

30135.

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KRONİK BÖBREK HASTALARINDA
OKSİDAN ETKİNİN
DEĞİŞİK YÖNTEMLERLE ÖLÇÜLMESİ**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. GONCAGÜL HAKLAR

Danışman

Prof. Dr. A. Süha Yalçın

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İstanbul-1994

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında gösterdiği yakın ilgi, değerli katkı ve yönlendirmelerinden dolayı

Sayın Prof. Dr. A. Süha Yalçın'a

Uzmanlık eğitimim sırasında değerli katkı ve desteklerini gördüğüm

Sayın Prof. Dr. Kaya Emerk'e,

Sayın Prof. Dr. Yavuz Taga'ya,

Sayın Doç. Dr. Nesrin Özer'e,

Sayın Yar. Doç. Dr. Serpil Bilsel'e

ve tüm çalışma arkadaşlarıma içten teşekkürlerimi sunarım.

KISALTMALAR

ADP	Adenozin difosfat
DHT	Düzenli hemodiyaliz tedavisi
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
ESR	Elektron spin rezonans spektroskopisi
GLC	Gaz sıvı kromatografisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LA	Linoleik asit
MDA	Malon(di)aldehit
NADPH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
PL	Fosfolipit
SOD	Süperoksit dismütaz enzimi
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler
UV	Işığın ultraviyole bölgesi

İÇİNDEKİLER

Giriş ve Genel Bilgiler.....	1
Amaç.....	17
Gereç ve Yöntemler.....	18
Bulgular.....	25
Tartışma.....	30
Özet.....	37
Kaynaklar.....	39

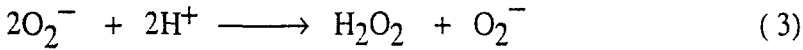
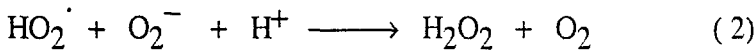
GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Anaerobik ortamlara uyum sağlamış organizmalar haricinde tüm canlılar yaşamlarını sürdürürebilmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Canlıların enerji üretimi için çok gerekli olan oksijenin bazı ara bileşikleri ise hücresel düzeyde son derece toksik etki gösterirler. Genel olarak adlarına reaktif oksijen türleri denilen bu grup moleküllerin önemli bir kısmını serbest radikaller oluşturur (Şekil 1). Serbest radikaller bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektron taşıyan bileşiklerdir. Bu tanımın içine pek çok geçiş metali iyonu ve oksijen molekülü de girmektedir (1,2,3,4,5,6,7,8).

Reaktif oksijen türleri

Singlet Oksijen: Temel halinde en dış orbitalinde taşıdığı iki eşleşmemiş elektronuyla oksijen atomu da bir radikaldir. Ancak elektronların spinleri aynı yönde olduğu için çok reaktif değildir. Oksijen atomunun uyarılmasıyla oluşan singlet oksijen ise daha reaktiftir. Porfiri hastalığının yüksek konsantrasyonda singlet oksijen oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca solunumsal patlama olayı ve süperoksit radikalinin dismütasyonu da singlet oksijen oluşturmaktadır (1,6,8,9).

Süperoksit radikali: Oksijenin bir elektron indirgenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur (O_2^-). Hücre içinde oksihemoglobin'in methemoglobin'e dönüşmesi aşamasında, ksantin oksidaz enziminin katalizlediği reaksiyonlarla, elektron taşıma zincirinde oksijen indirgenirken ve solunumsal patlama olayında süperoksit radikali oluşmaktadır. Süperoksit radikalinin dismütasyonu ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur.

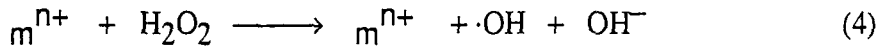


Süperoksit dismütaz (SOD) enzimiyle bu reaksiyonlar 4 kez hızlanır (1,12,14,15,83).

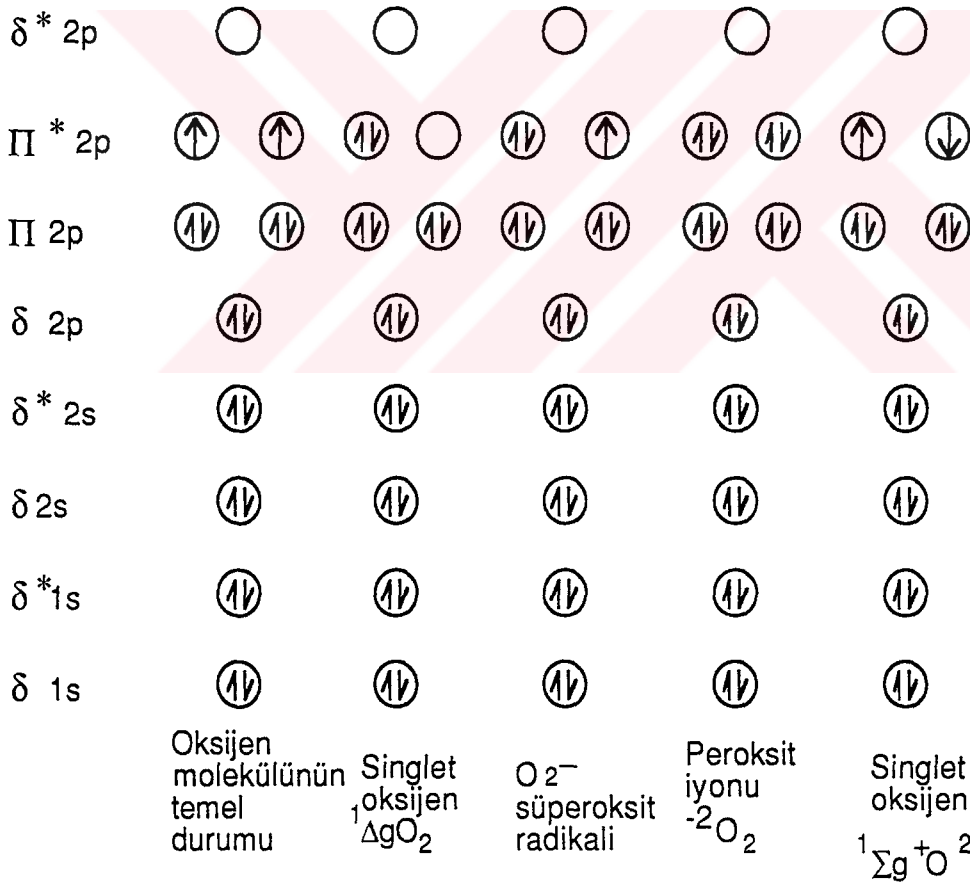
Hidrojen Peroksit: Süperoksit radikali oluşturan sistemlerde enzimatik olmayan veya SOD ile katalizlenen dismütasyonlarla hidrojen peroksit de oluşmaktadır (Reaksiyon 3). Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektron taşımadığı için radikal olarak kabul edilmez. H_2O_2 'nin reaktivitesi düşük olmasına karşın, yüklü süperoksit

radikalinin aksine biyolojik membranlardan kolaylıkla geçer (1,6,8,9).

Hidroksil ($\cdot\text{OH}$) ve hidroperoksil ($\text{HO}_2\cdot$) radikalleri: Süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin hücrede oluşturduğu hasar daha reaktif olan hidroksil ve hidroperoksil radikallerine dönüşmelerine bağlıdır. O_2^- radikalinin protonasyonu sonucu oluşan hidroperoksil radikali köken aldığı radikale göre daha az polar olduğu için biyolojik membranları hidrojen peroksite yakın bir etkinlikle geçer. Süperoksit radikaline göre daha reaktif olduğu için hidroperoksil radikali potansiyel olarak önemlidir. Hidroksil radikali çok reaktif olup yüksek dozda iyonize edici radyasyona maruz kalmakla veya hidrojen peroksitin metal bağımlı yıkımıyla oluşur (1,6,8,9,10).



(Burada m^{n+} metal iyonunu simgelemektedir.)



ŞEKİL 1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

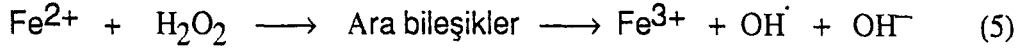
Hücre içindeki reaktif oksijen kaynağı olaylar Tablo 1'de verilmektedir.

TABLO 1 HÜCRE İÇİNDEKİ REAKTİF OKSİJEN KAYNAĞI OLAYLAR (11,12,13)

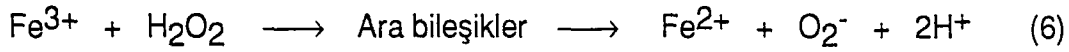
Reaktif oksijen türleri veya öncülleri	Kaynak(lar)
O ₂ , H ₂ O ₂ , [•] OH, ^Δ gO ₂	Hiperoksi, enflamasyon veya irradasyon ile uyarılmış oksijen metabolizması
Lipit peroksitler	Serbest radikallerle oluşan reaksiyonlar, prostanoid metabolizması
Hipoklorit radikali	Enflamasyon
Semikinonlar	Mitokondrial elektron taşınım zinciri
İki değerlikli metaller	Hem ve diğer metal taşıyan proteinler, serbest veya kompleks halde bulunan metaller
Reaktif oksijen türlerinin hücre içi kaynakları	
Plazma membranı	Lipoksijenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde bulunan NADPH oksidaz ve lipit peroksidasyonu
Çözünür enzimler ve proteinler	Hemoglobin, triptofan dioksijenaz, ksantinoksidaz
Küçük moleküller	İndirgenmiş flavinler, tiyoller, iki değerlikli metaller, epinefrin, antibiyotikler
Çevresel faktörler	Yüksek enerjili radyasyon, hava kirliliği, toksik kimyasallar
Endoplazma retikulumu	Sitokrom P450, sitokrom b 5
Peroksizomlar	Oksidazlar, flavoproteinler
Mitokondrial elektron taşınımı	Ubikinon, NADH dehidrogenaz, dihidroorotat dehidrogenaz

Serbest radikallerin oluşumunda metal iyonlarının rolü

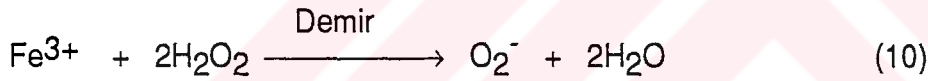
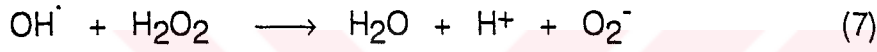
Bütün geçiş elemanları metaldir ve radikal olarak kabul edilirler. Elektron dağılımları nedeniyle de oksidasyon-redüksiyon tepkimelerinde kolaylıkla yer alırlar. 4 no.'lu reaksiyonda olduğu gibi, hidrojen peroksitin demir veya bakır iyonları yardımıyla oluşan dekompozisyonuna Fenton reaksiyonu adı verilir.



Fizyolojik pH da çok yavaş olmakla birlikte Fe^{3+} tekrar hidrojen peroksit ile reaksiyona girebilir.

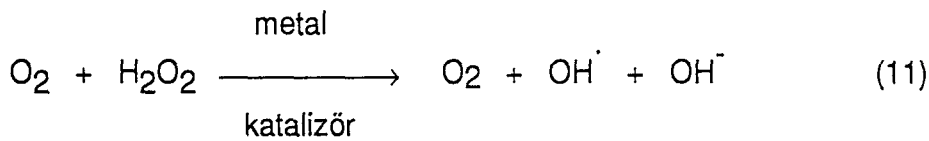


Daha da devam edebilen reaksiyonların sonucu hidrojen peroksitin demir ile katalizlenen dekompozisyonudur.

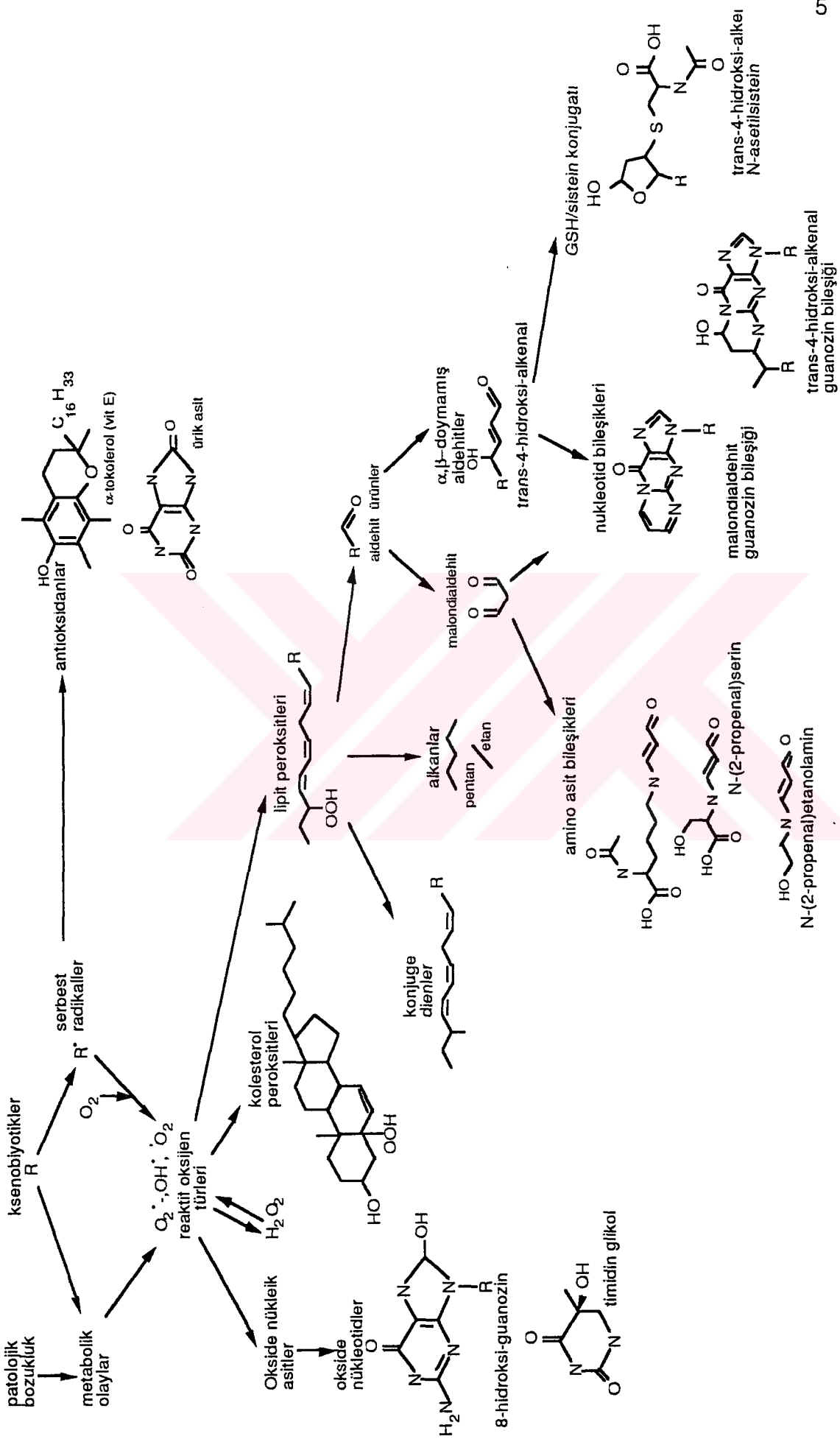


Oksidan stres, Fenton kimyası için kendine gereken demiri ferritin demirini mobilize ederek (süperoksit radikali oluşumu) veya hem proteinlerini demir açığa çıkarmak üzere yıkarak (hidrojen peroksit oluşumu) sağlayabilir.

