

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**HEMODİYALİZ SÜRECİNİN DNA HASARI İLE
İLİŞKİLİ GEN VE PROTEİN EKSPRESYONUNA ETKİSİ**

SELİN ÜNAL

**DANIŞMAN
PROF.DR.MEHMET GÜVEN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI**

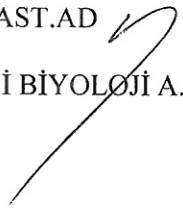
İSTANBUL-2015

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü TIBBİ BİYOLOJİ Anabilim Dalı TIBBİ BİYOLOJİ Programında SELİN ÜNAL tarafından hazırlanan HEMODİYALİZ SÜRECİNİN DNA HASARI İLE İLİŞKİLİ GEN VE PROTEİN EKSPRESYONUNA ETKİSİ . başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

11 / 02 / 2015

Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u> | <u>İmzası</u> |
|---|---|
| 1.PROF.DR.MEHMET GÜVEN | İ.Ü CERR. TIP FAK.TIBBİ BİYOLOJİ A.D  |
| 2.PROF.DR.MEHMET RIZA ALTIPARMAK | İ.Ü CERR.TIP.FAK. İÇ HAST.AD  |
| 3.DOÇ.DR.AHMET ÖZAYDIN | İ.Ü CERR.TIP.FAK. TIBBİ BİYOLOJİ A.D  |
| 4. | |
| 5. | |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

SELİN ÜNAL

İTHAF

Canım anneme, babama ve ağabeyime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman ve her koşulda desteğini yanımda hissettiğim, değerli bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Mehmet GÜVEN'e,

Eğitimimde ve tezimde bana her türlü konuda yardım eden Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e ve Anabilim Dalı'mızın tüm değerli Öğretim Üyelerine,

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için gerekli örneklerin temininde emeği geçen İç Hastalıklar-Nefroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sn. Prof. Dr. Mehmet Rıza ALTIPARMAK, Doç.Dr. Sinan TRABULUS ve ekibine,

Tez çalışmalarım boyunca bana destek veren ve tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Bahadır BATAR, Doç.Dr. Matem TUNÇDEMİR, Doç.Dr. Erdinç DURSUN ve Doç.Dr. Duygu GEZEN AK'a ve Dr. Burcu BAYOĞLU'na,

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman yanımda olan arkadaşlarım MSc. İlayda AKSÖZ, MSc. Nurnisa Oya ALANSAL, MSc. Özlem TUN, MSc. Sezin KARABULUT ve Mol. Biy. Hidayet MEMİŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan ve beni her konuda destekleyen canım aileme teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25949

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. BÖBREK	4
2.2. BÖBREK YETMEZLİĞİ.....	5
2.2.1. Akut böbrek yetmezliği	5
2.2.2. Kronik böbrek yetmezliği	5
2.2.2.1. Kronik böbrek yetmezliği etiyolojisi ve epidemiyolojisi.....	6
2.2.2.2. Kronik böbrek yetmezliği patogenezi.....	7
2.2.2.3. Kronik böbrek yetmezliğinin klinik özellikleri	8
2.2.2.4. Kronik böbrek yetmezliği progresyonunda etkili faktörler.....	10
2.2.2.5. Kronik böbrek yetmezliğinin tedavi yöntemleri.....	11
2.3. DİYALİZ	11
2.3.1. Hemodiyaliz	12
2.3.1.1. Hemodiyalizin öne çıkan yönleri.....	13
2.4. OKSİDATİF STRES.....	15
2.5. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ.....	16
2.5.1. Reaktif oksijen türlerinin etkileri	17
2.5.2. Reaktif oksijen türlerinin kaynakları	18
2.6. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ VE OKSİDATİF STRES	19
2.6.1. Diyaliz Membranının Etkileri	19

2.7. OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI	20
2.8. DNA ONARIM MEKANİZMALARI	21
2.8.1. Direkt onarım	22
2.8.1.1. Basit tek zincir kırıklarının ligasyon	22
2.8.1.2. Fotoreaktivasyon	23
2.8.1.3. O-6 metilguanin onarımı	23
2.8.2. Nükleotidlerin kesilip çıkarılma onarımı	23
2.8.2.1. Bazların kesilip çıkarılması onarımı	23
2.8.2.2. Nükleotidlerin kesilip çıkarılması onarımı	25
2.8.3. DNA yanlış eşleşme onarımı (mismatch tamir mekanizması)	27
2.8.4. DNA zincir kırıklarının onarımı	28
2.8.4.1. DNA tek zincir kırıklarının onarımı	28
2.8.4.2. DNA çift zincir kırıklarının onarımı	28
2.8.4.3. Homolog rekombinasyon onarımı	28
2.8.4.4. Homolog olmayan rekombinasyon onarımı	28
2.9. XRCC1 GENİ VE PROTEİNİ	28
2.10. PARP1 GENİ VE PROTEİNİ	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. ÇALIŞMA GRUBU	32
3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR	33
3.3. KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER	34
3.4. KULLANILAN CİHAZLAR	36
3.5. PERİFERİK KANDAN LENFOSİT İZOLASYONU	37
3.6. TOTAL RNA İZOLASYONU	37
3.6.1. Total RNA konsantrasyonunun ve saflığının Ölçülmesi	38
3.6.2. Birinci normalizasyon	38
3.6.3. QRt-pcr yöntemi kullanılarak XRCC1 ve PARP1 gen ekspresyonu düzeylerinin kantitatif olarak saptanması	38
3.6.4. RT-PCR	39
3.6.5. İkinci normalizasyon	41
3.6.6. Reaksiyonlarda kullanılan QPCR primerleri ve taqman problemleri	41
3.6.7. Qpcr reaksiyon karışımının hazırlanması	42
3.7. LENFOSİTTEN NÜKLEER PROTEİN İZOLASYONU	44

3.7.1. Nükleer protein konsantrasyonunun ve saflığının ölçülmesi.....	45
3.7.2. Birinci normalizasyon.....	46
3.7.3. Western blot yöntemi.....	46
3.7.4. İkinci normalizasyon	48
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	48
4. BULGULAR	49
4.1. Hemodiyaliz tedavisi gören kronik böbrek hastalarına ait klinik veriler ..	49
4.2. Hemodiyaliz tedavisi öncesi ve sonrası XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeyleri	50
4.3. Hemodiyaliz tedavisi öncesi ve sonrası XRCC1 ve PARP1 protein ekspresyon düzeyleri	53
4.4. Hemodiyaliz tedavisi öncesi ve sonrası XRCC1 gen ve protein ekspresyonu ile klinik verilerin korelasyonu	56
4.5. Hemodiyaliz tedavisi öncesi ve sonrası PARP1 gen ve protein ekspresyonu ile klinik verilerin korelasyonu	57
5. TARTIŞMA.....	60
KAYNAKLAR.....	66
FORMLAR.....	75
ETİK KURUL KARARI	77
ÖZGEÇMİŞ	78

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Türkiye’de RTT gerektiren SDBY nedenleri ve dağılımı.....	7
Tablo 2: Kronik böbrek yetmezliği evreleri.	8
Tablo 3: KBY’de hastalığın progresyonunu etkileyen risk faktörler.....	10
Tablo 4: ROT’ların hücrede başlıca hedefleri ve yaptıkları hasarlar	17
Tablo 5: Kalıp RNA ve primer karışımının içeriği.....	39
Tablo 6: RT reaksiyonunda kullanılan bileşenlerin hacim ve konsantrasyonları.	40
Tablo 7: ACTB prob ve primerlerinin özellikleri.....	41
Tablo 8: XRCC1 prob ve primerlerinin özellikleri.....	42
Tablo 9: PARP1 prob ve primerlerinin özellikleri.	42
Tablo 10: qPCR reaksiyon karışımı.....	43
Tablo 11 qPCR sıcaklık döngüsü.	44
Tablo 12: Kronik böbrek yetmezliği hastalarının klinik özellikleri.	49
Tablo 13: Diyaliz öncesi ve sonrası gruplarında XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeyleri.	50
Tablo 14: Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası, XRCC1 ve PARP1 protein ekspresyon düzeyleri.	53
Tablo 15: XRCC1 mRNA ekspresyonunun hastaların klinik verileri ile korelasyonları.....	56
Tablo 16: XRCC1 protein ekspresyonunun hastaların klinik verileri ile korelasyonları.....	57
Tablo 17: PARP1 mRNA ekspresyonunun hastaların klinik verileri ile korelasyonları.....	58
Tablo 18: PARP1 protein ekspresyonunun hastaların klinik verileri ile korelasyonları.....	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 : Böbrek ve nefron yapısı	4
Şekil 2: Çentiğin DNA ligaz enzimi tarafından tamir edilmesi	22
Şekil 3: Baz eksizyon tamir yolağı	24
Şekil 4: GG-NER (Genomik-NER) ve TC-NER (Transkripsiyon e_likli-NER) onarımı.....	26
Şekil 5: XRCC1 protein yapısı ve protein-protein etkileşimleri	29
Şekil 6: PARP1 proteininin ve geninin yapısı.....	31
Şekil 7: Diyaliz öncesi ve sonrası XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeyleri.	51
Şekil 8: Diyaliz öncesi, XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeylerinin korelasyonu.	52
Şekil 9: Diyaliz sonrası, XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeylerinin korelasyonu.	52
Şekil 10: Diyaliz öncesi ve sonrası XRCC1 ve PARP1 protein ekspresyon düzeyleri.	54
Şekil 11: (A) Hemodiyaliz öncesi ve hemodiyaliz sonrası XRCC1 ve ACTB protein ekspresyonu düzeyleri (B) Hemodiyaliz öncesi ve hemodiyaliz sonrası PARP1 ve ACTB protein ekspresyonu düzeyleri.....	55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABY	Akut Böbrek Yetmezliği
ACTB	Aktin beta
AP	Apürinik/apirimidinik
APE1	AP endonükleaz 1
BER	Baz kesip çıkarma tamiri
Ct	Döngü eşik değeri
DNA-PKcs	DNA bağımlı protein kinaz alt ünitesi
GFH	Glomeruler Filtrasyon Hızı
GG-NER	Genel genom nükleotid kesip çıkarma tamiri
GWAS	Genom çaplı ilişkilendirme çalışmaları
HD	Hemodiyaliz
hOGG1	İnsan 8-oksoguanin DNA glikozilaz 1
KBY	Kronik Böbrek Yetmezliği
NER	Nükleotid kesip çıkarma tamiri
PARP1	Poly (ADP-riboz) polimeraz 1
PBS	Fosfat tuz tamponu
PCNA	Proliferatif hücre nükleer antijen
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
OS	Oksidatif stres
ROT	Reaktif oksijen türleri
RRT	Renal replasman tedavisi
SDBY	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
TC-NER	Transkripsiyon ile birleştirilmiş nükleotid kesip çıkarma tamiri
XRCC1	X-ray cross complementing grup 1

ÖZET

ÜNAL, S. (2015). Hemodiyaliz Sürecinin DNA Hasarı İle İlişkili Gen ve Protein Ekspresyonuna Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kronik böbrek yetmezliği (KBY); glomeruler filtrasyon hızında azalma sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlamada ve metabolik endokrin fonksiyonlarda kronik ve ilerleyici bozulma halidir. KBY birçok nedenle gelişebilir. En sık görülen nedenler arasında kronik glomerülonefrit, diyabet, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı ve obstruktif üropatiler yer almaktadır.

Böbreğin işlev göremediği durumlarda kanın hipotonik diyaliz sıvısı içindeki yarı geçirgen bir zardan geçirilerek bileşimindeki ayrılması gereken maddelerden temizlenmesi işlemi diyaliz olarak tanımlanmaktadır. HD tedavisi alan kronik böbrek yetmezliği hastalarında antioksidan mekanizma bozulduğu, reaktif oksijen türevlerinde (ROT) ve serbest radikallerde artışın meydana geldiği ve bunun sonucunda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. Membran biyo-geçirgenliği ROT ların artışında merkezi bir rol oynamaktadır. Bu nedenle HD hastalarında kan-membran etkileşimine bağlı oksidatif stres kronik olarak gelişir.

ROT'lar hücrede metal katalizli dönüşümden sonra veya doğrudan DNA'da hasar oluşturur. Bu faktörler sebebiyle oluşan dna hasarına karşı hücre tamir sistemine sahiptir ve bu tip hasarlar çoğunlukla baz çıkarım tamir mekanizmasıyla tamir edilirler. Bu süreçte XRCC1 ve PARP1 rol oynar. Bu tamir süreci içerisinde XRCC1 ve PARP1 etkileşime girer ve diğer tamir proteinleriyle birlikte bu hasarı ortadan kaldırır.

Toplam 20 son dönem böbrek yetmezliği görülen hemodiyaliz tedvisi gören hasta çalışmaya dâhil edildi. Bu hastalar hemodiyalize girmeden önce ve girdikten sonra olarak iki gruba ayrıldı. Gen ve protein ekspresyon analizleri, Real-time PCR ve western blot analizi ile saptandı.

Hemodiyalize girmeden önceki hastalarda XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeylerinin hemodiyaliz sonrasına göre istatistiksel olarak anlam saptayamadık ($P>0,05$). Ayrıca, hemodiyalize girmeden önceki hastalarda XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeylerinin hemodiyaliz sonrasına göre istatistiksel olarak anlam saptayamadık ($P>0,05$).

Çalışmamızda, KBY görülen hastalarda, HD öncesi ve sonrası XRCC1 gen/protein ve PARP1 gen/protein ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Daha önce bu kurguda bir çalışma yapılmaması çalışmamızın özgün değerini ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz veriler özellikler HD süreci ile apoptotik yollar arasındaki ilişki bulgularını destekler niteliktedir.

Anahtar kelimeler: Kronik böbrek yetmezliği, Hemodiyaliz, DNA hasarı, XRCC1, PARP1.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25949

ABSTRACT

ÜNAL, S. (2015). The Effect of Gene and Protein Expression is associated with DNA Damage During Hemodialysis Process. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology. Master Thesis. İstanbul.

Chronic renal failure (CRF); renal fluid and solute balance of the endocrine and metabolic functions to set in a state of chronic and progressive deterioration as a result of reduction in glomerular filtration rate. CRF may develop for many reasons. The most common causes of chronic glomerulonephritis, diabetes, hypertension, polycystic kidney disease, nephritis, obstructive uropathy.

