bölgesel özelleşmiş B lenfositler tarafından otoantikor sentezi gerçekleşir. Oluşan anti-CCP antikorları RA'lı hastaların hem sinoviyal dokularında hemde serumlarında gösterilmiş olup hastalık için oldukça spesifiktir. Bu antikorun saptanmasına yönelik geliştirilmiş bir ELISA kiti bulunmaktadır ve bugün bu parametre RA'nın erken tanısında ve prognozunun değerlendirilmesinde RF'den çok daha kıymetli bulunmaktadır (38,41-46).

1.4. ROMATOİD ARTRİTTE NİTRİK OKSİDİN ÖNEMİ

1.4.1. Nitrik Oksit

Genel Bilgi

1916 yılında Mitchell ve arkadaşları memelilerde nitrat üretimi ile ilgili ilk delilleri rapor ettikten 71 yıl sonra (55) 1987 de bu nitratın kaynağı nitrik oksit (NO) veya EDRF olarak tanımlanmıştır (56). Ardından NO'ya olan ilgi birçok araştırma alanında giderek artan şekilde devam etmiştir. NO moleküler ağırlığı 30 dalton olan bir gazdır, apolar yapısıyla hücre zarından kolayca geçer. Yarılanma ömrü oldukça kısa olan ($T_{1/2} < 15\text{sn}$) (57) bu gaz oksijen varlığında hızlı bir şekilde nitrat ve nitrite metabolize olur (58). Bazı hücrelerde NO, guanilat siklazın hem grubuna bağlanarak enzimi aktive eder ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeyini artırır (58,59). Serbest tiollerle reaksiyona girerek S-nitrosotiol bileşiklerini oluşturur (60). Süperoksit anyonu ile reaksiyonundan oldukça toksik olan peroksinitrit oluşur (61). Proteinlerin hedef bölgelerinde nitrosilasyon oluşturur (62). Ayrıca proteinlerde adeozin difosfat (ADP) ribozilasyonu oluşturabilir (63).

NO, organizmadaki birçok hücrede NO sentazlar (NOS) olarak isimlendirilen enzimlerle L-arjininin terminal guanidino nitrojeninden sentezlenir. Bu sentez iki aşamalıdır. Sonuçta arjininin N-oksidasyonu ile sitrulin ve NO oluşur. NOS'lar aktif formlarında homodimeriktirler (64). NOS'un izomerik formları en az üç farklı gen ürünü ile sentezlenir. Bunlar sığırdı, ratta ve insan dokularında klonlanmıştır. Üç tip NOS tanımlanmıştır bunlar; NOS-1 nöronal NOS (ncNOS), NOS-2 indüklenebilir NOS (iNOS) ve NOS-3 endotelyal NOS (ecNOS) olarak adlandırılır. NOS izoformlarından ikisi, ecNOS ve ncNOS yapısal (geleneksel) NOS olarak kabul edilir ve reseptör stimulusuna cevap olarak (asetil kolin, bradikinin) pikomolar ve nanomolar miktarlarda NO üretir. NOS-2 yani uyarılabilir NOS, monosit/makrofaj hücrelerinde, sinoviyal hücrelerde ve kondrositlerde değişik sitokinler ve bakteriyel lipopolisakkaritler (endotoksin)

tarafından indüklenir (65). IL-1 β , tümör nekrotizan faktör- α (TNF α) ve interferon- γ (INF γ) gibi sitokinler iNOS indüksiyonu yaparken, tümör büyüme faktörü- β (TGF- β), IL-4, IL-10, ve IL-13 iNOS ekspresyonunu inhibe etmektedir (66).

Mikroçevredeki sitokinlerin dengesi iNOS ekspresyonunu regüle eder. Örneğin TGF- β , IL-4 ve IL-10 makrofajlardaki iNOS ekspresyonunu inhibe etmektedir. Sitokinlerin stimülasyonu ile ecNOS üreten endotel gibi farklı hücrelerde de iNOS ekspresyonu olabilmektedir (67). iNOS ekspresyonunun regülasyonunda tür ve hücre farklılıkları vardır. Örneğin in vitro şartlarda murine lökositlerinde iNOS, IL-1 β ve TNF- α ile kolayca indüklenirken, insan lökositlerinde efektif bir indükleme göstermemektedir. Ancak interferon- α insan monositlerinde iNOS mRNA ve proteinini indükleyebilmektedir. İn vitro şartlarda iNOS indüksiyonundaki zorluklara rağmen insan monosit ve makrofajları RA, Hepatit C ve vaskülit gibi değişik hastalıklarda iNOS eksprese eder (68). iNOS, inflamasyonla birlikteliği tipik olan NOS izoformudur. Şimdilerde ise inflamasyon bölgelerinde ecNOS ve enNOS'tan türeyen NO'nun da etkili olduğu ortaya çıkmıştır (69).

NO'nun lökositler üzerindeki etkileri

Düşük düzeylerdeki NO lenfosit aktivasyonu ve proliferasyonunu sağlar. Sodyum nitropurissid gibi NO donörleri lenfositlerde glukoz alımını arttırmıştır ki bu lenfosit aktivasyonu esnasında ilk olaydır. TNF- α üretimini ve nükleer transkripsiyon faktör κ B (NF- κ B) bağlanma aktivitesini stimüle eder (64). Nitrik oksit ayrıca lenfosit sinyal olayları ile ilişkisi olan tirozin kinaz ve p56'yı aktive eder. L-arjinin eksikliği ve NOS inhibitörleri fitohemaglutininin (PHA) oluşturduğu proliferasyonu baskımlarken, insanlarda diyetle arjinin suplementasyonu konkanavalin A ve PHA ile oluşan mitojenik cevabı arttırmıştır (70). İn vitro ve in vivo şartlarda doğal öldürücü hücreler ve lenfosit ile aktive olan öldürme aktivitesini artırır. Buna karşın yüksek konsantrasyonlardaki NO antijen sunan hücrelerin aktivitesini ve T hücre çoğalmasını baskılar (71). NO, Murine Th 1 hücrelerinde IL-2 sekresyonunu inhibe ederken Th 2 hücrelerinde ise

IL-4 sekresyonunu arttırır. Bu durum insanlarda farklıdır. Aktive olmuş T hücre ve T hücre klonlarında Th 1 ve Th 2 ile üretilen sitokinler NO donörleri ile baskılanmıştır. Nitrik oksit, makrofaj, CD4+/CD8+ lenfosit ve kıkırdak hücrelerinde apoptosis oluşumunda rol aldığı gibi, düşük konsantrasyonlarda (<1µM) hepatosit, B lenfosit ve eozinofillerde apoptozisi inhibe etmiştir (72). İnflamasyon bölgesinde NO üretiminin etkisi NO'yu üreten hücre tipine, NOS'a ve salınan NO miktarına göre değişir. Düşük miktarlardaki NO T hücre proliferasyonunu inhibe ederek, nötrofil adezyon ve migrasyonunu sınırlayarak ve vazodilatasyon ve antitrombosidal etki ile doku perfüzyonunu sürdürürerek doku koruyucu etki gösterir. Faydalı etkiler özellikle NO cNOS'lar tarafından üretilirse oluşmaktadır. Aksine NO büyük miktarlardaysa mitokondriyal respirasyonu inhibe ederek ve DNA'da değişiklikleri indükleyerek önemli sitotoksiste yaratmaktadır.

1.4.2. Artritte Nitrik Oksit

NO'nun Hayvan Artrit Modellerinde Görülen Etkileri

Adjuvantla indüklenmiş artrit bir NOS inhibitörü olan L-Nitro Mono Metil Arjinin (L-NMMA) ile suprese olmuştur. Kollajenle indüklenen artritte ve streptokokkal artritte NO düzeyinde yükselme ve nonselektif NOS inhibitörleri ile NO düzeyinde düzelme olduğu da gösterilmiştir (74). Ancak selektif iNOS inhibisyonunun streptokokkal eroziv artriti alevlendirdiğini belirten gözlemlerde vardır. Köpeklerle yapılan başka bir çalışmada iNOS spesifik inhibisyonun kıkırdak lezyonu progresyonu azalttığı ve bu etkinin metalloproteinaz, kaspaz 3, IL-1 ve kondrosit apoptozisinde azalma ile beraber olduğu rapor edilmiştir (64). iNOS ekspresyonu bulunmayan farelerde yapılan deneylerde artritli kartilajda, kondrosit proteoglikan sentezinde inhibisyon ve insulin büyüme faktörü-1 (IGF-1)'e cevapta düzelme, kartilaj lezyonunda ve osteofit formasyonunda azalma olmuştur (73). Adjuvant artrit oluşturarak hayvanlarda yapılan romatoid artrit modellerinde üriner nitrit düzeyleri yükselmiş ve hastalık şiddeti ile ilişkili bulunmuştur. Hayvanlara L-NAME ve deksametazon verildiğinde hastalık

aktivitesi ve üriner nitrit düzeyinde azalma gözlenmiştir. L-NAME ve aminoguanidin artrit gelişimine karşı koruyucu etki göstermektedir. Bu etki NOS inhibisyonu ile ilgilidir. L-Arjinin ile beraber uygulandıklarında L-arjininle alevlenen artriti azaltmışlardır (66). Nötrofil süperoksit ve nitrojen üretiminin artritin başlamasında ve sürdürülmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (75). Ancak NO inhibitörleri ve iNOS (-/-) farelerde yapılan bir çalışmada iNOS yada cNOS bağımlı NO üretiminin nötrofil migrasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (76). Nötrofillerde artan iNOS ekspresyonu nötrofil deformabilitesini artırabilmektedir (77).

Romatoid Artritte NO'nun Etkisi

Romatoid artritli hastaların eklem sıvılarında nitrit konsantrasyonu, sinoviyal hücrelerde ve kondrositlerde iNOS ekspresyonu artmış bulunmuştur (78). RA'lıların mononükleer hücre iNOS ekspresyonunda artış ve ex vivo nitrit üretimleri ile hastalık aktivitesi arasında bir ilişki saptanmıştır (79). Plazma nitrat ve nitrit düzeylerine bakılarak RA'lı hastalarda yapılan başka bir çalışmada plazma düzeylerinin yükseldiği fakat hastalık aktivitesini gösteren diğer parametrelerle korelasyon göstermediği rapor edilmiştir (80). RA'lı hastaların idrar, kan ve eklem sıvılarında nitrit düzeyleri şiddetle artarken osteoartritte orta düzeyde bir artış olmaktadır (66). Eklem sıvısındaki nitrit düzeyi lokal bir sentezi işaret eder şekilde kan ve idrardakinden daha yüksektir (81). Kan nitrit düzeyi, RA aktivitesi, TNF- α ve IL-6 düzeyleri ile koreledir. Üriner nitrit düzeyleri glukokortikoid ve anti-TNF- α antikorları ile tedavi sırasında azalmıştır (66). Özetlenmeye çalışılan sonuçlara göre lökosit kaynaklı NO ve bunun kaynağı olan enzimlerin romatoid artrit patogenezinde rol oynamaları kuvvetle ihtimal dahilindedir.

1.5. PAD ve NO İLİŞKİSİ

Peptidilarjinin deiminaz (PAD), proteine bağlı olan arjinin rezidulerini sitruline modifiye eden ve bu esnada ortama amonyak salan bir enzimdir. NOS ise

serbest arjinini sitruline çeviren ve PAD'dan farklı olarak ortama NO veren bir enzimdir (82). İki enzim arasındaki ilişkiye yönelik yapılan bir inhibisyon çalışmasında nonselektif NOS inhibitörü olan L-NAME ve L-thiocitrullinin milimolar düzeyindeki konsantrasyonlarda dahi PAD enzimini %100 inhibe ettiği gösterilmiştir. Her iki maddenin de PAD'ın substratı olan benzoylarjinin ile yarışmaya girdiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada ayrıca sentetik bir peptidilarjinin aldehit inhibitörü olan leupeptinin PAD'ı kuvvetle inhibe ettiği gözlenmiştir (83).

Diğer taraftan PAD'ın son ürünü olan amonyağın iNOS ekspresyonunu arttırarak etki edebileceği düşünülmektedir (82). Bütün bu bulgulardan, NOS ve PAD aktiviteleri sonrasında oluşan reaksiyon ürünleri olan serbest ve proteine bağlı sitrulinin bu enzimlerin aktivitelerini inhibe edebileceği düşünülebilir. Ayrıca bu reaksiyon ürünlerinden amonyak ve serbest sitrulinin üre döngüsüne katılıp yeniden NOS substratı olan arjinine dönüşmesi de mümkündür. Bu durum NOS için bir substrat sağlama yolu olabilir ve dolaylı bir PAD-NO ilişkisi ortaya çıkabilir.