Pek çok bilimadamı demir-EDTA kompleksiyle reaksiyona sokulan hidrojen peroksitten veya hem O_2^- hem hidrojen peroksit oluşturan sistemlerden hidroksil radikali açığa çıkacağını savunmaktadır (1,8,14). Bu reaksiyonlar Haber-Weiss reaksiyonu adıyla anılır ve net reaksiyon şöyledir:



Serbest radikal hasarı sonucu oluşan ürünler Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Serbest radikal hasarı sonucu oluşan ürünler

Reaktif oksijen türlerinin hücrelerdeki hedefleri (11,12,13)

Küçük moleküller

- Doymamış yağlar..... Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon
Lipitlerde çapraz bağlanmalar
Organel ve hücrelerde permeabilite değişiklikleri
Lipoproteinlerde değişiklikler
- Karbonhidratlar..... Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
- Nükleik asit bazları..... Hidroksilasyonlar
Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar
Şekerlerde de benzer reaksiyonlar
- Tiyol içeren aminoasitler..... Protein denatürasyonu ve çaprazlaşmaları.
Enzimlerde inhibisyon

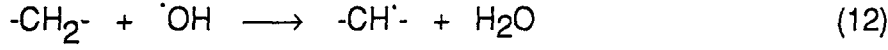
Makromoleküller

- Proteinler..... Peptid zincirlerinde kopma.
Denatürasyon.
- Nükleik asitler..... Tek ve çift iplikçik kırılmaları
Proteinlerle çapraz bağlar.
Baz içermeyen bölgeler.
- Hyaluronik asit..... Sinovial sıvı akışkanlığında değişme

Reaktif oksijen türlerinin hücredeki proteinler üzerine olan etkilerini daha yakından incelediğimizde triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin, sistein amino asitlerini taşıyan proteinlerin reaktif oksijen türlerinin etkisiyle modifikasyona uğradıkları görülür. Proteinlerde oluşan reaktif oksijen grubu etkileri amino asit kompozisyonlarına olduğu kadar, amino asitlerin yerleşimine, protein yapısında üstlendikleri görevlere ve tamir edilebilmeye de bağlıdır (11,15).

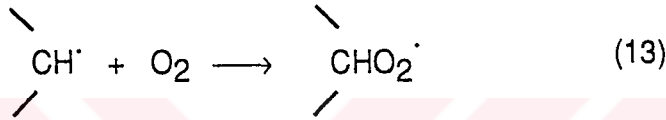
Lipit Peroksidasyonu

Tümüyle peroksitten arındırılmış bir lipit sisteminde, membranda veya çok doymamış yağ asitlerinde peroksidasyon işlemi başlatılmak için, bir metilen (-CH₂-) grubundan hidrojen kopartabilecek yeterli reaktiviteye sahip bir radikale ihtiyaç vardır. Örnek olarak hidroksil radikalini seçersek;



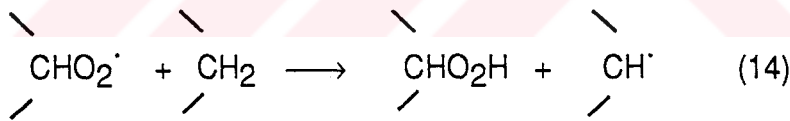
Benzer şekilde süperoksit radikali (yükü yapısı nedeniyle ancak bir anyon kanalı varlığında hücre içine ulaşır ve etki eder), hidroksil radikali veya çeşitli demir-oksijen kompleksleri de metilen gruplarından hidrojen kopartarak lipit peroksidasyonunu başlatır (1, 8,16).

Bir tek elektronu bulunan hidrojen atomunun kopartılması, geride eşleşmemiş bir elektron bırakır. Bir yağ asitinde çift bağları takip eden C-H bağları daha zayıftır. Bu bölgeden kolaylıkla kopartılan hidrojen atomları sonrasında oluşan karbon radikali bir moleküler düzenlenme ile konjuge dien yapısını oluşturur ve yapısını stabilize eder. Konjuge dien yapısı hidrofobik özelliklerinden dolayı membran içinde yer alan oksijen molekülüyle reaksiyona girer ve peroksil radikalini oluşturur.



Ancak düşük oksijen konsantrasyonlu ortamlarda proteinler veya diğer yağ asitlerinin etkilenmesi söz konusudur (1,2).

Peroksil radikalının oluşumu diğer lipit moleküllerinden hidrojen koparma gücü olduğu için önemlidir. Membran proteinlerinde de benzer etkisi vardır.



Bu reaksiyonlar sonucu lipit hidroperoksit radikali oluşur (1,3,8,16). Demirin lipit peroksidasyonunda önemli bir rolü vardır. Tamamen peroksitten arındırılmış bir doymamış lipit sistemine demir (II) tuzu eklenmesi peroksidasyonu Fenton reaksiyonu ile başlatabilir. Metal iyonları fizyolojik şartlarda çözünür olmadığından yüksek ve düşük molekül ağırlıklı hücresel bileşenler ile ilişki halinde bulunur ve buraları radikal oluşturan katalitik merkezler haline getirir. Proteine bağlanmayıp hücre içine geçebilen çok az miktardaki demir, Fenton reaksiyonunu sürdürmek için yeterlidir. Biyolojik sistemler peroksitten arındırılmış olmadığı için Fenton reaksiyonu daha çok alkoksil ve peroksil radikali oluşturacak şekilde lipit dekompozisyonu ile peroksidasyonu uyarır. Demir iyonlarının yanı sıra serbest hemoglobin, methemoglobin ve oksihemoglobin, metmiyoglobin, sitokromlar, ferritin ve transferrin de lipit peroksidasyonunu uyarır (8,17,18,19).

Enzimatik ve Nonenzimatik Lipit Peroksidasyonu

Nonenzimatik lipit peroksidasyonu lipit içeren sistemlere metal tuzlarının, kompleksleşmiş metal iyonlarının, lipit hidroperoksitlerinin veya yapay organik hidroperoksitlerin eklenmesi ve bunların alkoksil ve peroksil radikali oluşturacak şekilde dekompozisyonu ile zincir reaksiyonunu başlatması sonucu olur (20).

Enzimlerin katalitik merkezinde peroksit oluşumuna enzimatik lipit peroksidasyonu denir. Araşidonik asitten oksijenazlar aracılığı ile değişik eikozonoidlerin sentezi buna örnek olarak verilebilir. Siklooksijenaz'ın katalizlediği çok doymamış yağ asidi bis-dioksijenasyonu ile endoperoksit öncülleri olan prostaglandin ve tromboksanlar, lipooksijenaz'ın katalizlediği çok doymamış yağ asitlerinin monodioksijenasyonu ile ise lökotrien epoksitleri ve lipoksinler oluşur (20).

Reaktif Oksijen Türlerinin Biyomedikal Önemi

Oksijen radikalleri ve diğer oksijen kökenli reaktif türlerin çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bunların arasında ateroskleroz, kanser, artritler ve kemoterapötik ilaçlar, sigara gibi bazı toksik bileşiklerin etki mekanizmaları sayılabilir. Peroksidasyon olayı hastalığı başlatmasa da, oluşan hasar sonrasında ortaya çıkan peroksitler hastalığı şiddetlendirmekte ve hızlandırmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin ilişkili görüldüğü patolojik durumlar Tablo 2'de özetlenmiştir.

TABLO 2 OKSİJEN RADİKALLERİNİN ETKİLİ OLDUĞU DÜŞÜNÜLEN BAZI KLİNİK DURUMLAR

Enflamatuvar-immün hasar	Glomerülo nefritler (idiyopatik, membranöz), Vaskülitler (hepatit B virüsü, ilaçlar), Otoimmün hastalıklar, Romatoid artrit
İskemi-reperfüzyon durumları	Miyokard enfarktüsü Organ transplantasyonları
İlaç ve toksinlere bağlı reaksiyonlar	Demir birikimi, idiyopatik hemokromatozis Kan transfüzyonları ile tedavi edilen talasemi ve diğer kronik anemiler Beslenme bozuklukları (kwashiorkor)
Kırmızı kan hücrelerinde	Sıtma, Orak hücreli anemi Fenilhidrazin, primakin gibi ilaçlar
Akciğerlerde	Sigara içimi, Amfizem Hiperoksi, Bronkopulmoner displazi Akut solunum distressi sendromu (bazı formlar)
Kalp ve kardiyovasküler sistem	Ateroskleroz Alkol kardiyomiyopatisi Keshan hastalığı (selenyum eksikliği)
Böbrek	Otoimmün nefrotik sendrom Aminoglikozid nefrotoksitesisi
Gastrointestinal sistem	Endotoksinlere veya halojenli hidrokarbonlara bağlı karaciğer hasarı Pankreatitler Antiinflamatuarlara bağlı GİS hasarı
Beyin	Hiperbarik oksijen Vitamin E eksikliği Nörotoksinler, Parkinson hastalığı Hipertansif serebrovasküler hasar Demyelinizan hastalıklar
Göz	Katarakt oluşumu, oküler kanama Dejeneratif retinal hasar
Diğer	Radyasyon hasarı, yaşlanma (8)

Serbest Radikal Hasarına Karşı Hücresel Savunma Mekanizmaları

Serbest radikaller biyolojik yaşamda yapısal, metabolik ve genetik materyalleri değişikliğe uğratarak organizmanın varlığını tehdit ederler. Ökaryot ve prokaryotların buldukları oksijenden zengin ortamda reaktif oksijen türlerinin etkilerinden korunmaları için bazı biyokimyasal savunma sistemlerine ihtiyaç vardır. Bu nedenle savunma sistemlerinin verimli çalışması canlının yaşamını sürdürmesi için çok önemlidir (7,9,11,21,22,23).

A. Düşük molekül ağırlıklı serbest radikal tutucuları

1) Zar yapısında olanlar: E vitamini, β -karoten,

2) Sitoplazmada bulunanlar: Askorbik asit, ürik asit, glutatyon (indirgeyici gücü NADPH ve enzimatik katalizörleri ile birlikte), albumine bağlanmış bilirubin, transferrin, serüloplazmin, haptoglobin.

B. Enzimatik sistemler: Katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz, glutatyon transferaz.

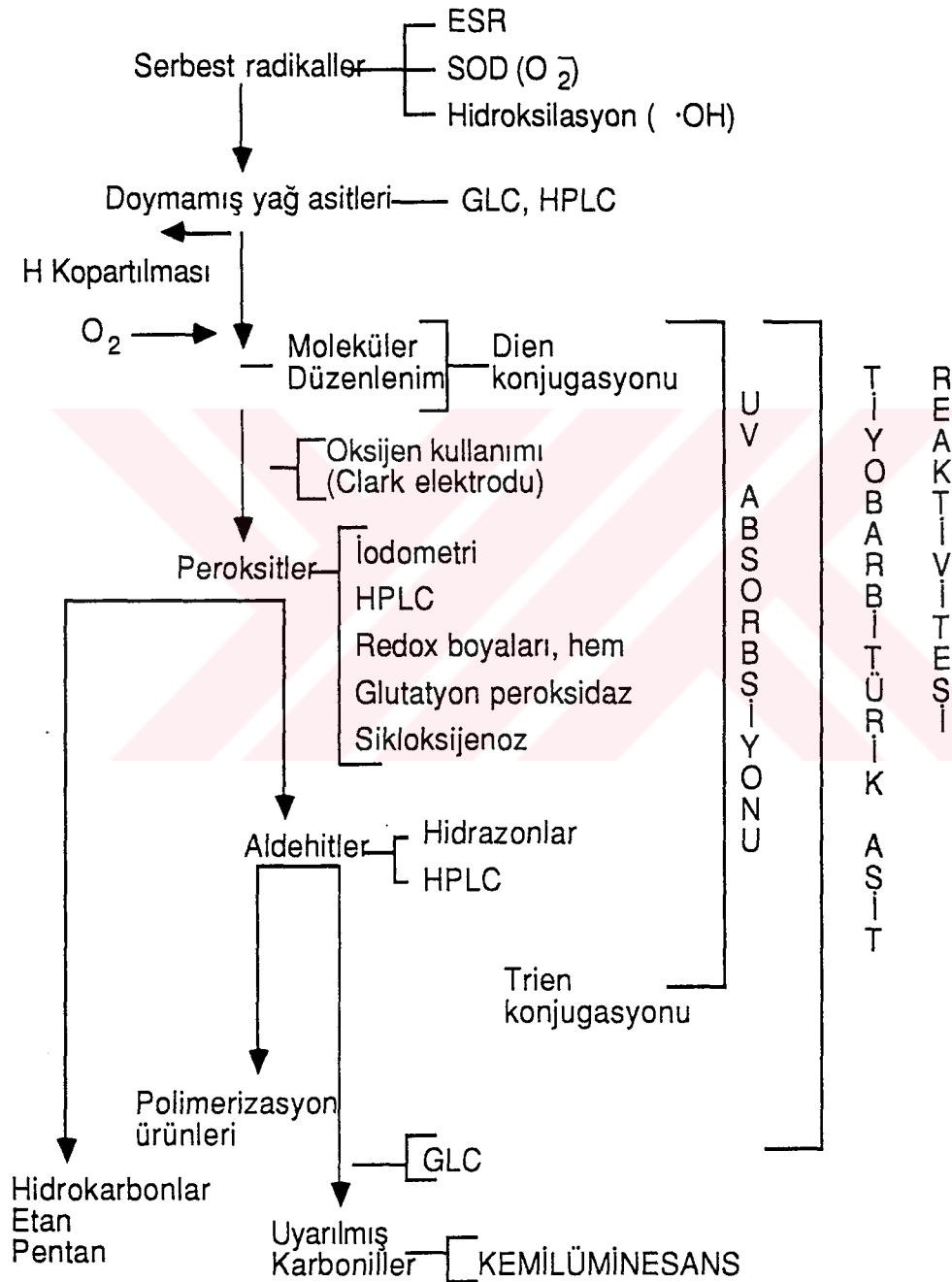
Serbest radikaller ve lipit peroksidlerin ölçülmesinde kullanılan yöntemler

Çeşitli hastalıklarda reaktif oksijen türlerinin oluşması, bu türlerin ve yan ürünlerden özellikle lipit peroksidlerin hasar meydana getirme potansiyellerinin anlaşılması ve patogenezdaki olası rollerinin ortaya çıkarılması, bu metabolitlerin daha iyi takip edilmesi gerekliliğini gündeme getirmiştir. Reaktif oksijen türleri çok kısa ömürlü ve değişken oldukları için bunların ölçülmesi ve miktarlarının takip edilmesi zordur. Bu nedenle metabolitleri özellikle lipit peroksidler ölçülmektedir (20).

Serbest radikal konsantrasyonunu ölçmede kullanılan en hassas yöntem elektron spin rezonans (ESR) yöntemidir. Direk olarak dondurulmuş örneklerde kullanılabileceği gibi spin tutucu bir ajan ekleyip, radikal ile spin tutucunun arasındaki özgül bağlanmadan faydalanarak da tayin yapılır (6).