Hemodialysis (HD) is a method that is used to achieve the extracorporeal removal of waste products such as creatinine and urea and free water from the blood when the kidneys are in a state of renal failure. HD patients with chronic renal failure impair anti-oxidant mechanisms, occur the reactive oxygen species (ROS) and consequently increase free radicals and oxidative stress were shown in previous study. Membrane bio-permeability which plays a key role increases in ROS. For this reason, the HD patients develop chronic oxidative stress due to blood-membrane interaction. ROS such as (O_2^-), (OH^-), (NO^-) or (HOO^-) damage DNA directly or after metal-catalyzed transformation in the cell. Cells respond to DNA damage with DNA repair mechanisms. In this process, XRCC1 and PARP1 which play a role remove the damage with other proteins.

In our study, we did not find any statistically significant difference mRNA expression levels of XRCC1 and PARP1 in before hemodialysis process group as compared after hemodialysis process group (both of them, $P > 0.05$). Furthermore, we detected a protein expression levels of XRCC1 and PARP1 in before hemodialysis group versus after hemodialysis group and we did not find any significant difference protein expression levels of XRCC1 and PARP1 in before hemodialysis process group as compared after hemodialysis process group ($P > 0.05$).

We investigated XRCC1 gene/protein and PARP1 gene/protein expression levels in end stage renal disease patients. Earlier studies performed to demonstrate the unique value of our study. Our data about HD process supports findings of the relationship between characteristics of the apoptotic pathways.

Key Words: Chronic Renal Failure, Hemodialysis, DNA Damage, XRCC1, PARP1

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.
Project No. 25949

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik böbrek yetmezliği; glomeruler filtrasyon hızında azalma sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlamada ve metabolik endokrin fonksiyonlarda kronik ve ilerleyici bozulma halidir (Akpolat ve ark., 1999). Kronik böbrek yetmezliği birçok nedenle gelişebilir. En sık görülen bu nedenler arasında kronik glomerülonefrit, diyabet, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı, obstruktif üropati ve interstiyel nefritler yer almaktadır (Nadir ve ark., 2002). Türk Nefroloji Derneği-2000 kaynak veri raporuna göre 31 Aralık 2000 tarihi itibarıyla düzenli hemodiyaliz (HD) programına giren hasta sayısı (15 yaş üzeri) 13944 ve bunların 6000'i kadın (%43), 7826'sı erkek (%57) olarak bildirilmiştir (Akpolat ve ark., 1999; Nadir ve ark., 2002).

Böbreğin işlev göremediği durumlarda kanın hipotonik diyaliz sıvısı içindeki yarı geçirgen bir zardan geçirilerek bileşimindeki ayrılması gereken maddelerden temizlenmesi işlemi diyaliz olarak tanımlanmaktadır (Öztürk, 2005). HD tedavisi alan kronik böbrek yetmezliği hastalarında antioksidan mekanizma bozulduğu, reaktif oksijen türevlerinde (ROT) ve serbest radikallerde artışın meydana geldiği ve bunun sonucunda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (Mastalerz ve ark., 2007). Membran biyo-geçirgenliği ROT ların artışında merkezi bir rol oynamaktadır. Bu nedenle HD hastalarında kan-membran etkileşimine bağlı oksidatif stres kronik olarak gelişir. Uzun süre HD tedavisi gören hastalarda ROT'la ilişkili olarak ateroskleroz, diyaliz ilişkili amilodozis ve kanser gelişimi görülmektedir (Magi ve ark., 1994; Niwa ve ark., 1996; Buccianti ve ark., 1996).

Prooksidan/antioksidan dengenin prooksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir. Stabil bir molekül olan DNA da; lipidler, karbonhidratlar ve proteinler gibi spontan kimyasal oksidatif hasara uğramaktadır (Emerce, 2007). Süperoksit anyon radikali (O₂⁻), hidroksil radikali (OH⁻), nitritoksit radikali (NO⁻) veya hidroperoksil (HOO⁻) gibi ROT'lar hücrede metal katalizli dönüşümden sonra veya doğrudan DNA'da hasar oluşturur (Boiteux ve ark., 1999). Bu faktörler sebebiyle oluşan DNA hasarına karşın hücre tamir sistemine sahiptir (Veronique ve ark., 2003).

DNA tamir sistemleri, DNA'da hasar oluşturan ultraviyole (UV) ve iyonize radyasyon gibi dışsal ajanlara ve normal hücresel metabolizma tarafından üretilen

reaktif oksijen türleri (ROT) gibi içsel kaynaklara karşı kritik savunma mekanizmasıdır (Hall ve ark., 2009). DNA tamir mekanizmaları genomik bütünlüğün sürdürülmesinde önemli rol oynar. Memeli hücreleri, farklı türdeki DNA hasarlarına karşı farklı DNA tamir mekanizmaları geliştirmişlerdir. Çift zincir kırıkları, hidrolitik depürinasyon, aprimidinik bölgeler ve oksidatif hasarlar farklı DNA hasar türleridir. Farklı DNA hasar türlerinin tamirleri, çift zincir kırık (double strand break, DSB) tamiri, baz kesip çıkarma tamiri (base excision repair, BER), nükleotid kesip çıkarma tamiri (nucleotide excision repair, NER) ve yanlış eşleşme tamiri (mismatch repair, MMR) gibi lezyon spesifik DNA tamir yolları tarafından gerçekleştirilir (Bartek ve ark., 2001). Oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarı baz çıkarım tamir mekanizmasıyla (BER) tamir edilirler (Veronique ve ark., 2003).

X-ray repair cross complementing group 1 (XRCC1) ve Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) BER yolağının önemli proteinleridir. XRCC1 geni insan kromozomunda 19q13.2-13.3'de haritalanmıştır (Mohrenweiser ve ark., 1989). XRCC1 proteini, tamir bölgesinde diğer BER proteinlerinin koordinasyonu için bir çatı (scaffold) vazifesi yapmaktadır (Hoeijmakers, 2001). PARP1 geni insan kromozomunda 1q42'de haritalanmıştır. PARP1 nükleer bir enzimdir ve DNA hasarına cevap olarak hedef proteinlerin poly ADP-ribozilasyonunu katalize etmektedir (Herceg&Wang, 2001).

Daha önceki yıllardaki yapılan çalışmalarca, HD programına giren kronik böbrek hastalarda hemodiyaliz süreci kaynaklı genomik hasarın meydana geldiği gösterilmiştir (Bagatini ve ark., 2008). Bunun yanında HD tedavisinin pro- ve anti-apoptotik moleküllerin ifadelerini etkilediği belirtilmiştir (Björn ve ark., 2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hemodiyaliz (HD) programına giren hastalarda kan-membran etkileşimine bağlı olarak oksidatif stresin meydana geldiği ve bunun sonucunda genomik DNA hasarının olduğu gösterilmiştir. DNA hasarına maruz kalan hücrenin, hasarın boyutuna ve DNA tamir kapasitesine bağlı olarak apoptotik sürece girme olasılığı vardır. Hemodiyaliz sürecinin apoptoza yol açtığı ve apoptotik/antiapoptotik genlerin ekspresyonlarını değiştirdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak HD tedavi sürecinde, DNA tamir gen ekspresyonlarının ne şekilde etkilendiği ile ilişkin herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Hasara karşı yanıtta DNA tamir mekanizmasının rolünün anlaşılması ve aydınlatılması bu alanda daha başarılı tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için gereklidir. Biz de HD tedavisi gören kronik böbrek hastalarında BER mekanizmasında görevli PARP1 ve XRCC1 molekülerinin hem gen hem de protein düzeyinde ekspresyonlarını inceleyeceğiz. Elde edeceğimiz bulgular, HD tedavisi sürecinde DNA tamir mekanizmasının rolünün ve apoptoz ile DNA tamir süreci arasındaki etkileşimin ortaya çıkartılmasına katkı sağlayacağını umut etmekteyiz.

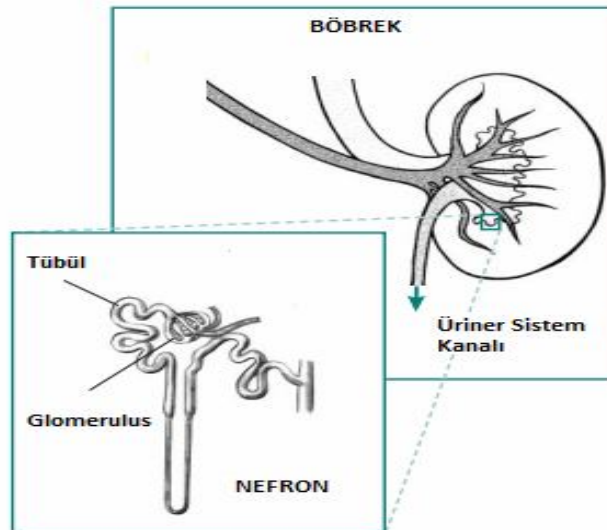
2. GENEL BİLGİLER

2.1. BÖBREK

Böbrekler periton arkası bölgede alt torasik ve üst lomber vertebralar seviyesinde yerleşmiş fasülye biçiminde organlardır. Erişkin bir insanda böbrek ortalama 120-170 gr ağırlığında ve 12x6x3 cm boyutlarındadır (Chatoth 2002).

Böbreğin temel görevi, aorttan dallanan böbrek arterlerinden gelen kan süzmektir. Dakikada kalp debisinin % 20 si kadarını alır ve dakikada kanın 1.25 litresi kadarını süzer. Vücutta bulunan tüm kan her 5 dakikada bir böbrekten geçer. 24 saatte 180 litre ultrafiltrat sıvısı üretilir ve idrar taşıyıcı tübüllerin içinden geçer. Bu miktarın 178,5 litresi tübül hücrelerce tekrar alınıp, kan dolaşımına geri dönerken, sadece 1,5 litresi idrar olarak atılır (Abraham 2006).

Histolojik olarak böbrek nefron adı verilen temel birimlerden oluşur. Her böbrekte yaklaşık 1 milyon nefron bulunur. Nefronun iki bileşeni vardır. Bunlar süzme işlevi gören kapiller ağ ve buna bağlı bir tübüldür. Tübül birkaç farklı anatomik ve işlevsel segmentten oluşur. Bunlar proksimal tübül, Henle kulbu ve distal tübüldür. Tübül toplayıcı kanallara boşalır (Schmidt, 1983).



Şekil 1 : Böbrek ve nefron yapısı (NIH, 2008)

2.2. BÖBREK YETMEZLİĞİ

Böbreğin temel fonksiyonları; vücut sıvı ve elektrolit dengesinin korunması, metabolik artık ürünlerin atılımı, ilaçlar, toksinler ve metabolitlerinin detoksifikasyonu ve atılımı, ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi, hormon üretimi, peptit hormonlarının ve küçük molekül ağırlıklı proteinlerin yıkımıdır. Böbreklerin bu fonksiyonları yerine getirememesine “böbrek yetmezliği” denir.

Böbreklerin fonksiyonel kapasitelerinin belirlenmesi için özellikli ölçüt glomerüler filtrasyon hızıdır (GFH). GFH, her iki böbrekte bir dakikada süzülen kan (filtrat) miktarıdır. Normal şartlar altında sağlıklı bir böbreğin GFH değeri 125 ml/dk/1.73 m²’ dir (Köse, 2009). Böbrek fonksiyonlarının bozulmasıyla bu değer giderek azalır. GFH’nin normal değerleri yaş, cinsiyet ve vücut boyutuna bağlı olarak değişir, dolayısıyla GFH’nin değeri normal sağlıklı bireyler arasında bile önemli derecede değişkenlik gösterebilir (Stevens ve ark. 2005).

Böbrek yetmezliği, akut (ani) veya kronik (sinsi) seyirli olmak üzere iki şekilde gelişebilir (Akyol, 2000; Avcı, 2008).

2.2.1. AKUT BÖBREK YETMEZLİĞİ

Akut böbrek yetmezliği (ABY) saatler, günler ya da haftalar içerisinde gelişen, GFH’deki azalma sonucu böbreğin fonksiyonlarında görülen hızlı kaybın oluşturduğu bir klinik tablodur (Doherty, 2005; Lameire, 2007). ABY, GFH'deki azalma ile tanımlansa da, tübüler ve/veya dolaşım sorunlarına bağlı olarak gelişebilir. ABY birçok olguda tek organ yetmezliği şeklinde değil, çoklu organ fonksiyon bozukluğu ile birlikte gelişmektedir ve tipik olarak iskemi, akut glomerülonefrit ve nefrotoksinlerle meydana gelen tübüler nekroz nedeniyle gelişir. Bu tabloda hasar çok şiddetli değilse böbrek fonksiyonları normale dönebilir (Bronzino, 1995).

2.2.2. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) GFH’de azalmanın sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik, ilerleyici ve tüm organları etkileyen, çok çeşitli metabolik bozukluklara neden olan bir klinik tablodur. KBY, nefronların ilerleyici kaybı sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu süreçte homeostazın sağlanması için fonksiyonel nefronlarda değişiklikler meydana gelmektedir. Fakat bir süre sonra nefronlardaki bu değişimler yetersiz kalmakta ve son dönem böbrek

yetmezliği (SDBY) ortaya çıkmaktadır (Akar, 2010). SDBY, hayati fonksiyonların devam ettirilebilmesi için renal replasman tedavilerinin (RRT) gerekli olduğu klinik bir tablodur (K/DOQI, 2002).

Böbrek hastalığının erken evreleri klinik olarak sessizdir ve GFH direkt olarak ölçülemez. Böyle durumlarda böbrek yetmezliği tanısında kreatin düzeyine bakılır. Kreatin fosfatın yıkım ürünü olan kreatinin normal kan değerleri 70-120 $\mu\text{mol/L}$ olup, bu değerin 120 $\mu\text{mol/L}$ 'yi geçmesi böbrek fonksiyonlarında yetersizlik olduğunu gösterir.