1.6. HASTALIK AKTİVİTE İNDEKSİ

1.6.1. SDAI (Simplified Disease Activity İndeks)

Günümüzde aktif romatoid artrit tedavisi için eklemlerde yapısal hasar oluşumunu yavaşlatan yada önleyen yüksek dozda DMARDs (disease modifying antirheumatic drugs) tercih edilmektedir. Bu stratejide, hastalığın seyrini takip ve tedavinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla hastalık aktivitesi çok iyi izlenmelidir (9). Hastalık aktivite indeksini gösteren standart yöntem DAS 28 (Disease Activity Score) değerlendirmesidir. Ancak bu skorlamayı, hesaplaması zor olduğundan bugün, hassasiyeti DAS28 kadar yüksek bulunan basitleştirilmiş hastalık aktivite indeksi (SDAI) geliştirilmiştir. Bu indeks özellikle günlük hasta takibinde pratik hesaplanması nedeniyle çok daha kullanışlıdır (84).

MATERYAL METOD

2.1. Hastalar

2.1.1. Hasta Kabul Kriterleri

Hasta grubunda yer alan RA'lı vakaların seçiminde aşağıdaki kriterler göz önüne alınmıştır.

- 1- RA tanısının, Amerikan Romatoloji Derneğinin 1987 yılında yenilediği kriterlere göre konmuş olması (9)
- 2- Hastaların, RA remisyon kriterleri (17) kullanılarak remisyonda ve aktif dönemde olanlar olarak iki gruba ayrılması
- 3- Seçilecek vakaların 35-65 yaş arasında olması
- 4- Hastalarda RA dışında kronik seyirli başka bir patolojinin (Diyabetes Mellitus, hipertansiyon ve kronik inflamatuvar diğer patolojiler gibi) olmaması.

2.1.2. Numunelerin toplanması

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon A.D. Romatoloji polikliniğine başvurmuş ve hasta kabul kriterlerine uyan 20 gönüllü vakadan ve kontrol amacıyla da 20 sağlıklı gönüllü kişiden lökosit izolasyonu için periferik kan örneği alındı.

Periferik kan örnekleri ön-kol yüzeyel veninden, heparin içeren tüpe 6 ml, düz biyokimya tüpüne 2ml alındı. Ayrılan serumlar anti-CCP ölçümü için yeterli sayıya ulaşınca kadar -70 °C'de saklandı, alınan tam kan örneklerinden lökosit izolasyonu bekletilmeden yapıldı.

Çalışmanın in vitro basamağı için tamamen sağlıklı olan 10 gönüllü kişiden, lökosit izolasyonu amacıyla periferik kan örneği alındı. Heparin içeren tüplere alınan 6 ml tam kandan bekletilmeden lökosit izolasyonu yapıldı ve bir lökosit havuzu oluşturuldu.

2.2. Periferik Kandan Lökosit İzolasyonu (28)

Periferik kandan lökosit izolasyonu 1968’de Boyum tarafından geliştirilen metod ile dansite gradiyentine göre histopak 1119 ve 1077 kullanılarak yapıldı .

2.2.1. Reaktifler

1. Histopak 1077 ve 1119

Sigmadan satın alındı.

2. PBS (Fosfat Tamponlu Salin, 10X konsantre pH 7.4)

10 X konsantre PBS için 2 g KCl, 80 g NaCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ tartılıp 1L distile suya tamamlandı. pH’sı 7,4’e ayarlandı. Kullanım esnasında 1:10 oranında sulandırıldı.

2.2.2. Lökosit izolasyon prosedürü

1. Kullanılacak histopak 1077 ve 1119 oda ısısına getirildi.
2. 15 ml’lik konik santrifüj tübüne 3ml histopak 1119 pipetlendi.
3. Histopak 1119’un üzerine 3 ml histopak 1077 pipetlendi.
4. Histopak 1077’nin üzerine 6 ml tam kan çok yavaş bir şekilde dikkatle tabakalandırıldı.
5. Oda ısısında, 700 g’de 30 dakika santrifüj edildi.
6. Histopak 1019 ile histopak 1077 arasında kalan granulosit fazından pastör pipeti ile 0.5 ml alınıp temiz bir konik santrifüj tüpüne aktarıldı.
7. Histopak 1077 ile plazma arasında kalan mononükleer hücre (MNC) fazından 0.5 ml alınıp temiz bir konik santrifüj tüpüne pipetlendi.
8. Hem granulosit hem de MNC içeren tüplerin üzerine 10 ml PBS (pH 7.4) tamponu konuldu.
9. Her iki tüp 400 g’de 10 dakika santrifüj edildi.
10. Süpernatant kısım boşaltıldı ve dipte kalan hücre peleti 10 ml PBS (pH 7.4) tamponu ile resüspanse edildi.

11. Her iki t p tekrar 400 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
12. Her iki tüpün süpernatant kısmı tekrar boşaltıldı ve dipte kalan hücre peleti 10 ml PBS (pH 7.4) tamponu ile resüspanse edildi.
13. Yıkanan hücre peleti 300  l RPMI 1640 içinde resüspanse edildi.
14. Bu hücre süspansiyonundan 50  l alındı ve 50  l % 0,5'lik tripan blue ile süspanse edildi.
15. Hücreler thoma lamına alındı ve mikroskopta 20 X'lik büyütme altında incelendi. Membranı mavi boyanan hücreler  l , boyanmayan hücreler canlı olarak kabul edildi.
16. Hücre sayımı yine thoma lamında 5 farklı alanda sayım yapılarak değerlendirildi. Toplam sayı 5'e bölündü ve çıkan değer 10⁶ ile çarpıldı.
17.  ıkan sonuca göre hücreler ml'de 1 milyon olacak şekilde RPMI 1640 ile süspanse edildi.

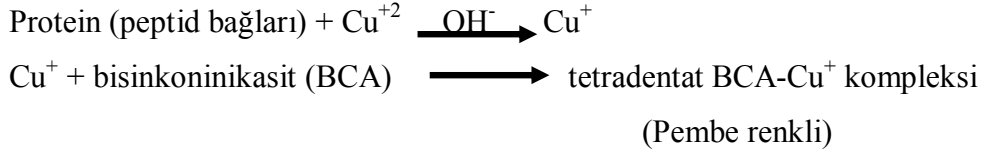
2.2.3. Lizat Hazırlama

Hazırlanan hücre süspansiyonu 20 saniye, 9 siklus ve %80 g  le sonike edilerek hücreleri parçalandı. Sonike edilen bu lizatlar 14.000 g'de, 4  C'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı protein ve enzim aktivitesinin ölçümü için temiz ependorflara aktarıldı.

2.3. Protein Miktarının Tayin Edilmesi (85)

2.3.1 Mikro Bisinkoninikasit (BCA)Kit Prensibi

Proteinlerin peptid bağları OH⁻ iyonu varlığında Cu⁺² iyonlarıyla reaksiyona girip Cu⁺-kompleksi meydana getirir. Cu⁺-kompleksi bisinkoninikasit ile reaksiyona girerek pembe renkli BCA- Cu⁺ kompleksini oluşturur. Oluşan pembe renk 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunur.



2.3.2. Kullanılan Malzemeler

RPMI 1640 Tamponu

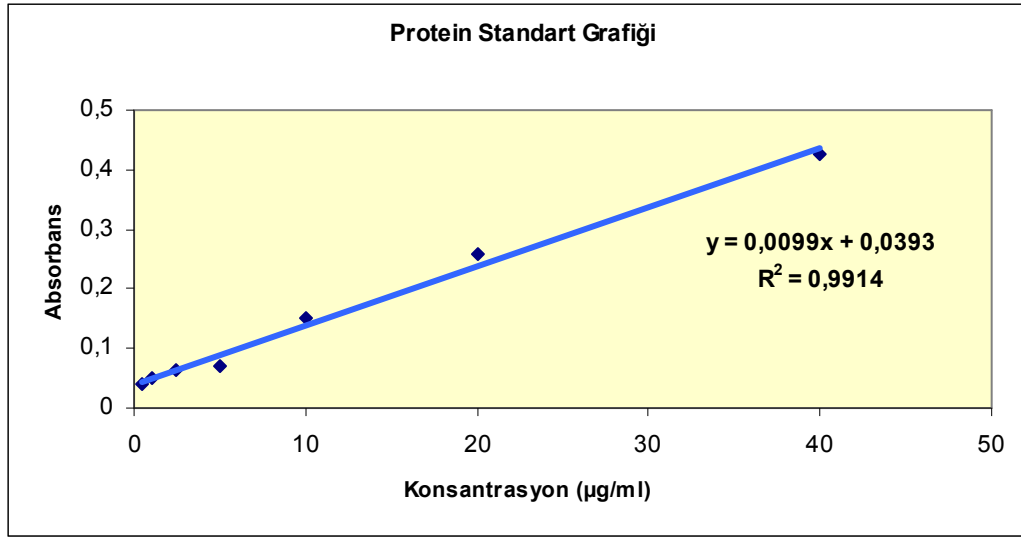
Periferal kandan izole edilen nötrofiller ve mononükleer hücreler 300 µl RPMI 1640 tamponu içerisinde resuspanse edildi. Bu hücreler Thoma lamı kullanılarak sayıldı ve 1×10^6 /ml hücre olacak şekilde RPMI 1640 ile dilüe edildi.

2.3.3. Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması

BSA (Bovine Serum Albumine) 0,2 mg/ml olarak kitin içinde hazırıldı. Bu stoktan dilüsyonlar yapılarak standartlar hazırlandı. (40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml)

Protein ölçümü için kitin içinde hazır olarak verilen MA (0,2 N NaOH), MB (%4'lük bisinkoninik asit), MC (%4'lük bakır sülfat) solüsyonları 25:24:1 oranında karıştırılarak çalışma reaktifi (WR) hazırlandı.

96 kuyucuklu petrilere 100 µl standart ve 100 µl WR pipetlenerek karıştırıldı ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. 2 saat inkübasyon sonrasında standartlar kendi körüne karşı 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede aynı anda okundu. Tüm protein standartları çift çalışıldı ve sonuçların ortalamaları alındı. Okunan absorbans değerlerine göre standart grafiği çizildi (Şekil 3.7.1). Elde edilen doğru yardımıyla sonuçlar mililitredeki mikrogram protein miktarı olarak saptandı.



Şekil 2.3.1. Protein Standart Grafiği

2.3.4. Numunelerin Protein Miktar Tayini

Hazırlanan lizatların bir kısmı 1:10 oranında RPMI ile dilüe edilip protein tayini için kullanıldı. Dilüe edilen her lizattan 25 µl alınıp 75 µl distile su ile tamamlandı (toplam dilüsyon oranı 1:40). 100 µl numune üzerine 100 µl WR pipetlendi ve 37 °C’de 96 kuyucuklu petrilerde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda numuneler çift kontrollü olarak spektrofotometrede 562 nm’de körüne karşı okundu. Elde edilen absorbans değerleri, standart grafiğinde yerine konarak örneklerin mililitresindeki mikrogram protein miktarı tayin edildi.

2.4. Lökositlerde Peptidilarjinin Deiminaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü (86)

2.4.1. Kullanılan Malzemeler

Tris HCl / DTT Tamponu (pH 7.5)

- 200 mM Tris HCl
- 20 mM CaCl₂
- 10 mM DTT

BAEE substratı ve sitrulin standart solüsyonu bu tampon içerisinde hazırlandı.

Perklorik Asit Solüsyonu

5 M Perklorik asit solüsyonu reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

2.4.2. PAD Aktivitesi Ölçüm Metodu (86)

Periferik kandan izole edilen lökositlerde PAD aktivitesi ölçümü için Sugawara'nın metodu kullandı. Bu metodun esası, PAD enziminin benzoyl-l-arginine ethyl ester (BAEE) substratındaki arjinin rezidülerini 50 °C'de 1 saat inkübasyonun ardından sitrulin rezidülerine çevirmesidir (86). Oluşan sitrulin rezidülerinin 530nm'de spektrofotometrede absorbansları okundu (87). Sonuçlar hazırlanan sitrulin standart grafiğinde yerine konularak enzim aktiviteleri bulundu. Bulunan enzim aktivitesi mg protein başına aktivite şeklinde verildi.

2.4.3. Sitrülin Ölçüm Reaktifleri

1- Asit Ferrik Solüsyonu (Reaktif 1)

Distile su	550 ml
H ₂ SO ₄ (konsantre)	250 ml
H ₃ PO ₄ (konsanre)	200 ml
Oda ısısında soğutulur	
FeCl ₃	250 mg/L

Solüsyon ışıktan korunursa oda ısısında 2 ay stabildir.

2- Diasetil Monoksim Solüsyonu (DAMO) (Reaktif 2)

500 mg diasetil monoksamin 100 ml distile su içinde çözüldü. Bu reaktif koyu renkli şişede 1 ay stabildir.