Kullanılan diğer yöntemler arasında iodometrik yöntem, siklooksijenaz enziminin katalizlediği yöntem, etan veya pentan gibi uçucu hidrokarbonların yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak ölçülmesi, oksitlenmiş DNA bazlarının gösterilmesi, floresans ölçümleri, RIA yöntemleri, antioksidan sistemlerdeki değişikliklerin kullanılması sayılabilir (24,25,26,27,28).

Gelecek vaad eden yöntemler arasında sitotoksik aldehitlerin HPLC ile ölçülmesi, uçucu türevlerin gaz kromatografisi ile ayrılıp kütle spektrometresi ile tanımlanması ve yine sitotoksik türevlere karşı geliştirilen antikorların dokuya bağlanmasının gösterilmesi gelmektedir (16).



ŞEKİL 3. SERBEST RADİKALLER VE LİPİT PEROKSİDASYONU ÜRÜNLERİ İLE İLGİLİ YÖNTEMLER (18)

Çalışmamızda kullandığımız yöntemleri daha ayrıntılı incelersek:

Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler (TBARS)

Bu maddeler arasında en yüksek orana malondialdehit (MDA) sahiptir. MDA ($C_3H_4O_2$) nonenzimatik olarak çok doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu ortaya çıkabildiği gibi, araşidonik asitin enzimatik oksijenasyonunda uçucu bir yan ürün olarak da açığa çıkar. Ayrıca prostaglandin H_2 'nin tromboksan sentetaz ile katalizlenen tromboksan A_2 'ye dönüşümü sırasında 12(L)-hidroksi-5,8,10-heptadekatrienoik asit (HHT) ile birlikte MDA oluşumu gözlenmektedir(16).

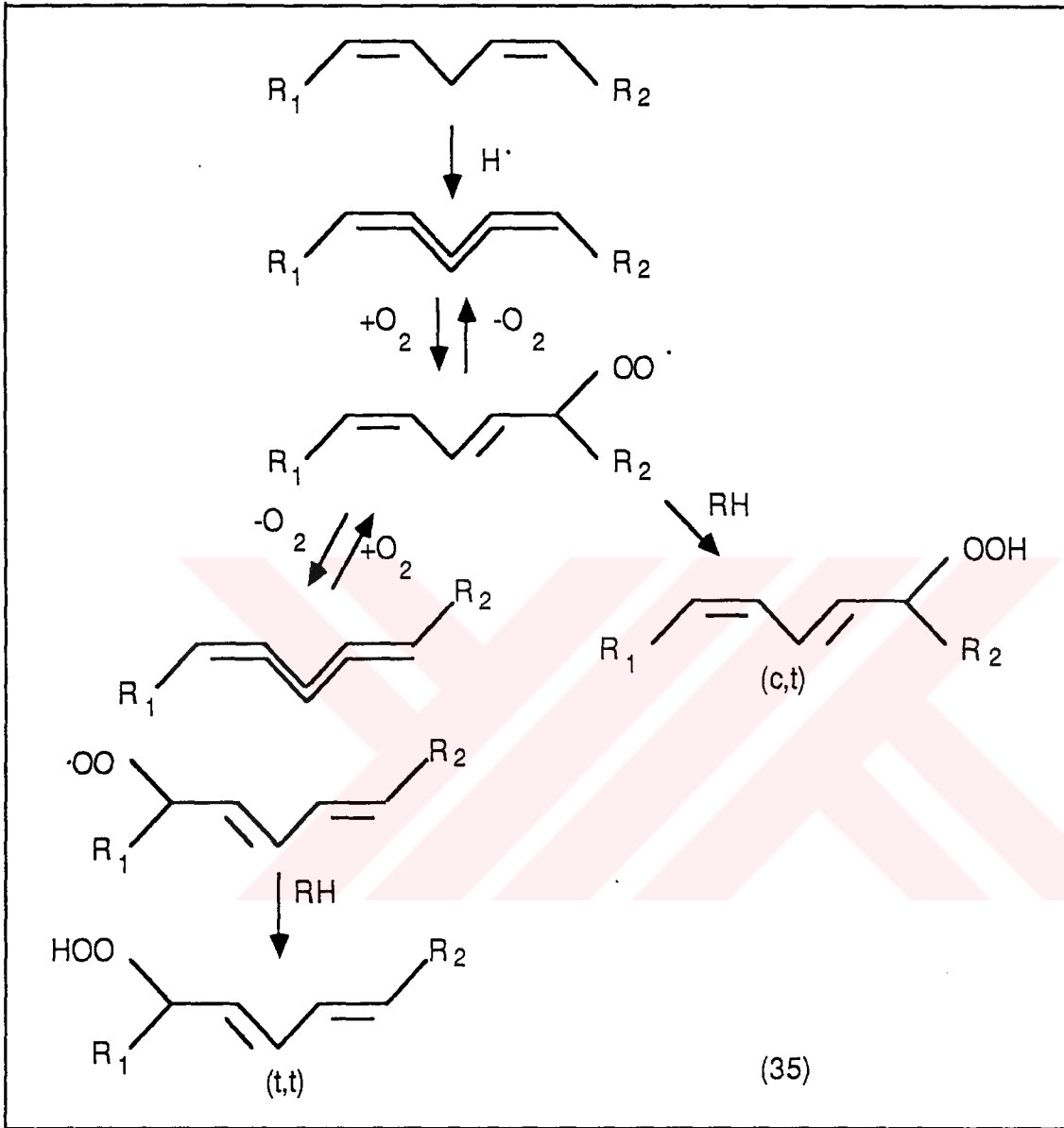
Oksidatif hasar sonucu lipitlerde oluşan MDA iki şekilde ölçülebilir. Bu yöntemlerden daha hassas olanı sonrasında UV spektrofotometresi ile miktar tayininin yapıldığı HPLC dir. Ancak teknik zorlukları ve kısıtlamaları oldukça fazladır. İkinci yöntem ise kolaylığı nedeniyle uzun yıllardır yaygın kullanım alanı bulmuştur. Bu yöntemde örnekdeki MDA, tiyobarbitürik asit ayırıcı ile asit ortamda ısıtılır, oluşturulan renk spektrofotometrik ($\lambda=532nm$) veya florometrik olarak ölçülebilir. Ancak kullanılan örneklerde daima MDA haricinde tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girecek maddeler mevcuttur; plazma için safra pigmentleri, amino asitler ve karbonhidratlar, idrar için doymamış aldehitler örnek olarak verilebilir. Bu nedenlerle yöntemin adı tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler (TBARS) olarak kullanılmaktadır. İnsan vücut sıvılarında kullanılan TBARS yönteminin prostaglandin sentezi sırasında enzimatik olarak oluşan endoperoksitleri de ölçeceği unutulmamalıdır (6,8,18,20,29,30,31,32,33,34).

Dien konjugasyonu

Çok doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerinin oksidasyonu ultraviyole bölgede ışığı absorbe eden konjuge dien yapılarının oluşmasına neden olur. Lipit peroksidasyonunun ilk aşamalarından olan bu öncül yapılar cis,trans- ve trans,trans-dien hidroperoksitleridir (Şekil 4).

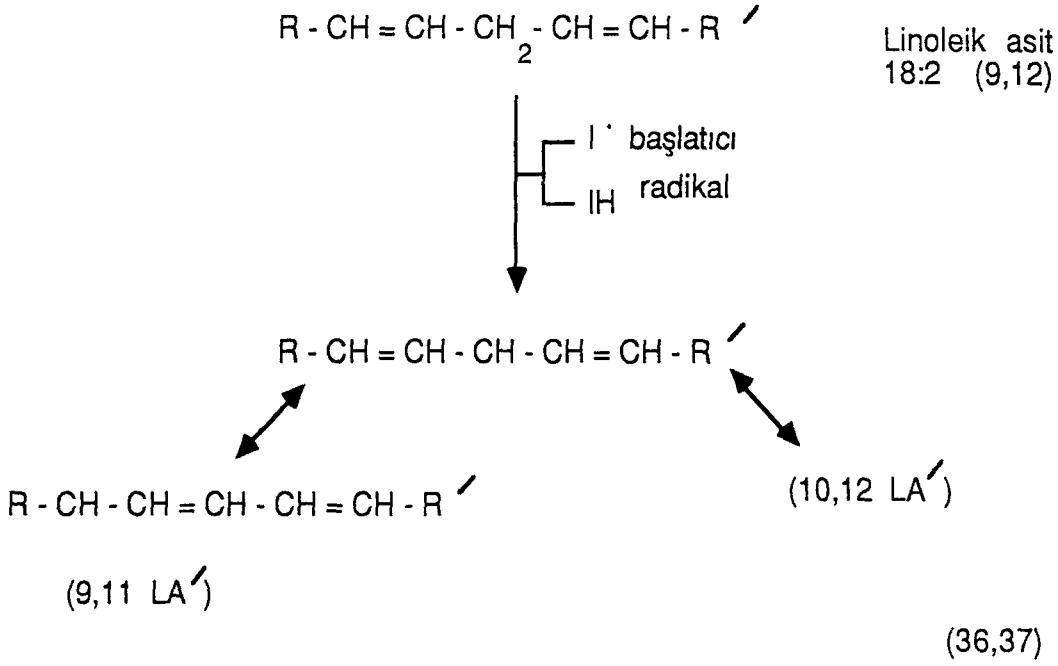
Dien konjugasyonu, saf lipitlerin peroksidasyonunu incelemek için ideal bir parametreyken, biyolojik materyellere uygulandığında aynı dalga boylarında ışığı emen diğer maddelerin örneğin hem proteinlerinin enterferansı söz konusudur. Bu nedenle dien konjugatları organik bir çözücüyle ekstrakte edilirler. Fakat organik çözücülerde de belirli bir miktar UV absorbansı söz konusudur ve bu yöntemin güvenilirliğini azaltmaktadır. Corongiu ve ark. bu sorunları türev spektroskopisiyle çözmüşlerdir. Bu yöntemde örneğin belli dalga boyları arası spektrumu alınır (A/λ). Bu spektrumda absorbans tepeleri, 2. dereceden türev alındığında ($d^2A/d\lambda^2$) belirgin

çukurlara dönüşürler, milimetrik olarak yapılan ölçümler hem konjuge dienlerin takibinde hem de farklı dienlerin saptanmasında kullanılabilir (16,33,35,36,37)



Şekil 4. Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan cis, trans- ve trans,trans dien hidroperoksitler.

Iversan ve arkadaşları insan plazmasında yağ asitlerinin ana dien konjugatının karboksil grubu haricinde oksijen taşımayan bir linoleik asit izomeri olan PL-9,11-LA' [octa deca 9(cis), 11 (trans)-dienoik asit] olduğunu HPLC ile göstermişlerdir (3).



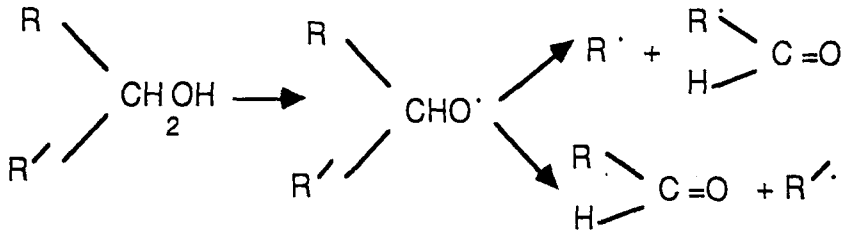
Karbonil içeriği:

Biyolojik membranlarda oluşan lipit peroksidasyon olayı malonaldehit, n-alkanallar, 2-alkenallar, 4-hidroksialkenallar gibi çeşitli aldehit türevi yıkım ürünlerinin oluşmasına neden olur (39,40,41,42,43)

Bu ürünlerden 4-hidroksialkenaller önemli bir yüzdeye sahiptir ve bunların da %95'inden fazlasını 4-hidroksinonenal, geriye kalan kısmı ise 4-hidroksioktenal, 4-hidroksidekanal, 4-hidroksiundekenal oluşturur (39).

Çok doymamış yağ asitlerinden karbonil gruplarının oluşumu, lipit hidroperoksitlerin dismütasyonu ile başlayıp alkoksil radikalinin oluşumu ve onun zincir kırılarak parçalanmasıyla aldehitler ve alkil radikalinin ortaya çıkması ile olur.

Aldehit grubu zincirin her iki tarafında da oluşabilir (Şekil 4). Membran fosfolipitlerine β pozisyonunda bağlanan çok doymamış yağ asitlerinden aldehitler oluşabileceği gibi karbonil fonksiyonu gösteren β asillerde oluşur (39).



Hidroksialkenoller hem çok miktarda ortaya çıktığı hem de özellikle nükleofilik gruplara karşı çok reaktif olup hücre fonksiyonlarını bozduğu için özel bir öneme sahiptir (43,44). Değişik çalışmalarda oksidan stres ile bu tür aldehyitlerin arttığı gösterilmiştir (40,41). Bu nedenle bu aldehyitler lipit peroksidasyonu takip etmek için kullanılacak parametrelerdir (45). Örnekteki karboniller 2,4-dinitrofenilhidrazin boyası ile inkübe edilip, oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazon türevleri ince tabaka kromatografisi ile ayrıldıktan sonra HPLC ile her bir aldehyit grubunun konsantrasyonu belirlenebileceği gibi malondialdehyit haricindeki tüm karboniller 2,4-dinitrofenilhidrazon türevi olarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir (40,46).

Reaktif oksijen türlerinin hücrede pek çok hedefleri olduğunu biliyoruz. Lipitten zengin hücre membranlarında oksidan etki lipit peroksidasyona yol açar ve bu etki in vivo sistemlerde değişik parametrelerin ölçülmesi ile saptanabilir.

Protein Oksidasyonu

Reaktif oksijen türlerinin hücredeki diğer bir hedefi ise proteinlerdir. Oksidan etki ile proteinlerde molekül ağırlıklığı değişimleri (agregasyon veya fragmentasyon), net yüklerde farklılaşmalar ve amino asitlerde yapısal bozukluklar olabilir. Özellikle katalitik aktiviteleri nedeniyle proteinlerde meydana gelen bu etki hücre için önemli fonksiyon kayıplarına neden olur. Oksidatif değişikliğe uğrayan proteinler belirlenerek hızlı bir şekilde hücre içi proteolitik sistemler tarafından yıkılır. Bu proteinlerin hücre içindeki proteinazlar, proteazlar ve peptidazlar tarafından nasıl tanındığı ise henüz bilinmemektedir (47,48).

Oksidan stres altındaki proteinler çeşitli karbonil türevlerine dönüşürler. Protein karbonilleri değişik fizyolojik durumlarda oksijen radikallerinin protein molekülleri üzerinde oluşturduğu hasarı ölçmede kullanılabilir. Başlıca 2 ayrı yöntem vardır:

1) 2,4-dinitrofenilhidrazin boyası ile reaksiyona tabi tutulan örnekte oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazon türevlerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesi.

2) [^3H]NaBH₄ ile karbonil grupları [^3H] işaretli alkol türevlerine indirgenen proteinlerde radyoaktif ölçüm yapılması

Ayrıca florösan hidrazid ile reaksiyona giren örneklerin oluşturduğu hidrazonlarda florösans ölçümleri veya karbonil gruplarından, önce florösamin ile Schiff bazı oluşturulması daha sonra bunların NaCNBH₃ ile stabil ikincil aminlere çevrilip spektrofotometrik olarak ölçülmesi gibi değişik yöntemler de mevcuttur (49,50).