2.2.2.1. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ ETİYOLOJİSİ ve EPİDEMİYOLOJİSİ

KBY'ne sebep olan birçok neden vardır. Prerenal nedenler; dehidratasyon, hemoraji, sepsis, hipoalbuminemi, kalp yetersizliğidir. Renal nedenler; diyabet, hipertansiyon, kronik glomerülonefritler, amiloidoz, kistik hastalıklar ve kronik tubulo-interstisyel nefritleri kapsayan böbreğin kendine özgü hastalıklarıdır. Postrenal nedenler ise, toplayıcı sistemdeki bozukluklardır ve uzun süreli üriner sistem tıkanmalarını kapsamaktadır. Türk Nefroloji Derneği-2012 raporuna göre ülkemizde hemodiyaliz (HD) hastalarında diyabet ve hipertansiyon etiyolojik nedenleri arasında ilk iki sırayı almıştır (Türk Nefroloji Derneği, 2012) (Tablo-1).

Hastalık	H.Yüzdesi(%)
Diyabet	37
Hipertansiyon	27
Glomerülonefrit	7
Polikistik böbrek hastalığı	4
Pyelonefrit	3
Amiloidoz	2
Renalvasküler hastalık	1
Nedeni bilinmeyen	11
Diğer nedenler	8

Tablo 1: Türkiye’de RTT gerektiren SDBY nedenleri ve dağılımı (Türk Nefroloji Derneği - 2012 raporu).

Türkiye yapılan KBY prevalans araştırması verilerine göre, genel toplumda %15,7, kadınlarda %18,4, erkeklerde %12,8’dir (Süleymanlar ve ark., 2011). Türk Nefroloji Derneği 2012 yılı raporuna göre, ülkemizde Aralık 2012 itibariyle 48900 HD, 4777 peritonel diyaliz (PD) uygulanan ve 8000 fonksiyonel greft ile izlenen renal transplantasyon yapılmış toplam 61677 SDBY hastası bulunmaktadır (Türk Nefroloji Derneği, 2012).

Amerika Birleşik Devletleri Böbrek Veri Sistemi “United States Renal Data System” (USRDS) verilerine göre 2010 Aralık ayı itibari ile RRT’si gören SDBY sayısı 39392’si HD uygulanan, 29733’ü PD uygulanan, 179361 ‘i fonksiyonel greft ile izlenen renal transplantasyon yapılmış olmak üzere 593086 kişiyi bulmuştur (USRDS, 2012).

2.2.2.2. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ PATOGENEZİ

Klinik açıdan KBY, asemptomatik olarak seyreden, böbrek fonksiyonu azalmasından üremik sendroma kadar uzanan geniş bir spektruma sahiptir. Hastalığın evreleri arasında kesin sınırlar yoktur. Fakat böbreklerin fonksiyonel değişiklik

derecelerine göre klinik açıdan bir sınıflandırma yapılmaktadır. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) kılavuzu 2013'e göre KBY, GFH değerleri temel alınarak 5 evreye ayrılmıştır (Tablo-2).

Evre	Tanım	GFH (ml/dak/1.73m ²)
1	Normal veya artmış GFH'li böbrek hasarı	≥ 90
2	Hafif azalmış GFH'li böbrek hasarı	60-89
3a	Hafif-orta azalmış GFH'li böbrek hasarı	45-59
3b	Orta-ciddi azalmış GFH'li böbrek hasarı	30-44
4	Ciddi azalmış GFH'li böbrek hasarı	15-29
5	Böbrek yetmezliği (SDBY)	< 15

Tablo 2: Kronik böbrek yetmezliği evreleri.

2.2.2.3. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİNİN KLİNİK ÖZELLİKLERİ

Hastaların klinik semptomları, böbrek yetmezliğinin derecesi ve gelişme hızı ile oldukça ilişkilidir. GFH değeri 35-50 ml/dk olana kadar hastalarda semptom görülmebilir. GFH değeri 20-25 ml/dk olduğunda hastalarda üremik semptomlar ortaya çıkar. GFH değeri 15 ml/dk olduğunda SDBY'den bahsedilir ve hastaya RRT'lerden biri uygulanır (Akpolat ve ark., 2007). KBY durumunda, sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesi bozulur, protein yıkım ürünlerinin miktarı kanda artar. Bu bozukluklarda tüm sistemleri etkiler. KBY belirti ve bulguları şöyledir (Yılmaz, 2013).

- Sıvı elektrolit bozuklukları: Hipervolemi, hipovolemi, hipernatremi, hiponatremi, hipokalsemi, hiperpotasemi, hipopotasemi, hiperfosfatemi, metabolik asidoz, hipermagnezemi.
- Kardiyovasküler sistem: Hipertansiyon, ödem, perikardit, kardiyomiyopati, hızlanmış ateroskleroz, aritmi.
- İskelet sistemi: Üremik kemik hastalığı, hiperparatiroidi, amiloidoz, D vitamini metabolizması bozuklukları, artrit.
- Hematolojik sistem: Normokrom normositer anemi, lenfopeni, kanamaya eğilimin artması, eritrosit fragilitesinde artış, infeksiyonlara yatkınlık, immün hastalıkların yatışması, alüminyuma bağlı mikrositik anemi, aşıyla sağlanan immünitede azalma, tüberkülin gibi tanısal testlerde bozulma, kanser gelişimi.
- Pulmoner sistem: Plevral sıvı, üremik akciğer, pulmoner ödem.
- Endokrin sistem: Glukoz intoleransı, hiperparatiroidi, hiperlipidemi, büyüme geriliği, hipogonadizm, impotans, hiperprolaktinemi.
- Sinir sistemi: Stupor, koma, konuşma bozuklukları, uyku bozuklukları, demans, konvülsiyon, polinöropati, başağrısı, sersemlik, gerginlik, kramp, konsantrasyon bozuklukları, yorgunluk, meningizm, huzursuz bacak sendromu, tik, tremor, istem dışı kas kasılması, ter fonksiyonlarında bozulma, ruhsal bozukluklar.
- Gastrointestinal sistem: İştahsızlık, bulantı, kusma, gastrit, stomatit, pankreatit, ülser, gastrointestinal kanama, kronik hepatit, motilite bozuklukları, özafajit, intestinal obstrüksiyon, asit.
- Cilt: Solukluk, kaşıntı, gecikmiş yara iyileşmesi, tırnak atrofisi, hiperpigmentasyon, üremik döküntü, ülserasyon, nekroz.

2.2.2.4. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ PROGRESYONUNDA ETKİLİ FAKTÖRLER

Değiştirilebilen Faktörler	Değiştirilemeyen Faktörler
Diabetes mellitus	Yaş
Proteinüri	Cinsiyet
Hipertansiyon	İrk
Obezite	Genetik
Dislipidemi	
Sigara	

KBY’nde hastalığın progresyonunda bazı değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri bulunmaktadır (Tablo-3).

Tablo 3: KBY’de hastalığın progresyonunu etkileyen risk faktörler (Taal ve ark.,2008).

Hastalığın progresyonunda yaş önemli bir risk faktörüdür. Yaşı ilerlemiş hastalarda renal hasarla beraber, GFR düşüşü daha hızlı olmaktadır. Yapılan bir çalışmayla, KBY’li olmayan bireylerde yaşla birlikte GFR’de düşüşün gözlemlenmesi, nefron kaybının normal bir yaşlanmanın parçası olduğunu düşünülmüştür (Eriksen ve ark.,2006). Cinsiyetin, KBY gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir risk faktörü olduğu saptanmıştır. USRDS’nin yayınladığı yıllık veri raporuna göre SDBY’nin kadınlara oranla erkeklerde daha sık görüldüğü bildirilmiştir. KBY ile ilgili yapılan birçok çalışmada, hastalığın progresyonunun kadınlarda erkeklere kıyasla daha yavaş olduğu gösterilmiştir (Foley ve ark.,2007). Amerika Birleşik Devletleri’nde, KBY progresyonunun Afrika kökenli Amerikalılarda beyaz ırka göre daha hızlı olduğu bildirilmiştir. Bunun ırk ve genetik faktörlerin yanında, yaşam tarzı, tuz tüketimi, hipertansiyon, çevresel ve sosyoekonomik farklılıklarında etkili olduğu düşünülmektedir (Tarver-Carr ve ark.,2002). Bilimsel çalışmaların artması ile beraber, KBY’den sorumlu aday genlerin ortaya çıkarılması beklenilmektedir. Yapılan

çalışmalar KBY ve SDBY’de genetik faktörlerin önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. Renal skar gelişiminden sorumlu bazı genlere ait polimorfizmlerin KBY progresyonunda sorumlu görülmektedir (Bello ve ark.,2010).

Diabetes mellitus değiştirilebilir risk faktörleri arasında gösterilmektedir. Tip I ve tip II diyabetli hastalarda, sıkı kan şekeri kontrolünün diyabetik nefropati gibi diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının ilerlemesini yavaşlattığına dair çalışmalar mevcuttur. Birçok çalışmada, diyabetik ve non-diyabetik glomeruler hastalıkta veya non-glomeruler böbrek hastalığında, ağır proteinürinin progresyonu hızlandırdığı gösterilmiştir (Jafar ve ark.,2001). Sistemik hipertansiyonun glomerüler kapiller yatağa iletiminin, glomeruler hipertansiyona ve glomerulosklerozun progresyonuna neden olduğuna inanılmaktadır (Bello ve ark.,2010).Sigara kullanımının, albuminüri düzeyinde ve KBY progresyonunda artışa neden olduğu bildirilmektedir. Sigaranın böbrek hasarına yol açmasının muhtemel mekanizmaları; hipertansiyon, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, endotel hasarı ve potansiyel olarak direkt tübüler toksisitesidir (Orth ve ark.,2008). Dislipidemi ve obezitenin KBY progresyonunu hızlandıran ve katkı sağlayan bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir.

2.2.2.5. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİNİN TEDAVİ YÖNTEMLERİ

KBY görülen hastalarda, böbrek fonksiyonlarının giderek azalmasının sonucu olarak fizyolojik denge sağlanmaz hale gelir ve ağır bir klinik tablo ortaya çıkar (Ülkü, 1996). SDBY evresine gelinmesiyle, hastalığın erken evrelerinde uygulanan konservatif tedaviler yetersiz kalır. Bu nedenle SDBY evresinde hastalara RRT uygulanması gerekir. RRT’ler; hemodiyaliz, peritonal diyaliz ve renal transplantasyondur (Selçuk, 1999).

2.3. DİYALİZ

Diyaliz, bir A solüsyonunun solüt içeriğinin yarı geçirgen bir membran aracılığıyla B solüsyonu ile karşılaştırarak değiştiren düzenektir. Her iki solüsyonda da bulunan su molekülleri ile düşük molekül ağırlıklı solütler, yarı geçirgen membranın porlarından geçebilirken, protein vb. büyük moleküller membrandan geçemezler ve

membranın her iki tarafında kalarak başlangıç konsantrasyonlarını sabit tutarlar. Diyaliz düzeneğinde: A solüsyonu yüksek konsantrasyonda zararlı artık maddeler taşıyan kan; B solüsyonu ise özel diyaliz sıvısı olan diyalizattan meydana gelir (Köse, 2009).

Diyaliz tedavisiyle, su-elektrolit dengesinin sağlanması, vücutta biriken toksinlerin atılması, hastanın genel durumunun düzeltilmesi ve yaşam kalitesinin artırılması ve transplantasyona hazırlanması amaçlanır. Bununla beraber diyaliz, bir böbreğin normal fonksiyonun sadece % 5'i sağlayabilir (Stein ve ark., 2003).

2.3.1. HEMODİYALİZ

Arteriyo-venöz fistül, greft veya katater yardımı ile hastadan alınan kanın (300-450 ml/dk) antikoagülasyon ile vücut dışında, bir cihaz yardımıyla yarı geçirgen bir membrandan geçirilerek, sıvı-solüt içeriğinin yeniden düzenlenerek hastaya geri verilmesi işlemidir (Akoğlu ve ark., 2000). George Hass 1924 yılında üremik bir kişide ilk klinik diyalizi uygulamıştır. 1964 yılında Williem Koff ABY tedavisini uygulanmaya başlamış ve başarılı olmuştur (Kolf ve ark., 1997).

HD işleminin uygulanabilmesi için yeterli kan akımının sağlanması gerekmektedir. Kan akımı erişkinlerde dakikada 200-600 ml olması gerekmektedir. HD işleminin uygulanabilmesi için birtakım araç ve gereçlere ihtiyaç vardır.

- Diyalizör: HD işleminin yapılabilmesi için 1-2 m² genişliğindeki bir diyaliz membranı parçasının steril, kan akımına uygun, az yer kaplayacak ve pratik kullanımlı gereçlere denir. Diyalizde kullanılan bu membranlar kuprofan, selüloz asetat gibi selüloz türevleri ve poliakrilonitril ve polisülfon gibi sentetik polimerlerden oluşur.
- Diyaliz solüsyonu: Büyük oranda saflaştırılmış su ve buna eklenmiş sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum klorür, bikarbonat ve dekstrozdur. Diyaliz solüsyonları içerdikleri tampon maddeye göre asetat ve bikarbonat olarak ikiye ayrılırlar. Bikarbonat diyalizi daha fizyolojik olduğundan günümüzde tercih edilmektedir (Daurgidas ve ark., 2003).

- Kan ve diyaliz solüsyonunun taşınması için setler: HD ile solüt klirensi ve su atılımı difüzyon, ultrafiltrasyon ve konveksiyonla sağlanır.
- Diyaliz cihazı

Diyaliz membranının (diyalizör) kapilleri içinde hastanın kanı, kapiller arasında ise makine tarafından hazırlanmış diyalizat yer alır. Damar giriş yolundan alınan kan, yarı sentetik membranın çok sayıdaki kapillerlerine pompalanırken eş zamanlı olarak, kan akımına ters yönde, sodyum klorür, asetat veya bikarbonat ile değişken konsantrasyondaki potasyum içeren diyalizat diyalizöre verilir. Membrandaki difüzyon hareketiyle üre gibi küçük molekül ağırlıklı maddeler konsantrasyon gradiyentine bağlı olarak kandan diyalizat tarafına hareket eder. Su ve sodyum klorür fazlalığı, membran boyunca oluşan hidrostatik basınca bağlı olarak ultrafiltrasyonla uzaklaştırılır. Haftada 3 defa, 4'er saatlik HD uygulaması hastalar için yeterli olmaktadır (Bozfakıoğlu, 1997; Stein ve ark., 2002).