3- Kromojenik Reaktif

Kromojenik reaktifi hazırlamak için ilk önce 5 mg TSC tartılarak 50 ml reaktif 2 içinde çözüldü. Sonra bu karışıma 100 ml reaktif 1 eklendi. Bu reaktif çalışmaya başlamadan hemen önce hazırlanmalıdır ve bir saat içinde kullanılmalıdır.

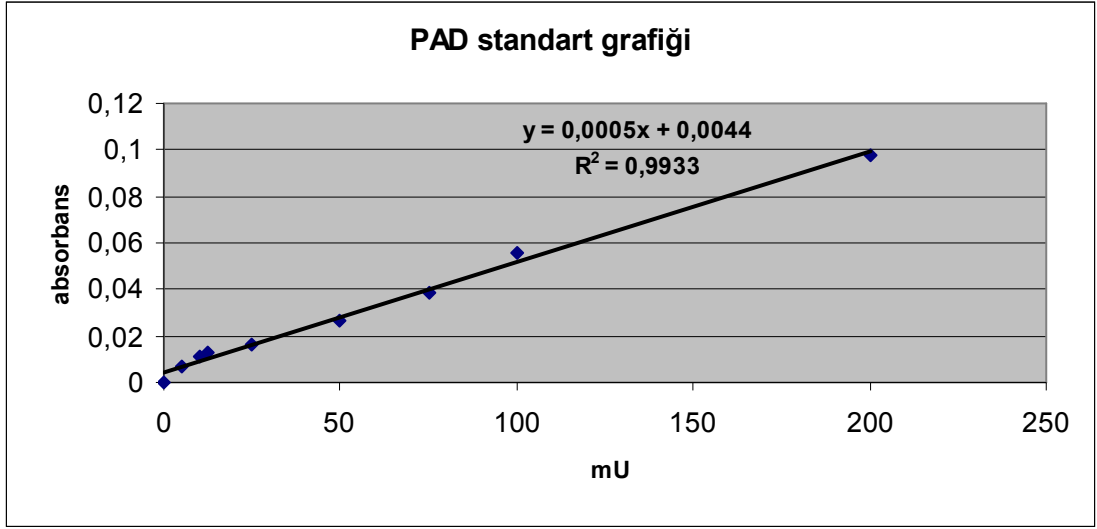
2.4.4. Sitrulin Standart Solüsyonun Hazırlanması

Stok sitrulin standardı hazırlamak için 17.52 mg L-Sitrülin 10 mM DTT içeren 100 ml Tris HCl Tamponu (pH 7.5) içinde çözüldü (–20 °C’de uzun süre stabil). Bir ünite PAD aktivitesi, 50°C, 60 dakikada 1µmol sitrulin oluşumunu katalizleyen enzim miktarıdır (39). Buna göre tablo 2.4.1.’deki PAD aktivitelerinin katalizleyeceği sitrulin konsantrasyonları aşağıdaki formülle hesaplanarak stok solüsyondan hazırlandı (sitrulinin molekül ağırlığı 175,2 g). Sitrulin ölçüm prosedürü (2.4.6) kullanılarak PAD standart grafiği çizildi (şekil 2.4.1)

$$\text{Sitrulin Konsantrasyonu} = \frac{\text{PAD akt.}}{\text{(mU/ml)}} * \frac{\text{Sitrulin Mol. Ağırlığı (g)}}{10^{-3}} * 30 \text{ (dilüsyon faktörü)} \text{ (ng/ml)}$$

Sitrulin Konsantrasyonu	PAD Aktivitesi
5,26 ng/ml	1 mU
26,3 ng/ml	5 mU
52,56 ng/ml	10 mU
65,75 ng/ml	12,5 mU
131,5 ng/ml	25 mU
263 ng/ml	50 mU
393 ng/ml	75 mU
526 ng/ml	100 mU
1056 ng/ml	200 mU

Tablo 2.4.1. Hazırlanan sitrülin standartlarının konsantrasyonları



Şekil 2.4.1. PAD Standart Grafiği

2.4.5. Sitrülin Ölçüm Metodu (87)

Sitrülin ölçümü Boyde T.R.C ve Rahmatullah M geliştirdiği metoda göre yapıldı. Bu yöntemin esası sitrülin gibi karbamido bileşiklerinin asit solüsyonda diasetil monoksim ile renkli bir kompleks oluşturmaya dayanır.

2.4.6. PAD Ölçüm Prosedürü

- 1- 100'er µl hücre lizatı 100 µl 20 mM BAEE içeren ve içermeyen tampon (20 mM Ca Cl₂, 10 mM DTT ve 200 mM Tris HCl pH 7.5) ile karıştırıldı.
- 2- Karışım 50 °C su banyosunda 1 saat inkübe edildi.
- 3- 50 µl 5 M perklorik asit eklenerek reaksiyon durduruldu.
- 4- Karışım 20 dakika buz içinde bekletildi.
- 5- 10 dakika, 1000 g, 4 °C de santrifuj edildi.
- 6- Süpernatant sitrülin ölçümü için ayrıldı.

Sitrülin ölçümü;

- 7- 33 µl süpernatant 990 µl kromojenik reaktifle karıştırıldı.
- 8- Karışım 100 °C su banyosunda 5 dakika inkübe edildi.
- 9- İnkübasyon sonunda tüpler oda ısısına getirildi.

10- 530 nm de sitrülin ölçümü yapıldı.

Sonuçlar PAD standart grafiğinde yerine konarak PAD aktivitesi bulundu.

2.5. Serumda anti CCP ölçümü (88)

Serumda sitrulinlenmiş peptidlere karşı gelişen anti CCP antikorunun düzeyi ELISA kitiyle ölçüldü (Euroimmun D-23560 Lübeck Seekamp).

2.5.1. Kitin içeriği

1. Antijen kaplı mikro plate.
2. Kalibratörler (0, 2, 8, 30 ve 100 RU/ml).
3. Anti CCP referans kontrol.
4. Pozitif kontrol (100 X konsantre)
5. Negatif kontrol (100 X konsantre)
6. Enzim konjugatı (ALP işaretli anti insan immunglobulin G).
7. Örnek tamponu (5X konsantre).
8. Yıkama tamponu (16 X konsanre).
9. Substrat solüsyonu (p-Nitrofenilfosfat, pNPP).
10. Durdurma solüsyonu (1 M NaOH).

2.5.2. Ölçüm Prosedürü

Birinci Basamak (Örnek İnkübasyonu)

100 µl kalibratör, pozitif ve negatif kontrol ve dilüe hasta örnekleri mikro plate pipetlendi. Pipetleme işlemi 15 dakikadan uzun sürmemelidir. Oda ısısında 60 dakika inkübe edildi.

Birinci Yıkama

Kuyucuklar manuel olarak başaltılıp 300 µl dilüe yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı.

İkinci basamak (Konjugat İnkübasyonu)

Kuyucuklara 100'er µl enzim konjugatı pipetlendi. 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.

İkinci Yıkama

Kuyucuklar manuel olarak başaltılıp 300 µl dilüe yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı.

Üçüncü Basamak (Substrat İnkübasyonu)

Tüm kuyucuklara 100 µl Substrat solüsyonu pipetlendi. Oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.

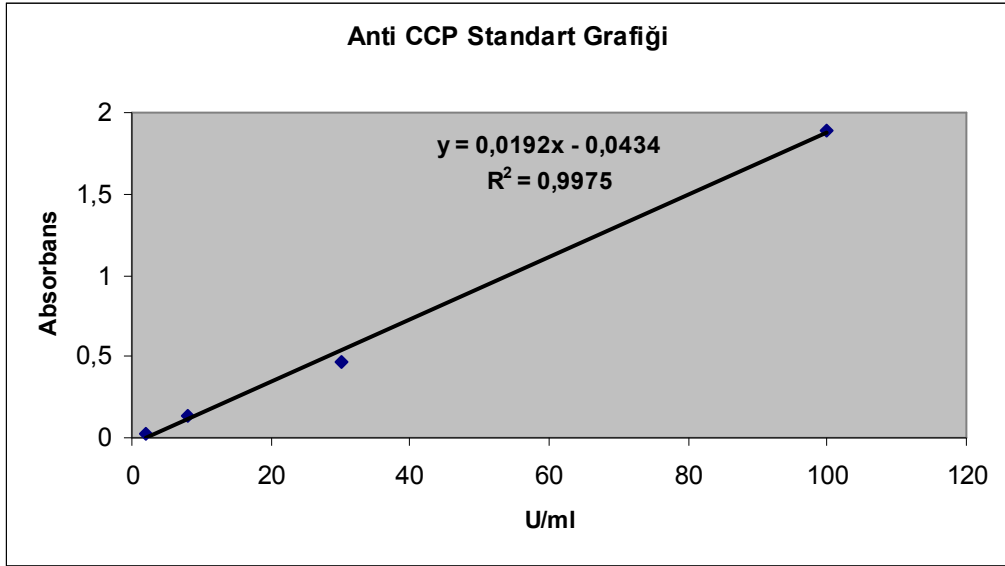
Durdurma Reaksiyonu

Tüm kuyucuklara 100 µl durdurma solüsyonu pipetlendi.

Ölçüm

Durdurma solüsyonu eklendikten sonra 60 dakika içerisinde renk yoğunluğunu 405 nm dalga boyunda fotometrik olarak ölçüldü.

2.5.3. Anti CCP Standart Grafiği



Şekil 2.5.1 Anti CCP standart grafiği

2.6. Lökositlerde NO Ölçümü

2.6.1. Amperometrik Nitrik Oksit Ölçümü (89)

Bir referans elektrot ve bir çalışma elektrodundan oluşan elektrokimyasal bir NO sensörü NO içeren bir solüsyona batırıldığında ve 900 mV'luk bir akım referans elektroda uygulandığında NO elektrodun yüzeyinde okside olur ve burada küçük bir redoks potansiyeli oluşur. Çalışma ve referans elektrotları arasındaki redoks akım, okside NO konsantrasyonu ile paraleldir. Amperometrik NO ölçümü için NO meter kullanılır (89).

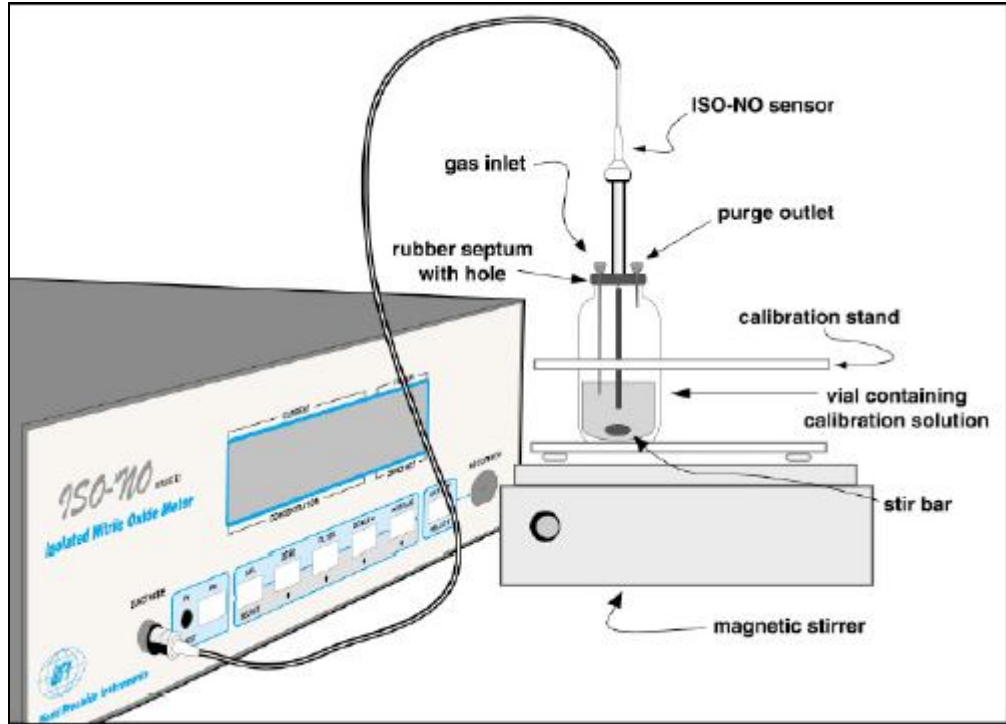
2.6.2. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- 1- Apollo 4000 NO meter World Precision Instruments (WPI)
- 2- ISO-NOP NO elektrodu (WPI)
- 3- Dört kanallı ölçüm tablası (WPI)

- 4- Reaktif I: 0.1 M sülfürik asit (H_2SO_4) ve 0.1 M potasyum iyodür (KI) 100 ml distile su içinde çözüldü. Solüsyon koyu renk şişede 2-8 °C de saklandı.
- 5- Reaktif II: 50 µM potasyum nitrit (KNO_2) distile su içinde çözüldü. Solüsyon koyu renk şişede 2-8 °C de saklandı.
- 6- L-arjinin 10^{-5} M olarak distile suda çözüldü.

