

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİNDE**  
**HEMODİYALİZ VE PERİTON DİYALİZİNİN**  
**OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**Biyokimya (Eczacılık) Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı**  
**Fadime AYDIN KÖSE**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU**

**İZMİR**

**2009**



**T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİNDE HEMODİYALİZ  
VE PERİTON DİYALİZİNİN OKSİDATİF STRES  
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**Biyokimya (Eczacılık) Programı**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Eczacı  
Fadime AYDIN KÖSE**

**Danışman  
Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU**

**İZMİR**

**2009**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

**Başkan** : Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU .....

**(Danışman)**

**Üye** : Prof. Dr. Ayfer YALÇIN .....

**Üye** : Doç. Dr. Emrah KILINÇ .....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: .....

## ÖNSÖZ

Çalışmalarımdaki değerli katkıları, özveri ve desteklerinden dolayı başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU' na, çalışma materyalinin sağlanmasında yardımcı olan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fehmi AKÇİÇEK' e, Sayın Dr. Meltem SEZİŞ' e ve Ege Nefroloji Diyaliz Merkezinde görev yapan Sayın Dr. Can BOYDAK' a ve tüm sağlık personeline, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Mehmet N. ORMAN' a, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim görevlisi hocalarım ile öğretim elemanı arkadaşlarıma teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca, her zaman olduğu gibi eğitim hayatım süresince de benden desteğini esirgemeyen aileme ve eşime çok teşekkür ederim.

İzmir, 2009

Ecz. Fadime AYDIN KÖSE

<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>X</b>

## **1. BÖLÜM**

### **GİRİŞ VE AMAÇ**

1.1 Genel Bilgiler .....	3
1.1.1 Oksidatif Stres .....	3
1.1.1.1 Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller .....	3
1.1.1.2 Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri .....	7
1.1.1.3 Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları.....	12
1.1.1.4 Antioksidan Savunma Sistemi .....	13
1.1.2 Protein Oksidasyonu .....	18
1.1.2.1 Protein İskeletinin Oksidasyonu ve Proteinin Parçalanması..	18
1.1.2.2 Amino Asit Yan Zincirlerinin Oksidasyonu .....	21
1.1.2.3 Reaktif Azot Türleri Tarafından Protein Oksidatif Modifikasyonu .....	22
1.1.2.4 Protein Oksidasyon Ürünleri.....	23
1.1.3 Kronik Böbrek Yetmezliği .....	30
1.1.3.1 Kronik Böbrek Yetmezliği Etiyolojisi .....	31
1.1.3.2 Kronik Böbrek Yetmezliği Patogenezi .....	31
1.1.3.3 Kronik Böbrek Yetmezliği Tedavisi .....	33
1.2 Kronik Böbrek Yetmezliği Tedavisi Ve Oksidatif Stres.....	36
1.3 Kronik Böbrek Yetmezliğinde Oksidatif Stres Belirteçleri .....	39

## 2. BÖLÜM

### GEREÇLER VE YÖNTEMLER

2.1	Kullanılan Aletler .....	41
2.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	42
2.3	Kullanılan Çözeltiler .....	43
2.3.1	Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	43
2.3.2	Karbonil Grupları Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	44
2.3.3	Miyeloperoksidaz Enzimi Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	45
2.3.4	İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	46
2.3.5	3- Nitrotirozin Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	47
2.3.6	Serbest Tiyol Grupları Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	48
2.3.7	Total Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	48
2.4	Kullanılan Hasta Ve Kontrol Gruplarının Tanımı Ve Plazma Örnekleri .....	50
2.4.1	Hasta Grubu .....	50
2.4.2	Kontrol Grubu .....	51
2.5	Kullanılan Yöntemler.....	51
2.5.1	Protein Miktar Tayini Yöntemi.....	51
2.5.2	Protein Karbonil Grubu Miktar Tayini Yöntemi .....	53
2.5.3	Miyeloperoksidaz Miktar Tayini Yöntemi.....	53

2.5.4 İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) Miktarı Tayini	
Yöntemi.....	56
2.5.5 3-Nitrotirozin Miktar Tayini Yöntemi .....	57
2.5.6 Serbest Tiyol Grupları Miktar Tayini Yöntemi .....	59
2.5.7 Total Antioksidan Kapasite (TAK) Tayini Yöntemi .....	60
2.6 İstatistiksel Analiz.....	63
2.7 Etik Kurul Onayı.....	63

### **3. BÖLÜM**

#### **BULGULAR**

3.1 Standart Eğri Çizimleri .....	64
3.1.1 Protein Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi .....	64
3.1.2 AOPP Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi.....	65
3.1.3 MPO Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi .....	66
3.1.4 Plazma 3-NT Düzeyi Tayini İçin Standart Eğri Çizimi.....	67
3.1.5 TAK Düzeyi Tayini İçin Standart Eğri Çizimi .....	68
3.2 Çalışma Gruplarında Plazma Oksidatif Stres Parametrelerine Ait	
Bulgular.....	69
3.2.1 Plazma Protein Karbonil Grubu Düzeyine Ait Bulgular.....	69
3.2.2 Plazma Miyeloperoksidaz Düzeyine Ait Bulgular.....	70
3.2.3 Plazma İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Düzeyine Ait	
Bulgular.....	72
3.2.4 Plazma 3- Nitrotirozin Düzeyine Ait Bulgular .....	73
3.2.5 Plazma Serbest Tiyol Grubu Düzeyine Ait Bulgular.....	74
3.2.6 Plazma Total Antioksidan Kapasite Düzeyine Ait Bulgular.....	75



<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>77</b>
<b>5. ÖZET.....</b>	<b>91</b>
<b>6. ABSTRACT .....</b>	<b>93</b>
<b>7. YARARLANILAN KAYNAKLAR.....</b>	<b>95</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>107</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. ROT' ların arttırdığı hücre hasarı mekanizmaları	11
Şekil 2. Diamidasyon ve $\alpha$ -amidasyon yolları ile polipeptit iskeletinde meydana gelen parçalanma reaksiyonları	19
Şekil 3. Proteinlerin polipeptit omurgasının parçalanma reaksiyonları	20
Şekil 4. Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları	24
Şekil 5. Ditirosin oluşum yolağı	25
Şekil 6. Tirozinin oksidasyon yolları	27
Şekil 7. Nitrotirozin oluşum yolağı	28
Şekil 8. KBY ve replasman tedavisinde protein oksidasyon yolları	40
Şekil 9. TNB oluşum reaksiyonu	60
Şekil 10. BSA standart eğri grafiğı	65
Şekil 11. Kloramin-T standart eğri grafiğı	66
Şekil 12. MPO standart eğri grafiğı	67
Şekil 13. 3-NT standart eğri grafiğı	68
Şekil 14. ABTS <sup>+</sup> radikali absorbans inhibisyonu standart grafiğı	69
Şekil 15. Çalışma gruplarına ait plazma PCC konsantrasyonuna ait grafik	70
Şekil 16. Çalışma gruplarına ait plazma MPO konsantrasyonuna ait grafik	71
Şekil 17. Çalışma gruplarına ait plazma AOPP konsantrasyonuna ait grafik	72

Şekil 18. Çalışma gruplarına ait plazma 3- NT konsantrasyonuna ait grafik	73
Şekil 19. Kontrol grubuna ait tipik plazma (A) ve $10^{-5}$ M 3-NT ekilmiş plazma (B) kromatogramları	74
Şekil 20. Çalışma gruplarına ait plazma serbest tiyol konsantrasyonuna ait grafik	75
Şekil 21. Çalışma gruplarına ait plazma TAK konsantrasyonuna ait grafik	76

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Reaktif oksijen türleri	5
Tablo 2. ROT'ların hücrede başlıca hedefleri ve oluşturduğu hasarlar	8
Tablo 3. Non-enzimatik antioksidanlar ve etki mekanizmaları	17
Tablo 4. Amino asitlerin ROT aracılı oksidasyonu ve oksidasyon ürünleri	22
Tablo 5. Kronik böbrek yetmezliği evreleri	31
Tablo 6. Standart trolox çözeltisi hazırlanması	49
Tablo 7. BSA standart grafiğini oluşturan absorbands değerleri	64
Tablo 8. Kloramin-T standart eğrisini oluşturan absorbands değerleri	65
Tablo 9. MPO standart eğrisini oluşturan absorbands değerleri	66
Tablo 10. 3-NT standart eğrisini oluşturan pik yükseklikleri	67
Tablo 11. TAK standart eğri grafiğini oluşturan absorbands değerleri	68
Tablo 12. Çalışma gruplarına ait plazma PCC düzeyleri	70
Tablo 13. Çalışma gruplarına ait plazma MPO düzeyleri	71
Tablo 14. Çalışma gruplarına ait plazma AOPP düzeyleri	72
Tablo 15. Çalışma gruplarına ait plazma 3- NT düzeyleri	73
Tablo 16. Çalışma gruplarına ait plazma tiyol düzeyleri	75
Tablo 17. Çalışma gruplarına ait plazma TAK düzeyleri	76

# 1. BÖLÜM

## GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY); böbrek fonksiyonlarının ilerleyici ve geri dönüşümsüz olarak bozulmasıyla sonuçlanan uzun süreli bir patolojik durumdur. Glomerüler filtrasyon hızının azalmasıyla belirlenebilen bu hastalıkta, böbreklerde gelişen ilerleyici fonksiyon kaybını açıklamak üzere önerilen çeşitli mekanizmalardan biri de oksidatif strestir. Böbrek fonksiyonlarının bozulması sonucunda meydana gelen birçok patolojik mekanizma ile reaktif oksijen türleri üretiminde artış olması ve antioksidan sistemdeki yetersizlikler KBY'nin patogenezinde katkıda bulunmaktadır. Tüm dünyada önemli bir sağlık problemi olarak yer alan kronik böbrek yetmezliğinin ilerlemesini durdurmak amacıyla halen yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.

Bu konuda yapılan çalışmalarda, idame diyaliz (hemodiyaliz veya periton diyaliz) tedavisi görmekte olan KBY hastalarında oksidatif stresin yükseldiğini gösteren çeşitli bulgular elde edilmiş ve diyaliz ortamının oksidatif stres için bir model olarak düşünülebileceği ve hatta oksidatif stresi arttırdığı ileri sürülmüştür. Ancak henüz, KBY hastalarında oksidatif stresin artmasının nedenleri henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. Çünkü inflamasyon gibi üremi ile ilişkili metabolik anormallikler, diyaliz membranının biyolojik uyumsuzluğu ve/veya endotoksinle kontamine olmuş diyalizatın kullanılması gibi diyaliz işlemine bağlı

faktörler ve hatta tedavide kullanılan eritropetin gibi ilaçların da oksidatif strese katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca, KBY hastalarında plazmanın oksidatif stres durumunu gösteren birçok belirteç olmasına rağmen, bu konudaki popülasyon çalışmalarının eksikliği nedeniyle, bu testlerin diagnostik gücü ile ilgili de çeşitli farklı görüşler mevcuttur.

Bu çalışmada, diyaliz tedavisi uygulanan hemodiyaliz ve periton diyalizi hasta gruplarında ve böbrek transplantasyonu gerçekleştirilmiş olan KBY hastalarında farklı tedavi yöntemlerinin, oksidatif stres ve protein oksidasyonu üzerindeki etkilerinin çeşitli parametreler aracılığıyla, detaylı bir şekilde incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla kontrol grubu ve hasta gruplarında plazma oksidatif stres durumu; protein oksidasyonu belirteçleri olan protein karbonil grupları (PCC), serbest tiyol grupları (-SH), ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP), 3-nitrotirozin (NT), miyeloperoksidaz (MPO) ve plazma total antioksidan kapasite (TAK) düzeyleri üzerinden incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## 1.1 Genel Bilgiler

### 1.1.1 Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile ortadan kaldırılma hızının denge halinde olması *oksidatif denge* olarak adlandırılır. Oksidatif denge korunduğu sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Oksidatif stres ise, serbest radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir azalma meydana geldiğinde oksidatif denge bozulmasıyla ortaya çıkan durumdur (29, 39, 77).

#### 1.1.1.1 Reaktif Oksijen Türleri ve Serbest Radikaller

Reaktif oksijen türleri (ROT) veya serbest radikaller; dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron ( $e^-$ ) içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan moleküllerdir. Bu geniş tanımlama; hidrojen atomunu, geçiş elementlerinin çoğunu ve oksijen molekülünü kapsamaktadır. Negatif yüklü elektron sayısının çekirdekdeki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmadığı moleküller oldukları için dayanıklı olmayan serbest radikaller, elektron konfigürasyonlarını pozitif yüklerle dengelemeleri gerektiğinden çok reaktifler ve kendi orbitallerini tamamlayabilmek için başka moleküllerden elektron kopartarak zincir reaksiyonlar başlatabilirler (22, 29, 30). Serbest radikallerin esas kaynağını moleküler oksijen ( $O_2$ ) oluşturmaktadır. Aerobik organizmalarda mitokondriler tarafından oksijenin kullanımında birçok serbest radikal meydana gelmektedir. Hücredeki oksidatif süreçler genellikle ara ürün salımı olmaksızın elektronların  $O_2$ 'ye transferiyle sonuçlanır. Elektron transfer reaksiyonlarındaki sızıntılar/ kaçışlar nedeniyle çok az miktarda oksijen radikali oluşur. Oksijen radikallerinin hücre içindeki başlıca kaynağı mitokondriyal elektron

transport zinciridir (ETZ). Bu zincirde kompleks I ve II tarafından ubikinonun indirgenmesiyle oluşan stabil semikinon molekülünden bir elektronun  $O_2$ 'ye transferiyle süperoksit anyonu oluşur. Süperoksit, aynı zamanda FMN gibi bir flavinden bir elektronun transferiyle de oluşabilir. Mitokondrilerdeki solunum zincirinde, elektronların oksijene transfer basamaklarında süperoksit anyonu ( $O_2^{\cdot-}$ ), daha sonra hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve son olarak da hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ ) oluşur (22).

Reaktif oksijen türleri aynı zamanda peroksizomlarda da oluşur. Uzun zincirli yağ asitleri ve diğer bileşikler  $FADH_2$ 'den iki elektronun  $O_2$ 'e transferiyle okside olurlar ve sonuçta  $H_2O_2$  meydana gelir. Oluşan  $H_2O_2$  süratle hidroksil radikaline dönüştürülür ( $OH^{\cdot}$ ). Ayrıca, endoplazmik retikulumda sitokrom  $p_{450}$  sistemi de oksijen radikalleri üretebilir (22).

Oksijen radikalleri, belirli hücrelerde bakteriyel enfeksiyonun neden olduğu inflamasyon sırasında da üretilirler. Mikrobiyal enfeksiyonlarda savaşan fagositler, solunum patlaması olarak bilinen süreçte toksik oksijen radikalleri üretirler. Daha sonra fagositler bakteriyi öldürür. Akut enfeksiyonlarda oksijen radikali oluşumu ve bakterilerin öldürülmesi olumlu bir proses olmasına rağmen, uzun süreli enfeksiyonlarda fagositlerin ölmesiyle salınan toksik oksijen radikalleri, hücre çevresini olumsuz olarak etkilemektedir (22). *Staphylococcus aureus* gibi patojenler ayrıca lökotrienler, prostaglandinler gibi mediyatörler; nötrofil, eosinofil ve makrofajları aktive ederek ve membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi yoluyla ROT salınmasına yol açarlar (15, 84).

Kozmik radyasyon, kimyasal ve ilaç kullanımı, dumana maruziyet reaktif oksijen türleri oluşumuna neden olur. Ayrıca, iskemi'de yüksek konsantrasyonda  $O_2$



içeren çözeltilerle dokuların perfüzyonu sırasında reaktif oksijen türleri meydana gelir ve hasara neden olur (28, 38).

ROT, hücrelerde tersinir veya tersinmez modifikasyonlara neden olur. Bu modifikasyonlar oksidasyon, fragmantasyon, köprüleşme (disülfit bağlantısı, protein-protein bağlanması, protein-lipit bağlanması), protein polipeptit iskeletinde parçalanma şeklinde meydana gelebilir. Bu değişiklikler sonucunda hücre, doku ve/veya organ hasarı meydana gelebilir (27, 84).

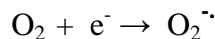
Radikal yapısında olan ve radikal yapısında olmayan reaktif oksijen türleri aşağıda yer alan Tablo 1’de sıralanmıştır.

Reaktif Oksijen Türleri	
<i>Radikal Yapısında Olanlar</i>	<i>Radikal Yapısında Olmayanlar</i>
Süper oksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )	Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )
Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ )	Lipit hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikali ( $ROO^{\cdot}$ )	Hipohalöz asit (HOX)
Alkoksil Radikali ( $RO^{\cdot}$ )	N-Halojenli aminler (R-NH-X)
Semikinon Radikali ( $HQ^{\cdot}$ )	Singlet oksijen ( $^1O_2$ )
Hemoproteine bağlı serbest radikaller	Ozon ( $O_3$ )
	Azot dioksit ( $NO_2$ )

**Tablo 1.** Reaktif oksijen türleri (28)

### 1) Süperoksit Radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )

Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde meydana gelir (4).



Hücrelerde,  $O_2^-$  üretilen başlıca mekanizmalar;

a) Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında ETZ'de meydana gelen elektron kaçışları,

b) İndirgeyici özellikteki moleküllerin (hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotitler, ve indirgenmiş geçiş metalleri) aerobik ortamda oksidasyonu,

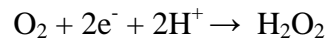
c) Dehidrogenaz ve oksidaz enzimleri başta olmak üzere, çok sayıda enzimin katalitik etkisi,

d) Aktive edilen fagositik lökositlerde gerçekleşen 'solunum patlaması'dır.

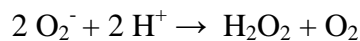
Süperoksit radikali doğrudan moleküler hasara neden olamazken organizmadaki asıl önemi hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) kaynağı olmasıdır. Ayrıca geçiş metallerini indirgeyebilmesi ve nitrik oksit radikalini peroksinitrite ( $ONOO^-$ ) dönüştürmesi ile oksidatif hasar oluşumuna katkıda bulunmaktadır (30, 75).

## 2) Hidrojen Peroksit

Moleküler oksijenin iki elektron alması veya süper oksit radikalinin çevredeki moleküllerden bir elektron alması sonucu oluşur.



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksit daha çok süperoksidin spontan olarak veya süperoksit dismutaz enzimi (SOD) katalizörlüğünde dismutasyonu sonucu oluşur.



Hidrojen peroksit,  $O_2^{\cdot-}$  gibi, reaksiyon ortamına göre hem oksidan hem de redüktan gibi davranabilir.  $H_2O_2$  bir serbest radikal değildir ancak  $Fe^{+2}$  veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu ile ve süperoksit radikalının varlığında Haber-Weiss reaksiyonu ile en reaktif serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini ( $HO^{\cdot}$ ) oluşturur (27, 30, 75).



### 3) Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali ( $HO^{\cdot}$ ); yukarıda belirtildiği gibi, geçiş metalleri varlığında Fenton Reaksiyonu ile süperoksit radikali varlığında ise Haber-Weiss Reaksiyonu ile hidrojen peroksitten meydana gelir. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması sonucunda da meydana gelir (27, 77). Bilinen en güçlü reaktif oksijen türü olan hidroksil radikalının yarılanma ömrü çok kısadır (30, 75).

### 4) Singlet Oksijen

Singlet oksijen, moleküler oksijenin elektronlarından birisinin enerji alarak kendi spininin tersi yönünde dönmesi veya orbitalini değiştirmesiyle oluşur.

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektron olmadığından, radikal olmayan bir reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonu sonucu gelişebileceği gibi serbest radikal reaksiyonunun başlamasına da yol açabilir (27, 30, 75).

#### 1.1.1.2 Reaktif Oksijen Türlerinin Etkileri

Reaktif oksijen türleri hücrelerde organizmanın temel yapı taşları olan lipid, protein, karbonhidrat ve nükleik asit yapıları başta olmak üzere hemen tüm moleküllere saldırarak hasara neden olurlar (Tablo 2). Hasar gören moleküller,

onarılmadığı hallerde, fonksiyonlarını kaybeder, bunu takiben hücre ölümü ve doku hasarı gelişebilir (15, 18).

<i>Hedef Molekül</i>	<i>Molekülde Oluşan Modifikasyonlar</i>
Doymamış yağlar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolesterol ve yağ asitlerinde oksidasyon</li> <li>• Lipidlerde çapraz bağlanmalar</li> <li>• Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar</li> </ul>
Karbonhidratlar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polisakkaritlerin depolimerizasyonu</li> </ul>
Nükleik asit bazları	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidroksilasyonlar</li> <li>• Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar</li> <li>• Şekerlerde benzer reaksiyonlar</li> </ul>
Kükürtlü amino asitler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protein denatürasyonu ve çaprazlanma</li> <li>• Enzimlerde inhibisyon</li> </ul>
Proteinler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptid zincirlerinde kopma</li> <li>• Denatürasyon</li> <li>• Proteinlerde çapraz bağlar</li> </ul>
Nükleik asitler	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tek ve çift iplikçik kırılmaları</li> <li>• Baz içermeyen bölgeler</li> </ul>
Hiyaluronik asit	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sinovyal sıvı akışkanlığında değişme</li> </ul>

**Tablo 2.** ROT'ların hücrede başlıca hedefleri ve oluşturduğu hasarlar

ROT ile başlatılan peroksidasyon zincir reaksiyonu ile membrandaki polidoymamış yağ asitleri (PUFA) hasara uğrar ve hücresel bütünlük bozulabilir (9). Ayrıca oluşan bir lipid peroksil radikali, çevredeki yağ asidi moleküllerinde otokatalitik zincir reaksiyonlar meydana getirmek suretiyle peroksil radikallerinin oluşumuna neden olabilir. Bu durum tek başına hidroksil radikalleri ile başlatılabileceği gibi, uygun bir şelatör varlığında  $O_2^{\cdot-}$  anyonu ile de başlatılabilir (15, 18, 30).

Proteinlerin ROT tarafından gerçekleştirilen oksidatif modifikasyonlardan etkilenme dereceleri amino asit içeriklerine bağlıdır. Yapılarında doymamış bağ ve serbest tiyol grubu taşıyan amino asitleri (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) içeren proteinlerden, ROT'ların etkisiyle *karbon merkezli radikaller* veya *tiyil (RS<sup>•</sup>)* radikalleri meydana gelir. Bu karbon merkezli radikallerden 'karbonil gruplarının' ölçülmesi ile proteinlerin oksidatif hasarı değerlendirilir. Serbest radikallerin meydana getirdiği oksidatif modifikasyonlar sonucunda proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin agregasyonu meydana gelebilir. Yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (15, 18).

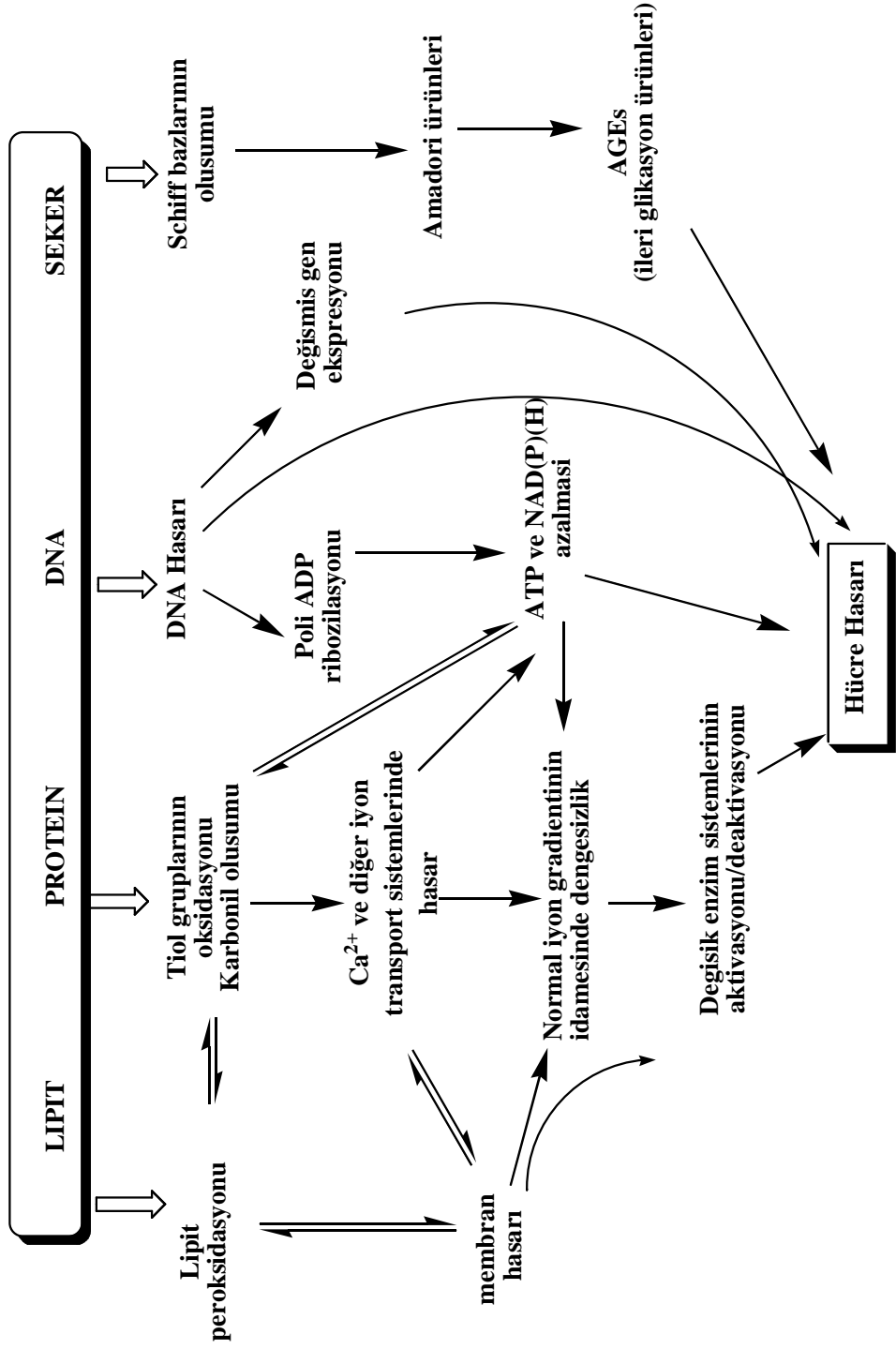
Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi-şekerler fizyolojik şartlarda oto-oksidasyona uğrayarak, süperoksit ve hidrojen peroksit oluşumuna neden olurlar. Monosakkaritlerin oto-oksidasyonu, protein çapraz bağlanmalarına yol açarak agregasyonlarına sebep olduğu gibi, bazal membran kalınlaşmasına da yol açar (15, 18, 59, 69).

Reaktif oksijen türleri DNA çift sarmalının ayrılmasına veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Bu da kromozal mutasyonlara ve sitotoksositeye yol açar (15, 18, 28, 29). Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Eğer hidroksil radikali DNA'nın yakınında meydana gelirse, pürin ve primidin bazlarına etki ederek mutasyonlara neden olabilir. Hidroksil radikali, nükleik asitlerin doymuş karbon atomlarından bir H<sup>+</sup> uzaklaştırarak karbon merkezli radikal oluşturur. Singlet oksijenin nükleik asitlerle tepkimeye girme yeteneği daha sınırlıdır. Süperoksit anyonu ise güçlü bir radikal olduğundan, özellikle guanin gibi yüksek elektron yoğunluğuna sahip moleküllerle daha kolay tepkimeye girer (15, 18, 28). Reaktif oksijen türlerinin DNA'yı oksidatif

hasara uğratması karsinogenez, nörodejenaratif hastalıklar ve yaşlanmada önemlidir (18, 30).

Reaktif oksijen türlerinin hücrenin yaşamsal bileşiklerinde oluşturduğu modifikasyonlar sonucu neden oldukları hücre ve doku hasarının, çeşitli akut ve kronik hastalıkların patogenevizinden doğrudan veya dolaylı olarak sorumlu olduğu düşünölmektedir (15, 18, 39). Birçok araştırma sonucunda; Parkinson, Alzheimer, multiple skleroz (MS), amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklarda; ateroskleroz, miyokard enfarktüsü gibi kardiyo-vasköler hastalıklarda; AIDS, astım, diyabet, KBY gibi kronik sistemik hastalıklarda; romatoid artrit, sepsis gibi inflamatuvar hastalıklarda oksidatif stres düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir (18, 43, 84).