AMAÇ

Çeşitli hastalıkların patogeneğinde yer aldığı düşünölen veya hastalıklar sırasında ortaya çıkan hasardan sorumlu tutulan serbest radikallerin tayin edilme güçlüğü araştırmacıları serbest radikal reaksiyonlarının ürünlerini incelemeye yöneltmiştir.

Serbest radikal reaksiyonlarını veya bunların ürünlerini ölçmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Oldukça karışık ve değişik faktörlerin etkisindeki bu sistemin anlamlı bir şekilde yorumlanabilmesi için değişik açılardan değerlendirilmesi gerektiğini düşündük. Etkilenen bileşenlerden lipitleri değerlendirmek için lipit peroksidasyonunun öncül ve son aşamalarını ölçen değişik yöntemleri, proteinleri değerlendirmek içinse protein oksidasyonunu seçtik.

Yöntemlerin insan eritrosit ve plazması için uyarlanması ve uygunluğunun gösterilmesini takiben, oksidan stresi eritrosit ve plazmalarından yoğun bir şekilde yaşadığı düşünölen düzenli hemodiyaliz tedavisi gören kronik böbrek hastalarının eritrosit ve plazmalarında denenmesini amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada Haydarpaşa Numune Hastanesi Hemodializ Ünitesindeki 14 kronik böbrek hastası (7 kadın; yaş ortalaması 44.14, 7 erkek; 59.22) ile aynı yaş grubundaki 14 sağlıklı kontrolden (6 kadın; 36.5, 8 erkek; 43.2) elde edilen EDTA'lı kan örnekleri kullanılmıştır. Sağlıklı kontrollerin seçiminde anamnezlerinde geçirilmiş operasyon ile metabolik ve enfeksiyon hastalıkları bulunmamasına dikkat edildi. Ayrıca bu kişilerin biyokimyasal parametreleri laboratuvarımız referans değerleri sınırları içindeydi. Kronik böbrek hastalarının serum kreatinin düzeyleri 6.0-16.6 mg/dL, BUN düzeyleri 71-167 mg/dL arasında değişmekteydi.

Plazma ve eritrositler santrifüj işlemi ile ayrıldıktan sonra eritrositlerde, lipit peroksidasyonuna duyarlılık testi, eritrosit lipit ekstralarında dien konjugasyonu ve karbonil fonksiyonu ile eritrosit membranlarında protein oksidasyonu ölçümleri yapıldı. Benzer şekilde plazmada da tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler (TBARS), plazma lipit ekstresinde dien konjugasyonu ve karbonil fonksiyonu ölçümleri yapıldı. Hesaplama aşamasında kullanılmak üzere örneklerin hemoglobin düzeyleri, plazma ve eritrosit lipit ekstralarında fosfolipit düzeyleri ile eritrosit membranlarında protein düzeyleri de belirlendi.

ERİTROSİT ZAR LİPİTLERİNİN LİPİT PEROKSİDASYONUNA DUYARLILIĞININ SAPTANMASI (51)

Prensip: Hidrojen peroksit ile oksidatif baskı altında tutulan eritrositlerde zar lipitlerinin yıkım ürünü malondialdehit, tiyobarbitürik asit reaksiyonuyla spektrofotometrik olarak saptandı.

- Ayırıcılar:**
- 1) Tamponlanmış tuzlu su çözeltisi: 1.76 mL 0.5 M KH_2PO_4 ile 6.08 mL 0.5M K_2HPO_4 karıştırıldı ve distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti, 1 litreye tamamlamak üzere % 0.9 NaCl (pH 7.4) çözeltisine eklendi.
 - 2)Azid tamponu: Bir litre tamponlanmış tuzlu su çözeltisine 10.0 mL 0.4 M sodyum azid çözeltisi eklendi.
 - 3) TCA-arsenit çözeltisi: 280 g triklorasetik asit (TCA) 500 mL.

deiyonize suda çözüldü, üzerine 13.0 g sodyum arsenit eklendi, distile su ile bir litreye tamamlandı.

4) Hidrojen peroksit çözeltisi: 5.5 mL 9 M hidrojen peroksit distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 2 mL alınarak tamponlanmış tuzlu su çözeltisi ile tekrar 150 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti günlük hazırlandı.

5) TBA çözeltisi: 0.5 g tiyobarbitürik asit (TBA) 20 mL distile suda ısıtılarak çözüldü, üzerine 2.5 mL 1N NaOH eklendi ve distile su ile 50 mL'ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı: Taze alınmış EDTA'lı kan santrifüj edilerek plazma ayrıldı. Eritrosit paketi üzerine ayrılan plazma hacmi kadar azid tamponu eklendi. Bu karışımdan 2 mL alındı, üzerine 8 mL azid tamponu eklendikten sonra santrifüj edildi. Daha sonra ayrılan eritrosit paketi üzerine 5 mL azid tamponu eklendi, karışımın hemoglobin içeriği saptandı ve tamponlanmış tuzlu su ile 3.0 g/dL olarak şekilde ayarlandı. Bu karışımda 5 mL bir deney tüpüne alındı ve 37°C'de 10 dakika bekletildi. 5 mL hidrojen peroksit çözeltisi eklendi ve 37°C'de 2 saat süre ile tutuldu. Bu süre sonunda, inkübasyon karışımında 3 mL alınarak TCA-arsenit çözeltisi ile karıştırıldı ve santrifüj edildi. Üç mL süpernatant başka deney tüpüne alındı, üzerine 1 mL TBA çözeltisi eklendi. Kaynar su banyosunda 15 dakika tutulduktan sonra soğutuldu, 532 ve 600 nm'de absorpsiyon okundu.

Hesap: Malondialdehit için saptanmış molar ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak sonuçlar hesaplandı ve nmol/MDA /g Hb olarak ifade edildi.

ERİTROSİT ZAR LİPİTLERİNİN EKSTRAKSİYONU (52)

Prensip: Eritrosit zarında bulunan kolesterol ve fosfolipitler hem kontaminasyonunu minimuma indiren ve maksimum ekstraksiyon sağlayan kloroform-izopropanol 7:11 (v/v) ayırıcıları kullanılarak ekstre edildi.

Ayırıcılar: 1) % 0.9 NaCl (pH 7.4 çözeltisi)

2) Soğuk deiyonize su

3) İsoopropanol

4) Kloroform

Uygulama: Taze alınmış EDTA'lı kan santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Eritrositler %0.9'luk NaCl çözeltisi ile üç kez yıkandı. 0.5 mL yıkamış eritrosit

üzerine 0.5 mL soğuk deiyonize su konup karıştırılarak patlatıldı ve 15 dakika bekletildi. Üzerine karıştırılarak yavaş yavaş 5.5 mL isopropanol eklendi ve arasıra karıştırılarak 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda 3.5 mL kloroform konarak, karıştırıldı ve 1 saat daha bekletildi. 500 xg'de 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Ölçülü bir tüpte 10 mL'ye kloroform-isopropanol 7:11(v/v) olacak şekilde tamamlandı, bu karışım daha sonraki ölçümlerde kullanıldı.

ERİTROSİT LİPİT EKSTRESİNDE DİEN KONJUGASYONU (37,38)

Prensip: Hidroperoksit oluşumu esnasında poliinsatüre asitlerindeki çift bağların yeni bir düzenlenim ile konjuge hal alması UV spektrumunda özellikle 233-248 nm arası belli dalga boylarında optik dansite artışına neden olur.

Ayıracılar: 1)Eritrosit lipit ekstresi

2)Kloroform

3)Sikloheksan

Deneyin yapılışı: Eritrosit lipit ekstresi elde edildikten sonra, bundan 0.1 mL alındı, 1 mL'ye kloroform ile tamamlandı ve azot altında uçuruldu. Tüpe 2.5 mL sikloheksan konarak iyice karıştırıldı. Shimadzu UV-VIS 2100 spektrofotometresinde 225-260 nm'ler arası spektrumu sikloheksan körüne karşı çizdirildi. 233 ve 248 nm'lerde absorpsiyon değerleri kaydedildi. Spektrumun 2. türevi alındı. Aynı dalga boylarına denk gelen çukurların sonrasındaki tepelere göre derinliği ölçüldü. Örneklerde fosfolipit ölçümleri yapıldı.

Sonuç: Abs/ μ M fosfolipit veya mm/ μ M fosfolipit olarak verildi.

ERİTROSİT LİPİT EKSTRESİNDE KARBONİL İÇERİĞİNİN ÖLÇÜLMESİ (41,46)

Prensip: Poliinsatüre yağ asitlerinin enzimatik olmayan oksidasyonu sonucu alkanallar, alkenallar, 4-hidroksialkanallar ve malondialdehit gibi aldehitler oluşur. Malondialdehit haricindeki aldehitler 2,4-dinitrofenilhidrazin boyasıyla konjuge edilerek spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Ayıracılar: 1) Eritrosit lipit ekstresi

2) 2,4 dinitrofenilhidrazin boyası (0,0034 gr/10mL 1N HCL) 1 saat karanlıkta 50°C çözünür. Boya her seferinde taze hazırlanmalı ve ışıktan korunmalıdır.

3)Diklormetan

Deneyin yapılışı: 1 mL lipid ekstresine 1 mL boya eklendi 2 saat 20°C'de karanlıkta ara sıra karıştırılarak bekletildi. Sonrasında 3000 xg'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. 2,4 dinitrofenilhidrazin boyası yerine 1 N hidroklorik asit konmuş köre karşı okundu, 350 ve 380 nm'lerde optik dansiteler kaydedildi. Örneklerde PL ölçümleri yapıldı.

Hesap: 1 Karbonil içeriği için saptanmış molar ekstinksiyon katsayısı (25,500 $M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak nmol karbonil/ μm fosfolipit olarak ifade edildi.

LİPİT EKSTRELERİNDE FOSFOLİPİT DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ (53)

Prensip: Lipit ekstresinde oksidatif yıkımı takiben açığa çıkan serbest inorganik fosfat, önce fosfomolibdat iyonuna dönüştürüldü sonra indirgenerek ve spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı.

- Ayraçlar:
- 1) Standart: 0.4393 g KH_2PO_4 1000 mL'de çözünür. (100 $\mu g/mL$)
 - 2) %70'lik perklorik asit
 - 3) Amonyum molibdat: (%5) 5.309 g 100 mL distile suda çözüldü.
 - 4) Elon: (p. metil amino fenol sülfat) 1 g elon ve 3 g sodyum bisülfid distile suda çözüldü ve 100 mL'ye tamamlandı.

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne 1 mL lipid ekstresi kondu, azot altında uçuruldu. 0.4 mL perklorik asit eklenip 210°C da yaklaşık birbuçuk saat tahrip edildi. (Deney tüplerinde renkler önce koyulaşır sonra açılır.) Soğutulan tüplere 7 mL distile su, 2 mL amonyum molibdat çözeltisi ve 0.5 mL elon eklenip karıştırıldı. Bir saat beklendi. 700 nm'de lipid ekstresi yerine ekstre yapmakta kullanılan ayraçlar eklenmiş kör tüpüne karşı okundu. Çalışılan standarda göre hesap yapıldı. Hesaplanan total lipid fosforu (mg/dL) 25 ile çarpılarak total fosfolipit konsantrasyonu bulundu.

ERİTROSİT MEMBRANLARININ (GHOST) ELDESİ

Prensip: Yıkanmış eritrositler hipotonik bir tamponla yüksek devirde santrifüj edilerek patlatıldı. Tamponda çözünen içerikler atıldı. Membranlar toplandı.

- Ayraçlar:
- 1) Tris-EDTA tamponu (7 mM Tris + 0.1 mM Na_2 EDTA) (0.4238g Tris 500 mL deonize suda çözüldü, konsantre HCl ile pH 7.4'e ayarlandı. İçine 0.0186 g Na_2 EDTA eklendi. 0.088 g bütillenmiş

hidroksi toluen 10 mL absolu etanolde çözüldü. Bundan 12.5 mL alınıp 500 mL'lik çözeltiye eklendi.

2) % 0.9 NaCl çözeltisi

Uygulama: Taze alınmış EDTA'lı kan santrifüj edilerek plazması ayrıldı. Dipte kalan eritrositler 1 kez %0.9 NaCl çözeltisi ile yıkandı. 0.5 mL paket üzerine 15 mL soğuk Tris-EDTA tamponu eklendi. 2-4°C de 20,000 xg de 20 dakika süre ile santrifüj edildi. Üst faz atıldı. Bu işleme beyaz ghost elde edilinceye kadar 3-4 kez devam edildi. Beyaz ghostlar deney gününe kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklandı.

ERİTROSİT MEMBRANLARINDA PROTEİN OKSİDASYONU (54)

Prensip: Oksidan etki sonucu protein yapılarından oluşan karbonil grupları 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona sokulup oluşan 2,4- dinitrofenilhidrazon düzeyi spektrofotometrik olarak saptandı.

- Ayırıcılar:
- 1) % 20 triklorasetik asit (TCA)
 - 2) 2,4-dinitrofenilhidrazin boyası (0,0198 g /10 mL 2 N HCl içinde 50°C de karanlıkta 1 saat bekletilerek çözünür
 - 3) % 10 TCA
 - 4) 1N NaOH çözeltisi

Deneyin yapılışı: Elde edilen ghostlarda protein içerikleri 0.1 mg ile 1 mg arasında olacak şekilde ayarlandı. Bir deney tüpüne konan 250 µL örnek üzerine 500 µL %20 TCA eklenip 11000 xg de 10-15 saniye süre ile santrifüj edildi. Süpernatantlar atılıp, kalan çökertilere 500 µL boya eklendi. 20°C'de ara sıra karıştırılarak 1 saat süre ile bekletildi. 500 µL %20 TCA eklendi, 2-3 dakika bekletilip daha sonra 11.000 x g'de üç dakika süre ile santrifüj edildi. Yine süpernatantlar atılıp kalan çökeltiye %10'luk TCA ile 9000 xg'de santrifüj edilerek iki kez yıkandı. Pellete 1 N NaOH çözeltisinden 1 mL eklenip 37°C'de çözünmesi sağlandı. 360 nm'de 2,4-dinitrofenilhidrazin boyası yerine 2N HCL konmuş köre karşı okundu.

Hesap: Protein karbonil içeriği için saptanmış ekstinksiyon katsayısı (22,000 M-1 cm-1) kullanıldı, sonuçlar hesaplandı ve n mol/mg protein olarak ifade edildi.

LOWRY YÖNTEMİ İLE GHOST'LARDA PROTEİN TAYİNİ (55)

Prensip: Proteinler alkali çözeltide bakır ile reaksiyona sokulup bakır-peptid bağı-protein kompleksi oluşturulur. Fosfotungstik-fosfomolibdik asit (Folin-Ciocalteu reaktifi) eklenmesiyle indirgenen tirozin ve triptofanlar bu komplekslerle birleşirler. Oluşan mavi renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

- Ayırıklar:
- 1) %2 Na₂CO₃, 0.1N NaOH çözeltisi içinde hazırlandı.
 - 2) % 0.5 CuSO₄, 5H₂O %1'lik Na-K tartarak içinde hazırlandı.
 - 3) 50 birim bir no'lu çözelti, 1 birim iki no'lu çözelti ile karıştırıldı.
 - 4) Folin-Ciocalteu ayıracağı (kullanılacağı zaman 1:1 sulandırıldı.)
 - 5) Standart: %0.2'lik bovin serum albumin çözeltisi

Uygulama: Bir deney tüpüne 50 µL örnek konup üzerine 1 mL üç no'lu karışım eklendi. 15 dakika süre ile oda ısısında bekletildi. 0.1 mL sulandırılmış Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenip 1 saat süre ile oda ısısında bekletildikten sonra 750 nm'de absorbans okundu.