2.6.3.NO Standart Grafiğinin Hazırlanması

1. Çalışmadan önce NO meter gece boyunca açık bırakıldı ve böylece NO elektrodunun distile su içinde dengeye gelmesi sağlandı. Çalışmaya başlamak için akımın 10 pA'yı geçmemesi ve sabit olması gerekmektedir.
2. Manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilen kalibrasyon kitine ait cam şişeye solüsyon I'den 10 ml konuldu ve bu şekilde en fazla 10 dakika bekletilerek akımın sabitlenmesi sağlandı (Şekil 2.6.1).



Şekil 2.6.1. Nitrik oksit elektrodunun kalibrasyon düzeneği

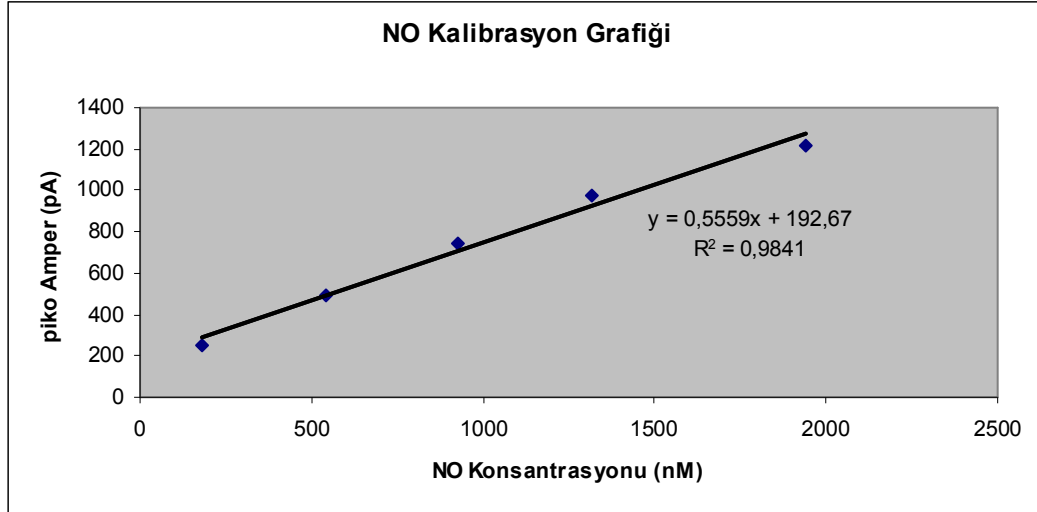
3. Tablo 2.6.1’deki gibi farklı konsantrasyonlardaki KNO₂ sırayla enjekte edildi. Kimyasal NO oluşumuna dayalı kalibrasyonun denklemi aşağıdaki gibidir.



Tablo 2.6.1. NO kalibrasyon solüsyonlarının kullanımı

Reaktif I (ml)	Reaktif II (µl)	Dilüsyon	NO miktarı (nM)
10	50	1:201	249
10	100	1:101	495
10	150	1:67	746
10	200	1:51	980
10	250	1:41	1220

4. NO standart grafiği tablo 2.6.1’de gösterilen konsantrasyonlarda hazırlandı (Şekil 2.6.2)



Şekil 2.6.2. NO kalibrasyon grafiği

2.6.4. Lökositlerde NO ölçümü

Çalışma grubumuzda yer olan 6 hasta ve 6 kontrolün 2.2.2’de tarif edilen prosedüre göre periferik kandan MNC ve PNL’leri ayrıldı ve mililitrede 10^6 hücre olacak şekilde PBS içerisinde resüspanse edildi.

Ölçüm Prosedürü

1. 2.6.3’te anlatıldığı gibi önce cihazın kalibrasyonu yapıldı.
2. Numunelerin ölçümü için çok kanallı ölçüm tablası kullanıldı. Önce ölçüm tablasına 1 ml hücre süspansiyonu pipetlendi ve elektrod bu solüsyona batırılarak solüsyonun havayla teması kesildi.
3. Solüsyona ml’de 10^{-5} M olacak şekilde L-arjinin enjekte edildi ve 15 dakika süresince NO oluşumu monitörden takip edildi. Kaydedilen en yüksek akım standart grafiğinde yerine konarak hücrenin ürettiği NO konsantrasyonu hesaplandı.

2.7. C-Reaktif Protein(CRP), Romatoid Faktör (RF) ve Sedimentasyon Ölçümü

2.7.1. C-Reaktif Protein Ölçümü

C-Reaktif Protein’i serumdan Beckman Colter İmage İmmunochem. cihazında ölçüldü. Ölçüm Roche firmasına ait CRP-LX hazır kiti kullanılarak immünoturbidimetrik yöntemle yapıldı.

2.7.2. Romatoid Faktör Ölçümü

Romatoid Faktör serumdan Beckman Coulter İmage İmmunochem. cihazında ölçüldü. Ölçüm, Dade Behring firmasına ait N Latex RF hazır kiti kullanılarak nefelometrik yöntemle yapıldı.

2.7.3. Sedimentasyon Ölçümü

Sedimentasyon Westergreen metodu ile ölçüldü.

2.8. SDAI (Basitleştirilmiş hastalık aktivite indeksi):

Çalışmaya dahil olan tüm RA vakalarında hastalık aktivitesini değerlendirebilmek için SDAI aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$SDAI = TJC + SJC + PGA + MDGA + CRP$$

SDAI = Basitleştirilmiş hastalık aktivite indeksi

TJC = Hassas eklem sayısı (0-28)

SJC = Şiş eklem sayısı (0-28)

PGA = Hastanın genel durum değerlendirmesi (0-10cm)

MDGA = Hekimin genel durum değerlendirmesi (0-10cm)

CRP = C-Reaktif Protein (mg/dl)

2.9. İn vitro Lökosit Havuzunda NO ve PAD Ölçümü

2.9.1. Kullanılan Malzemeler

Fitohemaglutinin (PHA)

10µg/ml olacak şekilde PBS içinde çözüldü. Solüsyon kısımlara ayrıldı. Kullanılincaya kadar -20 °C de saklandı.

L-arjinin

10⁻⁵ M olarak distile suda çözüldü. Solüsyon kısımlara ayrıldı. Kullanılincaya kadar -20 °C de saklandı.

Leupeptin

50 µM olacak şekilde distile su içinde çözüldü. Solüsyon kısımlara ayrıldı. Kullanılincaya kadar -20 °C de saklandı.

L-NMMA (L-Nitro Mono Metil Arjinin)

1 mM olacak şekilde distile su içinde çözüldü. Solüsyon kısımlara ayrıldı. Kullanılmaya kadar -20 °C de saklandı.

NIL (L-N-Iminoetil Lizin)

60 µg/ml olacak şekilde distile su içinde çözüldü. Solüsyon kısımlara ayrıldı. Kullanılmaya kadar -20 °C de saklandı.

2.9.2. Deney Prosedürü

Tamamen sağlıklı 10 gönüllü vakadan heparinli tüplere tam kan örnekleri alındı. 2.2.2'deki prosedüre göre periferik lökositler ayrıldı, bir lökosit havuzu hazırlandı ve mililitrede 10^6 hücre olacak şekilde PBS içinde resuspanse edildi.

Hücreleri aktive edecek PHA (10µg/ml) için en uygun inkübasyon süresi tayin edildi. Bu amaçla hücreler 6 farklı kuyu içinde 0, 0.5, 1, 1.5, 3 ve 6 saat boyunca PHA ile inkübe edildi. Inkübasyon sonunda PAD enzim aktivitesi ölçüldü.

Aynı süreler sonunda hücrelerin oluşturduğu NO düzeyleri ölçüldü. Bu amaçla NO ölçüm tablasına konan 1 ml hücre süspansiyonuna 10 µg/ml PHA enjekte edildi. Inkübasyonun 0, 0.5, 1, 1.5, 3 ve 6'ncı saatlerinde ölçüm tablasına 10^{-5} M L-arjinin eklendi. NO sentezi monitörden takip edildi.

İnhibisyon Deneyleri

Lökosit süspansiyonu beş kuyucuğa bölündü. İlk kuyucuk kontrol olarak kabul edildi. Diğer kuyucuklar 10 µg/ml PHA ile önceden belirlenen sürede inkübe edildi. Ardından tüm kuyucuklara 10^{-5} M L-arjinin konuldu. Arjinin ilavesi ile eş zamanlı üçüncü kuyucuğa 50 µM leupeptin, dördüncü kuyucuğa 1 mM L-NMMA ve son kuyucuğa 60 µg/ml NIL ilave edildi. 30 dakikalık inkübasyon sonunda tüm kuyularda PAD aktivitesi ve NO düzeyleri ölçüldü (Sırasıyla konu 2.4.6 ve 2.6.4'de anlatıldığı şekilde)

2.10 Gereçler ve Araştırmanın Yürütüldüğü Birimler

Spektrofotometre	: Thermo Labsystems Multiskan Spectrum, 1500
Santrifüj	: Heraeus Instruments Megafuge 1.0 R
Santrifüj	: Nüve NF 800
Sonikatör	: Bandelin sonopuls UV 2070
Buzdolapları	: İndesit (+4, -20 °C)
Çalkalayıcı	: Stovall, The Belly Buttum
pH Metre	: Schott CG 840
Su Banyosu	: B.Braun Biotech International
Hassas Terazî	: Shimadzu AW 120
İnverted mikroskop	: Zeiss, Olympus

Plastik ve cam malzemeler Akdeniz Üniversitesi Sterilisasyon Merkezinde sterilize edildi.

Hücre lizatının hazırlanmasında kullanılan 15 ml'lik plastik tüpler ile benzeri sarf malzemeler Corning Firmasından, kullanılan tüm kimyasallar Sigma'dan satın alındı.

Çalışmanın NO ölçüm kısmı Biyokimya AD Laboratuvarında, diğer ölçümler Merkez Laboratuvarı ve Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

2.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 13.0 programı kullanılarak yapıldı. Tüm parametreler için gruplar arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığı Kruskal Wallis Testi, yine tüm parametreler için grupların ikili değerlendirilmesi non parametrik Mann Witney U Testi ile yapıldı. Her grup için farklı parametreler arasındaki ilişkileri değerlendirmek amacıyla Pearson Korelasyon Testi kullanıldı. $p < 0.05$ olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı, $p > 0.05$ olanlar ise anlamsız kabul edildi.

BULGULAR

3.1 Klinik ve Laboratuvar Değişkenler

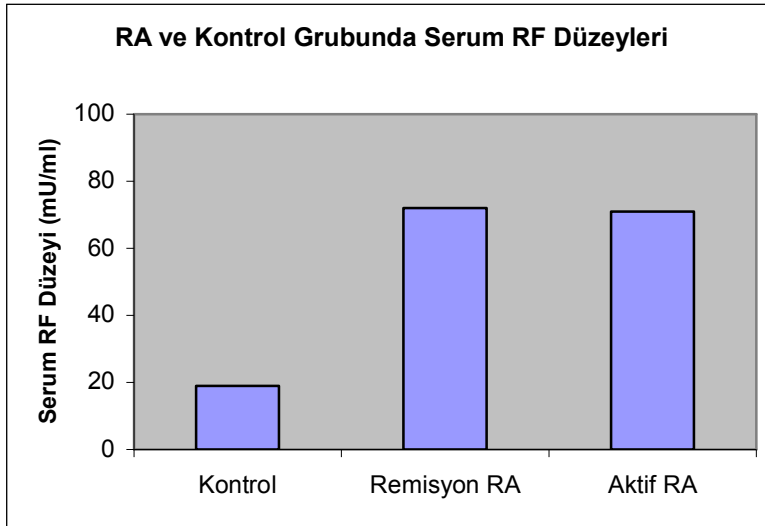
Çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon A.D. Romatoloji polikliniğine başvurmuş ve hasta kabul kriterlerine uyan 20 gönüllü RA vakası ve kontrol amacıyla da 20 sağlıklı gönüllü kadın vaka dahil edildi. Tüm vakalardan elde edilen demografik, klinik ve laboratuvara ait sonuçlar tablo 3.1’de verildi. Basitleştirilmiş hastalık aktivite indeksi (SDAI) kriterlerine göre vakalar, remisyonda ve aktif dönemde olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hastaların 10’u hastalığın aktif döneminde, 10’u ise remisyonda bulundu.