## ROT' LARIN ARTTIRDIĞI HÜCRE HASARI MEKANİZMALARI



Şekil 1. ROT' ların arttırdığı hücre hasarı mekanizmaları

### 1.1.1.3 *Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynakları*

Organizmada ROT, normal metabolik işlemlerin sürdürülmesi sırasında endojen olarak meydana gelebildiği gibi, ksenobiyotiklerin metabolize edilmesi, iyonize radyasyona maruz kalma gibi nedenlerle eksojen kaynaklı olarak da üretilmektedir (77).

#### **a) Endojen Kaynaklar:**

Metabolizma reaksiyonları sırasında az miktarda ROT meydana gelmesi fizyolojik bir durumdur. Metabolik yolağın ilerleyebilmesi için bu ara ürünlerin oluşumu kaçınılmazdır. Başlıca endojen ROT kaynakları aşağıda sıralanmıştır:

- ETZ'de meydana gelen elektron kaçıışı: Mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleer membrandaki elektron transport zincirinde, oksijenli solunum sırasında oluşan elektron sızıntıları başlıca ROT kaynağıdır. Oksijen, %1 oranında süperoksit indirgenir (13, 27).

- Peroksizom enzimleri: Peroksizom organelindeki çeşitli oksidaz enzimleri süperoksit radikali üretmeden, fazla miktarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretebilirler (27).

- Enzimler ve Proteinler: Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında ROT meydana gelmektedir. Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz ve triptofan dioksijenaz bu tür enzimlerden olup, süper oksit radikali oluşumuna neden olurlar (30, 77, 75 ).

- Aktive fagositler ve makrofajlar: İnfeksiyöz olaylarda özellikle *Staphylococcus aureus* gibi patojenler, ayrıca lökotrienler, prostaglandinler gibi mediyatörler, nötrofil, eosinofil ve makrofajları aktive ederler. Aktif hale geçen bu hücreler, membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi aracılığıyla ROT oluşmasına yol açarlar (13, 26, 75).



- Plazma membranı: Plazma membranında bulunan lipoksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri ROT üretimi için önemli bir kaynaktır (13, 28).

- Küçük moleküllerin oto-oksidasyonu: Nötral ortamda tiyoller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler gibi çok sayıda bileşiğin oto-oksidasyonu ile ROT oluşur (28).

- Yaşlanma süreci: ROT düzeyi yaşlanma ile paralel olarak artış gösterir. Yaşlanma ile protein karbonilasyon artışı ve katalize edici tüm enzimlerin azalmasının bu dengesizlikte önemli rolleri vardır (13, 59).

#### **b) Eksojen Kaynaklar:**

Başlıca eksojen ROT kaynakları; çevresel faktörler, stres, antineoplastik ajanlar, yabancı toksik maddeler ve glutasyonu okside eden maddelerdir. Çevresel faktörler arasında; iyonize radyasyon, hava kirliliği, sigara kullanımı, haşerelere karşı ilaçlar, metaller (titanyum, alüminyum, kurşun, molibden, nikel, krom, kobalt, cıva, kadmiyum, arsenik) ve aşırı oksijen konsantrasyonu (hiperoksi) yer alır (28- 30). Bu etkenler, doğrudan ROT üretimine neden olabilir veya antioksidan aktiviteyi azaltarak ROT' ların ortadan kaldırılmasını engelleyebilirler. Eksojen faktörler arasında yer alan stres, vücutta katekolamin düzeyini artırır. Katekolaminlerin oksidasyonu ise ROT oluşumuna neden olur (13).

#### **1.1.1.4 Antioksidan Savunma Sistemi**

Organizmada reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu ve neden oldukları hasarı önleyen ve/veya onaran çok sayıda farklı mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalara genel olarak *antioksidanlar* adı verilir (28, 77).

Antioksidanlar çeşitli mekanizmalar ile reaktif oksijen türlerinin gerçekleştirdiği oksidasyon zincirinin farklı basamaklarında etkilerini gösterirler.

Genel olarak ROT oluşum basamağını inhibe ederek veya oluşan ROT doku hasarını önleyerek savunma yaparlar. Etki mekanizmalarına göre dört başlık altında toplanabilir (28, 77):

a) *Toplayıcı etkili antioksidanlar*; ROT ile etkileşerek veya onları daha zayıf yeni yapılara dönüştürerek etkilerini gösterirler. Antioksidan enzim ve küçük moleküller bu mekanizma ile savunma yaparlar.

b) *Bastırıcı etkili antioksidanlar*; ROT ile reaksiyona girerler ve bir H<sup>+</sup> atomunu reaktif oksijen türlerine aktarırlar. Hidrojenlenen reaktif oksijen türlerinin aktivitesi azalır veya tamamen kaybolarak inaktif hale dönüşür.

c) *Zincir kırıcı antioksidanlar*: Bu grup bileşikler reaktif oksijen türlerine bağlandıktan sonra, reaktif zincir yapısını kırarlar. Modifikasyona uğrayan ROT fonksiyonunu kaybeder.

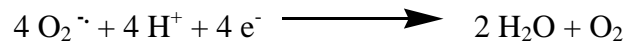
d) *Onarıcı etkiye sahip antioksidanlar*: ROT tarafından meydana getirilen hasarı ortadan kaldıran antioksidanlardır.

Antioksidanlar kaynağına göre endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki ana grup altında toplanır (13, 28, 77).

#### **1.1.1.4.1 Endojen Antioksidanlar**

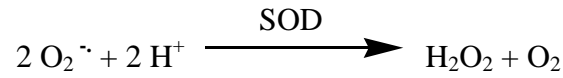
##### **1.1.1.4.1.1 Enzim Yapısındaki Endojen Antioksidanlar**

a. **Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi**: Solumun zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz aşağıdaki reaksiyonla süperoksit radikalini detoksifiye eder (13, 77).



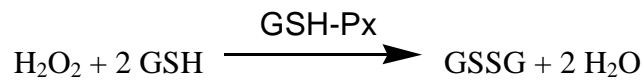
Bu reaksiyon devamlı olarak tekrarlanır. Böylece yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol enerji üretimi sağlanır. Ancak süperoksit üretimi çoğu zaman bu enzimin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidanlar devreye girer.

**b. Süperoksit Dismutaz:** Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eden enzimdir (13, 18).

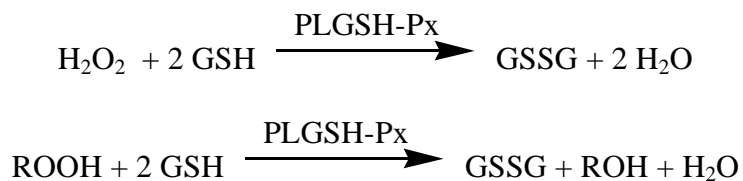


Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri  $\text{O}_2^{\cdot -}$ 'nin zarar verici etkilerine karşı korumaktır. SOD aktivitesi, yüksek oksijen tüketimi olan dokularda, özellikle eritrositlerde fazladır. Normal metabolizma sırasında süperoksit üretimi fazla olmasına rağmen SOD sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyi düşük tutulur.

**c. Glutasyon Peroksidaz:** Glutasyon peroksidaz (*GSH-Px*, EC 1.11.1.9) hidrojen peroksitin indirgenmesinden sorumlu enzimdir (13, 77).



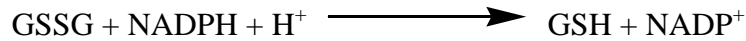
GSH-Px; tetramerik, dört selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir. Bir GSH- Px türevi olan fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz enzimi (PLGSH-Px) membranlarda oluşan fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger.





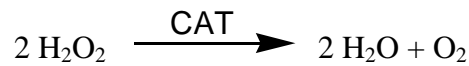
Membrana bağılı en önemli antioksidan olan vitamin E yetmezliğinde PLGSH-Px membranı peroksidasyona karşı korur.

Hidroperoksitlerin redükte olmasıyla meydana gelen GSSG, glutatyon redüktazın katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH'a dönüşür.

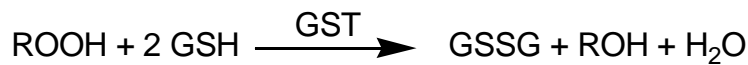


GSH-Px solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı antioksidan olarak görev yapar. GSH-Px aktivitesinde azalma hidrojen peroksitin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar.

**d. Katalaz:** Katalaz enzimi (CAT, EC 1.11.1.6) dört tane hem grubu taşıyan bir hemoproteindir. Hidrojen peroksitin oksijen ve suya parçalamasını katalize eder. Katalaz aktivitesinin neredeyse tamamına yakını eritrositlerde gerçekleşmektedir (13, 18, 77).



**e. Glutatyon-S-transferaz:** Glutatyon-S-transferaz enzimi (GST), selenyumdan bağımsız olan GSH-Px aktivitesi ile araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri başta olmak üzere lipid peroksitlerine karşı bir savunma mekanizması oluştururlar (77).



### 1.1.1.4.1.2 Non- Enzimatik Endojen Antioksidanlar

Organizmada yer alan başlıca non- enzimatik endojen antioksidan moleküller ve etki mekanizmaları Tablo 3' te verilmiştir.

Antioksidan	Savunma Mekanizmasındaki Etkinliği
<i>Melatonin</i>	Hidroksil serbest radikalini (OH <sup>·</sup> ) ortadan kaldırır.
<i>Seruloplazmin</i>	Ferro demiri (Fe <sup>2+</sup> ), ferri demire (Fe <sup>3+</sup> ) yükseltgeyerek Fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder. Cu <sup>2+</sup> bağlayıcı bileşiktir.
<i>Transferrin</i>	Dolaşımdaki serbest demiri bağlar.
<i>Haptoglobülin</i>	Hemoglobini bağlar.
<i>Ferritin</i>	Dokulardaki demiri bağlar.
<i>Bilirubin</i>	Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.
<i>Glutasyon</i>	Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur.
<i>Sistein</i>	Süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır.
<i>Metiyonin</i>	Serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur.
<i>Ürik Asit</i>	Hidroksil, süperoksit, peroksit radikalleri ve singlet oksijeni temizler.

**Tablo 3.** Non-enzimatik antioksidanlar ve etki mekanizmaları

### 1.1.1.4.2 EKSOJEN ANTIOKSİDANLAR

Eksojen antioksidanlar; A, C, E vitaminleri, antioksidan özellikteki çeşitli ilaçlar ve gıda antioksidanları olmak üzere sınıflandırılabilirler (13).

## 1.1.2 Protein Oksidasyonu

Serbest aminoasitler ve proteinlerdeki amino asit kalıntıları ROT ile oksidasyona duyarlıdır. Protein oksidasyonu, ROT tarafından amino asit kalıntılarının doğrudan oksidasyonu ile veya karbonhidrat ve lipitlerin oto-oksidasyonu sonucu meydana gelen reaktif karbonil bileşiklerinin karbonil gruplarının proteinlerin lizin kalıntısına kovalent bağlanması ile dolaylı yoldan gerçekleşir (5, 59, 69, 79).

Proteinlerin ROT tarafından oksidatif modifikasyonu; amino asit kalıntılarının yan zincirlerinin oksidasyonu, protein-protein çapraz bağlarının oluşumu ve proteinin parçalanmasıyla sonlanan protein iskeletinin oksidasyonu şeklinde meydana gelir (5).

Protein oksidasyon ürünleri olarak; protein karbonil türevleri, klorotirozin ve 3-nitrotirozin gibi aromatik yan zincir oksidasyonu ürünleri, disülfid ve metiyonin sülfoksit gibi alifatik yan zincir oksidasyonu ürünleri, ditirozin ve ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) gibi protein-protein çapraz bağlanma ürünleri sayılabilir (5).

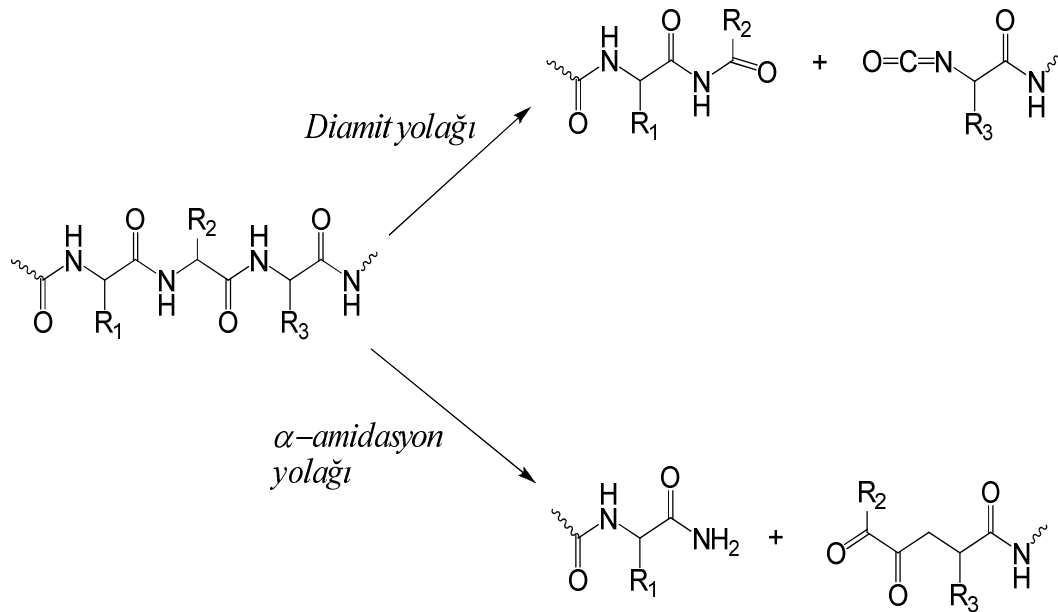
Oksidatif modifikasyona uğramış proteinlerde agregasyon, fragmentasyon, enzim aktivitesinde azalma veya kaybolma, proteolize yatkınlıkta artma veya azalma, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonunda değişiklik ve immünojenik aktivitede artış olması gibi yapısal veya fonksiyonel değişiklikler meydana gelir (43).

### 1.1.2.1 Protein İskeletinin Oksidasyonu ve Proteinin Parçalanması

Protein oksidasyonundan sorumlu en önemli reaktif oksijen türevi OH<sup>•</sup> radikalidir (5, 19). Suyun radyolizi veya hidrojen peroksitin metal katalizli yıkımı ile meydana gelen OH<sup>•</sup>, proteinin polipeptit iskeletindeki veya hidrofobik, alifatik yan zincirlerindeki  $\alpha$ -karbona saldırarak bir hidrojen atomunu uzaklaştırır. Bu reaksiyon ile yapı, *karbon merkezli radikal* halini alır. Oluşan karbon merkezli radikal,

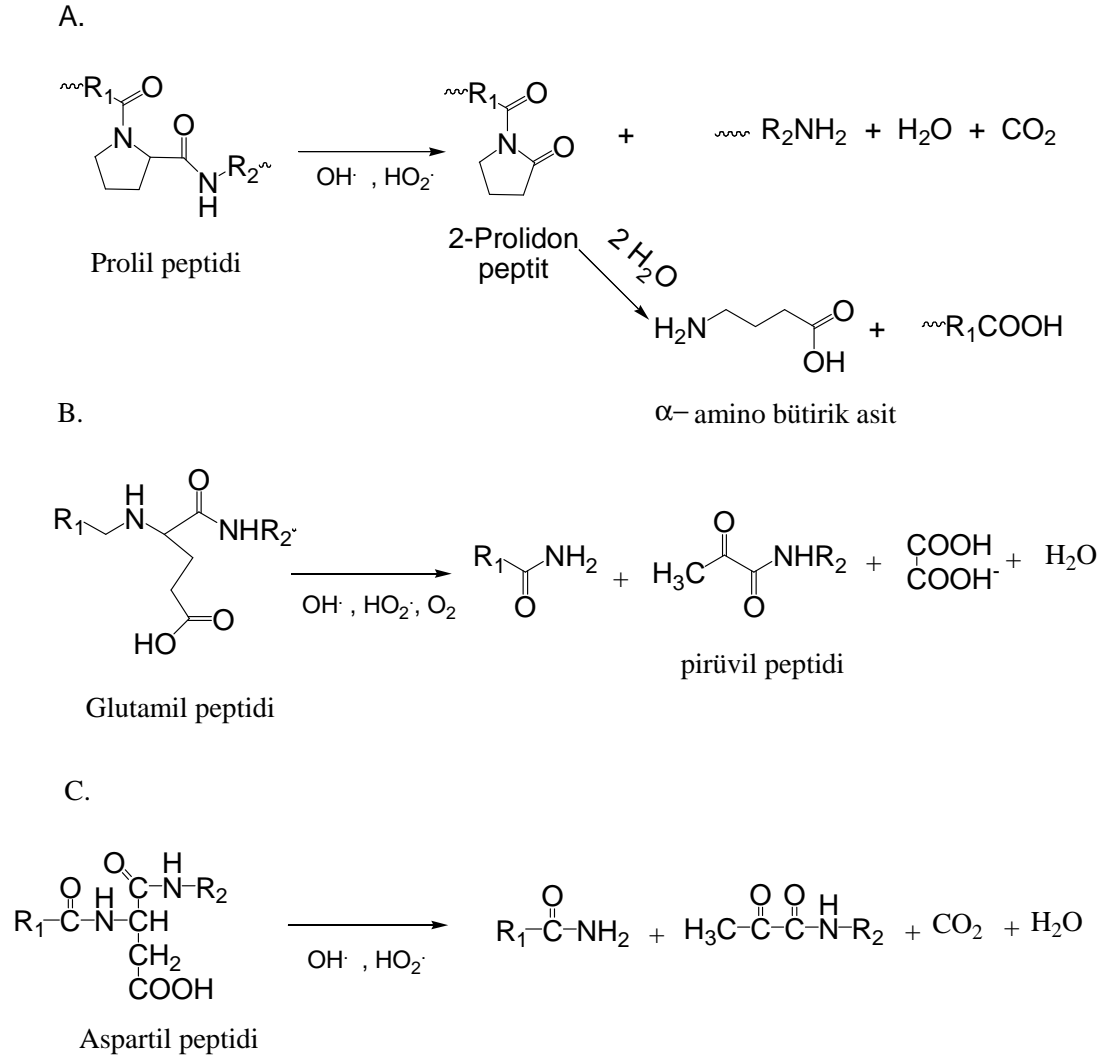
moleküler oksijen ile reaksiyona girerek daha sonra *alkil peroksidi* oluşturacak olan *alkil peroksil radikal ara ürününü* oluşturur. *Alkilperoksil, alkoksil radikal* üzerinden *hidroksi protein* yapısına dönüşür. Reaksiyon basamaklarının birçoğunda,  $Fe^{+2}$  veya  $Cu^{+}$  gibi geçiş metallerinin varlığı gereklidir. Bu metabolik yolda oluşan *alkil, alkilperoksil ve alkoksil radikal* türleri, aynı veya farklı proteinlerdeki amino asit kalıntılarının yan zincirleri (R grupları) ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikalleri meydana getirirler. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller, ortamda oksijen molekülünün bulunmadığı zamanlarda, kendi aralarında reaksiyona girerek çapraz bağlı protein yapılarını oluştururlar (5, 42, 73).

Alkoksil radikalinin oluşumu peptid bağının ya diamit veya  $\alpha$ -amidasyon yolları üzerinden parçalanmasına neden olur. Diamit metabolik yoluyla parçalanmada diamit ve izosiyanat yapısı,  $\alpha$ -amidasyon metabolik yolunda ise amit ve N- $\alpha$ -ketoaçil yapıları meydana gelir (5, 79).



**Şekil 2.** Diamidasyon ve  $\alpha$ -amidasyon yolları ile polipeptit iskeletinde meydana gelen parçalanma reaksiyonları (5, 79)

Bundan başka, polipeptid zincirinin ROT aracılı parçalanması; glutamil, aspartil ve prolil yan zincirlerinin oksidasyonu sonucunda da gerçekleşebilir (5, 79).



**Şekil 3.** Proteinlerin polipeptid omurgasının parçalanma reaksiyonları (5, 79)

A) Prolil a.a. kalıntısının oksidasyonuyla; B) Glutamil a.a. kalıntısının oksidasyonuyla; C) Aspartil a.a. kalıntısının oksidasyonu ile proteinin polipeptid iskeletinin parçalanma reaksiyonları.



### **1.1.2.2 Amino Asit Yan Zincirlerinin Oksidasyonu**

#### **1.1.2.2.1 Tiyol grubu içeren amino asit kalıntılarının oksidasyonu:**

Sistein ve metiyonin gibi tiyol grubu (-SH) içeren amino asitler ROT'ların hemen hepsi tarafından oksidasyona hassas gruplardır. Ilımlı koşullarda bile, sistein kalıntıları disüfitlere, metiyonin kalıntıları metiyonin sülfoksite dönüşebilir. Ancak biyolojik sistemlerin çoğu sisteini ve metiyonini okside formdan, tekrar unmodifiye forma dönüştüren *disüfit redüktaz* ve *metiyonin sülfoksit redüktaz* enzimlerine sahiptir. Bu durum proteinlerin oksidatif modifikasyonunda yer alan tek onarım olarak bilinmektedir (5).

Tiyol gruplarının disüfitlere ve diğer okside ürünlere (örneğin; oksiasitlere) dönüşümü proteinlerin radikal- aracılı oksidasyonunda en erken gözlenebilecek olaylardan biridir (19).

Plazmanın başlıca antioksidanlarından olan tiyol grupları; glutatyonun yanı sıra, başta albumin olmak üzere, plazma proteinlerinde bulunan sistein ve metiyonin kalıntılarında kaynaklanır. Organizmada ROT artışına bağlı olarak, tiyol gruplarının oksidasyonu da artar, plazma tiyol düzeyi ise azalır. Plazma tiyol düzeyi tayini proteinlerin ROT aracılı oksidasyondan ne derece etkilendiğini gösteren önemli bir belirteçtir (37).

#### **1.1.2.2.2 Aromatik amino asit kalıntılarının oksidasyonu**

Aromatik amino asit kalıntıları da ROT tarafından oksidasyona açık önemli hedeflerdendir. Örneğin; triptofan kalıntıları formilkinürenin ve kinürenine ve çeşitli hidroksi- türevlerine, fenil alanin ve tirozin ise çeşitli hidroksi türevlerine, histidin kalıntıları, 2-oksohistidin, asparagin ve aspartik asit kalıntılarında dönüşür.

Amino Asitler	Oksidasyon Ürünleri
Sistein	Sistein disülfidleri, sülfenik asit
Metionin	Metiyonin sülfoksit, metiyonin sülfon
Triptofan	2-, 4-, 5-, 6- ve 7-Hidroksi nitrotriptofan, kinürenin, 3-hidroksikinürenin
Fenilalanil	2,3-Dihidroksifenilalanil, 2-, 3- ve 4-hidroksifenilalanil
Tirozin	3,4-Dihidroksifenilalanil, tirozin-tirozin çapraz bağları, Tyr-O-Tyr, çapraz bağlı nitrotirozin
Histidin	2-Oksohistidin, asparagin, aspartik asit
Arginin	Glutamik semialdehit, 5-hidroksi-2-amino valerik asit
Lizin	$\alpha$ - Aminoadipik semialdehit
Prolin	2-Pirolidon, 4- ve 5-hidroksiprolin, proglutamik asit, glutamik semialdehit
Treonin	2-Amino-3-ketobütirik asit
Glutamil	Okzalik asit, pürivik asit
Lösin	3-,4-,5-Hidroksilösin, $\alpha$ -ketoizokaproik asit, izovalerik asit ve aldehit

**Tablo 4.** Amino asitlerin ROT aracılı oksidasyonu ve oksidasyon ürünleri (5, 79)

### 1.1.2.3 Reaktif Azot Türleri Tarafından Protein Oksidatif Modifikasyonu

Nitrit oksit (NO<sup>•</sup>), argininden nitrik oksit sentetaz tarafından oluşturulur ve çeşitli fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynar. NO<sup>•</sup> aynı zamanda süperoksit radikali ile reaksiyona girerek *peroksinitrit* (ONOO<sup>-</sup>) oluşturur. Peroksinitrit de fizyolojik koşullarda CO<sub>2</sub> ile reaksiyona girerek *nitrozoperoksokarboksilat* (ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşturur (27). Proteinlerdeki tirozin ve triptofan gibi aromatik amino asitler, sistein ve metiyonin kalıntıları reaktif azot türleri tarafından modifikasyona çok duyarlıdır. Özellikle tirozinin nitrolanması, hücrel düzenleme ve sinyal ileti mekanizmalarında görev yapan anahtar enzimlerin

tirozin kalıntılarının hidroksil gruplarının fosforilasyon/ defosforilasyon ve adenililasyon/ deadenililasyon dönüşümlerini engelleyerek hücrel düzenleme ve sinyal ileti mekanizmalarını etkiler (5, 79).

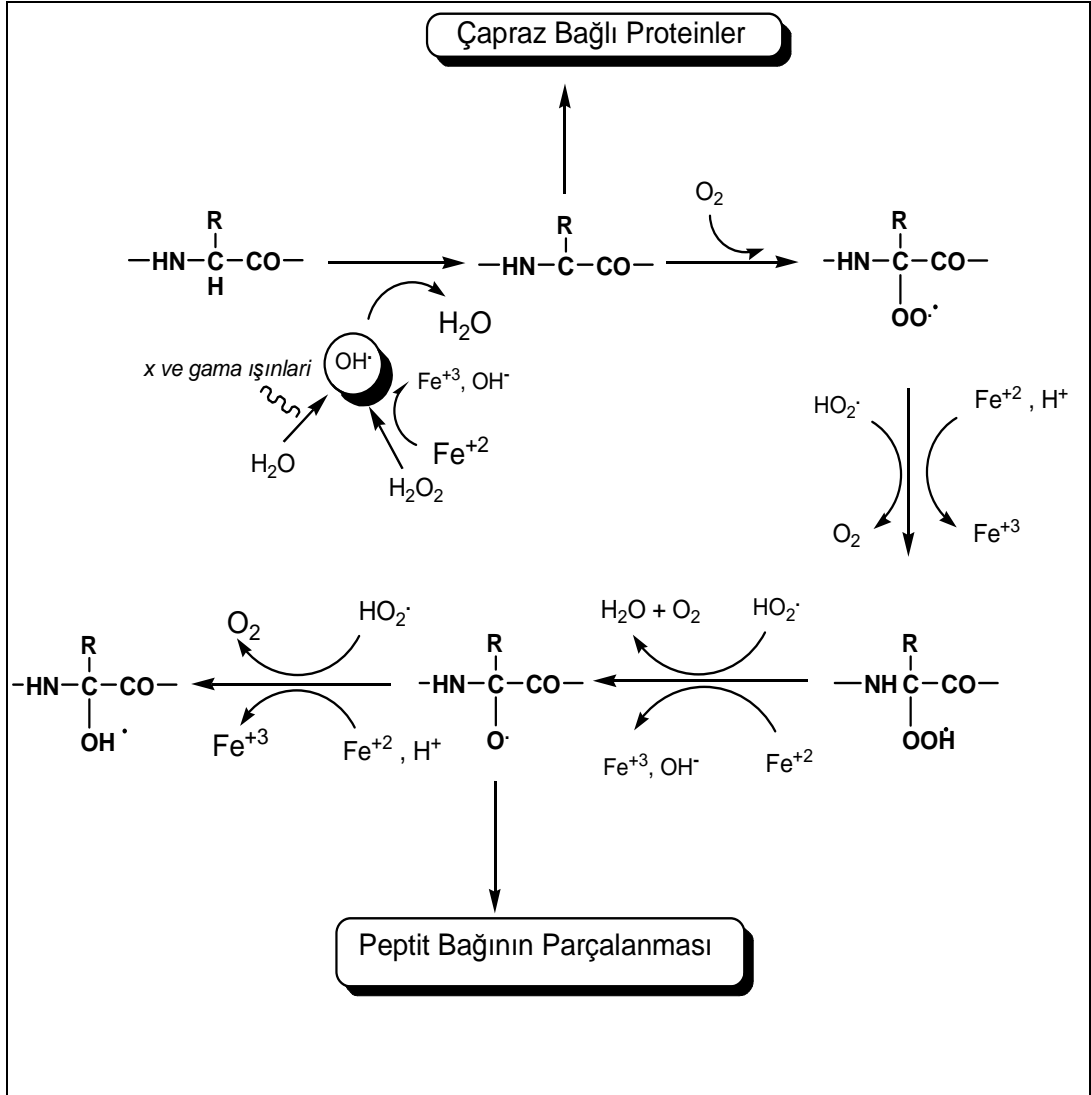
#### **1.1.2.4 Protein Oksidasyon Ürünleri**

##### **1.1.2.4.1 Protein Karbonil Türevlerinin Oluşumu**

Proteinlerin oksidatif parçalanması yukarıda da belirtildiği gibi ya  $\alpha$ -amidasyon yoluyla ya da glutamil yan zincirinin oksidasyonu yoluyla gerçekleşmektedir. Ayrıca lizin, arginin, prolin ve treonin rezidülerinin doğrudan oksidasyonu da karbonil türevlerinin oluşmasına yol açmaktadır. Bunlara ek olarak; proteinlerde karbonil grupları, proteinlerin lizin kalıntıları ile indirgen şekerlerin veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin reaksiyonu sonucunda oluşan reaktif karbonil türevleri (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksi-ozonlar gibi) ile ve lipit peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitler ile (4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit) reaksiyonlar sonunda oluşur (5, 32, 58, 59, 63, 69, 79).

