



T.C.

SAĞLIK BAKANLIĞI

İSTANBUL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

TIBBİ BİYOKİMYA LABORATUVARI

Klinik Şefi Uzm. Dr. Güvenç GÜVENEN

**DİABETES MELLİTUSLU HASTALARDA İLERİ
OKSİDASYON PROTEİN ÜRÜNLERİ'NİN (AOPP)
KİNETİK VE END-POINT YÖNTEMLERLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tıbbi Bio. Osman OĞUZ

TIBBİ BİYOKİMYA

UZMANLIK TEZİ

İstanbul-2011

TEŞEKKÜR

Hastanemizin fiziki koşullarının düzeltilebilmesi, daha kaliteli hizmet verebilmesi için uğraşan ve bizleri her türlü bilimsel yayınlarda destekleyen hastane başhekimimiz Sayın Doç. Dr. Özgür Yiğit'e,

Uzmanlık eğitimi süresince bilgi birikimi ve deneyimlerini bizden esirgemeyen, eğitimimizde büyük emeği olan ve bize her zaman sıcak bir aile ortamında çalıştığımızı hissettiren şefimiz sayın Uzm. Dr. Güvenç Güvenen'e

Bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen, yaptığım bilimsel çalışmalarda ve tezimde emeği geçen Uzmanlarımız Uzm. Dr. Berrin Berçik İnal, Uzm. Bio. Çiğdem Topkaya, Uzm. Dr. Hale Aral, Uzm. Dr. Pınar Tonbaklar Bilgi, Uzm. Ecz. Sevil Kapucu'ya

Güzel bir dostluk ortamında birlikte çalıştığımız sevgili asistan arkadaşlarım, Cihan Özer, F. Sinem Hocaoglu Emre, Turgut Aksoy ve uzmanlık eğitimlerini daha önce başarıyla tamamlamış olan arkadaşlarım Alpertunga Özdemir, Aram Aslan, Cansel Tuhral, Murat Usta, Mustafa Şahin ve Ömer Emecen'e

Laboratuvar ailemizin diğer fertlerine ve laboratuvar çalışanı bütün arkadaşlarıma

Benden sevgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Gökçe Oğuz'a, oğlum Poyraz'a ve aileme

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. DİABETES MELLİTUSUN TARİHÇESİ	2
2.2. DİABETES MELLİTUSUN TANIMI	5
2.3. DİABETES MELLİTUSUN İNSİDANSI VE EPİDEMİYOLOJİSİ.....	6
2.3.1. Amerikan Diabet Birliğinin Diabet Sınıflandırılması	7
2.4. DİABETES MELLİTUSUN TANISI (ADA 2010)	9
2.4.1. Standart Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT).....	10
2.4.2. ADA diabet tanı kriterleri (15).....	11
2.5. DİABETİN VE KOMPLİKASYONLARININ PATOGENEZİ	12
2.6. PROTEİN OKSİDASYONUNUN ANA MEKANİZMALARI	14
2.6.1. Protein Fragmentasyonu ve Karbonil Türevlerinin Oluşumu	16
2.6.2. Tiyoil Gruplarının Oksidasyonu	20
2.6.3. Nitrotirozin Oluşumu.....	20
2.7. PROTEİN OKSİDASYONUNUN ÖNEMİ	22
2.8. DİABET VE OKSİDATİF STRES	23
2.8.1. Glukozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi	25
2.8.2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (ilerlemiş glikasyon son ürünleri) Oluşumu	26
2.8.3. Polioli Yolu	27
2.9. İLERİ PROTEİN OKSİDASYON ÜRÜNLERİ (AOPP)	28
2.10. SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ	31
2.10.1. End Point Yöntem.....	31
2.10.2. Kinetik Yöntem	33
2.11. ANALİTİK YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ	36
2.11.1. Validasyon Stratejisi	36
2.11.2. Geçerlilik Göstergeleri	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. AOPP ÖLÇÜMÜNDE END-POINT VE KİNETİK YÖNTEM APLİKASYONU.....	46
3.1.1. Reaktifler:	46
3.1.2. Fosfat Tamponu:	46
4. BULGULAR	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	54
KAYNAKLAR	61

KISALTMALAR

AOPP: Advanced Oxidation Protein Products
HOCL: Hipoklorik Asit
DM: Diabetes Mellitus
NCCLS: National Commity For Clinical Laboratory Standarts
SOR: Serbest Oksijen Radikali
NIDDM: Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus
WHO: World Health Organisation
ADA; American Diabet Assosiation
OGTT; Oral Glukoz Tolerans Testi
NDDG: National Diabetes Data Group
FPG: Fasting Plasma Glucose
IFG; Impaired Fasting Glucose
IGT; Impaired Glucose Tolerans
TxA₂; Tromboksan A₂
PGI₂; Prostoglandin I₂
NO ; Nitrik Oksit
AGE: Advanced Glycosylated End-products
ROS: Reaktif Oksijen ürünleri
TBARS: Tiyoarbitürük asit reaktif maddeler
HLA; Human Leucocyte Antigen
NEG; Non-Enzimatik Glikasyon
PCO; Protein Carbonil
NT: Nitrotirozin
ONOO⁻: Peroksinitrit

TABLÖLER

TABLÖ1:Diabetes Mellitus'un EtiyolojikSınıflaması.....	7
TABLÖ 2: ADA Diabet Tanı Kriterleri.....	11
TABLÖ 3: Oksidasyona Yatkın Aminoasitler ve Oksidasyon Ürünleri.....	18
TABLÖ 4: Yöntem Geçerliliği Basamakları.....	39
TABLÖ 5: Tanımlayıcı İstatistikler.....	47
TABLÖ 6:Kinetik ve End-point Yöntemler ile AOPP- Fibrinojen Korelasyon Katsayıları....	47

ŞEKİLLER

ŞEKİL1.Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları.....	15
ŞEKİL2: Protein karbonil gruplarının oluşumu.....	22
ŞEKİL 3: Oksidatif Stres Mekanizması.....	23
ŞEKİL 4: Poliöl ve diaçilgliserol yollarının birbirleriyle ilişkisi.....	28
ŞEKİL 5: Genel Geçerlilik Akış Şeması.....	37
ŞEKİL 6: Sitratlı Örneklerdeki AOPP - Fibrinojen ile Kinetik ve End-point Yöntemler Regresyon Eğrileri.....	48

ÖZET

AOPP ilk defa Witko-Sarsat ve arkadaşları tarafından kronik üremik hastalarda tanımlanan oksidatif bir protein hasarı belirtecidir. Çalışmalarında molekül yarı otomatize end-point bir yöntemle ölçülmüştür. Daha sonra AOPP ölçümü için kinetik bir yöntem geliştirilmiştir. Biz çalışmamızda DM II hastalarında bu iki yöntemi karşılaştırmayı, AOPP plazma reaktivitesinden sorumlu anahtar molekül olarak sunulan fibrinojen düzeyi ile korelasyonlarını araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmaya diabet ve nefroloji polikliniğine başvuran HbA1c seviyesi % 7 ve üzerinde olan 93 hasta (36 kadın/ 57 erkek) alındı. Örnekler EDTA ve sitrat içeren antikoagülanlı tüplere alındı. Her iki yöntem Abbott Aeroset cihazına applike edilerek aynı zamanda çalışıldı. Kinetik ve end-point yöntemler arasında anlamlı korelasyon vardı (EDTA'lı örneklerde; $r=0,449$, sitratlı örneklerde; $r=0,412$ $p=0,0001$). Konsantrasyonu 27,7 U/L olan EDTA'lı örnek havuzunda kinetik yöntemin çalışma içi, çalışma arası ve total CV'leri sırasıyla; %1,4, %9,4 ve %10,2; konsantrasyonu 64,1 U/L olan sitratlı örnek havuzunda kinetik yöntemin çalışma içi, çalışma arası ve total CV'leri sırasıyla %3,6, %7 ve %8,0 olarak bulundu. Kinetik yöntemde AOPP ile fibrinojen arasında güçlü ve anlamlı bir korelasyon saptandı ($r= 0,644$; $p= 0,0001$). End-point yöntemde ise ($r= 0,060$; $p>0,05$) bu tür bir ilişki bulunmadı.

Kinetik yöntemin otomasyonunun kolay, basit ve ucuz olması nedeniyle oksidatif stres araştırmalarına ilgi duyan rutin klinik biyokimya laboratuvarlarında kullanılabileceği önerilebilir.

SUMMARY

AOPP was firstly described as an oxidative protein marker in chronic uremic patients by Witko-Sarsat et al. In their study, the molecule was measured with semi-automatic end-point method. Subsequently the kinetic method was introduced for AOPP assay. In our study, we aimed to compare these two methods in patients with DM II and to investigate the correlation with fibrinogen which is the key molecule responsible for human plasma AOPP reactivity.

This study involved 93 DM II patients (36 women/57 men), who have HbA1c level $\geq 7\%$ and above, admitted to diabetes and nephrology department. The samples were collected in EDTA and in citrate anticoagulated tubes. Both methods were adapted to Aeroset autoanalyser and studied at the same time. There were significant correlations between kinetic and end-point methods (in EDTA groups; $r=0.449$, in citrate groups; $r=0.412$; $p=0.0001$). Within run, between run and total CV's were 1.4%, 9.4 % and 10.2 % in EDTA sample pool of 27.7 U/L concentration; 3.6%, 7% ve 8.0% in citrate sample pool of 64.1 U/L concentration respectively. There was a significant correlation between AOPP and fibrinogen levels ($r=0.644$; $p=0.0001$) for kinetic method but no significant correlations was found in end-point method.

Since this kinetic method is easy for automation, simple and inexpensive, it can be used in routine clinical biochemistry laboratories interested in oxidative stress.

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus, pankreasın insülin salgısının tam ya da kısmi yetersizliği ya da insülin etkisinin yetersizliği ile oluşan, kendisini hiperglisemi ile belli eden, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizma bozukluğu ile de karakterize bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır. Diyabetik hastalarda hastalığının erken ve geç dönem komplikasyonlarının (mikroanjiyopati, nöropati gibi) patogeneğinde oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derece arttığı gösterilmiştir. Tanıda, tedavi etkinliğinin izlenmesinde oksidatif belirteçler önem kazanmaktadır (1). Protein oksidasyonu, hipoklorik asit (HOCl), hidroperoksi, peroksinitrit, hidroksi ve peroksi gibi SOR türevleri varlığında, direkt ve indirekt birçok yolla gerçekleşebilir. Kimyasal yapısı halen araştırılmakta olan AOPP'nin, klirensini önleyebilen yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu; disülfid köprüleri ve/veya tirozin çapraz bağlanmalarını içeren albümin agregatlarından oluştuğu ve hem saf albümininden hem de kontrol plazma albümininden farklı olduğu, kromatografik ve elektroforetik tekniklerle gösterilmiştir. Bu nedenle, oksidatif modifikasyona uğrayan albüminin son çapraz bağlanma ürünleri, AOPP olarak tanımlanmıştır (2). Bu çalışmada diabet mellituslu hastalarda AOPP ölçüm yöntemi kinetik olarak değerlendirilmiş ve end-point yöntemle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUSUN TARİHÇESİ

Diabetes Mellitus'un ilk tarifine milattan 1500 yıl öncelerine ait Ebers papiruslerinde rastlanmaktadır. Ebers papiruslerinin, Mısır' ın daha önceki tıp eserlerinin bir derlemesi olduğu, bu bakımdan verdiği bilgilerin daha eski yılların bilgilerini yansıttığı sanılmaktadır. Hindular'da Ayur Veda'da böcek, sinek ve karıncaların bazı insanların idrarının yapıldığı yere toplandığını kaydetmişlerdir. Hippokrates ve Galen gibi ünlü hekimlerin öğretileri “ Charak Samhita “ isimli tıp kitabında milattan önce 600 yıllarında toplanmıştır. Burada “ Medhumeh “ adı verilen bir hastalık tarif edilmekte, tarif bugünkü diabet tanımına çok uymaktadır. M.Ö. 5. yüzyılda Hint uygarlığında “Medhumeh” adı verilen, aşırı susama ve ağız kokusu ile birlikte “ballı idrarla” seyreden bir hastalıktan bahsedilmiştir. Bu hastalığa sahip kişilerin genelde şişman insanlar olduğu ve hastaların kuruyarak ve ağızlarının kokarak öldükleri belirtilmektedir (3).

Hastalığa ilk kez diabet adını M.S. 130 – 200 yılları arasında yaşayan Kapadokyalı hekim Arataeus vermiştir. Dört ciltlik eserinde diabeti “hastalık nemli vücut ve uzuvlardan oluşur. Salgılar böbrek ve mesane aracılığı ile dışarı atılır. Hastalardaki su yapımı asla kesilmez, fakat su kaybı bir bendin açılmış kapağı gibi sürer gider. Bir süre sonra

zayıflama, daha sonra da ölüm gelir.” diyerek tanımlarken diabetle ilgili ilk önemli belgeyi hazırlamıştır (3).

Büyük Türk İslam alimi İbni Sina da şeker hastalığını bugünkü tanımına yakın bir şekilde tarif etmiş, tanı ve tedavi hakkındaki kitabı 900 yıllarından 1500 yıllarına kadar dünya tıp okullarında ders kitabı olarak okutulmuştur (3).

Thomas Willis 1600'lü yılların sonunda diabetik hastaların idrarlarının tatlı olduğunu göstermiş ve hastalığa “Diabetes Mellitus” adını vermiştir. Bundan bir yüzyıl sonra İngiliz Methew Dobson idrardaki tatlı tadı, kristalleştirerek tespit ettiği şekerin verdiğini göstermiştir. Aynı dönemde Pool ve Cawley kimyasal olarak idrarda şeker bulmuş ve idrardaki şekerin glukoz olduğunu kanıtlamışlardır. Fransa'da Claude Bernard diabetik hastalardaki pankreasa ait muhtemel fonksiyonları, spekülasyonları ve bulguları değerlendirmiştir. Bernard, köpeklerde pankreatik kanalları bağlayarak veya kanallara yağ veya parafin enjekte ederek tüm salgıları engelleyebileceğini ve organın da atrofiye uğrayacağını göstermiştir. 1869 yılında “Pankreasın Mikroskopik Anatomisine Katkılar” isimli tezinde Paul Langerhans kendi adını taşıyacak olan pankreas hücrelerinden ilk kez bahsetmiştir. 1893 yılında Laguese, Langerhans tarafından tarif edilen adacıkların endokrin pankreas dokusu oluşturabileceğini düşünmüş ve bu dokulara Langerhans adacıkları ismini vermiştir. 1921 yılında Banting ve Best pankreas ekstrelerinin diabetik köpeklerde yüksek glukoz düzeylerini düşürdüğünü göstermişlerdir. 1922 yılında Leonard Thompson adında Kanadalı bir doktor ilk kez pankreas ekstrelerini bir insanda kullanarak tarihe geçmiştir. İnsülinin moleküler yapısı 1955'de Sanger tarafından gösterilmiş ve bu buluşu kendisine Nobel ödülünü kazandırmıştır. Profesör Collip, keşfedilen insülini ilk defa saflaştıran kişidir. Bu insülin kısa tesirli idi ve günde birkaç kez enjeksiyon gerekiyordu. 1936 yılında Hagedorn kristalize insüline protamin ilave ederek ilk defa uzun etkili insülinlerden birini buldu. 1972'de saf insülinler piyasaya sürüldü. İnsülin tedavisinde metabolik kontrol sağlayabilen yöntemin endojen insülinin fizyolojik salınımını en iyi taklit edebilen yöntem olduğunun 1993'de saptanması ile beraber intensif insülin tedavisinin diabetik komplikasyonları önlemede ve geriletmede daha başarılı bir uygulama biçimi olduğu ortaya konmuştur (3).

Biguanidler konusundaki araştırmalar ise 1926'da Frank tarafından yapılan ilk çalışmalardan sonra yoğunlaşmıştır. 1942'de slfanamidlerin hipoglisemik etkisi bulunduktan sonra slfanilre türevleri tıp dünyasına girmiştir. 1980'li yıllardan sonra başlayan pankreas adacık transplantasyonu, yapay pankreasın bulunması, ve de diabetin etyopatogenezinde immünitenin bulunması ve immünsüpresif tedavilerin geliştirilmesi yeni bir çığır açtı. Çok kısa etkili rekombinan insülin olan Lys-pro'nun ve çok uzun etkili geraldine insülinin günlük kullanıma girmesinden sonra günümüzde halen çalışmaların ağırlık noktası oral insülin, immünoterapi ve pankreas transplantasyonu olarak görülmektedir (3).

2.2. DİABETES MELLİTUSUN TANIMI

Diabetes mellitus (DM) insülin hormon sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli eksikliği sonucu karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır (4). Bu hastalarda en özgün klinik semptomlar polidipsi, polifaji ve poliüridir. Bazı hastalarda izah edilemeyen kilo kaybı, bazılarında da kronik komplikasyonlara bağlı göz, merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem veya ürogenital sistemle ilgili yakınmalar ön planda olabilir (5). Diabetes mellitus; glukoz intoleransının ortak payda olduğu genetik ve klinik olarak heterojen bir grup bozukluğu içerir (6,7). Bu nedenle diabet tüm vücut enerji metabolizmasını etkilese de tanısı spesifik olarak plazma glukoz anormallikleriyle konulur (8).

Diabetin akut, yaşamı tehdit edici sonuçları ketoasidoz veya nonketotik hiperosmolar komadır. Uzun dönem komplikasyonları ise, görme kaybı ile sonlanabilen retinopati; renal yetmezliğe gidebilen nefropati; ayak ülserleri, amputasyon ve charcot eklemine yol açabilen perifetik nöropati; gastrointestinal, genitoüriner, kardiyovasküler semptomlara ve sexüel disfonksiyona neden olan otonom nöropatiyi içerir. Doku proteinleri ve diğer makromoleküllerin glukozilasyonunun, poliol bileşiklerinin aşırı üretiminin kronik hiperglisemideki doku hasarına yol açan mekanizmalardan olduğu düşünülmektedir. Diabetli hastalarda aterosklerotik, kardiyovasküler, periferel vasküler ve serebrovasküler hastalık insidansı artmıştır. Hipertansiyon, lipoprotein metabolizması hastalıkları, peridontal hastalık diabetli hastalarda sık görülür. Diabetin emosyonel ve sosyal etkisi, hastalarda ve yakınlarında belirgin psiko-sosyal disfonksiyona neden olabilir (3).