Tablo 3.1.Çalışmaya katılan vakalara ait değişkenler

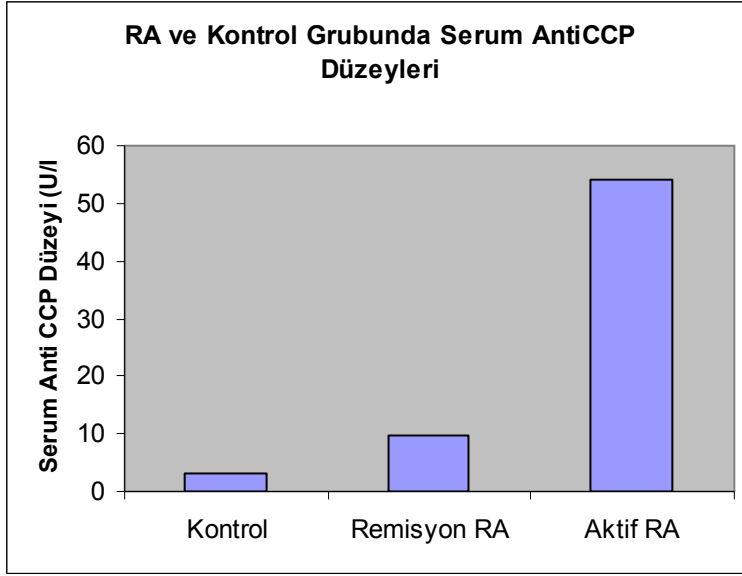
Değişkenler	Kontrol			Remisyon Dönemi RA			Aktif Dönem RA		
	Vaka Sayısı	Ortalama	SD	Vaka Sayısı	Ortalama	SD	Vaka Sayısı	Ortalama	SD
Yaş	20	47,6	14,9	10	42,8	8,3	10	50,6	7,1
Cinsiyet		K	K		K	K		K	K
Hastalık Yılı		-	-		10,5	9,7		13,6	8,3
CRP (mg/dl)		0,3	0,05		0,7	0,8		1,7	2,1
ESR (mm/h)		15,8	7,6		29,4	15,4		46,8	17,7
RF (mU/ml)		19	15		71	65		72	89
Anti-CCP (U/l)		3	0,4		9,7	5,9		54	39
PNL-PAD (mU/mg protein)		105	55,1		181,2	91,8		387,5	125,7
MNC-PAD (mU/mg protein)		85,4	21,8		173,1	147		485	324,2
PNL-NO (nM)	6	114	15,9	3	120,8	25,7	3	111,7	12,4
MNC-NO (nM)		123,3	8,9		143,3	32,1		140,8	54,7

3.1.1 RA'da Anti CCP ve RF Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Vakaların serum otoantikör seviyelerinin, ortalama $\pm$ SD'leri RF ve anti-CCP için sırasıyla, kontrolde 19 ± 15 mU/ml, 3 ± 0.4 U/l; remisyon dönemindeki vakalarda 72 ± 89 mU/ml, $9.7 \pm 5.9.4$ U/l; aktif RA'lılarda 71 ± 65 mU/ml ve 54 ± 39 U/l bulundu. Hem remisyondaki hem de aktif dönemdeki RA vakalarının serumlarında RF ($p < 0.05$, Şekil 3.1.1) ve anti-CCP ($p < 0.001$, Şekil 3.1.2) düzeyleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. Ancak remisyondaki vakalarla aktif evredeki RA'lılar arasında anti-CCP düzeyleri anlamlı derecede farklı ($p < 0.001$, Şekil 3.1.2) bulunurken, RF için fark anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$, Şekil 3.1.1).



Şekil 3.1.1. RA ve kontrol grubunda serum RF düzeyleri. Vakaların serum RF seviyelerinin ortalama $\pm$ SD'leri sırasıyla, kontrol grubunda 19 ± 15 mU/ml, remisyon dönemindeki grupta 72 ± 89 mU/ml ve aktif RA'lı grupta 71 ± 65 mU/ml bulundu. Hem remisyondaki hem de aktif dönemdeki RA vakalarının serumlarında RF, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0.05$). Remisyondaki vakalarla aktif evredeki RA'lılar arasında RF düzeyleri farkı istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).



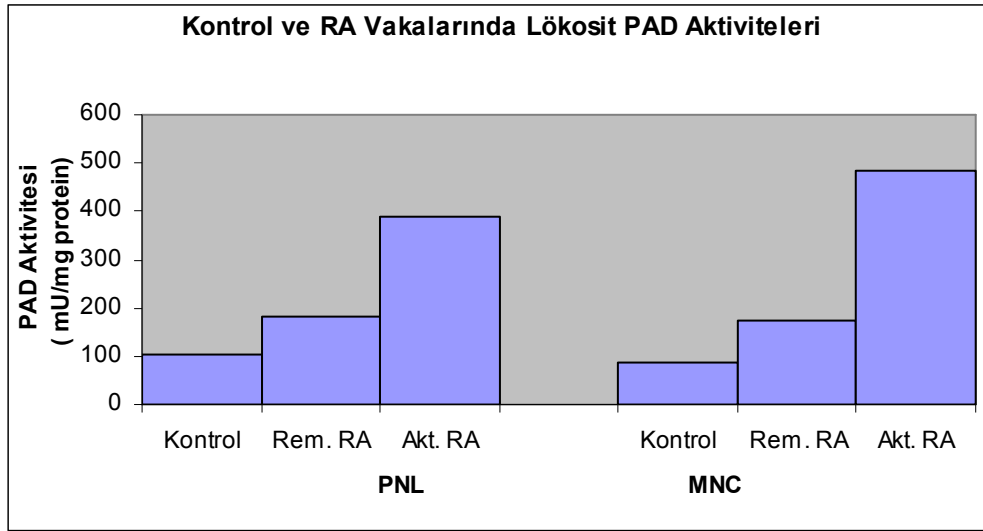
Şekil 3.1.2. RA ve kontrol grubunda serum anti-CCP düzeyleri. Vakaların serum anti-CCP seviyelerinin ortalama $\pm$ SD'leri sırasıyla, kontrol grubunda 3 ± 0.4 U/l, remisyon dönemindeki grupta $9.7 \pm 5.9.4$ U/l ve aktif RA'lı grupta 54 ± 39 U/l bulundu. Hem remisyonadaki hem de aktif dönemdeki RA vakalarının serumlarında anti-CCP kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p < 0.001$). Remisyonadaki vakalarla aktif evredeki RA'lılar arasında anti-CCP düzeyleri anlamlı derecede farklı ($p < 0.001$) idi.

Vakaların serum RF ve anti-CCP için duyarlılığı sırasıyla, remisyon dönemindeki vakalarda; %60 ve %80; aktif RA'lılarda %70 ve %100 bulundu. Testlerin özgüllüğü ise RF için %70, anti-CCP için %100'dü.

3.1.2. Lökositlerde PAD aktivitesi

Aktif dönemdeki ve remisyonadaki toplam 20 RA'lı vaka ve 20 kontrol grubunda periferik kandan polimorf nüveli lökosit (PNL) ve mononükleer hücre (MNC) izole edildi. Hücre lizatlarında yapılan ölçüm sonucunda PNL'ler için elde edilen PAD aktivitesinin ortalama $\pm$ SD değerleri kontrol, remisyon RA ve aktif RA grubunda sırasıyla, $104,9 \pm 55$; $181,2 \pm 91,8$ ve $387,5 \pm 125,7$ mU/mg protein, MNC'ler için ise sırasıyla, $85,4 \pm 21,8$, $173 \pm 147,5$ ve $485 \pm 324,2$ mU/mg protein bulundu. Aktif RA'lı vakaların her iki hücre grubundaki PAD

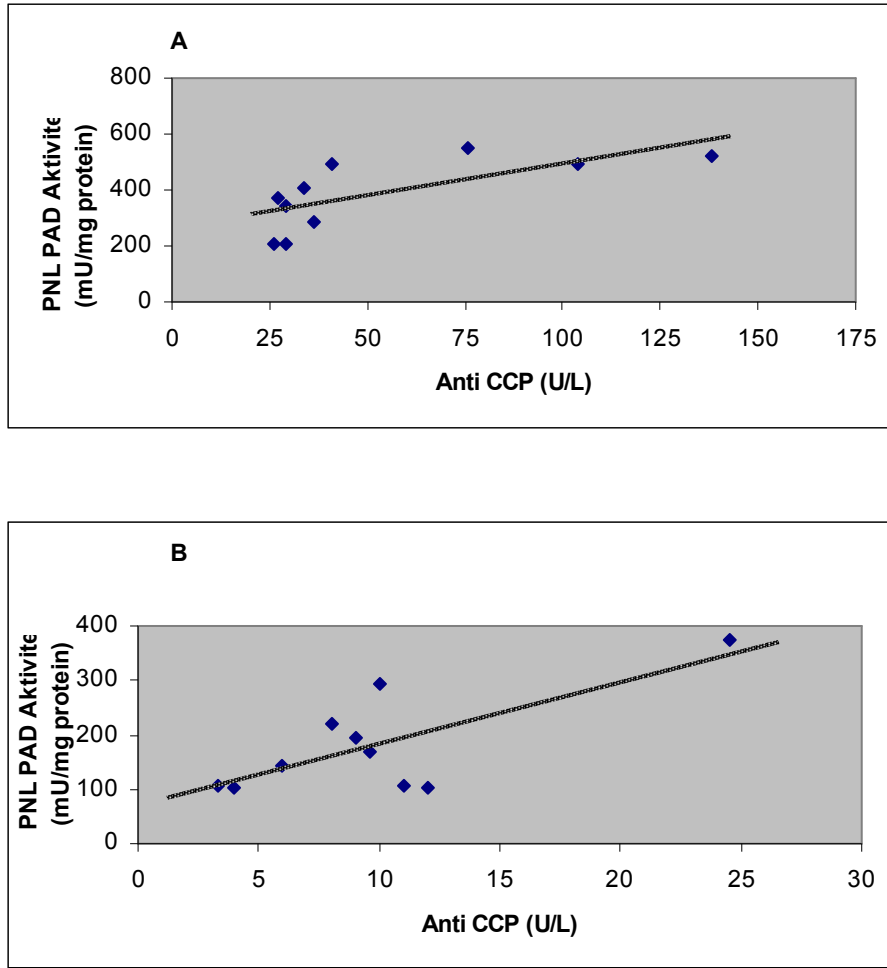
aktivitelerinin kontrole kıyasla anlamlı artış gösterdiği saptandı (PNL için $p<0.001$, MNC için $p<0.05$, Şekil 3.1.3). Remisyonundaki vakalarda PNL hücre grubundaki PAD aktiviteleri kontrole kıyasla anlamlı derecede yüksekti (PNL için $p<0.05$, Şekil 3.1.3). Ancak MNC’lerde anlamlı bir yükseklik bulunmadı ($p>0.05$, Şekil 3.1.3). Remisyonundaki vakalarla aktif evredeki RA’lılar arasında hem PNL, hemde MNC PAD aktiviteleri anlamlı derecede farklı (her iki hücre grubunda da $p<0.05$, Şekil 3.1.3) idi.



Şekil 3.1.3. PNL’lerde PAD aktivitesi. Aktif RA’lı vakaların her iki hücre grubundaki PAD aktiviteleri kontrole kıyasla anlamlı yüksekti (PNL için $p<0.001$, MNC için $p<0.05$). Remisyonundaki vakalarda PNL hücre grubundaki PAD aktiviteleri kontrole kıyasla artmış bulundu (PNL için $p<0.05$). MNC’lerde anlamlı bir yükseklik bulunmadı ($p>0.05$). Remisyonundaki vakalarla aktif evredeki RA’lılarda hem PNL, hem de MNC PAD aktiviteleri arasında anlamlı farklılık (her iki hücre grubunda da $p<0.05$) vardı.

3.1.3. PAD ve Anti CCP Arasındaki İlişki

Hem aktif dönemdeki hem de remisyonundaki RA vakalarının PNL PAD aktivitesi ile serum anti CCP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulundu (her iki grup için de $r = 0.73$, $p<0.05$, Şekil 3.1.4).



Şekil 3.1.4. RA vakalarında anti-CCP ve PNL PAD aktivitesinin korelasyonu.

A. Aktif dönemdeki RA vakalarında anti-CCP ve PNL PAD aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon vardı ($r = 0.73$, $p < 0.05$). **B.** Remisyon dönemindeki RA vakalarında da anti-CCP ve PNL PAD aktivitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon vardı ($r = 0.73$, $p < 0.05$).

