

**HEMODİYALİZ HASTALARINDA ÜREMİK TOKSİNLER İLE
APOPTOZİSİN İLİŞKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Arş. Grv. Dr. Zeynep Hünkerler

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay KÖKEN

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

AFYONKARAHİSAR 2010

**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HEMODİYALİZ HASTALARINDA ÜREMİK TOKSİNLER İLE
APOPTOZİSİN İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Arş. Grv. Dr. Zeynep HÜNKERLER

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Tülay KÖKEN**

AFYONKARAHİSAR 2010

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve tezimin hazırlanmasında büyük emekleri olan, değerli hocalarım Tıbbi Biyokimya öğretim üyeleri Prof. Dr. Tülay KÖKEN ve Doç. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Serap DEMİR'e teşekkür ederim.

Asistanlığım süresi içerisinde birlikte çalıştđđım asistan, tekniker ve personel arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz sevgilerimi sunarım.

Dr. Zeynep HÜNKERLER
AFYONKARAHİSAR 2010

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez başlığı : Hemodiyaliz hastalarında üremik toksinler ile apoptozisin ilişkisi

Tezi hazırlayan : Araş. Gör. Dr. Zeynep HÜNKERLER

Tez Savunma Tarihi : 23 Haziran 2010

Tez Kabul Tarihi : 23 Haziran 2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Tülay KÖKEN

İş bu çalışma jürimiz tarafından TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

PROF. DR. TÜLAY KÖKEN

Üye

PROF. DR. GÜLAY DEMİRCİN

Üye

DOÇ. DR. SERAP DEMİR

ONAY
DEKAN

PROF. DR. NECAT İMİRZALIOĞLU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
KISALTMALAR	III
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ	3
2.2. ÜREMİK SENDROM	5
2.2.1. Üremik Sendromun Fizyopatolojisi	5
2.2.2. Üremik Toksinler	6
2.2.3. Üremik Toksinlerin Patofizyolojik Etkileri	9
2.2.3.1.Üre	10
2.2.3.2. Guanidinler ve kreatinin	10
2.2.3.3. Fosfor	11
2.3. APOPTOZİS	12
2.3.1. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi	12
2.3.2. Apoptozisin Temel İşlevi ve Amaçları	13
2.3.3. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar	14
2.3.4. Apoptozis Morfolojisi	15
2.3.5. Apoptozis Mekanizmaları	17
2.3.6. Apoptozisi kontrol eden genler	19
2.3.7. Apoptozis Regülasyonu	19
2.3.8. Apoptozisin İndüksiyonu	20
2.3.9. Apoptozis ve Hastalıklar	22
2.3.10. Tedavide Apoptoz	23
2.4. SİTOKERATİNLER	23
2.4.1. Sitokeratin Ekspresyonu	26
2.4.2. Sitokeratin ve Apoptozis	27
2.4.3. Apoptozis ve Nekroz Sonucunda CK 18'in Seruma Salınması	28
2.4.4. Sitokeratinlerin Tümör Markırı Olarak Kullanımı	29

2.5. APOPTOZİSİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN	30
YÖNTEMLER	
2.5.1. Hematoksilen-eozin Boyama	30
2.5.2. Giemsa Boyama	30
2.5.3. Floresan Mikroskopi	30
2.5.4. Elektron Mikroskopi	31
2.5.5. Faz Kontras Mikroskopi	31
2.5.6. Anneksin-V Yöntemi	31
2.5.7. Tunel Yöntemi	31
2.5.8. M30 Yöntem	32
2.5.9. Kaspaz-3 Yöntemi	32
2.5.10. Agaroz Jel Elektroferez	32
2.5.11. Western Blotting	32
2.5.12. Flow Sitometri	33
2.5.13. ELISA	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Biyokimyasal analizler	35
3.2. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	36
4.1. Sonuçlar	36
4.2. M30 Düzeyleri	36
4.3. Hemodiyaliz Grupları İçinde M30 düzeyleri ile üremik asitler arasındaki Korelasyon	37
4.4. Tüm Hemodiyaliz Hastalarında M30 Düzeyleri ile Üremik Asitler Arasındaki Korelasyon	39
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR	50
7. ÖZET.....	51
8. SUMMARY.....	52
9.KAYNAKLAR.....	54

KISALTMALAR

ADMA:	Asimetrik dimetil arginin
AGE :	İleri glikolizasyon son ürünleri
Apaf-1:	Apoptatik proteaz aktive edici faktör-1
AIF :	Apoptozis indükleyici faktör
AMİ:	Akut miyokart infarktüsü
CAD:	Caspase activated DNase
CK :	Sitokeratin
CMPF:	3-Karboksi-4-metil-5propil-2-furopropionik asit
Cyt-c:	Sitokrom-c
ELISA:	Enzyme linked immunosorbent assay
FADD:	Fas associated death domain
Fas-L:	Fas ligandı
GFR:	Glomerüler filtrasyon hızı
IF:	İntermediate filament
KBY:	Kronik böbrek yetmezliği
K ⁺ :	Potasyum
NMDA:	N-metil-D-aspartat
NO:	Nitrik oksit
PAH:	Para-aminohippurik asit
Pmn:	Polimorfonükleer lökosit
PS :	Fosfotidil serin
SDBY:	Son dönem böbrek yetmezliği
SDMA;	Simetrik dimetil arginin
TdT:	Terminal deoksinükleotidil transferaz
TNF:	Tümör nekroz faktör
TNFR-1:	Tümör nekroz faktör resptörü
TPA:	İntermediate filament
TPS:	Doku polipeptit antijen
TRADD:	Doku polipeptit spesifik antijen

TABLÖLAR DİZİNİ

- Tablo-I(A,B):** Küçük suda çözünür bileşikler
- Tablo-II:** Proteine bağlı bileşikler
- Tablo-III:** Orta moleküler Bileşikler
- Tablo-IV:** Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar
- Tablo V:** Apoptozis ve genler
- Tablo-VI:** Kontrol grubu ve hemodiyaliz hastalarının M30 düzeyleri
- Tablo-VII:** Hemodiyaliz hastalarının üre, ürik asit, kreatinin, kalsiyum, fosfor düzeyleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Ölüm reseptörleri ve mitokondriyal yollarla kaspaz-3 aktivasyonunun başlamasıyla nükleusta oluşan DNA fragmantasyonu
- Şekil 2.** CK 18'in tümör hücrelerinde yıkımı ve salınımı
- Şekil 3.** Plazma M30 düzeyleri
- Şekil 4.** 2.grupta M30 ile ürik asit arasındaki korelasyon
- Şekil 5.** 3.grupta M30 ile üre arasındaki korelasyon
- Şekil 6.** 4.grupta M30 ile ürik asit arasındaki korelasyon
- Şekil 7.** Tüm hemodiyaliz hastalarında M30 ile ürik asit arasındaki korelasyon
- Şekil 8.** Tüm hemodiyaliz hastalarında M30 ile fosfor arasındaki korelasyon
- Şekil 9.** Tüm hemodiyaliz hastalarında M30 ile kalsiyum arasındaki korelasyon

I-GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), nefron sayısı ve nefron fonksiyonlarında azalma ile sonuçlanan, sıklıkla renal fonksiyonun irreversibl kaybı ve hayatı tehdit eden üremi ile karakterize son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) götüren pek çok etyolojik sebebi olan patofizyolojik bir süreçtir (1).

Üremik sendrom, SDBY’de, üremik serumda biriken ve protein ile aminoasitlerin metabolik ürünleri olarak kabul edilen "üremik toksinler" in etkilerinin bir sonucu olarak meydana gelen semptom ve bulguların bir toplamıdır. Dolayısıyla vücuttan atılmayan birçok metabolitin kombine toksik etkileri sonucu oluşan bir otointoksikasyondur (1,2,3).

Apoptosis, organizmanın genetik şifrelerinde bulunan ‘hücre intiharı’ programlarının gelişmesi ve/veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik ölümdür ve programlı hücre ölümü olarak da tanımlanır. Normal erişkin dokularda hücre büyümesi bir denge halindedir. Bu dengenin biri lehine bozulması çeşitli patolojilere yol açmaktadır. Apoptotik hücre ölümünün eksik veya aşırı uygulanması, çeşitli karsinom, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi hastalıkların patogenezinde rol alır (4).

Epitel hücre iskeletini oluşturan ara filamentlerden olan sitokeratinlerden (CK), sitokeratin 18 (CK18)’in apoptozis sırasında asp396’dan kaspazla kırılması sonucu ortaya çıkan bir neoepitop olan M30’un, serum ve/veya plazmada ölçümüyle apoptotik hücre ölümü belirlenebilmektedir (5).

SDBY’de apoptozisin arttığını ve üremik toksinlerle apoptozisin ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde, serumda ve peritoneal sıvıda biriken ve üremik toksin olarak nitelendirilen, ileri glikolizasyon son ürünleri (=AGE)’nin polimorfonükleer lökositlerin (pmn) apoptozisini arttırdığı ve immüdisfonksiyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir (6)

Bir diğer çalışmada ise, hiperfosfateminin endotelial hücrelerde apoptozisi arttırdığı bulunmuştur. Bunun da üremik hastalardaki vasküler komplikasyonları başlatan etken olabileceği, bu prosesin tamiri ile endotelial bütünlüğün tekrar sağlanabileceği ileri sürülmüştür (7).

Biz bu alışmamızda KBY'de artan apoptozisde, üremik toksinlerin ve/veya hemodiyaliz tedavi süresinin rolünün olabileceği dşncesiyle, beş üremik toksinin; üre, kreatinin, ürik asit, fosfor ve kalsiyumun, serum konsantrasyonları ile apoptozisin bir göstergesi olan M30'un plazma düzeyleri arasındaki ilişkiyi ve hemodiyaliz hastalarını tedavi sürelerine göre gruplandırıp, gruplar arasında plazma M30 düzeylerini karşılaştırarak hemodiyaliz tedavi süresinin apoptozise etkisini araştırmayı planladık.

II-GENEL BİLGİLER

2.1. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ

Kronik böbrek hastalığı, nefron sayısı ve nefron fonksiyonlarında azalma ile sonuçlanan ve sıklıkla son dönem böbrek yetmezliğine götüren pek çok etyolojik sebebi olan patofizyolojik bir süreçtir.

SBDY ise, renal fonksiyonun irreversibl kaybı ile karakterize olup hayatı tehdit eden üremi ile seyreden, devamlı diyaliz veya transplantasyon gibi renal replasman tedavilerinin uygulandığı klinik bir tablodur (1).

Fonksiyon kaybı reversibl özellikte ise akut, irreversibl ve progresif özellikteyse kronik böbrek yetmezliğinden söz edilir.

Böbrekte hastalık, asemptomatik hematüri ve/veya proteinüriden diyaliz gerektirecek düzeyde böbrek yetmezliğine kadar değişebilen farklı klinik tablolarla karşımıza çıkabilir. İlk olayı takiben olguların bir kısmı sekelsiz veya minimal bir hasarla tam bir iyileşme gösterirken bir kısmında hastalık sessiz veya ataklar halinde devam eder. Bazı olgularda ise hasar önemli düzeyde nefron kaybına neden olursa hastalık etkeni tamamen ortadan kaldırılmış olsa bile nefron kaybıyla karakterize patolojik süreç varlığını sürdürür (8).

KBY'nin patofizyolojisi altta yatan etyolojik etkene spesifik başlatıcı mekanizmalar ile renal kitlenin azalması ile ortaya çıkan ilerleyici mekanizmaları içerir. Renal kitledeki azalmaya paralel olarak geriye kalan nefronların fonksiyonlarında artma ve hipertrofiye sebep olur, başlangıçta gelişen adaptif bu evre hiperfiltrasyon evresidir. Sonrasında kısa süreli bu değişiklikler kalan nefron kitlesinde skleroza zemin hazırlar ve etyolojik neden ortadan kalkmış olsa bile kalan nefronların fonksiyonlarında ilerleyici bozukluk meydana gelir (1).

İrreversibl, progresif nefron kaybıyla karakterize KBY'li bir hastada GFR'deki azalma başlangıç evrelerinde genellikle klinik bir belirtiyeye neden olmazken GFR kaybı arttıkça volüm yüklenmesi, hiperkalemi, metabolik asidoz, hipertansiyon, anemi, kemik hastalığı gibi ciddi belirtilere sebep olur (1,8). KBY'li olguların, klinik seyir ve yetmezlik düzeyini belirlemek amacıyla GFR düzeylerine göre evrelemesi şu şekilde yapılmaktadır;

Evre I; GFR'nın iyi korunduğu ancak proteinürisi/albuminürisi olan hasta veya böbrek görüntülemesinde değişikliklerin bulunduğu durumlardır.

Evre II; Kronik böbrek hastalığı, böbrek hasarı ile birlikte azalmış GFR'nın bulunması (60-89 mL/dk/1,73 m²) durumudur.

Evre III; GFR'ında orta derecede azalma (59-30 mL/dk/1,73 m²),

Evre IV; Ciddi GFH azalması (29-15 mL/dk/1,73 m²) söz konusudur.

Evre V; Böbrek yetmezliği aşaması olup GFH 15 mL/dk/1,73 m² nın altına indiği renal replasman tedavisinin gerekli olduğu evredir (9).

Hastalığın klinik olarak aşikar hale gelmesi için geçen süre, nedene bağlı olarak değişir. GFR düzeyini temel alarak yapılan evrelere göre klinik ve laboratuvar veriler ile hastalığın yetmezlik düzeyine göre bakım, takip, tedavi yaklaşımları da değişir.

GFR'nin düştüğünün göstergesi olarak serum üre ve kreatinin düzeyleri yükselse bile GFR normalin %30'una kadar düşmedikçe hastalar asemptomatik kalabilir. Orta derece böbrek yetmezliğine tekabül eden evrede; niktüri, hafif anemi, hafif güç kaybı, iştah azalması ve erken beslenme bozuklukları ve laboratuvar olarak kalsiyum ve fosfor anormallikleri görülebilir GFR %30'un altına düştüğü ağır böbrek yetmezliğinde üremik klinik belirtiler artar, klinik tablo ağırlaşır ve biyokimyasal anormallikler birden gelişir. Hafif ve orta dereceli böbrek yetmezliği esnasında araya giren, üriner, respiratuvar ve gastrointestinal enfeksiyonlar, iyi kontrol edilmemiş hipertansiyon, hiper veya hipovolemi, nefrotoksik ilaç kullanımı ve radyokontrast ajanların nefropatisi vb. klinik hastalıklar renal fonksiyonu bozarak aşikar üreminin klinik belirtilerini ortaya çıkartır ki, GFR normalin %5'ine veya %10'una düşmüştür ve SDBY gelişmiştir.