2.3.1.1. HEMODİYALİZİN ÖNE ÇIKAN YÖNLERİ

HD tedavisinin diğer tedavilere göre avantajları;

- Yüksek çözünen klirensi aralıklı tedaviye olanak sağlar.
- Diyalizin yeterlilik değişkenleri iyi tanımlanmıştır, dolayısıyla yetersiz diyaliz erken saptanabilir.
- Teknik başarısızlık düzeyi düşüktür.
- Aralıklı heparinizasyon gerekmesine rağmen hemostaz değişkenleri hemodiyalizde peritonel diyalize oranla daha iyi düzeltilir.
- Merkezi hemodiyaliz hastanın daha yakından gözlenmesini sağlar.
- Hastanın tedavisinin haftada 2-3 kez 4-6 saat sürmesi, diğer zamanlarda serbesttir.
- Karın bölgesi ile ilgili komplikasyon görülmez.

- Hastanede yatma durumunu ortadan kaldırılmıştır.

HD tedavisinin diğer tedavilere göre dezavantajları;

- Hemodiyaliz merkezine her hafta birden çok ziyaret gerektirir.
- Denge kaybı, diyalize bağlı tansiyon düşüklüğü ve kas krampları yaygındır. Hastanın hemodiyalize alışması aylar gerektirebilir.
- HD hastalarında kompleman-aktiviteli membranların kullanılması nedeniyle infeksiyonlar görülür.
- Damar yolu erişimi sık sık infeksiyon ve tromboz ile ilişkilendirilir.
- Rezidüel böbrek fonksiyon düşüşü periton diyalizine kıyasla daha hızlı ve anidir.
- Özel yetişmiş personel gereksinimi vardır.

HEMODİYALİZ KOMPLİKASYONLARI

HD tedavisi nispeten güvenli bir yöntem olmakla birlikte, korporeal dolaşıma bağlı yan etkiler, teknik sorunlar ve hastalara bağlı anormal reaksiyonlar ortaya çıkabilir (Erkoç, 2003).

Hemodiyalizde Akut Komplikasyonlar:

1.Hemodiyalizde en sık görülen nispeten az tehlikeli komplikasyonlar: Hipotansiyon, kas krampları, bulantı, kusma, baş ağrısı, göğüs ve sırt ağrıları, ateş, titreme ve antikoagülasyona bağlı komplikasyonlar gelişebilmektedir.

2.Hemodiyalizde az görülen fakat ciddi komplikasyonlar: Aritmiler, kalp tamponatı, dengesizlik sendromu, intrakranial kanamalar, aşırı duyarlılık reaksiyonları, konvülsiyonlar, hemoliz, emboli, kalp durması (kardiyopulmoner arrest).

Hemodiyalizde Kronik Komplikasyonlar

1.Hemodiyalizin kronik komplikasyonları: Yetersiz beslenmeye bağlı olarak anemi, asetat birikimi, alüminyum toksisitesi gelişebilmektedir.

2.Kardiyovasküler sistem komplikasyonları: Sistemik kalp hastalığı, kalp yetmezliği, perikardit.

3.Hematolojik komplikasyonlar: Anemi, lökopeni, kanama diatezi, enfeksiyona eğilim.

4.İskelet sistemi komplikasyonları: Üremi kemik hastalığı.

5.Gastrointestinal komplikasyonlar: Gastroenteritis, konstipasyon, karaciğer hastalıkları.

6.Dermatolojik komplikasyonlar: Üremik kaşıntı ve damarlardaki kalsifikasyonlara bağlı gelişen cilt nekrozları.

7.Metabolik ve endokrin komplikasyonları: Hiperlipidemi, endokrin anomalileri, infertilite ve seksüel fonksiyon bozuklukları.

8.Nörolojik komplikasyonlar: Alüminyum intoksikasyonu, üremik periferik nefropati.

9.Diğer kronik komplikasyonlar: Enfeksiyonlar, fistül komplikasyonları.

10.Diyaliz amiloidozu ve psikososyal sorunlar.

2.4. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres (OS), reaktif oksijen oluşum düzeyi ile antioksidatif mekanizma kapasitesi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır (Hasselwander ve ark., 1998). Fizyolojik şartlarda insan vücudunda bu radikallerin üretimi ve antioksidan savunma denge halindedir. İn vivo koşullarda, reaktif oksijen türleri (ROT) olarak, hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$), süperoksit ($O_2^{\bullet-}$), hidroksil radikal ($OH^{\bullet}$) ve nitrik oksit (NO) sürekli olarak oluşmaktadır (Halliwell, 1993). ROT'lar hücre içi ve hücre dışı antioksidan savunma mekanizmaları ile detoksifiye edilmek suretiyle oksidatif stres dengede tutulmaya çalışılmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), nitrikoksit sentetaz (NOS) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerin düzeylerinin azalması gibi antioksidan defansın azalması ya da yoğun ROT üretimi, bu

dengeinin bozulmasına ve OS'e neden olmaktadır (Halliwell ve ark., 1996 Yıldız ve ark., 2002 Hwang ve ark., 2007).

2.5. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

ROT'lar veya serbest radikaller; dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron (e^-) bulundurlar. Eksik elektronlu bu moleküller oldukça reaktif ve kararsızdırlar (Akkuş, 1998). Bulabilecekleri herhangi bir molekül ile etkileşime girerek bu molekülle elektron alışverişi yaparlar ve molekülün yapısını bozarlar. Böyle moleküllere “serbest radikaller” ya da “oksidan moleküller” adı verilir. Bu moleküller diyet, ilaçlar, radyasyon, sigara ve hava kirliliği gibi çevresel kaynaklı olabileceği gibi, mitokondriyal metabolizma ve normal hücrel fonksiyonlar sırasında da meydana gelmektedir (Kılınç ve ark., 2002). Bu ROT'ları sıralayacak olursak;

- **Süperoksit radikali:** Moleküler oksijenin indirgenmesinde bir ara basamaktır ve oluştuğu yerden uzağa yayılmaz. Mitokondride elektron taşıma sisteminin çalışması esnasında süperoksit radikali meydana gelir. Savunma mekanizmasında da görevli olan bu molekül lökositelerde bolca üretilerek antibakteriyel etki gösterir.
- **Hidrojen peroksit:** H_2O_2 , oksijenin indirgenmesi ya da süperoksilerin enzimatik ya da non enzimatik dismutasyon tepkimeleri sonucu oluşur. Net yük taşımaz ve biyolojik zarlardan kolayca geçebilir. Lipit peroksidasyonu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Potansiyel oksitleyici özellikleri nedeniyle ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (Kılınç, 2002).
- **Hidroksil radikali:** Son derece reaktif bir oksidan radikali olup yarılanma ömrü çok kısadır. Bu radikal, ROT'ların en güçlüsüdür.

- **Singlet oksijen:** Ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına sebep olur.

Serbest radikal molekülleri, belirli düzeyde kaldıkları sürece organizmanın yabancı maddelere ve enfeksiyon ajanlarına karşı savunmasında rol alırlar. Ancak bu moleküller belirli düzeyin üzerinde çıkarsa veya antioksidan savunma sistemi yetersiz kalırsa hücrenin temel bileşenleri olan protein, lipid, karbonhidrat, nükleik asit ve enzimlerin yapısı bozabilir (Peskin, 1997).

2.5.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ETKİLERİ

ROT'lar kararsız yapıları ve çok reaktif olma özellikleriyle hücre bileşenlerinde hasara neden olurlar (Tablo-4). Hücrelerde sadece yapısal hasara neden olmamakta, hücre fonksiyonlarını bozarak hücreyi nekroz ya da apoptoza sürüklemektedir (Valdez ve ark., 2000 Dalle-Done ve ark., 2006).

Hedef Molekül	Molekülde Oluşan Modifikasyonlar
Doymamış yağlar	*Kolestrol ve yağ asitlerinde oksidasyon
	*Lipidlerde çapraz bağlanmalar
	*Organel ve hücrelerde çapraz bağlanmalar
Karbonhidratlar	*Polisakkaritlerin depolimerizasyonu
Nükleik asit bazları	*Hidroksilasyonlar
	*Mutasyonlar, kimyasal modifikasyonlar
Kükürtlü aminoasitler	*Protein denatürasyonu
	*Enzimlerde inhibisyon
	*Peptid zincirlerinde kopma
Proteinler	*Denatürasyon
	*Proteinlerde çapraz bağlar
Nükleik asitler	*Tek ve çift iplikçik kırılmaları
	*Baz içermeyen bölgeler
Hiyalüronik asit	*Sinovyal sıvı akışkanlığında değişme

Tablo 4: ROT'ların hücrede başlıca hedefleri ve yaptıkları hasarlar

ROT'ların sebep olduğu hücre ve doku hasarı birçok akut ve kronik hastalığın patogenezinin sorumlu olduğu bilinmektedir. Kronik böbrek yetmezliği, ateroskleroz, diyabet, romatoid artrit, myokard infarktüsü, astım, multipl skleroz, Parkinson hastalığı örnek olarak verilebilir (Gutteridge, 1995 Valko ve ark.,2006).

2.5.2. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN KAYNAKLARI

Organizmada ROT, normal metabolik süreçlerle meydana gelebildiği gibi radyasyon vb. dış nedenlerle de oluşabilmektedir.

1. Endojen Kaynaklar

Hücrel reaksiyonlar sırasında eser miktarda ROT meydana gelmesi fizyolojik bir durumdur ve bunların oluşması kaçınılmazdır. Başlıca endojen kaynakları;

- *ETZ'de meydana gelen elektron kaçıışı:* Mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleer membrandaki elektron taşıma sisteminde, oksijenli solunum sırasında oluşan elektron sızıntıları başlıca ROT kaynağıdır (Çavdar ve ark., 1997 Gilbert ve ark., 1999).
- *Peroksizom enzimleri:* Peroksizomda çeşitli oksidaz enzimleri süperoksit radikali üretmeden fazla miktarda H_2O_2 (hidrojen peroksit) üretebilirler (Gilbert ve ark., 1999).
- *Enzimler ve proteinler:* Enzimlerin katalitik döngüleri esnasında ROT'lar meydana gelmektedir. Triptofan dioksijenaz, ksantin oksidaz ve aldehit oksidaz süper oksit radikali oluşumuna neden olurlar (Halliwell ve ark., 1984 Sies, 1997).
- *Aktive fagositler ve makrofajlar:* İnfeksiyon durumunda, lökotrienler, prostaglandinler gibi mediyatörler, özellikle patojenler nötrofil, eosinofil ve makrofajları aktive ederler. Bu hücreler de NADPH oksidaz enzimi aracılığıyla ROT oluşumuna neden olurlar (Çavdar ve ark., 1997 Gilbert ve ark., 1999).
- *Plazma membranı:* Plazma membranı üzerinde bulunan lipoksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri ROT üretimine neden olur (Çavdar ve ark., 1997 Gilbert ve ark., 1999).
- *Küçük moleküllerin oto-oksidasyonu:* Nötral ortamda tüyoller, hidrokinonlar, kateolaminler ve flavinler gibi çok sayıda bileşiğin oto-oksidasyonu ile ROT'lar meydana gelir (Gilbert ve ark., 1999).

- *Yaşlanma süreci*: ROT düzeyi yaşlanma ile paralel olarak artış gösterir (Çavdar ve ark., 1997 Miyata ve ark., 2001)

2. Ekzojen Kaynaklar

Yabancı toksik maddeler, çevresel faktörler, stres, anti-neoplastik ajanlar ve glutasyonu okside edici ajanlar başlıca ekzojen kaynaklarıdır. Çevresel faktörler arasında iyonize radyasyon, hava kirliliği, sigara, böcek ilaçları ve metaller yer alır (Halliwell ve ark., 1987 Gilbert ve ark., 1999). ROT üretimine bu etkenler direkt olarak neden olabilir ve antioksidan aktiviteyi azaltarak ROT'ların ortadan kaldırılmasına engelleyebilirler.

2.6. KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ VE OKSİDATİF STRES

KBY hastalarında artmış oksidatif stresin nedenleri; nötrofil ve kompleman aktivasyonu, aşırı demir yükü, glikolizasyon son ürünlerindeki artış, hidrosoluble antioksidanların diyaliz ile uzaklaştırılması homosistein düzeyindeki artış, NO (azot monoksit) indüksiyonunu takip eden peroksinitrit formasyonu ve malnütrisyondur kendisidir (Caimi ve ark., 2005). Oksidatif mekanizmalar ile inflamatuvar mekanizmalar karşılıklı ilişki içerisindedir. IL-6, C-Reaktif Protein (CRP) sentezini regüle eder. Yapılan birçok çalışmada prediyaliz dönemde, hemodiyaliz ve peritonel diyaliz uygulanan hastalarda CRP düzeylerinin normal popülasyona göre artış gösterdiği belirtilmiştir (Borazan ve ark., 2004).

2.6.1. .DİYALİZ MEMBRANIN ETKİLERİ

İnflamatuvar hastalıklarda, nötrofillerce aşırı miktarda üretilen ROT doku hasarına sebep olur (Weis, 1989). HD sırasında kullanılan membranlar ve diyalizat sıvıları polimorf nükleer lenfositleri uyarak solunum patlamasına neden olmaktadır. Bu aşamada görev alan NADPH oksidaz, SOD, NOS ve myeloperoksidaz (MPO) gibi enzimler; H₂O₂, hidroklorik asit (HCL), nitrit oksit (NO₂) ve süper oksit anyonu ($\cdot$ O₂-) gibi reaktif ürünlerin ortaya çıkmasına yol açar.

Diyaliz membranları ve kontamine diyalizat sıvıları, proinflatuar sitokin yapımını uyararak proinflatuar ortam oluşmasına sebep olabilir (Arici ve ark., 2001). Sitokinlerin uyarısı ile aktive olan polimorfnükleer lenfositlerden kaynaklanan ROT, sitokinlerin transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör $\kappa\beta$ 'yi (NF- $\kappa\beta$) aktive ederek, sitokinler ve ROT arasında kısır bir döngünün oluşmasına yol açar. Ayrıca, diyaliz sırasında, diyalizatların alternatif yol ile kompleman aktivasyonuna yol açtığı, muhtemelen kompleman moleküllerinin diyaliz membranına bağlanarak, granüositler için biyokaktif bir yüzey oluşturduğu düşünülmektedir.