Glukoz veya diğer indirgen şeker molekülleri ile protein aminoasit kalıntıları arasında gerçekleşen Maillard reaksiyonu neticesinde protein karbonil türevi olan *ileri glikasyon son ürünleri* (AGE) meydana gelir. Maillard reaksiyonu oksidatif veya non-oksidatif olarak gerçekleşen non-enzimatik bir dizi reaksiyondan oluşur (5, 32, 58, 59, 63, 79, 84).

Diğer taraftan polidoymamış yağ asitlerinin, ROT aracılı peroksidasyonu sonucunda da *reaktif karbonil türevleri* oluşmaktadır. Meydana gelen bu reaktif karbonil türevlerinin karbonil grupları ile proteinlerin amino grupları arasında gelişen reaksiyon sonucunda *ileri lipit peroksidasyon son ürünleri* (ALE) olarak isimlendirilen protein karbonil türevleri sentez edilir (5, 32, 58, 59, 63, 69, 79, 84).



**Şekil 4.** Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları (79)

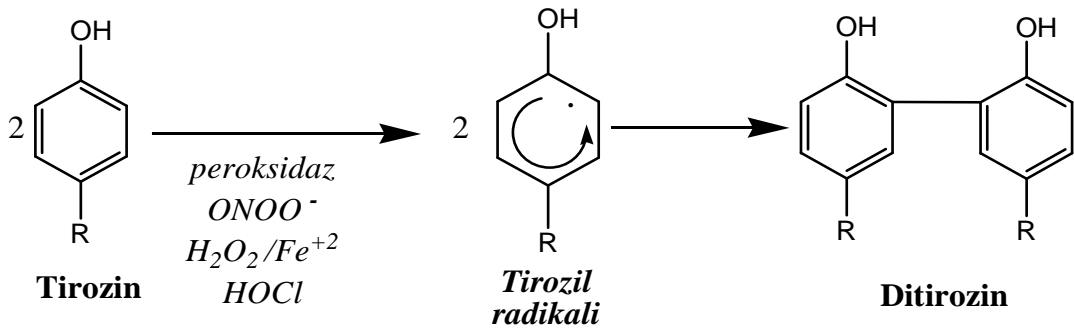
Protein karbonil türevlerinin doku ve plazmada birikmesi 'karbonil stres' olarak isimlendirilmiştir (59).

Protein karbonil türevleri; ROT aracılı oksidatif hasarın erken aşamalarında fazla miktarda oluşmaları, birikim göstermesi ve dolaşımda uzun süre kalması nedeniyle, genel oksidatif hasarın değerlendirilmesi için kabul görmüş bir protein oksidasyonu ve ROT aracılı oksidatif hücre hasarı belirtecidir (5, 15, 16, 21, 79).

### 1.1.2.4.2 İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP)

İleri oksidasyon protein ürünleri (AOPP) protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı olan belirteçlerden biridir. AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır.

AOPP ilk olarak 1996 yılında, Witko-Sarsat ve ark. (85) tarafından, üremili hasta plazmalarında tanımlanmıştır. Bu ürünlerin yüksek molekül ağırlığında olduğu ve daha çok disülfid köprüleri ve/veya ditorizin çapraz bağları oluşturmuş albumin agregatları ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. (85).



Şekil 5. Ditirozin oluşum yolağı (79)

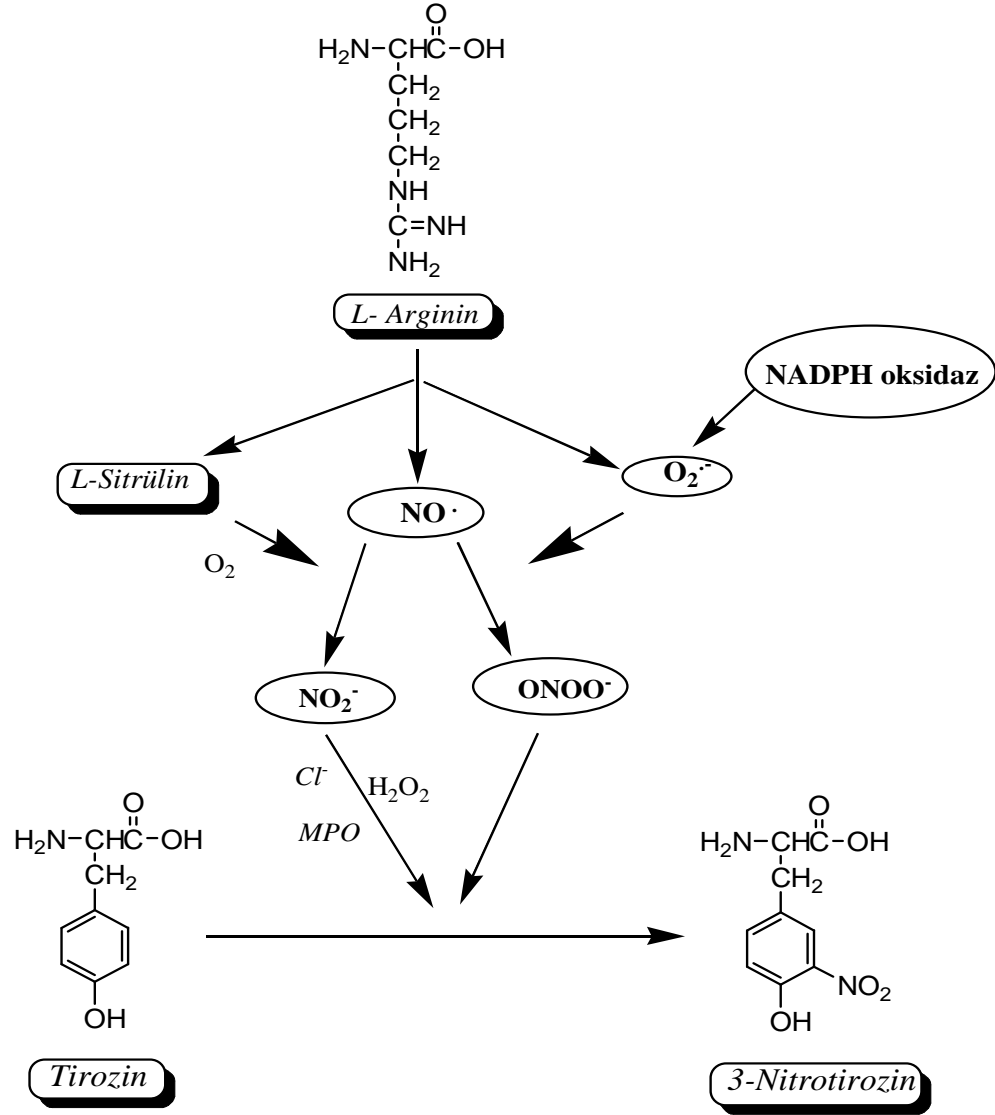
Aktive olmuş fagositler, reaktif oksidanların majör kaynaklarıdır ve konağın savunmasında temel bir rol oynarlar. Bu hücreler, oldukça fazla miktarlarda miyeloperoksidaz (MPO) enzimi içerirler. MPO;  $H_2O_2$  ve  $Cl^-$  iyonunun  $HOCl$  oluşturmak üzere reaksiyonunu kataliz eden *hem* grubu taşıyan bir enzimdir.  $HOCl$  çok kuvvetli bir oksidandır. *In vitro* koşullarda, serum veya saflaştırılmış insan serum albuminin (HSA)  $HOCl$  ile reaksiyonuyla ortamdaki AOPP düzeyinin,  $HOCl$  dozuna bağlı olarak, yükseldiği gösterilmiştir. Bu sonuç doğrultusunda, *in vivo* koşullarda

AOPP üretiminin aktif nötrofillerce salınan MPO aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (10, 86).

Serum AOPP düzeyi, protein oksidasyonu ürünlerinden olan AGE- pentozidin (ileri glikasyon son ürünleri-pentozidin) ve ditirozinin plazma konsantrasyonları ile pozitif korelasyon gösterirken; lipit peroksidasyonu belirteci olan tiyobarbitürik asit reaktif maddesi ile bir korelasyon göstermemiştir (85). Bu durum AOPP'nin protein oksidasyon düzeyinin belirlenmesinde güvenilir ve duyarlı bir belirteç olduğunu düşündürmektedir (21, 85, 86).

#### ***1.1.2.4.3 Nitrotirozin Oluşumu***

Nitrotirozin, daha önce de belirtildiği gibi; serbest veya proteine bağlı tirozin amino asit kalıntılarının, nitrik oksit radikalinin ( $\text{NO}^\bullet$ ),  $\text{O}_2$  ve  $\text{O}_2^-$  ile reaksiyonu sonucu oluşturduğu reaktif azot türleri ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{ONOO}^-$ ) ile oksidatif modifikasyonu sonucunda sentezlenir (5, 27, 38, 66, 79).

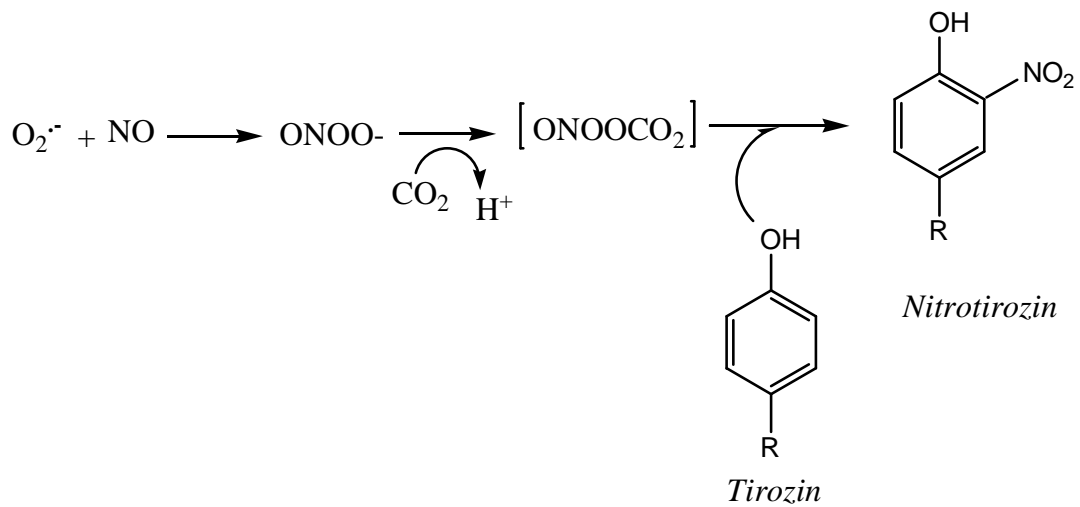


**Şekil 6.** Tirozinin oksidasyon yolları (74)

Diatomik serbest radikal olan nitrik oksit radikali, argininin, sitrülline dönüşümü sırasında, nitrik oksit sentetaz (NOS, EC 1.14.13.39) ve moleküler oksijen tarafından oluşturulur. Hem fizyolojik, hem de patolojik olarak önemi olan nitrik oksit'in, organizmada vasküler tonusun düzenlenmesi, böbrek fonksiyonlarının kontrolü ve sinirsel iletim gibi fizyolojik olaylarda görev aldığı belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda fizyolojik etkilerini gerçekleştirirken, yüksek konsantrasyonlarda patolojik özellikleri ortaya çıkmaktadır (74).

Nitrik oksit sentetaz enziminin nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç izoformu vardır (85). Nöronal NOS (tip I, nNOS), beyin ve periferel sinir hücrelerinde sentez edilirken; eNOS (tip3) endotelial hücrelerde sentezlenir. Tip I ve Tip III NOS izoformlarının her ikisi de  $Ca^{+2}$ /kalmodulin'e bağımlı mekanizma ile çalışır. İndüklenebilir NOS enziminin (tip 2) ise düz kas hücrelerinde, makrofajlarda ve fibroblastlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bu enzim, diğer iki izoformundan farklı olarak,  $Ca^{+2}$ 'dan bağımsız mekanizma ile çalışmaktadır (25). Nitrik oksit'in oksidatif hasar oluşturuucu etkisinden iNOS izoformununun sorumlu olduğu gösterilmiştir (9, 33, 74).

Nitrik oksit radikalının ( $NO\cdot$ ) süper oksit radikali ( $O_2\cdot^-$ ) ile reaksiyonu sonucunda, yarılanma süresi bir saniyeden kısa ve en reaktif  $NO\cdot$  türevi olan, peroksinitrit anyonu ( $ONOO^-$ ) meydana gelir. Bu dönüşüm ile  $NO\cdot$  fizyolojik etkilerini kaybeder ve oksidatif etki göstermeye başlar. Peroksinitrit anyonu sitotoksik olup, protein hasarının hem başlamasını hem de ilerlemesine neden olur (9, 33, 74).



**Şekil 7.** Nitrotyrosin oluşum yolağı (38, 43)



Peroksinitrit anyonu, özellikle karbondioksit veya bikarbonat molekülleri varlığında, kuvvetli oksidasyon ve nitrolama reaksiyonları gerçekleştirme gücüne sahiptir. Serbest veya proteine bağlı tirozin kalıntıları da dahil tüm fenolik bileşikler,  $ONOO^-$  anyonu tarafından kolayca oksitlenebilen, hedef moleküllerdir (23, 25). Proteinlerin, peroksinitrit ile reaksiyonunda oluşan ana ürün orto konumundan nitrolanmış 3-nitrotirozindir (NT) (33, 38, 66, 74).

Nitrik oksit radikalinin nitrolama veya oksidasyon gücü sadece peroksinitrit anyonu ile sınırlı değildir ayrıca  $NO^-$ 'in biyolojik metabolizmasında major ürün olarak oluşan nitrit anyonu ( $NO_2^-$ ) da iki farklı mekanizma ile tirozin amino asidi üzerinde nitrolama ve oksidasyon gerçekleştirebilir:

1)  $NO_2^-$  anyonu, hipoklorik asit (HOCl) ile reaksiyona girerek 'nitril klorür' ( $ClNO_2$ ) oluşturur ve  $ClNO_2$  doğrudan tirozin yapısına" nitro" grubunu aktararak 3-nitrotirozin oluşturur,

2)  $NO_2^-$  anyonu, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) varlığında, MPO enzimi tarafından nitrit radikaline ( $NO_2^{\cdot}$ ) dönüştürülür ve nükleofilik atak ile 3-nitrotirozin meydana getirir (38, 66).

Peroksinitrit anyonunun ve  $NO^-$ 'nin yarı ömürleri çok kısadır ve hızla dekompeze olarak kararlı yapıda son ürünler meydana getirirler. Bu nedenle, analitik tayin için kararlı bir yapıya sahip, uzun ömürlü ve büyük moleküler yapıya sahip olan 3-nitrotirozin son ürünün, *nitro-oksidatif stres* belirteci olarak kullanılması benimsenmiştir. Bu konuda yapılan çalışmalarda, serum 3-nitrotirozin düzeyinin  $NO^-$  radikali miktarı ile paralel artış gösterdiği saptanmıştır (33). 3-NT miktarının kanda ya da dokularda yükselmiş olması '*nitro-oksidatif stress*' olarak adlandırılır (74). Nitro-oksidatif stres aralarında kardiyovasküler hastalıklar (miyokard infarktüsü, ateroskleroz, kalp yetmezliği gibi), immunolojik hastalıklar (astım, sistemik skleroz, renal transplantasyon komplikasyonları, romatoit artirit, septik şok gibi) ve nörolojik

hastalıkların (PD, AD, ALS, MS, menenjit, demans gibi) da bulunduğu yaklaşık kırk hastalıkla ilişkilendirilmiştir (15, 20, 64, 74, 88).

Proteinlerdeki tirozin kalıntılarının 3-NT türevi haline gelmesi, proteinde alternatif konformasyonlara, çözünürlük değişikliklerine, agregasyonlara veya protein degradasyonlarına yol açar (74, 79).

Proteinlerin nitrolanması, hücre proliferasyonu ve farklılaşması için çok önemli olan protein tirozin kinazlar tarafından gerçekleştirilen, proteinlerin fosforilasyonu gibi anahtar hücresel prosesleri de olumsuz olarak etkiler (33).

### 1.1.3 Kronik Böbrek Yetmezliği

Kronik böbrek yetmezliği, çeşitli nedenlerle nefronların ilerleyici ve geri dönüşümsüz olarak hasara uğrayarak böbrek fonksiyonlarının kaybedilmesine neden olan bir sendromdur (41, 80). KBY; uzun süreli bir periyodun sonucunda meydana gelir. Sadece bir böbrekte meydana gelen hasar böbrek yetmezliği olarak değerlendirilmez; sağlam olan diğer böbrek fizyolojik fonksiyonlar için yeterli olmaktadır (80).

Böbreklerin fonksiyonel kapasitelerinin belirlenmesi için spesifik kriter glomerüler filtrasyon hızıdır (GFR). GFR, her iki böbrekte bir dakikada oluşan filtrat, yani süzülen kan miktarıdır. Normal koşullar altında sağlıklı böbreğin GFR değeri 125 ml/ dk/ 1.73 m<sup>2</sup>'dir. KBY'de, GFR yıllar içinde giderek azalmaktadır.

Böbrek yetmezliği tanısı için yaygın olarak kullanılan bir başka parametre ise kan *kreatinin* düzeyi artışıdır. Kreatin fosfatın yıkım ürünü olan kreatinin'in normal kan değerleri 70- 120 µmol/L olup, bu değer 120 µmol/L'yi geçmesi böbrek fonksiyonlarında yetersizlik olduğunu gösterir. Bunlardan başka; olgularda üç aydan uzun süren azotemi ve GFR'nin 60 ml/ dk/ m<sup>2</sup>'nin altında olması, uzun süreli üremik belirti ve bulgular, renal osteodistrofi belirtileri ve radyolojik incelemelerde bilateral küçük böbreklerin tespiti KBY göstergesi olarak kabul edilmektedir (41).

### 1.1.3.1 Kronik Böbrek Yetmezliği Etiyolojisi

KBY nedeni olan böbrek hasarı oluşumunda çok sayıda hastalık rol oynamaktadır. Bunlar arasında; diyabetik nefropati, kronik piyelonefrit, obstrüktif üropati, reflüks nefropati, kronik glomerülonefrit ve polikistik böbrek hastalıkları en sık karşılaşılanlardır. Kronik böbrek yetmezliğinin diğer nedenleri ise; primer glomerüler hastalıklar, tübüler- intertisyal hastalıklar, renal vasküler hastalıklar, kronik üriner sistem tıkanıklığı, kollojen doku hastalıkları, bazı metabolik hastalıklar'dır (80).

### 1.1.3.2 Kronik Böbrek Yetmezliği Patogenezi

Klinik açıdan KBY, asemptomatik olarak seyreden, böbrek fonksiyonu azalmasından üremik sendroma kadar uzanan değişken bir spektruma sahiptir. Böbrek yetmezliği evreleri birbiri içine girmiş olup kesin sınırları yoktur. Ancak böbreklerin fonksiyonel değişiklik derecelerine göre sınıflandırma klinik açıdan yararlı bulunmaktadır.

Evre	Tanım	GFR (ml/ dak/ 1.73m <sup>2</sup> )
1	Normal veya artmış GFR Böbrek hasarı	≥ 90
2	Hafif GFR azalması Böbrek hasarı	60- 80
3	Orta derecede GFR azalması	30- 59
4	Ağır derecede GFR azalması	15- 29
5	Böbrek yetmezliği (SDBY)	< 15

**Tablo 5.** Kronik böbrek yetmezliği evreleri (50)

KBY' nin *erken evresinde* sadece böbreğin fonksiyonel rezervinde azalma vardır. Böbreğin sekresyon, biyosentetik ve düzenleyici fonksiyonlarında bir sorun olmadığı için klinik belirti veya bulgusu olmamaktadır.

*Orta evrede*, böbrek yetmezliğinin meydana gelmesinden dolayı azotemi oluşur ve anemi gibi klinik bulgular gözlenebilir de hastalar genelde asemptomatiktir. Ancak enfeksiyon, hipovolemi, üriner sistemde oluşacak bir tıkanıklık veya nefrotoksik ilaç kullanımı gibi akut stres oluşturan faktörlerin varlığı hastayı hızla üremik tabloya yönlendirebilir. Geri dönüşü mümkün olan etkenlerin ortadan kaldırılmasıyla genellikle hasta stabil olduğu böbrek yetmezliği durumuna geri döner.

*İleri evreye* ulaşmış böbrek yetmezliğinde GFR değeri 20- 25 ml/ dk/ 1.73m<sup>2</sup>' nin altına düşmüştür. Böbreğin sekresyon, biyosentez ve düzenleyici fonksiyonlarının büyük ölçüde bozulmuş olması sürekli halsizlik, noktüri, kemik ağrıları gibi üreminin neden olduğu klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olur. Yetmezliğin en ileri safhası olan *son dönem böbrek yetmezliğinde* (SDBY) böbreklerde hasar ilerlemiş ve bunun sonucunda fonksiyonlarını tamamen kaybetmişlerdir.

SDBY' de giderek artan azotemi ve hemen hemen her organ sistemi ile ilgili klinik belirti ve bulgular ortaya çıkar. Terminal dönemde ortaya çıkan bu klinik sendrom, *üremi* olarak tanımlanır.

Böbrek hasarına neden olan primer etken ortadan kaldırılrsa bile böbrek hasarı ilerlemeye devam eder. Böbrek hasarının ilerlemesine neden olan başlıca nedenler arasında hiperfiltrasyon hemodinamiği, sürekli proteinüri, sistemik hipertansiyon, hiperfosfatemi ve hiperlipidemi sayılabilir (41, 80).

### 1.1.3.3 Kronik Böbrek Yetmezliği Tedavisi

SDBY evresine gelmiş olan KBY hastalarında, hastalığın erken evrelerinde uygulanan konservatif tedaviler hasta için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle SDBY hastalarında *renal replasman tedavilerinin* (RRT) uygulanması gereklidir. Renal replasman tedavileri; hemodiyaliz, periton diyalizi ve böbrek transplantasyonudur. SDBY hastaları, hastalığın farklı evrelerinde her üç RRT'den yararlanmak durumunda kalabilir (41, 80).

#### 1.1.3.3.1 Diyaliz tedavisi

Diyaliz; bir A solüsyonunun solüt (suda çözülmüş madde) içeriğinin, bu solüsyonu yarı geçirgen bir membran aracılığıyla bir B solüsyonu ile karşılaştırarak değiştiren mekanizmadır. Her iki solüsyonda da bulunun su molekülleri ile düşük molekül ağırlıklı solütler, yarı geçirgen membranın porlarından geçebilirken, büyük solütler (proteinler gibi) membrandan geçemedikleri için membranın her iki tarafındaki başlangıç konsantrasyonlarında kalırlar.

Diyaliz tedavisinde A solüsyonu yüksek konsantrasyonda zararlı artık maddeler taşımak olan kan; B solüsyonu ise diyalizattan (spesifik diyaliz sıvısı) oluşur.

Diyalizde sıvı ve solüt taşınması, '*difüzyon*' ve '*ultrafiltrasyon*' olmak üzere iki temel prensibe dayanır.

***Difüzyon:*** Diyaliz ile zararlı atık ürünlerin vücuttan uzaklaştırılmasını sağlayan en önemli mekanizma difüzyondur. Difüzyon yarı geçirgen bir zar (membran) ile ayrılmış iki solüsyon arasındaki konsantrasyon farkına bağlı olarak gerçekleşen solüt değişimidir.

***Ultrafiltrasyon:*** Su ve suda çözülmüş halde bulunan maddelerin, yarı geçirgen bir zardan, hidrostatik veya ozmotik bir kuvvetle itilmesi sonucu meydana gelen

suyun kitlesel hareketine ultrafiltrasyon denir. Hastalardaki sıvı fazlalığı bu prensibe dayalı olarak vücuttan uzaklaştırılır (8, 80).

Diyaliz tedavisi ile; uygun sıvı ve solüt değişiminin sağlanmasıyla hastanın genel durumunun düzeltilmesi, su- elektrolit dengesinin sağlanması, vücutta biriken toksinlerin atılımı, hastanın yaşam kalitesinin yükseltilmesi ve transplantasyona hazırlanması amaçlanır. Diyaliz tedavisi sonucu, bir böbreğin normal fonksiyon kapasitesinin ancak % 5'i kadarı ( iki böbrek için toplam % 10) karşılanabilir (80).

### *1) Periton Diyalizi*

SDBY hastalarında böbrek fonksiyonunun kesintisiz olarak, doğal bir membran aracılığıyla, herhangi bir kuvvete veya alete ihtiyaç duymadan, yerine koyma düşüncesiyle periton diyalizi geliştirilmiştir. Toksik maddeleri filtre eden yarı geçirgen zar olarak karın boşluğunu saran zar (periton zarı) kullanılmaktadır. Periton boşluğundaki solüt ve su absorpsiyonu, periton zarındaki kapiller dolaşım ve lenfatik akım yardımıyla gerçekleşmektedir. Periton diyalizinde vücut sıcaklığına getirilmiş, yaklaşık iki litre dekstroz içeren bir tuz solüsyonu (diyalizat), periton boşluğuna yerleştirilmiş olan kateter vasıtasıyla 10 dakika gibi kısa bir sürede periton boşluğuna verilir. Periton diyaliz tipine göre değişen sürelerde sıvı karın boşluğunda bekletilir. Bekleme periyodu esnasında, artık maddeler difüzyon ile, su fazlalığı ise hidrostatik ultrafiltrasyon yoluyla diyalizata geçer. Bekleme sürecinden yaklaşık 20 dakika sonra diyalizat boşaltılıp, yerine yeni bir diyalizat periton boşluğuna verilir. Bu işlem genel olarak günde 4 kez, haftanın 7 günü uygulanır (8, 80).

Periton diyalizi hastaları için altı farklı diyaliz yöntemi vardır. Bunlar; sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD), aletli periton diyalizi, aralıklı periton diyalizi, sürekli siklik periton diyalizi, gece periton diyalizi ve tidal periton diyalizidir. Genellikle hastanın sosyal şartlarına uygun ve periton diyalizin gerek solüt klirensi

gerekse ultrafiltrasyon transferi en yükseğe çıkaracak olan bir periton diyaliz yöntemi seçilir (8, 80) .

## 2) *Hemodiyaliz*

Hemodiyaliz (HD), bir pompa aracılığıyla vücut dışına alınan kanın, HD makinesinde yarı geçirgen bir membrandan geçirilerek, sıvı solüt içeriğinin düzenlenip hastaya geri verilmesi işlemidir. İlk olarak 1964 yılında Williem Koff tarafından akut böbrek yetmezliği tedavisinde uygulanmaya başlanmıştır. Hastaya HD işleminin uygulanabilmesi için yeterli kan akımının (erişkinlerde dakikada 200-600 ml) sağlanması gereklidir. Yeterli kan akımını sağlamak için hastaya kalıcı veya geçici vasküler giriş yolu açılır.

Hemodiyaliz işleminin 3 temel bileşeni vardır:

- Diyalizör (filtre),
- Pompa yardımıyla kan- diyalizat dolaşımını sağlayan sistem,
- Solüt klirensi için belirli bir kimyasal kompozisyonda sıvı (diyalizat).

Diyalizin etkililiğini arttırmak amacıyla, kan ve diyalizat akımı ters yönlüdür. Diyalizörler; hallow fiber (içi boş kapiller) veya paralel tabakalar yapısında olabilir. Kullanılan membran ise selüloz, rejenere selüloz ve sentetik selüloz yapısında olabilir. Diyaliz membranının (diyalizör) kapiller içinde hastanın kanı, kapiller arasında ise makine tarafından hazırlanmış diyalizat yer alır. Damar giriş yolundan alınan kan, yarı sentetik membrandaki çok sayıdaki kapillere pompalanırken eş zamanlı olarak, kan akımına ters yönde, sodyum klorür, asetat veya bikarbonat ile değişken konsantrasyondaki potasyum içeren diyalizat diyalizöre verilir. Membrandaki difüzyon hareketi, üre gibi küçük molekül ağırlıklı maddelerin konsantrasyon gradiyentine bağlı olarak kan tarafını bırakıp diyalizat tarafına hareket

etmesini sağlar. Benzer şekilde genelde konsantrasyonu 35 mEq/ L olan bikarbonat kan tarafına diffüze olur. Su ve sodyum klorür fazlalığının uzaklaştırılması, membran boyunca oluşan hidrostatik basınca bağlı olarak ultrafiltrasyonla gerçekleşir. Haftada 3 defa 4 er saatlik HD uygulaması hastalar için yeterli olmaktadır (8, 80).