3.1.4. Vakaların Lökositlerinde NO Düzeyleri

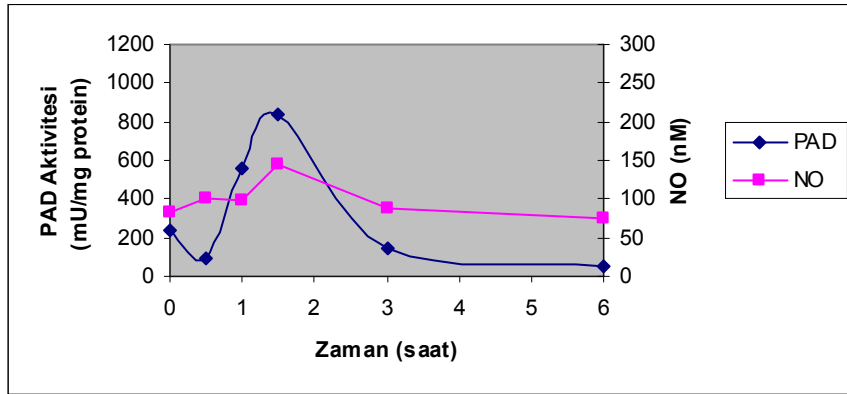
Lökositlerde yapılan ölçüm sonucunda PNL'ler için elde edilen NO düzeylerinin ortalama $\pm$ SD değerleri kontrol, remisyon RA ve aktif RA grubunda sırasıyla, $114 \pm 15,9$, $120,8 \pm 25,7$ ve $111,7 \pm 12,4$ nM; MNC'ler için ise sırasıyla, $123,3 \pm 8,9$, $143,3 \pm 32,1$ ve $140,8 \pm 54,7$ nM bulundu. Hem aktif dönemdeki hem de remisyonundaki RA vakalarının her iki lökosit grubunda da NO düzeyleri ile

kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (her iki grup için $p>0.05$).

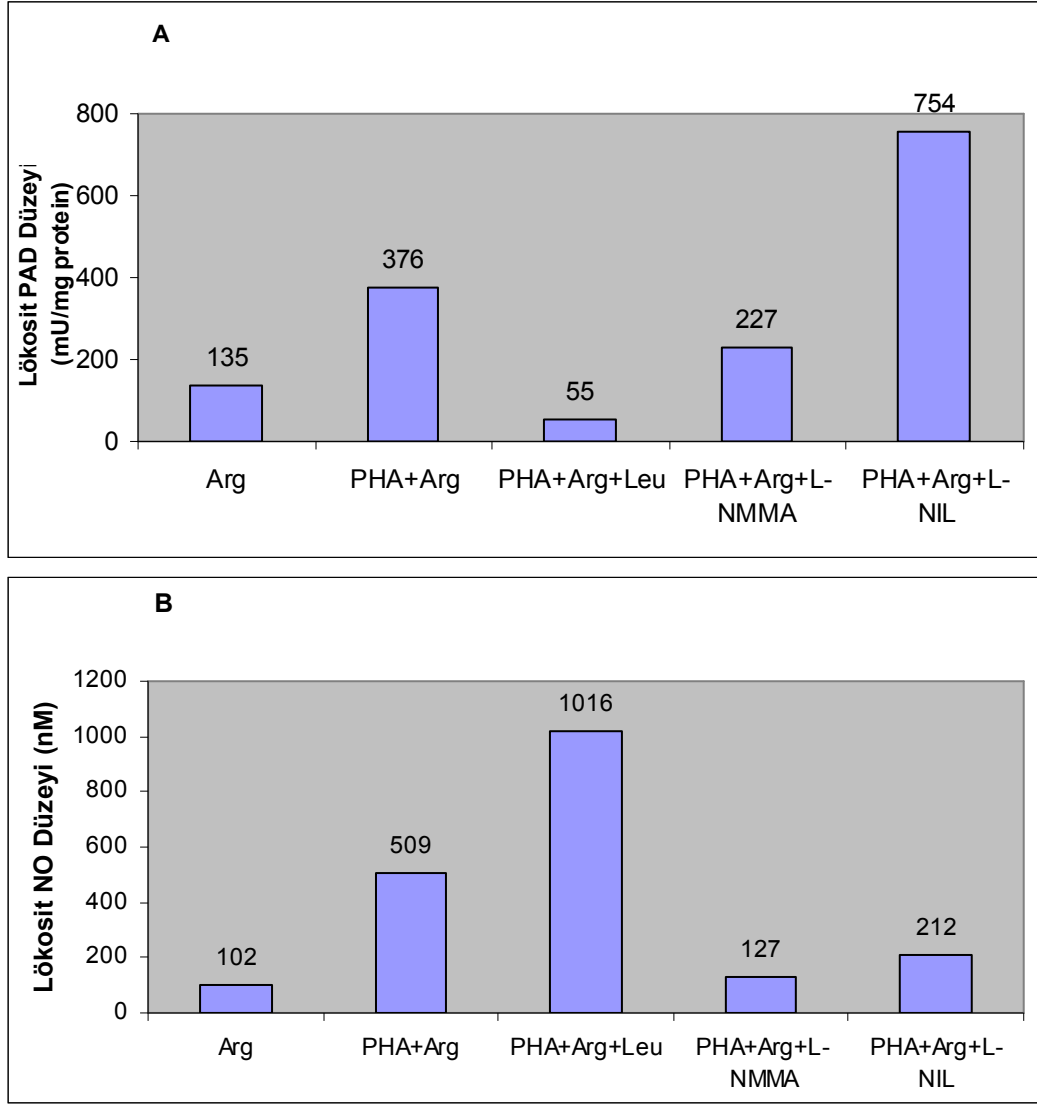
3.2. İn Vitro İnhibisyon Deneyleri

3.2.1. Lökosit Havuzunda NO ve PAD İnhibisyonu

Hücreleri aktif edecek PHA (10 μ g/ml) için en uygun inkübasyon süresi tayin etmek amacıyla hücreler 6 farklı kuyu içinde 0, 0.5, 1, 1.5, 3 ve 6 saat boyunca PHA ile inkübe edildi. İnkübasyon sonunda sonike edilen hücrelerde PAD enzim aktivitesi ve aynı süreler sonunda hücrelerin oluşturduğu NO düzeyleri ölçüldü. Hem PAD aktivitesi hem de NO düzeyi en fazla 1,5 saat PHA inkübasyonu sonrası artmış bulundu (Şekil 3.2.1).



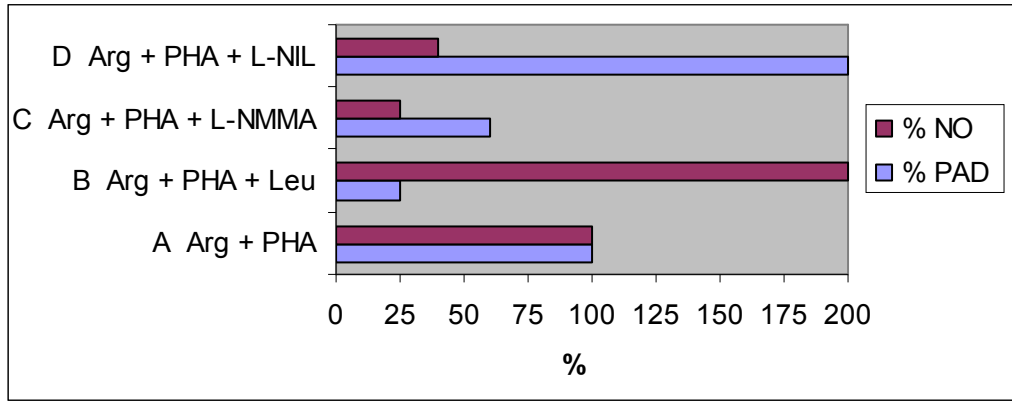
Şekil 3.2.1. Lökosit hücre havuzunda PHA ile farklı inkübasyon sürelerinin NO düzeyi ve PAD aktivitesi üzerine etkisi. Lökosit havuzunun 10 μ M PHA ile 1,5 saat inkübasyonu NO ve PAD düzeylerini en fazla aktif eder.



Şekil 3.2.2. Aktif lökosit havuzunda NO ve PAD inhibitörlerinin PAD (A) ve NO (B) düzeylerine etkisi.

Lökosit süspansiyonu beş kuyucuğa bölündü. İlk kuyucuk kontrol olarak kabul edildi. Diğer kuyucuklar 10 µg/ml PHA ile 1,5 saat inkübe edildi. Ardından tüm kuyucuklara 10^{-5} M L-arjinin konuldu. Bununla birlikte üçüncü kuyucuğa 50 µM leupeptin, dördüncü kuyucuğa 1 mM L-NMMA ve son kuyucuğa 60 µg/ml NIL ilave edildi. 30 dakikalık inkübasyon sonunda tüm kuyulardaki PAD aktivitesi sırasıyla; 135, 376, 55, 227 ve 754 mU/mg protein (Şekil 3.2.2-A) ve NO düzeyleri ise sırasıyla; 102, 509, 1016, 127 ve 212 nM (Şekil 3.2.2-B) bulundu.

Aktif lökosit havuzunda NO ve PAD inhibitörlerinin kullanımı ile NO ve PAD düzeylerinin yüzde değişimine bakıldı. İnhibisyon yüzdelerini belirlemek amacıyla sadece arjinin ve PHA eklenen grubun ölçülen NO ve PAD seviyeleri %100 kabul edildi (Şekil 3.2.3-A). Buna göre, PHA ve arjinin yanısıra spesifik PAD inhibitörü olan leupeptin eklenen grupta PAD aktivitesi %75 azalmış, NO düzeyi %100 artmıştı (Şekil 3.2.3-B). PHA, arjinin yanısıra non spesifik NOS inhibitörü olan L-NMMA eklenen grupta PAD aktivitesi %40 azalmış, NO düzeyi %75 azalmıştı (Şekil 3.2.3-C). PHA, arjinin ile beraber spesifik i-NOS inhibitörü L-NIL eklenen son grupta ise PAD aktivitesinin %100 arttığı, NO düzeyinin ise %60 azaldığı görüldü (Şekil 3.2.3-D).



Şekil 3.2.3. Aktif lökosit havuzunda NO ve PAD inhibitörlerinin NO ve PAD düzeyleri üzerine etki yüzdesi. **A.** Arjinin ve PHA eklenen bu grupta bulunan NO ve PAD seviyeleri %100 kabul edildi. **B.** PHA, arjinin ve leupeptin eklenen bu grupta PAD aktivitesi %75 azalırken, NO düzeyi %100 arttı. **C.** PHA, arjinin ve L-NMMA eklenen bu grupta PAD aktivitesi %40 azalırken, NO düzeyi %75 azaldı. **D.** PHA, arjinin ve L-NIL eklenen bu grupta PAD aktivitesi %100 artarken, NO düzeyi %60 azaldı.

TARTIŞMA

Romatoid artrit (RA), en sık karşılaşılan ve toplumun % 0.5-1'ini etkileyen inflamatuvar artrit tablosudur. Primer olarak el ve ayakların küçük eklemlerini tutan simetrik poliartriküler bir hastalıktır. Poliartritle sınırlı olmayıp daima eklem dışı semptom ve bulgular da gösteren bir hastalık olarak bilinmektedir. Tüm vakalardaki genel semptomlar simetrik eklem ağrısı ve şişliği halsizlik ve sabah tutukluğudur. Sıklıkla etkilenen eklemler el ve ayak parmakları başta olmak üzere el bileği, diz ve ayak bileğidir (1). Çalışmalar, geri dönüşümsüz eklem kıkırdak yıkımının romatoid artritin erken döneminde başladığını göstermektedir. Bu nedenle tedaviye, eklem hasarından korunmak için erken dönemde başlanması zorunludur (3).

Hastalığın patogenezi, genetik ve çevresel bazı faktörlerin tetikleyici olarak rol oynadıkları ispatlandığı halde, hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak hastalığın başlangıcı net olmasa da devamlılığı sağlayan immunolojik olaylar olduğu ve bunun eklem hasarında rol oynadığı iyi bilinmektedir (1).

Romatoid faktörün bir antikor olarak tanımlanması ve romatoid artritli hastaların kanlarında romatoid faktörün (RF) saptanması otoimmunitenin RA patogenezinde rol oynayabileceğinin ilk kanıtı olmuştur. Hastalığa yakalanan vakaların % 80 kadarının RF seropozitif olması bu düşüncüyü güçlendirmiştir (2,3). Ancak bu antikoron kronik inflamatuvar hastalıkların çoğunda hatta ileri yaştaki sağlıklı bireylerde bile saptanmış olması RA için spesifitesini kısıtlamaktadır (4,5).