HD tedavisi ile üremik toksinler uzaklaşırken, aynı zamanda antioksidan savunma sisteminde görev alan enzimelerin eser elementleri (Georgeus ve ark., 1989), vitamin C ve vitamin E gibi maddeler diyalizat sıvısına geçerek oksidan hasarın artmasına sebep olur (Clermont ve ark., 2000 Chao ve ark., 2002).Yapılan çalışmalarda KBY'de var olan renal parankimal hasar ve HD tedavisi ile ilgili olarak antioksidan kapasitenin azaldığı ve ROT seviyesinin arttığı gözlemlenmiştir (Matkwoics ve ark., 1988 Schmidtmann ve ark., 1991).

2.7. OKSİDATİF STRES VE DNA HASARI

KBY'deki oksidatif stres hücresel biyomoleküllere zarar verir. DNA'da da OS sonucu hasarlar meydana gelmektedir. ROT'lar, DNA sarmalında baz ve şekerlerde lezyonlara, tek ve çift zincir DNA kırıklarına, abazik bölgelere, DNA-protein çapraz bağlanmaları gibi birçok modifikasyonlara sebep olmaktadır. DNA'da ROT'lar tarafından oluşturulan oksidatif hasar, kanser, yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar; immün sistem hastalıkları, dejeneratif hastalık ve diyabet gibi birçok hastalığın başlıca nedeni ve göstergesidir (Yokuş, 2002).

Yapılan çalışmalarda da KBY'nde farklı hasar tipleriyle çalışmalar yapılmıştır. KBY hastalarında Comet Assay yöntemi ile DNA hasarı bakılmış, hemodiyaliz öncesi ve sonrası dna hasarı sağlıklı kontrol grubuna kıyasla daha yüksek seviyede bulunmuştur (Corredor, 2014). Bir başka çalışmada KBY hastalarında mikronükleus miktarı incelenmiş, KBY hastalarında mikronükleus miktarı sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Rasgel-Lopaez, 2013). Diğer bir çalışmada hiç diyaliz görmemiş KBY hastalarında diyaliz sıklığının DNA hasarına etkisi incelenmiş; serum ve ürede bakılan 8-OhdG seviyesi 3 günden fazla diyalize giren hastalarda, 3 günden az diyalize giren hastalara kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Dinçer, 2008).

ROT'lar DNA'da 20'den fazla oksidatif baz hasarının oluşmasına yol açar (Dizdaroğlu, 1999). Pirimidin bazlarındaki en yaygın hasar; timin glikol formasyonu, pürin bazlarında en sık gözlenen DNA hasarı ise 8-OHdG'dir. ROT üretiminin artmasına sebep olan tüm etkenler, 8-OHdG oluşumuna yani oksidatif DNA hasarına katkıda bulunur. 8-OHdG; ilk kez 1984 yılında Kasai ve Nishimura tarafından tespit edilmiştir. 8-OHdG oldukça duyarlı ve en sık kullanılan oksidatif DNA hasarı belirteçidir.

Oksidatif stresin DNA' da yol açtığı hasarlar DNA tamir mekanizmaları ile onarılırken, onarılamayacak türdeki ağır DNA hasarlarında hücre apoptotik yolu seçer. Genetik materyalin bütünlüğünün sağlanabilmesi için bu mekanizmalar şarttır (Demokan ve ark.,2006).

2.8. DNA ONARIM MEKANİZMALARI

DNA hasarları, endojen ve eksojen kaynaklı olup DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilir (Kuper ve ark., 2013). Bu mekanizmaları başlıca dört gruba ayırabilir;

1.Direkt onarımı

- Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu
- Fotoreaktivasyon
- O-6 metilguanin onarımı

2.Nükleotitlerin kesilip çıkarılma onarımı

- Bazların kesilip çıkarılması onarımı (BER=base excision repair)
- Nükleotitlerin kesilip çıkarılması onarımı (NER=nucleotide excision repair)

3.DNA yanlış eşleşme tamiri (Mismatch tamir mekanizması)

4.DNA zincir kırıklarının onarımı

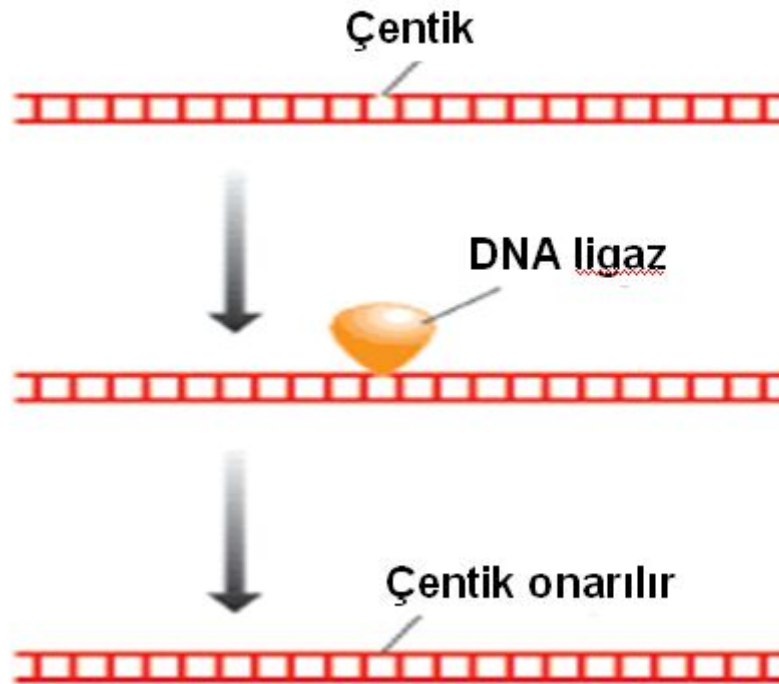
- Tek zincir DNA kırıkları
- Çift zincir DNA kırıkları
 - Serbest uç homolog olmayan bağlanması
 - Homolog rekombinasyon

2.8.1. DİREKT ONARIM

DNA'da meydana gelen hasarların bazıları, nükleotid veya baz çıkarılması yapılmadan onarılır. Direk onarım üç temel mekanizma ile gerçekleşir.

2.8.1.1. BASİT TEK ZİNCİR KIRIKLARININ LİGASYON

X-ışını ya da peroksidler gibi ajanlar DNA tek zincirinde fosfodiester bağının kırılmasına neden olabilir (Nieminuszczy ve ark., 2007). Oluşan bu kırıklar DNA ligaz enzimi ile onarılmaktadır. Enzim enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5'fosfat grubu ile 3' OH grubu arasındaki fosfodiester bağını yaparak hasarı tamir eder.



Şekil 2: Çentiğin DNA ligaz enzimi tarafından tamir edilmesi (Brown,2002).

2.8.1.2. FOTOREAKTİVASYON

Ultraviyole (UV), DNA hasar oluşumunda en önemli etkenlerden biridir. UV ışığın neden olduğu en yaygın DNA hasarı pirimidin dimerleridir. Dimerler, DNA zincir yapısında biçim bozukluklarına neden olarak, bu bölgelerde gerçekleşen DNA replikasyonunda ve transkripsiyonda duraklamaya neden olur. Pirimidin dimerlerinin tamir mekanizmalarından biri, fotoreaktivasyon mekanizmasıdır. Bu mekanizmada görev alan enzim ışık ile aktive olur ve primidin dimerlerine bağlanarak dimer onarımını gerçekleştirir. Prokaryot ve birkaç basit ökaryot canlılarda bu tip bir tamir mekanizması vardır. Örneğin E.coli’de bu işi yapan enzim DNA fotoliyazdır (Kondoh ve ark., 2011, Vass ve ark., 2012).

2.8.1.3. O-6 METİLGUANİN ONARIMI

DNA bazlarına metil veya etil gruplarını aktaran ve DNA bazlarında kimyasal değişime neden olan reaktiflerin DNA’da oluşturduğu hasarlar bu tamir mekanizma ile onarılır. Bu tip hasarlardan biri olan DNA yapısındaki O-6 metilguanin, sitozin yerine timin ile baz eşleşmesi yaparak mutasyona neden olabilir. Hasar, O-6 metilguanin metiltransferaz enziminin, O-6 metilguanindeki metil grubunu kendi merkezinde bulunan sistine aktarmasıyla onarılır. E.coli’de, timin veya guanin bazlarındaki alkilleyici grupları uzaklaştıran ‘Ada enzimi’ vardır. İnsanlarda ise O(6)-Metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) enzimi, bu mekanizmada görev alır (Nieminuszczy ve ark., 2007).

2.8.2. NÜKLEOTİDLERİN KESİLİP ÇIKARILMA ONARIMI

Nükleotidlerin onarımında temel mekanizma hasarlı DNA bölgesinin tanınmasıyla başlar ve hasarlı nükleotid veya nükleotidlerin enzimatik yollarla çıkartılmasıyla devam eder. Oluşan boşluk, hasarsız tamamlayıcı iplik kalıp olarak kullanılarak sentezlenen yeni bir DNA ipliği ile doldurulur (Cooper ve ark., 2006).

2.8.2.1. BAZLARIN KESİLİP ÇIKARILMASI ONARIMI

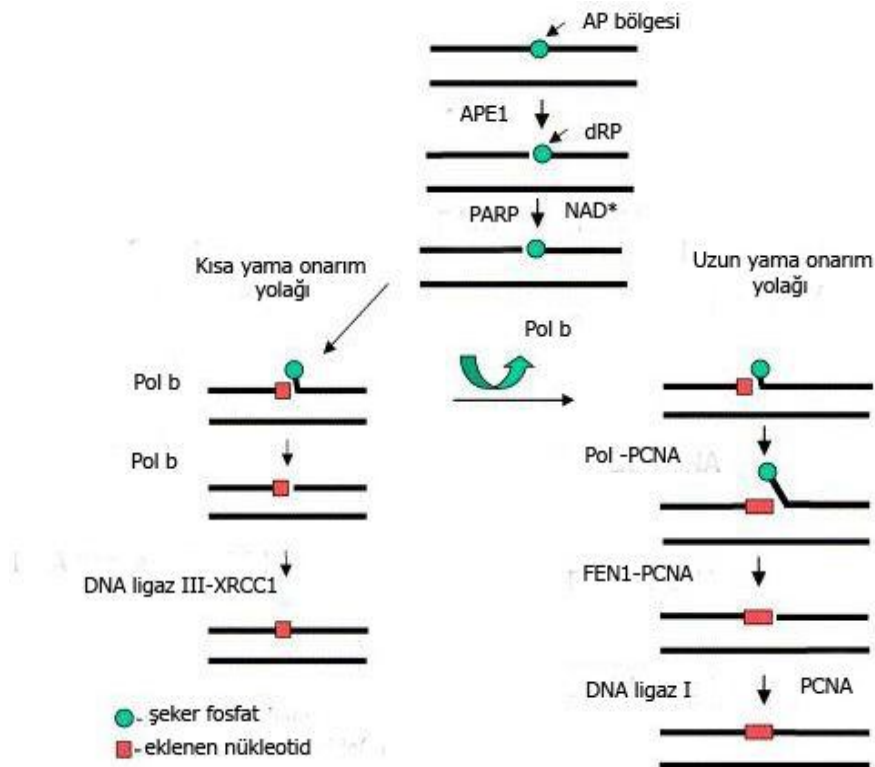
Deaminasyonun, alkilleyici ajanların, oksidasyon veya iyonize radyasyonun neden olduğu hasarların tamiri BER mekanizması ile gerçekleştirilir (Zhang ve ark., 2010).

Yolağın ilk aşaması hasarlı bazın DNA glikozilaz enzimi tarafından tanınmasıdır. DNA glikozilaz, hasarlanmış baz ile nükleotidin şeker komponenti

arasındaki beta-N-glikozidik bağı kırarak bazı polinükleotitten ayırır. Yapılan birçok insan çalışmasında benzer substrat spesifikliğine sahip en az 10 farklı DNA glikozilaz enzimleri tanımlanmıştır. DNA glikozilazın hasarlı bazı ayırmasından sonra oluşan bazsız bölgeye apürinik/apirimidinik bölge (AP bölgesi) denir. AP bölgesi, AP endonükleaz (APE) tarafından tanınır. İnsanda tanımlanmış APE, APE1'dir.

APE1, AP bölgelerindeki şeker-fosfat omurgasını ayırır; Gap bölgesinde 3' hidroksil grubu ve 5' abazik deoksiriboz fosfat bulunan bir çentik oluşur. Oluşan bu çentik DNA polimeraz-beta ile doldurulur ve DNA ligaz ile onarım tamamlanır.

Bu süreçte XRCC1 ve PARP proteinleri önemli rol oynar. PARP-1 enzimi kırık DNA uçlarına bağlanarak bu uçları yıkımdan ve rekombinasyondan korur (Brown ve ark., 2011).



Şekil 3: Baz eksizyon tamir yolağı (Dianov, 2003).

2.8.2.2. NÜKLEOTİDLERİN KESİLİP ÇIKARILMASI ONARIMI

NER sistemi BER'e göre daha özelleşmiş onarım sistemidir. DNA zincirleri arasında oluşan çapraz bağların tamiri, büyük kimyasal grupların eklendiği bazların tamiri, siklobütıl dimerlerinin tamiri, NER mekanizması tarafından gerçekleştirilir (Gilljam ve ark., 2012). Hasarlı nükleotidlerin çıkarılıp, yerine yenilerinin konulması ile BER mekanizmasıyla benzerlik gösterse de, daha uzun nükleotid hasarlarının tamiri ve hasara özgü oluşu NER mekanizmasının BER'den farklı olan yönleridir.