Hesap: Bovin serum albümin çözeltisi kullanılarak standart grafiği oluşturuldu. Hesaplar grafik kullanılarak yapıldı.

PLAZMA TBARS DÜZEYLERİNİN SAPTANMASI (56)

Prensip: Lipit peroksidasyonu ürünlerinden MDA ile tiyobarbitürik asit arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. TBA ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddelerin uzaklaştırılması için, serum lipitleri proteinlerle birlikte fosfotungstik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü.

- Ayırıklar:
- 1) 0,084 N sülfirik asit
 - 2) % 10 Fosfotungstik asit
 - 3) Tiyobarbitürik asit ayıracağı: Eşit hacim % 0.67 TBA ile glasiyel asetik asit karıştırıldı. Ayıraç günlük hazırlandı.
 - 4) n-bütanol

Deneyin yapılışı: Bir deney tüpüne 0,3 mL plazma, 2.4 mL 0.054 N sülfirik asit ve 0.3 ml %10 fosfotungstik asit kondu, karıştırıldı. Beş dakika bekletildi ve 1500 g'de

10 dakika süre santrifüj edildi. Üst faz atıldı, geriye kalan çökelti 4 mL distile suda süspanse edildikten sonra üzerine 1 ml TBA ayracı eklendi. Ayıraç körü olarak distile su ile TBA karışımı kullanıldı. Tüpler kaynar su banyosunda tam bir saat süre ile tutuldu. Soğutulduktan sonra, 3 ml n-bütanol ile karıştırıldı, santrifüj edildi. Bütanol fazının absorbası 532 nm'de okundu.

Hesap: Malondialdehit için saptanmış ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak sonuçlar hesaplandı ve nmol MDA/mL plazma olarak ifade edildi.

PLAZMA LİPİT EKSTRAKSİYONU (38)

Prensip: Plazmada bulunan kolesterol ve fosfolipitler kloroform - metanol 2:1 (v/v) kullanılarak ekstre edildi.

Ayıraçlar: 1)Kloroform

2)Metanol

Uygulama: Bir deney tüpüne 1:3 oranında sulandırılmış 1 mL plazma kondu.Üzerine 7 mL kloroform - metanol 2:1 (v/v) eklendi ve bir dakika süre ile karıştırıldı.Ara sıra karıştırarak on dakika süre ile beklendi. 2 mL su eklenip hafifçe karıştırıldı.10 dakika süre ile 260xg de santrifüj edildi. Altta bulunan kloroform fazı deneylerde kullanıldı.

PLAZMA LİPİT EKSTRAKSİYONUNDA DİEN KONJUGASYONU (37, 38)

Eritrosit lipit ekstresi ile benzer şekilde yapıldı.Yalnız uçurma işleminden sonra 2 mL sikloheksan ile alındı.

PLAZMA LİPİT EKSTRESİNDE KARBONİL İÇERİĞİNİN SAPTANMASI (41,46)

Eritrosit lipit ekstresi ile benzer şekilde yapıldı. Tüm çalışma süresince örneklerde yapılan tayinler ikişer kez tekrarlanarak sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği sağlandı.İstatistiksel incelemeler Macintosh Plus bilgisayarında StatView 512+ programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda " t-testi " kullanıldı. Aynı ürünleri ölçmediği bilinen bu parametrelerin aralarında anlamlı korelasyon izlenmedi.

BULGULAR

Çalışmamızda sağlıklı kontroller ile kronik böbrek hastalarından sağlanan kan örneklerini kullanıldı. Serbest radikallerin hücrenin farklı birimlerine etkilerini incelemek için seçilen değişik parametreler eritrositlere uyarılarak çalışıldı. Hücrelerin aktif olarak ilişkide olduğu plazmadan da örnekler alınarak çalışmaya dahil edildi.

Dien Konjugasyonu:

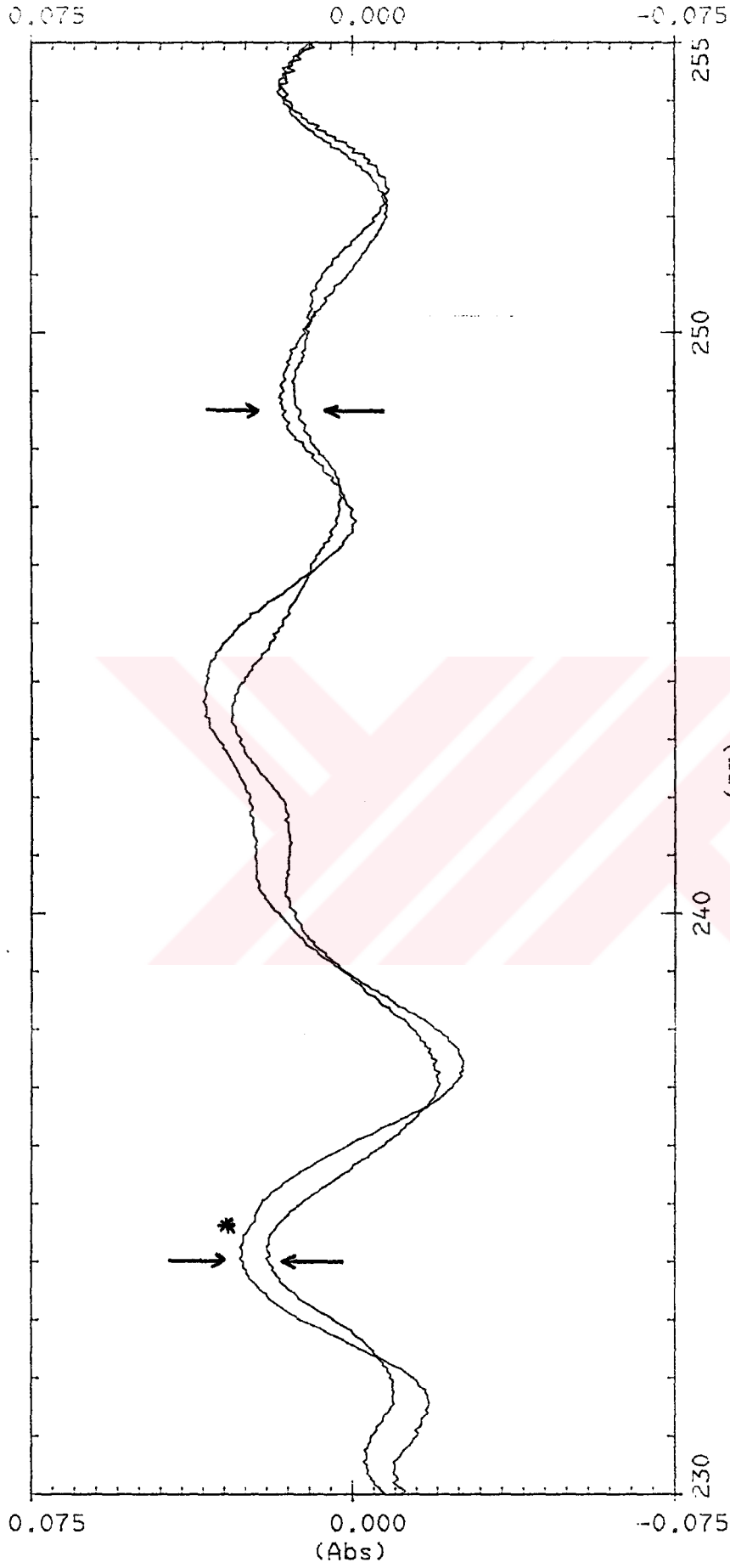
Çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyon sonucu UV bölgesinde ışığı absorbe eden bileşiklere dönüştüğü bilinmektedir. Bu konjuge dienlerin cis, trans ve trans,trans şekillerinin hangi dalga boylarında en yüksek optik dansiteye ulaştığı pek çok araştırmacı tarafından deneysel olarak gösterilmiştir. Deneysel şartlarda araşidonik asit ve linoleik asitin otooksidasyonu sonucu oluşan trans,trans hidroperoksitler 232.5 nm'de ve cis,trans hidroperoksitler ise 236 nm'de ışığı absorbe ederler. Sadece araşidonik asitin otooksidasyonu ile oluşan trans,trans hidroperoksitler 233 nm'de ve cis,trans hidroperoksitler ise 242 nm'de ışığı absorbe ederler. Mikrozomal lipit ekstralarında ise 233 ve 242 nm'de iki tepe gözlenebilir (57).

Yapılan bir başka çalışmada ise plazma ekstralarına eklenen 9 (t), 11(t) veya 9 (c), 11(t) linoleik asit türevlerinin tepe noktasını 233 nm'den 228 nm'ye kaydırıldığı gösterilmiştir(68).

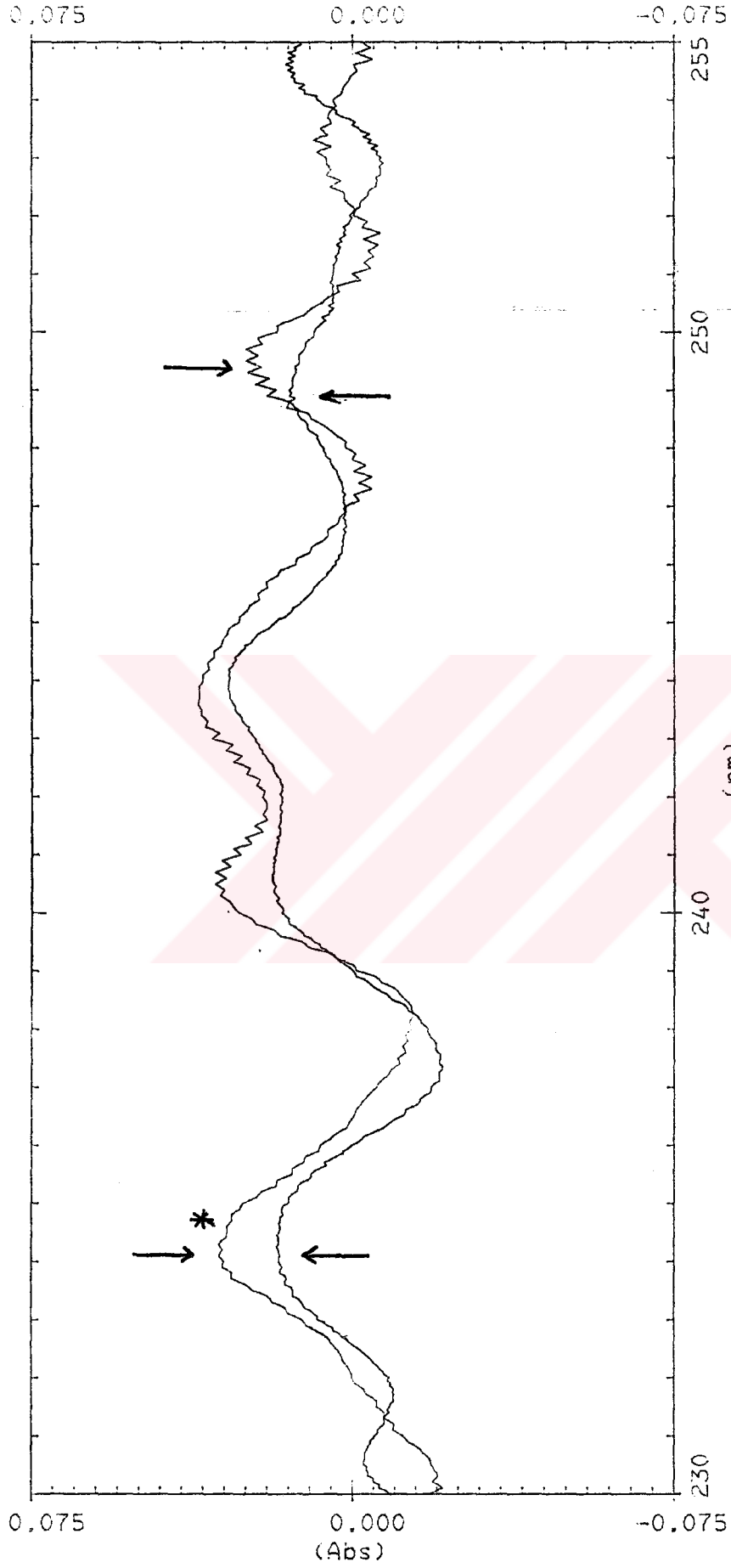
Literatürü incelediğimizde bu izomerler için farklı tepe noktaları verildiğini gördük. Bunun nedeni ise örneklerdeki esterleşmiş yağ asiti fosfolipit çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Plazma örnekleri için genelde sadece 233 nm dalga boyundaki absorptans kullanılmaktadır(58).

Bu nedenlerle biz sağlıklı kişilerden aldığımız örneklerden elde ettiğimiz plazma ve eritrosit ekstralarını kümen hidroperoksit ile 37°C'de 30 dakika inkübe ettik. Daha sonra 1 mL hacmi azot altında uçurup sikloheksan ile alarak 225-260 nm dalga boyları arasında spektrumunu çizdirdik ve 2. türevlerini aldık. Ekstrelerimizde artan kümen konsantrasyonları ile artan optik dansitelere 233 ve 248 nm'lerde rastladık (Şekil 5 ve 6).

Bu dalga boylarındaki absorptans değerleri tablo 3 ve 4 de verilmiştir.



Şekil 5. Normal ve kümenhidroperoksit ile uyarılmış (*) eritrosit lipid ekstraktlarının 2. türev spektrumu



Şekil 6. Normal ve kümenhidroperoksit ile uyarılmış (*) plazma lipit ekstraktinin 2. türev spektrumu

Tablo 3. Artan kümen hidroperoksit konsantrasyonları ile uyarılan eritrosit lipit ekstralarında dien konjugatları.

Kümen Konsantrasyonu (mM)	Abs (233 nm)	mm	Abs (248 nm)	mm
0	0.239	1.5	0.074	1.2
0.05	0.527	2	0.19	1.7
0.1	0.847	2.3	0.319	2.5

Tablo 4 . Artan kümen hidroperoksit konsantrasyonları ile uyarılan plazma lipit ekstralarında dien konjugantları.

Kümen Konsantrasyonu (mM)	Abs (233 nm)	mm	Abs (248 nm)	mm
0	0.587	1.5	0.119	0.2
0.01	0.811	2.5	0.306	0.8
0.02	1.025	3	0.41	1.3

Karbonil içeriği

Çok doymamış yağ asitlerinde oksidan etki ile çeşitli aldehit türevleri oluşmaktadır. Malonaldehit dışında kalan karboniller 2,4 dinitrofenilhidrazin boyası ile konjuge edilerek oluşan hidrazon türevleri spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Buradan hesaplanan karbonil konsantrasyonu çeşitli aldehitlerin toplamıdır. İnce tabaka kromatografisi ile referanslar kullanılarak çeşitlerine ayrılan karbonillerden, her birinin değişik bir UV dalga boyunda absorbans verdiği gösterilmiştir. (4-hidroksialkanaldinitrofenilhidrozon 370 nm, alkanallar 360 nm, 2-alkenaller 378 nm, 2,4 alkadienaller 392 nm gibi) (40).