Günümüzde Romatoid artrit için RF'den çok daha spesifik bir otoantikor ailesi tanımlanmıştır (6). Bu antikorların, yapısında sitrulin içeren proteinlere karşı geliştiği gösterilmiştir. Sitrulin standart olmayan bir amino asittir ve translasyon sırasında proteinlerin yapısına katılmaz. Ancak bazı durumlarda proteinlerin yapısındaki arjininlerin posttranslasyonel enzimatik deiminasyonu ile sitruline dönmeleri sonucu sitrulin içeren modifiye proteinler oluşabilir. Bu

reaksiyon sitrulinasyon olarak adlandırılır ve bu dönüşüm Ca^{++} bağımlı bir enzim olan peptidilarginin deiminaz ailesi tarafından katalizlenir (10-14, 39-43). Northern blot tekniğiyle PAD4 proteininin dokulardaki dağılımı incelendiğinde, bu izoformun özellikle kemik iliğinde ve periferik kandaki nötrofil ve monositlerde yüksek miktarlarda sentezlendiği gösterilmiştir (43-47). RA'da periferik kandan sinoviyuma nötrofillerin ve monositlerin göç ettiği bilinmektedir. İnflamasyonun etkisiyle artan lökosit membran geçirgenliği, hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunu artırır. Buda PAD4 enziminin aktive olmasına neden olur. Aktive PAD4, ekstrasvasküler fibrin proteinini sitrulinler ve oluşan bu modifiye fibrin proteinine karşı bölgesel özelleşmiş B lenfositler tarafından otoantikor sentezi gerçekleşir. Sitrulinli peptidlere karşı oluşan bu antikorlar (anti-CCP) RA'lı hastaların hem sinoviyal dokularında hemde serumlarında gösterilmiş olup hastalık için oldukça spesifiktir. Daha önce yapılan çalışmalar, RF'nin anti-CCP'ye göre daha duyarlı (%62) fakat daha az özgül (%84) bir test iken, anti-CCP'nin RA için oldukça özgül (%98) ve duyarlı (%68-75) olduğunu göstermiştir (15,17). Bu otoantikoru saptanmasına yönelik geliştirilmiş bir ELISA kiti bulunmaktadır ve bugün bu parametre RA'nın erken tanısında ve prognozunun değerlendirilmesinde RF'den çok daha kıymetli bulunmaktadır (38,41-46).

Bizim bu çalışmadaki ilk amacımız romatoid artrit prognozunu yansıtmada anti-CCP'nin etkili olup olmadığını değerlendirmektir. Sonuçta RA'lı vakaların serum RF ve anti-CCP için duyarlılığını sırasıyla, remisyon dönemindeki vakalarda; %60 ve %80; aktif evredeki vakalarda %70 ve %100, testlerin özgüllüğünü ise RF için %70, anti-CCP için %100 olarak bulduk. Her iki otoantikoru hastalık aktivitesi ile ilişkisine baktığımızda, kontrole kıyasla RA vakasını ayırt etmede, her iki testinde etkili olduğunu (RF için $p<0.05$ ve anti-CCP için $p<0.001$) ancak remisyon ve aktif dönem ayırımında sadece anti-CCP'nin etkili olduğunu gördük (anti-CCP için $p<0.001$ ve RF için $p>0.05$). Bu nedenle anti-CCP'nin RA için kullanılan remisyon kriterleri içinde yer almasının doğru olacağını düşünmekteyiz.

RA'lı sinoviyal dokuda anti CCP ve sitrulinlenmiş proteinlerin varlığının gösterilmesi bu alanda PAD enziminin de olması gerektiğini akla getirmiştir. Bugün RA'lı vakaların sinoviyal dokularında, insitu RT PCR ve immunhistokimyasal teknikler kullanılarak sitrulinlenmiş proteinlerin yanısıra PAD4 ve PAD2 proteinlerinin varlığı da kanıtlanmıştır. Sinoviyal dokuda bu enzimin kaynağı olarak iki hücre gösterilmiştir; aktive makrofajlar ve nötrofiller (28). RA'da, periferik kandan sinoviyal dokuya çok sayıda monosit ve nötrofil göç eder. Ekleme ulaşan monositler aktive makrofajlara dönüşerek sinoviyal membrana yerleşirler. Bu hücrelerin PAD2 ve PAD4 sentezlediği ve RA'lilerde sitrulinlenmiş protein içerdikleri gösterilmiştir (20,28,31,32).

Bu çalışmadaki bir amacımız da hastaların periferik lökositlerinde PAD enzim aktivitesini ölçmek ve hastalık aktivitesi ile ilişkisi olup olmadığına bakmaktır. Sonuçta özellikle aktif dönemdeki RA vakalarının MNC ve granülositlerinde PAD enzim aktivitesinin kontrole kıyasla anlamlı artış gösterdiğini bulduk (PNL için $p<0.001$, MNC için $p<0.05$). Yine remisyondaki vakalarda da PNL hücre grubundaki PAD aktivitesini kontrole kıyasla anlamlı derecede yüksek gördük (PNL için $p<0.05$). Ancak MNC'lerde anlamlı bir yükseklik bulunmadık ($p>0.05$). Buna karşılık, remisyondaki vakalarla aktif evredeki RA'lilar arasında hem PNL, hem de MNC PAD aktivitelerinin anlamlı derecede farklı olduğunu gördük (Her iki hücre grubunda da $p<0.05$). Yanı sıra hem aktif dönemdeki hem de remisyondaki RA vakalarının PNL PAD aktivitesi ile serum anti CCP düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptadık (her iki grup için de $r=0.73$, $p<0.05$). Bunlara dayanarak romatoid artrit patogenezinde, sitrulinli peptid otoantijenlerinin oluşumuna neden olan PAD enzim aktivitesinin nötrofillerde daha fazla olduğunu, otoantikör oluşumundan büyük ölçüde bu hücrelerin sorumlu olduğunu ve hastalık aktivitesinin değerlendirilmesinde özellikle periferik nötrofil PAD aktivitesinin kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

Romatoid artrit multifaktoriyal bir hastalıktır. Bu güne kadar yapılan bir çok çalışma, inflamatuvar eklem patogenezinde ve inflamasyonun kronikleşmesinde nitrik oksidin (NO) de rolü olduğunu göstermiştir (10-15). Normal durumda eklem içindeki major NO kaynağı kondrositler ve sinovisitik fibroblastlar iken, inflamasyonda eklem içi en önemli NO kaynağının, periferden bölgeye göç eden monositlerin oluşturduğu makrofajlar olduğu anlaşılmıştır (11,12). Yine inflamatuvar eklem alanına göç eden nötrofillerin de özellikle artan iNOS aktiviteleri üzerinden NO sentezini arttırarak patogeneze katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır (13,16). IL-1 başta olmak üzere bazı sitokinlerin uyarısıyla kondrositler, bölgesel makrofajlar ve nötrofillerde NO sentezi artar. Artan NO'nun artrit patogenezinde, kondrositlerde apoptozisini arttırarak, siklooksijenaz enzimini (COX) ve matriks metalloproteinazları (MMPs) aktive ederek etki gösterdiği bilinmektedir (11,12,14,15).

Çalışmamızda RA'lı vakaların periferik kan nötrofil ve mononükleer hücrelerinde nitrik oksit (NO) düzeyini tayin ettik ve bunların hastalık aktivitesi ile olası ilişkilerini değerlendirdik. RA vakalarının her iki lökosit grubunda da NO düzeyleri ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göremedik (iki grup için de $p>0.05$).

Peptidilarginin deiminaz (PAD), proteine bağlı olan arjinin rezidulerini sitruline modifiye eden ve bu esnada ortama NH_3 salan bir enzimdir. Nitrik oksit sentaz (NOS) ise serbest arjinini sitruline çeviren ve PAD'dan farklı olarak ortama NO veren bir enzimdir (82). İki enzim arasındaki ilişkiye yönelik yapılan bir inhibisyon çalışmasında nonselektif NOS inhibitörü olan L-NAME ve L – thiocitrullin'in milimolar düzeyindeki konsantrasyonlarda dahi PAD enzimini %100 inhibe ettiği gösterilmiştir. Her iki maddenin de PAD'ın substratı olan benzoyl arginine ile yarışmaya girdiği görülmüştür. Yine aynı çalışmada ayrıca sentetik bir peptidil arjinin aldehit inhibitörü olan leupeptinin PAD'ı kuvvetle inhibe ettiği gözlenmiştir (83).

Diğer taraftan PAD'ın son ürünü olan NH₃'ün iNOS ekspresyonunu arttırarak aktive edebileceği düşünülmektedir (82). Bütün bu bulgulardan, NOS ve PAD aktiviteleri sonrasında oluşan reaksiyon ürünleri olan serbest ve proteine bağlı sitrulinin bu enzimlerin aktivitelerini inhibe edebileceği düşünülebilir. Ayrıca bu reaksiyon ürünlerinden NH₃ ve serbest sitrulinin üre döngüsüne katılıp yeniden NOS substratı olan arjinine dönüşmesi mümkündür. Bu durum NOS için bir substrat sağlama yolu olabilir ve dolaylı bir PAD-NO ilişkisi ortaya çıkabilir.

Biz de bu çalışmada, invitro deney ortamındaki lökositlerdeki PAD enzimi aktivitesiyle NO düzeyi arasında bir bağlantı olup olamayacağını araştırdık. Bu amaçla invitro ortamda hazırladığımız lökosit havuzunu kısımlara ayırdık (10⁶ hücre/ml) ve farklı kuyucuklara pipetledik. Ardından tüm kuyuları bulmuş olduğumuz en uygun inkübasyon süresi olan 1,5 saat boyunca 10µg/ml PHA ile inkübe edip hücreleri aktive ettik. Tüm kuyucuklara substrat olarak 10⁻⁵ mol/L L-arjinin ilave ettik. Bir kuyuyu kontrol olarak bıraktıktan sonra, sırayla bir kuyucuğa spesifik PAD inhibitörü leupeptin (50 µmol/L), diğerine non spesifik NOS inhibitörü L-NMMA (1 mmol/L) ve son kuyucuğa spesifik iNOS inhibitörü NIL (60 µg/ml) koyduk (83). 30 dakikalık inkübasyon sonunda tüm kuyulardaki NO düzeyi ve PAD aktivitesine baktığımızda; leupeptinin PAD aktivitesini %75 azaltırken, NO düzeyini iki katına çıkarttığını, L-NMMA'nın PAD aktivitesini %40, NO düzeyini %75 azalttığını ve L-NIL'in NO düzeyini %60 azaltırken PAD aktivitesini iki kat arttırdığını saptadık. Bu sonuçlara dayanarak, aynı substrata etki eden iki enzim olan PAD ve NOS aktivitelerinin beraber kontrol altına alınması özellikle inflamatuvar patolojilerin tedavisinde daha etkili olacaktır diyebiliriz.

SONUÇLAR

- Romatoid artritli vakalarda tedavinin değerlendirilmesi ve prognozun takibi açısından serum anti-CCP düzeyinin bir remisyon kriteri olarak ve hastalık aktivite indeksi hesaplanmasında kullanımının faydalı olacağını düşünmekteyiz.
- RA vakalarının periferel lökositlerinde ölçtüğümüz NO düzeylerinin hastalık aktivitesi ile ilişkili bulunmaması vaka sayımızın düşük olmasından etkilenmiş olabilir. Bu sebeple daha geniş hasta gruplarında çalışılması uygun olacaktır.
- RA’da hastalık aktivitesine paralel olarak özellikle periferel nötrofillerde PAD enzim aktivitesinin belirgin artması nedeniyle, hastalığın tedavi takibinde bu enzim düzeyine bakılmasını ve tedavide PAD enzimini inhibe edecek ajanlar geliştirilmesini önermekteyiz. Ancak bu esnada, yaptığımız invitro inhibisyon çalışmasının sonuçlarına dayanarak, geliştirilecek ajanın PAD ile birlikte NOS’u da inhibe etmesine dikkat edilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. May 15;423:356-61, 2003.
2. Firestein GS, Corr M. Common mechanisms in immune-mediated inflammatory disease. *J Rheumatol. Suppl.* Feb;73:8-13; discussion 29-30, 2005.
3. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. Sep 15;358(9285):903-11, 2001.
4. Symmons DP. Epidemiology of persistence and outcome of rheumatoid arthritis: determinants of onset, persistence and outcome. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* Dec;16(5):707-22, 2002. Review.
5. Stastny P. HLA-D and Ia antigens in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* Jun;21(5 Suppl):S139-43., 1978.
6. Silman AJ. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4 Suppl 3:265-72. May 9, 2002.
7. Tuomi T. Smoking, lung function, and rheumatoid factors. *Ann Rheum Dis.* Oct;49(10):753-6, 1990.
8. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2002 Dec;16(5):707-22. Stastny P. HLA-D and Ia antigens in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* Jun;21(5 Suppl):139-43, 1978.
9. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315-24, 1988.
10. Sakurai H, Kohsaka H, Liu M-F, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K, et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest.* 96:2357-63, 1995.