### **1.1.3.3.2 Transplantasyon**

Transplantasyon, SDBY hastalarında en fazla yarar sağlayan tedavi şeklidir. Doğru zamanda, doğru hastaya uygulanmış böbrek transplantasyonu, hastanın böbrek fonksiyonların yaklaşık % 50'sini yerine getirebilmesini sağlar. Transplantasyon sonrasında genelde diyaliz tedavisine ve sıvı-diyet kısıtlamasına gerek kalmaz. Ayrıca diyaliz işleminin oluşturduğu fiziksel ve psikolojik zorluklar ortadan kalktığı için yaşam kalitesi yükselir. Ancak, transplantasyon işleminin yapılabilmesi için alıcının hayatı tehdit eden eksternal komplikasyonlarının olmaması gerekmektedir (80).

## **1.2 Kronik Böbrek Yetmezliği Tedavisi Ve Oksidatif Stres**

Kronik böbrek yetmezliğinde progresif fonksiyon kaybını açıklayabilmek için ileri sürülen mekanizmalardan birisi de oksidatif strestir. Oksidatif stresin idame diyaliz tedavisi alan ve almayan KBY hastalarında yükselmiş olduğu gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (34, 47, 85).

Bazı fizyolojik mediyatörlerin doğrudan veya dolaylı olarak böbrek hasarına neden olduğu saptanmıştır. Bu mediyatörler arasında nötrofiller, trombositler, glomerüler hücreler, kompleman ve koagülasyon sistemleri, sitokinler, biyoaktif lipitler, nitrik oksit ve reaktif oksijen türleri yer almaktadır (2, 21, 25, 31, 84).

Böbreklerdeki, glomerüler hücrelerin, nötrofillerin, monosit/makrofajların ve trombositlerin normal işlevleri esnasında meydana gelen reaktif oksijen türleri, renal



hücrelerin enerji üretimi ve transport fonksiyonlarında hasara neden olurlar, ayrıca morfolojik lezyonların oluşumundan ve proteinlere karşı glomerüler geçirgenliğin artmasından sorumlu oldukları düşünülmektedir (84).

Üremik hastalarda yüksek düzeydeki oksidatif stresin ve doku hasarının başlıca kaynağı olarak *nötrofil-MPO-HOCl* ile katalizlenen oksidatif reaksiyonlar olduğu ileri sürülmektedir (11, 35, 36, 53). Bu nedenle, SDBY ve diyaliz tedavisi uygulanan KBY hastalarında yaygın bir durum olan inflamasyon ile böbrek hasarı progresyonu arasında doğrudan ilişki kurulabilmektedir (2, 21, 25, 31, 84). Diyaliz tedavisinde kullanılan membran veya kontamine diyalizat sıvıları tarafından inflamatuvar yanıtta sorumlu olan nötrofillerin aktive edilmesinin ardından, PMNL'de solunum patlaması meydana gelir (77). Burada rol oynayan NADPH oksidaz, SOD, NOS ve MPO gibi enzimler tarafından süperoksit ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), HOCl ve  $NO^\cdot$  gibi oksidatif hasara neden olan bileşikler oluşturulur (16, 31, 36, 83).

Oksidatif strese yol açarak böbrek hasarına neden olan bir diğer mekanizma ise, diyalizörlerin alternatif kompleman yolağını aktive etmesiyle gerçekleşir. Bu yolda muhtemelen IgG ve kompleman elemanlarının diyaliz membranına bağlanmasıyla, granülositler için biyoaktif yüzey oluşur ve membranla temas eden nötrofillerde aktivasyon ve degranülasyon indüklenir (2, 47, 49, 50).

Hemodiyaliz tedavisi alan hastalardaki yukarıda sayılan nedenlere ek olarak ROT miktarında artışa yol açan ek faktörler arasında;

- Uygulanan diyaliz tedavisi ile birikmiş olan üremik toksinlerin tamamının uzaklaştırılmaması,
- Ekstrakorporal dolaşıma yeniden maruz kalınması,
- Proinflamatuvar sitokinlerin sentezinin uyarılması ve uzaklaştırılmasının azalması,

- Belirli miktarda bakterilerin geri sızması ve
- Regüler diyaliz için kullanılan sıvıda artan endotoksin düzeyinden

kaynaklanan endotoksemi sayılabilir (8, 80).

HD tedavisinde üremik toksinler uzaklaştırılırken, eser elementler ve hidrofobik yapıda, proteine bağlı olmayan düşük molekül ağırlığındaki bileşikler de diyalizat sıvısına geçer ve bu durum serum düzeylerinin azalmasına yol açar. Bu eser elementlerden birisi de antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) için esansiyel olan selenyumdur. Antioksidan vitaminlerden vitamin C ve E de diyalizat sıvısına geçerek, plazmada oksidatif hasarın artışına neden olmaktadır (47, 51).

HD tedavisi ayrıca, plazma SOD, katalaz, glutatyon redüktaz (GSSG-Red) ve GSH-Px gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalmasına yol açmaktadır. Bu azalmanın, böbrekler tarafından enzimlerin sentezinde azalmaya bağlı olabileceği gibi, üremik toksinlerin enzimlerin protein yapısında değişikliğe neden olmasına da bağlı olabileceği ileri sürülmektedir. Nitekim, MPO'dan kaynaklanan hipoklorik asidin GSH-Px'i inaktive ettiği gösterilmiştir (47, 51).

KBY tedavisinde PD uygulanan hastaların klinik bulguları incelendiğinde ise; okside/ redükte albümin oranındaki artışın, oksidatif stres ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca tedavi sırasında kullanılan diyalizatın yüksek glukoz içeriğinin de karbonil ve oksidatif stres ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Diyalizatın, oto-oksidasyon ve/veya ısıtma ile sterilizasyon işlemi sırasında glukoz yıkım ürünlerinin arttığı ve glikasyon reaksiyonlarıyla AGE oluşumunu hızlandırdığı düşünülmüştür.

Diğer bir replasman tedavisi yöntemi olan renal transplantasyon operasyonu sonrasında SDBY hastalarındaki oksidatif stres ve inflamasyon belirteçlerinin, sağlıklı kişilerin plazma düzeylerine yakın olduğu belirlenmiştir (25). Bir başka

araştırmada ise Tx tedavisi alan hastalarda inflamasyon nedeniyle oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir (12).

### **1.3 Kronik Böbrek Yetmezliğinde Oksidatif Stres Belirteçleri**

Oksidatif stresin hastalıkların patogenezinde veya progresyonundaki rolünü anlayabilmek için, uygun belirteçlerin kullanılması gereklidir. ROT kaynaklı oksidatif hasar en fazla protein, lipit ve nükleik asit gibi biyolojik molekülleri etkilediğinden; oksidatif stresin belirlenmesinde, genellikle bu biyomoleküllerin oksidatif ürünlerine yönelik testler uygulanmaktadır (16).

Daha nceki bölümlerde belirtildiği üzere KBY sürecinde gelişmiş ve renal replasman tedavilerinin uygulanması ile yükselmiş olan oksidatif stresin başlıca kaynağının MPO tarafından oluşturulan HOCl olduğu dşnlmektedir (89). Hipoklorik asit'in primer hedefleri proteinler olup, lipit veya nükleik asitlere çok az veya hiç etki göstermezler.

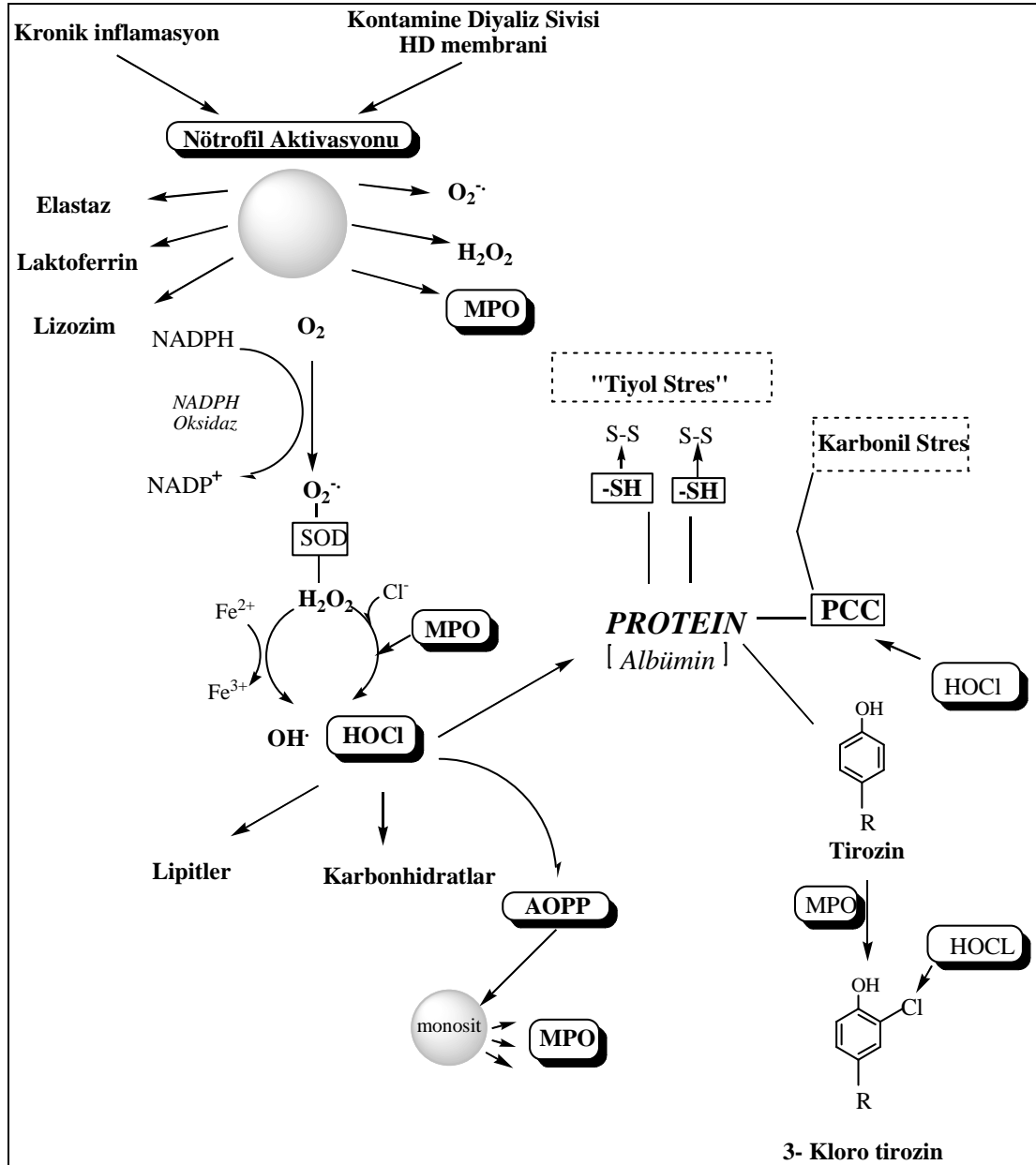
Oksidatif stresi belirlemede, lipid oksidasyonunu yansıtın malondialdehit (MDA) lmleri, geçmişte sıklıkla kullanılmış olsa da; KBY hastalarında hem lipit peroksidasyonunu hem de intra- ve ekstra-selüler antioksidan potansiyeli değerlendiren çalışmalar, uyumsuz sonuçlar vermiştir (16, 89).

Bu nedenle KBY ve renal replasman tedavileri esnasında meydana gelen oksidatif stresin değerlendirilmesi için protein oksidasyon ürünlerinin belirteç olarak kullanılması uygun bulunmaktadır (16, 89).

Ayrıca lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'nın ve nükleik asit oksidasyon ürünlerinin yarı ömürlerinin kısa olması, stabil yapıda olmamalarına karşılık, protein oksidasyon ürünlerinin stabil bir kimyasal yapıda olup, uzun süre dolaşımda kalmaları günümüzde, KBY'de oksidatif stres belirteci olarak lipit türevleri yerine

protein oksidasyon ürünlerinin kullanımının giderek yaygınlaşmasına neden olmuştur (16, 89).

Ayrıca KBY hastalarında oksidatif hasarın belirlenmesinde genel bir belirteç olan plazma antioksidan kapasite tayini de uygulanmaktadır (42,59).



Şekil 8. KBY ve replasman tedavisinde protein oksidasyon yolları (89)

## 2. BÖLÜM

### GEREÇLER VE YÖNTEMLER

#### 2.1 Kullanılan Aletler

- Badelin Sonorex model sonikasyon aleti
- Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler, Brand Transfer pipet
- Grant-Bio PHMT model ısıtmalı çalkalayıcı
- Heraus Sepatech RF model santrifüj Hewlett Packard Series 1100 model HPLC pompası
- Hewlett Packard 1049 A model elektro-kimyasal dedektör (Series 1100)
- Inolab 0321 model pH-metre
- Metiş Soğutmalı santrifüj
- Molecular Devices-Versamax BN 03252 model spektrofotometrik mikropłaka okuyucusu
- MZ-Analitik kolon, Nükleosil, 100\* 4,6 mm\* 5µm,100,C18
- Nüve BM 302 Model su banyosu
- Nüve MK 318 model manyetik karıştırıcı
- Nüvemix vorteks
- Sanyo Ultra Low -80 C derin dondurucu

- Sartorius hassas terazi
- Shimadzu UV- 1601 model spektrofotometre
- Shortcut bilgisayar yazılımı
- Termo EC250- 90 model güç kaynağı
- Uğur -20 °C derin dondurucu

## 2.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenz-tiazoline-6-sülfonik asit): ABTS, Sigma-Aldrich, (Almanya)
- 2,4-Dinitro Fenil Hidrazin: DNPH, Sigma- Aldrich , (Almanya)
- 3-Nitrotirozin: 3-NT, Sigma- Aldrich, (Almanya)
- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit: Trolox, Sigma-Aldrich , (Almanya)
- Asetonitril: Merck (Almanya)
- Bidistile su: Ebiltem'den temin edildi.
- Bakır sülfat penta hidrat:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Merck (Almanya)
- Etanol: Merck, (Almanya)
- Etil Asetat: Merck,(Almanya)
- Folin-Ciocalteu's fenol reaktifi: Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- Glasiyel Asetik Asit:  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Merck, (Almanya)
- Guanidin: Sigma- Aldrich , (Almanya)
- Hidroklorik Asit: HCl, Merck, (Almanya)
- HPLC saflığında distile su, Ebiltem'den temin edilmiştir
- Kloramin-T Hidrat: Sigma- Aldrich , (Almanya)

- Metanol: MeOH, Merck( Almanya)
- Miyeloperoksidaz kiti (Kat.no.HK324), Hycult Biotechnology (İsviçre)
- Orto fosforik asit: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Merck ( Almanya)
- Potasyum persülfat: K<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>, Sigma- Aldrich , (Almanya)
- Potasyum sodyum tartarat tetra hidrat: C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O, Merck (Almanya)
- Potasyum İyodür: Riedel-De Haen, (Almanya)
- Pronase E: AppliChem (Almanya)
- Sığır serum albumin: BSA, Sigma- Aldrich , (Almanya)
- Sodyum Karbonat: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Merck, (Almanya)
- Sodyum Hidrojen Fosfat: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Merck, (Almanya)
- Sodyum Dihidrojen Fosfat: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Merck (Almanya)
- Trikloro Asetik Asit: TCA, Sigma- Aldrich, ( Almanya)
- Vivaspin 500, Millipore diyaliz filtreleri

## 2.3 Kullanılan Çözeltiler

### 2.3.1 Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

#### 1) Stok Sığır Serum Albümin ( BSA) Standardı (1 mg/ml)

Hassas terazide 10 mg sığır BSA tartılarak distile su ile 10 ml' ye tamamlandı.

#### 2) % 1 CuSO<sub>4</sub> . 5H<sub>2</sub>O Çözeltisi

1 g CuSO<sub>4</sub> . 5H<sub>2</sub>O tartılarak distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.

#### 3) % 2 Na-K Tartarat Çözeltisi

2 g Na-K tartarat tartılarak distile su ile 100 ml' ye tamamlandı.

**4) % 2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Çözeltisi (0,1 N NaOH içerisinde)**

2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tartılarak 0.1 N NaOH çözelti ile 100 ml' ye tamamlandı.

**5) Protein Renk Reaktifi**

50 ml % 2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisine önce 0.5 ml % 2 Na-K tartarat çözeltisi, sonra 0.5 ml % 1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Çözelti deney günü taze hazırlanarak kullanıldı.

**2.3.2 Karbonil Grupları Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

**1) 20 mM Sodyum Fosfat Tamponu (pH: 6.5)**

a) 1.34 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O tartılarak distile su ile 250 ml' ye tamamlandı.

b) 0.78 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O tartılarak distile su ile 250 ml' ye tamamlandı

pH- metre kontrolünde *a* çözeltisi üzerine pH: 6.5 oluncaya kadar *b* çözeltisi ilave edilerek hazırlandı.

**2) 2,5 M HCl Çözeltisi**

51.8 ml HCl asit mezür ile ölçülerek temiz bir balonjojeye aktarıldı. Üzerine yavaş yavaş distile su ilave edilerek 250 ml' ye tamamlandı.

**3) % 20' lik TCA Çözeltisi**

Hassas terazi yardımıyla 20 mg TCA tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

**4) 10 mM DNPH Çözeltisi**

0.0198 g DNPH hassas olarak tartıldı. Bir miktar distile su ile çözüldükten sonra 10 ml'ye tamamlandı.

**5) 6 M Guanidin Çözeltisi**



9.8295 g Guanidin hassas terazide tartıldı. Bir miktar distile suda çözülerek 25 ml'ye tamamlandı.

### **2.3.3 Miyeloperoksidaz Enzimi Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler**

#### **1) Deney Tamponu**

Dilüsyon tamponu A ve dilüsyon tamponu B çözeltilerinin 1: 1 hacim oranında karıştırılmasıyla hazırlandı.

*a) Dilüsyon Tamponu A:* 20 ml' lik konsantre çözeltinin içerisine 30 ml distile su ilave eklenerek 50 ml' ye tamamlandı.

*b) Dilüsyon Tamponu B:* 10 ml' lik konsantre çözeltinin içerisine 40 ml distile su ilave edilerek 50 ml' ye tamamlandı.

#### **2) Tracer ( İkincil Antikor) Çözeltisi**

Konsantre çözelti şişesi içine 1 ml distile su ilave edilip karıştırıldı. Daha sonra 11 ml deney tamponu ilave edilerek iyice karıştırıldı. Deney süresince 2- 8 °C' de buzdolabında saklandı.

#### **3) Streptavidin- Peroksidaz Konjugat Çözeltisi**

Konsantre çözelti şişesi içine 1 ml distile su ilave edilerek karıştırıldı. Daha sonra 23 ml deney tamponu ilave edilerek 24 ml' ye tamamlandı.

#### **4) Stok Standart Çözeltisi**

Konsantre standart çözeltisi içerisine 0.5 ml distile su ilave edilerek çözüldü. Bu çözelti standart serisinin hazırlanmasında kullanıldı. Deney süresince -20 °C' de derecede saklandı.

**5) Yıkama Tamponu**

Kit içeriğindeki 40 ml' lik konsantre çözelti 760 ml distile su ilave edilerek 800 ml' ye tamamlandı.

**6) Tetra Metil Benzidin (TMB) Substrat Çözeltisi**

Şişe içeriği kullanıma hazır halde bulunmaktaydı.

**7) Sonlandırma Çözeltisi**

Şişe içeriği kullanıma hazır halde bulunmaktaydı.

**2.3.4 İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler****1) 1.6 M KI Çözeltisi**

1.119 g KI hassas olarak tartılarak distile su ile 10 ml' ye tamamlandı.

**2) Stok Standart Kloramin-T Çözeltisi**

22.77 mg Kloramin-T hassas olarak tartılarak 100 ml' ye tamamlandı.

**3) % 0.9 NaCl İçeren 10 mM' lik Sodyum Fosfat Tamponu (pH: 7.4)**

a) 0.67 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  tartılarak distile su ile 250 ml' ye tamamlandı.

b) 0.39 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  tartılarak distile su ile 250 ml' ye tamamlandı.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$  çözeltisi üzerine pH-metre kontrolünde  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  çözeltisinden damla damla ilave edilerek pH: 7.4'e ayarlandı. Çözeltinin son hacmi ölçüldü ve hacmin % 0.9'u kadar NaCl tartılarak çözelti içerisinde çözüldü.

### 2.3.5 3- Nitrotirozin Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

#### 1) HPLC Mobil Faz Çözeltisi, % 50- % 50 (v/v) Metanol- 0.01 M Fosforik Asit Çözeltisi

*0.01M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  çözeltisinin hazırlanması:* 1 lt balonjoje içerisine bir miktar bidistile su doldurulduktan sonra 0.684 ml %98' lik  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ilave edilerek karıştırıldı. Bidistile su ile 1 lt' ye tamamlandı. Hazırlanan 0.01 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  çözeltisinden 500 ml temiz bir mezüre konularak metanol ile 1 lt'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti cam mobil faz şişesine aktarıldı. Gaz çıkışının sağlanması amacıyla 30 dakika sonikasyon aletinde bekletildi. Süre sonunda şişenin ağzı sıkıca kapatıldı.

#### 2) 0.01 M Sodyum Fosfat tampon çözeltisi ( pH: 6.4)

- 0.67 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$  tartılarak distile su ile 250 ml' ye tamamlandı.
- 0.39 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  tartılarak distile su ile 250 ml' ye tamamlandı.

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$  çözeltisi üzerine pH-metre kontrolünde  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  çözeltisinden damla damla ilave edilerek pH: 6.4'e ayarlandı.

#### 3) Pronase E çözeltisi (1 mg/ ml)

10 ml hazırlamak için 10 mg proteaz (Pronase E) tartılarak balonjojeye aktarıldı. Üzerine bir miktar 0.01 M sodyum fosfat ( pH:6.4) tamponu ilave edilerek

çözüldü ve 10 ml' ye tamamlandı. Deney süresince + 4 °C' de buzdolabında saklandı.

#### 4) 3-NT stok çözeltisi

2.262 mg 3-nitrotirozin, %50- 50 (v/v) metanol- 0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisi içerisinde çözülerek 10<sup>-4</sup> M standart stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden belirli miktarlarda seyreltilerek 10<sup>-6</sup> - 10<sup>-10</sup> M konsantrasyon aralığında standart çözeltiler hazırlandı.

### 2.3.6 Serbest Tiyol Grupları Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

#### 1) 0.1 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH: 7.4)

a) 6.701 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O tartılarak distile su ile 250 ml' ye tamamlandı.

b) 3.9 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O tartılarak distile su ile 250 ml' ye tamamlandı

pH- metre kontrolünde *a* çözeltisi üzerine pH: 7.4 oluncaya kadar *b* çözeltisi ilave edilerek hazırlandı.

#### 2) 2 mM DTNB Çözeltisi ( Ellman Reaktifi )

0.00792 g DTNB hassas olarak tartıldı. Bir miktar distile suda çözüldükten sonra, distile su ile 10 ml' ye tamamlandı.

### 2.3.7 Total Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

#### 1) 7mM Stok ABTS<sup>•+</sup> Çözeltisi

ABTS çözeltisi: 38.407 mg ABTS tartılarak bidistile su ile 10 ml' ye tamamlandı.

Potasyum persülfat çözeltisi: 49.667 mg potasyum persülfat tartılarak bidistile su ile 25 ml'ye tamamlandı.

Hazırlanan potasyum persülfat çözeltinden 2.5 ml, ABTS çözeltisinden 5 ml alınarak renkli bir şişede karıştırılarak 30 °C' de ve karanlıkta 12- 16 saat karanlıkta bekletildi. Böylece ABTS• radikali oluşturuldu. Bu radikalın 4 °C de iki gün süreyle stabil olduğu bildirilmiştir.

### 2) 5 mM Fosfat Tamponu (pH: 7.4)

0.170 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 0.217 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  tartıldı. Her biri distile su ile 250 ml' ye tamamlandı.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  çözeltisi üzerine,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözelti ilave edilerek pH: 7.4' e ayarlandı.

### 3) Standart Trolox Çözeltisi

2.5 mM trolox çözeltisi hazırlamak için 0.0156 g trolox tartıldı ve 5 mM fosfat tamponu kullanılarak 25 ml' ye tamamlandı. Çeşitli konsantrasyonlarda standartlar hazırlamak için gerekli seyreltmeler Tablo 6'da belirtildiği hacimlerde stoktan alınarak, 5 mM fosfat tamponu( pH: 7.4) ile tamamlama yapılarak hazırlandı.

Stok Trolox Çözeltisi		Son Konsantrasyon
1 ml alınır	10 ml' ye PBS ile tamamlanır	0.25 mM
2 ml	"	0.5 mM
4 ml	"	1 mM
6 ml	"	1.5 mM
8 ml	"	2 mM
10 ml	Tamamlama yapılmaz	2.5 mM

**Tablo 6.** Standart trolox çözeltisi hazırlanması

## 2.4 Kullanılan Hasta Ve Kontrol Gruplarının Tanımı Ve Plazma

### Örnekleri

#### 2.4.1 Hasta Grubu

Tez çalışmamıza katılan hastalar; Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bölümünde tedavi gören ve kronik böbrek yetmezliği tanısı almış yetişkinlerden oluşmaktadır.

Bu hastalar uygulanan tedavi şekillerine göre;

- 1) Hemodiyaliz grubu (HD) (n=20), (Yaş Ort.  $\pm$  S.S.= 45.33  $\pm$  9.56)
- 2) Periton diyalizi grubu (PD) (n=20), (Yaş Ort.  $\pm$  S.S.= 41.77  $\pm$  9.34)
- 3) Böbrek transplantasyonu grubu (Tx) (n=20), (Yaş Ort.  $\pm$  S.S.= 35.9  $\pm$  9.33)

şeklinde üç gruba ayrılmıştır.

Çalışmaya katılan hasta grupları için çeşitli kriterler belirlenmiştir. Hasta grubuna dahil edilecek kişiler için belirlenen genel kriterler şunlardır: 20- 64 yaş aralığında, KBY haricinde diabetes mellitus, SLE, hepatit B, hepatit C, akut enfeksiyon gibi herhangi bir hastalığı olmayan, immünosüpresan tedavi almayan, sigara kullanmayan, yakın zamanda cerrahi bir operasyon geçirmemiş olan, gebelik durumu olmayan hastalar dahil edildi. PD ve HD hasta grubu için en az 12 aydır diyaliz tedavisi uygulanmakta olan hastalar seçildi. Böbrek transplantasyonu grubunu oluşturan hastalarda ise operasyonun üzerinden en az 12 ay geçmiş olmasına ve operasyon sonrasında herhangi bir sekonder komplikasyonun gelişmemiş olmasına dikkat edildi.

Çalışma gruplarında örnek toplama işlemi PD ve Tx grubu hastalarından sabah saat 08.00- 09.00 saatleri arasında bir defaya mahsus olmak üzere herhangi bir uygulama yapılmadan önce gerçekleştirilmiştir. HD grubundaki hastalarda ise; hemodiyaliz işlemi başlamadan önceden (HD1), HD işlemi başladıktan 2 saat sonra (HD2) ve HD işlemi bitiminde (HD3) olmak üzere toplam 3 kez kan örneği alınmıştır. EDTA içeren cam tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edilmiştir. Ayrılan plazmalar plastik ependorf tüplerine aktararak – 80 °C’de deney gününe kadar saklanmıştır.

## **2.4.2 Kontrol Grubu**

Kontrol grubunda değerlendirilmek üzere çalışmaya dahil edilen kişiler ise, herhangi bir sistemik rahatsızlığı bulunmayan, 20 ile 65 yaşları arasında bulunan, sigara kullanmayan, herhangi bir antioksidan tedavi uygulanmayan, yakın zamanda cerrahi bir operasyon geçirmemiş olan sağlıklı gönüllülerden oluşturulmuştur. Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kişilerin yaş ortalaması (ortalama  $\pm$  standart sapma)  $28,13 \pm 8,22$  olarak hesaplanmıştır. Kan örnekleri aç karnına, sabah 08.30-09.00 saatlerinde alınmıştır.

## **2.5 Kullanılan Yöntemler**

### **2.5.1 Protein Miktar Tayini Yöntemi**

Protein miktar tayini Lowry yöntemine göre yapılmıştır (52). Bu yöntemin temelini proteinlerin alkali ortamda bakır tuzları ile verdiği biüret tepkimesi oluşturmaktadır. Peptid bağları bakır tuzları ile alkali ortamda mor renkli bir kompleks oluştururken, aynı zamanda protein yapısındaki tirozin ve triptofan amino asitleri fosfomolibdat-fosfotungstat çözeltisi (Folin-Ciocalteu) ile indirgenirler.