2.3. DİABETES MELLİTUSUN İNSİDANSI VE EPİDEMİYOLOJİSİ

Diabetes mellitusun tanınması, tedavi programlarının belirlenmesi, erken dönemde tanı konulabilmesi ve bu konuda toplumsal sağlık politikalarının oluşturulabilmesi için hastalığın epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi şarttır (3).

Çeşitli ülke ve toplumlarda diabet epidemiyolojisi değişiklik göstermektedir. Bu durum çeşitli etnik gruplarda genetik ve çevre faktörlerinin derecesinin ve etkinliğinin ayrı oluşundan, sosyal ve ekonomik durumun değişik olmasından ve kullanılan araştırma metodlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır (9).

Yaşam sürelerinin giderek uzaması, fiziksel aktivitenin azalması ve obezitenin artması, diabetes mellitus insidans ve prevalansında bir artmaya neden olmuştur (10). Dünya sağlık örgütü, diabetin prevalansının gelecek 22 yıl içinde iki katına çıkacağını düşünmektedir (11).

Dünya genelinde 2025 yılında diabet prevalansının erişkin popülasyonun % 7.8 olacağı ve bu olguların %75'inin gelişmekte olan ülkelere bulunacağı tahmin edilmektedir (12). Ülkemizde yapılan çalışmalarda değişik değerler bildirilmekle beraber 2010 yılında sonuçları yayınlanan TURDEP çalışmasına göre prevalansın %13.7 yükseldiği düşünülmektedir (13).

Grönland ve Alaska Eskimolarında DM prevalansı çok düşüktür ve saptanan olguların çoğu NIDDM'dur. Buna karşılık Amerika'da yaşayan Pima Kızılderililerinde prevalans %55'in üstündedir ve dünya üzerindeki en yüksek diabet prevalansı bu ırktadır (5). Son 40 yıl içinde ABD' de diabetin sıklığı yaklaşık altı kat artmıştır. Yayınlanan raporlarla 1997' nin sonunda Amerikadaki diabetli sayısının 15,7 milyona (% 5,9) ulaştığı bildirilmiştir. Bunların da % 90-95' nin Tip 2 DM, % 5-10' nunun da Tip 1 DM olduğu saptanmıştır. Ayrıca daha önceden diabet tanısı almışların tanı almamışlara oranının 2 kat olduğu hesaplanmıştır (14).

2.3.1. Amerikan Diabet Birliğinin Diabet Sınıflandırılması

Tablo 1: Diabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflaması (ADA 2010) (15)

I-Tip 1 diabetes (β hücre yıkımı, çoğunlukla mutlak insülin eksikliği) A- İmmunolojik B- İdiopatik II-Tip 2 diabetes (İnsülin direnci veya insülin salgı bozukluğu ağırlıklı olarak neden olabilir) III-Diğer spesifik tipler A- β hücre fonksiyonunda genetik defekt 1-Kromozom 12 ,HNF-1 alfa (MODY 3) 2-Kromozom 7,glukokinaz (MODY 2) 3-Kromozom 20,HNF-4 alfa(MODY 1) 4-Chromosome 13, insulin promoter factor-1 (IPF-1; MODY4) 5-Chromosome 17, HNF-1_ (MODY5) 6-Chromosome 2, NeuroD1 (MODY6) 7-Mitokondriyal DNA 8-Diğerleri B- İnsulin etkisinde genetik defekt 1-Tip A insulin resistansı 2-Leprechaunizm 3-Rabson-Mendenhall sendromu 4-Lipoatrophic diabet 5-Diğerleri C- Ekzokrin pankreas hastalıkları 1-Pankreatit 2-Travma/pankreatektomi 3-Neoplazm 4-Kistik fibrosis 5-Hemakromatozis 6-Fibrokalkuloz pankreas 7-Diğerleri D- Endokrinopati
--

- 1-Akromegali
 - 2-Cushing sendromu
 - 3-Glukagonoma
 - 4-Feokromasitoma
 - 5-Hipertiroidizm
 - 6-Somatostatinoma
 - 7-Aldesteronoma
 - 8-Diğerleri
- E- İlac yada kimyasallara bağlı**

- 1-Vacor
- 2-Pentamidin
- 3-Nikotinik asit
- 4-Glukokortikoidler
- 5-Tiroid hormonu
- 6-Diazoksit
- 7- β -adrenerjik agonistler
- 8-Tiazidler
- 9-Dilantin
- 10-Alfa-interferon
- 11-Diğerleri

F- Enfeksiyonlar

- 1-Konjenital rubella
- 2-Sitomegalovirus
- 3-Diğerleri

G- İmmun Diabetin yaygın olmayan formları

- 1-“Stiff-man” sendromu
- 2-Anti-insulin antikoru
- 3-Diğerleri

H- Diabetle bazen birlikteliği olan genetik sendromlar

- 1-Down sendromu
- 2-Klinefelter sendromu
- 3-Turner sendromu
- 4-Wolfram sendromu

- 5-Friedreich ataksisi
- 6-Huntington korea
- 7-Laurence-Moon-Biedl sendromu
- 8-Miyotonik distrofi
- 9- Porfiria
- 10-Prader-Willi sendromu
- 11-Diğerleri

2.4. Diabetes Mellitusun Tanısı (ADA 2010)

1-) $HbA_{1C} \geq 6.5\%$.

2-) Diabet semptomları ve 200 mg/dl (11.1 mmol/l) üzerinde günün herhangi bir saatinde öğüne bakılmaksızın ölçülen plazma glukoz düzeyi

3-) Açlık plazma glukoz düzeyi $>126\text{mg/dl}$ (7 mmol/l) (En az 8 saat tam açlık sonrası)

4-) Oral glukoz tolerans testi sırasında 2.saat plazma glukozu $>200\text{mg/dl}$ (11.1 mmol/l) ve üzerinde olması (WHO nun tanımlamasına göre 75 gram oral glukoz ile uygulanmalı).

Amerikan Diabet Birliğine (ADA) göre diabetes mellitusun tanısı açlık glisemisinin venöz plazmada en az iki ardışık ölçümde 126 mg/dl veya daha yüksek olması ile konur. Yine günün herhangi bir saatinde açlık veya tokluk durumuna bakılmaksızın randomize plazma glisemisinin 200mg/dl 'nin üzerinde olması ve polidipsi, poliüri, polifaji, zayıflama gibi semptomların oluşu ile de tanı konulabilir (15).

Açlık plazma glukoz düzeyi 100 mg/dl üstünde olan ve diabet açısından yüksek risk taşıyan bireylerde belirli aralıklarla OGTT yapılarak bozulmuş glukoz toleransı veya diabet

aranmalıdır. Açlık kan şekeri tek başına tanı kriterlerini sağlıyorsa OGTT'ne gerek yoktur.

Eğer hastada semptomlar yok veya hafif var ise ve glisemi tanılarını zorluyor ise OGTT gerekebilir. Ayrıca bozulmuş glukoz tolerans tanısı içinde OGTT'ne gerek vardır (15).

2.4.1.Standart Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)

OGTT karbonhidratlara karşı tolerans durumunu belirlemek için kullanılan tanı ve tarama testidir (16).

OGTT Endikasyonları

1. Tarama testinde açlık kan şekerinin 115 mg/dl ve üzerinde ya da postprandiyal kan şekerinin (120. dakika) 140 mg/dl ve üstünde bulunması.
2. Gestasyonel diabeti belirlemek veya reddetmek.
3. Şişmanlık ve/veya özellikle ağırlıklı ailesel diabet hikayesi olanlar.
4. Otozominal dominant (MODY) tipi diabet hikayesi olanlar.
5. Açıklanamayan nöropati, retinopati, ateroskleroz, koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalıklar (özellikle 50 yaşın altında olanlarda).
6. Operasyon, stres, travma, infarktüs, serebral vasküler olaylar, kortikosteroid kullanımı, gebelik esnasında anormal glukoz değerleri veya glukozüri görülenlerde, bu olaylar geçtikten sonra test yapılmalıdır.
7. Metabolik sendrom X düşünülen kişilerde.
8. Reaktif hipoglisemi düşünülen kişilerde (bu kişilerde OGTT süresi daha uzun tutulur).

OGTT yapılması

1. Hasta 10-16 saatlik açlık sonrası sakin bir odaya alınır. O. dakikada ilk kan örnekleri alınır.
2. 5 dakika içinde 300 ml suda eritilmiş 75 gr glukoz hastaya içirilir.
3. Dünya Sağlık Örgütüne göre glukoz verildikten yalnızca 2 saat sonra kan örneği alınması yeterli olmakla birlikte; NDDG (Amerikan Ulusal Diabet Veri Toplama Grubu)'nin önerdiği şekilde 2 saat süreyle 30 dakikada bir (30., 60., 90., 120. dk) kan örneği alınmasında fayda vardır. Reaktif hipoglisemi düşünülen vakalarda test süresi 5 saat kadar uzatılmaktadır.
4. Test süresince sigara içmek, dolaşmak ve su dışında yiyecek almak sakıncalı ve yasaktır.

2.4.2. ADA diabet tanı kriterleri (15)

Tablo 2: ADA diabet tanı kriterleri

KATEGORİ	FPG	2. SAAT PLAZMA GLUKOZU
Normal	<100mg/dl (<5,6mmol/l)	<140mg/dl(<7,8mmol/l)
IFG	100 ile 125mg/dl (5,6-6,9mmol/l)	
IGT		140-199mg/dl (7,8-11mmol/l)
DIABETES	≥126mg/dl (≥7mmol/l)	≥200mg/dl (≥11,1mmol/l)

2.5. DİABETİN VE KOMPLİKASYONLARININ PATOGENEZİ

Diabetes Mellitus, mutlak veya fonksiyonel insülin yetersizliği sonucu ortaya çıkan, karbonhidrat metabolizması başta olmak üzere yağ ve protein metabolizmasında da bozuklukla seyreden bir endokrin ve metabolizma hastalığıdır (17). Hastalığın ilerlemesiyle retinopati, renal yetmezlik, nöropati ve ateroskleroz gibi spesifik komplikasyonların gelişmesi riski artar (18,19).

İntrasellüler sinyal transdüksiyonunda değişiklik, aldoz redüktaz aktivitesinde artış, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP'az aktivitesinde azalma, TxA_2 ve endotelin gibi vazokonstriktörlerde artış, PGI_2 ve NO gibi vazodilatatörlerde azalma, reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin oluşumunda artma ve proteinlerin glikasyonundaki artış, değişmiş lipoprotein metabolizması, artmış protein kinaz C aktivitesi gibi pek çok faktör diabetin komplikasyonlarının gelişmesinde rol oynamaktadır (20,21).

Bu faktörlerin her biri temel ortak bir mekanizmanın farklı yansımaları olabileceği gibi, çeşitli dokuların farklı mekanizmalara duyarlılık göstermelerinden kaynaklanabilmektedir. Bir çoğu birbiri ile yakın ilişkili olan bu mekanizmalar bazen örtüşmektedir. AGE oluşumunun yol açtığı oksidatif stres, glikooksidasyonla AGE oluşumunu hızlandırmaktadır. Oksidatif stresi artıran ve AGE oluşumunu hızlandıran poliol yolu aktivasyonu damar duvarında doku protein kinaz C aktivasyonuna neden olmakta ve retina, lens, glomerul ile sinir dokusunda miyoinozitol düzeyinde ve protein kinaz C aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır (20,21).

Anormal poliol yolu hipotezine göre glukoz girişi için insüline ihtiyaç duymayan ve aldoz redüktaz enzimi içeren lens, periferik sinirler, böbrek glomerulleri gibi dokularda hiperglisemi sonucu hücre içi glukoz ve dolayısıyla sorbitol konsantrasyonu artar. Aşırı su tutucu özellikte olan sorbitolün bu dokularda birikmesi hücre ödemi ve hasarına neden olur (22). Hiperglisemide poliol yolunun aktivasyonu ile NADH/NAD^+ oranı artmakta ve bu da enzimatik olmayan glikasyonu ve diaçilgliserol sentezini artırmaktadır. Diaçilgliserolün

artışı da protein kinaz C aktivasyonuna yol açarak diabetteki damar patolojilerine neden olmaktadır (20,21). Oksidatif stres hipotezinde reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan savunma kapasitesi arasındaki dengesizlik diabetin kronik komplikasyonlarına neden olmaktadır. Bir başka deyişle hiperglisemi oksidatif strese yol açmaktadır. Lipid hidroperoksidler, konjuge dienler, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ve isoprostanlar gibi oksidatif stres göstergelerinin düzeylerinin arttığı diabetli hastalarda E ve C vitaminleri, glutatyon, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan parametrelerin miktarının azalması diabetin kronik komplikasyonlarının patogenezinde oksidatif stresin önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir (18,23).

Diabetteki vasküler komplikasyonlarda görülen endotel fonksiyon bozukluklarından endoteldeki nitrik oksid üretiminin azalması sorumlu tutulmaktadır. Bu azalmaya da ileti aksaması, substrat L-arginin yetmezliği veya nitrik oksid sentazın kofaktörlerindeki azalma neden olabilir. Ancak diabetteki azalmış endotel bağımlı vazodilatasyona NO üretiminin azalması mı, yoksa oksidatif stresin mi neden olduğu tartışmalıdır (21, 24) .

Diabetin kronik komplikasyonlarının mekanizması ile ilgili bir diğer hipotez de AGE hipotezidir. Oligosakkarit zincirlerin enzimatik olarak proteinlere glukozidik bağ ile bağlandığı glukozilasyon glikoprotein sentezi sırasında oluşan posttranslasyonel bir modifikasyondur. Bazal membran proteinleri, α_2 makroglobulin, bazı hücre membran reseptörleri, HLA antijenleri, immunglobulinler ve bazı hormonlar bu şekilde sentezlenen önemli glikoproteinlerdir (21,24). Hiperglisemi durumlarında glukozun hücre içine alınmasının insülininden bağımsız olduğu eritrosit, beyin, böbrek, lens, periferik sinirler gibi dokularda intrasellüler konsantrasyonu artan glukoz, proteinlere non-enzimatik bir tepkime sonucu bağlanmaktadır. Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Bu şekilde oluşan erken glikasyon ürünleri tedavi sonucu glukozun normale dönmesiyle azalmaktadır. Yarı ömrü uzun olan proteinlerde ise geri dönüşümsüz olarak imidazol veya pirol yapısındaki ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşmaktadır. Hipergliseminin şiddetine ve süresine, proteinlerin yarı ömrüne, dokuların glukozla olan geçirgenliğine ve proteinlerdeki serbest amino gruplarının sayısına bağlı olan protein glikasyonu yarı ömrü kısa (albumin, hemoglobin) ve uzun (kollajen, elastin, myelin,

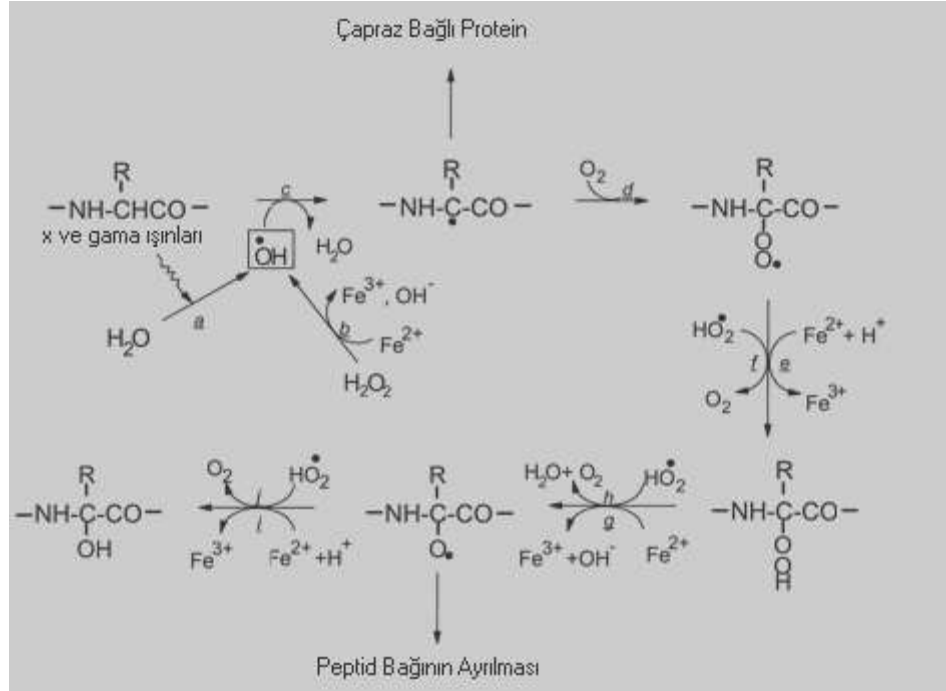
tubulin) olan tüm proteinlerde gerçekleşmektedir. Dayanıklı doku proteinlerine bağlanmayan bu glikasyon ürünlerinin en tipik örneği glikolize hemoglobin (HbA₁C) ve fruktozamindir (20,21). Proteinlerin yapı işlev ve metabolizmasını etkileyen protein glikasyonunu serbest radikallerin oluşumu ve glikooksidasyon izlemektedir. Aşırı biriken inaktif proteinler DNA hasarına neden olabilir veya hücre siklusunu bozabilir. Glukoz kaynaklı amadori ürünlerinden glikooksidasyonla uzun ömürlü proteinlerdeki amino gruplarını geri dönüşümsüz olarak çapraz bağlayabilen AGE bileşikler oluşmaktadır. Böylece non-enzimatik glikasyonun (NEG) artışı sonucu ortaya çıkan AGE bileşikler diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (19).

Proteinlerin büyüklüğünü, şeklini, elektriksel yüklerini, viskozitesini, çözünürlüğünü değiştiren glikasyon, ısı ve enzimlere dayanıklılığı ve membran reseptörüne bağlanmayı etkilemektedir. Ayrıca SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimler glikasyonla inaktive olmaktadır. Diabette koagülasyona eğilimi artıran AGE bileşikler koagulan/antikoagulan dengesini koagulanlar lehine bozmaktadır (20, 21).