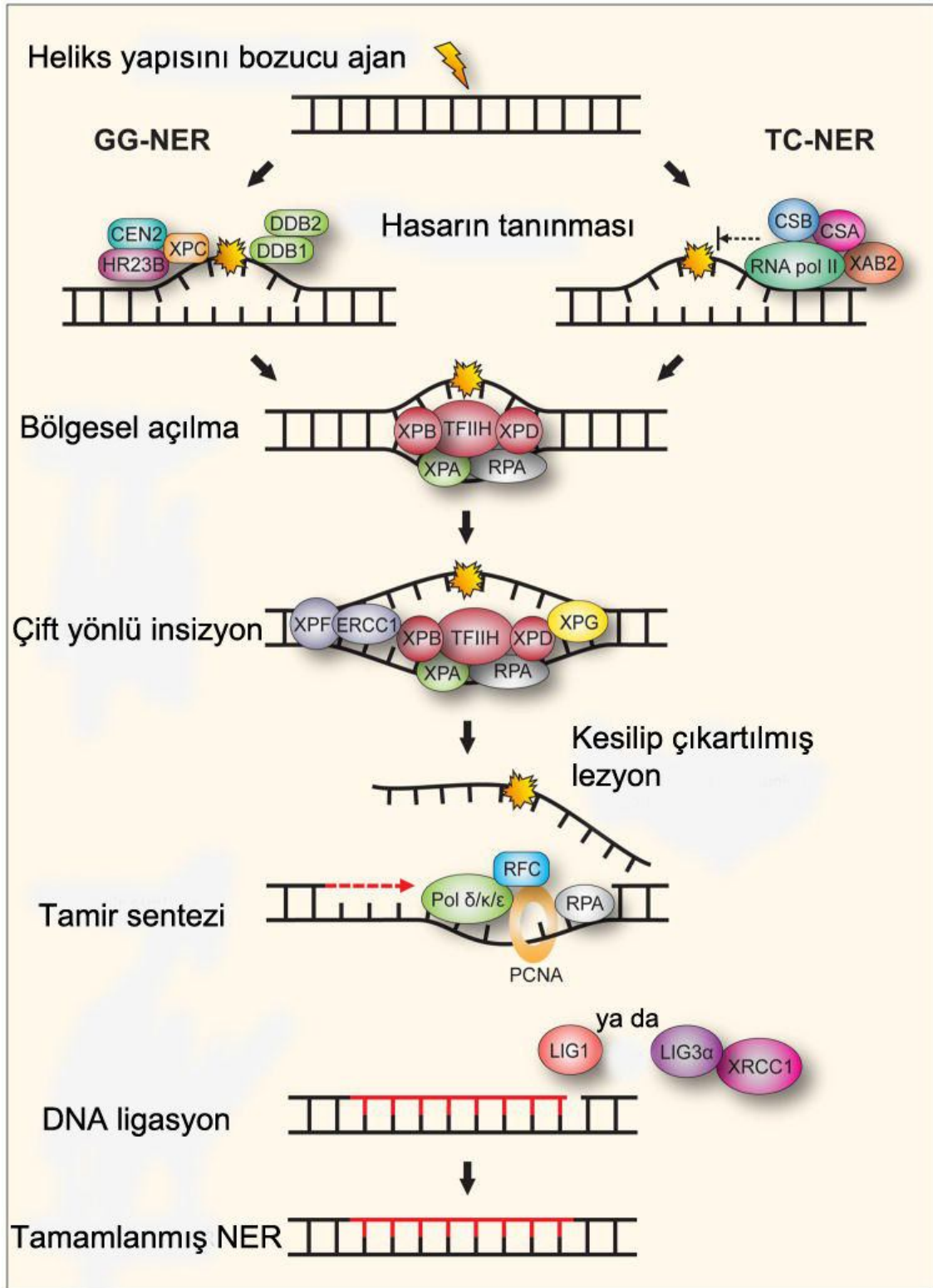
***E.coli* NER Sistemi**

E.coli'deki 12 nükleotid uzunluğundaki hasarlı dizilerin onarımı 'kısa yama' sistemi ile onarılır. Bu onarım UvrA, UvrB ve UvrC genlerinin ürünleri tarafından gerçekleştirilir. UvrA proteini hasarlı bölgeyi tanır, UvrB hasarlı bölgeyi 3' yönünden UvrC ise 5' yönünden keserek 12-13 bazlık bir bölgeyi çıkartır. Daha sonra UvrC proteini ayrılır. UvrB ise hasarlı bölgede bağlı kalır, oluşan boşluk DNA polimeraz I tarafından doldurulur, fosfodiester köprüleride DNA ligaz tarafından yapılır (Bichara ve ark., 2011).

Ökaryotlarda NER Sistemi

Ökaryotik NER sistemi *E.coli* 'deki sistemden daha komplekstir ve proteinler arasında bir homoloji yoktur. Hasarın tanınmasında XPC, XPA ve XPE proteinleri rol oynar.

Transkripsiyon faktör II H'nin alt birimlerinden olan XPB ve XPD'nin helikaz aktiviteleri ile DNA çift sarmal yapısı açılır. XPG hasarlı bölgeyi 3' ucundan ERCC1, 5' ucundan ise XPF keser. Oluşan boşluğun doldurulmasında ise Replikasyon protein A, replikasyon faktör C, proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA) ve DNA polimeraz delta ve epsilon rol oynar. DNA ligaz ile fosfodiester bağının oluşumu katalizlenerek onarım tamamlanır.



Şekil 4: GG-NER (Genomik-NER) ve TC-NER (Transkripsiyon ilişkili-NER) onarımı (Jeppesen, 2011).

2.8.3. DNA YANLIŞ EŞLEŞME ONARIMI (MISMATCH TAMİR MEKANİZMASI)

Genetik rekombinasyon ve replikasyon hataları gibi durumlarda oluşan hatalı baz eşleşmesi/eşleşmemesi bu onarım mekanizması ile düzeltilir. Bu tamir mekanizması hatalı bazın bulunup çıkarılması, hatanın düzeltilmesi ve orjinal dizinin korunması esasına dayanır. En önemli nokta hangi zincirin kalıp olarak kullanılıp hatalı eşleşmiş bazın düzeltilileceğidir. *E.coli* 'de bu sorun metilasyon modifikasyonu ile çözülmüştür (Brown, 2002). Replikasyon için kalıp olarak kullanılan zincir metilasyon modifikasyonu taşır, yeni sentezlenen ve hatalı baz taşıyan zincirde ise bu modifikasyon yoktur. Yeni oluşan zincirde bu modifikasyon daha sonra gerçekleşir. İki zincir arasında bu modifikasyon ile ilgili zamanlama farkı, tamir sürecinin başarılı bir şekilde yürütülmesini sağlar.

***E.coli*'de yanlış eşleşme onarım sistemi**

Uzun yama tamir sistemi ile bir kilobaz yada daha fazla hatalı baz eşleşmeleri tamir edilir. Bu sistemde; MutH, MutL, MutS proteinleri ve DNA helikaz II rol oynar.

MutS hatalı baz eşleşmelerini tespit eder. MutS-DNA kompleksine MutL bağlanır ve MutS-MutL kompleksi DNA'da bir loop yapısı oluşturur. MutH endonükleazı metillenmemiş DNA ipliğini GATC dizisinden keser. MutS ve MutL bir helikaz ve ekzonükleaz ile birlikte, metillenmemiş ipliğin hasarlı kısmını keserek çıkarır. Oluşan boşluk DNA polimeraz tarafından doldurulup, ligaz tarafından da bağ oluşturulur (Polosina ve ark., 2009).

Ökaryotik sistemde yanlış eşleşme onarım sistemi

Ökaryotlarda *E.coli* MutS ve MutL genlerinin homologları vardır. Sadece MutH'nin homologu yoktur. Bu durum hatalı bazı taşıyan zinciri ayırma da farklı bir mekanizmanın rol oynadığını gösterir. Yanlış eşleşme onarım sistemindeki genlerde meydana gelen mutasyonlar yaygın kalıtsal hastalıklardan biri olan HNPCC' ye (kalıtsal polipsiz kolorektal kanser veya kolon kanseri) yol açmaktadır (Laulier ve ark., 2012).

2.8.4. DNA ZİNCİR KIRIKLARININ ONARIMI

2.8.4.1. DNA TEK ZİNCİR KIRIKLARININ ONARIMI

OS, tek zincir kırıkları oluşturabilir. Bu durumunda sağlam zincir PARP1 proteini ile kapatılarak sağlam zincirin yıkılması veya istenmeyen rekombinasyona maruz kalması önlenir. Kırık, kesip-çıkarma onarım sisteminde rol oynayan enzimlerce tamir edilir.

2.8.4.2. DNA ÇİFT ZİNCİR KIRIKLARININ ONARIMI

İyonize radyasyon ve kimyasal mutajenler DNA'da çift zincir kırıklarına yol açabilir. Çift zincir kırıklarının onarımı iki şekilde gerçekleşir;

- Homolog rekombinasyon onarımı
- Homolog olmayan rekombinasyon onarımı

2.8.4.3. HOMOLOG REKOMBİNASYON ONARIMI

Kırık bölgesinin tamiri, kromozomun sağlam olan homoloğu kullanılarak gerçekleştirilir. Onarımda rekombinasyon olayında rol oynayan Rec A ve diğer proteinler (RAD ve BRCA) görev alır (Rowan ve ark., 2010).

2.8.4.4. HOMOLOG OLMAYAN REKOMBİNASYON ONARIMI

Hızlı ve hataya meyilli bir onarım sistemidir. Hasarın onarımı, kırık kromozomların uçlarını birleştirip, onları proteazlardan koruyan ve diğer onarım proteinlerinin kırık bölgesine toplanmasını sağlayan Ku proteinleri (Ku70, Ku80) aracılığı ile gerçekleşir. İki Ku proteininin birbirine olan afiniteleri sayesinde iki uç bir araya getirildikten sonra, Ku proteinleri DNA-PKcs (DNA protein kinaz katalitik alt ünitesi) ile etkileşime girer. Bu durum XRCC4'ü aktive eder. XRCC4 DNA ligaz IV ile etkileşime girer. DNA ligaz IV, tamir mekanizması ile ilgili proteinleri koordine ederek hasarın tamir edilmesini sağlar (Li, 2011).

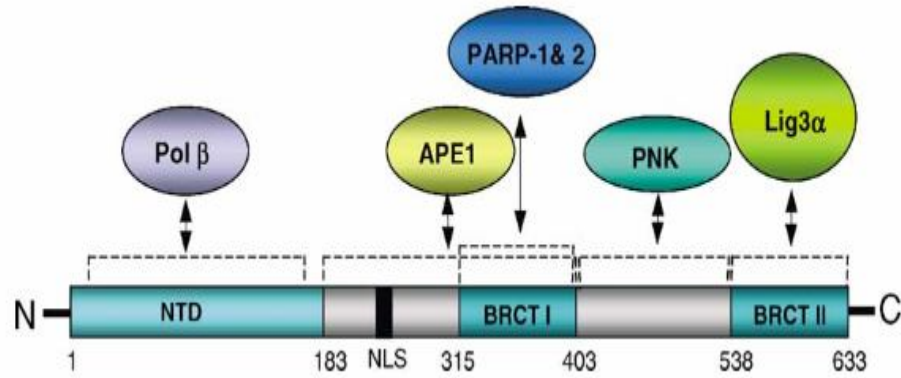
2.9. XRCC1 GENİ VE PROTEİNİ

XRCC1 geni insanlarda 19. kromozomun uzun kolu üzerinde haritalanmış (19q13.2-13.3) olup, 17 ekzon ve 32.067 baz çiftinden oluşmaktadır. XRCC1 proteini, 69 kDa molekül ağırlığında olup 633 aminoasitten oluşur. XRCC1 proteininin kendisinin enzimatik bir aktivitesi olmayıp, BER onarım mekanizmasında ve tek zincir DNA kırıklarının onarımında rol oynayan önemli

enzimler ile etkileşerek onların koordinasyonu için bir iskele proteini olarak işlev görür. Bundan dolayı, XRCC1 proteini DNA tamir sürecinin etkinliğini arttırmada önemli rol oynar.

XRCC1 proteinin diğer proteinlerle etkileştiği üç ayrı fonksiyonel bölgesi vardır. DNA polimeraz beta ile etkileşen N-terminal bölge (NTD), PARP-1 ve 2 ile etkileşen merkezdeki BRCA1 C-terminus (BRCT-I) bölgesi ve DNA ligaz III α ile etkileşen C-terminal BRCT-II bölgesi. (Cuneo ve ark., 2011).

XRCC1'in temel görevi, PARP-1'in DNA kırıklarına bağlanmasını sağlamak, onun poli(ADP-riboz)ilasyon aktivitesini düzenlemek ve diğer baz çıkarım mekanizması enzimlerinin XRCC1'e bağlanarak DNA tamirini tamamlamasını sağlamaktır. XRCC1 proteinindeki bozukluklar, DNA hasar ajanlarına (iyonize radyasyon ve metilmetan sülfonat gibi) artmış hassasiyet ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Caldecott, 2003).



Şekil 5: XRCC1 protein yapısı ve protein-protein etkileşimleri (Caldecott, 2003).