SDYB'deki pek çok bulgu üremi olarak tanımlanır ki üremide ön plandaki belirtiler; iştahsızlık, bulantı kusma, halsizlik, kilo kaybı, bilinç düzeyindeki değişiklikler, kaşıntı, nefes darlığı, bacaklardaki huzursuzluk hissi, perikardit kanama gibi çeşitli doku ve organ sisteminin üremik toksinlerin katkıda bulunduğu üremik havuzdan etkilenmesiyle oluşan bulgulardır. Bu belirtiler ile serum üre, kreatinin düzeyleri arasında direkt bir korelasyon yoktur. Özellikle yaşlı olgular düşük üre düzeylerinde (100-120 mg/dl) belirgin semptomatik olmalarına karşın, bazı olgular yüksek üre düzeylerinde (200-250 mg/dl) bile asemptomatik kalabilirler (1,8).

2.2. ÜREMİK SENDROM

Üremik sendrom, değişik sebeplere bağlı olarak nefronların progressif ve irreversibl kaybı sonucu oluşan böbrek yetersizliğinin, direkt veya indirekt olarak sebep olduğu semptom ve bulguların bir toplamıdır. Dolayısıyla vücuttan atılmayan birçok metabolitin kombine toksik etkisi sonucu oluşan bir otointoksikasyondur (1,3).

Bu toksik etkilerden herbiri hastaların bazısında daha az, bazısında ise daha belirgin olabilir. Ayrıca, bunlar, birbirlerini de etkileyerek, spesifik ve nonspesifik çeşitli kombinasyonlar oluşturabilirler.

İrreversibl böbrek yetmezliği, fonksiyon gören nefron sayısının çeşitli hastalıklar nedeniyle giderek azalması sonucu, böbrek fonksiyonunun % 30'un altına inmesi ile ortaya çıkar ve % 10'un altına indiği zaman ise üremik sendrom yerleşir (2).

2.2.1. ÜREMİK SENDROMUN FİZYOLOJİSİ

Üremik sendromda böbrek fonksiyonlarında ortaya çıkan değişiklikler, şu şekilde özetlenebilir.

a; İdrarla normalde atılan metabolizma artıklarının, üremik toksinlerin retansiyonu,

- b. Elektrolit metabolizmasındaki değişiklikler,
- c. Konsantrasyon mekanizması bozuklukları,
- d. Asit-baz dengesi bozuklukları,
- e. Böbreğin hormonal fonksiyonlarındaki değişiklikler,
- f. Protein, lipid ve karbohidrat metabolizmasındaki değişiklikler (2).

2.2.2. ÜREMİK TOKSİNLER

Üremide tesbit edilen bozuklukların üremik serumda biriken ve protein ile aminoasitlerin metabolik ürünleri olarak kabul edilen "üremik toksinler"ın etkilerinin bir sonucu olduğuna inanılmaktadır. Üremide saptanan bu bozuklukların bazıları, düzenli hemodiyaliz tedavisine rağmen sebat eder. Bununla beraber, yoğun diyaliz ve başarılı böbrek transplantasyonundan sonra, bu bozuklukların giderek düzelmesi, toksik molekül retansiyonunun rolünün olduğunu düşündürmektedir. Üremik plazmada tespit edilen azot artıkları üzerinde 50 yıldan daha fazladır çalışılmasına rağmen, üremik toksinlerin kimyasal hüviyeti tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Spesifik organik bileşiklerin ve bunların sınıfının tayin ve ölçülmesini sağlayan analitik kimyanın gelişmesi ve mevcut metodlar sayesinde, bu tür maddelerin konsantrasyonu, vücut sıvı ve dokularında tayin edilmiştir. Böylece üremik toksinlerden sorumlu olduğu kabul edilen metabolitlerin sayısı, geçen 40 yıl esnasında önemli derecede artmıştır (2).

Halen tanımlanabilen 90 tane üremik toksin mevcuttur.

Üremik toksinler 3 majör grupta tanımlanmışlardır;

1: Küçük suda çözünür solütler; Moleküler ağırlıkları 500 D'un altındadır. (Tablo-I.A ve Tablo-I.B)

2: Proteine bağlı bileşikler; Moleküler ağırlıkları 500 D'nun altındadır, intradiyalitik hareketleri proteine bağlı olmaları ile kısıtlandığı için daha çok, orta moleküler solütlere benzerler (Tablo-II). Bu tabloda, 25 tane proteine bağlı olduğu bilinen toksin verilmiştir fakat bunlardan leptin ve retinol-binding protein moleküler ağırlıkları açısından orta moleküler solütlere dahildirler.

3: Orta moleküler bileşikler; moleküler ağırlıkları 500 D'un üzerindedir (Tablo-III) (3).

Tablo-I.A. Küçük, suda çözünür bileşikler (moleküler ağırlıkları<500 D) (3).

Üremik toksinler	Moleküler ağırlıkları (D)	Gruplar
1-methyladenosine µg/L	281	Ribonucleosid
1-methylguanosine µg/L	297	Ribonucleosid
1-methylinosine µg/L	282	Ribonucleosid
ADMA mg/L	202	Guanidin
α-keto-guanidinovaleric acid µg/L	151	Guanidin
α-N-acetylarginine µg/L	216	Guanidin
Arab(in)itol mg/L	152	Polyols
Argininic acid µg/L	175	Guanidin
Benzylalcohol mg/L	108	
β-guanidinopropionic acid µg/L	131	Guanidin
β-lipotropin ng/L	461	Peptid
Creatine mg/L	131	Guanidin
Creatinine mg/L	113	Guanidin
Cytidine µg/L	204	Purin
Dimethylglycine µg/L	103	
Erythritol mg/L	122	Polyol
γ-guanidinobutyric acid µg/L	145	Guanidin
Guanidine µg/L	59	Guanidin
Guanidinoacetic acid µg/L	117	Guanidin
Guanidinosuccinic acid mg/L	175	Guanidin
Hypoxanthine mg/L	136	Purin
Malondialdehyde µg/L	71	
Mannitol mg/L	182	Polyol
Methylguanidine µg/L	73	Guanidin
Myoinositol mg/L	180	Polyol
N2,N2-dimethylguanosine µg/L	311	Ribonucleosid
N4-acetylcytidine µg/L	285	Ribonucleosid
N6-methyladenosineµ g/L	281	Ribonucleosid
N6-threonylcarbamoyladenosine µg/L	378	Ribonucleosid
Orotic acid mg/L	174	Pyrimidin

Tablo-I.B. Küçük, suda çözünür bileşikler (moleküler ağırlıkları<500 D) (3).

Üremik toksinler	Moleküler Ağırlıkları (D)	Gruplar
Orotidine mg/L	288	Pyrimidin
Oxalate mg/L	90	
Phenylacetylglutamine mg/L	264	
Pseudouridine mg/L	244	Ribonucleosid
SDMA µg/L	202	Guanidin
Sorbitol mg/L	182	Polyol
Taurocyamine µg/L	174	Guanidin
Threitol µg/L	122	Polyol
Thymine mg/L	126	Pyrimidin
Uracilü g/L	112	Purin
Urea g/L	60	
Uric acid mg/L	168	Purin
Uridine mg/L	244	Pyrimidin
Xanthine mg/L	152	Purin
Xanthosine µg/L	284	Ribonucleosid

Tablo-II. Proteine bağlı bileşikler (moleküler ağırlıkları<500 D) (3).

Üremik toksinler	Moleküler Ağırlıkları (D)	Gruplar
2-methoxyresorcinol µg/L	140	Phenol
3-deoxyglucosone mg/L	162	AGE
CMPF mg/L	240	
Fructoselysine mg/L	308	AGE
Glyoxal µg/L	58	AGE
Hippuric acid mg/L	179	Hippurat
Homocysteine mg/L	135	
Hydroquinone µg/L	110	Phenol
Indole-3-acetic acid µg/L	175	Indol
Indoxyl sulfate mg/L	251	Indol
Kinurenine µg/L	208	Indol
Kynurenic acid mg/L	189	Indol
Leptin µg/L	16000	Peptid
Melatonin ng/L	126	Indol
Methylglyoxal µg/L	72	AGE
Nε-(carboxymethyl)lysine mg/L	204	AGE
p-cresol mg/L	108	Phenol
Pentosidine µg/L	342	AGE
Phenol mg/L	94	Phenol
P-OHhippuric acid mg/L	195	Hippurat
Putrescine µg/L	88	Polyamin
Quinolinic acid mg/L	167	Indol
Retinol-binding protein mg/L	21200	Peptid
Spermidine µg/L	145	Polyamin
Spermine µg/L	202	Polyamin

Tablo III. Orta moleküler bileşikler (moleküler ağırlıkları>500 D) (3).

Üremik toksinler	Moleküler Ağırlıkları (D)	Gruplar
Adrenomedullin ng/L	5729	Peptides
Atrial natriuretic peptide ng/L	3080	Peptides
β_2 -microglobulin mg/L	11818	Peptides
β -endorphin ng/L	3465	Peptides
Cholecystokinin ng/L	3866	Peptides
Clara cell protein (CC16) mg/L	15800	Peptides
Complement factor D mg/L	23750	
Cystatin C mg/L	13300	Peptides
Degranulation inhibiting protein 1c μ g/L	14100	Peptides
Delta-sleep inducing peptide μ g/L	848	Peptides
Endothelin ng/L	4283	Peptides
Hyaluronic acid μ g/L	25000	Peptides
Interleukin-1 ng/L	32000	Cytokines
Interleukin-6 ng/L	24500	Cytokines
κ -Ig light chain mg/L	25000	Peptides
λ -Ig light chain mg/L	25000	Peptides
Leptin μ g/L	16000	Peptides
Methionine-enkephalin ng/L	555	Peptides
Neuropeptide Y ng/L	4272	Peptides
Parathyroid hormone μ g/L	9225	Peptides
Retinol-binding protein mg/L	21200	Peptides
Tumor necrosis factor- α ng/L	26000	Cytokines

ADMA; Asimetrik dimetil arginin

SDMA; Simetrik dimetil arginin

CMPF; 3-Karboksi-4-metil-5propil-2-furopropionik asit

2.2.3. ÜREMİK TOKSİNLERİN PATOFİZYOLOJİK ETKİLERİ

Üremik toksinlerin çeşitli biyolojik sistemler üzerine in vivo ve invitro toksik etkileri vardır. Üremik toksinlerin in vitro toksik etkileri şu şekilde özetlenebilir.

Üremik Toksinlerin İn Vitro Etkileri;

1. Trombosit Faktör-3 aktivasyonunun inhibisyonu
2. Eritrositlerin otohemolizi
3. Eritrositlerin glukoz utilizasyonunun bozulması
4. Lökositlerin glukoz oksidasyonunun bozulması
5. Laktik dehidrogenazın inhibisyonu
6. Raşitik kırırdağın kalsifikasyonunun bozulması
7. Böbrek korteksinde para-aminohippurik asit (=PAH) transportunun inhibisyonu

8. Serebral korteksde oksijen almanın inhibisyonu
9. Hücresel ve hümoral immünitinin baskı altına alınması (2).

2.2.3.1. Üre;

Yakın zamanda yapılan çalışmalar ürenin patofizyolojik etkilerinin önemine işaret etmektedir. Lim ve ark. ürenin insan eritrositlerinde NaK_2Cl kotransportunu ve bazı hücre hacmine duyarlı transport yollarını inhibe ettiğini göstermiştir (10). NaK_2Cl kotransportunun, en önemlileri, hücre hacmi ve ekstra renal potasyum regülasyonu olmak üzere çok önemli vital fonksiyonları vardır. Klinik üremide, extrasellüler üre, cAMP yapımını inhibe eder. Kandaki üre 2,3 difosfogliseratı bağlayarak hemoglobinin oksijene afinitesini azaltır. Makrofajın indüklediği nitrik oksit (NO) sentezini, posttranskripsiyonel seviyede inhibe eder. Direk toksisitesi dışında üre, guanidinlerin, özellikle de biyokimyasal değişiklikleri direk uyarabilen guanidinosüksinik asidin prekürsörüdür (11).

2.2.3.2. Guanidinler ve kreatinin

Guanidinler, argininin yapısal metabolitlerinin büyük bir kısmını oluşturur. Bunların arasında çok iyi bilinen, üremik retansiyon maddesi olan, kreatinin ve metilguanidin bulunur. Bazı guanidino bileşikleri biyolojik fonksiyonlarda anahtar rol oynar. Kreatinin; klor kanalının blokajı, miyokardial hücre kültürlerinin kasılmasını azaltmaktan sorumlu tutulmuştur.

Guanidinosüksinik asit ve guanidinopropiyonik asit nötrofil süperoksit üretimini engeller. Guanidinosüksinik asit, gamaguanidinobütirik asit, metilguanidin, homoarginin ve kreatinin hayvanlarda serebrovasküler ya da sistemik uygulamada inmeyi azaltır. Guanidino bileşiklerinin karışımı naturel killer hücrelerinin, interlökin-2'ye cevabını baskılar.

Bir guanidino bileşiği olan arginin, NO'nun üretimini önemli ölçüde artırır. Arginin analogları gibi diğer bazı guanidinler, nitrikoksit sentezinin kuvvetli bir kompetitif inhibitörüdür. NO sentezinin inhibisyonu saphen ve mezenterik

vazokonstrüksiyon, hipertansiyon, iskemik glomerüler zedelenme, immün disfonksiyon ve nörolojik değişikliklerle sonuçlanır. Asimetrik dimetilarginin (ADMA), NO sentezi üzerinde inhibitör etkisi olan en spesifik endojen bileşiktir. ADMA, beyinde vasokonstrüksiyona ve asetilkolin bağlantılı vazorelaksasyonun inhibe olmasına neden olur. Bu bulgular, metilargininin beyindeki relatif yükseliğiyle alakalı olabilir. ADMA konsantrasyonları SDBY' de önemli ölçüde yükselmiştir ve hipertansiyon gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Simetrik dimetilarginin'deki yükselme daha çok gündeme getirilmiştir, fakat bu bileşik biyolojik olarak daha az aktiftir. Diğer endojen guanidin olan metilguanidinin, N^G-monometil-L-arginin gibi sentetik bileşiklerle kıyaslanınca, sitokin ve endotoksinle indüklenebilir NO sentezi üzerine inhibitör aktivitesi (%1-5) oldukça azdır (11).