2.6. PROTEİN OKSİDASYONUNUN ANA MEKANİZMALARI

Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir. Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir. Reaktif türevler tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, bir dizi bozukluk ve hastalığın etyolojisi ile ilerlemesinde rol oynar. Bu hastalıklar arasında başlıcaları; Alzheimer, amiyotrofik lateral skleroz, katarakt oluşumu, kronik böbrek yetmezliği, kistik fibroz, diyabet, iskemi ve reperfüzyon hasarı, Parkinson, romatoid artrit ve sepsis olarak sayılabilir (25).

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar protein karbonil (PCO) oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, nitrotirozin (NT) ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) oluşumu olarak sıralanabilir (26).



Şekil 1. Protein karbonil oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları (27)

Reaktif türevlerin doğrudan proteinler (primer modifikasyon reaksiyonları), şekerler ve lipidlerle reaksiyona girmesi sonucunda oluşan ürünler, tekrar proteinler ile reaksiyona girerek sekonder modifikasyon reaksiyonlarına yol açmaktadır. Reaktif türevler ya peptit bağları ile yada amino asit yan zincirleri ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar, redoks reaksiyonlarına giren demir ve bakır gibi metal katyonlardan etkilenir. Oksidatif modifikasyona uğramış proteinler ya düşük molekül ağırlıklı ürünlere ayrılır ya da çapraz bağlı yüksek molekül ağırlıklı ürünleri oluşturur (28). Proteinlerdeki oksidatif modifikasyonların sınıflandırılmasında bu özellikler esas alınsa da, genel olarak kabul edilmiş bir sınıflandırma sistemi mevcut değildir. Bununla birlikte proteinlerde modifikasyonlara yol açan reaksiyonların; oksidasyona ve peptit bağının ayrılmasına yol açan reaksiyonlar ve yan zincir modifikasyonuna yol açan reaksiyonlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılmasının daha kolay bir sınıflandırma sistemi olacağı öne sürülmektedir (29).

Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O_2 ile birlikte, süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$), ve süperoksit

radikalinin protonlanmış formu olan hidroperoksil (HOO^*)'in varlığı da gereklidir. Adı geçen bu reaktif oksijen türevleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile protein fragmentasyonuna neden olur (Şekil 1) (27).

2.6.1. Protein Fragmentasyonu ve Karbonil Türevlerinin Oluşumu

PCO türevlerinin oluşumuna yol açan primer modifikasyon reaksiyonları (Şekil 1) amino asitlerin α - karbon atomlarının veya R yan zincirlerinin oksidatif modifikasyonlarından ve bu modifikasyonları takiben meydana gelen reaktif oksijen aracılı peptit ayrılması reaksiyonundan oluşmaktadır (27). Reaktif oksijen türevlerinin proteinlerle etkileşimi sonucunda, histidin, prolin, arjinin ve lizin gibi çok sayıda amino asit bakiyesinde ve/veya proteinlerin peptit omurgasında oluşan oksidatif hasara bağlı olarak PCO ürünleri meydana gelir. PCO düzeylerinin saptanması protein oksidasyonunu belirlemede duyarlı ve genel olarak kabul görmüş bir yöntemdir (28).

Polipeptit omurgasındaki α -karbon atomundan hidroksil radikali ile α -hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda amino asit bakiyesi karbon merkezli radikal haline dönüşür (Şekil 1, Reaksiyon c). Bu reaksiyona yol açan hidroksil radikali suyun radyolizinden (x ve γ ışınlarıyla) veya H_2O_2 'in metal katalizli yıkımından açığa çıkar (reaksiyon a ve b). Oluşan karbon merkezli radikal moleküler oksijen ile hızlı bir şekilde reaksiyonlaşarak (reaksiyon d) daha sonra alkil peroksidi verecek olan alkilperoksil radikal ara ürününü oluşturur. Alkilperoksit, alkoksil radikali (reaksiyon h) üzerinden hidroksi protein türevini verir (reaksiyon j).

Reaksiyon basamaklarının pek çoğunda Fe^{++} ve Cu^+ varlığında hidroperoksil ile etkileşim önem taşır (reaksiyon e,g,i). Bu metabolik yolda oluşan alkil, alkilperoksil, ve alkoksil radikal ara ürünleri aynı veya farklı protein molekülündeki R yan zincirleri ile, yan reaksiyonlar ile etkileşerek yeni karbon merkezli radikallerin oluşumuna yol açar. Oluşan bu yeni karbon merkezli radikaller ile yukarıdaki reaksiyonlar tekrarlanır. Oksijen yokluğunda (reaksiyon d) gerçekleşmez. Oluşan karbon merkezli radikal diğer bir karbon

merkezli radikal ile etkileşerek protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna yol açar (Şekil 1). Alkoksil radikalinin oluşumu (Şekil 1, Reaksiyon h ve g) peptit bağının diamid veya α -amidasyon metabolik yolları ile ayrılmasına neden olur.

Diamid metabolik yoluyla ayrılma sonucunda, diamid ve izosiyanat yapısı, α -amidasyon metabolik yolunda ise amid ve N- α -ketoaçil yapısına sahip peptid fragmentleri oluşur (27, 28)

Diamid ve α -amidasyon metabolik yolları dışında polipeptid zincirinin serbest radikal aracılı ayrılması; prolil, glutamil ve aspartil bakiyelerinin oksidasyonu ile de gerçekleşebilmektedir (27).

Bununla birlikte Tablo 3’de görüldüğü gibi, lizin, arginin, prolin direkt oksidasyon ile karbonil türevlerini verir (27)

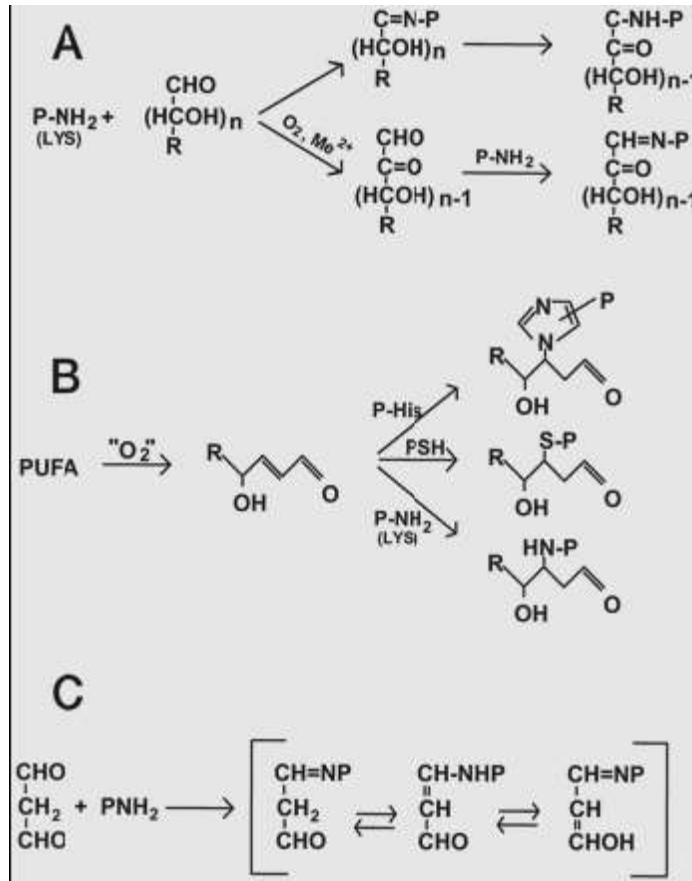
Tablo 3:Oksidasyona yatkın aminoasitler ve oksidasyon ürünleri (27)

Amino asit	Oksidasyon Ürünleri
Sistein	Disülfidler, sisteik asit
Metionin	Metionin sülfoksit, Metionin Sülfon
Triptofan	2-,4-,5-,6- ve 7 hidroksitriptofan, nitrotriptofan, kinürenin, formil ve hidroksi kinürenin
Fenilalanin	2-,3- dihidroksifenilalanin, 2-,3- ve 4- hidroksifenilalanin
Tirozin	3-,4-dihidroksifenilalanin, tirozin-tirozin çapraz bağları, Tyr-O-Tyr çapraz bağlı nitrotirozin
Histidin	2-oksohistidin, asparagin,aspartik asit
Arginin	Glutamik semialdehit, 5-hidroksi-2 aminovalerik asit
Lizin	Lizin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, α aminoadipik semialdehit
Glisin	Amino valerik asit
Prolin	2-pirrolidon, 4-5-hidroksiprolin, piroglutamik asit, glutamik semialdehit
Valin	Valin hidroperoksitleri ve hidroksitleri
Lösin	Lösin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, α ketoizokaproikasit, izovalerik asit ve aldehit
İzolösin	İzolösin hidroperoksitleri
Treonin	2-amino-3-ketobutirik asit
Glutamik asit	Okzalik asit, piruvik asit

PCO oluşumuna yol açan sekonder modifikasyon reaksiyonları; proteinlerin karbonhidrat ve lipit oksidasyon ürünleri ile reaksiyonlarını içermektedir (Şekil 2) (27). Lipit peroksidasyonu sırasında oluşan aldehitler (4-hidroksi-2-nonenal, malondialdehit), indirgen şekerler veya bu şekerlerin oksidasyon ürünlerinin proteinlerdeki lizin bakiyeleri

ile reaksiyonu (glikasyon ve glikoksidasyon reaksiyonları) sonucu oluşan reaktif karbonil türleri (ketoaminler, ketoaldehitler, deoksiozonlar) protein yapısına karbonil gruplarının katılmasına yol açar (27).

Lipitlerden türetilen aldehitler veya otooksidasyona uğramış şekerler Schiff bazı oluşumu yolu ile proteinlerdeki amino gruplarına bağlanır. Schiff bazı oluşumu geri dönüşümlü bir reaksiyon olmakla birlikte, sıklıkla geri dönüşümsüz bir reaksiyon olan Amodori düzenlemesine uğrar (30).



Şekil 2:Glikasyon, glioksidasyon ve poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyon ürünleri ile proteinlerin reaksiyonları sonucu, protein karbonil gruplarının oluşumu (Sekonder modifikasyon reaksiyonları)25 (A: Şekerlerin proteinlerdeki lizin amino grupları (P-NH₂) ile reaksiyonu; B: Michael tipi katılma reaksiyonu ile 4-hidroksi-2-nonenal'in proteinlerdeki lizin P-NH₂), histidin (P-His), veya sistein (P-SH) bakiyelerine bağlanması; C: Proteinlerdeki amino grupları ile lipid peroksidasyon ürünü malondialdehitin reaksiyonu)

Okside proteinlerin birikimi sadece protein oksidasyonunun hızını değil, aynı zamanda okside proteinlerin yıkılım hızını da yansıtır. Proteinlerin yıkılım hızı proteazların konsantrasyonuna ve bu proteazların proteolitik aktivitesini etkileyen metal iyonlarının, inhibitörlerin, aktivatörlerin ve regülatör proteinlerin varlığına bağlıdır.

2.6.2. Tiyol Gruplarının Oksidasyonu

Serbest radikallerin proteinlerdeki tiyol (-SH) gruplarının oksidasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (31).

Sisteinin -SH grubu oksidatif atağa oldukça yatkındır ve -SH gruplarından değişik mekanizmalarla oluşan Tiyil radikali (-S.) proteinlerdeki disülfid bağlarının oluşumuna öncülük eder. -SH gruplarının disüflitlere ve oksiasitler gibi diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal aracılı protein oksidasyonunun en erken gözlenebilen belirtisidir (30).

Birçok araştırmacı grubu elektron paramanyetik rezonans (EPR) tekniği kullanarak peroksinitritin tiyol grupları ile reaksiyonu sonucu tiil radikallerinin oluştuğunu göstermiştir. Tiyol gruplarının diğer bir oksidasyon şekli; 4-Hidroksinonenal'in, proteinlerdeki -SH gruplarına Michael reaksiyonu sonucunda tioeter bağıyla bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Michael reaksiyonu geri dönüşümlü bir reaksiyondur (Şekil 2B) (27).

2.6.3. Nitrotirozin Oluşumu

NT oluşumu protein oksidasyonuna yol açan bir başka moleküler mekanizmadır. Peroksinitrit (ONOO^-), nitrik oksidin (NO), O_2^- ile *invivo* reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir tüevdir (30). NT oluşumu reaksiyon (A) ve (B)'de görülmektedir.

Bu reaksiyonun (A) hız sabiti $1.9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ 'dir (32). Süperoksit ve nitrik oksit radikallerinin peroksinitrite göre nispeten daha dayanıklı olmalarına karşılık, peroksinitrit daha reaktif bir tüevdir (33).

Normal koşullarda, süperoksit dismutaz, oluşan tüm süperoksit radikallerini dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir fakat, süperoksit düzeyleri çok artmışsa yada fazla miktarda NO radikali meydana gelmişse peroksinitrit oluşur (32).

Peroksinitrit oluşumu oksidatif protein hasarının hem ortaya çıkışına, hem de ilerlemesine sebep olmaktadır (30). ONOO^- 'in proteinler üzerine atağının ana ürünü tirozinin orto pozisyonunda nitrolanmasıdır, bu da NT oluşumuna yol açar. NT, ONOO^- 'nin in vivo spesifik bir marker'ıdır (34).

ONOO^- ; DNA'yı, enzimleri, proteinleri, lipitleri ve tiyol gruplarını okside edebilmesinden dolayı yüksek toksisiteye sahiptir (34). Tirozinin geri dönüşümsüz olarak nitrasyonu, fosforillenmiş ve fosforillenmemiş formlarının birbirine dönüşümünü engelleyerek, enzim aktivitesinin düzenlenmesini ve sinyal ileti mekanizmalarının regülasyonunu etkiler (27).

ONOO^- oksidasyonunun stabil son ürünü olmasına bağlı olarak, NT konsantrasyonu NO-bağımlı in vivo hasarın tespitinde kullanışlı bir marker'dır (35). Bugünkü bilgilere göre, ONOO^- tek başına nitrik oksitten ve süperoksit radikalinden daha güçlü bir oksidan ve sitotoksik mediatördür (36).

2.7. PROTEİN OKSİDASYONUNUN ÖNEMİ

Oksidasyon araştırmalarında bugün en büyük iddialardan biri in vivo oksidatif stresin tayinidir. Proteinler tüm hücre ve dokularda yer almaları ve oksidatif modifikasyona duyarlı olmaları nedeniyle oksidatif stresin faydalı bir markırı olarak kullanılabilirler (37). Bununla birlikte proteinler muhtemelen oksidatif hasara en duyarlı moleküllerdir ve hasarın etkisi diğer moleküllere göre oldukça fazladır (38).

Proteinlerin oldukça farklı biyolojik fonksiyonları vardır. Proteinlerde in vivo olarak meydana gelen oksidatif değişiklikler rol oynadıkları çeşitli hücresel fonksiyonları etkiler. Protein oksidasyonu ile ilişkili olduğu bilinen bazı hastalıklar ve hedef proteinleri: Ateroskleroz (LDL), Romatoid artrit (IgG, α -1-proteinaz inhibitör), iskemi-reperfüzyon hasarı, Amfizem (α -1-proteinaz inhibitör, elastaz), Norodejeneratif hastalıklar, Alzheimer (β -aktin, kreatin kinaz), Parkinson, sporadik amiotrofik lateral skleroz, Musküler distrofi, ARDS, Yaşlanma (glutamin sentetaz, karbonik anhidraz III , akonitaz), progeria, Akut pankreatit, Kataraktogenez (α -kristalinler) ve Kanser (39).

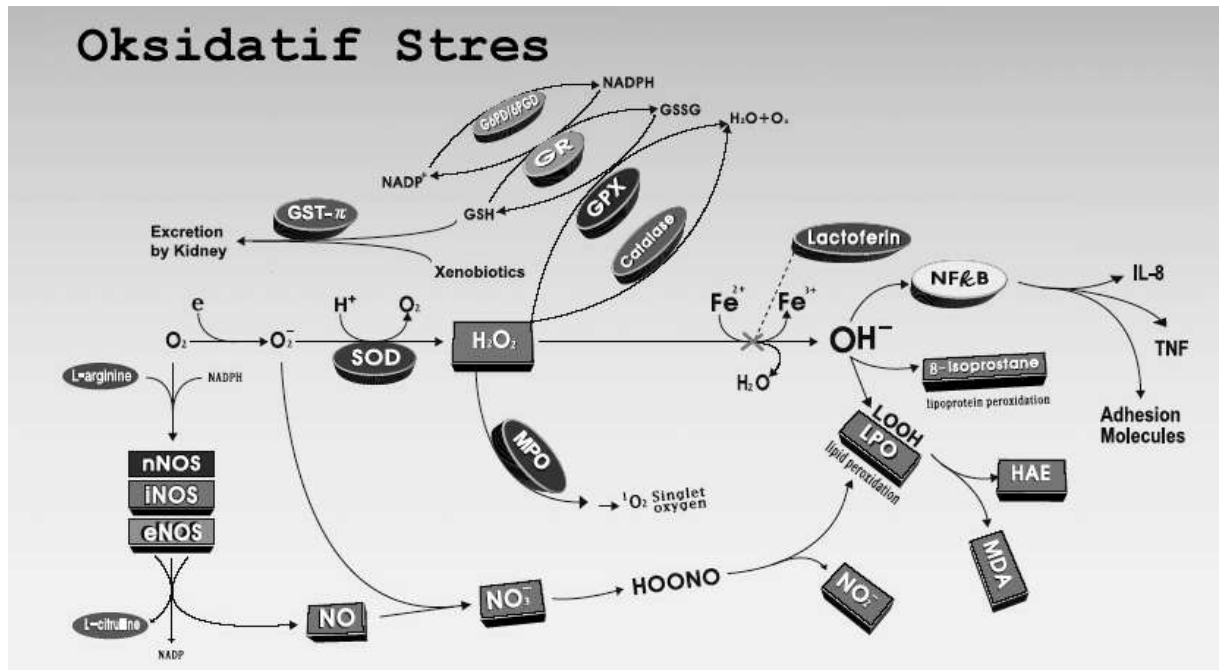
Reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, transport sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı hücresel olaylar oksidatif protein hasarından etkilenir (40). Örneğin enzimlerin oksidatif değişikliklerinin enzim aktivitelerinde inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. Enzim oksidatif değişiklikleri ılımlı veya ciddi, hücresel veya sistemik metabolik etkiler gösterebilir. Bu etkiler değişikliğin sürekliliği ve değişen moleküllerin yüzdesine bağlıdır (39).