2.10. PARP1 GENİ VE PROTEİNİ

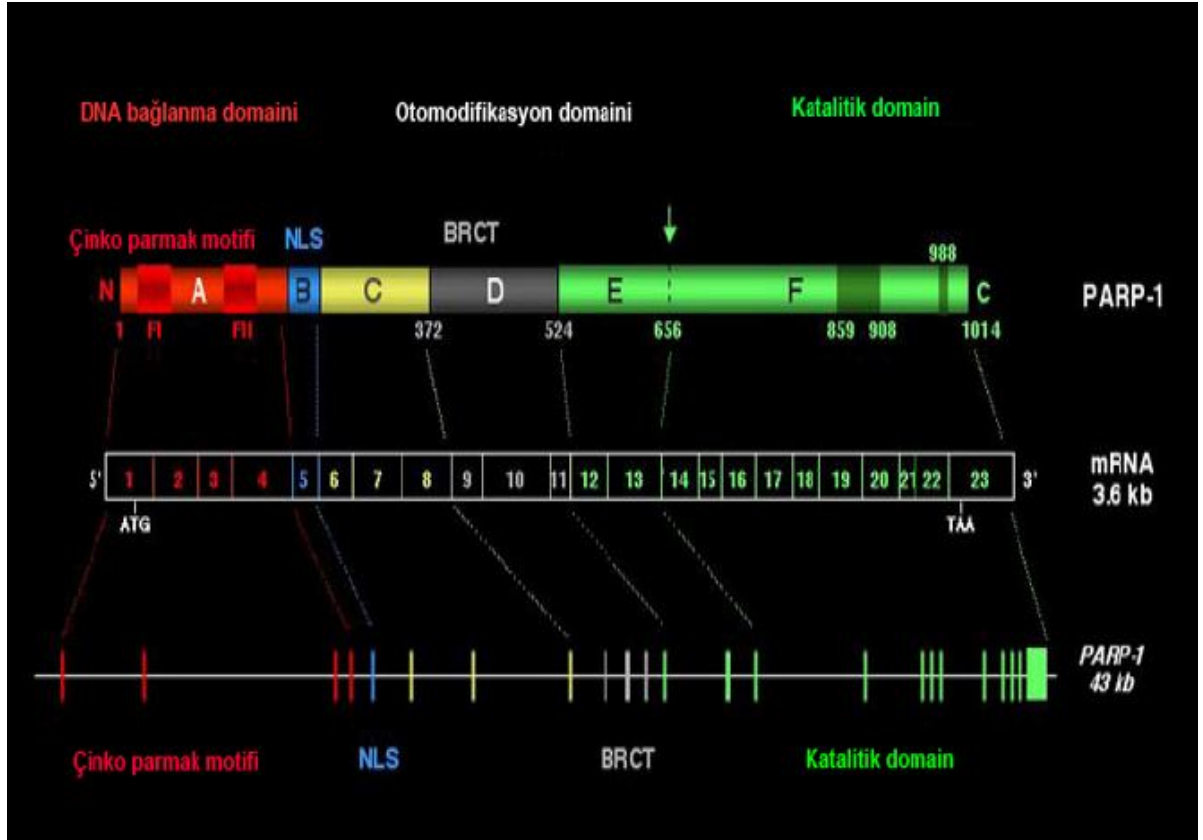
PARP1 geni insanlarda 1. kromozomun uzun kolu üzerinde haritalanmış (1q42) olup, 23 ekzondan ve 47.410 baz çiftinden oluşmaktadır. PARP1 geni kromatin ilişkili poly (ADP-ribozil) polimeraz enzimini kodlar. PARP1, PARP (poly (ADP-riboz) polimeraz) protein ailesinin bir üyesidir. PARP1 proteini 113 kDa molekül ağırlığında olup 1014 aminoasitten oluşur.

PARP1 enzimi poly-ADP-ribozilasyon aktivitesine sahiptir. Poly-ADP-ribozilasyonu özelliği, DNA tamir yollarında rol oynayan proteinlerin aktivitesini düzenleyerek, bu proteinlerin hasarlı bölgeye toplanmasını sağlar.

PARP-1 enzimi nükleer bir proteindir ve 3 fonksiyonel bölgesi vardır; N terminal uçta DNA bağlanma bölgesi, orta kısımda otomodifikasyon bölgesi, C terminal uçta katalitik bölge. N-terminal bölgesi 2 tane çinko parmak motifi içerir. DNA hasarlarının tespitinde PARP-1'in bu çinko parmak motifi önemlidir. Birinci çinko parmak motifi, hem tek hem de çift iplikteki kırığa bağlanırken, ikinci çinko parmak motifi yalnızca tek iplik kırıklarını tanımaktadır. Orta kısımdaki otomodifikasyon sahası poli(ADP-riboz)ilasyon bölgesini içermektedir.

PARP-1'in tarafından gerçekleştirilen poli(ADP-riboz)ilasyon reaksiyonu, oksidatif hasar sonucu oluşan DNA hasarı, inflamasyon ve hücre ölümüne karşı oluşturulan hücrel bir cevaptır. C terminal bölgesi ise, NAD'ın bağlandığı bölgedir (Auer ve ark., 1989).

Yüksek miktardaki DNA hasarı, PARP-1 üzerinden hücre ölümüne yol açabilmektedir; yüksek miktardaki DNA hasarı PARP-1'in hücredeki substratı olan NAD'ın tüketilmesine neden olmakta ve NAD'ın yeniden sentezlenebilmesi için ATP kullanımı gerekmektedir. Sonuç olarak tüketilen fazla enerji hücre ölümünü tetikleyebilmektedir (Dong ve ark., 2010).



Şekil 6: PARP1 proteininin ve geninin yapısı (Auer, 1989).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. .ÇALIŞMA GRUBU

Çalışmaya evre 5 kronik böbrek yetmezliği bulunan ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nefroloji Polikliniğinde takip edilmekte olan 18 yaş üstü toplam 20 hasta dahil edilmiştir.

Bütün hastalara haftada 3 gün ve 4 saat süreyle bikarbonatlı hemodiyaliz uygulandı. Tüm hastalarda hemodiyaliz damar erişim yolu arterio-venöz fistüldür. HD işlemi Fresenius 4008 B tipi makinalar kullanılarak yapıldı. Bütün hastalarda vücut kitlesine uygun (1.4 – 2.1) sentetik tipte membran (polisülfon) kullanıldı. Hastalarda her ay single – pool Kt/V üre hesaplanacak ve Kt/V değerinin 1.4’ün üzerinde tutulması hedeflendi.

Hastalardan HD seansından hemen önce ve HD seansının hemen sonunda arterio – venöz fistülün arteriyel bölümünden 10 ml kan örneği alındı. Kan örneğinin alınacağı seans haftanın ilk seansıdır. Hastaların demografik bilgileri (yaş, cinsiyet), kronik böbrek yetmezliği etiyolojisi ve süresi, sigara ve alkol tüketimi, eşlik eden hastalıklar, kullandığı ilaçlar kaydedildi.

Hastaların üre, kreatinin, sodyum, potasyum, kalsiyum, fosfor, şeker, total protein, albümin, LDL – kolesterol, trigliserid, ürik asit, CRP, ferritin, parathormon, ALT, AST, hemogram, hepatit B, C ve HIV serolojileri dosyalarından kaydedildi.

Çalışma grubunda dışlanan kriterler;

- Gebelik,
- Malignite, sistemik vaskülit, inflamatuvar barsak hastalığı, Ailevi Akdeniz Ateşi (FMF) bulunan hastalar,
- Malnütrisyonu olanlar,
- Aktif alerjisi bulunanlar,
- Diyabetes mellitusu bulunan hastalar,
- İmmunosupresif ilaç kullanan hastalar,

- Statin veya antiinflamatuvar herhangi bir ilaç kullanan hastalar,
- Hepatit B, C ve HIV enfeksiyonu bulunan hastalar,
- Son altı ay içerisinde geçirilmiş herhangi bir kronik enfeksiyonun klinik ve laboratuvarının saptandığı hastalar,
- Aktif enfeksiyonu bulunan hastalar (aksiler vücut ısısı $> 38^{\circ}\text{C}$ ve diğer bulgular),
- Kan hemoglobin düzeyi 9 gr / dl nin altında olanlar,
- C-reaktif protein düzeyi 15 mg /dl nin üzerinde olanlar,
- Çalışma sırasında akut febril episodların gelişimi (aksiler vücut ısısı $>38^{\circ}\text{C}$),
- Hemodiyaliz sırasında intravenöz olarak % 0.9 izotonik NaCl verilmesi gereken hipotansiyonu olanlar,
- Sigara kullananlar,
- Çalışma protokolüne uyumsuzluk gösteren hastalar.

Çalışmanın deneysel aşaması Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.2. KULLANILAN KİMYASALLAR

Dimetil sülfoksit, Applichem

Etanol, Merck

NaCl, Sigma

KCl, Merck

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Merck

KH_2PO_4 , Meck

Glisin, Merck

Gliserol, Merck

Brom fenol mavisi, Sigma

Tris Base, Sigma

HCl, Merck

β -Merkaptoetanol, Sigma

Bovine Serum Albumin, Gibco

Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting substrat, Roche

İzopropil Alkol, Sigma

Tripan mavisi, Biochrom AG

Metanol, Merck

Revers Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, Roche

Koruyucu RNaz İnhibitörü, Roche

DTT, Roche

Protein ladder, Thermo Scientific

3.3. KULLANILAN TAMPON VE ÇÖZELTİLER

Lenfosit İzolasyonunda Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler

- **1X Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (1000 ml, pH 7,4)**

NaCl.....8 g

KCl.....0,2 g

Na₂HPO₄.2H₂O.....1,81 g

KH₂PO₄.....0,24 g

Western Blot Yönteminde Kullanılan Tampon Ve Çözeltiler

- **6 X Protein Yükleme Tamponu**

1 M Tris Base (pH: 6,8)..... 5 ml

%20 SDS..... 20 ml
 %100 Gliserol..... 12 ml
 Brom Fenol Mavisi.....0,48 mg
 ddH₂O.....3 ml

- **Strip Tamponu (pH: 2,0)**

25 mM Glisin0,94 g
 SDS.....5 g
 dH₂O.....500 ml

HCl ile pH: 2,0'ye ayarlanır.

- **Bloklama Tamponu**

%7,5 BSA.....1,3 ml
 PBS (Ph:7,4).....8,7 ml

- **1X 3- (N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) Yürütme Tamponu**

20 X MOPS.....50 ml
 dH₂O.....950 ml

- **1X Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (1000 ml, pH 7,4)**

NaCl.....8 g
 KCl.....0,2 g
 Na₂HPO₄.2H₂O.....1,81 g
 KH₂PO₄.....0,24

3.4. KULLANILAN CİHAZLAR

Çalkalamalı Su Banyosu, Kottermann

Çeker Ocak, Termal

Hassas Terazî, CHYO

Mikropipetler, Socorex ve Eppendorf

Manyetik karıştırıcı, Ühromag

Vorteks, Velp

Santrifüj, Hettich

Soğutmalı Santrifüj, Hettich

Nandrop, Thermo

Ph Metre, WTW

Buzdolabı ve Derin Dondurucu (+4 °C ve -20 °C), Arçelik

Ultra Derin Dondurucu (-80 °C), New Brunswick Scientific, Sanyo

Yatay elektroforez Tankı, Thermo Scientific

Otoklav, Hirayama

Termal Döngü Cihazı, Applied Biosystems

LightCycler® 1.5, Roche

Saf su cihazı, Millipore Elix 3

Işık Mikroskobu, Olympus

Western Blot Transfer Sistemi, iBlot™

Güç Kaynağı, Power Ease 500

Dikey elektroforez Tankı, XCell SureLock™

Kemilüminesans Görüntüleme Sistemi, DNR MicroChem

UV transillüminatör, Vilber Lormat

3.5. PERİFERİK KANDAN LENFOSİT İZOLASYONU

Evre 5 kronik böbrek yetmezliği bulunan ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nefroloji Polikliniğinde takip edilmekte olan toplam 20 hastanın heparinli tüplere alınmış kan örnekleri PBS tamponu ile 1:1 oranında seyreltildi. PBS ile seyreltilmiş kan örnekleri Histopaque (1077 g/ml, BioChrom AG, Berlin, GE) yoğunluk medyumuna üzerine tabakalandırıldı ve 600 x g'de, 21°C'de, 35 dakika santrifüjleme ile lenfositler izole edildi. Lenfositlerin üzerine eşit hacimde PBS eklendi ve 600 x g'de, 21°C'de, 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Son olarak eritrosit kontaminasyonunu önlemek amacıyla lenfositler 3 ml kırmızı kan hücresi lizis tamponu (Roche Applied Science, Mannheim, GE) ile muamele edildi ve karışım 10 dakika elde çalkalandı. 500 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj yapıldı ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Canlı lenfosit sayısı trypan mavisi kullanılarak hemositometre ile saptandı. Lenfositler %10 dimethyl sulphoxide (Applichem GmbH, Darmstadt, GE), %60 fetal bovine serum (BioChrom AG, Berlin, GE) ve %30 RPMI 1640 medyumuna (L-glutaminsiz, 2g/l NaHCO₃'li, BioChrom KG, Berlin, GE) içeren örnek saklama medyumunda $\sim 2 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde süspanse edilerek cryo tüplere aktarıldı. Her bir örnek, analizler yapılncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.6. TOTAL RNA İZOLASYONU

HD tedavisi gören hastalardan XRCC1 ve PARP1 gen ekspresyon miktarını tespiti için izole ettiğimiz lenfositlerden ($\sim 2 \times 10^6$ hücre) total RNA izolasyonu yapıldı. Bunun için total RNA izolasyon kiti (Gene-JET, Thermo Fisher, Delaware, USA) kullanıldı. Uygulanan protokol;

1. İzole edilmiş lenfositler 250 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
2. Üst sıvı uzaklaştırıldı.
3. Lenfosit çökeltisi üzerine 1 ml PBS eklendi.
4. 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Üst sıvı uzaklaştırıldı.

6. Tüplere 600 µl lizis solusyonu eklendi ve 10 dakika inkübe edildi.
7. Tüplerin üstüne 360 µl etanol uygulanıp pipetaj yapıldı.
8. Örnekler kolonları transfer edildi. 12000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
9. Kolona 700 µl yıkama 1 solusyonu eklendi. 12000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
10. Kolona 600 µl yıkama 2 solusyonu eklendi. 12000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
11. Kolona 50 µl ddH₂O eklendi. 12000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
12. Tüpte kalan sıvı total RNA içermektedir.

3.6.1. TOTAL RNA KONSANTRASYONUNUN VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ

İzole edilen RNA örnekleri, NanoDrop Scientific™ 1000 (Thermo Fisher, Delaware, USA) cihazı ile ölçüldü. RNA konsantrasyonu 260 nm'deki optik yoğunluluğundan (OD) saptandı. RNA konsantrasyonunun ve saflığının hesaplanmasında kullanılan formüller aşağıda belirtilmiştir.

RNA konsantrasyonu (ng / µl): OD 260 nm x seyreltme faktörü x 40

RNA saflığı: OD 260 / OD 280 > 2,0

3.6.2. BİRİNCİ NORMALİZASYON

cDNA sentezi için, her bir RNA örneğinin konsantrasyonu 100 µg'a eşitlendi.