Üremide NO sentezinin inhibe olduğu hipotezine zıt olarak, Noris ve ark. üremiyle ilişkili kanaması olan, bazı üremik hastalarda, NO üretiminde artış olduğuna dikkat çekmişlerdir (12).

Proksimal sarmal tubulde argininden sentez edilen, guanidinoasetikasit ve kreatinin gibi, guanidinlerin üretimi, SDBY' de baskılanır. Diğer taraftan guanidinosüksinik asit, guanidin ve metilguanidin sentezi önemli ölçüde artar ki, bu, üre geri dönüşümüne dayandırılabilir (11).

2.2.3.3. Fosfor

Organik fosforun yüksek seviyeleri kaşıntı ve hiperparatiroidizm ile ilişkilidir. Fosfor fazlalığı, alfa1 hidroksilazı ve buna bağlı olarak aktif vitamin D metaboliti, kalsitriol üretimini inhibe eder. Fosfor retansiyonu bir de spermidin/spermin N⁷-accetyl-transferaz enziminin (poliaminlerin parçalanmasından sorumlu) azalması nedeniyle poliamin metabolizmasında bozukluklara neden olur ve intestinal villuslarda proliferasyon ile intestinal disfonksiyona yol açar (11).

2.3. APOPTOZİS

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir. Örneğin; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogenezde rol oynadığı düşünülmektedir.

Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden sürekli olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir. Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozis yoluyla gerçekleşir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (13).

2.3.1. APOPTOZİSİN TANIMI VE TARİHÇESİ

Canlının kendi otonom mekanizması tarafından ayarlanan zararlı, yaşlanmış, bakteri ve otreaktif virüslerle enfekte veya istenmeyen kendi hücrelerinin bir düzen içerisinde enerji (ATP) kullanılarak ve zaman endeksli olarak iz bırakmadan öldürülmesi süreci apoptozis olarak tanımlanır. Başka bir anlatımla apoptozis, yaşam boyu devam eden programlı , bir hücrenin genetik olarak düzenlenen sistematik yok oluş fenomenidir (14).

Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptosis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (13).

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdaki daha farklı hücre ölümü gösterilmiş ve buna, ağaç yapraklarının gövdeden ayrılması anlamına gelen 'apoptozis' adı verilmiştir (15).

2.3.2. APOPTOZİSİN TEMEL İŞLEVİ VE AMAÇLARI

Amaç; komşu hücelere hasar vermeden ve onları kötü yönde etkilemeden ve iz bırakmadan hedeflenen hücrelerin yok edilmesidir (14).

Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır:

A; Apoptozisin homeostazis içindeki yeri:

1. Metamorfoza uğramış veya yaşlanmış ve bu nedenle fonksiyonlarını kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılması

2. Hormona bağımlı involüsyon (örn; prostat, endometrium ve meme dokusu hücrelerinde)

3. Sürekli çoğalan hücre gruplarının azaltılması (örn. gastrointestinal sistem hücreleri, deri v.b.)

4. İmmün hücrelerin seçimi (örn. sitokin deplesyonundan sonra B ve T lenfositlerin ve timusta otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılması)

B; Organizmanın şekillenmesi; Embriyo gelişimi, başkalaşım (metamorfoz) ve doku atrofisi sırasında olduğu gibi. İnsan embriyosunda el ve ayak ekstremitelerinin gelişimi esnasında, parmakarası bölgelerdeki hücrelerin, parmakların şekillenmesi için masif apoptozise gitmeleri, apoptozise ve onun vücuttaki fizyolojik rolüne örnek verilebilir.

C; Tümör hücreleri, virüsle kontamine olmuş hücreler, kendi başına buyruk hale gelen ve kendine zarar veren immün hücreler (ki bunlar otoimmün

hastalıklara yol açabilirler) gibi istenmeyen ve tehlikeli hücreler ortadan kaldırılır ve bunlara karşı savunma oluşturulur.

Her gün insanda mitozla artan on milyar hücreyi dengelemek için her gün on milyar hücre ölmelidir. Bu rakam organizmadaki hücrelerin %5'ini oluşturur. Hücreler apoptozis ile 15-120 dakika içinde ölürlür.

Hücrenin yaşam süresi tipine göre değişmektedir. Örneğin; bağırsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürlürken, derinin epidermal hücreleri 20-25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Kalp kası hücreleri veya nöronlar ise ömür boyu yaşarlar. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için, fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (13,14,15).

2.3.3. APOPTOZİS İLE NEKROZ ARASINDAKİ FARKLAR

Dokularda hücre doğumu ve ölümü çok dikkatli ve hassas bir denge içindedir. Morfolojik olarak 2 tip hücre ölüm şekli bilinmektedir.

Nekroz (Patolojik hücre ölümü)

Apoptozis (Fizyolojik hücre ölümü)

Diğer bir hücre ölüm şekli olan nekroz ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar Tablo IV'de gösterilmiştir (15).

Tablo-IV. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar (15).

Özellik	Nekroz	Apoptozis
Dağılım	Komşu hücre grupları	Dokuda tek tek hücreler
Nedenler	Her zaman patolojik	Fizyolojik/patolojik
Eksudatif yangı	Genellikle var	Yok ,± hücresele immünite
Işık mikroskobi	Bazofili, piknoz, karyoreksis, karyolizis	Kresentik görünüm, eozinofilik patikül
Elektron mikroskobi	Hücrede şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime, kayıp	Volüm kaybı, apoptotik cisimcikler
Fagositoz	Mononükleer hücreler	Fagositik ve komşu hücreler
Mekanizma	Kimyasal yada yapısal parçalanma	Makromolekül sentezini gerektiren aktif hücresele yıkım

2.3.4. APOPTOZIS MORFOLOJİSİ

Apoptozis aşamaları şu şekilde özetlenebilir;

- A; Ölüm sinyali,
- B; kromatinde sıkışma,
- C; hücrede parçalanma,
- D; fagositoz

Biraz daha ayrıntılı incelendiğinde şunlar özet olarak söylenebilir;

A; Eksternal olarak

a; Hücreler hacim kaybeder ve büzüşür.

b; Hücre yüzeylerinde küresel kabarcıklar oluşur (blebbing).

c; Fosfolipidlerin isimli fosfolipid hücreden dışarı çıkar.

B; İnternal olarak

a; Stoplazma yoğunlaşır (kondanse olur)

b; Mitokondriyum, sitokrom-C gibi apoptozisi uyaran faktörleri

serbestleştirerek bütünlüğünü kaybeder ve parçalanır.

c; Kaspazlar (Cysteinyll aspartate-specific proteases) aktive olur.

d; Kromozomal DNA'lar kendi içinde 180-200 bp'lik internükleozomal fragmanlara ayrılarak parçalanır.

e; Hücre sağkalımı ve metabolizmasında çok önemli olduğu düşünülen ve moleküler ağırlığı 100 daltonun üzerinde olan bir çok protein de benzer şekilde parçalanır (14).

Apoptozisde ana morfolojik olay, nukleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz.

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, bir kaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler etrafında açık bir parlama şeklinde görülmektedir.

Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, stoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosit edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır.

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin

olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklaşmalar oluşur ki bu yapı ‘zeiozis’ olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır.

Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetric olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP’ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptoz 30–60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir. Elektron mikroskopunda apoptoz esnasında, kromatinin yoğunlaşması, stoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan Apoptozis İndükleyici Faktör salınımı, olduğu bildirilen morfolojik değişikliklerdendir (13).

2.3.5. APOPTOZİS MEKANİZMALARI

Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır.

İki apoptotik yol tanımlanmıştır;

a; ekstrinsik yol; hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri ile gerçekleştirilir

b; intrinsik yol; büyüme faktör sinyallerinin kaybına veya hücre içindeki ölüm stimuluslarına cevaben oluşan mitokondri aracılı yoldur (16).

Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir.

Hücre dışı uyaranlar arasında; Tümör nekroz faktörü (TNF) , koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, interlökin-2 gibi maddelerin ortamda azalması ve glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir.

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında; Sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral,bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler, onkojenler (cmyc gibi) yer alır. Ayrıca, sitotoksik antikanser ilaçları, hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler.

Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir .

Apoptozis süreci;

- 1; DNA hasarına genlerin yanıtı,
- 2; hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı),
- 3, hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi olmak üzere 3 farklı şekilde işleyebilir.

Apoptoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar;

- 1; Bcl-2 ailesi proteinleri,
- 2; kaspazlar
- 3; Apaf-1 (Apoptotik aktive edici faktör-1) proteindir.

Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (13).

2.3.6. APOPTOZİSİ KONTROL EDEN GENLER

Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır. Bunlar Tablo-V’de verilmiştir (15).

Tablo-V. Apoptozis ve genler (15).

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1,A-1	Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bad, Bcl-xS, bid, bik, hrk-1
c-abl geni	Cmyc
Ras onkogeni	p53, p21
Çözünabilir fas	Fas (CD95/APO1), FADD/MORT, RIP, FAST
p53	İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)
A20	LOH (MTS1/CDK41)

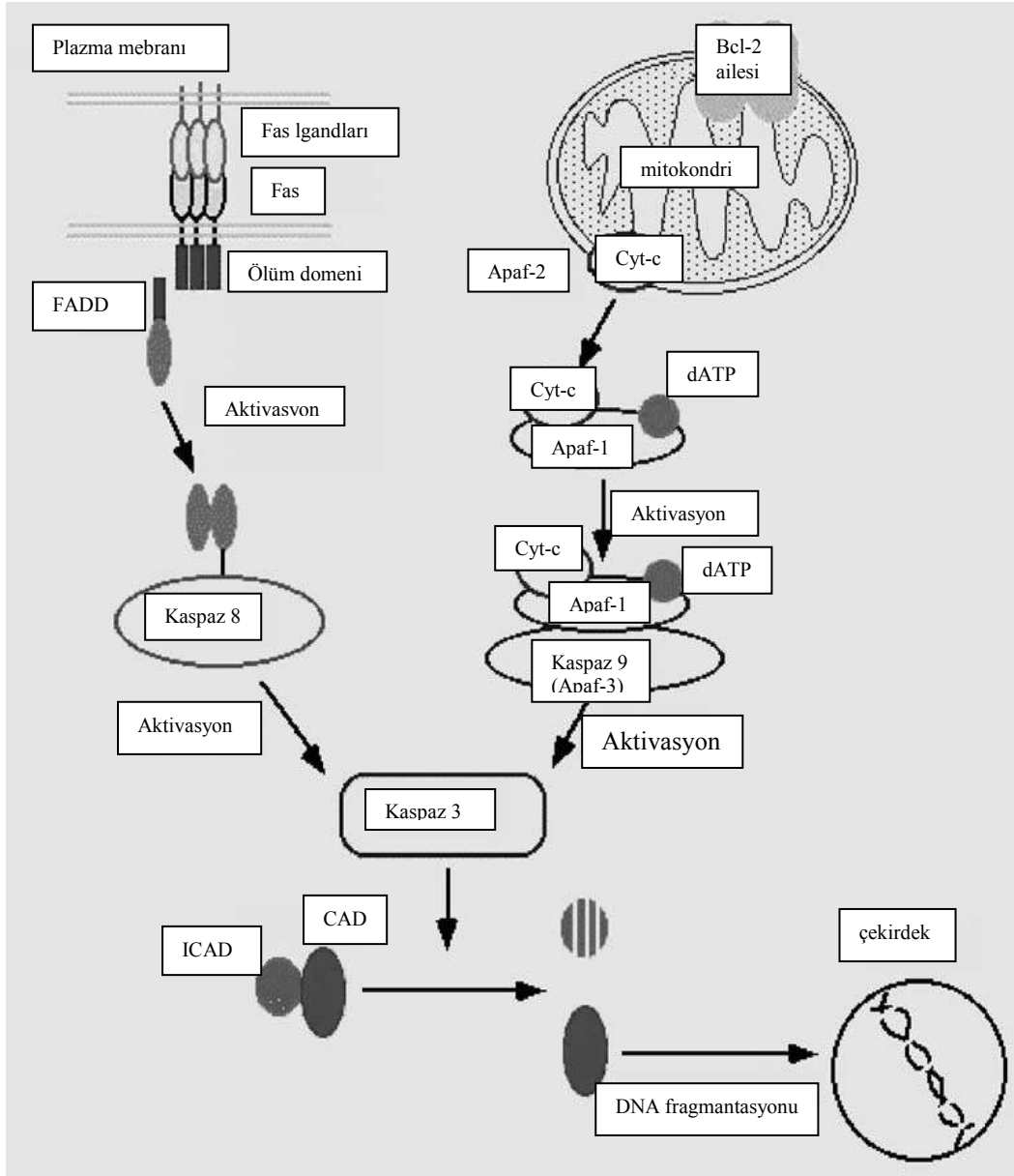
2.3.7. APOPTOZİS REGÜLASYONU

Regülasyon; Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptozis inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozisi uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptozis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanan çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1’e bağlanarak prokaspaz-9’u aktive eder ve oluşan bu kompleks ‘apoptosom’ olarak

isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır. Apoptozom aracılığıyla prokaspaz-9'un aktifleşmesiyle oluşan aktif kaspaz-9 efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder ve aktif kaspaz-3 meydana gelir. Aktif kaspaz-3, normalde kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz ile kompleks halde bulunan, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü'nü inaktive eder ve kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz'ı serbestleştirir. Serbestleşen kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz da DNA'yı oligonükleamaz fragmanlara ayırır (14). Hücre içi ve hücre dışı sinyaller ile başlayıp kaspaz aktivasyonu ile devam eden ve DNA fragmantasyonu ile sonuçlanan apoptozis süreci şekil.1'de verilmiştir (14).

2.3.8. APOPTOZİSİN İNDÜKSİYONU

Apoptozis hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri, hücre membranında bulunur ve tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar (13).



Şekil.1. Ölüm reseptörleri ve mitokondriyal yollarla kaspaz-3 aktivasyonunun başlamasıyla nükleusta oluşan DNA fragmentasyonu

Cyt-c; sitokrom-c

ICAD; Inactive caspase activated DNase

CAD: caspase activated DNase adı verilir.

FADD: Fas associated death domain

Apaf-1: Apoptatik proteaz aktive edici faktör-1 (14).