Proteinlerin yapısal değişiklikleri de fonksiyon kaybına yol açabilir. Örneğin plazma fibrinojen proteini okside olduğu zaman solid pıhtı oluşturma yeteneğini kaybeder ve pıhtının inhibisyonunun derecesi proteinlerde karbonil oluşumuyla koreledir. Sinoviyal sıvıdaki immunglobinlerin oksidasyonu agregasyona neden olur ve romatoid artrit etyolojisine katkıda bulunur. α -1 antitripsin'in oksidatif değişikliği ciddi fizyolojik sonuçlara neden olur. Bu plazma proteini akciğer ve kartilaj gibi dokularda proteoliz inhibisyonundan sorumludur.

Düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonu LDL apoproteininde karbonil gruplarının oluşumuna yol açar. Okside LDL ise doku makrofajları tarafından alınıp birikir. LDL nin oksidasyonu aterosklerozun etiyolojisinde önemli rol oynar. Benzer şekilde kristalin proteininin oksidasyonu lenste katarakt oluşumunda önemli rol oynayabilir. Diğer bazı hastalıklarda da okside proteinlerde bir artış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (39).

2.8. DİABET VE OKSİDATİF STRES

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (şekil 3) (41).



Şekil 3: Oksidatif Stres Mekanizmaları

Diabette reaktif oksijen türlerinin rolü 1980’li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur. Diabet ve diabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (42).

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir. Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu da bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (43).

Hidrojen peroksidin, yüksek reaktiviteye sahip bir ROS ürünü olan hidroksil radikale dönüşmesi sonrası insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir rol oynayabileceği görüşü araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır. Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen transkripsiyonunu azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmaların bulguları bu görüşü destekler niteliktedir (43). T ve B lenfositlerin, makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin beta hücrelerine toksik etkilerini de serbest radikaller aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir (44).

Diabet oluşturulan rat deney modellerinde oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-OHdG (8-hidroksi deoksiguanozin) düzeylerinde de artış gözlenmiştir (44). Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğunu destekleyen çalışmaların (45) yanısıra endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda inkube edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir (46). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile de desteklenmiştir (47). Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diabet oluşturmak için kullanılan N- nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki streptozotosin (48),

oksidan maddeler meydana getirerek langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip etmekte ve uygun olmayan NO cevapları vererek diabeti başlattığı düşünülmektedir (49).

Hipergliseminin yanı sıra hipertrigliserideminin de diabetin komplikasyonları için bağımsız risk faktörü olduğu görüşü önem kazanmaktadır (50).

Diabetik olguların plazma lipoproteinlerinde, eritrosit membran lipitlerinde ve çeşitli dokularında lipid peroksidasyonunun arttığı, yapılan çalışmalar sonucu görülmüştür. Bu artışın enzimatik (araşidonik asit yolu) ya da nonenzimatik lipid peroksidasyonundan mı kaynaklandığı bilinmemektedir. Lipid peroksidasyonu, hem yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktifleşen lipooksijenaz yolu ile prostoglandinlerden, hem de serbest radikaller ve geçiş metallerinin etkisi ile endotelyal ve fagositik hücrelerin membranlarında bulunan lipidlerden, nonenzimatik yolla oluşmaktadır. Daha sonra her iki yola ait ürünlerin, karşılıklı olarak birbirlerini aktive ederek, lipid peroksidasyonunu artırdıkları bildirilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, plazma lipid peroksidlerindeki artışın, diabetten çok, vasküler hastalığın kendisi ve hipertrigliseridemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (30,49).

Yine araştırmacıların bulguları, vasküler komplikasyonları olan diabetik hastalarda, hem LDL'nin oksidasyonunda hem de nonenzimatik glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışlar olduğunu göstermektedir. Diabetik olgularda, lipidlere ilave olarak protein oksidasyonu da artmaktadır. Özellikle kollajen, elastin ve myelin kılıfındaki ekstrasellüler proteinlerin oksidasyonu sonucu; lens, damar, bazal membran gibi dokularda katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diabetik komplikasyonlar gelişmektedir (49).

Hiperglisemi Aracılı ROS üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır;

2.8.1. Glukozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Bir geçiş elementinin varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri, superoksit radikalının hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikali oluşturmaya yol açar. Hücre içi glukoz oksidasyonu NADH'nın açığa çıkmasına yol açar. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında süperoksit radikali açığa çıkar. Yüksek glukoz

konsantrasyonu varlığında bu yolla süperoksit radikal üretimi artar. Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROS üretim kaynağıdır. Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperoksit radikali oluştuğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyal ROS üretimi ile ilintili olduğunu göstermektedir (51).

2.8.2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (ilerlemiş glikasyon son ürünleri) Oluşumu

Proteinler yüksek glukoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glukoz bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur (52).

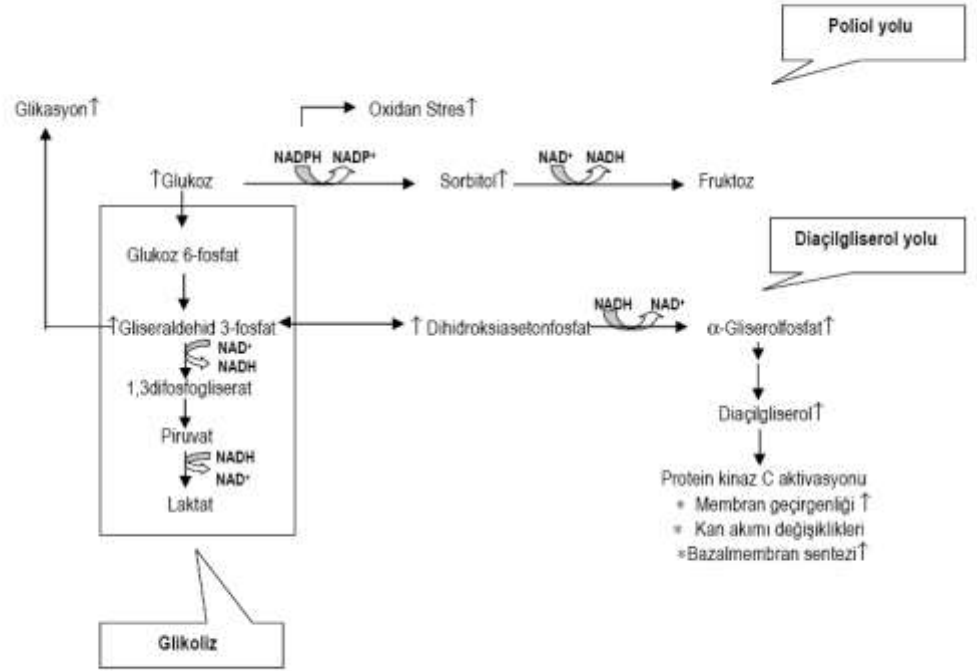
Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra ileri glikasyon son ürünleri (AGE) meydana gelir (52). AGE'ler, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına yol açtığı gibi, kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal üretebilme kapasitesine de sahiptirler. Yine AGE'lerin toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri ve sonuçta Nükleer Faktör Kappa B (NFkB) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri ve ilgili genlerin (prokoagülant doku faktörü endotelin -1, adhezyon molekülü, VCAM- 1 gibi) ekspresyonlarının artışı bulunmaktadır (53). Araştırmalar AGE'lerin, reseptör aracılı mekanizma ile serbest radikal üretimini uyarmasının yanı sıra, artmış serbest radikallerin de hücre içi AGE oluşumunu arttırdığını göstermektedir (53). Giardino ve ark. hücre içi AGE oluşumu ile lipid peroksidasyonu arasında sıkı bir ilişki olduğunu, lipid peroksidasyonunun önlenmesi ile AGE oluşumunun da önlendiğini bildirmişlerdir (54) Diabetik nefropati oluşturulan ratlara AGE inhibitörleri verildiğinde glisemik kontrolde herhangi bir değişiklik olmaksızın albüminürinin önlenbildiği gösterilmiştir (55).

Yapılan alışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan PKC'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogenezinde rol aldığı ne sürülmektedir (56).

2.8.3. Poliol Yolu

Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliol yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir. Redükte glutatyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması diabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında rol oynar (49) .

Vazodilatör mediatörlerin kaybı endonronal kan akımının azalmasına dolayısıyla endonronal hipoksi veya iskemiye yol açmaktadır. Bu olayın sonucunda nöronal hücre, schwann hücrelerde hasar meydana gelmektedir (57). Glukozun sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak hücrede miyoinozitol düzeylerinde azalma ve bunun sonucunda da Na-K ATP-az enzim aktivitesinde düşme olduğu gözlenmiştir ki bu enzim aktivitesi sinir iletim hızı için önem taşımaktadır (57). Sorbitolun kendisi bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (57).



Şekil 4: Poliöl ve diaçilgliserol yollarının birbirleriyle ilişkisi (58)

2.9. İLERİ PROTEİN OKSİDASYON ÜRÜNLERİ (AOPP)

Protein oksidasyonu, hipoklorik asit (HOCl), hidroperoksi, peroksinitrit, hidroksi ve peroksi gibi SOR türevleri varlığında, direkt ve indirekt birçok yolla gerçekleşebilir. Reaktif oksijen ürünleri (ROS) vücutta sürekli olarak oluşmaktadır. Reaktif oksijen ürünleri, inflamatuvar ve dejeneratif hastalıklar gibi insandaki birçok patolojik duruma katkıda bulunur. Oksidatif stresin kritik olan hastaların hastalıklarının gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (59). Oksidatif stresi belirlemede, lipid oksidasyonunu yansıtan ölçümler yapılabilmesine karşın daha stabil ve uzun ömürlü protein oksidasyon ürünlerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (59).

Son zamanlarda protein oksidasyonunun yeni bir marker'ı olan ileri oksidasyon protein ürünleri (Advanced Oxidation Protein Products-AOPP) çeşitli araştırmacıların dikkatini çekmeye başlamıştır (60). AOPP protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir marker'dır (2,60). Reaktif oksijen ürünleri, direkt olarak proteinler üzerine etki

ederek aminoasitlerin oksidasyonuna yol açarlar. İndirekt yolla karbonhidrat ve lipidlerin otooksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif karbonil bileşiklerinin (RCO) etkisi ile de ileri glikozillenmiş son ürünlerine (AGE) ve ileri lipoksidasyon son ürünlerine (ALE) dönüşürler. ROS, tirozin aminoasidini direkt olarak okside ederek ditirozin yapısını oluşturup protein yapıda agregasyona ve fragmentasyona yol açarlar. Bu karşılıklı bağlar ile oluşan ürüne "İleri Oksidasyon Protein Ürünleri" (AOPP) adı verilir. AOPP, ditirozin içeren çapraz bağlı protein ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Diğer taraftan AOPP'nin yapısal olarak ileri glikasyon son ürünlerine benzediği bildirilmektedir (60).

Witko Sarsat ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, fakat lipit peroksidasyon markerı olan tiyobarbitirik asit ile reaksiyonlaşan maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir (2).

Üremik hastalarda, oksidatif stresle karbonil stres arasındaki ilişkiyi destekleyecek şekilde, plazma AOPP düzeyleri İleri Glikozillenmiş Son Ürünlerin (AGE) düzeyleri ve neopterin ile, pozitif ilişki bulunması,. AOPP'nin mononükleer fagositleri aktive ederek, nötrofiller ve monositler arasında sitokin benzeri proinflamatuvar medyatör gibi davrandıkları öne sürülmektedir. ve AOPP ve AGE'nin hem oluşum mekanizması hem de yapısal açıdan benzerlik göstermeleri nedeniyle, biyolojik aktivitelerinin de birbirleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (2,60,61). AOPP ler esas olarak klorinize bileşiklerin etkisi ile şekillenir ve ditirozin rezidülerine ve proteinlerin çapraz bağlar kurmasına öncülük ederler (62). Kimyasal yapısı halen araştırılmakta olan AOPP'nin klirensini de önleyebilen yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu, disülfid köprüleri ve/veya tirozin çapraz bağlanmalarını içeren albumin agregatlarından oluştuğu ve saf albüminden farklı olduğu kromatografik ve elektroforetik tekniklerle gösterilmiştir. Bu nedenle oksidatif modifikasyona uğrayan albumin'in son çapraz bağlanma ürünleri AOPP olarak tanımlanmıştır (2,60,61).

1996'da kronik üremik hastaların plazmasında, Advanced oxidation protein products (AOPP) olarak adlandırılan, yeni bir oksidatif stres belirteci tespit edildi ve çalışma şekli klinik kimya analizörlerine programlandı. Üremik plazma örneklerinde kütle spektrometresi sayesinde AOPP, 600 ve 80kDa çevresinde iki pik yapacak şekilde elde

edilirken kontrol plazmalarında bu pikler elde edilmemiştir. Daha ileri biyokimyasal çalışmalar sayesinde AOPP nin özellikle albümin olmak üzere okside olmuş plazma proteinleri olduğu ve oksidan özellikleri olmadığı bulunmuştur (2). AOPP'nin, invitro şartlarda H₂O₂'den çok HOCl'ye maruz kalan saf plazma albümin örneklerinde olduğu belirlendiğinden, in vivo olarak aktif nötrofillerce üretilen HOCl'nin AOPP oluşturabileceği düşünülmektedir (61).

Aterosklerozun erken belirleyicisi olarak kabul edilen karotis arter intima media kalınlığı ile AOPP arasında pozitif korelasyona rastlanmıştır (63).

Protein oksidasyonunu bir göstergesi olan karbonillerin ve AOPP'nin plazma düzeyinin hemodiyaliz hastalarında oldukça yükseldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (60,61,64). Hemodiyaliz öncesi yüksek olan AOPP düzeylerinin, hemodiyaliz sonrası yükseldiği ya da değişmediği bildirilmektedir. Witko-Sarsat ve arkadaşları, membran tipinden etkilenmeyen AOPP'nin değişmemesini, diyaliz sonunda normale yakın buldukları nötrofil oksijen radikal üretimine bağlamışlardır (2).

AOPP düzeyleri kreatinin klirensi ile korele şekildedir ve bu yüzden kronik renal hasarın ilerleyişinin önemli bir göstergesidir (2).

Nötrofil aktivasyonunu gösteren plazma myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) düzeyleri gibi protein oksidasyonunu yansıtan oksidatif stres biomarkırlarının Behçet hastalarında özellikle hastalığın aktif dönemlerinde olmak üzere artmış olduğu bulunmuştur. Otoriteler bu hastalığın seyrini ve aktivite şiddetini göstermede olasılıkla yeni bir markır olarak AOPP'yi önermektedir (65).

2.10. SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

2.10.1. End Point Yöntem

Enzimatik olarak bir maddenin miktarını belirlemede en yaygın kullanılan ilke, reaksiyonunu tamamlanmasına izin verilmesidir, böylece tüm substrat ölçülebilir bir ürüne dönüşür. Dengeye ulaşıldığında reaksiyon yavaşladığından bu yöntemler ‘endpoint’ veya daha doğru olarak denge yöntemleri (equilibrium methods) olarak adlandırılır. Bu tip analiz için hemen hemen substratın tamamının dönüştüğü denge noktasındaki reaksiyonlar tercih edilir. Ancak denge reaksiyonları, birinci reaksiyonun ürünlerini dönüştüren veya yakalayan enzimatik veya enzimatik olmayan ek reaksiyonlarla istenen yöne değişirler. Örneğin, LDH ile laktat’ ın ölçümünde, oluşan piruvat fazla hidrazin ile hidrazona dönüşür (66).

Kuramsal olarak, sabit miktardaki, Q, substratı ürüne dönüştürmek için gereken zaman, enzim miktarı, [E] ile ters orantılıdır (66).

$$Q = k_1 \times [E] \times t \quad [E] = (Q / k_1) + (1/t)$$

k_1 , hız sabiti ve t geçen süre. Bu sebeple [E] , 1/t ile doğru orantılıdır

Bu yöntem için reaksiyon karışımı belli bir süre ve belli bir sıcaklıkta inkübe edilir. Reaksiyon tamamlanıp ürünlerin oluşumu ve dolayısıyla renk oluşumu tamamlandıktan sonra okuma yapılır. Bu maksatla kör, standart ve numune olmak üzere üç tüp hazırlanır. Şayet reaksiyon doğrusal ise bir tek standart, değilse birden fazla standart hazırlanır. Deney

süresi bittikten sonra cihaz sıfırlanır ve numune ve standartın optik dansiteleri okunur. Beer kanunu gereği standart için;

$$A_{st} = a.b.C_{st} \text{ olur. Buradan } a.b = A_{st} / C_{st} \text{ olur.}$$

A_{st} = standartın absorbansı

C_{st} = standartın konsantrasyonu

$$\text{Numune için } A_N = a.b.C_N \text{ ise } a.b = A_N / C_N \text{ olur.}$$

A_N = Numunenin absorbansı

C_N = Numunenin konsantrasyonu

a ve b değerleri sabit ve her 2 denklemde birbirine eşit olduğundan

$A_{st} / C_{st} = A_N / C_N$ olur. Buradan numune konsantrasyonu $C_N = C_{st} \times A_N / A_{st}$ eşitliğinden C_N bulunmuş olur.

Öte yandan C_{st} / A_{st} oranı sabit bir değer olarak da hesaplanabilir.

Bu sabit değer F (faktör) olarak gösterilirse $C_N = A_N \times F$ olur. Bu formül, deneyin lineer olduğu yani Lambert-Beer kanunun geçerli olduğu konsantrasyonlarda kullanılabilir. Linearitenin bozulduğu yüksek konsantrasyondaki numuneler distile su veya serum fizyolojikle dilüe edilip yeniden çalışılır. Bulunan sonuç dilüsyon faktörüyle çarpılır (66).

Bu yöntemde inkübasyon süresi kimyasal reaksiyonun tamamlanması için gerekli süredir. Elverişsiz uzun inkübasyon sürelerinden kaçınılması için her örneğe uygun miktarda enzim kullanılması gerekebilir. Madde konsantrasyonun çok yüksek olduğu hallerde inkübasyon süresi reaksiyonun bitmesi için yeterli olmaz ve sonuç hatalı çıkar. Reaksiyonun sonunda substrat konsantrasyonu düşük düzeylere düştükçe, enzimin K_m değeri reaksiyonun hızının belirlenmesinde önem taşır. Bu nedenle, substratlarına yüksek afiniteli (dolayısıyla düşük K_m değerli) enzimler denge analizleri için daha uygundur. Endpoint yöntem reaksiyon koşullarındaki küçük değişikliklere büyük ölçüde duyarsızdır.