Sığır serum albümininin (BSA) ana stok standardı (1 mg/ml) olarak hazırlanmış çözeltilerden 0.2 ml ve 0.4 ml alınıp, 10 ml' ye tamamlamak suretiyle elde edilen 20 µg/ml ve 40 µg/ml BSA içeren çözeltilerden 0.4' er ml alınarak standart tüplerine konuldu. Plazma protein miktarı tayini için örnekler, 200 kat seyreltilip elde edilen plazma örneklerinden 0.4 ml alınarak numune tüplerine kondu. Her tüpe 2 ml protein renk reaktifi eklendi. Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışıma 1:1 oranında distile su ile seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltilisinden 0.2 ml konuldu ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 750 nm'de köre karşı spektrofotometrede okundu. Kör tüpleri ise örnek yerine distile su konularak hazırlandı ve örnek uygulanan tüpler ile aynı işleme tabi tutuldu. Plazma protein miktarları, konsantrasyonu bilinen BSA çözeltileriyle oluşturulan standart eğri yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar *µg protein/ml* değerinde ifade edildi.

#### ***Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması:***

BSA'nın belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Bunun için 10 mg BSA tartılarak distile su ile 10 ml'ye tamamlandı ve böylece ana stok BSA standardı (1 mg/ml) hazırlandı. Bu stok çözeltilerden alınan belirli hacimler, distile su ile seyreltilerek ml' de 20, 40, 60, 80,100 ve 120 µg BSA bulunduran standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 0.4'er ml alınarak boş tüplere aktarıldı. Her tüpe 2 ml protein renk reaktifi eklendi. Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışıma 1:1 oranında distile su ile seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltilisinden 0.2 ml konuldu ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Süre sonunda, 750 nm dalga boyunda köre karşı spektrofotometrede okundu. Protein konsantrasyonlarının karşılık geldiği absorbanslar köre karşı okunup standart eğri çizildi. Her deney günü,



iki ya da üç ayrı konsantrasyonda taze hazırlanan standart çözeltilerinin absorbanı, örnekler ile birlikte okunarak standart eğriden sapmalar düzeltildi.

### **2.5.2 Protein Karbonil Grubu Miktar Tayini Yöntemi**

Protein karbonil grubu (PCC) tayini Reznick ve arkadaşlarının (71) yöntemine göre yapılmıştır. Yöntemin esası, plazmada bulunan serbest karbonil gruplarının DNPH ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen kararlı hidrazon ürünlerinin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir.

Hasta ve kontrol grubu plazma örneklerinden 0.8 ml boş tüp içerisine alındı. Üzerine 0.8 ml DNPH çözeltisi ilave edildi. Tüpler kapatılarak 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi boyunca, her 15 dakikada bir tüpler vortekslendi. Süre sonunda her bir tüp içeriğine, 0.8 ml % 20'lik TCA çözeltisi ilave edilerek hızlıca çalkalandı. Ardında 3800 rpm hızda 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj bitiminde tüpteki süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Tüpün alt kısmında toplanmış olan pelletlerin üzerine 1 ml, 1:1 (hacim/hacim) etanol-etil asetat karışımı ilave edilerek yıkandı. Yıkama işlemi üç defa tekrar edildi. Pelletlerin üzerine 0.8 mL 6 M guanidin çözeltisi ilave edildi. Tüp içerisindeki pelletler vorteks aleti yardımı ile çözülerek homojen bir çözelti elde edildi. Kör olarak kullanılan fosfat tamponuna karşı, spektrofotometrede 370 nm'de absorbanları okundu. Ekstinksiyon katsayı olarak  $22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  kullanıldı. Sonuçlar nmol/ mg protein olarak ifade edildi.

### **2.5.3 Miyeloperoksidaz Miktar Tayini Yöntemi**

Kullanılan MPO kiti ELISA yöntemiyle çalışmaktadır. Kit içerisinde bulunan mikropilaka kuyucukları MPO enzim antikorları ile kaplı vaziyette bulunmaktadır.

Örneklerin veya standart çözeltilerinin kuyucuklara konularak inkübe edilmesiyle var olan MPO'lar bu antikolar tarafından bağlanırlar. İnkübasyon sonunda yapılan yıkama işlemi sayesinde çözeltide bulunan bağlanmamış (gereksiz materyaller) kısımlar ortamdaki uzaklaştırılır. Yıkama işleminin ardından kuyucuklara ikincil antikoları içeren 'tracer çözeltisi'nin eklenmesi ve inkübe edilmesiyle antikor-MPO-kompleksinin ucuna biyotin molekülünün eklenmesi sağlanır. Yıkama işlemi yapılarak bağlanmayan kısımlar ortamdaki uzaklaştırılır. Kuyucuklara Streptavidin-peroksidaz konjugat çözeltisi eklenir. Gerçekleşen reaksiyon sonrasında streptavidin-peroksidaz konjugatı kompleksin biyotin ucuna eklenmiş olur. Reaksiyon süresi sonunda yıkama işlemiyle ortamdaki fazlalıklar arındırılır. Son olarak oluşturulan kompleksin konsantrasyonuyla doğru orantıda renk şiddeti gösterecek olan, streptavidin-peroksidaz substratı tetrametilbenzidin (TMB) çözeltisi ilave edilip inkübe edilir. İşlem için yeterli bir süre beklendikten sonra, sitrik asit içermekte olan durdurma çözeltisinin kuyucuklara eklenmesiyle işlem sonlandırılır. Sonuçlar, oluşan renkli kompleksin 450 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümü ile değerlendirilir. Sonuçlar ng/ml olarak ifade edilmiştir.

#### ***MPO Standart Serisinin Hazırlanması:***

Kit içerisinde hazır halde bulunan standart içeriği dilüsyon tamponu ile çözülerek stok standart çözeltisi hazırlandı. Stok standart çözeltisinin belirli konsantrasyonlarda seyreltilmesiyle 0.4-100 ng/ ml konsantrasyon aralığında standart MPO serisi hazırlandı.

Polipropilen materyalinden yapılmış 8 adet tüp, 1'den 8'e kadar numaralandırıldı. Numaralandırılan tüplerden 1 numaralı tüpe 0.15 ml stok standart çözeltisi ve 0.315 ml dilüsyon tamponu konuldu. Tüp içeriği vorteksenerek karıştırıldı. 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 numaralı tüplerin içerisine 0.225'er ml dilüsyon

tamponu konuldu. 1 numaralı tüp içerisinde hazırlanmış olan çözeltilerden 0.15 ml alınarak 2 numaralı tüpün içine konuldu ve karıştırıldı. 2 numaralı tüpten 0.15 ml alınarak 3 numaralı tüpe eklendi ve karıştırıldı. Bu işlem 8 numaralı tüpe kadar tekrar edildi. 8 numaralı tüpe ise sadece 0.5 ml dilüsyon tamponu konuldu. Yapılan bu seri dilüsyonlar ile 100 (1 no.lu), 40 (2 no.lu), 16 (3 no.lu), 6.4 (4 no.lu), 2.6 (5 no.lu), 1 (6 no.lu), 0.4 (7 no.lu) ve 0 (8 no.lu) ng/ml konsantrasyonlarında MPO standart serisi hazırlandı. Mikroplaka kuyucuklarına 0.1 ml standart çözeltileri eklendi. Üzerleri kapatılıp 1 saat süreyle oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Süre sonunda dikkatlice üzeri açılıp plaka aspirasyonla boşaltıldı. Kuyucuklara 0.2 ml yıkama tamponu ilave edilerek, 20 saniye beklendi ve plaka boşaltıldı. Yıkama işlemi 3 defa daha tekrarlandı. Yıkama işleminin ardından her kuyucuğa 0.1 ml 'tracer çözeltisi' eklendi. Plakanın üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. İnkübasyon bitiminde çözelti boşaltılarak 4 defa yıkama tamponu ile yıkama işlemi uygulandı. Kuyucuklara 0.1 ml seyreltilmiş streptavidin- peroksidaz konjugatı ilave edilip üzeri kapatıldı. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Kuyucuklar boşaltılarak 4 defa yıkama işlemi yapıldıktan sonra 0.1 ml TMB substrat çözeltisi eklendi. Üzeri kapatılarak, karanlık ortamda 30 dakika bekletildi. Sürenin sonunda, 0.1 ml, reaksiyonu durdurma çözelti konularak reaksiyon bitirildi. Kuyucuklarda hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edildikten sonra mikrolaka okuyucusunda 450 nm' de absorbans değerleri ölçüldü. Her konsantrasyon için 2 defa, farklı mikrolakalarda ölçüm yapıldı. Okunan değerlerin ortalaması alınarak standart eğri çizildi.

#### ***Numunelerin Hazırlanması:***

Plazma örnekleri, seyreltme tamponu ile 1: 10 oranında seyreltilerek kullanıldı. Numunelerin absorbans ölçümleri, yukarıda MPO standart eğrisini oluştururken yapılan deney protokolünün standart çözeltisi yerine, 10 kat seyreltilerek hazırlanmış

numunelerin kullanılması ile yapıldı. Standart MPO çözeltisinin belirli konsantrasyonlarına karşılık çizilen standart eğri yardımıyla numunelerdeki MPO konsantrasyonları hesaplandı.

#### **2.5.4 İleri Oksidasyon Protein Ürünleri (AOPP) Miktarı Tayini Yöntemi**

Toplanan plazma örneklerindeki AOPP konsantrasyonu ölçümü Witko- Sarsat ve ark.(85) yöntemine göre yapılmıştır. Yöntemin esası; plazmadaki AOPP' nin asidik ortamda, 340 nm' de maksimum absorpsiyon göstermesini sağlayan potasyum iyodürün varlığında, spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Sonuçlar standart olarak hazırlanarak spektrofotometrede 340 nm' de ölçülen Kloramin T konsantrasyonuna eşdeğer olarak verilmektedir.

Plazma AOPP konsantrasyonu ölçümü için 10 mM PBS (pH: 7.4) ile 1:5 oranında seyreltilen plazma örneklerinden 0.2 ml alınarak mikrolplaka kuyucuklarına konuldu. Örneklerin üzerine 0.01 ml 1.16 M KI çözeltisi eklendi. 2 dakika süre ile oda sıcaklığında bekletildi. İkinci dakikanın sonunda üzerlerine 0.02 ml glasiyel asetik asit konuldu ve mikrolplaka okuyucusu vasıtasıyla 340 nm'de absorbnsları ölçüldü alınır. Kör olarak, numune yerine % 0.9 NaCl içeren 10 mM PBS çözeltisi (pH:7.4) konulan, numunelerle aynı işlemlerin uygulandığı kuyucuklar değerlendirildi. Plazma AOPP konsantrasyonları; bilinen konsantrasyonlarda kloramin T ile oluşturulan standart eğri yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar  $\mu\text{mol/ml}$  Kloramin T eşdeğeri olarak ifade edildi.

##### ***AOPP Miktar Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması:***

Kloramin T' nin belirli konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı. Bunun için 22.77 mg kloramin T tartılarak bir miktar distile suyla çözüldükten sonra distile su

ile 100 ml'ye tamamlandı. Böylece 100  $\mu\text{M}$ 'lık ana stok kloramin T standardı hazırlanmış oldu. Hazırlanan bu stoktan belirli hacimlerde alınarak distile suyla seyreltilip 80, 60, 40 ve 20  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 0.2 ml alınarak mikropilaya kuyucuklarına uygulandı. Üzerlerine 1.16 M konsantrasyondaki KI çözeltisinden 0.01 ml ilave edilerek 2 dk bekletildi. Süre sonunda kuyucuklara 0.02 ml glasiyel asetik asit ilave edilip bekletilmeden 340 nm dalga boyunda mikropilaya okuyucusunda spektrofotometrik ölçümü yapıldı ve standart eğri çizildi. Kör olarak, Kloramin T standart çözeltisi yerine % 0.9 NaCl içeren 10 mM PBS çözeltisi (pH:7.4) kullanılarak hazırlandı ve standartlarla aynı işleme tabi tutuldu. Her deney günü standartlardan üç farklı konsantrasyon da numunelerle birlikte okunarak standart eğride oluşan sapmalar düzeltildi.

### **2.5.5 3-Nitrotirozin Miktar Tayini Yöntemi**

Hasta plazmalarındaki serbest veya proteine bağlı halde bulunan total 3-NT konsantrasyonu, Nobushige I. ve ark.'nın (40) modifiye yöntemine göre HPLC ile tayin edilmiştir. Yöntemin esası, ayırıcı kolondan geçerken kolon yüzeyinde tutunarak plazmadaki diğer materyallerden ayrılan serbest 3-NT'lerin poröz karbon yapısındaki elektrolitik hücreden geçerek indirgenmesi ve bunun sonucunda oluşan oksidasyon potansiyelinin amperometrik elektrokimyasal dedektör aracılığıyla tespit edilmesidir.

Hazırlanan mobil faz çözeltisi HPLC pompasına bağlandı. Bir gün süreyle, düşük akış hızında ayırıcı kolondan mobil faz çözeltisinin akışı sağlandı. Örneklerin sisteme enjekte edilmesinden önce bu mobil faz ile çalışacak sistemdeki 3-NT amino asitlerinin optimum etkinlikteki eğri potansiyel değeri ( $e^{1/2}$ ) tespit edildi. 1.13 mg 3-NT standart maddesi tartılarak 50 ml mobil faz içerisinde çözülerek  $10^{-4}$  M konsantrasyonda 3-NT standart çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözeltinin siklik

voltametre kullanılarak  $e^{1/2}$  değeri ölçüldü. Mobil faz içindeki 3-NT'nin  $e^{1/2}$  değeri 1104 mV olarak ölçüldü. Bu değer HPLC cihazına 1150 mV olarak uyarlandı. Sonuçlar *nmol/L* olarak verildi.

#### ***Örneklerin Hazırlanması:***

Hazırlanan 0.01 M PBS tamponundan 0.845 ml alınarak plastik ependorflar içerisine konuldu. Örnek ve kontrol grubuna ait plazma örneklerinden alınan 0.045 ml plazma, tampon çözeltisi üzerine ilave edildi. Ependorf içeriği homojen olacak şekilde vorteks yardımıyla karıştırıldı. Ependorf içeriği üzerine 0.5 ml pronase E çözeltisi (10 mg/ml) eklenerek tekrar karıştırıldı. Hazırlanan ependorflar ısıtmalı çalkalayıcıya yerleştirilip ısı kaybına önlemek amacıyla üzerleri alüminyum kağıt ile sıkıca kapatıldı. Alet çalıştırılarak plazmalar 50 °C'de 18 saat enzimatik hidrolize bırakıldı. Bu sayede serbest 3-NT haricinde, proteinlere bağlı olarak bulunan 3-NT'ler de serbest hale getirildi.

Hidroliz işlemi bitiminde ısıtmalı çalkalayıcı kapatılarak tüp içeriğinden 0.5 ml alınarak 0.4 µM por genişliğine sahip ultrafiltrasyon ependorflarına aktarıldı. Ependorflar +4 °C de 15000 g rotasyon hızında 10 dakika süreyle santifüj yapıldı. Süre sonunda ependorfun alt kısmında birikmiş olan filtrat, plazmada serbest olarak bulunan 3- NT'leri içermektedir.

Hazırlanan örnek çözeltisinden boş ependorf tüpüne 0.01 ml alınarak 0.01 M fosfat tamponu (pH: 6.4) ile 1 ml' ye tamamlandı. Elde edilen 1:100 dilüsyondaki örnek çözeltisinden 60 ml alınarak 0.02 ml'lik HPLC sistem lopuna enjekte edilip, okuma işlemi başlatıldı. Belirlenen yaklaşık 3.1 dakikalık tutunma zamanının ardından, aynı örnekten 5' er dakikalık aralıklar ile 5 ölçüm yapıldı.

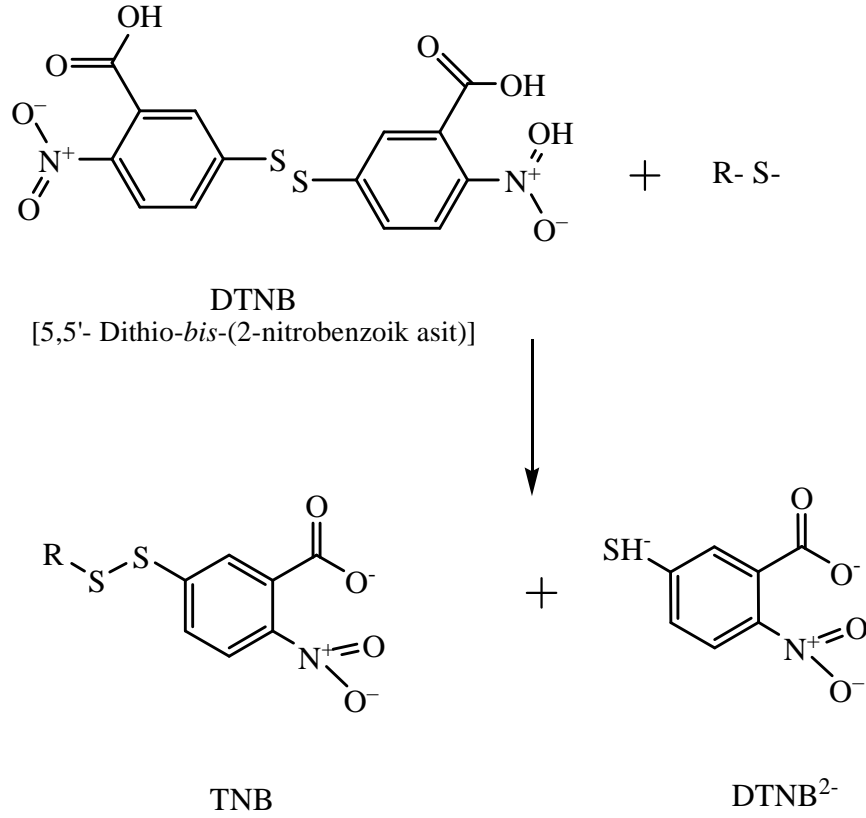
Standart 3- NT eğrisinin hazırlanması: standart eğri grafiği çizmek için 3- NT standardının belirli konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandı ve ölçümleri alındı.

Bunun için 1.13 mg 3- NT tartılarak balonjoje içerisine alınıp 0.01M'lık sodyum fosfat tampon çözeltisi ile 50 ml' ye tamamlandı. Bu sayede  $10^{-4}$  M konsantrasyonda 3- NT standart stok çözeltisi elde edildi. Bu stok çözeltiden  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-7}$  ve  $10^{-7}$  M konsantrasyonlarda 3-NT standart çalışma çözeltileri hazırlandı.

Standart çalışma çözeltilerinden 0,6 ml alınıp, % 50- 50 (v/v) MeOH-0.01M  $H_3PO_4$  mobil fazın kullanıldığı, 1150 mv potansiyelde, 25 °C kolon ısısında 5 ml/ dk akış hızındaki HPLC-ECD sistemine enjekte edilerek okuma işlemi gerçekleştirildi. Tüm konsantrason için 5 ayrı enjeksiyon yapılarak, oluşturdukları oksidasyon potansiyellerinin ortalaması değerlendirmeye alındı. Her bir 3- NT çözeltisi konsantrasyonuna karşılık oluşan oksidasyon potansiyeli belirlenip, standart eğri grafiği çizildi.

### **2.5.6 Serbest Tiyol Grupları Miktar Tayini Yöntemi**

Plazma tiyol seviyeleri, serbest tiyol gruplarının, Ellman reaktifi (DTNB) ile oksitlenmesi esnasında oluşan koyu sarı renkli 5-tiyo- 2-benzoik asit (TNB)'nin renk şiddetinin, 412 nm dalga boyunda ölçülmesiyle belirlendi (45) (Şekil 9).



**Şekil 9.** TNB oluşum reaksiyonu

Plazma örnekleri 1: 2 oranında seyreltildi. Seyreltilmiş örneklerden 0.05 ml alınarak boş ependorflara konuldu. Daha sonra üzerine önce 0.75 ml 0,1 M fosfat tamponu (pH: 7.4) ardından 0.2 ml 2mM'lık DTNB çözeltisi eklendi. Isıtmalı çalkalayıcı kullanılarak 37 °C' de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyon süresi sonunda oluşan TNB konsantrasyonu 412 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. TNB molekülüne ait molar ekstinksiyon katsayı (e) değeri olan 13600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> kullanılarak numunelerdeki serbest tiyol grubu konsantrasyonu hesap edildi. Sonuçlar µmol/ L olarak ifade edildi.

### 2.5.7 Total Antioksidan Kapasite (TAK) Tayini Yöntemi

TAK tayini, trolox'a eşdeğer total antioksidan kapasiteyi göstereren bir yöntemle saptanır (70). Bu yöntemde, ortamda bulunan ABTS<sup>•+</sup> radikalinin 734 nm



dalga boyunda absorbansı sabitlendikten sonra ortama ilave edilen plazma örneğindeki antioksidanların etkisiyle, absorbansta meydana gelen azalma, kolorimetrik olarak tayin edilir. Stok ABTS çözeltisindeki ABTS' nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu 734 nm' de maksimum absorbans gösteren mavi/yeşil kromofor ABTS<sup>•+</sup> radikali meydana gelir. Radikalın absorbansı 30° C' de 12- 16 saat içinde sabitlenir ve iki gün süreyle stabil kalır. Ancak ortamda hidrojen verici antioksidanların bulunması ile radikal indirgenmeye başlar ve radikal katyonun absorpsiyonunda zamana bağlı olarak düşüş olur. Bu düşme, yüzde inhibisyon olarak ifade edilip aynı koşullar altında yapılan bir çalışma ile çizilen trolox standart eğrisinden hareketle TAK tayini yapılır.

Bu deneyde kullanılan örnek plazmalar 5 mM fosfat tamponu ( pH: 7.4) ile 100 kat seyreltilerek kullanılmıştır. Karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 16 saat inkübe edilen 7 mM stok ABTS<sup>•+</sup> radikal çözeltisinin 734 nm' de 1ml 5 mM fosfat tamponuna (pH: 7.4) karşı  $0.700 \pm 0.02$  absorbans gösterdiği konsantrasyondaki, yüzde inhibisyonu 'sıfır' olarak belirlenmiştir. Bu nedenle ABTS çözeltisinin absorbansı  $0.700 \pm 0.02$  olacak şekilde 5 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) ile seyreltildi. Bu çözeltiden örnek küvetine 1 ml eklenerek, 30 °C sıcaklığa sabitlenmiş spektrofotometrede, 5 mM fosfat tampon ( pH: 7.4) çözeltisine karşılık 734 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Bu değer  $A_{ABTS\bullet+}$  olarak kaydedildikten sonra küvet içeriğine 10 µl seyreltilmiş plazma çözeltisi ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Küvet içeriğinin homojen olması için küvet kapağı kapatılarak birkaç defa karıştırıldı. Aynı dalga boyunda (734 nm) 6. dakikaya kadar olan absorbans değeri gözlendi ve 6. dakikadaki köre karşı okunan absorbans  $A_{6. dk}$  olarak kaydedildi. Elde edilen bu değerlerden sonra yüzde inhibisyon oranı aşağıdaki şekilde her örnek için ayrı hesap edildi.

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{\text{ABTS}^{\bullet+}} - A_{6. \text{dk}}) \times 100 / A_{\text{ABTS}^{\bullet+}}$$

Trolox standart eğrisinde % inhibisyon değerlerinin karşılık geldiği trolox eşdeğer konsantrasyonu belirlendi. Sonuçlar, *mM trolox eşdeğerliği* olarak verildi. Her örnek için üçer ölçüm alındı ve sonuçlar hesap edilirken üç ölçümün ortalaması kullanıldı.

#### ***TAK Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması:***

Suda çözünen bir E vitamini türevi olan Trolox, TAK tayinleri için en çok kullanılan standarttır. Trolox' un çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Bunun için 6.257 mg trolox tartıldı ve 5 mM fosfat tamponu kullanılarak 10 ml' ye tamamlandı. Böylece 2.5 mM konsantrasyondaki stok çözelti elde edildi. 2.5 mM stok çözeltilerden alınan belirli hacimler, 5 mM fosfat tamponu ile seyreltilerek 0.25 mM, 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM ve 2 mM'lık standart çözelti serisi hazırlandı. Karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 16 saat inkübe edilen 7 mM stok ABTS<sup>•+</sup> radikal çözeltilisinin 734 nm' de absoransı 0.700± 0.02 olacak şekilde 5 mM fosfat tamponu (pH: 7.4 ) ile dilüe edildi. Bu çözeltilerden örnek küvetine 1 ml eklenerek kör olarak 5 mM fosfat tamponununun (pH: 7.4) kullanıldığı ve 30 °C sıcaklığa sabitlenmiş spektrofotometrede, 734 nm dalga boyunda absorans değerleri ölçüldü. Daha sonra küvete 10 µl trolox standart çözeltisi eklendi ve kronometre çalıştırıldı. Küvet içeriği karıştırılarak 6 dakika süresince 734 nm dalga boyunda ölçüm alındı. 6. dakikadaki absorans değeri dikkate alınarak trolox konsantrasyonuna karşılık gelen yüzde inhibisyon değeri hesap edildi. Sonuçlar "*mM Troloxa eşdeğer antioksidan kapasite*" olarak ifade edildi.

Farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltiler için üçer deneme yapıp hesaplanan yüzde inhibisyonların ortalaması alındı ve standart eğri çizildi. Deneyin çalışıldığı farklı günlerde, iki veya üç ayrı konsantrasyonda taze hazırlanan standart çözeltilerinin absorbansı, örnekler ile birlikte okunarak standart eğrideki sapmalar düzeltildi.

## **2.6 İstatistiksel Analiz**

Tez çalışması için oluşturulan tedavi gruplarından elde edilen sonuçların anlamlılığını belirlemek için Two-Sample-T-Test Power analizi yapılarak örneklem büyüklüğü hesaplandı.

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek aritmetik ortalamaları (Ort.) ve standart hataları (S.H.) bulundu. Gruplar arasındaki farkın anlamlı olup olmadığı tespit etmek için ANOVA (tek yönlü varyans analizi) testi ve ikili grupların kendi aralarında karşılaştırmak için de POST- HOC testlerinden TURKEY HSD testi yapıldı.

Anlamlılık sınırı olarak  $p < 0.05$  kabul edildi. Bu işlemlerin tamamı SPSS 13 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

## **2.7 Etik Kurul Onayı**

Tez çalışmamız başlangıcında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu'ndan 23/ 01/ 2008 tarihli ve 07- 12/ 3 sayılı bir yazıyla onay alınmıştır.