2.3.9.APOPTOZİS VE HASTALIKLAR

Apoptozis;

1. Tümörlerde, hem büyüme hem de regresyonda hücre ölümü (kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisiyle ve spontan regresyonda),
2. Hormona bağımlı dokularda patolojik atrofi,
3. Parenkimatöz organlarda duktus tıkanmasına bağlı patolojik atrofi (örn. karaciğer),
4. Sitotoksik T lenfositleri ile oluşturulan hücre ölümü,
5. Bazı viral hastalıklarda hücre ölümü (örn. HIV-1, HCV, Adenovirüs infeksiyonlarında),
6. Çeşitli zedeleyici etkenlerle oluşan hücre ölümü (hipertermi, radyasyon, sitotoksik kemoterapi, hipoksi gibi nekroz oluşturan etkenler) gibi patolojik süreçlerde rol alırken (15), etiopatogenezinde apoptozisin rolünün gösterildiği hastalıklara,
 1. Otoimmün hastalıklar; Apoptozisle, yaşlı T lenfositler, timusun kontrolundan ve denetiminden kaçan otoreaktif T lenfositler öldürülür. Timustaki bu negatif seleksiyon ile organizmanın self toleransı korunur (17). Otoimmün hastalıklarda T lenfositlerinin negatif seleksiyonu olmamaktadır. Örneğin, otoimmün linfoproliferatif sendrom'da mutasyonlar nedeniyle yetersiz apoptozise uğrayan lenfosit sayısı artar ve bir çok otoimmün hastalık ortaya çıkar (14).
 2. Astım,
 3. Amiyotrofik lateral skleroz; Spinal motor nöronlar aşırı apoptozis nedeniyle kaybolarak azalır,
 4. Alzheimer hastalığı,
 5. Huntington hastalığı,
 6. Miyokard iskemisi,
 7. Serebral iskemi (14),
 8. Sepsis örnek olarak verilebilir (18).

2.3.10.TEDAVIDE APOPTOZİS

Bugün birçok hastalığın hücre ölümü ya da yaşamı ile ilgili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle apoptotik sürece müdahale ederek yeniden düzenlenmesi, önemli tedavi yöntemlerini gündeme getirmektedir. Potansiyel tedavi yöntemleri üç kategoride toplanmaktadır ki bunlar; gen tedavisi (p53'ün yedeklenmesi vb.), apoptoz moleküllerinin düzenleyicilerini hedefleyen moleküllerin enjeksiyonu (Growth faktörler ve çözülebilir FasL vb.), apoptozla ilişkin genlerin ifadesini (ekspresyonunu) düzenleyen farmakolojik küçük moleküller (Bcl-2 vb.). Bugüne kadar non-steroidal antiinflamatuvarlar gibi apoptoz düzeyini değiştirdiği bilinen birçok ilaç vardır. Aslında bütün sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi programları tümör hücrelerinde apoptozu başlatır ve apoptoza olan direnç tedavideki başarısızlığı getirir. Üstelik bu tedaviler, normal hücrelerde de apoptozu başlatır ve kemik iliği üzerinde olumsuz yan etkileri vardır.

Ayrıca apoptoz inhibisyonu yapan başka proteinler ve sentetik özgül kaspaz inhibitörleri de üretilmektedir.

Tedavide kaspaz ailesi üyeleri ve Bcl-2/Bax ailesindeki genlerin ekspresyonları da önemli yer tutmaktadır (13).

2.4. SİTOKERATİNLER

Tüm memeli hücrelerinde bulunan sitoskeleton (hücre iskeleti) proteinlerle birleşik bulunan başlıca üç strüktürel ünitelerden oluşur.

- a; aktin içeren mikrofilament,
- b; tübülün içeren mikrotübüller,
- c; intermediate filamentler (IF)

Üç filament sistemin entegrasyonu ile kurulmuş sitoskeletal ağ mekanik bütünlükten sorumludur ve motilite, hücre-hücre etkileşimi gibi birkaç hücrel işlevin kritik ortağıdır. Intermediate filament protein ailesi filamentöz yapının en kompleksi olup farklı birkaç yüz üyeden oluşmaktadır. Sekans benzerliği ve

ekspresyon gibi karakteristik özelliklerine dayanarak birkaç gruba bölümlenerek sınıflandırılmışlardır (19).

İntermediate filament proteinleri 5 grupta sınıflandırılırlar:

Tip 1: asidik sitokeratinler (CK 9-20)

Tip2: bazik sitokeratin (CK 1-8)

Tip3: vimentin,desmin,glial fibriler asidik protein ve periferin

Tip4: nöroflamentler; nestin ve internexin

Tip5: laminler

Tip6: filensin,fakinin (19,20).

İntermediate filamentlerin fonksiyonları tam olarak bilinmemekle beraber; strüktürel yapıyı kurmak, hücresel bütünlüğü korumak, şekil ve organellerinin pozisyonlarını korumak gibi fonksiyonlarının yanında yapılan çalışmalarda IF'lerin statik olmaktan ziyade son derece dinamik oldukları ve hücre motilitesinde düzenleyici fonksiyon görenek, hücresel ve hücre içi hareketlerin düzenlenmesinde rol aldığını ortaya konmuştur. İlaveten hücre sinyalizasyonunda, strese dirençte görev alıp, apoptozise katkıda bulunmak gibi fonksiyonlar da göstermektedir (5,21).

Sitokeratin filamentleri epitel hücrelerinde, vimentin filamentleri mezenşimal hücrelerde, desmin filamentleri kas hücrelerinde, nöroflamentler sinir hücrelerinde ve glial fibriler asidik protein filamentleri de astrositlerde bulunur (21).

Sitokeratin filamentleri diğer filamentlerle karşılaştırıldığında en kompleks yapıda olan filamentlerdir. Çeşitli epitelyal dokular üzerinde iki-boyutlu elektroforez ile yapılan çalışmalarda moleküler ağırlığı 40-70 kDa arasında değişen 20 farklı sitokeratin tanımlanmıştır. Moleküler ağırlıklarına göre düşük moleküler ağırlıklı ve yüksek moleküler ağırlıklı olarak iki gruba ayrılabilir, izoelektrik noktalarına göre ise bazik ve asidik olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilirler (22).

Sekans homolojileri gözetilerek sitokeratinler;

Tip1 sitokeratinler; CK 9-20 (40-50 kDa, asidik proteinler)

Tip2 sitokeratinler; CK 1-8 (53-68 kDa, nötralden bazik protein komponentlerine kadar) şeklinde sınıflandırılmışlardır. Sitokeratinler 50 farklı üyesi olan geniş bir multigen ailesi tarafından kodlanmaktadır (19).

Genelde düşük moleküler ağırlıklı keratinler yüksek moleküler ağırlıklı keratinlerle çiftler halindedir ve çoğu bazik keratinler asidik keratinlerle çift halinde eksprese olur. Homopolimerik vimentin ve desmine karşın keratin filamentleri heterodimer yapıdadır ve bu üyelerin her biri antijenik özellik taşır (22).

Sitokeratinlerin tip1 ve tip2 çiftlerinden oluşan heterodimer yapısı fonksiyonel açıdan önemli olup, bu heteropolimer yapıya en yaygın örnek sitokeratin 8/18 çiftidir. Heterodimerler yan yan dizilerek tetramer forma, uç uca eklenerek daha yüksek sitokeratin polimerlerine (sarmal dimerik yapıyla beraber) dönüşerek filamentöz yapı içinde organize olurlar. Diğer tüm IF proteinlerle birlikte sitokeratinler 3 majör bölge içerirler; nonhelikal N-terminal bölge, helikal santral rod ve nonhelikal C-terminal segment. Helikal rod bölge çoğunlukla α -helikal yapıdan oluşmuştur, 300-320 aminoasit rezidüsünden oluşan korunmuş bir sekansı meydana getirir ve 4 farklı bölgeye ayrılabilir; 1A,1B, 2A, 2B halkaları şeklinde. Helikal segmentler L1, L2 ve L-2 adı verilen daha az korunmuş olan kısa bağlayıcı bölgelerden ayrılmıştır (19).

Keratinlerin hepsi bir hücreden aynı anda sentezlenmezler, farklı epitellerden farklı sitokeratin salınımında olduğu gibi, gelişim tamamlanıncaya kadar farklı evrelerde ayrı keratin alttürleri eksprese edilir. Böylece, tüm epitel (basit ve kompleks) CK ekspresyonuna göre sınıflandırılabilirler. Keratinlerin ekspresyonunun oldukça sıkı regülasyonu vardır. Keratin çiftleri epitelyal hücrelerin farklı tiplerinde devamlı salınır ve basit epitelde sadece basit epitelyal keratinler (tip1; CK 18,19 ve tip2; CK8), çok katlı epitelde ise çok katlı epitelyal sitokeratinler (tip1; CK14 ve tip2; CK4) eksprese edilir (22).

Genellikle basit epitelyal hücreler CK8/18 çiftini diğer çiftlerle kombine olarak içerirler. Hepatositlerde sadece IF'nin CK8/18'i bulunur. CK8/18 çifti balıktan memeliye kadar pek çok tür için koruyucu fonksiyon görürler bu nedenle gelişim esnasında erken dönemde bile CK8/18 çifti bulunmalıdır. CK8 eksikliği farelerde embriyo ölümüne neden olurken CK18 eksikliğinde ise fareler normal yaşam süresine sahip olup fertil de olabilirler. CK18 olmayan farelerde CK19 ve CK20, CK18 yerine fonksiyon göstermiş böylece normal keratin filamentleri gözlenmiştir. CK18/19'un her ikisinin de yokluğu erken embriyonik ölümle sonuçlanırken sadece CK19'un yokluğu spesifik fenotipik sonuçlar oluşturmaz. CK18'in yokluğunda yaşla ortaya çıkan CK8-pozitif agregatlar (mallory body) patolojik bir özellik olarak oluşur (5).

2.4.1. SİTOKERATİN EKSPRESYONU

Sitokeratin ekspresyonu normal dokularda gelişim evresine göre değişirken, normal hücrelerin kansere dönüşümü esnasında sitokeratin profili değişmeden kalır. Santral rodlike bölgenin posttranslasyonel modifikasyonu daha nadirken, N ve C terminal bölgelerinde fosforilasyon, glikasyon ve transglutamasyon gibi bir takım modifikasyonlar görülür. Bu modifikasyonlar filamentlerin biyolojik aktivitelerini etkiler, çözünürlükleri ve reorganizasyonları artar. Sitoskeleton içinde sitokeratinlerin çözünürlükleri çok düşük iken dolaşıma geçince küçük kompleksler veya geniş polimerik protein kompleksleri gibi basit protein fragmentlerine parçalandıkları gösterilmiştir. Henüz dolaşımda intakt sitokeratin molekülleri saptanmamıştır. Dolaşımdaki sitokeratin fragmentlerinin yarı ömürleri büyüklüklerine bağlı olup yaklaşık 10-15 saattir.

Dolaşıma solubl CK fragmentlerinin salınımına neden olan prosesler tam açıklanamamıştır fakat ölen hücrelerde, anormal mitozda, proliferen olan hücrelerde monomerik CK polimerlerinin aşırı üretiminde, apoptozisde ve/veya neovaskularizasyonda solubl fragmentlerin salınımı için protein parçalanmasını içeren pek çok metabolik yolun gerekli olduğu görülmektedir.

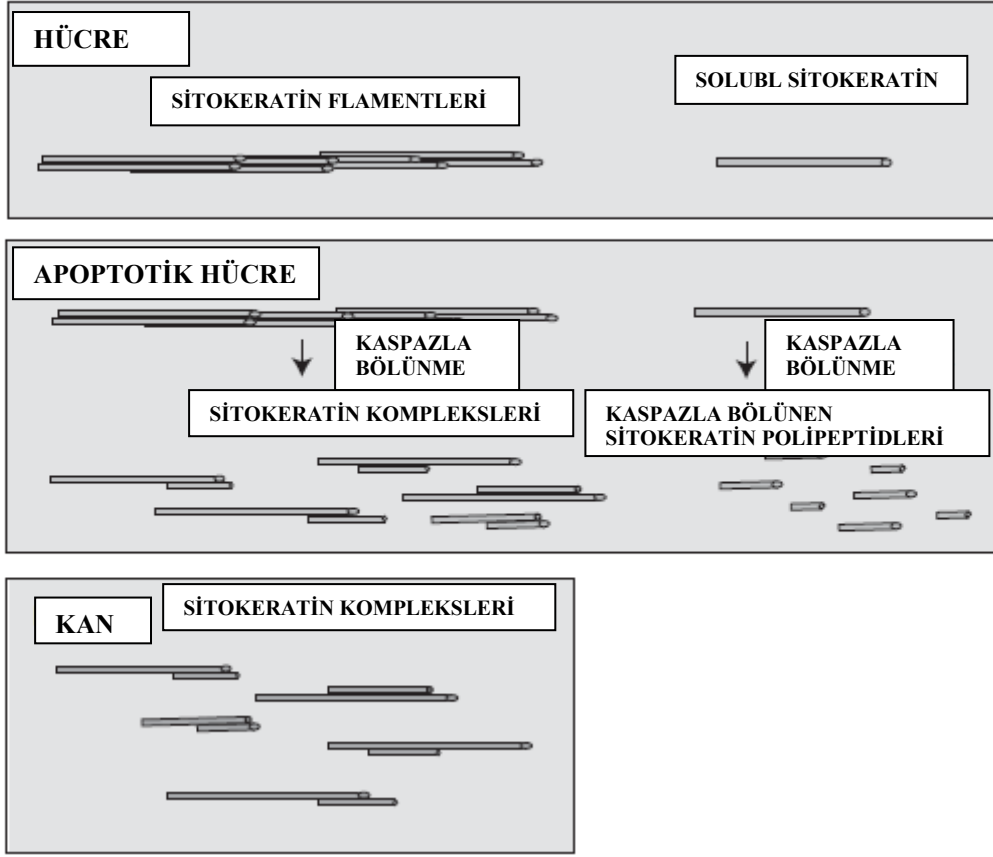
Tümör hücrelerinden salınmaları üzerine sitokeratinler kan, idrar, kist sıvısı, asit, plevral efüzyon ve beyin omurilik sıvısı gibi çeşitli vücut sıvılarında da saptanmıştır.

Sağlıklı insanlarda dolaşımında sitokeratin düzeyleri oldukça düşüktür. Epitelyal hücre ilişkili karsinomlarda ise düzeylerinde artış görülür. Basit epitelyal hücreli karsinomlarda CK8,18,19 düzeyleri oldukça artar (19).