Ayrılan sabit sürede reaksiyonun tamamlanmasını önleyecek büyüklükte değişkenler olmadığından, her reaksiyon karışımında aynı enzim miktarına sahip olmak veya pH veya sıcaklığın tam olarak sabit olması gerekli değildir (66).

İki veya daha fazla standart çalışılarak elde edilen optik dansiteler ve absorbens değerleri ile konsantrasyon- optik dansite grafiği çizilir ve numunenin optik dansitesinden bu grafik yardımıyla konsantrasyonu tesbit edilebilir. Grafiğin doğrusal çıkmaması Beer kanunundan sapmaya işaret eder. Bu durumda yukarıda belirtilen formüller kullanılamaz (66).

2.10.2. Kinetik Yöntem

Kinetik bir yöntemde, sabit-zaman aralığında, reaksiyon süresi için gerekli reaktif enzim miktarı düşünülerek, üretilen değişiklik ölçülür. Yüksek substrat konsantrasyonu ile başlayan enzimle katalizlenen reaksiyonun hızı önce sıfır-derece kinetiğe, daha sonra substrat konsantrasyonu azalmaya başlayınca, birinci derece kinetik evreye geçer. Herhangi bir birinci derece reaksiyon için, belli bir t zamanındaki, substrat konsantrasyonu, [S], reaksiyon başladıktan sonra aşağıdaki gibidir;

$$[S] = [S_0] \times e^{-kt}$$

[S₀] = başlangıç substrat konsantrasyonu

e = doğal logaritma temeli

k = hız katsayısı

Sabit zaman aralığında, t₁' den t₂' ye, substrat konsantrasyonundaki değişim Δ[S], [S₀] ile aşağıdaki denklem ile gösterilir;

$$[S_0] = -\Delta[S] / (e^{-kt_1} - e^{-kt_2})$$

Bu denklem, sabit zaman aralığında substrat konsantrasyonundaki değişimin başlangıçtaki substrat konsantrasyonu ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu durum birinci derece reaksiyonlar için genel bir özelliktir (66).

Enzimatik bir reaksiyon için, [S] küçük olduğu zaman, birinci derece kinetiğe uyar. K_m eşitliği ile karşılaştırıldığında, reaksiyon aşağıdaki hale dönüşür;

$$V = V_{\text{mak}} / K_m \times [S] \quad \text{veya} \quad v = k[S]$$

Böylece, birinci derece hız katsayısı, k , V_{mak} / K_m ye eşittir.

Substrat konsantrasyonu ile ilişkili özelliğin (örneğin, ışık absorbansı) reaksiyon süresi sırasında iki sabit zamanda ölçüldüğü yöntemler iki noktalı kinetik yöntemler olarak bilinir. Kuramsal olarak, substratların enzimatik olarak ölçümlemlerinde kullanılan en doğru yöntemlerdir. Ancak, bu yöntemler, teknik olarak endpoint yöntemlerine göre daha çok dikkat gerektirirler. Reaksiyon hızı iki noktada ölçüldüğünden pH, ısı ve enzim miktarı gibi reaksiyon hızını etkileyen tüm faktörler, her iki ölçüm zamanlarında olması gerektiği gibi bir ölçümden diğerine sabit olmalıdır. Bu koşullara artık otomatize analizörler ile ulaşılmıştır. Analitin bir referans çözeltisi, kalibrasyon için kullanılmalıdır. Birinci derece reaksiyon koşullarını sağlamak için substrat konsantrasyonu, $0,2 \times K_m$ 'den düşük olmalıdır. Dolayısıyla, yüksek K_m değerine sahip enzimler, kinetik analiz için, daha kullanılabilir geniş bir substrat konsantrasyon aralığı sağladığından tercih edilir. Yarışmalı bir inhibitör eklenmesi, reaktif enzimin K_m değerini arttırmanın bir yolu olarak önerilmektedir. Kinetik analizler için gerekli olan düşük konsantrasyonlar küçük değişikliklerin (örneğin absorbansta) ölçülmesinde de gereklidir (66).

Genellikle enzimlerin katalitik aktivitelerinin tayininde kullanılan bu yöntemde hesaplama için standart solusyondan ziyade deney ortamındaki kromojen maddenin molar absorbtivite kat sayısının bilinmesi gerekir (66).

Analiz tüpüne reaktif ve numune konup belirtilen sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. Deney metodunda belirtilen bir süre sonra ilk absorbans değerleri okunur. Daha sonra birer dakika aralarla 2, 3 defa daha absorbans değerleri okunur ve müteakip her 2 okumanın farkı alınır. Buna ΔA denir. Daha sonra bu dakikalık absorbans farkları toplanıp okuma aralığı sayısına bölünerek dakikadaki ortalama absorbans değişimi ($\Delta A/\text{dakika}$) bulunmuş olur (66).

Örnek ; birer dakika ara ile $A_1 = 0.110$, $A_2 = 0.220$, $A_3 = 0.340$ $A_4 = 0.450$ şeklinde dört absorbans değeri okunduğunu farzedelim. Böylece ilk okuma ile son okuma arasında üç dakika geçmiş olur. Buna göre $\Delta A/\text{dakika}$ şu şekilde hesaplanır.

$$\Delta A_1 = A_2 - A_1 = 0.11 \quad \Delta A_2 = A_3 - A_2 = 0.12 \quad \Delta A_3 = A_4 - A_3 = 0.11 \text{ olur.}$$

$$\Delta A/\text{dakika} = (\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3)/3 = (0.11 + 0.12 + 0.11)/3 = 0.115 \text{ olur.}$$

Bu testte cihaz distile su veya reaktif körüyle sıfırlanmakla birlikte eğer reaktifte deney şartlarında numune olmaksızın bir absorbans değişimi oluyorsa, bunun tesbit edilip numune için bulunan değerden çıkarılması gerekir. Ayrıca $\Delta A/\text{dakika}$ değerleri birbirinden çok farklı ise reaksiyonun lineer olmadığını gösterir (66).

Deneyde ölçülen maddenin miktarı reaksiyon sonunda gittikçe artıyorsa artan absorbans değerleri bulunur, azalıyorsa azalan absorbans değerleri bulunur. Bu durumda $\Delta A/\text{dakika}$ değerleri negatif çıkar. O zaman ya $\Delta A/\text{dakika}$ değerlerinin işareti dikkate alınmadan mutlak değerleri alınır veya faktör de negatif olarak alınır. Böylece pozitif sonuçlar elde edilmiş olur (66).

Kinetik reaksiyonlarda aranan maddenin ortamda çok olması durumunda deney süresi dolmadan reaksiyona giren maddelerin azalması sonucu reaksiyon hızı değişir. Bu durumda dakikalık A değişimlerinin linearitesi bozulur ve bulunan sonuç hatalı olur. O zaman, numunenin sulandırılarak yeniden çalışılması gereklidir. Kinetik okumada, okumaların toplam inkübasyon süresi sonunda yapılarak dakika sayısına bölünmesi yerine her dakikada bir defa okuma yapıp sonra ortalamasının alınmasının sebebi, normalde birbirlerine oldukça yakın çıkması gereken bu değerlerin gözlenmesi yani linearitenin takibidir (66).

Kinetik okumada $\Delta A/\text{dakika}$ değerleri bir faktörle çarpılarak sonuçlar bulunur. Faktör aşağıdaki formülden bulunur (verilen örnek enzim aktivitesi hesabı içindir);

$$IU/\text{lt} (\mu\text{mol}/\text{dk}/\text{L}) = (\Delta A/\text{dk} \times T.V (\text{ml}) \times 10^6) / (\epsilon \times \text{ışık yolu} \times N.V (\text{ml}))$$

$$\text{Burada } F = T.V \times 10^6 / \epsilon \times \text{ışık yolu} \times N.V \text{ dir}$$

T.V. : ml cinsinden toplam hacim (deney tüpündeki toplam sıvı miktarı)

10^6 : sonucu $\mu\text{mol}/\text{dk}/\text{L} = U/L$ 'ye çevirme katsayısıdır

ϵ : ekstinsiyon katsayısı; Reaksiyon sonunda okunan maddenin molar absorbtivite katsayısı olup sabit bir değerdir. Rutin biyokimya laboratuvarlarında özellikle enzim ölçümlerinde çoğunlukla reaksiyona giren veya reaksiyon sonucu oluşan NADH veya

NADPH koenzimleri kullanılır. Bu koenzimlerin redükte şekilleri 340 nm’de maksimum absorbans gösterirler. Bu iki koenzimin molar absorptivite katsayıları $6,22 \times 10^3$ L/mol/cm = 6,22 L/mmol.cm’ dir).

$\epsilon = A/L \times C$ ’dir A=çözeltinin gerçek absorbansı, L=ışık yolu (cm) C= çözeltinin konsantrasyonu (Mol/L)

Işık yolu: okuma küvetinin çapı (cm)

N.V: ml cinsinden reaksiyon katılan numune hacmi

2.11. ANALİTİK YÖNTEM GEÇERLİLİĞİ

Geçerlilik, analitik yöntemin istenen amaca uygun olmasını sağlayan işlemlerdir. Diğer bir tanım olarak geçerlilik; herhangi bir yöntemde işlem, araç ve gereç, materyal, sistem ve faaliyetin beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlaması işlemidir. Kendi kullanım amacı için uygun olan bir test için amaçlanmış, analitik işlemin doğruluğunu kanıtlayan bir süreçtir. Yani yöntem geçerliliği; her derecede aynı sonucu elde etmek için yapılan işlemlerdir (67).

2.11.1. Geçerlilik Stratejisi

Geçerlilik stratejisi dört bileşenden oluşur; ön geçerlilik, gerçek geçerlilik, istatistiksel analiz, gerçek çalışma. Bir geçerlilik çalışmasının akışı Şekil 5 de verilmiştir (68).

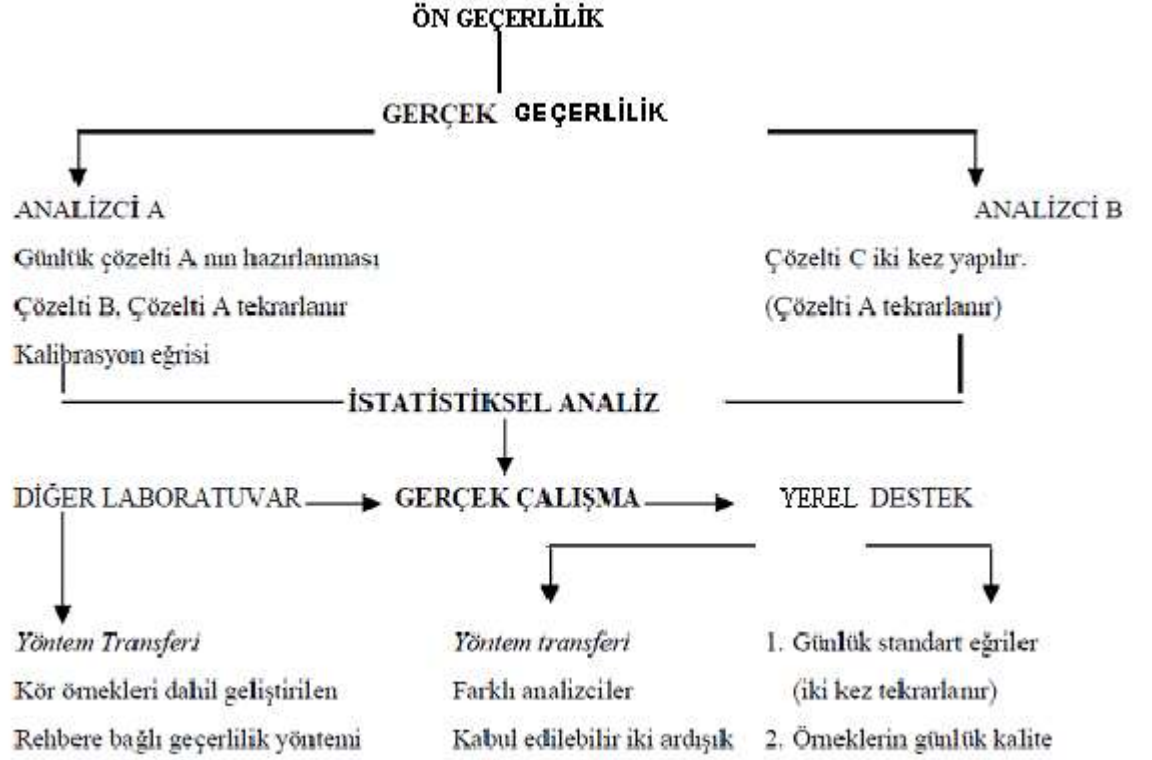
Ön Geçerlilik

Ön geçerlilik, gerçek validasyonun başlamasından önce analiz yapan kişiye pratik deneyimini arttırma ve optimum koşulları sağlama şansını verir. İki başlık altında incelenir: Yöntem oturtuluş sırasındaki geçerlilik ve geçmişe ait geçerlilik.

Analitik yöntem geliştirme işleminde ilk basamak neyin, hangi doğrulukla ölçüleceğinin kurulmasıdır. Buna; yöntemin oturtuluşu sırasındaki geçerlilik adı verilir. Daha sonra literatür araştırılır; en uygun kimyasal yöntem seçilir. Eğer yeni bir yöntem kullanılmaya karar verilirse yöntemin ön bilgileri tayin edildikten sonra, bazı basamaklarının tekrar edilebilirliğinin geliştirilmesi ve deneylerin sağlamlığının kontrol edilmesi gerekir (68). Varolan sistemin, varolan başarımının yeniden incelenmesi ve değerlendirilmesi, geçmişe ait geçerlilik diye adlandırılır. Bu sistemler için geçerlilik; geçerlilik protokolünü, sistemin genel tarifini, donanım şemasını, programın listesini, yazılım ve donanımın o an ki konfigürasyonunu, yazılım ve donanım bileşenlerinin geçmiş konfigürasyonunu, kullanılan verilerin ve sistemin kullanım amacını, cihaz kullanım kılavuzunu ve operatör uygulama kayıtlarını içermelidir (68).

ÖN GEÇERLİLİK

1. Cihaz cevabının seçimi
2. Regresyon modelinin seçimi
3. Standart eğri sınırına yaklaşma
4. Ekstraksiyon yeteneğinin değerlendirilmesi



Şekil 5: Genel Geçerlilik Akış Şeması

Gerçek Geçerlilik (Uygulama Aşamasındaki Geçerlilik)

Geçerlilik işleminin laboratuvar aşamasıdır. Ön geçerlilik aşamasındaki teorik düzenleme bu aşamaya hazırlık oluşturur. Daha önceden çalışılmış bir yöntem için, geçerlilik işleminin uygulama aşamasına geleceğe ait geçerlilik denir. Eğer referans bir laboratuvar geçerli edilmemiş alternatif bir analitik yöntemi kullanmaya niyet ederse yöntem geçerlilik rehberliğinde bu yöntemin güvenilir ve tekrarlanabilir olduğunu göstermesi gerekir (68). Uygulama aşamasındaki validasyonda, üç çeşit kontrol amaçlı geçerlilik yapılır; denetim geçerliliği, güvenlik geçerliliği ve tekrarlanır geçerlilik (68). Göstergelerde herhangi bir değişiklik olmasa da, yapılan çalışmanın arasıra kontrol edilmesi amacıyla denetim geçerliliği yapılır. Günlük başarımın, verilerin değerlendirilmesi bu aşamayı oluşturur. Bir analizci (A) herbir konsantrasyon düzeyi (Çözelti A) için üç deneme yapar. İkinci bir analizci (B) aynı işlemi (Çözelti C) tekrarlar. Çalışma sırasında denetim geçerliliği yapılmasına karşın herhangi bir şüphe duyulduğunda, yapılan validasyona güvenlik geçerliliği denir (Çözelti B). Geçerli edilen koşullarda herhangi bir değişiklik olduğunda, ise tekrar geçerlilik yapılmalıdır. Tekrar geçerlilik bütün geçerlilik işleminin tekrarı değildir. Eğer sistem iyi anlaşılıyorsa, tekrar geçerlilik sadece değişikliklerin geçerli edilmesidir (67).

Son İstatistiksel Analiz

Kalibrasyon eğrisinin istatistiğinde; korelasyon yüzdesi, eğim, kesişim, konsantrasyonların ayarlanaması, herbir konsantrasyon için standart sapma ve herbir konsantrasyon için bağıl standart sapma yer alır. Günlük standart eğriler örnek konsantrasyonun tanınmasını sağlar. Deneysel sonuçların kabul edilebilirliği için verilerin, yöntem geçerliliği sırasında güven sınırları içinde olması gereklidir (67,68). Geçerlilik göstergeleri boyunca kabul edilebilir sınırlar, sisteme uygun testler ve kalite kontrol noktalarını tanımlar (67).

Geçerliliği yapılan bir çalışmada yapılan tüm işlemlerin yazılı olarak kanıtlanması gereklidir. Geçerlilik protokolü ve geçerlilik raporu çalışmanın en önemli kısımları arasındadır. Hazırlanma ve yürütme, geçerlilik protokolüne bağlı kalmalıdır; protokol

tercihen basamak basamak, talimat şeklinde yazılmalıdır. Tamamlanmış yöntem geçerliliği için olası basamaklar Tablo 4 gösterilmiştir (67,68).

İlk olarak yöntemin hedefi ve geçerlilik kriterleri tanımlanmalıdır. Yöntem başarımlı özellikleri yöntemin kullanım amacına dayanmalıdır ve ilk göstergeler deneyimli analizcilerin kararlarına göre seçilmelidir. Tatmin edici sonuçlar ancak iyi çalışan bir cihaz ile sağlanabilir. Bunun için; cihaz başarımlı göstergelerine ayrı bir önem vermek gerekir. Eğer geçerlilik deneyleri için resmi bir kaynak yoksa deneyimlere bağlı olarak, yöntemin kendi yapısına göre geçerlilik yöntemi geliştirilir ve uygun göstergeler seçilir (67,68).