## 3. BÖLÜM

### BULGULAR

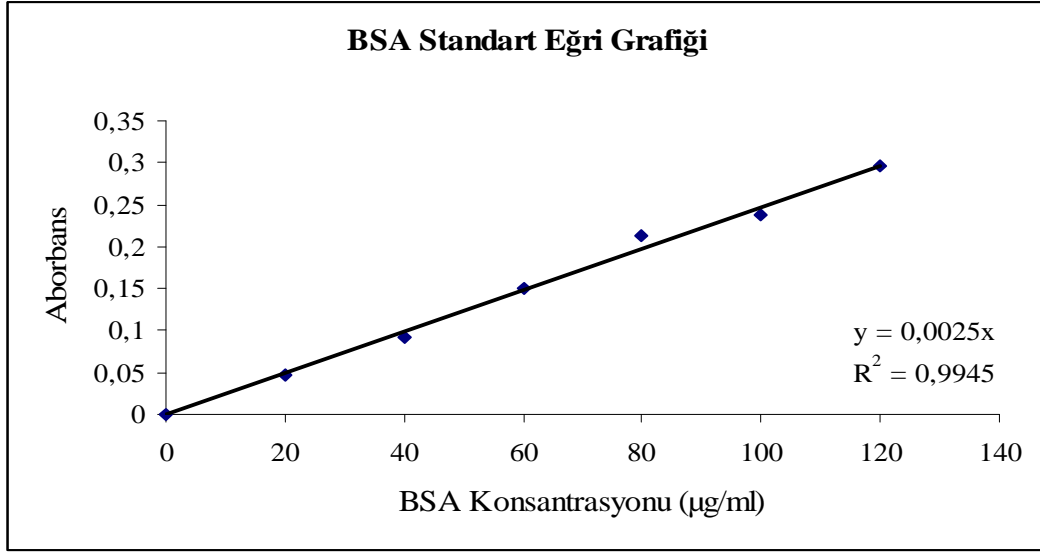
#### 3.1 Standart Eğri Çizimleri

##### 3.1.1 Protein Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi

Çeşitli konsantrasyonlarda sığır serum albümini (BSA) taşıyan çözeltilerin spektrofotometredeki absorbans değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo 7’de sunulmuş ve Şekil 10’da bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

BSA ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbans (n=3) (Ort. $\pm$ S.H.)
20	0.047 $\pm$ 0.0023
40	0.093 $\pm$ 0.0021
60	0.151 $\pm$ 0.0017
80	0.213 $\pm$ 0.002
100	0.237 $\pm$ 0.0015
120	0.297 $\pm$ 0.0005

**Tablo 7.** BSA standart grafiğini oluşturan absorbans değerleri



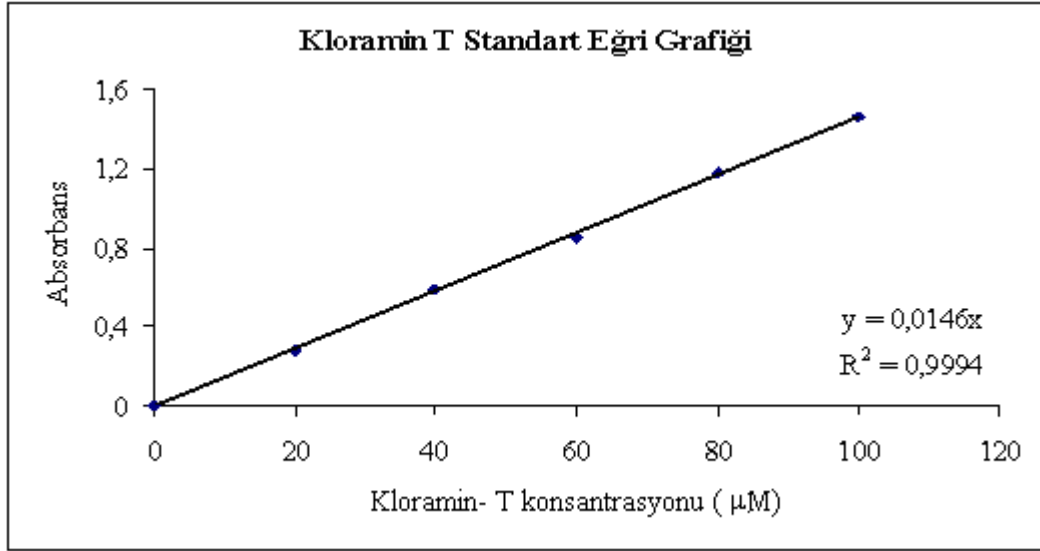
**Şekil 10.** BSA standart eğri grafiği

### 3.1.2 AOPP Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi

Çeşitli konsantrasyonlarda Kloramin-T içeren çözeltilerin mikropilaka okuyucusunda okunan absorbans değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo 8’de sunulmuş ve Şekil 11’de bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Konsantrasyon (µM)	Absorbans (n=3) (Ort.± S.H.)
20	0.282 ± 0.0003
40	0.589 ± 0.0058
60	0.852 ± 0.0288
80	1.181 ± 0.0231
100	1.463 ± 0.0174

**Tablo 8.** Kloramin-T standart eğrisini oluşturan absorbans değerleri



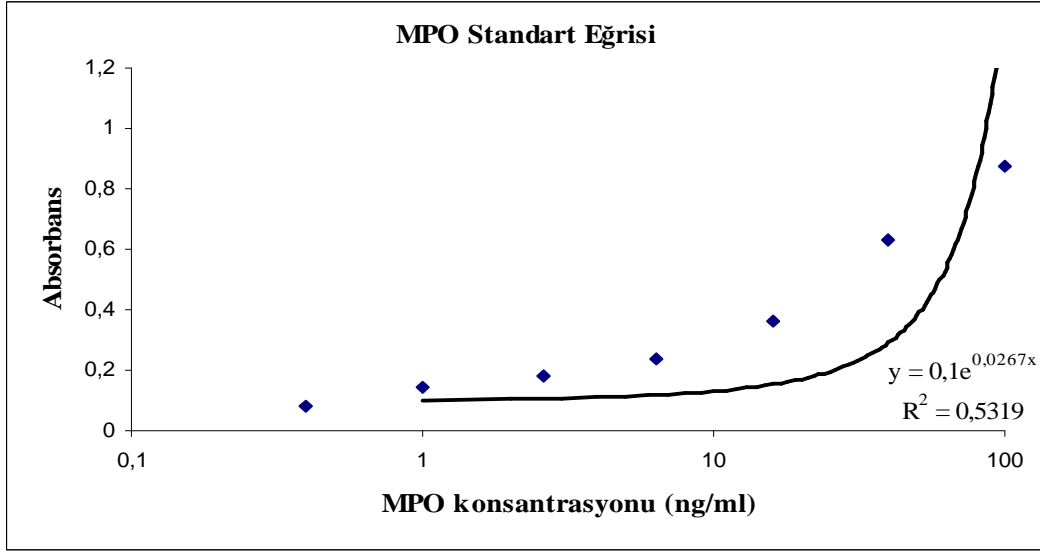
Şekil 11. Kloramin-T standart eğri grafiği

### 3.1.3 MPO Miktar Tayini İçin Standart Eğri Çizimi

Çeşitli konsantrasyonlarda miyeloperoksidaz içeren çözeltilerin mikrolplaka okuyucusunda okunan absorbans değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo 9'da sunulmuş ve Şekil 12'de bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Konsantrasyon (ng/ml)	Absorbans (n=4) (Ort.± S.H.)
0	0.032 ± 0.0051
0.4	0.08 ± 0.0037
1	0.144 ± 0.0094
2.6	0.18 ± 0.0143
6.4	0.24 ± 0.0417
16	0.364 ± 0.0378
40	0.632 ± 0.0531
100	0.872 ± 0.0591

Tablo 9. MPO standart eğrisini oluşturan absorbans değerleri



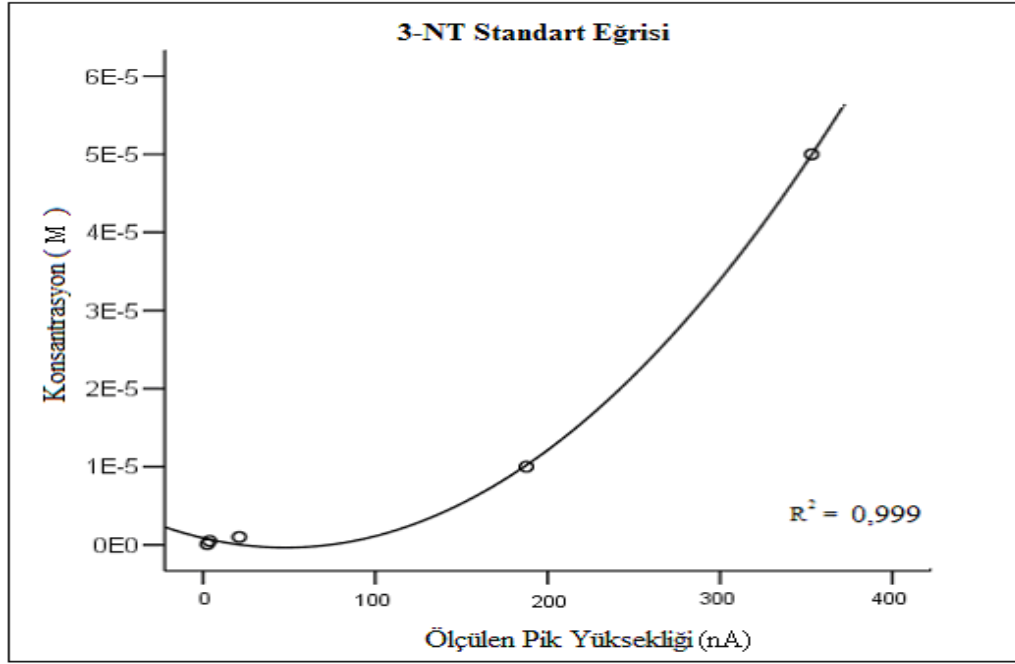
Şekil 12. MPO standart eğri grafiği

### 3.1.4 Plazma 3-NT Düzeyi Tayini İçin Standart Eğri Çizimi

Belirli konsantrasyonlarda 3-nitrotirozin standardı içeren çözeltilerin HPLC-ECD ile tayininde elde edilen konsantrasyonlara karşılık elde edilen pik yükseklikleri ve bunlara ait standart hatalar Tablo 10' da sunulmuştur. Şekil 13'de bu değerlere ait standart eğri grafiği çizilmiştir.

Konsantrasyon (M)	Pik Yüksekliği (nA) (n=4) (Ort.± S.H.)
$10^{-7}$	2,50 ± 0,057
$5 \times 10^{-7}$	3,83 ± 0,050
$10^{-6}$	21,10 ± 0,068
$10^{-5}$	187,63 ± 0,057
$5 \times 10^{-5}$	353,20 ± 0,093

Tablo 10. 3-NT standart eğrisini oluşturan pik yükseklikleri



Şekil 13. 3-NT standart eğri grafiği

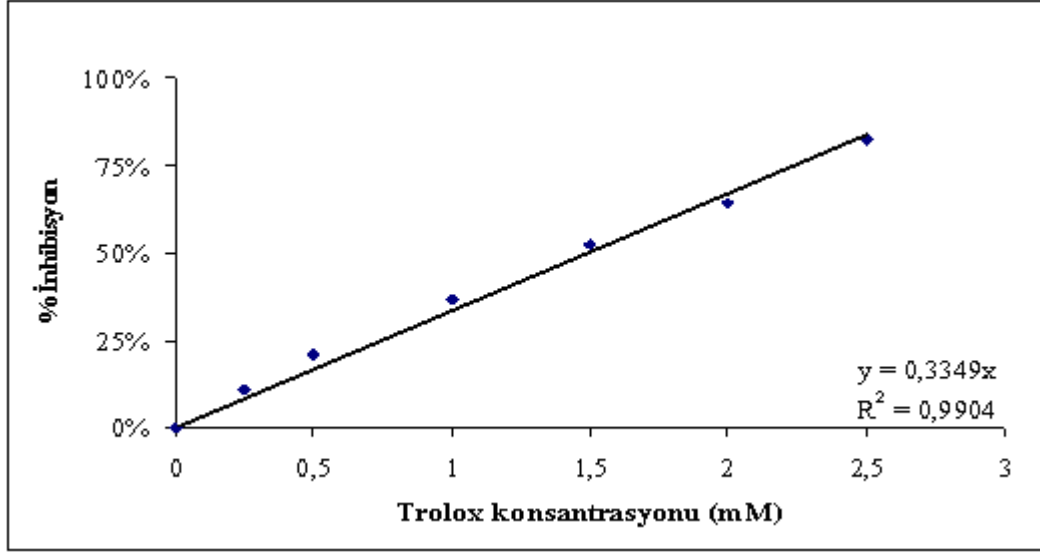
### 3.1.5 TAK Düzeyi Tayini İçin Standart Eğri Çizimi

Çeşitli konsantrasyonlarda trolox içeren çözeltilerin spektrofotometredeki absorbans değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo 11’de verilmiş ve Şekil 14’de bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Konsantrasyon (mM)	% İnhibisyon (n=3) (Ort.± S.H.)
0.25	% 11.18 ± 0.058
0.5	% 20.84 ± 0.065
1	% 36.80 ± 0.073
1.5	% 52.46 ± 0.051
2	% 64.12 ± 0.15
2.5	% 82.28 ± 0.039

Tablo 11. TAK standart eğri grafiğini oluşturan absorbans değerleri





Şekil 14. ABTS<sup>+</sup> radikali absorbans inhibisyonu (734 nm) standart grafiği

### 3.2 Çalışma Gruplarında Plazma Oksidatif Stres Parametrelerine Ait Bulgular

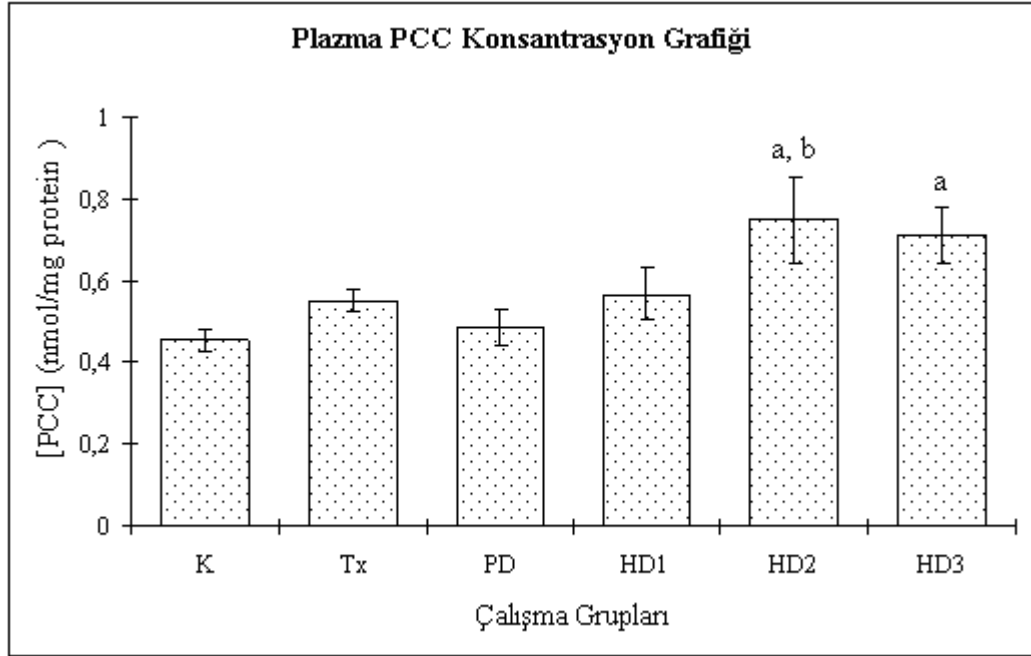
Bu çalışmada kronik böbrek yetmezliği hastalığında uygulanan renal replasman tedavilerinin, oksidatif stres üzerine etkileri incelendi. Çalışılan oksidatif stres parametreleri ve plazmada tespit edilen düzeyleri Ort.  $\pm$  S.H. olarak aşağıda sunulmuştur.

#### 3.2.1 Plazma Protein Karbonil Grubu Düzeyine Ait Bulgular

Çalışılan plazma örneklerine ait PCC düzeyleri Ort  $\pm$  S.H. değerleri Tablo 12'de sunulmuş ve bu değerlere ait bar grafiği Şekil 15'de gösterilmiştir.

Çalışma Grubu	PCC (nmol/mg protein) (n= 20) (Ort.± S.H.)
K	0.455 ± 0.027
Tx	0.552 ± 0.028
PD	0.483 ± 0.046
HD1	0.568 ± 0.065
HD2	0.751 ± 0.105
HD3	0.714 ± 0.068

**Tablo 12.** Çalışma gruplarına ait plazma PCC düzeyleri



**Şekil 15.** Çalışma gruplarına ait plazma PCC konsantrasyonuna ait grafik

<sup>a</sup> Kontrol grubuna anlamlı derecede artış var ( $p < 0.004$ )

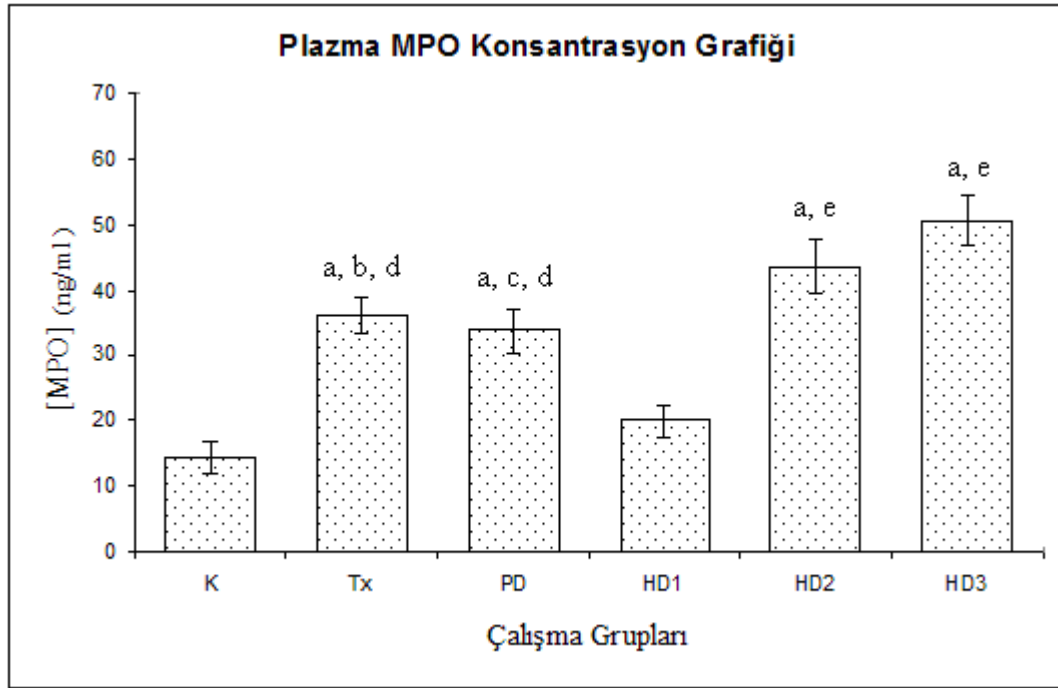
<sup>b</sup> PD grubuna göre anlamlı derecede artış var ( $p < 0.05$ )

### 3.2.2 Plazma Miyeloperoksidaz Düzeyine Ait Bulgular

Çalışma gruplarına ait plazma MPO konsantrasyonları Ort. ± S.H. olarak Tablo 13'de sunulmuştur. Bu değerlere ait bar grafiği çizilerek Şekil 16 ile gösterilmiştir.

Çalışma Grubu	MPO (ng/ml ) (Ort.± S.H.)
K	14.32 ± 2.48
Tx	35.99 ± 2.84
PD	33.75 ± 3.16
HD1	19.97 ± 2.28
HD2	43.61 ± 4.12
HD3	50.60 ± 3.96

**Tablo 13.** Çalışma gruplarına ait plazma MPO düzeyleri



**Şekil 16.** Çalışma gruplarına ait plazma MPO konsantrasyonuna ait grafik

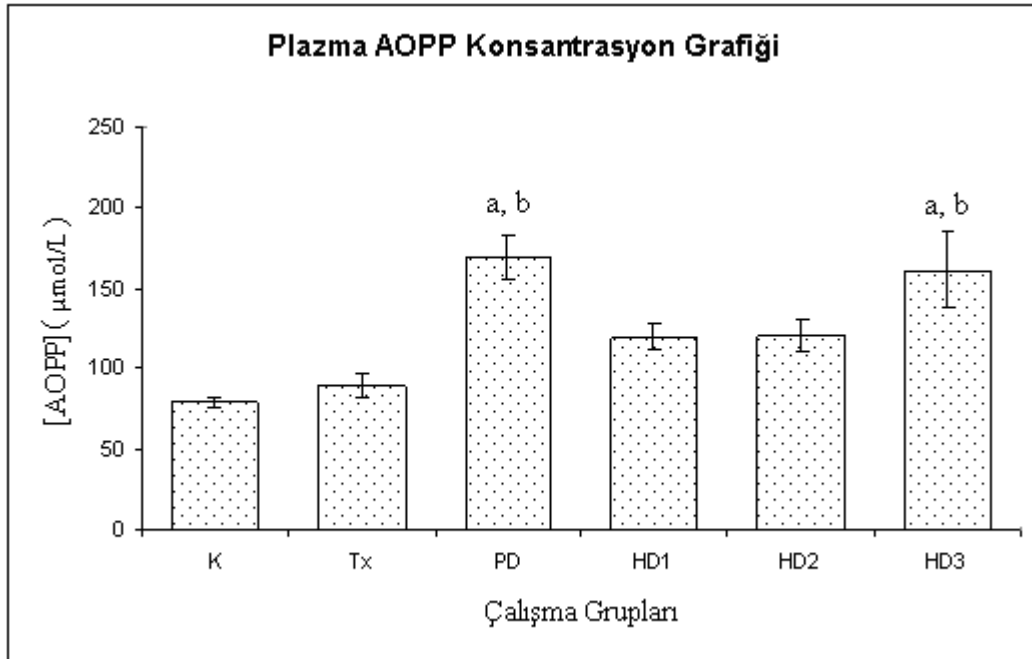
- <sup>a</sup> Kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış ( $p < 0.001$ )
- <sup>b</sup> HD3 grubuna göre anlamlı derecede düşük ( $p < 0.05$ )
- <sup>c</sup> HD3 grubuna göre anlamlı derecede düşük ( $p < 0.01$ )
- <sup>d</sup> HD1 grubuna göre anlamlı derecede yüksek ( $p < 0.05$ )
- <sup>e</sup> HD1 grubuna göre anlamlı derecede yüksek ( $p < 0.001$ )

### 3.2.3 Plazma İleri Oksidasyon Protein Ürünleri Düzeyine Ait Bulgular

İncelenen plazma örneklerine ait AOPP konsantrasyonları Ort  $\pm$  S.H. olarak Tablo 14’de belirtilerek bu değerlere ait bar grafiği çizilerek Şekil 17’da gösterilmiştir.

Çalışma Grubu	AOPP ( $\mu\text{mol/L}$ ) (n=20) (Ort. $\pm$ S.H.)
K	79.04 $\pm$ 3.05
Tx	89.29 $\pm$ 7.60
PD	169.39 $\pm$ 13.39
HD1	119.32 $\pm$ 8.48
HD2	120.09 $\pm$ 9.88
HD3	161.37 $\pm$ 23.81

**Tablo 14.** Çalışma gruplarına ait plazma AOPP düzeyleri



**Şekil 17.** Çalışma gruplarına ait plazma AOPP konsantrasyonuna ait grafik

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ( $p < 0.001$ )

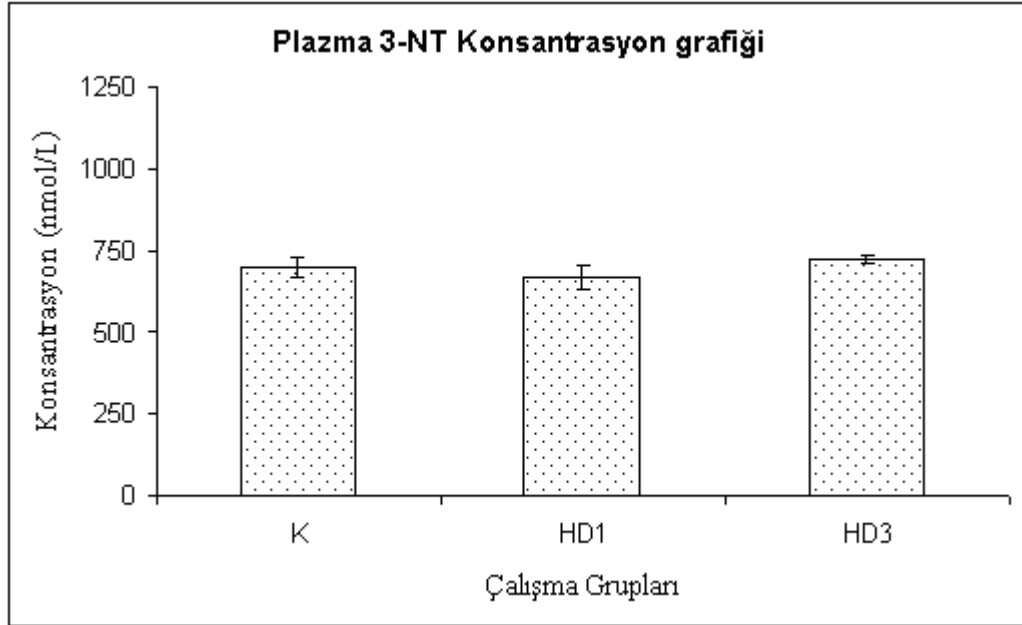
<sup>b</sup> Tx grubuna göre anlamlı derecede yüksek ( $p < 0.001$ )

### 3.2.4 Plazma 3- Nitrotirozin Düzeyine Ait Bulgular

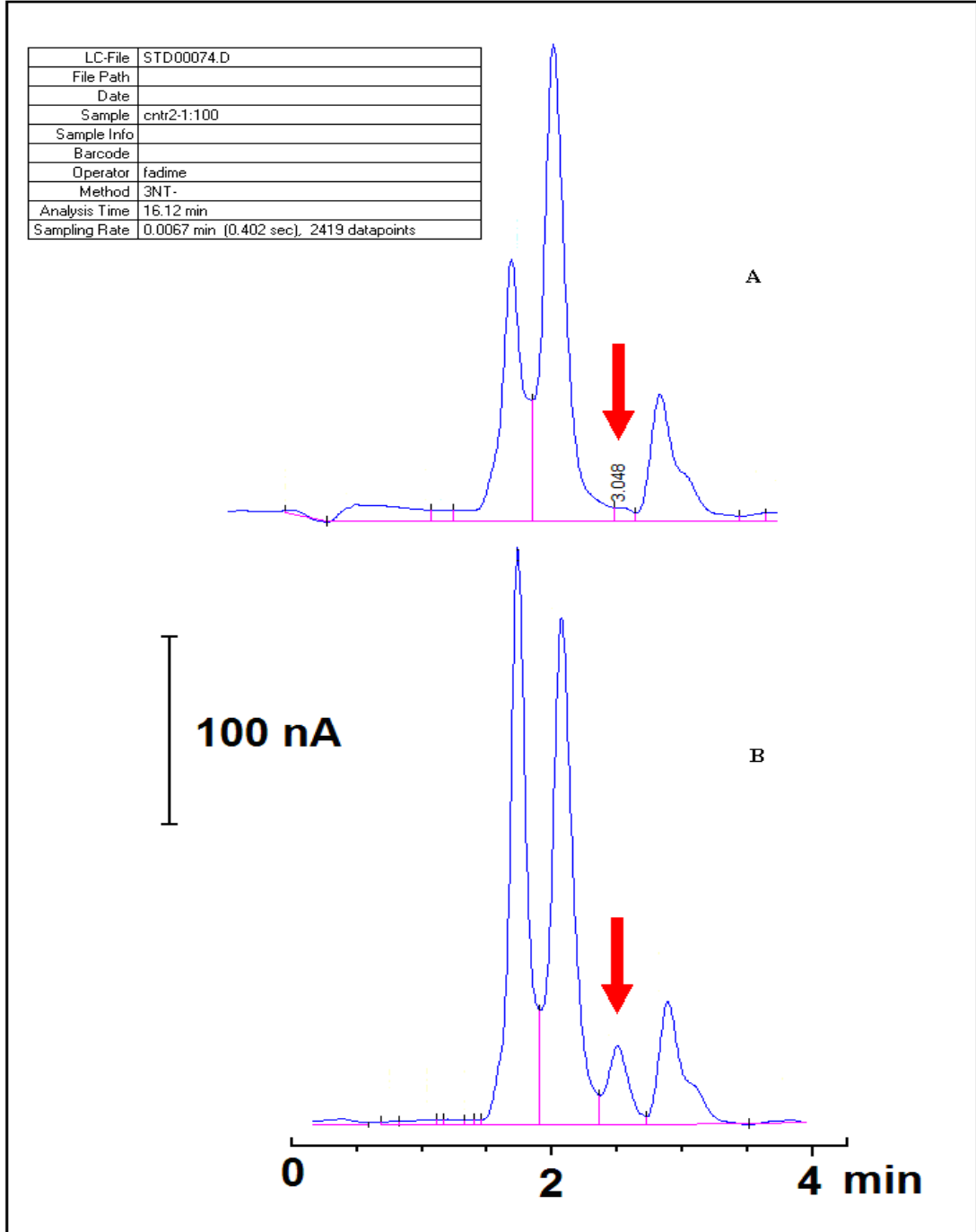
Plazma örneklerinde ölçülen 3-nitrotirozin konsantrasyonlarına ait ort. $\pm$  S.H. tablo 15’de sunulmuştur ayrıca şekil 18’de gruplara göre konsantrasyon dağılımı belirtilmiştir (p= 0.296).