2.4.2. SİTOKERATİN VE APOPTOZİS

Son zamanlarda apoptozis esnasında CK'lerin önemli fonksiyonlarının olduğu bulunmuştur (19). Granüler strüktür içinde apoptotik süreç başladıktan sonra sitokeratin filamentleri tekrar organize olurlar. Sitoskeletonun tekrar organize olmasının epitelyal hücrelerinin apoptozisi için gerekli olduğu düşünülüyor. Apoptozis sırasında kaspazların aktivasyonundan sonra bazı sitokeratinler sindirilir (Şekil.2).

CK18, nonhelikal L1-2 bağlayıcı bölgede VEVD/A sekansından kırılır (asp238 sonrası). Kaspaz 6, VEVD/A sekansının kırılmasında en etkin enzim olarak görülmektedir. VEVD/A sekansının CK19 da da olduğu ve apoptozis sırasında kırıldığı bulundu. CK14 de VEVD/A sekansından kırılır ayrıca CK12, 17 de de bu sekans bulunur. Bu nedenle kuraldışı olan CK9 ve CK10 dışındaki tüm tip1 sitokeatinler kaspazların potansiyel substratıdır. VEVD₂₃₈ sekansındaki kırılmaya ilaveten CK18, C-terminalinde DALD₃₉₆ (asp396) sekansında kaspazlarca kırılır. Bu sekans diğer tip1 sitokretainlerde bulunmaz. Erken apoptozis sırasında sitozolik ölüm efektör domaini içeren DNA bağlayıcı protein ile CK8/18 filamentleri ve pro- kaspaz -3 ve kaspaz-9 beraber lokalize olmuşlardır ve bu pozisyonda kırılma gerçekleşir. Dahası erken apoptozis esnasında katalitik aktif kaspaz-9, CK filamentleri üzerinde bulunmuştur. CK filamentlerinin kaspaz-9 için platform görevi görüp pro-kaspaz-3'ün aktivasyonunu hızlandırdığı fikri öne sürülmüştür. Apoptozis sırasında CK18 direk olarak DALD₃₉₆ da kaspaz-9 tarafından kırılır (20).



CK18, hücrede hem insolubl filament hem de solubl protein olarak bulunur. Apoptozis sırasında CK18, iki ayrı bölgeden farklı kaspazlar ile parçalanır. Sonuçta, CK fragmentleri ve daha düşük moleküler ağırlıklı polipeptidlerin her ikisinin salınımı meydana gelir (20).

Apoptozis sırasında kaspazla kırılmış sitokeratinlerin apoptotik cisimciklerin oluşumunu hızlandırdığı ve apoptotik sinyallerin güçlenmesini sağladığı düşünülmektedir. İn vitro denemeler CK18 ve CK19 fragmentlerinin apoptozisin orta aşamalarında kaspazla parçalanmasından sonra hücreden ekstrasellüler alana salınımını göstermiştir (19).

2.4.3. APOPTOZİS VE NEKROZ SONUCUNDA CK18'İN SERUMA SALINMASI

Apoptozis esnasında CK18'in C-terminalinde kaspazla kırılması ile 387-396. aminoasitleri içeren bir neoepitop oluşur; M30. M30'a karşı antikor kullanılarak geliştirilen M30 ELİSA yöntemi ile CK18'in kaspazla kırılmış formu değerlendirilir.

Nekrotik hücrelerin plazma membranının bütünlüğünün bozulmasıyla sitokeratinler hücre dışına salınabilir. Nekrozla ortaya çıkan CK18 kaspazla kırılmayan formdur. Geliştirilen M65 ELİSA yöntemi ile M65 ölçülerek total CK18 (hem kaspazla kırılmış form hem de kaspazla kırılmamış formların bütünü) değerlendirilmektedir.

Kaspazla kırılmış CK18/totalCK18 oranı ile yaklaşık olarak hücre ölümünün apoptozis ile olup olmadığını belirlenir (5,20).

2.4.4. SİTOKERATİNLERİN TÜMÖR MARKIRI OLARAK KULLANIMI

Sitokeratinler epitelyal hücrelerden ifade edildiği için, epitelden köken alan malignansilerin takibinde kullanışlıdır (5).

En çok kullanılan 3 sitokeratin markır; doku polipeptit antijen (TPA), doku polipeptit spesifik antijen (TPS), CYFRA21-1'dir.

TPA; CK8, CK18, CK19'u serumda ölçer. Meme kanseri, kolorektal kanser, akciğer kanseri, baş boyun kanseri gibi çeşitli epitelyal karsinomlarda seolojik markır olarak kullanılmaktadır.

CYFRA21-1; CK19 fragmentleri ölçülür. Akciğer kanseri ve baş boyun kanserinde kullanılmaktadır.

TPS; M3 monoklonal antikor kullanılarak CK18 ölçülür. Over kanseri, prostat kanseri, gastrointestinal kanser gibi çeşitli epitelyal hücreli karsinomlarda tümör markır olarak kullanılmaktadır (19).

Çeşitli araştırmalarda, kemoterapötik ilaçlarla hücre ölümünün indüklenmesi sonucunda oluşan kaspazla kırılmış CK18 ürünü M30'un ve total CK18'in belirlenmesinde kullanılan M65'in hasta serumunda arttığı gösterilmiş ve kanser tedavisinin takibinde kullanışlı oldukları belirtilmiştir.

Sadece kanserli hastalarda değil karaciğer hastalıkları, septik şok ve şiddetli enfeksiyonlarda da kaspazla kırılmış CK18 artışı saptanmıştır (20).

2.5. APOPTOZİSİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

2.5.1. HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYAMA

Hematoksilen-eozin boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi (23).

2.5.2. GİEMSA BOYAMA

Giemsa ile boyamada, hematoksilen-eozin ile boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır (23).

2.5.3. FLORESAN MİKROSKOPİ

Floresan mikroskopi, floresan maddelerin kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Canlı ve ölü hücre ayrımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. Propidium iyodür) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayrımı, hematoksilen boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisine bakılarak yapılır (23).

2.5.4. ELEKTRONMİKROSKOPİ

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir (23).

2.5.5. FAZ KONTRAST MİKROSKOPİ

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücrelerin yapıştıkları alttabakadan ayrılarak besiyerinde yüzmeleri, apoptotik hücreler üzerinde gelişen ceçikler, hücreler henüz alttabakaya yayılmış halde iseler stoplazmalarındaki vakuoller izlenebilir (23).

2.5.6. ANNEKSİN-V YÖNTEMİ

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin- V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir (23).

2.5.7. TUNEL YÖNTEMİ

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Konvansiyonel parafin kesitleri, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden

ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır (23).

2.5.8. M30 YÖNTEM

M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18’in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler (23).

2.5.9. KASPAZ-3 YÖNTEMİ

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir (23).

2.5.10. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamıdır. Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan ethidium bromide ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. Apoptotik hücrelerdeki endonükleaz aktivasyonu kromatinin oligonükleozomal parçacıklara ayrılmasına neden olur. Bu enzim kalsiyum ve magnezyum bağımlı olup, DNA’da tipik olarak 180-200 baz çifti ve katları biçiminde bir parçalanmaya yol açar. Bu parçalanma paterni, agaroz jel elektroforezinde merdiven biçiminde “ladder pattern” izlenir ve apoptoz için tipiktir. Agaroz jel elektroforez güvenilir sonuçlar veren kalitatif bir analiz yöntemidir (23).

2.5.11. WESTERN BLOTTING

Western blotlama ya da immunoblotlama denilen yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot hücrede ne kadar protein

biriktiğini gösterir. Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilir (23).

2.5.12.FLOW SİTOMETRİ

Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır. Apoptoz flow sitometri uygulamasında iki şekilde belirlenir.

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak (23).

2.5.13. ELISA (ENZYM LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. Apoptozda görülen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların salınmasını takip eden DNA fragmentasyonudur. ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında, gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür. ELISA analizinde, ELISA pleytlerindeki sitoplazmik nükleozomları belirlemek ve yakalamak için iki nükleozomal epitopa spesifik bir çift monoklonal antikor kullanılır. Bu analiz yöntemi agaroz jel elektroforez ile apoptotik DNA merdiveninin belirlenmesinden yaklaşık 500 kat daha fazla duyarlı ve çok sayıda örneğin test edilmesi açısından daha uygundur (23).

III-GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Afyonkarahisar il merkezinde bulunan iki özel diyaliz merkezinde, hiğflux polisulfan sentetik membran kullanılan diyalizerlerle tedavi edilen 70 hemodiyaliz hastası ve 20 gönüllü sağlıklı hastane personeli dahil edilmiştir. Bu çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulunun 19.03.2009 tarih ve 2009/5-27 sayılı onayı alınmıştır.

Çalışmamız 4 gruptan oluşmuştur.

1. Grup1 (n=20): (Kontrol grubu) sağlıklı grup
2. Grup 2 (n=23): 6 ay-3 yıldır diyalize girenler
3. Grup 3 (n=24): 4-7 yıldır diyalize girenler
4. Grup 4 (n=23): 8-10 yıldır diyalize girenler

Kontrol grubunun (grup 1) yaş ortalaması; $45 \pm 4,2$ olup 9 erkek ve 11 kadından oluşturuldu. Grup 2’de hastaların yaş ortalaması $55,4 \pm 1 4,6$ olup 12 erkek, 11 kadın hastadan oluşturuldu. Grup 3, 14 erkek, 10 kadın hastadan oluşturuldu ve yaş ortalamaları $54,6 \pm 15,3$ idi. Grup 4’ün yaş ortalaması $55,4 \pm 14,1$ olup 10 erkek, 13 kadından oluşturuldu.

Kontrol grubunun katılımcılarında herhangi bir kronik inflamatuvar hastalık mevcut değildi.

Kontrol grubundan M30 için EDTA’lı tüplere venöz kan alındı. Hemodiyaliz hastalarından, M30 çalışmak için hemodiyalize girmeden önce EDTA’lı tüpe ve üre, kreatinin, ürik asit, fosfor, kalsiyum parametreleri için eş zamanlı olarak antikoagülansız tüpe venöz kan alındı. Her iki tüpe alınan numuneler 4000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. EDTA’lı tüplerdeki

numunelerden ayrıştırılan plazmalar çalışma yapılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Antikoagülansız tüpteki numunelerden ayrıştırılan serum örnekleri hemen çalışıldı.

Gruplar arasında, M30 düzeyleri karşılaştırıldı. 2., 3. ve 4. gruplarda, her bir grubun kendi içinde, üre, kreatinin, kalsiyum, fosfor ve ürik asit düzeyleri ile M30 seviyelerinin ilişkisi belirlendi. Ayrıca tüm hemodiyaliz hastalarının (gruplara bölünmeden) üre, kreatinin, kalsiyum, fosfor ve ürik asit düzeyleri ile M30 seviyelerinin ilişkisi saptandı.

3.1. Biyokimyasal Analiz

M30, Peviva (Lausen,Switzerland) firmasına ait M30-Apoptosense ELISA kiti ile çalışıldı. Ölçümler Trinity (Biotech Captia Reader, USA) marka yıkayıcı ve okuyucu ile yapıldı.

Üre, kreatinin, kalsiyum, ürik asit, fosfor Cobas 400 otoanalizörde Roche (Mannheim, Germany) firmasına ait spektrofotometrik kitlerle ölçüldü.

3.2. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS paket programı kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi. Kontrol grubu ve diğer grupların M30 değerlerinin ikili karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi ve değişkenler arasındaki ilişkinin belirlenmesinde korelasyon analizi kullanıldı.

IV-BULGULAR

4.1. SONUÇLAR

Hemodiyaliz hastalarının üre, ürik asit, kreatinin, kalsiyum ve fosfor düzeyleri tablo-VII. de verilmiştir.

Tablo-VII. Hemodiyaliz hastalarının üre, ürik asit, kreatinin, kalsiyum, fosfor düzeyleri.

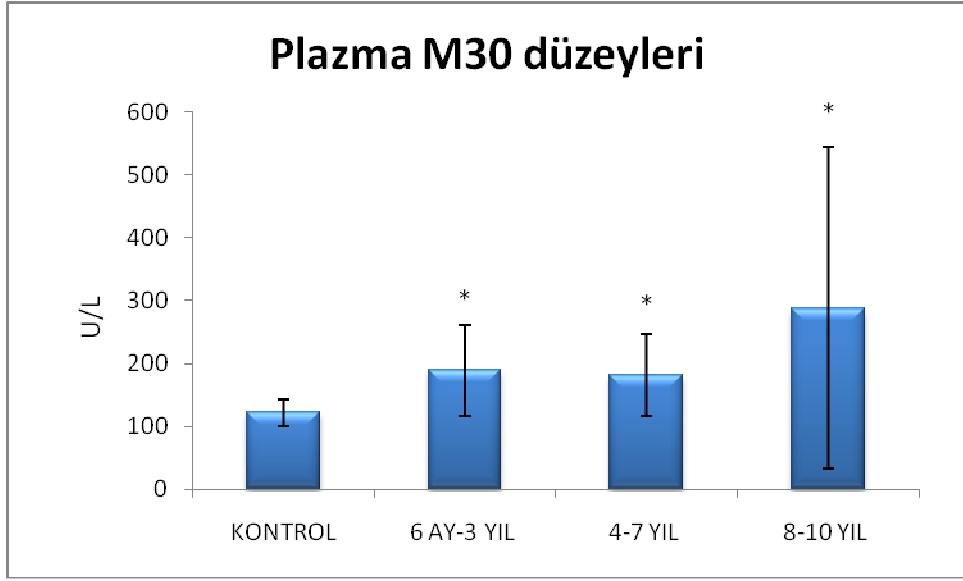
Grup	Üre (mg/dl)	Ürik asit (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	Kalsiyum (mg/dl)	Fosfor (mg/dl)
6ay-3yıl	132 ± 29,6	6.67 ± 1,46	8.63 ± 2,54	9.24 ± 0,69	5.39 ± 1,40
4-7yıl	126 ± 33,0	6.52 ± 1,48	8.49 ± 2,08	9.38 ± 0,84	5.36 ± 1,31
8-10yıl	132 ± 38,0	6.71 ± 0,96	9.29 ± 2,31	9.13 ± 1,27	5.78 ± 1,75

4.2. M30 Düzeyleri

Serum M30 düzeyleri Şekil 3’de ve tablo VI’da verilmiştir. Bu bulgulara göre plazma M30 düzeyleri tüm diyaliz gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). 4.grubun (8-10 yıl) M30 düzeyleri diğer gruplardan yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo-VI. Kontrol grubu ve hemodiyaliz hastalarının M30 düzeyleri.