Tablo 4: Yöntem geçerliliği basamakları

Yöntemin uygulama şekli, amacının ve hedefinin tanımlanması
•Başarımlı göstergeleri ve kabul edilen değerlerin tanımlanması
•Geçerlilik deneylerinin tanımlanması
•Cihazın uygun başarımlı özelliklerinin değiştirilmesi
•Maddeler, standartlar ve belirteçlerin temini
•Ön geçerlilik işlemlerinin yapılması
Yöntem göstergeleri ve kabul kriterlerinin ön deney sonucuna göre tekrar değerlendirilmesi
•Tam dahili ve harici geçerlilik deneylerinin yapılması
•Rutin çalışmalar için yöntemin çalışma esaslarının (SOP) geliştirilmesi
•Tekrar geçerlilik kriterlerinin belirlenmesi
•Kalite kontrol, sistem uygunluğu testleri ve uygulama döneminin belirlenmesi
• Geçerlilik deneylerinin yazılması ve sonuçların geçerlilik raporuna yazılması

2.11.2. Geçerlilik Göstergeleri

Bu göstergeler bir çok farklı araştırma grubu tarafından ve uluslararası komiteler tarafından tanımlanmış, literatürlerde ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır

Validasyon için en uygun performans karakteristiklerine karar verilir ve bunlar test edilir. Önemli performans özellikleri şunlardır (69):

Doğruluk (Accuracy)

Tekrarlanabilirlik (Presizyon)

Hassasiyet (Sensitivite)

Özgünlük (Spesifite/ Selektivite)

Doğrusallık (Linearite)

En küçük tayin sınırı (LOD=Limit of detection)

En küçük belirleme sınırı (LOQ=Limit of quantitation)

Yöntemin kararlılığı, güçlülüğü (Robustness)

Ölçüm Aralığı (Analitik sınır)

Doğruluk: Analitik yöntemin doğruluğu, yöntem ile elde edilen deneme sonuçlarının gerçek değere yakınlığıdır. Bir analitik yöntemin doğruluğu yöntem ve gerçek değer tarafından toplanan test sonuçlarına dayanır. Doğruluk için gerçek değer bir çok farklı yoldan elde edilebilir. Bu yollardan biri; yöntemin sonuçlarını, yerleşik yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmaktır. İkinci yol ise; doğruluğun bilinen konsantrasyonlara sahip bir örneğin analiziyle kontrol edilmesidir. Doğruluk, analitin matriksten ayrılmasından ve cihaza verilmesinden sonra elde edilecek cevap ile saf bir çözücü içinde çözünmeyen referans materyalin cevabının karşılaştırılmasına bağlıdır. Çünkü bu doğruluk örneğin hazırlanışının etkisini ölçer. Elde edilen değer mümkün olduğunca doğruya yakın olmalıdır. Doğruluk konsantrasyon başına kör hariç en az beş tayin ile belirlenir. (67,68).

Tekrarlanabilirlik: Aynı denek üzerinde tekrar edilen ölçümler arasındaki değişimin bir ölçüsüdür. Bu ölçüt bir yöntemin kullanılabilir olup olmadığına karar vermede önemli

bir role sahip olduğu gibi iki yöntemi karşılaştırırken de kullanılır. Tekrarlanabilirlik yöntemlerin uyumunu önemli ölçüde etkilemektedir. Eğer yöntemlerden biri zayıf tekrarlanabilirliğe sahipse iki yöntem arasındaki uyumun zayıf olması kaçınılmazdır. Eğer referans yöntemin tekrarlanabilirliği düşükse yeni yöntem çok iyi bir yöntem olsa da uyum yüksek çıkmayacaktır. Eğer iki yöntemin de tekrarlanabilirliği düşükse problem daha da büyüyecektir. Yöntem karşılaştırma çalışmalarında iki yöntem uyumlu çıkarsa bu yöntemlerden tekrarlanabilirliği yüksek olanın diğerine göre daha üstün olduğu söylenebilir. Tekrarlanabilirlik katsayısı kurulan deney düzenine bağlı olarak değişik şekillerde hesaplanır. Örneğin sadece bir kişiden alınan kan örneği 'n' defa çalışılırsa bu diziye ait varyasyon katsayısı bu tür bir deney düzeni için tekrarlanabilirlik katsayısı olarak kullanılır. İkinci bir yol 'n' kişiden alınan kan örneklerinin her birini iki kez çalışmaktır. Bu tür bir deney düzeninde yaygın olarak kullanılan tekrarlanabilirlik katsayısı iki ölçüm arasındaki farklara ait standart sapmanın 2 katıdır (70).

Hassasiyet (Sensitivite): Analitin konsantrasyonundaki değişime karşılık ölçüm sinyalinde meydana gelen değişikliktir. Kalibrasyon eğrisinin eğimi, analitik hassasiyetin göstergesidir. Sensitivite hastalık varken testin pozitif olma olasılığıdır. Yüksek sensitiviteye sahip bir test düşük yanlış negatiflik oranına sahiptir, yani test, hastalığı olanlarda yanlışlıkla negatif sonuç vermez. Hastalığa hassastır.

$$\text{Sensitivite} = \text{Gerçek pozitif} / (\text{Gerçek pozitif} + \text{Yanlış negatif})$$

Özgünlük (Spesifite/ Selektivite): Metodun kompleks bir karışımda, benzer davranış gösteren diğer maddelerle etkileşimsiz sadece ölçülecek analiti belirleme yeteneğidir. Spesifiklik hastalık yokken testin negatif olma olasılığıdır. Eğer bir testin spesifikliğı yüksek ise yanlış pozitiflik oranı düşüktür. Yani test hastalığı olmayanlarda yanlışlıkla pozitif sonuç vermez. Sağlığa spesifiktir.

$$\text{Spesifiklik} = \text{Gerçek negatif} / (\text{Gerçek negatif} + \text{Yanlış pozitif})$$

Tayin ve Belirleme Sınırı: Her ikisi de analitik başarımların göstergelerindendir. Tayin sınırı; analitin analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur. Tayin sınırının belirlenmesi aletli ve aletsiz olmak üzere yöntemlere göre değişir. Aletli işlemlerde bilinen en düşük konsantrasyonda analit içeren örnek sonuçlarının kör sonuçlarıyla karşılaştırılmasıyla yani sinyal/gürültü oranı ile belirlenir. Genelde sinyal/gürültü oranı 2:1 veya 3:1 olarak kabul edilir. Tayin sınırının hesaplanmasında diğer bir yöntem, kör örneklerinin analizlenerek analitik geri zemin cevabının ölçülmesi ve bu değerlerin standart sapmasının 2 veya 3 gibi faktörlerle çarpılmasıdır (71).

Belirleme sınırı; analitik bir yöntemle analitin, uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur. Analitin bilinen miktarlarla azaltılmasıyla hazırlanan örnekler ölçülür ve kabul edilebilir kesinlik ve doğruluğa sahip en düşük miktar tespit edilir. Belirleme sınırı genelde varyasyon katsayısı ile varyasyon katsayısının % 15-20 yi aşan konsantrasyonlarıyla ifade edilir. Pek çok durumda belirleme sınırı, tayin sınırının iki, üç katıdır . belirleme sınırının tayini için deneysel işlemlerde genel yaklaşım, belli bir sayıda kör örneği analizlenerek analitik geri zemini ölçmek, bu değerlerin standart sapmasını 10 veya 20 gibi bir faktör ile çarpılmasıdır . Bu sınır, sınıra yakın yada sınırdaki hazırlanmış belli sayıda örnek analizi ile kontrol edilmelidir (71).

Doğrusallık ve Sınırlar: Bir analitik yöntemin doğrusallığı test sonuçlarından doğrudan elde edilerek ya da çok iyi tanımlanmış matematiksel denklemleri belli, belirli bir sırada verilen örnekler içinde analitin değişik konsantrasyondaki örneklerinden elde edilir. Doğrusallık % 80 - % 120 oranındaki konsantrasyon uzunluğuna sahip beş ya da beşten fazla standarttan üçten altıya kadar uygulama serisiyle sağlanır. Cevap doğrudan veya çok iyi tanımlanan matematiksel hesaplara dayanmalıdır. Eğer sıfır olmayan bir değer elde edilirse bu yöntemin doğrusallığı üzerinde bir etki olmadığını kanıtlar. Bir analitik yöntemin sınırları; bir yöntemin doğruluğu, doğrusallığı ve kesinliği kullanılarak karşılaştırılmış en düşük en yüksek değerler arasındaki süreçtir. Sınırlar, normalde bir analitik yöntemden elde edilen test sonuçları olarak aynı üniteler içinde açıklanır (67,68).

Yöntemin kararlılığı: Kararlılık testleri operasyonel göstergelerin analiz sonuçları üzerindeki etkilerini ölçer. Çeşitli şartlar altında yöntemin analitik sonuçlarının kabul edilebilir doğruluk ve kesinliğini saptama kabiliyeti olarak da tanımlanabilir. Kararlılık ,

yöntemin bir veya birden daha fazla göstergesi değiştirildiğinde tekrar validasyona ihtiyacı olup olmadığına karar verilmesini sağlar.Farklı oda sıcaklığı ve farklı laboratuvarlardaki nem, farklı tecrübeye sahip analizciler, farklı firmaların aletleri, farklı kaynaklardan belirteçler sağlamlığa etki eden faktörler arasındadır (67,68).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi diabet ve nefroloji polikliniğine başvuran hastalardan diabet teşhisi alan ve HbA1c seviyesi % 7 'nin üstünde, böbrek ve karaciğer fonksiyonları normal olan 93 hasta (36 Erkek/ 57 Kadın; ortalama yaş: 54,45; aralık: 26-81) çalışmaya alındı. Venöz kan örnekleri pıhtı aktivatörlü, jelli (BD Vacutainer® SSTTM II, BD Diagnostics, Franklin Lakes, USA), % 3,2 trisodyum sitratlı (Greiner Bio-One GmbH, Austria) ve EDTA'lı vakumlu tüplere (BD Vacutainer®,UK) 8-10 saatlik açlık sonrası sabah 8.00 -10.00 arası alındı. Örnekler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dakika 1600 g (4000 rpm)' de santrifüj edildi ve lipemik, ikterik, hemolizli örnekler ayrıldıktan sonra diğer örnekler analiz zamanına kadar -80°C'de saklandı. Mikroalbümin koruyucu ilave edilmeden toplanan 24 saatlik idrar örneklerinden bekletilmeksizin çalışıldı.

Rutin biyokimyasal testler için serum, AOPP ölçümleri için sitrat ve EDTA'lı plazma, fibrinojen ölçümleri için ise sitratlı plazma kullanıldı. Fibrinojen ölçümleri Sysmex CA 1500 analizörü(Siemens Healthcare, Germany), AOPP, glukoz, üre, mikroalbümin, , AST, ALT ve HbA1c ölçümleri Abbott Aeroset otoanalizörü (Abbott®, USA) ile yapıldı. HbA1c ve mikroalbümin ölçümlerinde immunoturbidimetrik yöntem kullanıldı. AOPP end-point ölçüm konsantrasyonları chloramine-T equivalents ($\mu\text{mol/L}$), AOPP kinetik ölçüm konsantrasyonları ise U/L olarak ifade edildi. Impresizyon çalışmaları NCCLS EP-5 A2

protokolüne göre yapıldı. Korelasyonlar Microsoft Excel ve SPSS 11.5; Imprezisyon ise EP Evaluator® programı ile değerlendirildi. Microsoft Excel (2003) programı ile elde edilen regresyon denkleminde slope ve intercept değerleri oluşturuldu.

3.1. AOPP ÖLÇÜMÜNDE END-POINT VE KİNETİK YÖNTEM APLİKASYONU

END-POINT APLİKASYON;

3.1.1.Reaktifler:

Reaktif 1; 158 µL(18 µL asetik asit, 140 µL PBS),

Reaktif 2; 35 µL (PBS tamponunda hazırlanan 0.3 mol/L potasyum iyodür) kullanıldı.

Örnek; 35 µL ,

3.1.2. Fosfat Tamponu:

PBS (20 mmol/L, pH:7,4) hazırlanması:

Na₂HPO₄.12H₂O (Merck, Germany): 14,61 gr

KH₂PO₄ (Merck, Germany): 0,52 gr

NaCl (Merck, Germany): 8,71 gr tartıldı ve distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Asetik asit oda ısısında, diğer reaktifler +4°C’de saklandı. Kalibratör stok solusyonu olarak 10 mmol/L chloramine-T (C₇H₇ClNaNO₂S*3H₂O) (Merck, Germany) hazırlanarak, 100,75,50,25,12.5 µmol/L konsantrasyonlarında kalibrasyon noktaları oluşturuldu (2,73).

Blank olarak deiyonize su kullanıldı. 340 nm’de 18 -20 okuma aralığı kullanılarak end-point okuma yapıldı.

KINETİK ÖLÇÜM APLİKASYON;

Örnek; 20 µL,

Reaktif 1; 220 µL (180 µL PBS ve 40 µL (0.3 mol/L) KI),

Reaktif 2; 15 µL (asetik asit) olarak uyarlandı.

340 nm'de 21-31 okuma aralığında kinetik okuma yapıldı. Faktör olarak 10000 kullanıldı (77).

4. BULGULAR

Tanımlayıcı istatistikler Tablo 5'de, her iki tip örnek için kinetik ve end-point yöntemler ile AOPP- fibrinojen korelasyon katsayıları Tablo 6'de, sitratlı örneklerdeki AOPP - fibrinojen ile kinetik ve end-point yöntemler için regresyon eğrileri ise Şekil 6'de gösterilmiştir.

Konsantrasyonu 27,7 U/L olan EDTA'lı örnek havuzunda kinetik yöntemin çalışma içi, çalışma arası ve total CV'leri sırasıyla; %1,4, %9,4 ve %10,2; konsantrasyonu 64,1 U/L olan sitratlı örnek havuzunda kinetik yöntemin çalışma içi, çalışma arası ve total CV'leri sırasıyla %3,6, %7 ve %8,0 olarak bulundu. Kinetik yöntemde her iki örnek tipinde de AOPP ile fibrinojen arasında anlamlı bir korelasyon bulunurken ($r = 0,581$; $p = 0,0001$; $r = 0.644$; $p = 0.0001$); end-point yöntemde her iki örnek tipinde de fibrinojen ve AOPP arasında korelasyon gözlenmedi. ($r = 0,060$; $p > 0,05$; $r = 0.062$; $p > 0,05$) . Kinetik ve end-point yöntemler arasında ise her iki tip örnek için de anlamlı korelasyon ilişkisi gözlemlendi.

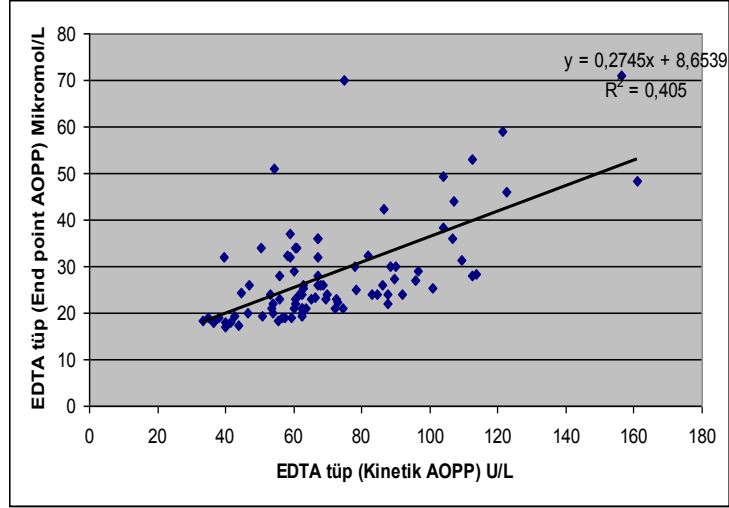
Tablo 5: Tanımlayıcı İstatistikler

N=93	Range	Minimum	Maximum	Mean	SD
Edtalı tüp (Kinetik AOPP)	128	33,5	161	71.07	25.10
Edtalı tüp(EndPoint AOPP)	54	17	71	28,16	10,83
Sitratlı tüp (Kinetik AOPP)	103,5	18	121,5	51,83	20.21
Sitratlı tüp(EndPoint AOPP)	46,5	12	58,5	22,04	8,35
Fibrinojen	397	179	576	350.86	88.63
HbA1c	6,8	7,0	13,8	8.85	1.51
Mikroalbuminüri	1903.7	2.3	1906	172.66	394.53

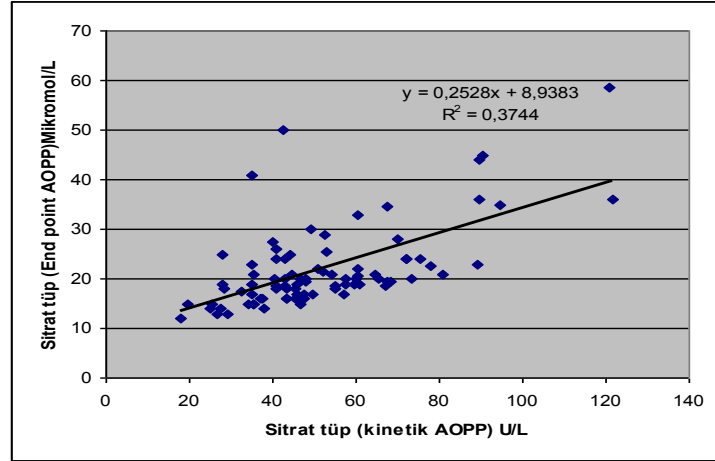
Tablo 6: Kinetik ve end-point yöntemler ile AOPP- fibrinojen korelasyon katsayıları

	Edtalı tüp (Kinetik AOPP)	Edtalı tüp(End point AOPP)	Sitratlı tüp (Kinetik AOPP)	Sitratlı tüp End point AOPP	Fibrinojen	HbA1c	mikroalbü min
Edtalı tüp Kinetik AOPP	1	0.636 (*)	0.969 (*)	0.537 (*)	0.581(*)	0.051	0.490 (*)
Edtalı tüp End point AOPP	0.636(*)	1	0.661 (*)	0.991(*)	0.060 (**)	0.027(**)	-0.006(**)
sitratlı tüp kinetik AOPP	0.969 (*)	0.661(*)	1	0.611(*)	0.644(*)	0.073(**)	0.520(*)
sitratlı tüp endpoint AOPP	0.537(*)	0.991(*)	0.611(*)	1	0.062(**)	0.033(**)	-0.024(**)
fibrinojen	0.581(*)	0.060(**)	0.644(*)	0.062(**)	11	0.203(**)	0.461(*)
HbA1c	0.051(**)	0.027(**)	0.073(**)	0.033(**)	0.203(**)	1	-0.063(**)
mikroalbuminüri	0.490(*)	-0.006(**)	0.520(*)	-0.024(**)	0.461(*)	-0.063(**)	11