Çalışma Grubu	3-NT (nmol/L) (Ort. $\pm$ S.H)
K (n=16)	701.47 $\pm$ 31.34
HD1 (n=20)	668.47 $\pm$ 36.97
HD3 (n=20)	725.41 $\pm$ 14.52

**Tablo 15.** Çalışma gruplarına ait plazma 3- NT düzeyleri



**Şekil 18.** Çalışma gruplarına ait plazma 3- NT konsantrasyonuna ait grafik



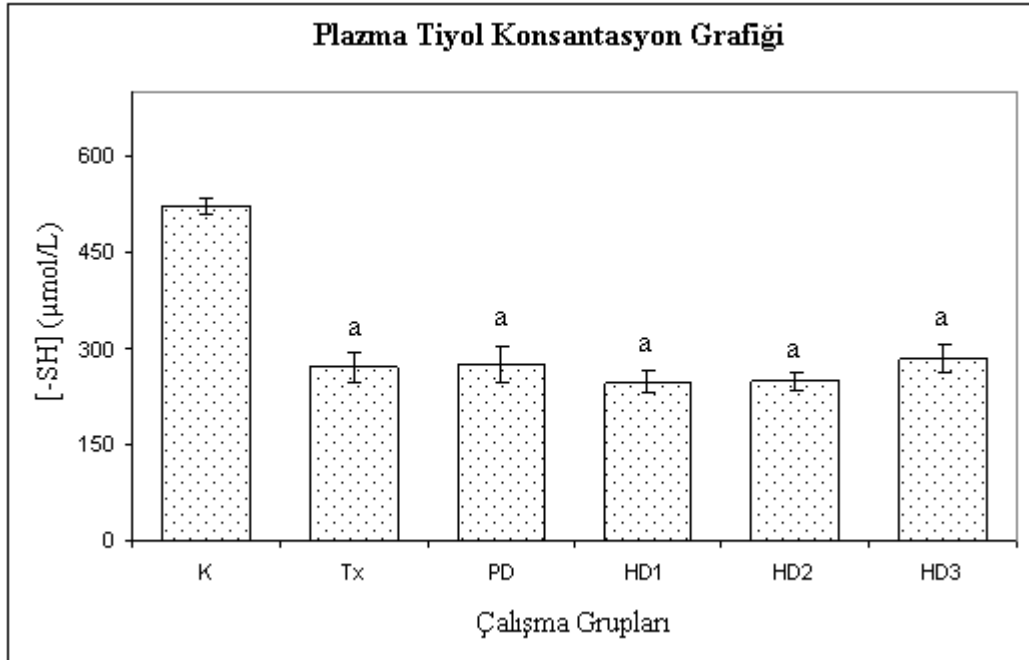
**Şekil 19.** Kontrol grubuna ait tipik plazma (A) ve  $10^{-5}$  M 3-NT ekilmiş plazma (B) kromatogramları

### 3.2.5 Plazma Serbest Tiyol Grubu Düzeyine Ait Bulgular

Plazma örneklerinde ölçülen serbest tiyol grubu konsantrasyonlarına ait Ort.  $\pm$  S.H. Tablo 16'de verilmiştir. Şekil 20'de bu değerlere göre çizilen bar grafiği ile gösterilmiştir.

Çalışma Grubu	Tiyol konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$ ) (n=20) (Ort. $\pm$ S.H.)
K	523.57 $\pm$ 12.72
Tx	269.23 $\pm$ 22.25
PD	274.30 $\pm$ 28.41
HD1	246.65 $\pm$ 16.44
HD2	247.76 $\pm$ 15.13
HD3	282.02 $\pm$ 21.68

**Tablo 16.** Çalışma gruplarına ait plazma tiyol düzeyleri



**Şekil 20.** Çalışma gruplarına ait plazma serbest tiyol konsantrasyonuna ait grafik

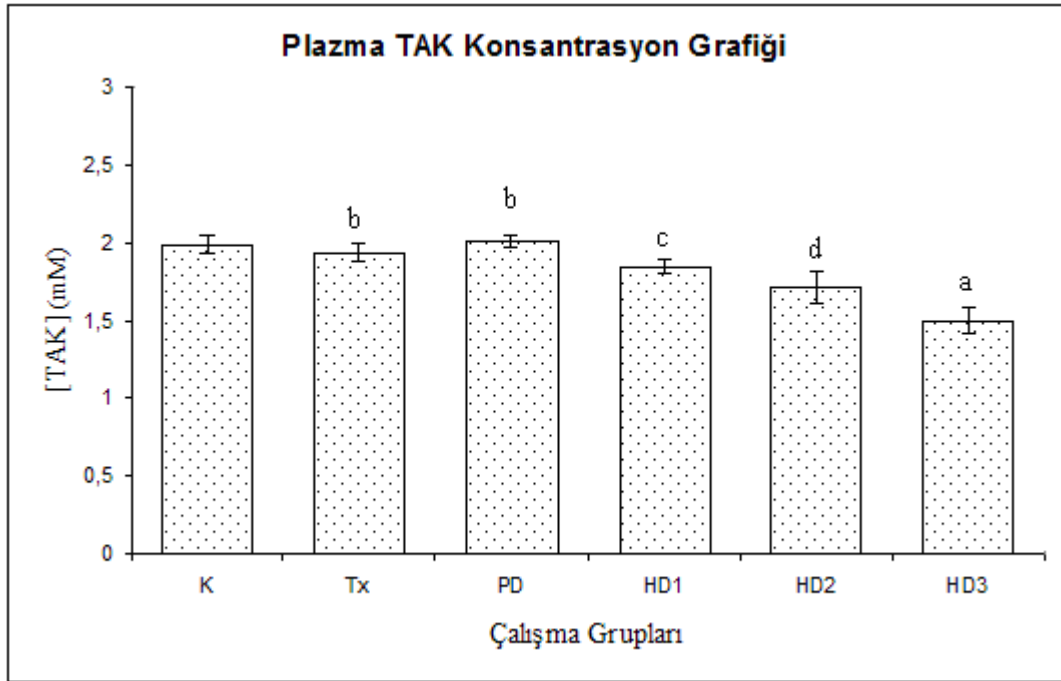
<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma var ( $p < 0.001$ )

### 3.2.6 Plazma Total Antioksidan Kapasite Düzeyine Ait Bulgular

İncelenmiş olan plazma TAK düzeyleri Ort.  $\pm$  S.H. olarak Tablo 17’de sunulmuştur. Bu değerlere göre çizilmen bar grafiği Şekil 21’de gösterilmiştir.

Çalışma Grubu	TAK (mM) (n=20) (Ort.± S.H.)
K	1.988 ± 0.057
Tx	1.935 ± 0.055
PD	2.011 ± 0.036
HD1	1.845 ± 0.041
HD2	1.714 ± 0.104
HD3	1.498 ± 0.083

**Tablo 17.** Çalışma gruplarına ait plazma TAK düzeyleri



**Şekil 21.** Çalışma gruplarına ait plazma TAK konsantrasyonuna ait grafik

- <sup>a</sup> Kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p < 0.001$ )
- <sup>b</sup> HD 3 grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.001$ )
- <sup>c</sup> HD 3 grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.005$ )
- <sup>d</sup> PD grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ )



## 4. BÖLÜM

### TARTIŞMA VE SONUÇ

KBY hastalarında, ROT üretiminin artması ve antioksidan savunma sisteminin yetersiz kalması nedeniyle oksidatif stres düzeyinin arttığı bildirilmiş ve bu durumun KBY'nin patogeneze katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (2, 85).

Renal replasman tedavisi olarak uygulanan HD, PD ve Tx tedavilerinin oksidatif stresle ilişkisini araştıran çalışmalarda; HD ve PD tedavilerinin uygulama süreçlerinde ve böbrek transplantasyonu (Tx) sonrasında oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir (2, 23, 31, 47, 55, 89). Ancak, bu çalışmaların bazılarında hasta sayısının az olması ve oksidatif stresin belirlenmesinde farklı parametreler kullanılmış olması, sonuçlar arasında çelişkilere neden olmuştur. Dolayısıyla, replasman tedavisi uygulanan hastalarda oksidatif stres düzeyinin artmasının neden-sonuç ilişkileri henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır.

Renal replasman tedavilerinin, oksidatif stres üzerine etkilerine ilişkin çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Örneğin; HD tedavisi uygulanmakta olan hastalarda, ROT artışına neden olan temel mekanizma olarak; üremik durum, kullanılan diyaliz membranları ve kontamine diyalizat sıvıları olmak üzere üç temel mekanizma üzerinde durulmaktadır (31, 62, 83). Bu mekanizmaların fagositlerin aktif hale geçmesine neden olarak oksidatif doku hasarı gelişimine sebep olduğu, ayrıca

kompleman yolunun aktivasyonunun da oksidatif hasarın ilerlemesine neden olduğu bildirilmiştir (2, 47, 49, 81). Bunlara ek olarak, hemodiyaliz süresince küçük molekül ağırlığındaki antioksidan moleküllerin (vitamin C gibi) membrandan diyaliz olmasının, plazma antioksidan sisteminin yetersiz kalmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (2, 47, 49, 63).

PD tedavisinin değerlendirilmesinde ise, diyalizatın içeriği üzerinde durulmaktadır. Bu tedavi şeklinde diyalizat olarak kullanılan sıvının ozmotik basıncını ayarlamak amacıyla genelde yüksek glukoz konsantrasyonundan faydalanılmaktadır. Diyalizatın yüksek glukoz konsantrasyonu ve ısıtma yoluyla sterilizasyon esnasında oluşan glukoz yıkım ürünlerinin, Maillard reaksiyonunu indükleyerek AGE oluşumunu arttırdığı ve artmış oksidatif stresten sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (60, 65). Diyaliz sırasında kana diffüze olan glukoz ve reaktif karbonil türevlerinin periton membranında protein modifikasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (86).

Miyata ve ark. (57), diyalizatın yüksek glukoz içeriğinin ve ısıtma ile diyaliz sterilizasyonunun reaktif karbonil bileşiklerin oluşumunu arttırdığını belirlemişlerdir. Ancak farklı olarak, diyaliz işlemi sonrası diyalizatta yaptıkları incelemede, karbonhidrat ve lipit kaynaklı reaktif karbonil bileşiklerinin üremik sirkülasyondan diyalizata difüze olduğu anlaşılmıştır. Bunun sonucunda PD hastalarında gerçekleşen protein modifikasyonunun sadece PD solüsyonun içerdiği reaktif karbonil bileşikleri ile değil, aynı zamanda üreminin neden olduğu karbonhidrat ve lipit kaynaklı reaktif karbonil bileşikleri tarafından da meydana getirildiğini belirtmişlerdir.

Renal transplantasyon operasyonunun başarılı olması durumunda ise; hastaların böbrek fonksiyonlarının yaklaşık %50' si hastaya geri kazandırılabilmekte, ancak hastalarda görülen üremik durum, diyaliz tedavisine göre azalmış olsa da, Tx

sonrası devam edebilmektedir. Transplantasyon operasyonunda transplante edilen böbrek dokusunun nefronların metabolik adaptasyonu sırasında gelişen renal kütle azalmasının, arteriyel hipertansiyon, hipoksi nedeniyle vasküler kontraksiyon gibi patolojik olayların neden olduğu immün sistem stimülasyonu, sitokinler tarafından endotelial ve mezangiyal hücre aktivasyonu ve makrofajların yeni dokuya infiltrasyonu sonucunda inflamasyon geliştiği belirtilmiştir. İnflamasyona bağlı olarak Tx hastalarında oksidatif stresin arttığı düşünülmektedir (12).

Tez çalışmamızda, renal replasman tedavilerinin oksidatif stres üzerindeki etkileri protein oksidasyonu üzerinden araştırılmaya çalışılmıştır. KBY'de oksidatif stres oluşturan başlıca mekanizma olarak HOCl'in yer aldığı mekanizmanın üzerinde durulduğu ve bu nedenle protein oksidasyon ürünlerinin KBY hastalarında oksidatif stresin değerlendirilmesinde daha doğru sonuçlar vereceği önceden ifade edilmişti (16).

Bu nedenle çalışmamızda, hasta gruplarında ve kontrol grubunda protein oksidasyonunu değerlendirmek amacıyla; oksidan yolağı katalizleyen enzim olması nedeniyle plazma MPO konsantrasyonu; proteinlerin oksidatif modifikasyon ürünleri olan protein karbonil türevleri (PCC) düzeyi, ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP), 3- nitrotirozin (3-NT) düzeyi, serbest tiyol düzeyi (-SH) ile plazma total antioksidan kapasite (TAK) düzeyleri tayin edilmiştir.

Protein oksidasyonunu değerlendirmek için kullanılan başlıca metot; protein karbonil türevlerinin (PCC) ölçümüdür. Oksidatif stresin erken aşamalarında oluşan ve diğer oksidasyon ürünlerine göre dolaşımda daha uzun süre kalabilen PCC, güvenilir bir oksidasyon belirteci olarak önerilmektedir (16, 32, 65). Protein karbonil türevleri protein omurgasının, ROT ile oksidasyonu sonucu parçalanması ile oluşabileceği gibi, bazı amino asitlerin oksidasyonu ile doğrudan oluşabilirler.

Dolaylı olarak ise glukoz ve diğer karbonhidratlar ile proteinler arasında Maillard reaksiyonu adı verilen bir dizi oksidatif veya oksidatif olmayan non-enzimatik reaksiyon sonucunda da oluşabilirler (58, 63).

Çalışmamızda HD grubunda, tedavi öncesinde (HD1 grubu) kontrol grubuna benzer olan PCC düzeyi, hemodiyaliz işlemi ile artmış, hemodiyalizin 2. saatinde (HD2 grubu) ve 4. saatinde (HD3 grubu) kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p= 0,004$ ). (Şekil 15). PD ve Tx gruplarında ise, plazma PCC düzeyleri kontrol grubuna göre artmış olarak görülse de, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (grup sırasıyla  $p=1$ ,  $p=0.88$ ). Tedavi gruplarının karşılaştırılmasında ise; PD grubu ile HD2 grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ( $p< 0.05$ ) (Şekil 15).

Yaptığımız literatür araştırmasında, renal replasman tedavilerinin sonunda plazma PCC düzeylerinin tayin edildiği çalışmalarda elde edilen sonuçların farklılık gösterdiğini tespit ettik.

Üremili hastalarda, plazma PCC düzeylerinin böbrek yetmezliğinin derecesine bağlı olarak giderek yükseldiği gösterilmiş ve bu mekanizmanın ya oksidatif strese bağlı olarak reaktif karbonil bileşiklerinin artış göstermesiyle, ya da reaktif karbonil bileşiklerinin detoksikasyonunun azalmasına bağlı olarak meydana geldiği ileri sürülmüştür (57, 60). Aynı şekilde, HD tedavisi uygulanan hastalarda diyaliz işlemi sürecinde, plazma PCC düzeylerinin artarak biriktiği bildirilmiştir (3, 37, 47, 48, 73, 89). Bizim çalışmamızda da HD süresince artış gösteren plazma PCC düzeyleri bu bulguları desteklemektedir.

Bunların aksine, Himmelfarb ve ark. (37) yaptıkları çalışmada; diyaliz seansı sırasında, seans sonunda ve hatta seanstan 30 ve 60 dakika sonra bile plazma PCC düzeylerinin değişmediğini tespit etmişler ve bu durumu diyaliz boyunca

oksidasyonun olmadığı şeklinde yorumlamışlardır. Bu sonuca benzer şekilde, Erdoğan ve ark. (23) çalışmalarında gerek HD, gerekse PD tedavisi sonrasında PCC düzeylerinin değişmediğini bulmuşlar ve bu durumu KBY'de var olan oksidatif stresin diyaliz tedavisinden kaynaklanmadığı şeklinde yorumlamışlardır.

PD tedavisi uygulanan hastalarda ise; plazma PCC düzeylerinin yüksek olduğunu bildiren çalışmalar olduğu gibi (1, 44, 48, 73), bizim bulgularımızda görüldüğü gibi, kontrol grubuna benzer olduğunu bildiren yayınlar da (23) yer almaktadır. PD hastalarında diyaliz uygulamasıyla PCC düzeylerinin arttığını bildiren çalışmalarda okside/redükte albumin oranında artış ve glutatyon düzeylerinde azalma olduğu da gösterilmiş ve reaktif karbonil gruplarının detoksikasyonunun glutatyon ve albumin olmak üzere redükte tiyol grupları taşıyan antioksidanlar tarafından gerçekleştirildiği vurgulanmıştır (4, 49).

Tx operasyonu gerçekleştirilmiş KBY hastalarında ise plazma PCC düzeyleri yayınlarda kontrol grubuna benzer düzeylerde belirlenmiştir (1, 3, 4).

Çalışmamızda; HD tedavisi süresince plazma PCC düzeylerinin artmış olarak saptanması, bu tedavi şeklinin protein oksidasyonunu arttırdığını göstermektedir. Bu durum HD tedavisi sürecinde protein karbonil bileşiklerinin plazmada birikerek karbonil stresin artmasıyla veya PCC bileşiklerinin detoksikasyonunun yetersiz kalmasıyla açıklanabilir.

PD ve Tx gruplarında ise, plazma PCC gruplarındaki artışın kontrol grubuna göre anlamsız olması, bu tedavi şekillerinde PCC'lerin "karbonil stres" oluşturacak kadar artış göstermediğini ve PCC'lerin plazmada birikiminin engellendiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda PD grubu ile HD2 grubu arasında PCC düzeyleri arasında anlamlı farklılık saptanması, PD tedavisinin protein oksidasyonu üzerine HD tedavisi

kadar olumsuz bir etkisinin olmadığına işaret etmekte ve literatür bulgularını desteklemektedir.

Miyeloperoksidaz enziminin, üremik hastalarda oksidatif stresin artışından sorumlu tutulan başlıca mediyatör olması nedeniyle, gerek KBY' de gerekse RRT uygulanmakta olan hastalarda, plazma MPO düzeyi tayini sıklıkla kullanılan, spesifik bir inflamasyon/oksidasyon belirteçidir (11, 34, 36). Çalışmamızda plazma MPO konsantrasyonlarının; hemodiyaliz öncesi grupta (HD1 grubu), kontrol grubuna benzer düzeyde olduğu, hemodiyalizin 2. saatinde (HD2 grubu) arttığı, hemodiyalizin 4. saatinde (HD3 grubu) en yüksek değere ulaştığını belirledik ( $p < 0,001$ ). Benzer şekilde; PD grubunda ve TX grubunda da plazma MPO konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığını belirledik ( $p < 0,001$ ) (Şekil 16). Tedavi gruplarını kendi aralarında karşılaştırdığımızda ise; HD3 grubu plazma MPO değerlerinin, PD grubuna göre ( $p < 0,01$ ) ve Tx grubuna göre ( $p < 0,05$ ) anlamlı derecede yüksek olduğunu tespit ettik (Şekil 16).

Literatürde yer alan değişik çalışmalarda da replasman tedavisi (HD ve PD tedavisi) uygulanan hastalarda, plazma MPO konsantrasyonu sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek olarak bulunmuş ve KBY hastalarında üremiden kaynaklanan inflamasyona ek olarak, HD işleminde kullanılan yapay membranlar ile kanın temas etmesi sonucunda da fagositlerin ve kompleman yolunun aktive olduğu; buna bağlı olarak MPO ve ROT üretiminin arttığı ileri sürülmüştür (2, 47, 49, 81). Capeillere-Blandin ve ark. (11), HD tedavisi süresince plazma MPO konsantrasyonunun ve aktivitesinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde arttığını ifade etmişlerdir. Bu bulguyu destekler şekilde, HD süresince MPO sentezinden sorumlu olan reseptörün, MPO plazma konsantrasyonunun ve aktivitesinin diyaliz öncesine ve sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiğini bildiren

yayınlar mevcuttur (36, 87). Renal replasman tedavisi gruplarındaki yüksek MPO düzeyleri; KBY hastalarında var olan üreminin bu tedaviler ile yeterli düzeyde giderilememesiyle ve/veya HD tedavisinde kullanılan yapay membranların nötrofil aktivasyonuna neden olarak MPO üretimini arttırmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Çalışmamızda HD ve PD gruplarında plazma MPO düzeyi ile ilgili bulgularımız da bu sonuçları desteklemektedir. Kullanılan tedavi yöntemleri arasında en yüksek plazma MPO düzeyinin HD3 grubunda gözlenmiş olması; bu artışın HD işleminde kullanılan yapay membrandan ileri gelebileceği görüşünü kuvvetlendirmektedir. PD grubunda gözlenen artış ise hastalarda var olan üremik toksinlerin uzaklaştırılmasında PD diyalizinin yetersiz kalmasıyla açıklanabilir.

Çalışmamızda, Tx grubunda MPO düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunması; operasyon sonrasında renal fonksiyonların geri kazanılmış olmasına rağmen, inflamasyona neden olan üremi durumunun yeteri kadar giderilemediğini düşündürmektedir.

Yüksek derecede okside proteinler olan ileri oksidasyon protein ürünleri (AOPP); KBY sürecinde oksidatif stresi yansıtan önemli bir belirteç olarak kabul görmüştür. AOPP'nin disülfid köprüleri ve/veya tirozin çapraz bağlarını içeren albumin agregatlarından oluştuğu, hem saf hem de plazma albumininden farklı yapıda olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle albuminin son çapraz bağlanma ürünleri olarak isimlendirilmiş ve kendi klirensini dahi önleyebilecek büyük bir molekül ağırlığına sahip olmasından dolayı, doku ve plazmalarda biriktiği bildirilmiştir (85). İleri oksidasyon protein ürünlerinin, *in vitro* şartlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye göre, HOCl'e maruz kalan saf/ plazma albumin örneklerinden meydana geldiği gösterilmiş olup, *in vivo* olarak aktif nötrofillerce üretilen HOCl'in AOPP oluşturabileceği düşünülmektedir (85).

Çalışmamızda plazma PCC ve MPO düzeylerine benzer şekilde, plazma AOPP düzeylerinin de HD öncesi (HD1 grubu) yükselmiş olarak gözlenmesine rağmen, kontrol grubuna göre anlamlı fark göstermediği, diğer taraftan hemodiyalizin 4.saati olan HD3 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükselmiş olduğunu belirledik ( $p < 0,001$ ) (Şekil 17). PD grubu hastalarında ise plazma AOPP düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı derece yüksek olarak bulunmuş ( $p < 0,001$ ), Tx grubu hastalarda ise kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği görülmüştür ( $p < 0,001$ ) (Şekil 17).

Literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda, SDBY (25, 85, 86) ve diyaliz tedavisi alan KBY hastalarında (3, 25, 85, 89) AOPP plazma düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek olduğu bildirilmiştir. Witko-Sarsat ve ark. (85) plazma AOPP düzeylerinin, HD hastalarında en yüksek olmak üzere, PD uygulanan hastalarda ve diyaliz tedavisi almayan KBY hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre artmış olduğunu ileri sürmüşlerdir.

HD tedavisi öncesinde kontrol grubuna göre yüksek olan AOPP düzeylerinin tedavi ile daha da yükseldiğini (11, 85, 86) ya da değişmediğini (83) belirten çalışmalar da mevcuttur. PD tedavisinde ise plazma AOPP düzeyinin kontrol grubuna göre yükseldiğini bildiren çalışmaların (44, 85) yanı sıra, PD tedavisi öncesinde, kontrol grubuna göre yüksek olarak belirlenen AOPP düzeyinin diyalizden sonra azaldığı da rapor edilmiştir (7).

Çalışmamızda; HD tedavisi süresince plazma MPO düzeyine benzer şekilde artış gösteren AOPP düzeyleri, HOCl aracılı protein oksidasyonunun arttığını ileri süren çalışmaları desteklemektedir (86). PD grubunda da kontrol grubuna göre artış gösteren AOPP düzeyleri üremi durumunun PD tedavisi ile giderilemediğini ve oksidatif stresin diyaliz sonrasında da devam ettiğini göstermektedir.



Renal transplantasyon operasyonu sonrasında böbrek fonksiyonları stabil olan Tx hastalarında ise; iki ayrı çalışmada da AOPP düzeylerinin, kontrol grubuna benzer bulunduğu ifade edilmiştir (3, 4). Bizim Tx grubunda elde ettiğimiz sonuçlar da bu bulguları destekler niteliktedir.

Proteinlerdeki tirozil kalıntılarının fenolik halkalarında gerçekleşen nitrasyon sonucunda meydana gelen 3-NT, hem peroksinitrit anyonu aracılı oksidasyon, hem de MPO katalizli protein oksidasyonunu belirlemek için kullanılan uygun ve spesifik bir belirteç olarak önerilmektedir.

Böbrek yetmezliği de dahil olmak üzere bir çok hastalıkta, hücre proteinlerindeki tirozil kalıntılarının nitrik oksit radikali (NO<sup>•</sup>) aracılı nitrolanması sonucu oluşan, 3- *nitrotirozin* oksidasyon ürününün, dokularda ve plazmada birikerek nitro-oksidatif strese yol açtığı bilinmektedir (5, 27, 38, 66, 74, 79).

Mitrogianni ve ark.'ları (55) hemodiyaliz tedavisi görmekte olan hastalarda plazma proteinlerinin nitrolanmasını Western-blotting yöntemiyle göstermeye çalışmışlar ve HD sonrası plazma 3-NT düzeylerini kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulduklarını; HD öncesi ile HD sonrasında plazma 3- NT düzeyleri arasında ise bir fark bulamadıklarını bildirmişlerdir.

3-nitrotirozin doku ve plazma düzeylerinin çok düşük olması nedeniyle, bu konuda yapılan az sayıdaki çalışmada hem metodolojik açıdan hem de elde edilen sonuçlar açısından farklılıklar bulunmaktadır (24, 79). Yaptığımız literatür araştırmasında; 3- nitrotirozinin doku ve plazmadaki düzeylerinin belirlenmesinde uygun yöntemler olarak; mass spektrometresi ve HPLC ile tayin önerilmektedir (24).

Çalışmamızda, sadece HD grubunda gerçekleştirebildiğimiz 3-nitrotirozin düzeyleri, HPLC-ECD yöntemine göre tayin edilmiştir. *In vivo* tirozin nitrolanmasının MPO aracılı bir mekanizmaya dayanması nedeniyle, plazma MPO

düzeylerindeki artış doğrultusunda 3-nitrotirozin düzeylerinin de artmasını beklediğimiz halde, çalışmamızda HD öncesi (HD1 grubu) ve HD sonrası (HD3 grubu) nitrotirozin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlılık göstermemiştir ( $p < 0,296$ ) (Şekil 18). 3-NT plazma düzeylerinin çok düşük olması; elde ettiğimiz bu sonucun kullandığımız yöntemin duyarlılığı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Plazmanın başlıca antioksidanlarından olan serbest tiyol gruplarının (-SH) büyük bölümü albumin, glutatyon ve sistein üzerinde lokalize bulunmaktadır. Serbest tiyol gruplarının HOCl ve kloramin bileşiklerini yakalayan en önemli antioksidan molekül olduğu bilinmekte (34, 37) olup ayrıca, reaktif karbonil bileşikleri de serbest tiyol grupları tarafından etkisiz hale getirilmektedir (56). Bu nedenle tiyol oksidasyonunun ölçümü önemli bir oksidatif stres belirteci olarak kabul görmüştür (56). Plazma serbest tiyol gruplarının belirlenmesi doğrudan serbest tiyol düzeyi tayiniyle yapılabileceği gibi, serbest tiyol gruplarını taşıyan, plazma okside/redükte albumin oranı veya redükte glutatyon gruplarının ölçümüyle de gerçekleştirilebilir.

Çalışmamızda tüm tedavi gruplarında, plazma tiyol grubu düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış olarak belirlenmiştir ( $p < 0,001$ ). Ayrıca, HD sonrası (HD3 grubu) plazma tiyol düzeylerinin HD öncesine (HD1 grubu) göre, anlamlı olmasa da, artmış olduğunu tespit ettik (Şekil 18).

Literatürde KBY hastalarında plazma tiyol düzeylerinin azaldığını bildiren çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (34, 36, 37). Himmelfarb ve ark. (35), tüm KBY ve HD uygulanan hastalarda plazma tiyol grubu düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre azalmış olduğunu belirlemişler ve bunu ‘tiyol stres’ olarak isimlendirmişlerdir. Ayrıca PD ve HD hastalarında, redükte/okside sistein oranlarının diyaliz tedavisi

almayan hastalara göre daha düşük konsantrasyonda olduğunu da rapor edilmiştir. Bu bulguyu destekleyen bir diğer çalışmada ise, protein tiyol gruplarının böbrek yetmezliğinin derecesine bağlı olmaksızın azalması, oksidatif stres ürünlerinin plazmada birikmesi ile ilişkilendirilmiştir (56).

Benzer çalışmalarda, KBY hastalarında ve replasman tedavisi uygulanan hastalarda tespit edilen plazma tiyol grubu düzeylerindeki azalmanın, plazmanın antioksidan düzeyindeki azalmanın veya yetersizliğin göstergesi olarak da değerlendirilebileceği ileri sürülmüştür (89). Simmic-Ogrizovic ve ark.'ları (78), böbrek transplantasyonu sonrasında hastalarda, plazma tiyol düzeyinin kontrol grubuna göre azalmış olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda tüm tedavi gruplarında plazma tiyol grubu düzeylerinin azalmasının nedeni; literatürlerde de belirtildiği gibi, uygulanan tedaviler ile oksidatif stresin artmasıyla, antioksidan olan tiyollerin tüketilmesi olarak yorumlanabilir.