Grup	M30 (U/L)
1.grup (Kontrol)	122 ± 20,9
2. grup (6ay-3yıl)	189 ± 71,7
3.grup (4-8yıl)	182 ± 65,2
4.grup (8-10yıl)	288 ± 255,7



Şekil 3. Plazma M30 düzeyleri (* $p < 0,01$ Kontrol grubu ile kıyaslandığında)

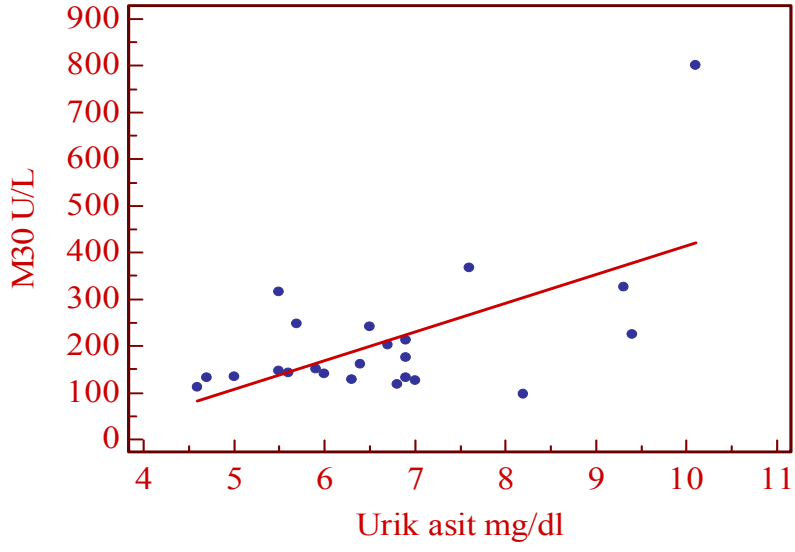
4.3. Hemodiyaliz grupları içinde M30 düzeyleri ile üremik toksinler arasındaki korelasyonlar

Her hemodiyaliz hasta grubunda, M30 ile üre, kreatinin, kalsiyum, üre, fosfor arasında korelasyon analizi yapılmıştır, sonuçlar şöyledir;

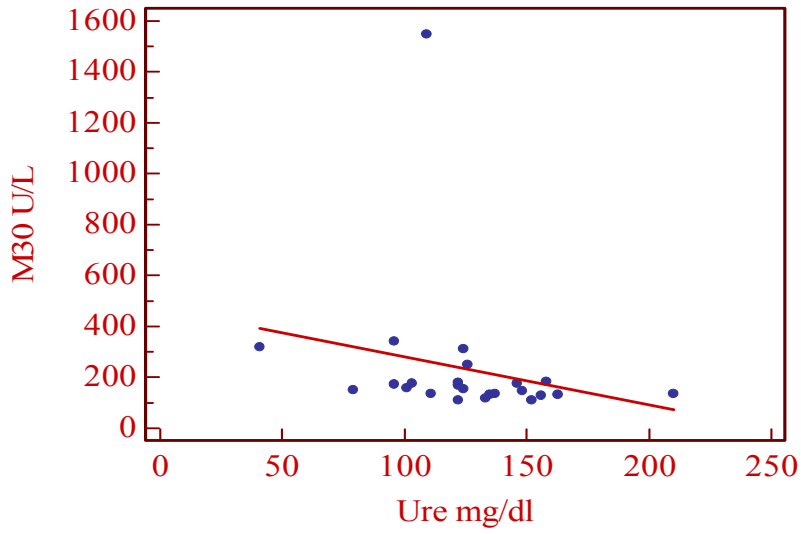
2.grup (6ay-3yıl); M30 ile üre ($r; 0,380$), keatinin ($r; 0,132$), kalsiyum ($r; 0,378$), fosfor ($r; 0,245$) arasında korelasyon bulunmazken ürik asit ile M30 arasında pozitif korelasyon ($r: 0,449$, $p < 0,05$) bulunmuştur. 2. Grubun M30'u ile ürik asit arasındaki korelasyon şekil 4'de gösterilmiştir.

3. grup (4-7yıl); M30 ile ürik asit ($r; -0,077$), kreatinin ($r; -0,241$), kalsiyum ($r; -0,252$), fosfor ($r; -0,361$) arasında korelasyon bulunmazken, M30 ile üre arasında negatif korelasyon ($r; -0,521$, $p < 0,01$) bulunmuştur. 3. Grubun M30'u ile üre arasındaki negatif korelasyon şekil 5'de gösterilmiştir.

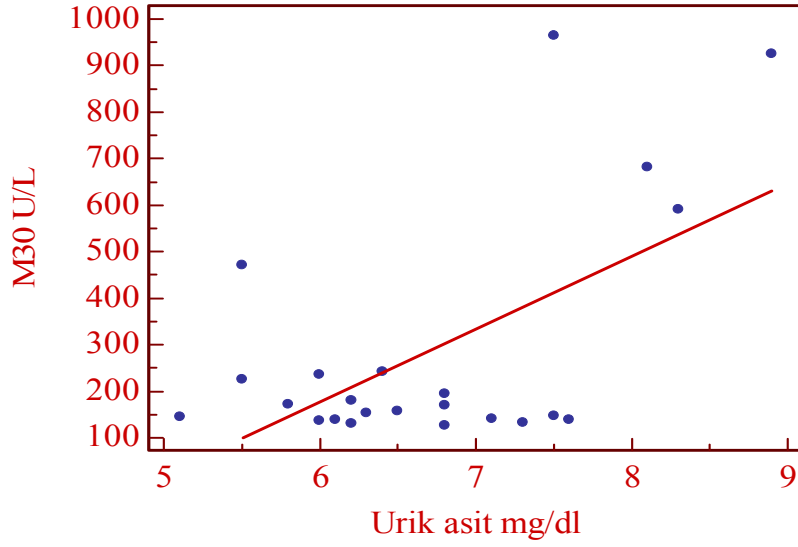
4. grup (8-10yıl); M30 ile üre ($r; 0,283$), kreatinin ($r; 0,261$), kalsiyum ($r; -0,352$), fosfor ($r; 0,399$) arasında korelasyon bulunmazken M30 ile ürik asit arasında pozitif korelasyon ($r: 0,590$, $p < 0,01$) bulunmuştur. 4. Grubun M30'u ile ürik asit arasındaki korelasyon şekil 6'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 2.grupta M30 ile ürik asit arasındaki korelasyon



Şekil 5. 3.grupta M30 ile üre arasındaki korelasyon



Şekil 6. 4.grupta M30 ile ürik asit arasındaki korelasyon

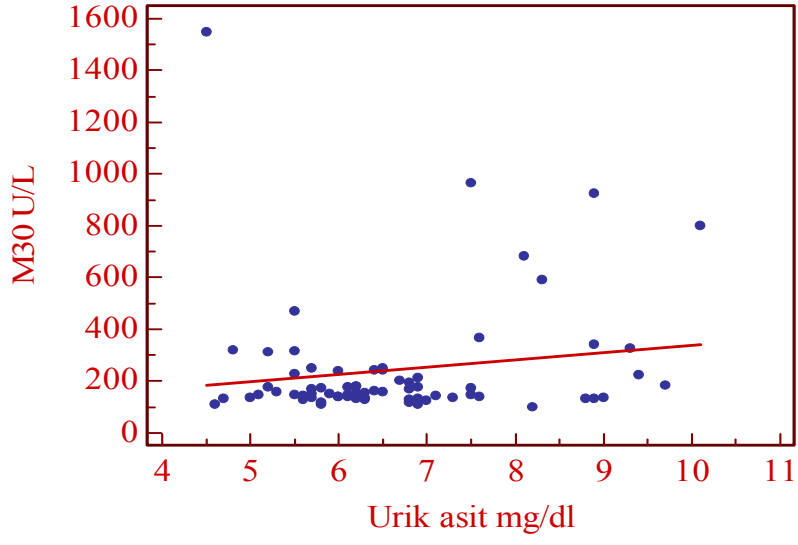
4.4. Tüm hemodiyaliz hastalarında M30 ile üremik toksinler arasındaki korelasyon

Hemodiyaliz hastalarının bütününde, M30 ile üre, kreatinin, kalsiyum, ürik asit, fosfor arasında korelasyon analizi yapılmıştır, sonuçlar şöyledir;

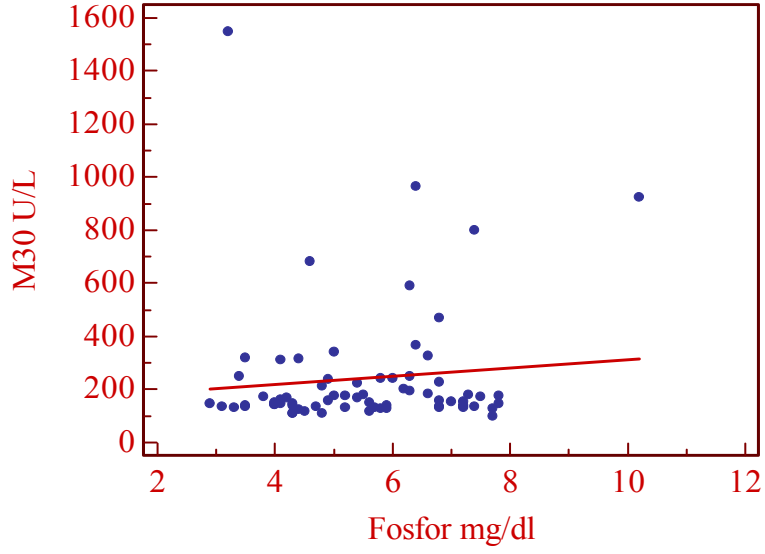
M30 ile üre ($r;0,157$), kreatinin ($r;0,168$) arasında korelasyon bulunmazken, M30 düzeyi ile ürik asit arasında pozitif korelasyon ($r: 0,291$, $p<0,05$) bulunmuş ve şekil 7'da gösterilmiştir.

Fosfor ile M30 arasındaki pozitif korelasyon ($r: 0,265$, $p<0,05$) gösterilmiş ve Şekil 8'de verilmiştir.

Kalsiyum ile M30 arasında negatif korelasyon ($r: -0,253$, $p<0,05$) bulunmuş ve Şekil 9'de gösterilmiştir



Şekil 7. Tüm hemodiyaliz hastalarında M30 ile ürik asit arasındaki korelasyon



Şekil 8. Tüm hemodiyaliz hastalarında M30 ile fosfor arasındaki Korelasyon

V-TARTIŞMA

Apoptozis, organizmanın genetik şifrelerinde bulunan ‘hücre intiharı’ programlarının gelişmesi ve/veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik ölümdür ve programlı hücre ölümü olarak da tanımlanır. Normal erişkin dokularda hücre büyümesi bir denge halindedir. Bu dengenin biri lehine bozulması çeşitli patolojilere yol açmaktadır. Apoptotik hücre ölümü, eksik veya aşırı uygulanması ile çeşitli karsinom, otoimmün hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi hastalıkların patogenezinde rol alır (17).

KBY’de apoptozis ile ilişkili çalışmalar daha çok immüdisfonksiyonun etiopatogenezinin anlamaya yöneliktir. Periferal kan hücrelerinden lökositler (mononükleer hücreler, polimorfonükleer hücreler) üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda üremik serumun ve/veya diyaliz tedavi yöntemlerinin etkisi araştırılmıştır.

Üremi, immüdisfonksiyon ile ilişkili olup artmış enfeksiyon ve malignensi oranı ile karakterizedir. Biyolojik sistemin devamlılığı için gerekli bir proses olan apoptozisin disregülasyonu ile hemostazis bozulmuştur. Literatürde üremik hastalarda apoptozis artışı rapor edilmiştir. D’Intini ve arkadaşları (24), üç üremik gruptan (hemodiyaliz grubu, periton diyalizi grubu, prediyaliz kronik böbrek yetmezliği grubu) elde ettikleri monositler üzerinde, yaklaşık 10 hafta boyunca takip ederek bir invitro çalışma yapmışlar ve apoptozisi, annexin V ve propidium iyodür kullanarak, flow sitometri yöntemiyle belirlemişlerdir. Kontrol grubu ve periton diyalizi hastalarına nazaran, hemodiyaliz hastalarında ve prediyaliz kronik böbrek hastalarında apoptozis oranının daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Periton diyalizi hastalarında apoptozis oranının kontrol grubuna daha yakın olmasını, üremik toksinlerin hemodiyaliz yöntemiyle belli aralarla dolaşımdan temizlenirken periton diyalizinde sürekli temizleniyor olmasına bağlamışlardır. Hemodiyalizde görülen apoptozis oranının takip edilen 10 hafta boyunca

değişmemesi hemodiyaliz tedavi yönteminden bağımsız olarak üreminin, mononükleer apoptozisi indüklediği sonucunu ortaya çıkarmıştır (24).

Sardenberg ve arkadaşları (25) 3 üremik gruptan (hemodiyaliz hastaları, periton diyalizi hastaları, prediyaliz kronik böbrek yetmezliği hastaları) elde edilen polimorfonükleer lökositlerde flow sitometri yöntemi ile annexin V bağlanmasını göstererek apoptozisi ölçmüşler, tam kanda, flow sitometri ile pmn'deki fagositoz ve reaktif oksijen türlerini çalışmışlardır. Prediyaliz kronik böbrek yetmezlikli hastalarda apoptozis oranını yüksek bulurken, hemodiyaliz ve periton diyalizi hastalarında kontrol grubuna yakın bulmuşlardır. Bunun sonucunda, üremik serumdaki üremik toksinlerin, pmn'de apoptozisi artırırken diyaliz yöntemlerinin apoptozisi yavaşlattığını öne sürmüşlerdir. Pmn'deki fagositoz oranını periton diyalizi hastalarında kontrol grubuna daha yakın bulurlarken hemodiyaliz grubunda pmn'lerin fagositoz yeteneklerinin azaldığını saptamışlar ve azalmış fagositoz oranını muhtemelen pmn'deki artmış apoptozis oranına bağlamışlardır. Pmn'deki fagositoz oranının, periton diyalizi hastalarında nispeten daha iyi olmasını, periton diyalizinin hemodiyalize oranla üremik toksinleri dolaşımdan daha sık temizliyor olması ile açıklamışlardır (25).