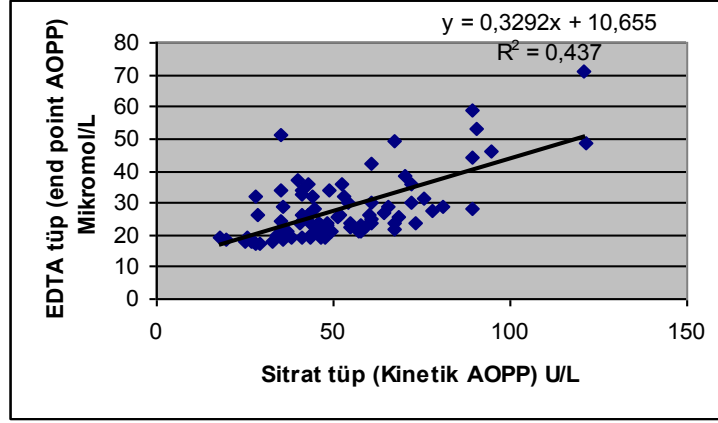
(*) p= 0,0001 (**)p>0,05



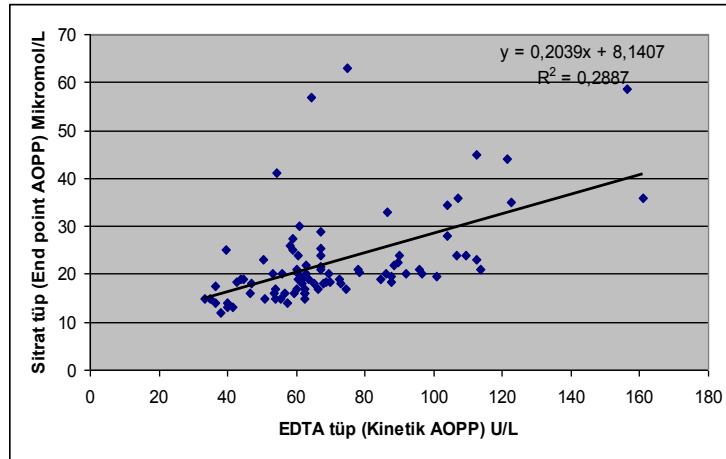
Şekil 6.a. EDTA'lı örnekten End point yöntem-EDTA'lı örnekten Kinetik yöntem karşılaştırılması



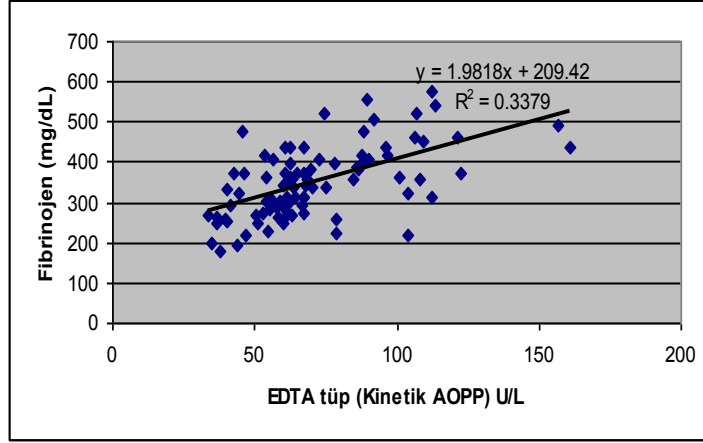
Şekil 6.b. Sitratlı tüpe alınmış örneklerde end-point-kinetik yöntemleri arasındaki $y=ax+b$ eşitliği, r^2 sayısı



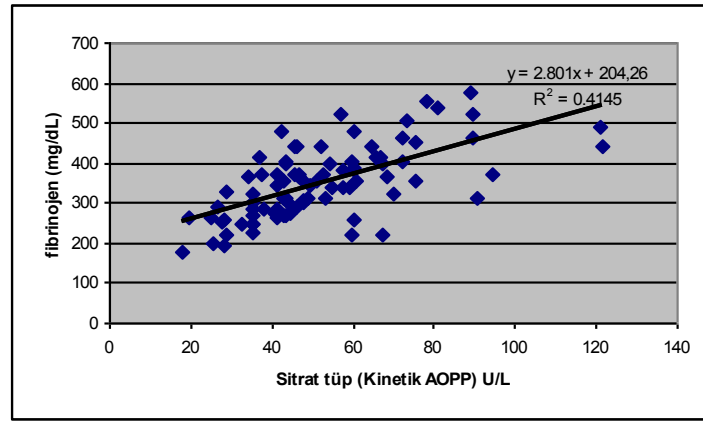
Şekil 6.c. EDTA'lı örnekten alınmış end point yöntem sonuçları ile-Sitratlı örneklerden alınmış Kinetik yöntem sonuçlarının karşılaştırılması



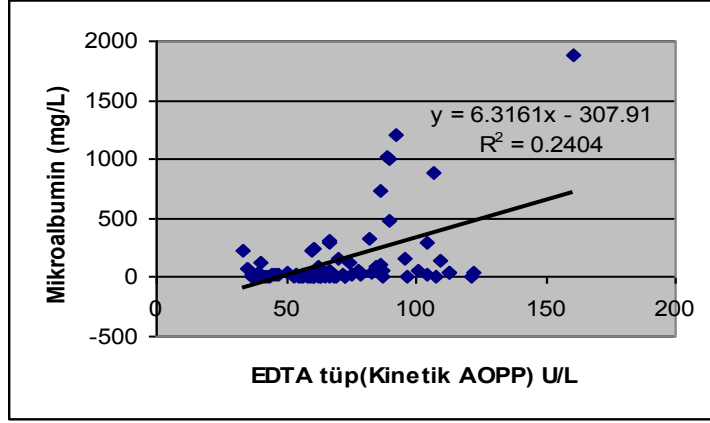
Şekil 6.d Sitratlı örnekten End point yöntem ile- EDTA'lı örnekten kinetik yöntem karşılaştırılması



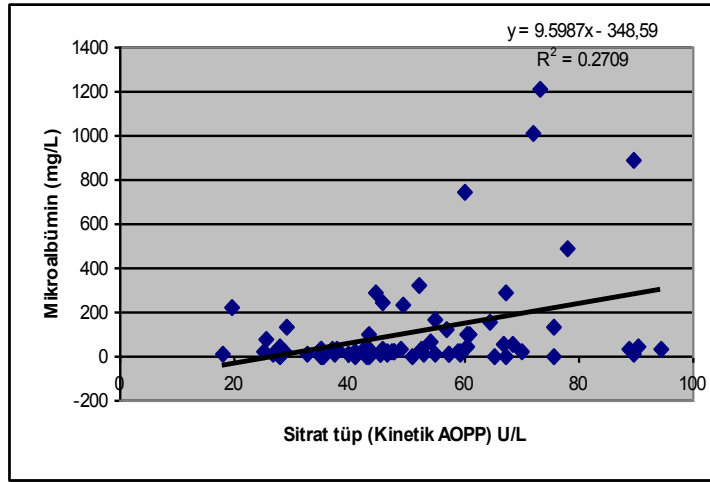
Şekil 6.e. Fibrinogen ile EDTA'lı örnekten Kinetik yöntem karşılaştırılması



Şekil 6.f. Fibrinogen-sitratlı örnekten kinetik yöntem karşılaştırılması



Şekil 6.g. Mikroalbumin ile EDTA'lı örnekten Kinetik yöntem karşılaştırılması



Şekil 6.h. Mikroalbumin-sitratlı örnekten Kinetik yöntem karşılaştırılması

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Diabet, kronik metabolik bir bozukluk olduğu gibi aynı zamanda da artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette artmış serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır. Organizma bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için bazı enzimatik ve non enzimatik antioksidan defans sistemlerine sahiptir (17).

Diabetteki yüksek kan glukoz düzeyleri; glukoz oto-oksidasyonu, poliol yolunun stimülasyonu, okside ve redükte koenzim formları arasındaki dengenin bozulması , ileri glikasyon son ürünleri oluşumu gibi çeşitli yollarla reaktif oksijen (ROS) türlerinin oluşumuna yol açar (72). Reaktif oksijen türlerinin DNA, proteinler, lipidler gibi bir çok molekülle reaksiyona girerek moleküllerin yapı ve fonksiyonlarını bozduğu bilinmektedir (73). Artmış oksidatif stresin inflamatuvar ve dejeneratif hastalıkları da kapsayan geniş bir hastalık gurubu yanında diabet patojenezi ve geç komplikasyonlarındaki önemi tartışılmaktadır (72). Bu kapsamda özellikle oksidatif lipit hasarı ürünleri sensitif tekniklerle bir çok hastalık gurubunda çalışılmıştır. Serbest radikallerin proteinlerin oksidatif modifikasyonu üzerine etkisi ise son yıllara kadar kolay metotlar elde edilememesi nedeniyle çalışılamamıştır (74).

Proteinlerin reaktif türevler tarafından oksidatif modifikasyonu bir dizi bozukluğun ve hastalığın etyolojisi veya ilerlemesinde rol oynar. Proteinlerin oksidasyonu aromatik amino asitlerin nitratlaşmasına, tiyol gruplarının oksidasyonuna, ileri oksidasyon protein ürünlerinin oluşmasına ve bazı amino asitlerin karbonil türevlerine dönüşümüne yol açar.

Oksidasyon aynı zamanda polipeptit zincirinin yarılmasına ve çapraz bağlı protein agregatlarının oluşumuna yol açabilir (25).

Protein oksidasyonu XX. yüzyılın ortalarından beri araştırılmış olmakla birlikte bu reaksiyon ürünlerinin in-vivo oksidatif hasarın spesifik, genel marker'ları olarak kullanılması ancak son yıllarda gerçekleşmiştir. Bunun nedeni oluşan ürünlerin yapısının bilinmemesi ve bu ürünleri biyolojik materyalde saptayacak duyarlı metodların mevcut olmamasıdır. Protein oksidasyonunun protein karbonil (PCO) gibi marker'larının in vivo protein oksidasyonunun derecesini gösterecek bir araç olarak kullanılması ise nispeten daha uzun bir geçmişe dayanmaktadır (25).

Oksidatif stresin direkt invivo ölçümleri zor ve zahmetli olup, günlük uygulama pratiğinden uzaktırlar. Bunun yerine pratik ve ölçümü kolay yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu da oksidatif modifiye ürünlerin ikincil ürünlerinin tesbitiyle yapılmaya çalışılmaktadır. AOPP olarak tanımlanan oksidatif modifikasyona uğrayan albumin'in son çapraz bağlanma ürünleri proteinlerin oksidatif modifikasyonunu ölçmek için güvenli bir belirteç olarak değerlendirilebilir (75,76).

Aktive nötrofiller tarafından üretilen myeloperoksidaz ile oluşan hipokloröz asit ve kloraminler özellikle tiol gurupları için oksidandır ve AOPP gibi klorine protein ve lipidlerin oluşumundan sorumludur. Bununla birlikte AOPP'nin bunun dışında oluşum yolları olduğu da bildirilmektedir (75).

Son yıllarda Witko-Sarsat ve arkadaşları tarafından üremide ileri protein oksidasyon ürünlerini (AOPP) ölçen bir yöntem geliştirilmiş, bu yeni yöntem ve belirtecin çeşitli hastalıklarda performansını değerlendiren çalışmalar yapılmıştır (2). Bu çalışmalar sonucunda üremik hastalarda AOPP düzeyleri anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Ayrıca uygulanan elektroforetik yöntemde AOPP'nin iki pik yaptığını ve AOPP formasyonunun albümin konsatrasyonları ile birlikte arttığı belirlenmiştir (2). Bunlara karşılık üremi ve koroner arter hastalığına sahip hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada ise AOPP nin düşük molekül ağırlıklı fraksiyonuna rastlanmamıştır (77). Witko-Sarsat ve arkadaşları saflaştırılmış insan serum albümini ve kontrol plazmaları üzerinde yaptıkları çalışmalar

sonucu kullandıkları bu yöntemin oksidasyona uğramamış saf albümin ile reaksiyon vermediğini göstermişlerdir (2).

Laszlo Selmeci ve arkadaşları 2005 yılında Witko-Sarsat tarafından sunulan bu yöntemi Cobas otoanalizörüne adapte ederek AOPP için referans değer çalışması ile birlikte kritik hastalarda AOPP cevabını değerlendirmişlerdir (73). Yaş ortalaması 21.3 (18-33) olan 266 sağlıklı kişide (81 erkek,185 kadın) yapılan bu referans çalışmasında AOPP için referans aralık 22.3 ± 6.3 $\mu\text{mol/L}$ olarak bildirilmiştir ve literatürde bildirilen referans değerleri ile uyumludur. Bununla birlikte çalışılan hasta grubunun yaş ortalamasında sağlıklı birey bulma güçlüğü ve referans değerlerinin genellikle genç ve sağlıklı kişilerden oluşan gruplardan elde edilmesi nedeniyle AOPP referans değer çalışmalarına gereksinim olduğu vurgulanmaktadır (73).

Biz de çalışmamızda hasta grubumuz olan tip II DM'lu hastalarda bu referans değerlere göre her iki tip örnek ve yöntemde yüksek AOPP düzeyleri elde ettik. Yapılan bir çalışmada AOPP düzeylerinin sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında DM tip II'de (1.7-2 kat), DM Tip I'den (1.2 kat) yüksek bulunduğu ve AOPP'nin diabetik hastalarda oksidatif protein hasarının şiddetini gösteren bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (76). Bizim çalışmamızda AOPP, erken diabet komplikasyon belirteci mikroalbümin ile kinetik yöntemde anlamlı bir korelasyon gösterirken , HbA1c ile böyle bir ilişki göstermemiştir. Piwowar ve arkadaşlarının diabetik nefropatili hastalar üzerinde yaptığı çalışmada ise AOPP konsantrasyonunun albümiüri derecesine göre artış gösterdiğini ve albümin/kreatinin oranından çok plazma kreatinin konsantrasyonu ile daha anlamlı şekilde korele olduğunu bildirmişlerdir (78).

Marcela ve arkadaşları koroner arter hastalığı olan kişiler ile yaptıkları çalışma sonucu AOPP düzeylerini bu hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Fakat AOPP düzeyleri ile koroner arter hastalık risk faktörleri arasında bir ilişki bulamamışlardır. Akut koroner hastalığı tanısı için cut-off değerini % 64 hassasiyet ve %71 özgüllük değerleri ile birlikte 89 mmol/L olarak belirlemişlerdir (79).

Yapılmış olan başka bir çalışmada araştırmacılar AOPP nin özellikle tip 2 diabetes mellitus hastalarında olmak üzere her iki tip diabetde artış gösterdiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte AOPP' nin glukoz ve HbA1c ile korelasyon göstermediğini bulmuşlardır

(76). Bizim çalışmamızda da bu sonucu destekleyecek şekilde AOPP ve HbA1c arasında her iki yöntem ve örnek tipinde korelasyon ilişkisi gözlenmedi. Bu durumun end-point yöntem adaptasyonu sırasında yapılan modifikasyonlar ve end-point yöntemdeki değerlerin dağılımı ile ilgili olabileceğini düşündük.

Aynı araştırmacılar Witko-Sarsat ve arkadaşlarının bulup uyguladığı AOPP konsantrasyonunu ölçmeye yönelik olan end-point yöntemin, ortam sıcaklığı, son reaktifi ekledikten sonra geçmesi gereken süre gibi standardize edilmesi zor değişkenlerin varlığı sebebiyle laboratuvarlar arasında ciddi bir fark ortaya çıkacağını ve bu yöntemin plazma AOPP düzeylerini olması gereken düzeyden daha yüksek ölçtüğünü bildirerek 2008 yılında AOPP için yeni kinetik bir yöntem geliştirmişlerdir. Kardiyovasküler/ periferik damar hastalıklarından oluşan 70 hastadan (47 erkek/23 kadın) alınan sitratlı ve EDTA'lı örneklerde her iki yöntemin performansını değerlendirmişler ve sitratlı örneklerde iki yöntem arasında yüksek bir korelasyon ilişkisi bulurken ($r^2 = 0.588$), EDTA'lı örneklerde sitratlı örneklerdeki kadar güçlü bir korelasyon ilişkisi bulamamışlar ve bunu EDTA'nın iyod oksidasyonunu inhibe etmesine bağlamışlardır (77,80). Biz bu araştırmacılar farklı olarak sitratlı ve EDTA'lı örneklerde iki yöntem arasında anlamlı bir korelasyon bulduk (Tablo-6) .

L. Selmeçi ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma ile aramızdaki başka bir fark ise reaktif aplikasyonuydu. Araştırmacıların çalışmayı gerçekleştirdikleri Cobas Mira Plus biyokimya otoanalizörü üç reaktif haznesine sahipti. Bizim kullandığımız Abbott Aeroset otoanalizörü ise iki reaktif haznesine sahipti. Bu sebeple end point reaksiyon için asetik asit ve PBS kinetik yöntem için ise PBS ve KI birleştirilip tek reaktif haline getirildi.

Bir başka araştırmada ise -20°C ve -80°C 'de saklanan örneklerde endpoint yöntem kullanılarak AOPP konsantrasyonları ölçülmüş ve karşılaştırılmıştır. Örnekler küçük porsiyonlara ayrılarak 7, 15, 31, 90, 180, 438'inci günlerde çalışılmışlardır. Bu çalışma sonucu 6 aya kadar -20°C ve -80°C saklanan örneklerde AOPP konsantrasyonlarında bir değişiklik olmamıştır (r aralığı; 0,8-1,0 $p < 0,001$). Bununla birlikte 438 günden fazla saklanan örneklerde -80°C (96.6 ± 83.2 , $p < 0,01$) ve -20°C (171.3 ± 94.6 , $p < 0,001$) 'de AOPP konsantrasyonlarında artış bulunmuştur (74). Orijinal metoda uyarak yapılan daha önceki çalışmalarda ise bekleme süresinin etkisi çoğunlukla tartışılmamış ve de AOPP analizi için

açlık kanı gerekliliği önerilmemesine rağmen çoğu araştırmacı açlık kanı örnekleri kullanmıştır (81).. Ayrıca Alessandro ve arkadaşları referans yöntemde kullanılan 340 nm dalga boyuna sahip ışık kaynağının, lipemik plazma örneklerinde ortaya çıkan bulanıklık nedeniyle AOPP için spesifik bir dalga boyu olamayacağını belirtmişlerdir. Ayrıca dondurulmuş ve tekrar çözölmüş plazma örneklerinin taze örneklerden daha bulanık olabileceğini belirtmişlerdir. Bekleme süresiyle ilgili AOPP konsantrasyon değişikliklerinin bu sebepten dolayı ortaya çıktığını belirtmişlerdir (81). Bizde çalışmamızda açlık kanı örnekleri kullandık ve elde ettiğimiz plazmaları analiz gününe kadar (yaklaşık 6 ay) - 80°C’de sakladık.