Bu nedenle plazma ve lipit ekstraları boya ile inkübe edilip, oluşan 2,4-dinitrofenilhidrazon türevlerinin 330-400 nm. ler arası spektrumu çizdirildi . 350 ve 380 nm'lerde izlenen tepe noktaları bundan sonraki ölçümlerde kullanıldı.

Protein oksidasyonu

Eritrositlerin dolaşımdaki uzun yaşam süreleri ve özellikle hemoglobin gibi demir içeren molekülleri taşımaları nedeniyle enzimatik ve kimyasal olarak radikal oluşturan sistemlere çok hassastırlar. Bu tür sistemler eritrositlerde hızlı bir protein hasarı ve yıkımı oluşturur. Bu nedenle protein oksidasyonunun ölçülmesi önem kazanmaktadır (48,74).

Dokularda protein oksidasyonunu ölçmek için çeşitli yöntemler mevcuttur (49). Eritrositlerin hemoglobin içeriği spektrofotometrik yöntemlerle interferans yaratmaktadır. Bu nedenle eritrositlerdeki hemoglobini deney sisteminden uzaklaştırmak için sadece eritrosit membranları (ghost) kullanıldı. Deney sistemimizin çalıştığını göstermek amacıyla ghost'lar çeşitli kümen konsantrasyonları ile 37 °C de 30 dakika inkübe edildi, sonra yöntemler kısmında belirtildiği gibi çalışıldı (Tablo 5).

Tablo 5. Artan kümen hidroperoksit konsantrasyonları ile uyarılan ghost protein oksidasyonu

Kümen Konsantrasyonu (mm)	Abs (360nm)
N	0.144
0.25	0.203
0.5	0.318

Kronik böbrek hastaları ile sağlıklı kontrollerden alınan örneklerde belirlenen şartlarla değişik parametreler çalışıldı. Sonuçlar Tablo 6 ve Tablo 7 de verilmiştir.

Tablo 6. Kronik böbrek hastaları ile sağlıklı kontrollerde eritrosit lipit peroksidasyonu ve protein oksidasyonu (ortalama \pm standart hata).

	KONTROL (n=14)	HASTA (n=14)
Dien konjugasyonu (A-233/ μ M PL)	0.57 \pm 0.13	0.70 \pm 0.17 *
Dien konjugasyonu (mm-233/ μ M PL)	2.4 \pm 1.2	3.7 \pm 1.2 **
Dien konjugasyonu (A-248/ μ M PL)	0.17 \pm 0.05	0.25 \pm 0.07
Dien konjugasyonu (mm-248/ μ M PL)	2.2 \pm 1.2	2.9 \pm 1.2
Karbonil içeriği-350 (nmol / μ M PL)	42.8 \pm 7.9	65.5 \pm 9.9 ***
Karbonil içeriği-380 (nmol / μ M PL)	23.1 \pm 4.4	30.9 \pm 5.2 ***
Protein oksidasyonu (nmol /gHb)	22.6 \pm 5.5	41.2 \pm 10.4 ***
Lipit peroksidasyonuna duyarlılık (nmol /gHb)	87.0 \pm 6.8	108.0 \pm 25.7 *
* Kontrollardan anlamlı olarak farklıdır (p<0.05)		
** Kontrollardan anlamlı olarak farklıdır (p<0.01)		
*** Kontrollardan anlamlı olarak farklıdır (p<0.001)		

Tablo 7. Kronik böbrek hastaları ile sağlıklı kontrollerde plazma lipit peroksidasyonu (ortalama \pm standart hata).

	KONTROL	HASTA
TBARS (nmol/ml plasma)	2.82 \pm 0.36	5.50 \pm 0.60 *
Dien konjugasyonu (A-233/ μ M PL)	0.52 \pm 0.07	0.57 \pm 0.17
Dien konjugasyonu (mm-233/ μ M PL)	1.97 \pm 0.98	2.90 \pm 1.10 **
Dien konjugasyonu (A-248/ μ M PL)	0.16 \pm 0.03	0.19 \pm 0.06
Dien konjugasyonu (mm-248/ μ M PL)	1.84 \pm 0.03	2.11 \pm 0.98
Karbonil içeriği (nmol/ μ M PL)	54.8 \pm 7.6	75.4 \pm 7.8 *
Karbonil içeriği (nmol/ μ M PL)	27.2 \pm 4.0	37.3 \pm 5.2 *
* Kontrollerden anlamlı olarak farklıdır (p<0.05)		
** Kontrollerden anlamlı olarak farklıdır (p<0.01)		

TARTIŞMA

Serbest radikallerin bir çok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı görüşü giderek önem kazanmaktadır. Çeşitli araştırmacılar bu mekanizmaları aydınlatmada kullanılacak doğru, güvenilir, hassas, özgül ve kantitatif yöntemlerin geliştirilmesi için çalışmaktadırlar. Kısa ömürlü ve değişken yapıları nedeniyle serbest radikallerin ölçülmesi teknik olarak zordur. Bu nedenle serbest radikallerin etkilerini ürünleri ile, örneğin lipit peroksidasyonunu veya protein oksidasyonunu ölçmek daha çok tercih edilmektedir (20,58).

Lipit peroksidasyonunu ölçmek için pek çok değişik yöntem mevcuttur (24,25,26). Bunlar arasında en eski ve en çok kullanılanı tiyobarbitürik asit (TBA) testidir. TBA testinde temel olarak ölçülen madde enzimatik araşidonik asit oksidasyonu ile oksidatif lipit yıkımının volatil bir yan ürünü olan malondialdehit (MDA)'dır (1,8,18,29,30,31). Ancak, TBA testinde ölçülen MDA'nın büyük bir kısmının nonvolatil olduğu ve çok doymamış yağ asitleri, endoperoksitler veya diğer bileşenlerden asidik ısıtma sonucu oluşan peroksidasyonla ortaya çıktığı HPLC ile gösterilmiştir (6,16,29). Ayrıca, özellikle insan kaynaklı örneklerde tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerle benzer dalga boyunda absorbanans veren maddelerin varlığı da gösterilmiştir (6,20). Lands ve arkadaşları (27) siklooksijenaz enzimini kullanarak insan plazmasında lipit peroksit konsantrasyonunu 0.5 µm olarak saptamışken, TBA testinin ölçtüğü lipit peroksit konsantrasyonu 38 µm'dir (6). Çeşitli hayvan çalışmalarında da plazma TBA'sının tür, ırk, yaş, cinsiyet, yiyecek alımı ve stres ile farklılaştığı gösterilmiştir (1,16,31). Bugüne kadar örneklerde bulunan gerçek MDA'yı deney sırasında oluşarlardan ayırt edebilecek bir yöntem geliştirilememiştir (33,60). Biyolojik örneklerde değişik kaynaklardan köken alan enterferanslar daha da belirgin olduğu için çalışmamızda, MDA miktarlandırmasını destekleyecek yöntemlerin birlikte kullanılmasının anlamlılığa katkısını araştırdık.

Çok doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu 215-250 nm'ler arası absorbanans veren konjuge dien yapılarının oluşmasına neden olur (1). Özellikle peroksidasyonun öncül aşamalarını izlemek için kullanılabilcek olan bu yapılar deneysel olarak bazı zorluklara neden olmaktadır (1). Doğal olarak bulunan lipitlerin UV bölgesinde absorbanans vermelerinin yanı sıra, bu lipitleri ekstre etmek için kullanılan bazı organik çözücüler de aynı bölgenin değişik dalga boylarında ışığı absorbe ederler (16,36). Özellikle hayvan modellerinde karaciğer, kalp, beyin gibi dokularda lipit peroksidasyonunu ölçmekte sıklıkla kullanılan dien konjugatları (21,36,60,71),

eritrosit membran lipitlerinin oksidasyonu göstermek için de kullanılabilir (61,62). İnsan kaynaklı örneklerde kullanımı ise bazı sorunları beraberinde getirmektedir. Iversen ve arkadaşları (63) HPLC ile insan plazmasındaki temel dien konjugatını karboksil gurubu haricinde, oksijen taşımayan bir linoleik asit türevi olan 9,11 LA olarak saptamışlardır. Bu izomer saf linoleik asitin demir-ADP veya ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile peroksidasyon için uyarılması sonucu oluşmaz, sadece albumin varlığında UV radyasyonu ile oluşabilir (64). Bu nedenle bazı araştırmacılar tarafından lipit peroksidasyonunu izlemek için özgül bir parametre olduğu düşünülen bu izomer sadece insan plazmasında ölçülebilmekte, sıçan ve tavşanlarda bulunmamaktadır (64). Biyolojik materyallerdeki konjuge dien absorbansları, kandaki lipit miktarını etkileyen diyet alışkanlıkları, alkol veya sigara kullanımı gibi nedenlerle normaller arasında bile farklılıklar göstermektedir (64). Spektrofotometrik olarak dien konjugatı ölçümlerinin bulgular bölümünde anlatılan veya yukarıda bahsedilen tüm bu olumsuzlukları Corongiu ve Milia'nın (37) önerdiği spektrumun ikinci dereceden türevinin alınması ile giderilebilir (8,33).

Ultraviole spektrumda çakışan bandların daha sık görülmesi, ayırım gücünün zayıflığı yanında sinyal/gürültü oranının düşük olmasına bağlıdır. Türev uygulamaları, bu sorunların tümüne birden belli oranda çözüm getirebilmekte, karakteristik tepeleri az olan spektrumların ayırım gücünü oldukça düşük bir bedelle arttırabilmektedir (65).

Bir eğrinin bir noktasından geçen teğetin eğimini veren türev, ayırım gücünü arttırarak iyi ayırdedilemeyen pikleri ayırd etmek ve değişken özelliği olan zemin spektrumunun etkisini düşürmek için kullanılır. İkinci türevde ise daha keskin ve daha büyük bir pik maksimum ile minimumu belirir. Ayrıca tek bir pik içinde kaybolmuş olan ve ancak belli belirsiz omuzlar yapan iki veya üç pik daha net bir şekilde açığa çıkar. Değerlendirme pik yüksekliğinin ölçülmesi ile yapılır (33,65).

Yapılan çeşitli araştırmalarda dien konjugatı yönteminin serbest radikal aktivitesini ölçmede kullanılan TBA reaksiyonu, oksijen tüketimi gibi endirek yöntemlerle uyumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Stabil ve stabil olmayan anjinada plazma MDA düzeyleri ile konjuge dien düzeyleri (233 nm'de absorbans değerleri) (37) , deneysel termik hasarda eritrosit MDA ile konjuge dien düzeyleri (233 nm'de absorbans değerleri) (58) ve benzeri çalışmalar buna örnek olarak verilebilir (62,66,67).

İnsan kökenli biyolojik örneklerde dien konjugasyonu yöntemi enterferansa çok açıktır. Oksidasyon sonucu oluşan dien konjugatları trans, trans veya cis, trans

konfigürasyonuna sahip olurlar. Öncelikle bunlar için gerekli dalga boylarını saptadığımız çalışmamızda enterfeansları en aza indirmek için 2. dereceden türev uygulamasını da kullandık. Seçtiğimiz dalga boylarından sadece 233 nm de eritrositler için hem absorbans hem de 2. dereceden türev uygulaması sonucunda, plazma örnekleri için ise yalnızca 2. dereceden türev uygulaması sonucunda elde ettiğimiz değerlerde gruplar arası anlamlı fark elde ettik. Cis, trans ve trans, trans konfigürasyonları arasında dinamik bir dengenin olduğunu düşünüyoruz. Gruplar arasında 233-nm değerlerinin daha anlamlı olması türev uygulamasının deney sistemine katkısını göstermektedir. Bir grup araştırmacı plazmanın Folch yöntemi ile ekstraksiyonunda 245 nm'de ikinci dereceden türev spektrumunun ölçümlerinin değişik yöntemler ile uyumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir (65). Ancak biz çalışmamızda ne eritrosit, ne de plazma örnekleri için benzer bir uyumu gözlemedik.

Çok doymamış yağ asitlerinde oluşturulan deneysel modellerde lipit peroksit düzeyleri ile konjuge dienlerin 1:1 olmadığı belirtilmiştir (69). Bunun nedeni singlet oksijenin oluşturduğu oksidasyonlarda nonkonjuge dienlerin de oluşmasıdır. Ancak biyolojik örneklerde konsantrasyon olarak bunlar önem arz etmemektedir.

Bulgular kısmında da anlatıldığı gibi, fosfolipitlerdeki çok doymamış yağ asitlerinin peroksidatif yıkımı hem karbonil bileşiklerinin hem de karbonil fonksiyonu gösteren fosfolipitlere bağlı açıl gruplarının oluşmasına neden olur (39). Bu karbonil gruplarının varlığı ilk kez 1970 yılında McCay ve arkadaşları (70) tarafından 2,4 dinitrofenilhidrazin boyası ile gösterilmiştir. Daha sonra değişik araştırma grupları hem spektrofotometrik olarak karbonilleri miktarlandırmış, hem de ince tabaka kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanarak alt gruplarına ayırabilmişlerdir (40,41). Biz de çalışmamızda alkanal ve alkenal gruplarına ait olan iki ayrı dalga boyunda elde ettiğimiz değerlerde, gruplar arasında diğer yöntemlerle de uyumlu anlamlı farklar bulduk.

Dokulardaki ve vücut sıvılarındaki karbonil gruplarının oksidan strese bağlı bir artma gösterdiği bildirilmiştir (71,74). Bu aldehitlerden özellikle 4-hidroksialkenallar nötral pH'de tiyol grupları taşıyan düşük molekül ağırlıklı bileşikler (glutasyon, sistein), yapısal proteinler ve enzimler ile reaksiyona girerler (72). Araştırmacılar selüler ve subselüler düzeyde, bu aldehitlerin DNA, RNA ve protein sentezini, anaerobik glikolizi, trigliserit salınımını, Ca^{2+} alınımını baskıladıklarını; mitokondrial fosfat taşınımını engellediklerini; sitokrom P-450'yi hasara uğrattıklarını; hücre sel glutasyonu azalttıklarını; platelet agregasyonunu arttırdıklarını; kemotaksise engel olduklarını ve in vitro hücre sel büyümeyi yavaşlattıklarını göstermişlerdir (57,60,61).

Serbest malondialdehit, diğ er aldehitlerin saptanması için oluşturulan 2,4-dinitrofenilhidrazon türevleri ile karışmaz. Çünkü boya ile MDA pirazol oluştururken, karboniller hidrazon türevleri oluştururlar. Sıç an karaciğ er mikrozomlarının Fe^{2+} -NADPH ile uyarıldığı deney sistemlerinde MDA ile karbonil içeriğ inin uyumu gösterilmiştir (39, 46, 73).

Reaktif oksijen türleri hücre içinde ve dışında yüksek konsantrasyonlarda bulunan proteinleri de etkilerler (47) . Bu olaylar sonucunda enzimlerde , aktivatör veya inhibitörlerde yapısal modifikasyonlar, peptid bağlarında hidroliz, proteinler arası ç apraz bağlanmalar meydana gelir. Proteinlerde meydana gelen bu hasarlar serbest radikallerden başka peroksitlenmiş lipitlere de bağlıdır (47,48). Özellikle oluşan aldehitler ç apraz bağlanmalardan sorumlu tutulmaktadırlar. Proteinlerde oluşan oksidatif hasarın rastlandığı durumlar arasında doku iskemi/reperfüzyon hasarları, m üsküler distrofiler, pulmoner amfizem, katarakt oluşumu, romatoid artrit, ateroskleroz, kronik oksijen toksisitesi, kanser ve demyelinizan nörolojik hastalıklar sayılabilir (47,48). Organel ve hücre membranlarından arındırılmış sistemlerde lipit peroksidasyonu olmaksızın protein oksidasyonunun başlaması, bu parametrelerin de serbest radikal hasarını izlemekte kullanılabilceğ inin bir göstergesidir. Oluş an hasarın mekanizması amino asitler veya α -karbon atomundan hidrojen koparılmasını takiben oksijenin katılması ve peroksil radikalinin oluşması şeklindedir (51,74,75,76).