Martin-Malo ve arkadaşları (26) 5 ayı hemodiyaliz membranının (suprofan, hemofan, selüloz asetat, AN69, polisulfon) apoptozis oranına etkisini araştırmak amacıyla üremik hastalardan elde edilen mononükleer hücreler üzerinde invitro bir çalışma yapmışlardır. Mononükleer hücrelerdeki apoptozis oranını, diyaliz tedavisi almayan üremik hasta grubunda, kontrol grubu ve periton diyalizi grubuna nazaran daha yüksek bulmuşlar ayrıca beş diyaliz membranı içinde en yüksek apoptozis oranlarını, hemofan ve suprofan membranlarının kullanıldığı hemodiyaliz hastalarında saptamışlardır. Üreminin bizzat kendisinin apoptozisi indüklediği ve ayrıca seçilen tedavi şekli ile kullanılan membran çeşitlerinin de apoptozis oranını etkilediği sonucuna ulaşmışlardır (26).

Bu üç çalışmada üremik kandan elde edilen lökositlerdeki apoptozis oranının artmış olması bizim çalışmamızdaki apoptozis oranının hemodiyaliz

hastalarında kontrol grubuna nazaran daha yüksek olması ile uyumluydu. Ancak biz çalışmamızda bu üç çalışmadan farklı olarak hemodiyaliz tedavisi gören hastaları, hemodiyalize girdikleri süreler göre gruplandırıp, hemodiyaliz hasta grupları arasındaki M30 düzeylerini karşılaştırarak, hemodiyaliz tedavi süresinin apoptozis oranı üzerinde etkisinin olup olmadığını belirlemeyi amaçladık. Çalışmamıza dahil edilen 8-10yıl süreyle hemodiyalize giren grupta diğer gruplara göre çok yüksek M30 düzeyleri bulmamıza rağmen, bu grupta aynı zamanda düşük M30 seviyelerinin de olması nedeniyle apoptozis oranı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulamadık ve hemodiyaliz tedavi süresinin üremiden bağımsız olarak apoptozis oranını arttırmadığını belirledik.

Fernandez-Fresnedo ve arkadaşları (27) üremik hastaların lenfositlerinde invitro olarak yaptıkları çalışmada, apoptozisi flow sitometride propidium iyodür ile boyayarak ölçmüşler ve Fas ve Bcl-2'yi de flow sitometri ile belirlemişlerdir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında prediyaliz üremik hastalarda ve hemodiyaliz hastalarında B lenfositlerindeki apoptozis oranı artarken B lenfosit sayılarının da azaldığını saptamışlardır. B lenfosit apoptozisindeki artışa Bcl-2 ekspresyonundaki azalmanın eşlik ettiğini göstermişler ve kronik böbrek hastalarındaki B lenfositlerinin apoptozisinin artışına Bcl-2 ekspresyonundaki azalmanın neden olabileceği sonucuna ulaşmışlardır (27).

Üremide total T lenfosit sayılarında azalma ve T helper (Th) lenfosit oranlarında (Th1/Th2) dengesizlik olduğu gösterilmiştir. Alvarez-Lara (28) ve arkadaşları yaptıkları invitro çalışmada, üremik hastaların Th1 lenfositlerinde apoptozis oranının arttığını bulmuşlar ve bunun da KBY'li hastalarda sellüler immünitede değişikliğe neden olabileceği sonucuna ulaşmışlardır (28).

Sekonder hiperparatroidizm KBY de sık rastlanan bir komplikasyondur ve paratroid hormonun aşırı sekresyonuyla beraber paratroid bezinde meydana gelen hiperplazinin hücre proliferasyonu ile apoptozis arasındaki dengenin bozulduğunu gösterdiği ifade edilmektedir. Zhang ve ark. (29) primer ve sekonder hiperparatroidizm olgularında, paratroid bezinde apoptozis oranına bakmışlar ve

her iki hiperplazi çeşidinde de bezdeki aşırı proliferasyona paralel olarak apoptozis oranının da arttığını göstermişlerdir (29).

Literatürde, bazı üremik toksinlerin apoptozise etkisini göstermeyi amaçlayan çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bunlardan bir tanesinde, Cohen ve ark. (6) üremik serumda ve peritoneal sıvıda biriken, üremik toksin olarak nitelendirilen, glukoz modifiye proteinlerin p_{mn} apoptozisini arttırdığı ve böylece immüdisfonksiyona katkıda bulunduğunu gözlemlemişler (6), yine Cohen ve ark. (30) yaptıkları bir diğer çalışmada bir başka üremik toksin olan immünglobulin light zincirlerinin hemodiyaliz hastalarında p_{mn}'lerin apoptozisini yavaşlattığını bulmuşlardır (30).

Üremik toksinlerin endotelial hücreler üzerindeki apoptozis oranına etkisini göstermeyi amaçlayan çalışmalardan birinde, Dou ve ark. (31) pek çok üremik toksinin (guanidin bileşikleri, poliaminler, okzalat, miyoinozitol, üre, ürik asit, kreatinin, indoksil sülfat, indolasetik asit, p-krezol, hippurik asit, homosistein) endotelial fonksiyon üzerine etkisini araştırmışlardır. Bu toksinlerden ikisinin, p-krezol ve indoksil sülfatın, endotelial hücrelerde apoptozisi arttırmadığını fakat endotelial hücre proliferasyonu ve oluşan hasarın tamirini azalttığını göstermişler ve böylece bu üremik toksinlerin, üremik hastalardaki endotelial disfonksiyonda rol oynayabilecekleri görüşünü öne sürmüşlerdir (31).

Bir diğer çalışmada, Di Marco ve ark. (7) endotelial hücreler üzerinde ekstrasellüler fosfat artışının etkisini araştırdıkları bir invitro çalışmada hiperfosfateminin endotelial hücrelerin apoptozisini arttırdığını bulmuşlar ve bunun da üremik hastalardaki vasküler komplikasyonları başlatan etken olabileceği, bu prosesin tamiri ile endotelial bütünlüğün sağlanabileceği sonucuna ulaşmışlardır (7).

Biz, apoptozis ile üremik toksinlerin ilişkisini göstermek üzere hemodiyaliz hastalarında yaptığımız bu çalışmada, 5 üremik toksinin (üre, kreatinin, ürik asit,

kalsiyum, fosfat) apoptozis artışı üzerine etkisini araştırdık. Hemodiyaliz hasta gruplarında, bu üremik toksinlerin plazma M30 düzeyi ile korelasyon profillerini ortaya koyduk. M30 düzeyleri ile 2.grupta (6ay-3yıdır hemodiyaliz tedavisi görenler) ürik asit, ve 4.grupta (8-10yıdır hemodiyaliz tedavisi görenler) yine ürik asit arasında pozitif korelasyon, 3. grupta (4-7yıdır hemodiyaliz tedavisi görenler) M30 ile üre arasında negatif korelasyon saptadık. Tüm hemodiyaliz hastaları dikkate alındığında M30 ile ürik asit ve fosfor arasında pozitif korelasyon, kalsiyum ile M30 arasında ise negatif korelasyon bulduk. Bu bulgularımız bize ürik asit, ve fosforun apoptozis oranını arttırabileceğini düşündürmüştür.

Hemodiyaliz tedavisi gören üremik hastalarda yaptığımız çalışmamızda apoptotik hücre ölümünü belirlemek için plazma M30 düzeyini ölçtük. Hücre ölümünün dolaşımdaki biyobelirteci olan M30 aynı zamanda kanser, otoimmün hastalıklar, karaciğer hastalıkları ve vasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarda, hasta takibinde kullanılabilen yararlı bir markıdır. Özellikle yeni kanser tedavilerinin denemelerinde bu biyobelirteçler seri tümör biyopsilerine karşın periferel kan örneklerinden çalışıldıkları için çalışma örneklerinin elde edilmesi açısından çok daha avantajlıdır. M30, CK18'in aspartat 396'da kaspazla kırılması ile ortaya çıkan bir neopitoptur, apoptotik hücre ölümünü belirler ve M30 apoptosense ELİSA gibi basit ölçüm yöntemleri ile saptanabilir. M65 ölçümü ise, apoptozis ya da nonapoptotik hücre ölümü sırasında salınan total CK18 (hem kaspazla kırılmış hem de intakt CK18'in her iki formu) formunu saptar. Bu biyobelirteçler hem serum hem plazmada çalışılabilmektedirler. Özellikle epitelyal kanserlerde hücre ölüm biyobelirteci olarak M30 ve M65 kullanılmaktadır (32).

M30 ve M65 hücre ölümünün biyolojik markırı olarak meme, akciğer ve endometrium kanserli hastalarda kemoterapiye cevabın değerlendirilmesi ve prognozinin belirlenmesinde yararlı olduğu gösterilmiştir. Öztürk ve arkadaşları (33), lokal baş-boyun kanserli hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada, kontrol

grubuna nazaran lokal baş-boyun kanserli hasta grubunda, serum M30 ve M65 düzeylerinin yükseldiğini saptamışlar ve bunun sonucunda M30 ve M65'in serumdaki yüksek seviyelerinin, lokal baş-boyun kanseri için prognostik anlam taşıdığı sonucuna ulaşmışlardır (33).

Solubl CK18 fragmentlerinin (M30, M65), metastaz sıklığı yüksek kolorektal kanserli hastalarda potansiyel bir biyobelirteç olarak yeri gösterilmiştir. Aussch ve arkadaşları (34) 62 kolorektal kanserli hastada yaptıkları çalışmada preoperatif ve postoperatif serum örneklerinde M30 ve M65 çalışmışlar ve M65'in beraberinde sistemik metastaz görülme sıklığı yüksek olan bu hastalarda yararlı bir markır olabileceğini öne sürmüşlerdir (34).

Hem plazma hem de serumda, çeşitli kanser tiplerinde farklı kemoterapötik ilaçlar kullanarak yapılan klinik denemeler ile kemoterapötik ilaçların indüklediği hücre ölümünün farmakodinamik biyobelirteci olarak M30 ve M65'in geniş kapsamlı kullanımı gösterilmiştir. De Haas ve arkadaşları (35) epitelyal orjinli, kemosenitif ve %80-90 oranında kür elde edilebilen bir kanser olan testiküler germ hücreli kansere sahip ve bleomisin, etoposid, sisplatin tedavisi gören 34 hastada bir çalışma yapmışlardır. İlaç tedavisi verilmeden önce ve verildikten sonra M0 ve M65 düzeylerini ölçmüşlerdir. İlaç tedavisinden önce, testiküler germ hücreli tümör markırı olarak kabul görmüş, laktat dehidrogenaz, alfa fetoprotein, β -human koryonik gonodotropin markırlarının düzeyleri ile M30 ve M65 düzeylerinin korele olduğunu ve M30 ile M65'in tümörün büyüklüğünü yansıtabileceğini bulmuşlardır. İlaç tedavisinden sonra ise prognozu kötü olan hastalarda, M30 ve M65 düzeylerindeki değişimin daha fazla olduğunu görmüşlerdir. Bu sonuçlar ile M30 ve M65'in bu hastalar için prediktif değere sahip olduğu ve kemoterapötik ilaçların tümörde meydana getirdikleri değişiklikleri yansıtıldığını ileri sürmüşlerdir (35).

Cummings ve arkadaşları (36) yaptıkları bir çalışmada SW620 insan kolon ksenograftı taşıyan ratlarda, auroro kinaz inhibitörü AZD1152 ile apoptotik hücre ölümünü indükleyerek M30, M65 düzeylerindeki değişiklikleri ölçmüşlerdir.

M30'un ilaçla indüklenen apoptotik hücre ölümü için bir biyomarkır olduğunu ve M65'in ise tümörün büyümesi ile korele olup, bu nedenle daha çok tümör büyüklüğünü yansıtan bir biyobelirteç olduğunu ifade etmişlerdir (36).

Kronik karaciğer hastalıklarında ve sirozda karaciğer hücre apoptozisin oldukça arttığı bulunmuştur. Kronik hepatit C hastalarında, apoptoziste kaspazla yıkım sonucu ortaya çıkan ürünlerin düzeyi ile karaciğerdeki inflamasyona bağlı hasarın derecesinin korele olduğu biyopsilerde gösterilmiştir. Yağmur ve arkadaşları (37) M30 antijen serum konsantrasyonunun kronik karaciğer hastalıklarındaki klinik ve diagnostik değerini tespit etmek amacıyla 76 kronik karaciğer hastası üzerinde bir çalışma yapmışlar, M30 düzeylerinin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kronik karaciğer hastalarında arttığını ve kolanjit, kolelitiazis gibi hepatik inflamasyonla korele olduğunu tespit etmişlerdir (37).

Yılmaz ve arkadaşları (38), nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı olanlarda yaptıkları bir çalışmada, basit yağlanma ile nonalkolik karaciğer yağlanmasını ayırt etmekte serum M30 ve M65 düzeylerinin kullanılıp kullanılmayacağını tespit etmeye çalışmışlardır. Kesin tanısı biyopsi ile konmuş nonalkolik karaciğer yağlanması olan hastalarda, M30 ve M65 düzeylerini yüksek bulmuşlar ve nonalkolik karaciğer yağlanmasını tanımlamada bu biyobelirteçlerin yararlı olabileceği sonucuna ulaşmışlardır (38).

Simopoulos ve arkadaşları (39) laporoskopik kolesistektomi ile tanısı konmuş, kronik taşlı kolesistiti olan 35 hastada hem serumda hem de safra örneklerinde M30 ve M65 düzeylerini ölçmüşlerdir. Serumda ve safrada, M30 ve M65 düzeylerinin arttığını ayrıca her iki CK18 formunun serum düzeyleri ile karşılaştırıldığında safra örneklerinde daha yüksek olduğunu bulmuşlar fakat M30 ve M65 düzeylerinin artışının aktif kolesistit ile inaktif kolesistiti ayırımında yararlı olmadığı sonucuna ulaşmışlardır (39).

şentürk ve arkadaşları (40) akut koroner sendromlu hastalarda, serum M30 ve M65 düzeylerinin seri ölçümlerini (hastaneye girişte, 24 saat sonra, 48 saat

sonra) yapmışlar ve akurt miyokart infarktöslü hastalarda bu iki biyobelirtecın düzeylerindeki artışın, 24 saat sonraki ölçümlerde pik yaptığını böylece koroner hastalığın boyutunu yansıtabileceğini bulmuşlardır (40).