Ayrıca bizim bulgularımıza benzer şekilde, HD sonrası tiyol grubu düzeyinin HD öncesine göre nispeten yükseldiğini gösteren çalışmalar da literatürde yer almaktadır (42,46). Bu durum, tedavi öncesinde de oksidatif stresin olduğunu ve HD tedavisiyle proteine bağlı oksidan ajanların uzaklaştırılması sonucunda, proteine bağlı olarak bulunan tiyol gruplarının serbest hale geçmesinin antioksidan sisteme katkıda bulunduğu şeklinde açıklanmaya çalışılmıştır (42, 46).

Plazmada bulunan antioksidanlar ayrı ayrı ölçülebilse de çok sayıda antioksidan molekül olması ve birbirleriyle etkileşim halinde olmaları nedeniyle, oksidatif stresin ortaya koyulmasında total antioksidan kapasite (TAK) düzeyini gösteren testlerin daha değerli olduğu düşünülmektedir (68).

Çalışmamızda HD öncesi (HD1 grubu) plazma TAK düzeyi kontrol grubuna benzer bulunurken, HD sonrasında (HD3 grubu) kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmış olduğu saptanmıştır ( $p < 0.001$ ) (Şekil 21). Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada HD sonrası (HD3 grubu) plazma TAK düzeyi, HD öncesine göre (HD1 grubu) anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). PD ve Tx gruplarında ise plazma TAK düzeyi kontrol grubuna benzer bulunurken, gruplar arasındaki karşılaştırmada PD ve Tx grupları plazma TAK düzeyleri HD3 grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).

Literatür araştırmamızda; KBY hastalarında ve renal replasman tedavisi uygulanan hastalarda plazma TAK düzeyinin arttığını, değişmediğini veya azaldığını bildiren çelişkili sonuçların yer aldığını tespit ettik. Dascher ve ark. (17), HD ve PD hastalarında plazma TAK düzeyinin normal olduğunu ve diyaliz boyunca değişmediğini belirtirken; başka bir çalışmada HD öncesi ile sonrasında (75) ve PD uygulanan hastalarda (6, 75) plazma TAK düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş, ayrıca plazma MDA ve TAK düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirilmiştir (75). Benzer olarak Erdoğan ve ark. (23) da HD ve PD hasta gruplarında TAK düzeylerini kontrol grubuna oranla iki kat artmış olarak bulmuşlar; serum MDA düzeylerini kontrole göre farklı bulamadıklarından, oksidatif stresin KBY'li hastalarda serum TAK'daki artış nedeniyle tehdit oluşturmadığı sonucuna varmışlardır.

Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda, HD hastalarında diyaliz işlemi ile vitamin C'nin belirgin şekilde kaybolduğunu ve buna paralel olarak oksidatif stres parametresi olan MDA'nın arttığı bildirilmiştir (61). Bu görüşü destekleyecek nitelikte, farklı çalışmalarda da HD işleminin serum total antioksidan kapasitesiyi azalttığı ve küçük molekül yapısındaki antioksidanların diyaliz esnasında

kaybedildiği belirlenmiş, bu hastalarda görülen yüksek ürik asit düzeyinin ise TAK' deki azalmayı maskeleydiği düşüncesi önem kazanmıştır (23, 54, 63).

Renal transplantasyon sonrası hasta plazmalarında, TAK düzeyinin yükseldiğini ancak kontrol grubu düzeyine ulaşamadığını bildiren farklı çalışmalar da mevcuttur (62, 67, 78). Bu karışıklığın, TAK tayininde kullanılan yöntemlerin metodolojik farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmekte; artan oksidatif stres ve hemodiyaliz işlemi suda çözünen antioksidan moleküllerin membrandan difüze olması sonucunda (61, 63, 90) TAK düzeyinin azalmasının beklendiği ileri sürülmektedir.

Bizim sonuçlarımızda, plazma TAK düzeylerinin HD uygulamasıyla azalması, hemodiyaliz sürecinde oksidatif stresin arttığını gösteren diğer parametrelere ait bulgularımızla uyum göstermektedir.

Renal replasman tedavileri genel olarak değerlendirildiğinde; HD tedavisi öncesine göre, HD işlemi ile yükseldiği belirlenen MPO, PCC, AOPP düzeylerinin yanı sıra serbest tiyol ve plazma TAK düzeylerinin anlamlı derecede azalmış olması, HD tedavisinin oksidatif stresi arttırdığını işaret etmektedir. Benzer olarak PD hastalarında da plazma MPO, AOPP, gibi protein oksidasyon parametreleri kontrol grubuna göre artmış, serbest tiyol grubu düzeyi ise azalmış olarak tespit edilmiş olup oksidatif stresin, HD tedavisi kadar olmasa da, PD tedavisinin sonunda da yükseldiğini göstermektedir. İlgili yayınlarda PD hastalarında yüksek permeabiliteye sahip peritonun, diyalizör görevi yapması ve rezidüel renal fonksiyonun daha iyi olması nedeniyle üremik toksinlerin daha etkili bir şekilde temizlenmesine neden olduğu görüşü (14, 58) bizim sonuçlarımızla da desteklenmiştir. Transplantasyon hastalarında ise AOPP ve PCC grupları kontrol grubuna benzer düzeylerde bulunurken kontrol grubundan anlamlı derecede farklı olarak belirlenen plazma MPO

ve tiyol grubu düzeyleri; Tx hastalarında oksidatif stresin varlığına işaret etmektedir. Transplantasyon sonrası hastaların üremi durumunun, HD ve PD tedavilerine göre daha iyi olmakla birlikte, normale dönmemesinden kaynaklandığını düşündürmüştür.

Çalışmamızda sonuç olarak; KBY hastalarına uygulanan renal replasman tedavileri arasında oksidatif stres üzerine en az artış oluşturan yöntemin renal transplantasyon olduğu belirlenmiştir. Böbrek fonksiyonları normale dönmüş olan Tx hastalarından oluşturduğumuz grupta, PCC ve AOPP düzeylerinin artış göstermemesi karbonil stres durumunun normale döndüğünü, plazma MPO düzeyinin artışı ise inflamasyona bağlı bir oksidatif stres durumunun geliştiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, Tx tedavisinin oksidatif stres üzerine etkisi ile ilişkili az sayıdaki literatüre katkı sağlayabilecektir.

İdame diyaliz tedavileri arasında ise; PD tedavisinin HD tedavisine göre, oksidatif stres üzerinde daha az artışa neden olduğunu belirlediğimiz çalışmamızda, diyaliz membranı olarak periton zarının kullanılmasının daha uygun bir tedavi şekli olduğunu ve tedavi süresince oksidatif stresin en fazla artış, antioksidan kapasitenin ise azalma gösterdiği HD tedavisi uygulanan hastalara antioksidan destek tedavisi verilmesinin yararlı olacağını düşünmekteyiz.

## ÖZET

### **KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİNDE HEMODİYALİZ VE PERİTON DİYALİZİNİN OKSİDATİF STRES ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Bu çalışmada, KBY hastalarında uygulanan RRT'den HD ve PD tedavilerinin oksidatif stres durumuna etkileri, protein modifikasyonu üzerinden incelendi. Ayrıca bir diğer tedavi şekli olan transplantasyonun (Tx) da oksidatif stres üzerindeki etkisi araştırıldı. Bu amaçla; hemodiyaliz (HD) (n= 20), periton diyalizi (PD) (n= 20) ve renal transplantasyon gerçekleştirilmiş (Tx) (n= 20) KBY hastaları olmak üzere çalışma grupları oluşturuldu. Ayrıca HD grubu da kendi içerisinde HD öncesi HD1 grubu, HD'nin 2.saati HD2 grubu ve HD'nin 4.saati HD3 grubu olarak ayrıldı.

Bu gruplarda plazma protein oksidasyonu belirteçleri olan; PCC, MPO, AOPP, 3-NT, serbest tiyol grubu ve TAK düzeyleri tayin edildi.

Yapılan çalışmalar sonucunda, uygulanan tedavi şekillerinde plazma protein oksidasyonu belirteçlerinden MPO düzeyleri, en fazla HD grubunda olmak üzere tüm gruplarda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede yükseldiği belirlendi. Plazma PCC düzeyleri ise; HD grubunda anlamlı derecede yüksek bulunurken, PD ve Tx gruplarında kontrol grubuna benzer bulundu. AOPP düzeyleri ise; PD ve HD

gruplarında anlamlı derecede artmış olduğu halde, Tx grubunda anlamlı bir değişiklik göstermedi. Plazma tiyol grubu düzeylerinin ise, tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Plazma TAK düzeyleri; HD grubunda anlamlı derecede azalırken, PD ve Tx gruplarında kontrol grubuna benzer düzeyde bulundu.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, RRT'nin, HD tedavisi, PD tedavisi ve Tx tedavisi azalan sıralaması içerisinde, oksidatif stresi arttırdığını belirledik. Diyaliz tedavileri içinde PD tedavisi; oksidatif stres üzerindeki olumsuz etkisinin HD'ye göre daha az olması nedeniyle, daha uygun bir tedavi yöntemi olarak önerilebilir.



## **ABSTRACT**

### **THE EFFECTS OF HEMODIALYSIS AND PERITONEAL DIALYSIS ON OXIDATIVE STRESS IN CHRONIC RENAL FAILURE**

In this study, the effects of RRTs to CRF patients on oxidative stress was evaluated by measuring protein modifications. For this aim, hemodialysis (HD) (n=20), peritoneal dialysis (PD) (n=20) and renal transplanted (Tx) (n=20) working groups were established. Furthermore, HD group was subdivided into three groups as the preHD (HD1), 2.nd hour of HD (HD2) and 4.nd hour of HD (HD3).

In these groups; PCC, MPO, AOPP, free thiol groups and TAC levels were detected as plasma protein oxidation markers.

Our results showed that MPO levels are significantly increased in all groups compared to control group. Plasma PCC levels found significantly increased in HD, while PD and Tx showed similar levels to controls. AOPP levels were detected significantly increased in HD and PD groups but not in Tx group. Plasma thiol groups are decreased in all groups in comparison to control group. Plasma TAC levels of PD and Tx were similar to control group, only HD group has a decreased level of plasma TAC levels.

Our results revealed that RRTs increase oxidative stress and its degree is as HD> PD>TX treatments. This study suggests that PD treatment is a suitable

treatment process compared to HD, since it has less negative effect on oxidative stress.

## YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Agalou, S., Ahmed, N., Dawnay, A., Thornalley, P. J. (2003). Removal of advanced glycation end products in clinical renal failure by peritoneal dialysis and haemodialysis, *Biochem Soc Trans.*, 31 (6): 1394-6
2. Amore, A., Coppo, R.(2002) Immunological basis of inflammation in dialysis, *Nephrol Dial Transplant.*, 17 (Suppl 8): 16-24
3. Antolini, F., Valente, F., Ricciardi, D., Baroni, M., Fagugli, R. M. (2005) Principal component analysis of some oxidative stress parameters and their relationships in hemodialytic and transplanted patients, *Clin Chim Acta.*, 358 (1-2): 87-94.
4. Antolini, F., Valente, F., Ricciardi, D., Fagugli, R. M. (2004). Normalization of oxidative stress parameters after kidney transplant is secondary to full recovery of renal function, *Clin Nephrol.*, 62 (2): 131-7.
5. Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (33): 20313- 6.
6. Bibi, G., Green, Y., Nagler, R. M. (2008). Compositional and oxidative analysis in the saliva and serum of predialysis chronic kidney disease patients and end-stage renal failure patients on peritoneal dialysis, *Ther Apher Dial.*, 12 (2): 164-70.
7. Boulanger, E., Moranne, O., Wautier, M. P., Witko-Sarsat, V., Descamps-Latscha, B., Kandoussi, A., Grossin, N., Wautier, J. L. (2006). Changes in glycation and oxidation markers in patients starting peritoneal dialysis: a pilot study, *Perit Dial Int.*, 26 (2): 207-12

8. Bozfakıoğlu, S. (çeviri edit.) (1997). *Diyaliz El Kitabı*, Nobel Tıp Kitapevleri.
9. Bryan, N.S., and Grisham, M. B., (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples, *Free Radic Biol Med.*, 43 (5): 645-57.
10. Capeillère-Blandin C, Gausson V, Descamps-Latscha B, and Witko-Sarsat V. (2004). Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products, *Biochim Biophys Acta.*, 1689 (2): 91-102.
11. Capeillère-Blandin, C., Gausson, V., Nguyen, A. T., Descamps-Latscha, B., Drüeke, T., Witko-Sarsat, V. (2006). Respective role of uraemic toxins and myeloperoxidase in the uraemic state, *Nephrol Dial Transplant.*, 21 (6): 1555-63.
12. Cottone, S., Palermo, A., Vaccaro, F., Raspanti, F., Buscemi, B., Incalcaterra, F., Cerasola, G. (2006). In renal transplanted patients inflammation and oxidative stress are interrelated, *Transplant Proc.*, 38 (4): 1026-30.
13. Çavdar, C., Sifil, A., Çamsarı, T. (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma, *Türk Nefroloji Diyaliz Ve Transplantasyon Dergisi*, 3- 4: 92-95.
14. Çeliker, H., Elkiran, B., İlhan, N., Günal, A. İ., Günal, İ., Doğukan, A. (2001). Hemodiyaliz ve periton diyalizinin oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 10 (2): 88- 92.
15. Dalle- Done, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., and Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease, *Clinical Chemistry.*, 52 (4): 601- 623.

16. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clin Chim Acta.*, 329 (1-2): 23-38.
17. Daschner, M., Lenhartz, H., Bötticher, D., Schaefer, F., Wollschläger, M., Mehls, O., Leichsenring, M. (1996). Influence of dialysis on plasma lipid peroxidation products and antioxidant levels, *Kidney Int.*, 50 (4): 1268-72.
18. De Zwart, L. L., Meerman, J. H. N., Commandeur J. N. M. And Vermeulen, N. P. E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans, *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 202- 26.
19. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., and Davies, M. J. (1997). Biochemistry and pathology of radical- mediated protein oxidation, *Biochem. J.*, 324: 1-18.
20. Deng, G., Vaziri, N. D., Jabbari, B., Ni, Z., Yan, X. X. (2001). Increased tyrosine nitration of the brain in chronic renal insufficiency: reversal by antioxidant therapy and angiotensin-converting enzyme inhibition, *J Am Soc Nephrol.*, 12 (9): 1892-9.
21. Descamps-Latscha, B., Drüeke, T., Witko-Sarsat, V. (2001). Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy, *Semin Dial.*, 14 (3): 193-9.
22. Devlin, T. M. (edit.) (2002), Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Wiley- Liss Pub., New York.
23. Erdoğan, C., Unlüçerçi, Y., Türkmen, A., Kuru, A., Cetin, O., Bekpinar, S. (2002). The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure, *Clin Chim Acta.*, 322 (1-2): 157-61.

24. Frost, M. T., Halliwell, B., Moore, K. P. (2000). Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts, *Biochem J.*, 345 (3): 453-8.
25. Galli, F. (2007). Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients, *Nephrol Dial Transplant.*, 22 (Suppl 5): 20-36.
26. Gilbert, D. L., Colton, C. (edit.) (1999). Reactive Oxygen Species in Biological Systems, Chapter 19, Kluwer Academic/ Plenum Pub., New York.
27. Gilbert, D. L., Colton, C. (edit.) (1999). Reactive Oxygen Species in Biological Systems, Chapter 2, Kluwer Academic/ Plenum Pub., New York.
28. Gilbert, D. L., Colton, C. (edit.) (1999). Reactive Oxygen Species in Biological Systems, Chapter 8, Kluwer Academic/ Plenum Pub., New York.
29. Halliwell, B. (1987). Oxidant and human disease: some new concepts, *FASEB J.*, 1: 358- 64.
30. Halliwell, B., Gutteridge, M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, 219: 1- 14.
31. Heinzelmann, M., Mercer-Jones, M. A., Passmore, J. C. (1999). Neutrophils and renal failure, *Am J Kidney Dis.*, 34 (2): 384-99.
32. Hensley, K., and Floyd, R. A. (2003). Methods In Biological Oxidative Stres, Chapter 18, Humana Press, Totowa, NJ.
33. Herce-Pagliai, C., Kotecha, S., and Shuker, D. E . (1998). Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review, *Nitric Oxide.*, 2 (5): 324-36.

34. Himmelfarb, J., and McMonagle, E. (2001). Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia, *Kidney International*, 60: 358-363.
35. Himmelfarb, J., and McMonagle, E. (2001). Manifestations of oxidant stress in Uremia, *Blood Purif.*, 19: 200-5.
36. Himmelfarb, J., McMenamin, M. E., Loseto G., Heinecke J. W. (2001) Myeloperoxidase-catalyzed 3-chlorotyrosine formation in dialysis patients, *Free Radic Biol Med.*, 31 (10): 1163-9.
37. Himmelfarb, J., McMonagle, E., and McMenamin, E. (2000). Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure, *Kidney International.*, 5: 2571-8.
38. Hurst, J. K. (2002). Whence nitrotyrosine?, *J Clin Invest.*, 109 (10): 1287-9.
39. Hwang, E., Kim, G. (2007). Biomarkers for oxidative stress status of DNA, lipids, and proteins in vitro and in vivo cancer research, *Toxicology*, 241 (1-2): 1- 10.
40. Ishida, N., Hasegawa, T., Mukai, K., Watanabe, M., Nishino, H. (2002). Determination of nitrotyrosine by HPLC-ECD and its application, *J Vet Med Sci.*, 64 (5): 401-4 .
41. İliçin, G., Biberoglu, K., Süleymanlar, G., Ünal S. (edit.) (2003). İç Hastalıkları, Güneş Yayınevi, Ankara.
42. Jackson, P., Loughrey, C. M., Lightbody, J. H., McNamee, P. T., Young, I. S. (1995). Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure, *Clin Chem.*, 41 (8 Pt 1): 1135-8.

43. Kayalı, R., Çakatay, U. (2004). Protein oksidasyonunun ana mekanizmaları, *Cerrahpaşa J Med.*, 35: 83- 9.
44. Kocak, H., Gumuslu, S., Sahin, E., Ceken, K., Gocmen, Y. A., Yakupoglu, G., Ersoy, F. F., Tuncer, M. (2009). Advanced oxidative protein products are independently associated with endothelial function in peritoneal dialysis patients, *Nephrology (Carlton)*, 14 (3): 273-80.
45. Koster, J. F., Biemond, P., Swaak, A. J. (1986). Intracellular and extracellular sulphhydryl levels in rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis.* 45 (1): 44-6.
46. Köken, T., Kahraman, A., Sereser, M., Çetinkaya, G. (2001). Hemodiyalizin protein karbonil içeriği ve sülfidril grupları düzeyi üzerine etkisi, *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, 10 (2): 83-5.
47. Köken, T., Kahraman, A., Serteser, M., Gökçe, Ç. (2004). Hemodiyaliz ve oksidatif stres, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5: 9-13.
48. Köken, T., Serteser, M., Kahraman, A., Gökçe, C., Demir, S. (2004). Changes in serum markers of oxidative stress with varying periods of haemodialysis, *Nephrology (Carlton)*, 9 (2): 77-82.
49. Latcha, S., Hong, S., Gibbons, N., Kohn, N., Mattana, J. (2008). Relationship between dialysate oxidized protein and peritoneal membrane transport properties in patients on peritoneal dialysis, *Nephrol Dial Transplant.*, 23 (10): 3295-301.
50. Leung, A. K., Yan, W. W. (2009). Renal replacement therapy in critically ill patients, *Hong Kong Med J.*, 15 (2): 122-9.



51. Locatelli, F., Canaud, B., Eckardt, K. U., Stenvinkel, P., Wanner, C., Zoccali, C. (2003). Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome, *Nephrol Dial Transplant.*, 18 (7): 1272-80.
52. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem.*, 193 (1): 265-75.
53. Matthijsen, R. A., Huugenü, D., Hoebbers, N. T. , de Vries, B., Peutz-Kootstra, C. J., Aratani, Y., Daha, M. R. , Tervaert, J. W., Buurman, W. A., Heeringa, P. (2007). Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage after renal ischemia reperfusion, *Am J Pathol.*, 171 (6): 1743-52.
54. Mayer, B., Zitta, S., Greilberger, J., Holzer, H., Reibnegger, G., Hermetter, A., Oetl, K. (2003). Effect of hemodialysis on the antioxidative properties of serum, *Biochim Biophys Acta.*, 1638 (3): 267-72.
55. Mitrogianni, Z., Barbouti, A., Galaris, D., Siamopoulos, K. C. (2004). Tyrosine nitration in plasma proteins from patients undergoing hemodialysis, *Am J Kidney Dis.*, 44 (2): 286-92
56. Miyata ,T., Saito, A., Kurokawa, K., van Ypersele de Strihou, C. (2001). Advanced glycation and lipoxidation end products: reactive carbonyl compounds-related uraemic toxicity, *Nephrol Dial Transplant.*, 16 (Suppl 4): 8-11.
57. Miyata, T., Horie, K., Ueda, Y., Fujita, Y., Izuhara, Y., Hirano, H., Uchida, K., Saito, A., van Ypersele de Strihou, C., Kurokawa, K. (2000). Advanced glycation and lipidoxidation of the peritoneal membrane: respective roles of serum and peritoneal fluid reactive carbonyl compounds, *Kidney Int.*, 58 (1): 425-35.

58. Miyata, T., Kurokawa, K., and Strihou, C. V. Y. (2000). Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications, *Kidney International.*, 76: 120-125.
59. Miyata, T., Sugiyama, S., Saito, A., Kurokawa, K. (2001). Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity ("carbonyl stress"), *Kidney Int Suppl.*, 78: 25-31.
60. Miyata, T., van Ypersele de Strihou, C., Kurokawa, K., Baynes, J. W. (1999). Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications, *Kidney Int.*, 55 (2): 389-99.
61. Morena, M., Cristol, J. P., Bosc, J. Y., Tetta, C., Forret, G., Leger, C. L., Delcourt, C., Papoz, L., Descomps, B., Canaud, B. (2002). Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients, *Nephrol Dial Transplant.*, 17 (3): 422-7.
62. Moreno, J. M., Ruiz, M. C., Ruiz, N., Gomez, I., Vargas, F., Asensio, C., Osuna, A. (2005). Modulation factors of oxidative status in stable renal transplantation, *Transplant Proc.*, 37 (3): 1428-30.
63. Nakayama, K., Terawaki, H., Nakayama, M., Iwabuchi, M., Sato, T., and Ito, S. (2007). Reduction of serum antioxidative capacity during hemodialysis, *Clin Exp Nephrol*, 11: 218- 224.
64. Nemirovskiy, O. V., Radabaugh, M. R., Aggarwal, P., Funckes-Shippy, C. L., Mnich, S. J., Meyer, D. M., Sunyer, T., Rodney Mathews, W., Misko, T. P.

- (2009). Plasma 3-nitrotyrosine is a biomarker in animal models of arthritis: Pharmacological dissection of iNOS' role in disease, *Nitric Oxide.*, 20 (3):150-6.
65. Oberg, B. P., McMenamin, E., Lucas, F. L., McMonagle, E., Morrow, J., Ikizler, T. A., Himmelfarb, J. (2004). Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease, *Kidney Int.*, 65 (3): 1009-16.
66. Ohshima, H., Celan, I., Chazotte, L., Pignatelli, B., and Mower, H. F. (1999). Analysis of 3-nitrotyrosine in biological fluids and protein hydrolyzates by high-performance liquid chromatography using a postseparation, on-line reduction column and electrochemical detection: results with various nitrating agents, *Nitric Oxide.*, 3 (2): 132-141.
67. Ozden, M., Maral, H., Akaydin, D., Cetinalp, P., Kalender, B. (2002). Erythrocyte glutathione peroxidase activity, plasma malondialdehyde and erythrocyte glutathione levels in hemodialysis and CAPD patients, *Clin Biochem.*, 35 (4): 269-73.
68. ÖgüŖ, E., Meriç Yılmaz, F., Yılmaz H., Duranay, M., Yücel, D. (2004). Hemodiyaliz ve periton diyalizi hastalarında serum malonaldehit düzeyleri ve oksidasyona yatkınlık, *T Klin J Med Sci.*, 24: 316-322.
69. Rabbani, N., Thornalley, P. J. (2009). Quantitation of markers of protein damage by glycation, oxidation, and nitration in peritoneal dialysis, *Perit Dial Int.*, 29 (Suppl 2): 51-6.
70. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.(1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic Biol Med.*, 26 (9-10): 1231-7.

71. Reznick, A. Z., Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay, *Methods Enzymol.*, 233:357-63.
72. Rubbo, H., Radi, R. (2008). Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury, *Biochim Biophys Acta.*, 1780 (11): 1318-24.
73. Ruiz, M. C., Portero-Otín, M., Pamplona, R., Requena, J. R., Prat, J., Lafarga, M. A., Borràs, M., Bellmunt, M. J. (2003). Chemical and immunological characterization of oxidative non-enzymatic protein modifications in dialysis fluids, *Perit Dial Int.*, 23 (1): 23-32.
74. Ryberg, H. and Caidahl, K. (2007). Chromatographic and mass spectrometric methods for quantitative determination of 3-nitrotyrosine in biological samples and their application to human samples, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, 851 (1-2): 160-171.
75. Samouilidou, E., Grapsa, E. (2003). Effect of dialysis on plasma total antioxidant capacity and lipid peroxidation products in patients with end-stage renal failure, *Blood Purif.*, 21 (3): 209-12.
76. Shigenaga, M. K., Lee, H. H., Blount, B. C., Christen, S., Shigeno, E. T., Yip, H., Ames, B. N. (1997). Inflammation and NO(X)-induced nitration: assay for 3-nitrotyrosine by HPLC with electrochemical detection, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 94 (7): 3211-6.
77. Sies, H. (1997). Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants, *Exp Physiol.*, 82: 291- 295.
78. Simic-Ogrizovic, S., Simic, T., Reljic, Z., Markovic, S., Blagojevic, R., Radivojevic, D., Lezaic, V., Djukanovic, L., Mimic-Oka, J. (1998). Markers of oxidative stress after renal transplantation, *Transpl Int.*, 11 (Suppl 1): 125-9.

79. Stadtman, E. R. and Levin, R. L. (2003). Free- radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids*, 25: 207-218.
80. Stein, A., and Wild, J. (edit.) (2002). *Kidney Failure Explained*, Class Pub., London, UK.
81. Vanholder, R., Ringoir, S., Dhondt, A., Hakim, R. (1991). Phagocytosis in uremic and hemodialysis patients: a prospective and cross sectional study, *Kidney Int.*, 39 (2): 320-7.
82. Vaziri, N. D., Ni, Z., Oveisi, F., Liang, K., Pandian, R. (2002). Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency, *Hypertension.*, 39 (1): 135-41.
83. Ward, R. A., McLeish, K. R. (2003). Oxidant stress in hemodialysis patients: what are the determining factors?, *Artif Organs.*, 27 (3): 230-6.
84. Ward, R. A., McLeish, K. R. (1995). Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency, *J Am Soc Nephrol.*, 5 (9): 1697-702.
85. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, and Descamps-Latscha B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney International.*, 49 (5): 1304-1313.
86. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Nguyen Khoa, T., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A. T., Canteloup, S., Dayer, J. M., Jungers, P., Drüeke, T., Descamps-Latscha, B. (1998). Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure, *J Immunol.*, 161 (5): 2524-32.

87. Wu, C. C., Chen, J. S., Wu, W. M., Liao, T. N., Chu, P., Lin, S. H., Chuang, C. H., Lin, Y. F. (2005). Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes, *Nephrol Dial Transplant.*, 20 (6): 1134-9.
88. Yamaguchi, Y., Yoshikawa, N., Kagota, S., Nakamura, K., Haginaka, J., Kunitomo, M. (2006). Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome, *Nitric Oxide.*, 15 (4): 380-6.
89. Yazıcı, C., Köse, K. (2004). Kronik böbrek yetmezliğinde oksidatif stres ve “biyomarkır”ları, *Türk Nefroloji Diyaliz Ve Transplantasyon Dergisi*, 13 (3): 117-124.
90. Ziouzenkova, O., Asatryan, L., Tetta, C., Wratten, M. L., Hwang, J., Sevanian, A. (2002). Oxidative stress during ex vivo hemodialysis of blood is decreased by a novel hemolipodialysis procedure utilizing antioxidants, *Free Radic Biol Med.*, 33 (2): 248-58.

## ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Adana Ceyhan' da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Ceyhan' da, lise öğrenimimi Gaziantep' te tamamladım. 2001 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde lisans eğitimine hak kazandım ve 2006 yılında mezun oldum. 2006 yılının ağustos ayında E: Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı' na araştırma görevli olarak atandım. Aynı yıl Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. Evli ve bir kız çocuk annesiyim.