11. Hadjigogos K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Panminerva Med.* 45:7-13, 2003.
12. Christophe B, Emmanuelle D-L, Hervé B, Dominique L, Maxime B. Nitric oxide in rheumatology. *Joint Bone Spine.* 68:457-62, 2001.
13. St. Clair EW, Wilkinson WE, Lang T, Sanders L, Misukonis MA, Gilkeson GS, Pisetsky DS, Granger DL, Weinberg JB. Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. *The Journal of Experimental Medicine.* 184:1173-78, 1996.
14. Stefanovic-Racic M, Stadler J, and Evans CH. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis and rheumatism.* 36:1036-44, 1993.
15. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The rol of nitric oxide in inflamation and immunity. *Arthritis & Rheumatism* 41:1141-51, 1998.
16. Sethi S and Dikshit M. Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thrombosis Research* 100:223-247, 2000.
17. Van Schaardenburg D, Lagaay AM, Otten HG, Breedveld FC. The relation between class-specific serum rheumatoid factors and age in the general population. *Br J Rheumatol* 32:546–9, 1993.
18. Newkirk MM. Rheumatoid factors: host resistance or autoimmunity? *Clin Immunol.* Jul;104(1):113, 2002.
19. Van Boekel MA, Vossenaar ER, van den Hoogen FH, van Venrooij WJ. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value. *Arthritis Res.* 4(2):87-93. Epub 2001 Nov 06, 2002.
20. Alnigenis MN, Warikoo S, Barland P. Amtiperinuclear factor and antikeratin antibody: diagnostic use in a clinical laboratory setting. *J Rheumatol.* Aug;27(8):2056-7, 2000.

21. Young BJ, Mallya RK, Leslie RD, Clark CJ, Hamblin TJ Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J*. Jul 14 (2):97-9, 1979.
22. Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomes-Daudrix V, Vincent C, Salama G, Serre G. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. Sep;92(3):1387-93, 1993.
23. Sebbag M, Simon M, Vincent C, Masson-Bessiere C, Girbal E, Durieux JJ, Serre G The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. Jun;95(6):2672-9, 1995.
24. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. Jan 1;101(1):273-81, 1998.
25. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. Jan;43(1):155-63, 2000.
26. Van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med*. Nov;60(10):383-8, 2002.
27. Vasishta A. Diagnosing early-onset rheumatoid arthritis: the role of anti-CCP antibodies. *Am Clin Lab*. Aug-Sep;21(7):34-6, 2002.
28. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum*. Feb;46(2):357-65, 2002.
29. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M, van de Putte LB, van Rijswijk MH, van Venrooij WJ, van Riel PL. The prognostic

value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Aug;43(8):1831-5, 2000.

30. Meyer O, Labarre C, Dougados M, Goupille P, Cantagrel A, Dubois A, Nicaise-Roland P, Sibilia J, Combe B. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann Rheum Dis.* Feb;62(2):120-6, 2003.
31. Vencovsky J, Machacek S, Sedova L, Kafkova J, Gatterova J, Pesakova V, Ruzickova S. Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* May;62(5):427-30, 2003.
32. Van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2(4):249-51. Epub 2000 May 24, 2000.
33. Vossenaar ER, Radstake TR, Van Der Heijden A, Van Mansum MA, Dieteren C, De Rooij DJ, Barrera P, Zendman AJ, Van Venrooij WJ. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis.* Apr;63(4):373-81, 2004.
34. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays.* Nov;25(11):1106-18, 2003.
35. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB, van Venrooij WJ, Joosten LA. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Sep;48(9):2489-500, 2003.
36. Rus'd AA, Ikejiri Y, Ono H, Yonekawa T, Shiraiwa M, Kawada A, Takahara H. Molecular cloning of cDNAs of mouse peptidylarginine deiminase type I, type III and type IV, and the expression pattern of type I in mouse. *Eur J Biochem.* Feb;259(3):660-9, 1999.

37. Guerrin M, Ishigami A, Mechlin MC, Nachat R, Valmary S, Sebbag M, Simon M, Senshu T, Serre G. cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. *Biochem J.* Feb 15;370:167-74, 2003.
38. Nakashima K, Hagiwara T, Ishigami A, Nagata S, Asaga H, Kuramoto M, Senshu T, Yamada M. Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Biol Chem.* Sep 24;274(39):27786-92, 1999.
39. Asaga H, Nakashima K, Senshu T, Ishigami A, Yamada M. Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *J Leukoc Biol.* Jul;70(1):46-51, 2001.
40. Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J Biol Chem.* Dec 20;277(51):49562-8. Oct 18, 2002.
41. Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* Aug;34(4):395-402, 2003.
42. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Durieux JJ, Nogueira L, Vincent C, Girbal-Neuhausser E, Durroux R, Cantagrel A, Serre G. In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin Exp Immunol.* 2 Mar;119(3):544-52, 2000.
43. Reparón-Schuijt CC, van Esch WJ, van Kooten C, Schellekens GA, de Jong BA, van Venrooij WJ, Breedveld FC, Verweij CL. Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Jan;44(1):41-7, 2001.

44. Masson-Bessiere C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol.* Mar 15;166(6):4177-84, 2001.
45. Cutolo M, Sulli A, Barone A, Seriola B, Accardo S. Macrophages, synovial tissue and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* May-Jun;11(3):331-9,1993.
46. Hayem G, Chazerain P, Combe B, Elias A, Haim T, Nicaise P, Benali K, Eliaou JF, Kahn MF, Sany J, Meyer O. Anti-Sa antibody is an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* Jan;26(1):7-13, 1999.
47. Bostan M, Brasoveanu LI, Livescu A, Manda G, Neagu M, Iordachescu D. Effects of synovial fluid on the respiratory burst of granulocytes in rheumatoid arthritis. *J Cell Mol Med.* Apr-Jun;5(2):188-94, 2001.
48. Weinberg JB, Pippen AM, Greenberg CS. Extravascular fibrin formation and dissolution in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Aug;34(8):996-1005, 1991.
49. Kroot EJ, de Jong BA, van Leeuwen MA, Swinkels H, van den Hoogen FH, van't Hof M, van de Putte LB, van Rijswijk MH, van Venrooij WJ, van Riel PL. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Aug;43(8):1831-5, 2000.
50. S Dubucquoi, E Solau-Gervais, D Lefranc, L Marguerie, J Sibilia, J Goetz, V Dutoit, A-L Fauchais, E Hachulla, R-M Flipo, and L Prin. Evaluation of anti-citrullinated filaggrin antibodies as hallmarks for the diagnosis of rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* April 1; 63(4): 415 – 419, 2004.
51. O Meyer, C Labarre, M Dougados, Ph Goupille, A Cantagrel, A Dubois, P Nicaise-Roland, J Sibilia and B Combe. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage *Annals of the Rheumatic Diseases* 62:120-126, 2003.

52. Xiaofeng Zeng, Maixing Ai, Xinping Tian, Xiaodan Gan, Yanping Shi, Qinfang Song, And Fulin Tang. Diagnostic Value of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* 30:1451-5, 2003.
53. Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G.; Moncada, S., "NO release accounts for the biological activity of EGRF" *Nature* pp. 524-526, 1987.
54. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. Aug 1;167(3):1601-8, 2001.
55. Mitchell, H.H.; Shoule, H.A.; Grindley, H.S., "The origin of nitrates in the urine" *J. Biol Chem.* pp. 461-490, 1916.
56. Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G.; Moncada, S., "NO release accounts for the biological activity of EGRF" *Nature* pp. 524-526, 1997.
57. MacMicking, J.; Xie Q-, W.; Nathan, C., "Nitric oxide and macrophage function" *Annu Rev Immunol* pp. 323-350, 1997.
58. J S Stamler, D J Singel and J Loscalzo, Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258, pp. 1898–1902, 1992.
59. A I Sharara, D J Perkins and M A Misukonis, Interferon (IFN)-alpha activation of human blood mononuclear cells in vitro and in vivo for nitric oxide synthase (NOS) type 2 mRNA and protein expression: possible relationship of induced NOS2 to the anti-hepatitis C effects of IFN-alpha in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 186, pp. 1495–1502, 1997.
60. P R Myers, R L Minor, Jr and R Guerra, Jr, Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345, pp. 161–163, 1990.

61. W A Pryor and G L Squadrito, The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American Journal of Physiology* 268, pp. L 699–722, 1995.
62. A Hausladen, C T Privalle and T Keng, Nitrosative stress: activation of the transcription factor Oxy. R. *Cell* 86, pp. 719–729, 1996.
63. R M Clancy and S B Abramson, Acetylcholine prevents intercellular adhesion molecule 1 (CD54)-induced focal adhesion complex assembly in endothelial cells via a nitric oxide-cGMP-dependent pathway. *Arthritis & Rheumatism* 43, pp. 2260–2264, 2000.
64. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. Dec;15(5):831-45, 2001.
65. Sakurai, H.; Kohsaka, K.; Liu, M., "Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase in human chondrocytes" *Biochem Biophys Res Commun* pp. 398-405, 1993.
66. Bernardeau C, Dernis-Labous E, Blanchard H, Lamarque D, Breban M. Nitric oxide in rheumatology. *Joint Bone Spine*. Dec;68(6):457-62, 2001.
67. H M Belmont, D Levartovsky and A Goel, Increased nitric oxide production accompanied by the up-regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular endothelium from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 40, pp. 1810–1816, 1997.
68. A I Sharara, D J Perkins and M A Misukonis, Interferon (IFN)-alpha activation of human blood mononuclear cells in vitro and in vivo for nitric oxide synthase (NOS) type 2 mRNA and protein expression: possible relationship of induced NOS2 to the anti-hepatitis C effects of IFN-alpha in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 186 (1997), pp. 1495–1502, 1997.

69. N L McCartney-Francis, X Song, D E Mizel and S M Wahl, Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. *Journal of Immunology* 166, pp. 2734–2740, 2001.
70. D T Efron, S J Kirk and M C Regan, Nitric oxide generation from L-arginine is required for optimal human peripheral blood lymphocyte DNA synthesis. *Surgery* 110, pp. 327–334, 1991.
71. P F Merryman, R M Clancy, X H He and S B Abramson, Modulation of human T cell responses by nitric oxide and its derivative, S-nitrosoglutathione. *Arthritis & Rheumatism* 36, pp. 1414–1422, 1993.
72. Y-M Kim, R V Talanian and R Billiar, Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 272, pp. 31138–31148, 1997.
73. R Clancy, G Marder and V Martin, Circulating activated endothelial cells in systemic lupus erythematosus: further evidence for diffuse vasculopathy. *Arthritis & Rheumatism* 44, pp. 1203–1208, 2001.
74. M Stefanovic-Racic, J Stadler and C H Evans, Nitric oxide and arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 36, pp. 1036–1044, 1993.
75. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *J Immunol.* Aug 1;167(3):1601-8, 2001
76. Secco DD, Paron JA, de Oliveira SH, Ferreira SH, Silva JS, Cunha Fde Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide*, Nov;9(3):153-64, 2003.
77. Kobayashi H, Cui T, Ando M, Hataishi R, Imasaki T, Mitsufuji H, Hayashi I, Tomita T. Nitric oxide released from iNOS in polymorphonuclear leukocytes makes them deformable in an autocrine manner. *Nitric Oxide*. Nov;7(3):221-7, 2002.

78. H Sakurai, H Kohsaka and M-F Liu, Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *Journal of Clinical Investigation* 96, p. 2357, 1996.
79. E W St Clair, W E Wilkinson and T Lang, Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. *Journal of Experimental Medicine* 184, pp. 1173–1178, 1996.
80. Choi JW. Nitric oxide production is increased in patients with rheumatoid arthritis but does not correlate with laboratory parameters of disease activity. *Clin Chim Acta*. Oct;336:83, 2003.
81. Hilliquin, P.; Borderie, D.; Hernvann, A.; Menkès, C.J.; Ekindjian, O.G., "Nitric oxide as S-nitrosoproteins in rheumatoid arthritis" *Arthritis Rheum*. pp. 1512-1517, 1997.
82. Schliess F, Gorg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Haussinger D. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J*. May;16(7):739-41,2002.
83. McGraw WT, Potempa J, Farley D, Travis J. Purification, characterization, and sequence analysis of a potential virulence factor from *Porphyromonas gingivalis*, peptidylarginine deiminase. *Infect Immun*. Jul;67(7):3248-56, 1999.
84. Smolen JS. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology*. 42:244-257, 2003.
85. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. Nov;193(1):265-75, 1951.
86. Watanabe K, Akiyama K, Hikichi K, Ohtsuka R, Okuyama A, Senshu T. Combined biochemical and immunochemical comparison of peptidylarginine deiminases present in various tissues. *Biochim Biophys Acta*. Sep 8;966(3):375-83, 1988.

87. Boyde TR, Rahmatullah M. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Anal Biochem.* Sep 15;107(2):424-31, 1980.
88. Lopez-Hoyos M, Ruiz de Alegria C, Blanco R, Crespo J, Pena M, Rodriguez-valverde V, and Martinez-Taboada VM. Clinical utility of anti-CCP antibodies in the differential diagnosis of elderly-onset rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatology Advance Access Published.* February.17, 2004.
89. Zhang X and Broderick M. Amperometric detection of nitric oxide. *Mod Asp Immunobiol.* 1(4):160-165, 2000.