Oksidatif değ işikliğ e uğ rayan proteinler hücre içindeki proteolitik sistemler tarafından hızlı ve selektif bir şekilde yıkıma uğ ratılırlar. E. coli ve retikülositlerde ATP ve kalsiyumdan bağımsız ç alış an bu tür sistemler gösterilmiştir (75,77,78). Davies ve arkadaşlarının (74) yaptığı ç alış malarda özellikle primer yapıdaki oksidatif değ işikliklerin proteolitik sistemleri uyardığı vurgulanmaktadır. Karış ık fonksiyonlu oksidazlar (MFO) metal iyonlarının yardımıyla nativ enzimleri, okside ve inaktif formlarına dönüştürerek, proteolitik sistemlere uygun birer substrat haline getirmektedirler. Bu tür reaksiyonların hücrenin kendi protein içeriğ ini kontrol etmekte kullandığı bir sistem olabileceğ i düşünölmektedir (49,78). Ayrıca bu proteolitik sistemler primer antioksidanların eksikliğ inde veya yüksek oksidan tehdit altındaki hücrelerde, ikinci dereceden bir antioksidan sistem olarak da kabul edilebilir (66,69,72).

Değ işik deney sistemlerinde protein oksidasyonu oksidan etkiyi gösteren bir parametre olarak kullanılmıştır. Kurtel ve arkadaşları (81) ince barsak iskemi/reperfüzyonunun oksidan etkilerini incelemek için lenf sıvısında okside protein miktarını ölçmüşlerdir. Reznick ve arkadaşları (82) egzersiz sonrası oluşan iskelet kası protein oksidasyonunun E vitamini ile önlenebileceğ ini göstermişlerdir.

Chapman ve arkadaşları (83) da romatoid artritli hastaların sinovial sıvı protein oksidasyonlarının osteoartritli hastalara göre anlamlı olarak arttığını belirtmektedirler. Biz de çalışmamızda hasta grubunda oksitlenmiş protein konsantrasyonunda anlamlı bir artış olduğunu ve bunun diğer parametrelerle de uyum içinde olduğunu gösterdik.

Kronik böbrek yetmezliği, glomerüler filtrasyon hızı ve diğer böbrek fonksiyonlarında yavaş ama ilerleyici bir seyirle azalmanın görüldüğü kompleks bir patolojidir (84). Bu tabloda yer alan hızlanmış yaşlanma, katarakt oluşumu, ateroskleroz, eritrosit dayanıklılığında azalma, anemi, hemodiyaliz artması ve trombositlerde fonksiyon kaybının reaktif oksijen türü konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (85).

Kronik böbrek yetmezliği vakalarında reaktif oksijen türlerinin oluşması değişik nedenlere bağlıdır. Bu nedenler arasında nötrofil ve makrofaj infiltrasyonunu takiben salınan myeloperoksidaz enziminin klor iyonu yardımıyla katalizlediği reaksiyonlar, demir iyonunun yer aldığı Fenton reaksiyonu vb. sayılabilir. Bunlar özellikle glomerüllerde hasar ve proteinüri oluşturmaktadırlar (86,87,88).

Reaktif oksijen türleri özellikle eritrositleri etkilerler. Kan dolaşımında eritrositlerin canlılığını sürdürmesi hücrenin mekanik özelliklerini etkileyecek bir grup faktöre bağlıdır. Eritrositlerin dayanıklılığını etkileyen ekstresek faktörler arasında hücrenin şekli ve yüzey alanı/hücre volümü oranı yer alır. İntrensek faktörlere ise hücre içi yoğunluğu örnek olarak verilebilir (87). Bütün bu faktörler içinde en önemli yeri membran tutar. Çünkü peroksidasyona çok duyarlıdır. Membranda yeralan çok doymamış yağ asitlerinin, yağ asiti hidroperoksitlerine ve bir grup aldehite dönüşümleri sonrasında, özellikle fosfatidil etanolamin ve fosfatidilserin gibi zar fosfolipitlerinin ve spektrin gibi membran proteinlerinin polimerizasyonu, zar rijiditesinin artması ve hücre dayanıklılığının azalması söz konusudur (90,91).

İleri kronik böbrek yetmezliği ile düzenli hemodiyaliz tedavisi görmek zorunda kalan hastalar için anemi önemli bir sorundur. Aneminin en önemli nedeni eritropoietin üretimindeki azalma iken, alüminyum yüklenmesi, üremik toksinler ve reaktif oksijen türlerinin etkileri de unutulmamalıdır (92,93,94,95).

Kronik böbrek yetmezliğinde özellikle düzenli hemodiyaliz tedavisi olan hastalarda, değişik patolojilerin oluşumunda veya ilerlemesinde rolü olduğu düşünülen reaktif oksijen türleri çeşitli araştırmacılar tarafından miktarlandırılmıştır. Paul ve arkadaşları (85) plazma TBARS ve konjuge dien konsantrasyonlarında kontrol grubu ile hasta grubu arasında anlamlı bir fark bulamazken eritrosit TBARS'ında artma ($p < 0.01$) saptamışlardır. Toborek ve arkadaşları (96) kontrol

grubu ile karşılaştırıldığında düzenli hemodiyaliz tedavisi gören hastaların plazma lipit peroksit konsantrasyonları ile eritrosit süperoksit dismütaz aktivitelerinde artma ve serum antioksidan aktivitelerinde azalma belirlemişlerdir . Srivasta ve arkadaşları (97) yaptıkları karşılaştırmalı çalışmalarda bu grup hastaların plazmasında GSSG/GSH oranının arttığını göstermişler ve yüksek konsantrasyonda GSSG'nin hemoglobin ile birleşip, Hb-glutatyon disülfidleri şeklinde çökerek, hemolize ve anemiye neden olabileceğini belirtmişlerdir. Taccone-Galucci ve arkadaşları (89) ile Miguel ve arkadaşları (98) da hemodiyaliz hastalarında eritrosit MDA düzeyinin arttığını ifade etmektedirler . Agatsuma ve bir grup araştırmacı (99) hidrojen peroksit ve demir sülfat ile uyarılmış kontrol serumlarında 680 nm civarında zayıf kırmızı bir kemilüminesans alırken düzenli hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda 430 nm dalga boyunda kuvvetli mavi bir lüminesans elde etmişlerdir. Dasgubta ve arkadaşları (100) da plazma lipit peroksitlerinin bu grup hastalarda arttığını ve antioksidan bir protein olarak değerlendirilen transferrin düzeyinin düştüğünü göstermişlerdir. Benzer şekilde antioksidan çalışma yapanlar arasında El-Rashidy ve arkadaşları (101) eritrosit GSH düzeyleri ile GST ve GR aktivitelerinin hemodializ hastalarında arttığını ve bunun kompensatuvar bir mekanizma olabileceğini belirtmişlerdir. Gülcan ve arkadaşları (102) da otomasyona uyarlanmış yöntemlerde bunu doğrulamışlardır. Giardini ve arkadaşları (103,104) hem hemodiyaliz sonrası eritrosit MDA düzeylerinin azalmadığını, hem de kuvvetli bir antioksidan olan E vitamini tedavisinin bu konuda etkili olabileceğini göstermişlerdir. Benzer bir çalışma ile Yalçın ve arkadaşları (105) E vitamini tedavisinin düzenli hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda eritrosit ve plazma lipit peroksidasyon düzeyini azalttığını saptamışlardır .

Bazı araştırmacılara göre kronik böbrek hastalarından düzenli hemodiyaliz tedavisine ihtiyaç duyanlarda eritrositler ile ilgili patoloji bu hücrelerden köken almaktadır. Örneğin plazma TBARS ve konjuge dien konsantrasyonları açısından anlamlı bir fark bulamayan Paul ve arkadaşları (85) benzer bir yorum getirmektedirler. Bunun aksini düşünen araştırmacılar da mevcuttur. Smith ve arkadaşları, (106) hemoglobinin oksidatif denatürasyonunda GSH'ın aktivite göstermek için NADPH'a ihtiyaç duyduğunu, bunun da eritrosite heksozmonofosfat şantı tarafından karşılanacağını açıklayarak, eritrosit GSH düzeyinde bir anormallik bulamadıklarını, oluşan denatüre hemoglobinin plazma kaynaklı faktörleri bağlı olduğunu belirtmişlerdir .

Çalışmamızda, düzenli hemodiyaliz tedavisi gören kronik böbrek hastalarında malondialdehit ölçümlerinin yanısıra, lipit peroksidasyonu göstergelerinden olan diene konjugatları ile karbonil grupları konsantrasyonlarının ve protein oksidasyonunun arttığını gösterdik. Pek çok değişik reaksiyonu içeren ve çeşitli faktörlerin etkisi altındaki bu sistemin daha iyi değerlendirilmesi için değişik yöntemlerin aynı anda kullanılmasının daha uygun olacağını düşünmekteyiz.



ÖZET

Biyolojik sistemlerde hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de yabancı maddelerin etkisiyle meydana gelebilen reaktif oksijen türleri bazı hücre elemanlarına hasar verirler ve değişik hastalıklarda etkilerini gösterebilirler. Reaktif oksijen türlerinin çok kısa ömürlü olmaları nedeniyle doğrudan tayinleri çok güçtür. Bu yüzden reaksiyonlarda oluşan ürünler veya reaktif türlere karşı olan savunma sistemleri incelenerek bu konuda bilgi sahibi olunabilmektedir.

Uzun yıllar reaktif oksijen türlerinin yer aldığı reaksiyonların bileşenlerini veya oluşan ürünleri ölçen bir çok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler söz konusu reaksiyonlar topluluğunun değişik yönlerini ölçmektedirler.

Bu nedenle çok sayıda yöntemin kullanılmasının anlamlılığı arttıracağını düşündüğümüz çalışmamızda eritrosit ve plazma örneklerine dien konjugasyonu ile karbonil içeriği yöntemlerini, ayrıca yine eritrositlere protein oksidasyonunu uyarlayarak sıklıkla kullanılan bir yöntem olan eritrosit ve plazma TBARS düzeyi ile birleştirdik.

Hasta grubu olarak oksidan etkiyi yoğun bir şekilde yaşayan kronik böbrek hastalarından düzenli hemodiyaliz tedavisi olanları seçtik. Çalıştığımız parametrelerde kontrol grubu ile hastalar arasında anlamlı farklılıklar bulduk.

Sonuç olarak, pek çok değişik reaksiyonu içeren ve çeşitli faktörlerin etkisi altındaki bu sistemin daha iyi değerlendirilmesi için değişik yöntemlerin aynı anda kullanılmasının daha uygun olacağını düşünmekteyiz.

SUMMARY

Reactive oxygen species which may be formed endogenously or from external influences, are capable of damaging cellular components and may contribute to various disease entities. Direct detection of reactive oxygen species is a difficult procedure because of their very short life span. Therefore, determination of their reaction products and/or protective mechanisms is preferred.

Many assays have been developed over the years to measure the various reactants or the products that are formed. These assays measure the different parts of the pathway of reactions.

We have decided to use different parameters of lipid peroxidation and protein oxidation for quantitation of free radical reactions. So following the adaptation of the diene conjugation and the carbonyl content measurements to plasma and erythrocyte samples, and also protein oxidation to the erythrocytes, we compared our results with the oldest and most used procedure, TBARS for plasma and erythrocyte samples.

Chronic renal failure patients with regular dialysis treatment constitutes our patient group as they demonstrate high oxidative stress. We had significant differences between control and patient groups.

In conclusion, because reactive oxygen species reaction pathway is complex and because many factors effect the amounts of products formed; it seems to us more appropriate to apply several procedures for quantitation of free radical reactions.

KAYNAKLAR

- 1) Packer, L., Glazer, A.N. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth Enzymol*, 186 -B: 1-89 (1990).
- 2) Hageman, J.J., Bast, A., Vermeulen, N.P.E. Monitoring of oksidative free radical damage in vivo: analytical aspects. *Chem. Biol. Interactions*, 82: 243-293 (1992).
- 3) Rice-Evans, C., Burdan, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.*, 32: 71-110 (1993).
- 4) Dix, T.A., Aikens, J. Mechanism and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem. Res. Toxicol.*, 6: 2-18 (1993).
- 5) Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (Eds.) *Free Radicals in Medicine*. British Medical Bulletin, 49: 479-724 (1993).
- 6) Marshall, P.J. Role of active oxygen in the formation of lipid hydroperoxides: Biochemistry of arachidonic acid metabolism. Martinus Nijhoff Publishing, Boston (1985).
- 7) Halliwell, B., Cross, C. Reactive oxygen species, antioxidants and acquired immunodeficiency syndrome: Sense or speculation. *Arch. Inter. Med.*, 151:29-31 (1991).
- 8) Halliwell, B., Gutteridge, J.M. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen derived species. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 22-86 (1991).
- 9) Marklund, S.L. Oxygen toxicity and protective systems: *Clin. Toxicol.*, 23:289-298 (1985).
- 10) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and diseases. *Biochem. J.*, 219:1-14 (1984).
- 11) Freeman, B.A., Cropa, J.D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab. Inves.*, 47: 412-426 (1982).
- 12) Kappus, H. Oxidative stress in chemical toxicity. *Arch. Toxicol.*, 60: 144-149 (1987).
- 13) Dizdaroğlu, M. Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. *DNA and Free Radicals*, 19-39 (1993).

- 14) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Iron as a biological pro-oxidant. *ISI Atlas of Science: Biochemistry*:48-52 (1988).
- 15) Nagu, A., Change, B. Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 137-166 (1985).
- 16) Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS*, 15:129-135 (1990).
- 17) Chevion, M. A site specific mechanism for free radical induced biological damage: The essential role of redox-active transition metals. *Free Rad. Biol. Med.*, 5:27-37 (1988).
- 18) Gutteridge, J.M.C. Lipid peroxidation: Some problems and concepts. *Proceedings of the Upjohn Symposium on Oxidants and Diseases*. Lourence Press, Kansas (1988).
- 19) Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Iron and free radical reactions: Two aspects of antioxidant protection. *TIBS*, 11:372-375 (1986).
- 20) Joreno, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.*, 9:515-540 (1990).
- 21) Kawabata, T., Ogino, T., Awai, M. Protective effects of glutathione against lipid peroxidation in chronically iron-loaded mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 1004: 89-94 (1989).
- 22) Cohen, J.D, Viljoen, M., Clifford, D., De Oliveira, A.A., Veriava, Y., Milne, F.J. Plasma vitamin E levels in a chronically hemolyzing group of dialysis patient. *Clin. Nephrol.*, 25:42-47 (1986).
- 23) Healing, G., Green, C.J., Simpkin, S., Fulle, B.J., Linec, J. Inhibition of lipid peroxidation in renal tissue: In vitro studies with desferrioxamine, mannitol and uric acid. *Cryo-Letters*, 10: 7- 16 (1989).
- 24) Pryor, W.A., Godber, S. S. Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Rad. Biol. Med.*, 10: 177-184 (1991).
- 25) Taylor, A.E., Townsley, M.I. Assesment of oxygen radical tissue damage. *Physiol. Oxy. Rad.*, (1986).