Sonuç olarak hemodiyaliz tedavisi gören SDBY olan hastalar üzerinde yaptığımız bu çalışmada, sağlıklı kişilere oranla apoptozisin arttığını gösterdik. Hemodiyaliz hastalarındaki serum üre, kreatinin, ürik asit, kalsiyum ve fosfat düzeylerini plazma M30 düzeyleri ile karşılaştırdığımızda ürik asit ve fosfor ile M30 arasında bulduğumuz pozitif korelasyon ile bu üremik toksinlerin SDBY'deki hastalarda apoptozis oranının artışında rol oynayabileceklerini gördük. Hemodiyaliz tedavi sürelerine göre yaptığımız gruplar arasında apoptoziz oranları anlamlı farklılık göstermediği için hemodiyaliz tedavi süresinin apoptozis artışına etki etmediği sonucuna ulaştık.

VI. SONUÇLAR

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür.

- 1- Tüm hemodiyaliz hastalarında (tüm hemodiyaliz grupları) M30 düzeyleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
- 2- Hemodiyalize giriş sürelerine göre sınıflandırdığımız Hemodiyaliz grupları arasında yapılan karşılaştırmada, M30 düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- 3- Tüm hemodiyaliz hastalarında M30 ile ürik asit ve fosfor arasında pozitif korelasyon, M30 ile kalsiyum arasında ise negatif korelasyon bulunmuştur.
- 4- Hemodiyaliz hastalarından 2.grupta M30 ile ürik asit arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.
- 5- Hemodiyaliz hastalarından 3.grupta M30 ile üre arasında negatif korelasyon bulunmuştur.
- 6- Hemodiyaliz hastalarından 4.grupta M30 ile ürik asit arasında pozitif korelasyon bulunmuştur.

Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre hemodiyaliz hastalarında apoptozisin arttığı ve bu artışta üremik toksinlerin katkısının olabileceği, fakat hemodiyaliz tedavi süresinin apoptozis üzerine etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar bize SDBY hastalarında en uygun tedavi yöntemlerinin belirlenip üremik toksinlerin hasta dolaşımından etkin biçimde uzaklaştırılmasının, apoptozisin ve apoptozis artışının neden olduğu pek çok patolojik sürecin azaltılmasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

VII. ÖZET

Bu çalışmanın amacı, KBY’de üremik toksinlerin (üre, kreatinin, ürik asit, kalsiyum, fosfor) ve hemodiyaliz tedavi süresinin apoptozis üzerine etkisini, sitokeratinlerin apoptosiz sırasında kaspazlar tarafından yıkılması ile oluşan M30 biyobelirtecinin plazma konsantrasyonunu ölçerek araştırmaktır.

Çalışmaya hemodiyaliz tedavisi alan yaşları ortalama 55 ± 14 olan 34 kadın ve 36 erkek toplam 70 hemodiyaliz hastası ve yaşları ortalama 45 ± 4 olan 11 kadın 9 erkek toplam 20 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hemodiyaliz hastaları tedavi sürelerine göre gruplandırıldı; 1.grup; kontrol grubu, 2.grup; 6 ay-3 yıl, 3.grup; 4-8 yıl, 4.grup; 8-10 yıl süreyle hemodiyaliz tedavisi görenler.

Hemodiyaliz öncesi alınan kanlardan M30 düzeyi ELISA yöntemi ile üre, kreatinin, ürik asit, fosfor ve kalsiyum düzeyleri spektrofotometrik yöntem ile ölçüldü.

Plazma M30 düzeyleri hemodiyaliz hasta gruplarında (2.grup; $189 \pm 71,7$ U/L, 3.grup; $182 \pm 65,2$ U/L, 4.grup; $288 \pm 255,7$ U/L) kontrol grubuna ($122 \pm 20,9$ U/L) göre anlamlı oranda yüksek bulundu. ($p < 0,01$) 2.grupta ürik asit ile M30 ($p < 0,05$, $r: 0,449$), 3.grupta üre ile M30 ($p < 0,01$, $r: -0,521$), 4.grupta ürik asit ile M30 ($p < 0,01$, $r: 0,590$) arasında korelasyon vardı. Tüm hemodiyaliz hastalarında ise M30 ile ürik asit ($p < 0,05$, $r: 0,291$), fosfor ($p < 0,05$, $r: 0,265$) ve kalsiyum ($p < 0,05$, $r: -0,253$) arasında korelasyon bulundu.

Sonuç olarak çalışmamızın bulguları KBY’li hastalarda apoptozisin arttığını ve bu artışta fosfor ve ürik asitin rolünün bulunabileceğini, hemodiyaliz tedavi sürelerinin apoptozis üzerine etkili olmadığını göstermiştir.

VIII- SUMMARY

The objective of this study is to investigate the impact of both the uremic toxins (urea, creatinine, uric acid, calcium, phosphorus) and the hemodialysis treatment duration onto apoptosis process by measuring the level of M30 biomarkers which are generated by the caspase's cleave of cytokeratins during this apoptosis process.

Seventy volunteer patients that were composed of 34 female and 36 male patients who had undergone hemodialysis treatment with a mean age 55 ± 14 and twenty healthy volunteers that were composed of 11 female and 9 male with a mean age 45 ± 4 were included to this study. Hemodialysis patients were grouped on the basis of their treatment duration; 1st group was taken as a control group, 2nd group was selected between the ranges of 6 months-3 years; 3rd group was between the ranges of 4-8 years; 4th group was between the ranges 8-10 years of hemodialysis treatment.

Whilst M30 levels were measured via ELISA methods, urea, creatinine, uric acid, phosphorus and calcium were obtained via spectrophotometric methods in blood samples which were taken prior to hemodialysis treatment.

As a result, M30 levels of plasma (2nd group: $189 \pm 71,7$ U/L, 3rd group; $182 \pm 65,2$ U/L, 4th group; $288 \pm 255,7$ U/L) were found significantly higher in hemodialysis patient groups when compared to the control group. ($p < 0,01$) The correlations among M30 and uric acid in 2nd group ($p < 0,05$, $r: 0,449$); M30 and urea in 3rd group ($p < 0,01$, $r: -0,521$); M30 and uric acid in 4th group ($p < 0,01$, $r: 0,590$) were found statistically significant. Additionally, the correlations were found statistically significant among M30 levels and uric acid ($p < 0,05$, $r: 0,291$), phosphorus ($p < 0,05$, $r: 0,265$), calcium ($p < 0,05$, $r: -0,253$) in whole hemodialysis patients.

In conclusion, we suggest that apoptosis increases in hemodialysis patients and is closely correlated with serum phosphorus and uric acid levels but total duration of hemodialysis is not correlated with the apoptosis.

IX. KAYNAKLAR

1. Brenner BM, Lazarus JM. Chronic renal failure. In Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, eds. Harrison's principles of internal medicine: U.S.A: Mcgrow-Hill, Inc. 1994:1274-1281
2. Dalgıç N, Yetkin D. Üremik Sendrom. Türkiye Klinikleri 1986; 6: 1:47-51
3. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argile's A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Lemke HD, Massy ZA, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Tetta C, Wanner C, Zidek W, Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 2003;63:1934–1943
4. Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptosis ve kardiyovasküler hastalıklar. *Anadolu Kardiyol Derg* 2002; 4:323-329
5. Ueno T, Toi M, Linder S. Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. *Biomed Pharmacoter* 2005; 59:359-362
6. Cohen G, Rudnicki M, Walter F, Niwa T, Hörl WH. Glucose-modified proteins modulate essential functions and apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:1264-1271
7. Di Marco GS, Hausberg M, Hillebrand U, Rustemeyer P, Wittkowski W, Lang D, Pavenstädt H. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294:1381-1387
8. Yenicesu M. Kronik böbrek yetmezliği. In Arık N, Nefroloji. İstanbul: Deniz Matbacılık, 2001:212-224

9. Süleymanlar G. Kronik böbrek hastalığı ve yetmezliği: tanımı, evreleri ve epidemiyolojisi. *J Int Med Sci* 2007; 338:1-7
10. Lim J, Gasson C, Kaji DM. Urea inhibits NaK2Cl cotransport in human erythrocytes. *J Clin Invest* 1995; 96:2126–2132
11. Vanholder R, De Smet R. Pathophysiologic effects of uremic retention solutes. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1815–1823
12. Noris M, Benigni A, Boccardo P, Aiello Q, Gaspari F, Todeschini M, Figliuzzi M, Remuzzi G. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: Implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension. *Kidney Int* 1993; 44:445–450
13. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *Y.Y.Ü Vet Fak Derg* 2008; 19:55-63
14. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. *Türk Kardiyol Dern-Arch Turk Soc Cardiol* 2008; 36:120-130
15. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi* 2001; 2:91-95
16. Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncologica* 2009;48: 811-821
17. Baykal Y, Özet G, Kocabalkan F. Apoptozis ve İmmün Sistem. *T Klin J Med Sci* 1998;18:11-14

18. Da Silva F, Nizet V. Cell death during sepsis: İntegration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis*. 2009; 14:509-521
19. Barak V, Goike H, Panaretakis KW, Einarsson R. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clin Biochem* 2004; 37:529-540
20. Linder S. Cytokeratin markers come of age. *Tumor Biol* 2007; 28:189-195
21. Milli ÜH, Hazıroğlu R, Aydın Y, Gülbahar MY. Köpek meme tümörlerinde sitokeratin, vimentin ve alfa-düz kas aktin intermedier ve mikro filamentlerin immunohistokimyasal lokalizasyonu. *Turk J Vet Anim Sci* 2000; 24:81-92
22. Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology* 2002; 40:403-439
23. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Vet Fak Derg* 2008; 2:73-78
24. D'Intini V, Bordoni V, Fortunato A, Galloni E, Carta M, Galli F, Bolgan I, Inguaggiato P, Poulin S, Bonello M, Tetta C, Levin N, Ronco C. Longitudinal study of apoptosis in chronic uremic patients. *Semin Dial* 2003; 16:467-473
25. Sardenberg C, Suassuna P, Cruz Andreoli MC, Watanabe R, Aparecido Dalboni M, Manfredi SR, Dos Santos OP, Kallas EG, Draibe SA, Cendoroglo M. Effects of uraemia and dialysis modality on polymorphonuclear cell apoptosis and function. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:160-165
26. Martin-Malo A, Carcedo J, Ramirez R, Rodriguez-Benot A, Soriano S, Rodriguez M, Aljama P. Effect of uremia and dialysis modality on mononuclear cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11:936-942

27. Fernandez-Fresnedo G, Angeles Ramos M, Gonzales-pardo MC, De Francisco ALM, Lopez-Hoyos M, Arias M. B lymphopenia in uremia is related to an accelerated in vitro apoptosis and dysregulation of Bcl-2. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:502-510
28. Alvarez-Lara MA, Carracedo J, Ramírez R, Martín-Malo A, Rodríguez M, Juan Madueno A, Aljama P. The imbalance in the ratio of Th1 and Th2 helper lymphocytes in uremia is mediated by an increased apoptosis of Th1 subset. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 3084–3090
29. Zhang P, Duchambon P, Gogusev J, Nabarra B, Sarfati E, Bourdeau A, Drüeke TB. Apoptosis in parathyroid hyperplasia of patients with primary or secondary uremic hyperparathyroidism. *Kidney Int* 2000; 57:437–445
30. Cohen G, Rudnicki M, Deicher R, Hörl WH. Immunoglobulin light chains modulate polymorphonuclear leucocyte apoptosis. *Eur J Clin Invest* 2003;33: 669–676
31. Dou L, Bertrand E, Cerini C, Faure V, Sampol J, Vanholder R, Berland Y, Brunet P. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int* 2004; 65:442–451
32. Greystoke A, Cummings J, Ward T, Simpson K, Renehan A, Butt F, Moore D, Gietema J, Blackhall F, Ranson M, Hughes A, Dive C. Optimisation of circulating biomarkers of cell death for routine clinical use. *Ann Oncol* 2008; 10: 990-995

33. Ozturk B, Coskun U, Sancak B, Yaman E, Buyukberber S, Benekli M. Elevated serum levels of M30 and M65 in patients with locally advanced head and neck tumors. *Int Immunopharmacol* 2009; 9:645–648
34. Ausch C, Buxhofer-Ausch V, Olszewski U, Schiessel R, Ogris E, Hinterberger W, Hamilton G. Circulating cytokeratin 18 Fragment M65-a potential marker of malignancy in colorectal cancer patients. *Gastrointest Surg* 2009; 13:2020–2026
35. De Haas EC, Di Pietro A, Simpson KL, Meijer C, Suurmeijer AJH, Lancashire LC, Cummings J, De Jong S, De Vries EGE, Dive C, Gietema JA. Clinical evaluation of M30 and M65 ELISA cell death assays as circulating biomarkers in a drug-sensitive tumor, testicular cancer. *Neoplasia* 2008; 10:1041–1048
36. Cummings J, Hodgkinson C, Odedra R, Sini P, Heaton SP, Mundt KE, Ward TH, Robert Wilkinson RW, Growcott J, Hughes A, Dive C. Preclinical evaluation of M30 and M65 ELISAs as biomarkers of drug induced tumor cell death and antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(3):455-463
37. Yagmur E, Trautwein C, Leers MPG, Gressner AM, Tacke F. Elevated apoptosis-associated cytokeratin 18 fragments (CK18Asp386) in serum of patients with chronic liver diseases indicate hepatic and biliary inflammation. *Clin Biochem* 2007; 40:651–655
38. Yılmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, Akgöz S, Keskin M, Kiyici M, Aker S, Yılmaztepe A, Gurel S, Gulden M, Nak SG. Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World J of Gastroenterol* 2007; 13:837-844

39. Simopoulos C, Tsaroucha AK, Asimakopoulos B, Giatromanolaki A, Gavriilidis P, Polychronidis A, Karayiannakis A. Total caspase-cleaved cytokeratin 18 in chronic cholecystitis: a prospective study. *BMC Gastroenterol* 2008; 8:14-18

40. Senturk T, Aydinlara A, Yilmaz Y, Yilmaztepe Oral A, Ozdabakoglu O, Ulukaya E. Serial changes in circulating M30 antigen, a biomarker of apoptosis, in patients with acute coronary syndromes: relationship with the severity of coronary artery disease. *Coron Artery Dis* 2009; 20:494–498