Witko-Sarsat ve arkadaşları bu aktivitenin okside plazma proteinleri, özellikle de albüminden kaynaklandığı belirtilmekle birlikte (2), daha sonra yapılan çalışmalarda serum AOPP değerlerinin plazma AOPP değerlerinden düşük olması, hazırlanan plazma havuzlarının 50°C ısıda bekletilmesiyle AOPP ve fibrinojen değerlerinde gözlenen paralel düşme bu aktivitenin modifiye fibrinojenden kaynaklandığı görüşüne yol açmıştır. Bu çalışmalarda serumda gözlenen AOPP aktivitesinin, albümin yerine preanalitik işlemler sırasında oluşan fibrin monomerlerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (75). Başka bir çalışmada da fibrin monomerlerinin serumda plazmadan iki kat daha yüksek oldukları bildirilmektedir (75,77).

Biz AOPP-fibrinojen ve AOPP-mikroalbümin arasında kinetik yöntemde her iki örnek tipinde de anlamlı bir ilişki bulmamıza rağmen, aynı ilişkiyi end-point yöntemde her iki örnek tipinde de bulamadık. Selmecı L. ve arkadaşları da kinetik yöntemi kullanarak AOPP ve fibrinojen arasında aynı şekilde anlamlı bir ilişki bulmuşlardır ($p<0,0001$, $r^2=0,564$). Aynı çalışmada AOPP konsantrasyon ölçümünün reaktivite ölçümüne göre fibrinojenle daha kuvvetli bir korelasyon içinde olduğunu bulmuşlardır. Bunu da AOPP nin spektral karakteristiğinin, ditirozin, karbonil ve pentosidin gibi değişik kromoforların karakteristiği ile uyumluluk gösterdiğini ve bu kromoforların fibrinojen molekülü üzerindeki konsantrasyonlarına bağlı olarak AOPP reaktivitesinin hastadan hastaya farklılık gösterebileceği şeklinde açıklık getirmişlerdir. İnceledikleri vakaları değerlendirerek düşük fibrinojen konsantrasyonlarında AOPP konsantrasyonlarının end point yöntemin tayin

limitinin altında kalıp ölçülemediğini bu yüzden kinetik yöntemin daha düşük düzeyleri ölçebildiği için daha uygun bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (77) .

Çalışmamızda iki yöntem arasındaki uyumu değerlendirmek için korelasyon ve regresyon analizleri kullandık. Bland-Altman yaptıkları çalışmalarda, korelasyon derecesinin örneklemedeki sonuçların dağılım genişliğine bağlı olduğu için, korelasyonun dağılım genişliği büyük olan örneklemelerde, dar olan örneklemelere göre daha yüksek bulunacağını ve iki yöntem zayıf uyuma sahip olduğu halde yüksek korelasyon gösterebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca korelasyon katsayısının anlamlılığının testi, “ iki yöntem arasında bağıntı yoktur” hipotezinin testi olduğunu bu yüzden aynı değeri ölçmek için dizayn edilen iki yöntemin ilişkili olup olmadığını test etmenin gereksiz olduğunu belirtmişlerdir. Regresyon analizinin x bağımsız değişkeni ile y bağımlı değişkeni arasındaki ilişkiyi incelediğini ve uyumu göstermede hangi yönteme ait verilerin x, hangilerinin y olarak kabul edilmesine dair bir bilgi olmadığını belirtmişlerdir. Regresyon katsayısının da korelasyon katsayısı gibi dağılım genişliğinden etkilendiğini göstermişlerdir. Ayrıca regresyon analizinde kullanılan veriler analizin doğrusallık sınırlarında olmalıdır. Linearite sınırları dışındaki değerler eğim’in artmasına neden olarak regresyonun standart hatasının artmasına neden olur. Bu sebeplerle iki yöntem arasındaki uyumu incelemede korelasyon ve regresyon analizi kullanımının doğru bir seçim olmayacağını belirtip Bland-Altman metodu adıyla yeni bir analiz metodu geliştirmişlerdir. Bu yöntemin en önemli özelliği iki yöntemin ölçüm farklılıklarını objektif olarak ortaya koyması ve farklılıkların kabul edilebilirlik düzeyinin yorumunu klinisyenin görüşüne bırakması olduğunu bildirmişlerdir (70).

Endpoint enzimatik analizleri ile yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlik değerleri elde edebilmek için spektrofotometri sisteminin ve örnekleme pipetlerinin kalibre olduğundan emin olmak gerekir. Ayrıca geleneksel endpoint enzimatik analizlerin en büyük dezavantajı numunenin başlangıç absorbansının elde edilmesinin zorluğudur. Fakat daha sonra geliştirilen hızlı analiz cihazları ile reaksiyon gerçekleştikten birkaç saniye sonra absorbans ölçülüp bu absorbans değerine uygun gelecek şekilde curve-fitting programı kullanılarak 0. zamana dönülebilir ve başlangıç absorbansı elde edilebilir. Bu yöntem ile Hekzokinaz ve Glukokinaz gibi çok hızlı gerçekleşen reaksiyonlarda bile başlangıç absorbansını (A_0)

elde edebilmek mümkündür. Bu yöntemin en büyük dezavantajı uzun sürede gerçekleşen reaksiyonlara pek uygun olmamasıdır. (82).

Kinetik yöntemlerde ise daha hızlı sonuç elde edilebilir. Bu yöntem sayesinde toplam reaksiyon süresi kısaltılmış ve örnek körü ile ilişkili sorunlar elimine edilmiş olunur. Kalibrasyon standartlarına ihtiyacının olması ve başlangıç absorbansı ile daha sonraki absorbans değişiklikleri arasındaki ilişkinin doğrusal olmaması dezavantajları arasındadır. Basit numerik analiz metodları ile doğrusallık sorunu elimine edilebilirse kinetik yöntem hızlı, basit ve güvenilir bir yöntem olarak ürün analizlerinde kullanılabilir (82).

Kimyasal analizlerde analiz metodunun uygulama performansı birçok faktöre bağlıdır. Bu nedenle ölçüm metodunun çok iyi tanımlanması gerekmektedir. Analiz edilen örneğe, analiz edilen bileşenlerin cinsine ve miktarına bağlı olarak farklı metot kullanmak gerekebilmektedir. Belirli bir analiz için çok değişik metotlardan hangisinin kullanılacağı analiz edilen örnek cinsine, analiz edilecek bileşenlerin miktarına, günlük yapılacak analiz sayısına, istenen sonucun kalitesine, metodunun uygulama kolaylığına, analiz süresine, analiz maliyetine bağlı olarak yapılacak bir değerlendirme sonucunda belirlenmelidir.

Kinetik ölçüm yöntemi hem elde ettiğimiz sonuçların literatüre uygunluğu hem de cihaz aplikasyonunun kolay ve ucuz, olması nedeniyle oksidatif stres araştırmaları ile ilgilenen biyokimya laboratuvarları için daha iyi bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Bunun yanında yöntemin geliştirilmesi ve daha fazla araştırmalarla desteklenmesi gerekliliği yadsınamaz.

KAYNAKLAR

1. Altan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif stres. Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem] 2006; 31 (2); 51–56
2. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. Kidney Int 1996; 49:1304-1313
3. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 2001;51-61, 63-7, 69-81, 215-17, 237-43
4. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Joslin's Diabetes Mellitus. 14.th Edition. 2005 Lippincott Williams-Wilkins
5. Watkins PJ, Drury PL, Howell SL: Diabetes and its management 5th ed. Blackwell Co p:3 1996
6. Lebovitz HE: Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. In: Lebovitz HE, Ed, Therapy for Diabetes mellitus and related disorders. American Diabetes Association clinical education series, Third edition, Virginia;4–7,1998
7. National Diabetes data group. Classification and diagnosis of Diabetes mellitus and categories of glucose tolerance. Diabetes; 28,1039–57,1999
8. The expert committee of the diagnosis and classification of the Diabetes mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and clasification of Diabetes mellitus. Diabetes Care, 28(1): 4-36, Jan 2005

9. Bagrıaık N: Tanı, komplikasyonlara yaklaşımlar, tedavi konsensus el kitabı .Novo Nordisk diabet servisi yayınları .İstanbul 1997
10. Eschwege E, Simon D, Balkau B. The growing burden of diabetes in the world population. International diabetes federation Bulletin 1997;42:14-9
11. Boyle JP, Honeycutt AA, Narayan KM et al. Projection of diabetes burden through 2050: impact of changing demography and disease prevalence in the US. Diabetes Care 2001;24:1936-40
12. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates and projections. Diabetes Care 1998;21:1414
13. Türkiye Diabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II Çalışması)'nın saha araştırması Ocak 2010-Haziran 2010
14. Geiss L, Centers for disease control and preventions division of diabetes translation: Diabetes surveillance 1997
15. Diabetes Care, Volume 33, Supplement 1, January 2010
16. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia Report of a WHO/IDF Consultation © World Health Organization 2006
17. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL: Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. Endocrine Reviews. 25: 612–628, 2004.
18. Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I: Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. Cell Biochem Func. 21: 291-296, 2003
19. Ostenson, C. G: The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. Acta Physiologica Scandinavica. 171: 241– 247, 2001
20. Memişoğulları R. Plazma Homosistein Düzeyleri ile Tip 2 Diabet, Komplikasyonları, Kontrolü ve Süresi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 2003
21. Lipinski, B: Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. Journal of Diabetes and Its Complications. 15:203–210, 2001
22. Sacks DB: Diabetes Mellitus. In: Burtis CA, Ashwood ER, (Ed). Tietz Textbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB Saunders Co: 766-776, 1999

23. Alper G. Diabet. In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY, (eds). İnsan Biyokimyası. Ankara, Palme Yayıncılık, pp: 248-257, 2002
24. Pratic`o D: Antioxidants and endothelium protection. Atherosclerosis. 181: 215–224, 2005
25. Kayalı R, Çakatay U. Basic mechanisms of protein oxidation. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 83-89
26. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. Ann N Y Acad Sci 2000; 899: 191- 208
27. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem 1997; 272: 20313-20316.
28. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino Acids, 2003; 25: 207-218.
29. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. Free Radic Biol Med 2002; 32: 790-796.
30. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J 1997; 324: 1-18.
31. Bindoli A, Rigobello MP. Mitochondrial thioredoxin reductase and thiol status. Methods Enzymol, 2002; 347: 307-316
32. Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. Free Radic Biol Med 1998; 25: 385-391.
33. Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide. Free Radic Biol Med 1998; 25: 392-403
34. Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modification. FEBS Lett 1995; 364: 279-282.
35. Ter Steege JCA, Koster-Kamphuis L, van Straaten EA, Forget PP, Buurman WA. Nitrotyrosine in plasma of celiac disease patients as detected by a new sandwich ELISA. Free Radic Biol Med 1998; 25: 953-963
36. Szabo C. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia reperfusion injury. Shock 1996; 6: 79-88

37. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Biol Med* 1992; 17: 221-237)
38. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003; 329: 23-38
39. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 2000; 32:307-326
40. Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli R, Akcay T, Sivas A. Relation of oxidative protein damage and nitrotyrosine levels in the aging rat brain. *Experimental Gerontology* 2001; 36: 221-229
41. Serafini M, Del Rio D (2004) Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report* 9(3), 145- 152).
42. Elmalı E, Altan N, Bukan N (2004) Effect of sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Drugs R.D.* 5(4), 203-8
43. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V (2004) β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53 (Supplement 1), 119-124.
44. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiani H, Seino Y, Yamada Y (1999) Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic β cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 48(4), 927-932.
45. Giugliano I, Ceriello A, Paolisso G (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19(3), 257-267)
46. Rösen P, Du X, Tschöpe D (1998) Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by α -tocopherol?. *Molecular and Cellular Biochemistry* 188(1- 2), 103-111
47. Ceriello A (1997) Acute hyperglycemia and oxidative stress generation. *Diabetic Medicine* 14(Supplement.3), 45-49

48. Davidoff AJ, Rodgers RL (1990) Insulin, thyroid hormone, and heart function of diabetic spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 15(6), 633-642
49. Das K, Chainy GBN (2001) Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1537(1), 1-13.)
50. Januszewski AS, Alderson NL, Metz TO, Thorpe SR, Baynes JW (2003) Role of lipids in chemical modification of proteins and development of complications in diabetes. *Biochemical Society Transactions*. 31(6), 1413-1416.
51. Brownlee M (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865), 813-820
52. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP (1988) Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes* 14(1), 1114- 1120
53. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Muller M, Wahl P, Ziegler R and Nawroth PP (1997) Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 46(9), 1481-149
54. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M (1998) Amino guanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 47(7), 1114- 1120
55. Soulis T, Cooper ME, Sastra S, Thallas V, Panagiotopoulos S, Bjerrum OJ, Jerums G (1997) Relative contributions of advanced glycation and nitric oxide synthase inhibition to amino guanidine- mediated renoprotection in diabetic rats. *Diabetologia* 40(10), 1141-1151
56. Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL (1997) Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *European Journal of Clinical Investigation*. 27(2), 97-108
57. Cameron NE, Cotter MA (1995) Neurovascular dysfunction in diabetic rats: potential contribution of autooxidation and free radicals examined using transition metal chelating agents. *Journal of Clinical Investigation*. 96(2), 1159-1163
nts: Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17(1), 4-38

58. Şekeroğlu MR, Şahin H, Dülger H, Algün E: The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 33:669-674, 2000
59. Goodyear-Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients. *Am J Crit Care* 2002; 11: 543-51
60. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol*, 1998; 161: 2524-2532
61. Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001;59 (Supl.78): S108-S113
62. Krzystek-Korpacka M, Neubauer K, Berdowska I, Boehm D, Zielinski B, Petryszyn P, Terlecki G, Paradowski L, Gamian A. Enhanced formation of advanced oxidation protein products in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Jun;14(6):794-802
63. Tilman Drüeke, MD; Véronique Witko-Sarsat, PhD; Ziad Massy, MD; Béatrice Descamps-Latscha, MD, PhD; Alain P. Guerin, MD; Sylvain J. Marchais, MD; Valérie Gausson, MS; Gérard M. London, MD Iron Therapy, Advanced Oxidation Protein Products, and Carotid Artery Intima-Media Thickness in End-Stage Renal Disease *Circulation* 2002;106;2212-2217; originally published online Oct 7, 2002
64. Koken T, Serteser M, Kahraman A, et al. Changes in serum markers of oxidative stress with varying periods of hemodialysis. *Nephrol Dial Transplantation*, 17(Sup:1):O47,2002
65. Evereklioglu C. Current concepts in the etiology and treatment of Behcet disease. *Surv Ophthalmol* 2005;50: 297-350
66. Mehmetoğlu İ. Klinik biyokimya laboratuvarı el kitabı. Nobel Tıp kitapçevleri. 2007
67. Ertaş Ö., Kayalı A. An overview on Analytical Method Validation *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 34 (1) 37 - 57, 2005

68. Lang, J.R., Bolton, S., A comprehensive method validation strategy for bioanalytical applications in the pharmaceutical industry- 1. Experimental considerations”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 9(5), 357- 361 (1991)
69. CITAC / Eurachem Guide,; Guide to Quality in Analytical Chemistry An Aid to Accreditation 2002
70. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement *Lancet* 1986; I: 307-10
71. Ludden, T.M., “Estimation of limit of quantitation”, Bio-Internal, Munich, Germany (1994).
72. Piwowar A., Knapik-Kordecha M., Warwas M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 77 2007; 188-192
73. Selmeçi L., Seres L., Antal M., Lukacs J, Regöly-Merei A., and Acsady G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Med* 2005; 43 (3): 294-297.
74. Matteucci E, Biasci E, Giampietro O. Advanced oxidation protein products in plasma: stability during storage and correlation with other clinical characteristics. *Acta Diabetol*(2001) 38: 187-189
75. Selmeçi L, Székely M, Soos P, Seres L, Klinga N, Geiger A, Acsady Gyorgy A. Human blood plasma advanced oxidation protein products(AOPP) correlates with fibrinogen levels . *Free Radical Research*, September 2006; 40(9): 952-958
76. Kalousova M., Krha J., Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol. Res.* 51: 597-604, 2002
77. L Selmeçi, L Seres, P Soós, M Székely, Gy Acsády Kinetic assay for the determination of the oxidative stress biomarker, advanced oxidation protein products (AOPP) in the human blood plasma *Acta Physiologica Hungarica*, Volume 95 (2), pp. 209–218 (2008)

78. Piwowar A., Kordecka M., Szczecińska J., Warwas M., Plasma glycooxidation protein products in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24: 549–553.
79. Škvařilova M, Bulava A., Stejskal D., Adamovská S., Bartek J. Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndro. *Biomed. Papers* 149(1), 83–87 (2005)
80. Bhattacharyya DK, Adak S, Bandyopadhyay U, Banerjee RK: Mechanism of inhibition of horseradish peroxidase-catalysed iodide oxidation by EDTA. *Biochem. J.* 298, 281–288 (1994)
81. Valli A., Suliman M., Meert N., Vanholder R., Lindholm B., Stenvinkel P., Watanabe M., Barany P., Alvestrand A., Anderstam B. Overestimation of advanced oxidation protein products in uremic plasma due to presence of triglycerides and other endogenous factors. *Clinica Chimica Acta* 379 (2007) 87–94
82. T. O. Tiffany, J. M. Jansen, C. A. Burtis, J. B. Overton, and C. D. Scott. Enzymatic Kinetic Rate and End-point Analyses Of Substrate, by use of a GeMSAEC Fast Analyser. *CLINICAL CHEMISTRY*, Vol. 18, No. 8, 1972