- 26) Pryor, W.A. On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples. *Free Rad. Biol. Med.*, 7:177-178 (1986).
- 27) Marshall, P.J., Warso, M.A., Lands, W.E.M. Selective micro determination of lipid hydroperoxides. *Anal. Biochem.*, 145:192-199 (1985).
- 28) Yamamoto, Y., Brodsky, M.H., Baker, J.C., Ames, B.N. Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels by HPLC. *Anal. Biochem.*, 160:7-13 (1987).
- 29) Draper, H.H., McGirr, L. G., Hadley, M. The metabolism of MDA. *Lipids*, 21:4 (1986).
- 30) Frankel, E.N. Biological significance of secondary lipid oxidation products. *Free Rad. Res. Comm.*, 3:213-225 (1987).
- 31) Slater, T.F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Meth. Enzymol.*, 105:283-293 (1984).
- 32) Halliwell, B., Gutteridge, J.M. Oxygen is poisonous—an introduction to toxicity and free radicals. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 1-22 (1991).
- 33) Halliwell, B. Free radicals, reactive oxygen species and human diseases: A critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br. J. Exp. Pathol.*, 70: 737-757 (1989).
- 34) Ekström, T., Gorberg, P., Egestad, B., Hügberg, J. Recovery of MDA in urine as a 2,4 -DNPH derivative analyzed with HPLC. *Chem-Biol Interactions*, 67:25-31 (1988).
- 35) Halliwell, B., Grootveld, M. The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentations. *FEBS Lett.*, 213: 9-14 (1987)
- 36) Dormandy, T.L., Wickens, D.G. The experimental and clinical pathology of diene conjugation. *Chem. Phys Lipids*, 45:353-364 (1987).
- 37) Corongiu, F.P., Banni, S., Dessi, M.A. Conjugated dienes detected in lipid extracts by second derivative spectrophotometry. *Free Rad. Biol. Med.*, 7: 183-186 (1989).
- 38) Recknagel, R.O., Glende Jr, E.A. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. *Meth. Enzymol.*, 105: 189-192 (1984).

39) Benedetti, A., Fulceri, R., Ferrali, M., Ciccoli, L., Esterbauer, H., Comporti, M. Detection of carbonyl functions in phospholipids of liver microsomes in CCl₄ and BrCCl₃-poisoned rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 712: 628-638 (1982).

40) Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., Dianzini, M.U., Poli, G., Slater, T.F. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes *Biochem. J.*, 208: 129-140 (1982).

41) Poli, G., Dianzini, M.U., Cheeseman, K.H., Slater, T.F., Long, J., Esterbauer, H. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by CCl₄ or ADP-iron in isolated rat hepatocytes and rat liver microsomal suspensions. *Biochem J.*, 227: 629-638 (1985).

42) Corongiu, F.P., Lai, M., Milla, A. Carbon tetrachloride, bromotrichloromethane and ethanol acute intoxication *Biochem J.*, 212: 625-631 (1983).

43) Dillard, C.J., Tappel, A.L. Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes. *Lipids*, 6:715-721 (1971).

44) Esterbauer, H., Koller, E., Sice, D.G., Koster, J.F. Possible involvement of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the formation of fluorescent chromolipids. *Biochem J.*, 239:405-409 (1986).

45) Esterbauer, H., Zollner, H., Schaur, R.J. Hydroxyalkenals: Cytotoxic products of lipid peroxidation. *ISI Atlas of Science: Biochemistry 1*: 311-317 (1988).

46) Pompella, A., Maellara, E., Casini, A.F., Ferrali, M., Ciccoli, L., Comporti, M. Measurement of lipid peroxidation in vivo: A Comparison of different methods. *Lipids*, 22: 206-211 (1987).

47) Wolff, S.P., Garner, A., Dean, R.T. Free radicals, lipids and protein degradation. *TIBS*, 11: 27-31 (1986).

48) Davies, K.J.A. Protein damage and degradation by oxygen radicals I. General aspects. *J. Biol. Chem.*, 262:9895-9900 (1987).

49) Stadtman, E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.*, 9: 315-325 (1990).

50) Stadtman, E.R., Oliver, C.N. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *J. Biol. Chem.*, 266:2005-2008 (1991).

51) Stocks, J., Offerman, E.L., Modell, C.B., Dormandy, T.L. The susceptibility to autoxidation of human red cell lipids in health and disease. *Brit. J. Haematol.* 23:713-724 (1972).

52) Rose, H.G., Oklander, M. Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes. *J. Lipid Res.*, 6:428-431 (1965).

53) Gamuri, G. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with a photoelectric colorimeter. *Lab. Clin. Med.*, 27:955-960 (1942).

54) Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahr, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 186:464-473 (1990).

55) Henry, R.J., Cannon, D.C., Winkelman, J.W, Eds: *Clinical Chemistry: Principles and Techniques*, Harper and Row, 424-428 (1974).

56) Yagi, K. Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. *Lipid peroxides in Biology and Medicine*, Academic Press, 223-242 (1982).

57) Corongiu, F., Poli, G., Dianzini, M.U., Cheeseman, K.H., Slater, T.F. Lipid peroxidation and molecular damage to polyunsaturated fatty acids in rat liver. Recognition of two classes of hydroperoxides formed under conditions in vivo. *Chem. Biol. Interactions*, 59: 147-155 (1986).

58) Jayakumari, N., Ambikakumari, V., Balakrishnan, K. G., Subramania, K. Antioxidant status in relation to free radical production during stable and unstable anginal syndromes. *Atherosclerosis*, 94: 183-190 (1992).

59) Faure, P., Carticelli, P., Richard, M.J., Arnold, J., Caudray, C., Halimi, S., Favier, A., Russel, A.M. Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: Influence of insulin therapy. *Clin. Chem.*, 39/5:789-793 (1993).

60) Dillard, C.J., Tappel, A.L. Lipid peroxidation product in biological tissues. *Free Rad. Biol. Med.*, 7:193-196 (1989).

61) Bekyarova, G., Yonmova, D., Kozarev, I., Erythrocyte rheology and lipid peroxidation in burns. *Biochim. Biophys. Acta.*, 50: 71-76 (1991).

62) Goldstein, B.D., Harber, L.C. Erythropoietic Protoporphyrinemia. Lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis. *J. Clin. Invest.*, 51: 892-902 (1972).

63) Iversen, S.A., Cawood, P, Madigan, M.J., Lawsan, A.M., Dormandy, T.L. Identificaton of diene conjugated component of human lipid as octadeca-9,11,dienoic acid. FEBS Lett., 171: 320 (1984).

64) Thompson, S., Smith, M.T. Measurement of the diene conjugated form of linoleic acid in plasma by high performance liquid chromatography: A questionable non-invasive assay of free radical activity. Chem. Biol. Interactions, 55: 357-366 (1985).

65) Duygu, E. TMMOB Spektroskopi Okulu Notları, 185-217 (1987).

66) Hunter, M.I.S., Mohamed, J.B. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in Duchenne muscular dystrophy. Clin. Chim. Acta, 155: 123-132 (1986).

67) Brown, J.E., Wahle, K.W.J. Effect of fish oil and vitamin E supplementation on lipid peroxidation and whole blood aggregation in man. Clin. Chim. Acta, 193: 147-156 (1990).

68) Siturayake, R.D., Crump, B.J., Zezulka, A.V., Davis, M., Mc conkey, B., Thurnham, D.I. Measurement of conjugated diene lipids by derivative spectroscopy in heptane extracts of plasma. Ann. Clin. Biochem., 27-258-266 (1990).

69) Pryor, W.A., Castle, L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. Meth. Enzymol., 105: 293-299 (1984).

70) Tam, B.K., Mc Cay, P.B. Reduced triphosphopyridine nucleotide oxidase-catalyzed alterations of membrane phospholipids. J. Biol. Chem., 245: 2295-2300 (1970).

71) Ramenghi, U., David, O., Dianzini, I., Socchetti, L., Biasi, F., Chiarpotto, E., Poli, G. Analysis of the carbonyl compounds produced in β -thalassaemic erythrocytes by oxidative stress. Haematologia, 74: 531-5 (1989).

72) Benedetti, A., Pompella, A., Fulcen, R., Romani, A., Composti, M. Detection of 4-hydroxynonenal and other lipid peroxidation products in the liver of bromobenzene-poisoned mice. Biochim. Biophys. Acta, 876: 658-666 (1986).

73) Esterbauer, H., Benedetti, A., Lang, J., Fulceri, R., Fauler, G., Comporti, M. Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. Biochim. Biophys. Acta, 876:154-166 (1987).

74) Davies, K.J.A., Delsignore, M.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of 2° and 3° structure. *J. Biol. Chem.*, 262:9908-9913 (1987).

75) Davies, K.J.A., Goldberg, A.L. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanism in erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 262:8220-8226 (1987).

76) Davies, K.J.A., Goldberg, A.L. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 262:8227-8234 (1987).

77) Davies, K.J.A., Lin, S.W., Pacifici, R.E. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured proteins. *J. Biol. Chem.*, 262:9914-9920 (1987).

78) Davies, K.J.A., Delsignore, M.E., Lin S.W. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 262:9902-9907 (1987).

79) Davies, K.J.A., Lin, S.W. Oxidatively denatured protein are degraded by an ATP-independent proteolytic pathway in *E. Coli*. *Free Rad. Biol. Med.*, 5:225-236 (1988).

80) Stadtman, E.R. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: Implication in protein turnover, ageing and neutrophil function. *TIBS*, 11:11-12 (1986).

81) Kurtel, H., Granger, D.N., Tso, P., Grisham, M.B. Vulnerability of intestinal fluid to oxidant stress. *Am. J. Physiol.* 263 : G001- G006 (1992).

82) Reznick, A.Z., Witt, E., Matsumoto, M., Packer, L. Vitamin E inhibits protein oxidation in skeletal muscle of resting and exercised rats. *Biochem. Biophys. Res Comm.*, 189: 801-806 (1992).

83) Chapman, M.L., Rubin, B.R., Gracy, R.W. Increased carbonyl content of proteins in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 16:15-18 (1989).

84) Preuss, H.G.(Ed) *Clinics in Laboratory Medicine: Renal function* 13: 62-74 (1993).

85) Paul, J.L., Sall, N.D., Sani, T., Poinet, J.L., Lindenbaum, A., Man, K.N., Moaith, N., Raichvarg, D. Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients. *Nephron*, 64:106-109 (1993).

86) Rhee, M.S., Mc Goldrick, M.D., Meuwissen, H.J. Serum factor from patients with chronic renal failure enhances polymorphonuclear leucocyte oxidative metabolism. *Nephron* 42:6-13 (1986).

87) Johnson, K.J., Rehan, A., Ward, P.A. The role of oxygen radicals in kidney diseases. Upjohn symposium April 1987.

88) Laurent, B., Ardaillou, R. Reactive oxygen species production and role in kidney. *Am. J. Physiol.*, 251 F 765-776 (1986).

89) Taccone-Galucci, M., Giardini, O., Lubrano, R., Bandino, D., Casciani, C.U. Red blood cell lipid peroxidation in predialysis chronic renal failure patients. *Clin. Nephrol.*, 27:238-241 (1987).

90) Pfaffenot, C., Meiselman, H.J., Hochstein, P. The effect of malondialdehyde on erythrocyte deformability. *Blood*, 59:12-15 (1982).

91) Peuchant, E., Solles, C., Vallot, C., Wone, C., Lenser, R. Increase of erythrocyte resistance to hemolysis and modification of membrane lipids induced by hemodialysis. *Clin.Chim. Acta* , 178: 271-282 (1988).

92) Clemens, M.D., Zanetti, Z.B. Lipid abnormalities and peroxidation of erythrocytes in nephrotic syndrome. *Nephron*, 43:325-329 (1989).

93) Altmann, P., Plowman, D., Maish, F., Cunningham, J. Aluminium chelation therapy in dialysis patient: Evidence for inhibition of hemoglobin synthesis by low levels of aluminium. *Lancet*, May7: 1012-1014 (1988).

94) La Serna, F.J., Prapa, M., Gilsanz, F., Rodicio, J.L., Ruilope, L.M., Alcazar, J.M. Improvement in the erythrocytes of chronic haemodialysis patients with desferrioxamine. *Lancet* 7 May: 1009-1011 (1988).

95) Trznadel, K., Pavlicki, L., Kedziora, J., Luciak, M., Blaszczyk, J., Buczynski, A. Superoxide generation, erythrocyte superoxide dismutase activity, and lipid peroxidation during hemoperfusion and hemodialysis in chronic uremic patients. *Free Rad. Biol. and Med.* 6:393-397 (1987).

96) Tobarek, M., Wasik, T., Drozd, M., Klin, M., Wrobel, K.M., Grzebeienlak, E.M. Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. *Metabolism*, 41:1229-1232 (1992).

97) Costagliola, C., Romano, L., Sarice, P., Benedetto, A.D. Anemia and chronic renal failure: The possible role of the oxidative state of glutathione. *Nephron* 52:11-14 (1989).

98) Miguel, A., Miguel.A., Linaes, M., Perez, A., Moll, R., Sanchis, J., Escobedo, J.M., Miguel-Borja, J.M. Evidences of an increased susceptibility to lipid peroxidation in red blood cells of chronic renal failure patients. *Nephron*, 50:64-65 (1988).

99) Agatsuma, S., Nagoshi, T., Kobayashi, M., Uso, M., Watanabe, H., Sekino, H., Ineba, H. Hydroxyl radical induced characteristic chemiluminescent spectra for plasma of hemodialyzed patients. *Clin. Chem.*, 38:48-58 (1992).

100) Dasgubta, A., Hussain, S. Elevated lipid peroxidation products and depleted transferrin levels in the serum of patients with chronic renal failure. *Clin Chem.* 36 (abstract)(1990).

101) El-Rashidy, F.H., Al-Turk, W.A., Stohs, S.J. Glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in erythrocytes and lymphocytes in chronic renal disease. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 44, 423-30 (1984).

102) Gülcan, G., Yalçın, A.S., Emerk, K. Glutathione and related enzyme levels in the erythrocytes of chronic hemodialysis patients. *Med. Sci. Res.* 20: 625-626 (1992).

103) Giardini, O., Taccone-Galucci, M., Lubrano, R., Ricciardi-Tenore, G., Bandino, D., Silvi, I., Paradisi, C. Effects of alpha-tocopherol administration on red blood cell membrane lipid peroxidation in hemodialysis patients. *Clin Nephrol.*, 21: 174-177 (1984).

104) Giardini, O., Taccone-Galucci, M., Lubrano., R, Ricciardi-Tesore, G, Berdino, D., Silvi, I., Rubeto, U., Casciani, C.U. Evidence of red blood cell membrane lipid peroxidation in haemodialysis patients. *Nephron*, 36: 235-237 (1987).

105) Yalçın, A. S., Yurtkuran, M., Dilek, K., Kılınç, A., Tağa, Y., Emerk, K. The effect of vitamin E therapy on plasma and erythrocyte lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *Clin. Chim. Acta*, 185: 109-112 (1989).

106) Smith, C.L., Berkseth, R.O. Sensitivities of erythrocytes to oxidant stress in uremia. *Am. J. Nephrol.*, 10: 61-68 (1990).