3.6.3. QRT-PCR YÖNTEMİ KULLANILARAK XRCC1 VE PARP1 GEN EKSPRESYONU DÜZEYLERİNİN KANTİTATİF OLARAK SAPTANMASI

Kantitatif ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği, mRNA ekspresyonu düzeylerinin kantitatif olarak saptanmasını ve ölçülmesini sağlayan oldukça hassas floresan tabanlı bir PCR teknolojisidir. Bu teknik, RT-PCR tekniği içerisinde kantitatif PCR (qPCR) tekniğinin dahil edilerek RT-PCR tekniğinin RNA

kantitasyonunda kullanılmasına olanak sağlar. İlk aşama, revers transkriptaz enzimi kullanılarak RNA kalıplarının cDNA'ya dönüştürülmesi (RT-PCR) reaksiyonlarını içerir. İkinci aşama ise PCR amplifikasyonu (qPCR) ile ilgili reaksiyonları içerir. qRT-PCR'in iki farklı uygulaması mevcuttur. Bu uygulamalardan biri, cDNA sentezinden PCR amplifikasyonuna kadar olan bütün reaksiyonların tek bir tüpte gerçekleştirilmesidir. İkinci uygulama ise iki aşamalı bir süreç olup, RT-PCR ve qPCR ayrı tüplerde gerçekleştirilir. Tek aşamalı reaksiyonda başlangıç RNA kalıpları yıkıma daha yatkındır. Ayrıca, tek aşamalı reaksiyon iki aşamalı reaksiyona göre daha az hassastır.

Biz çalışmamızda, XRCC1 ve PARP1 gen ekspresyonu düzeylerini iki basamaklı qRT-PCR reaksiyonunu kullanarak saptadık.

3.6.4. RT-PCR

RT-PCR tekniğinde, ters transkriptaz enzimi kullanılarak RNA kalıpları cDNA'ya dönüştürülür. Çalışmamızda kalıp RNA'ların cDNA'ya dönüştürülmesi, cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche 05 081 955 001. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, GE) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Her bir örneğe ait total RNA ve primer karışımı, ince cidarlı PCR tüpü içerisinde Tablo-5'e göre hazırlandı.

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	1 µg
Random Hexamer Primer, 600 pmol / µl	2 µl	60 µM
PCR-grade Su	Değişken	Toplam hacim 11.4 µl olacak şekilde
Toplam hacim	11.4 µl	

Tablo 5: Kalıp RNA ve primer karışımının içeriği (1 reaksiyon için)

2. Her bir örnek, total kalıp RNA'ların ikincil yapısını denatüre etmek amacıyla 10 dakika 65°C inkübe edildi. PCR tüpleri, ters transkripsiyon (RT) reaksiyonuna kadar buz içerisine yerleştirildi.

3. RT reaksiyonu aşağıdaki tabloya (Tablo-6) göre gerçekleştirildi.

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Transkriptör Ters Transkriptaz Reaksiyon Tamponu, 5X kons.	4 µl	1X (8 mM MgCl ₂)
Koruyucu RNaz inhibitörü (40 U/µl)	0,5 µl	20 U
dNTP karışımı, her biri 10 mM	2 µl	1 mM (her biri)
DTT	1 µl	5 mM
Transkriptör Ters Transkriptaz	1,1 µl	10 U
Son hacim	20 µl	

Tablo 6: RT reaksiyonunda kullanılan bileşenlerin hacim ve konsantrasyonları.

4. Reaksiyon karışımı dikkatli bir şekilde karıştırıldı ve aşağıda belirtilen sıcaklık döngüleri kullanılarak RT reaksiyonları gerçekleştirildi.

29°C 10 dakika

48°C 60 dakika

85°C 5 dakika

4°C 1-2 saat

5. Reaksiyon sonrasında elde edilen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

3.6.5. İKİNCİ NORMALİZASYON

İkinci normalizasyon işlemi için, çalışılan her bir hedef genin ekspresyon düzeyleri, aktin beta (ACTB) housekeeping geni ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.6.6. REAKSİYONLARDA KULLANILAN QPCR PRIMERLERİ VE TAQMAN PROBLARI

1.Universal Probe Library (UPL) insan ACTB Real Time Ready Designer Assay NM_001101.3, UPL Probe #64 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, GE) (Tablo-7).

Primer/Prob	Uzunluk (bç)	Yerleşim	Tm	% GC	Dizi
İleri Primer	18	425-442	60	56	ccaaccgcgagaagatga
Geri Primer	20	502-521	59	60	ccagaggcgtacaggatag
Prob	8	492-499			ccaggctg
Amplikon (97 nt)	ccaaccgcgagaagatgaccagatcatgtttgagaccttcaacacccagccatgtacgttgctatccaggctgtgctatccctgtacgcctctgg				

Tablo 7: ACTB prob ve primerlerinin özellikleri.

2. UPL insan XRCC1 Real Time Ready Catalog Assay NM_006297.2, UPL Probe # 71 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, GE) (Tablo 8).

Primer/Prob	Uzunluk (bç)	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	18	492-509	60	56	ctgggaccgggtcaaaat
Geri Primer	18	535-552	60	61	caagccaaagggggagtc
Prob	8	515-522			gcagccag
Amplikon (61 nt)	ctgggaccgggtcaaaattgtttgcagccagccctacagcaaggactccccctttggcttg				

Tablo 8: XRCC1 prob ve primerlerinin özellikleri.

3. UPL insan PARP1 Real Time Ready Catalog Assay NM_001618.3, UPL Probe # 22 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, GE) (Tablo-9).

Primer/Prob	Uzunluk (bç)	Yerleşim	Tm	%GC	Dizi
İleri Primer	25	2198-2222	59	32	tctttgatgtggaaagtatgaagaa
Geri Primer	20	2242-2261	59	50	ggcatcttctgaaggtcgat
Prob	8	2228-2235			tggtggag
Amplikon (64 nt)	tctttgatgtggaaagtatgaagaaagccatgggtggagtatgagatcgaccttcagaagatgcc				

Tablo 9: PARP1 prob ve primerlerinin özellikleri.

3.6.7. QPCR REAKSİYON KARIŞIMININ HAZIRLANMASI

20 µl'lik standart qPCR reaksiyon karışımını hazırlamak üzere gerçekleştirilen basamaklar aşağıda belirtilmiştir.

1. Tüm karışımların içerikleri çözündürüldü, kısa süreli santrifüj edildikten sonra açılarak buz üzerine alındı.
2. RealTime ready Assay (primer-prob karışımı) 20X konsantrasyonda hazır olarak kullanıldı.

3. Buz üzerindeki 0,5 ml'lik eppendorf tüpe 15 µl'lik reaksiyon karışımı konuldu (Tablo-10).
4. Karışım mikropipet yardımıyla karıştırıldı, 20 µl'lik cam kapillerlerin her birine 15 µl'lik PCR karışımı konuldu. Üzerine 5 µl cDNA eklendi.
5. Cam kapillerler kapatıcı yardımıyla kapatıldı.
6. Tüm kapillerler 500 g'de 1 dk santrifüj edildi ve LightCycler® 1,5 cihazına yüklendi.

Reaksiyon bileşenleri	Kons.	Hacim	Son Kons.
PCR dH ₂ O	-	10 µl	-
Master Mix	5X	4 µl	1X
RealTime ready Assay (primer-prob karışımı)	20X	1 µl	Herbir primer 8 pmol, UPL prob 4 pmol
Total hacim		15 µl	
cDNA		5 µl	
Total hacim		20 µl	

Tablo 10: qPCR reaksiyon karışımı

qPCR Sıcaklık Döngüsü

LightCycler® 1,5 cihazında yapılan qPCR'ın sıcaklık döngüsü aşağıdaki tabloda görülmektedir (Tablo-11).

Program İsmi	Döngü Sayısı		Analiz Tipi
Pre-İnkübasyon*	1		None
Amplifikasyon**	45		Quantification
Soğutma***	1		None
Sıcaklıklar (°C)	İnkübasyon	Sıcaklık değişim oranı (°C/sn)	Elde Etme Tipi
Pre-İnkübasyon			
95°C	10 dk	20	None
Amplifikasyon			
95°C	10 sn	20	None
60°C	30 sn	20	None
72°C	1 sn	20	Single
Soğutma			
40°C	30 sn	20	None

Tablo 11 qPCR sıcaklık döngüsü.

3.7. LENFOSİTTEN NÜKLEER PROTEİN İZOLASYONU

HD tedavisi gören hastalardan XRCC1 ve PARP1 protein miktarını tespiti için izole ettiğimiz lenfositlerden ($\sim 2 \times 10^6$ hücre) nükleer protein izolasyonu yapıldı. Bunun için nükleer protein izolasyon kiti (NE-PER Nuclear an Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo Fisher, Delaware, USA) kullanıldı. Uygulanan protokol;

1. İzole edilmiş lenfositler 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
2. Üst sıvı uzaklaştırıldı.
3. Lenfosit çökeltisi üzerine 1 ml PBS eklendi.

- 4.500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 5.Üst sıvı uzaklaştırıldı.
- 6.Tüplere 20 µl CER I solusyonu eklendi ve vorteks yapıldı.
- 7.10 dakika buzda inkübasyona bırakıldı.
- 8.Tüplere 5,5 µl CER II eklendi ve vortekslendi.
- 9.14000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 10.Üst sıvı başka bir tüpe aktarıldı.
- 11.Kalan lizata 50 µl NER solusyonu eklendi.
- 12.40 dakika buzda inkübasyon yapıldı.
- 13.14000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 14.Nükleer proteini içeren üst sıvı 1,5 ml'lik steril eppendorf tüp içerisine aktarıldı.
- 15.Total protein örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü.
- 16.Total protein örnekleri western blot yöntemi ile analiz edilinceye kadar - 80°C'de saklandı.

3.7.1. NÜKLEER PROTEİN KONSANTRASYONUNUN VE SAFLIĞININ ÖLÇÜLMESİ

Her bir örnek, NanoDrop Scientific™ 1000 (Thermo Fisher, Delaware, USA) cihazına yüklenerek ölçüm gerçekleştirildi. Protein konsantrasyonu 280 nm'deki optik yoğunluluğundan (OD), saflığı da 260 nm / 280 nm'deki OD oranından saptandı. Protein konsantrasyonunun ve saflığının hesaplanmasında kullanılan formüller aşağıda belirtilmiştir.

Protein konsantrasyonu (mg / ml): $(1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260})$

Protein saflığı: OD 260 / OD 280

3.7.2. BİRİNCİ NORMALİZASYON

Western blot yönteminde her bir protein örneğinin miktarı 40 µg'a eşitlendi

3.7.3. WESTERN BLOT YÖNTEMİ

Western blot yöntemi hücre veya doku lizatları gibi kompleks örneklerde spesifik proteinlerin saptanmasında en yaygın olarak kullanılan tekniktir. Western blot tekniği çok basamaklı bir işlemdir.

Çalışmamızda, lenfositlerden nükleer protein izolasyonunu takiben western blot yöntemi ile hedef proteinlerin (XRCC1 ve PARP1) ekspresyon düzeylerindeki değişimleri saptadık. Ayrıca, protein miktarlarının doğru bir şekilde saptanabilmesi için her dokuda eksprese edildiği bilinen referans protein (housekeeping protein, aktin beta) kullanılarak normalizasyon (ikinci normalizasyon) işlemi yapıldı.

Western blot yöntemi ile spesifik proteinlerin ekspresyon düzeylerinin saptanması, XRCC1 mouse anti-human monoklonal antikoru (1:1000 dilüsyon, LifeSpan BioSciences, Seattle, USA), purified mouse anti-human PARP monoklonal antikoru (1:1000 dilüsyon, BD Pharmingen, California, USA), ACTB mouse anti-human monoklonal antikoru (1:3000 dilüsyon, LifeSpan BioSciences, Seattle, USA) ve Goat anti-mouse IgG, peroxidase conjugated, H+L antikoru (1:3000 dilüsyon, Millipore, Billerica, USA) kullanılarak aşağıda belirtilen protokole göre yapıldı.

Proteinlerin Elektroforez İle Ayrılması

1. Eşit konsantrasyondaki her bir protein örneği (40 µg) 1,5 ml'lik steril eppendorf tüplerin içerisine konuldu.
2. Eppendorf tüplere 6x protein yükleme tamponu ve β-merkaptoetanol karışımı eklendi (β-merkaptoetanol'ün 6x protein yükleme tamponu içerisindeki oranı %10).
3. Protein örneklerini içeren eppendorf tüpler kaynar suda 5 dakika tutuldu ve daha sonra soğumaya bırakıldı (4°C'de).
4. Dikey elektroforez tankına % 4-12 konsantrasyonundaki 10 kuyucuklu hazır Bis-Tris jel (Invitrogen, New York, USA) yerleştirildi ve 1 X MOPS

tamponu (Invitrogen, New York, USA) jellerin yüzeyine gelecek şekilde eklendi.

5. Jeldeki ilk kuyucuk hariç her bir kuyucuğa total protein örneklerinin her birinden eşit konsantrasyonda (40 µg) yüklendi. İlk kuyucuğa 4 µl protein ladder yüklendi.
6. 70 voltta 15 dakika ve 100 voltta 60 dakika uygulanan elektroforez ile proteinlerin elektroforetik olarak ayrılması sağlandı.

Proteinlerin PVDF Membrana Aktarılması

7. Bis-Tris jel, kasetlerinden çıkartıldı ve PVDF membran (Invitrogen, New York, USA) üzerine yerleştirildi.
8. Bis-Tris jel üzerine distile su ile ıslatılmış filtre kağıdı yerleştirildi.
9. Filtre kağıdının üzerine katot stack ve PVDF membran altına anot stack yerleştirildi.
10. IBLOT™ cihazında 7 dakikada jel üzerindeki proteinler PVDF membrana aktarıldı.

Nonspesifik Bölgelerin Bloklanması

11. %1 Bovine Serum Albumin (8,7 ml PBS; 1,3 ml %7,5 BSA) bloklama tamponu hazırlandı.
12. PVDF membran %1'lik BSA bloklama tamponu içerisinde +4°C'de bir gece inkübe edildi.

Primer ve Sekonder Antikorların Uygulanması

13. PVDF membran 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı.
14. 10 µg spesifik primer antikor mouse anti-XRCC1, mouse anti-PARP1 veya mouse-anti ACTB PVDF membrana eklendi ve 4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

15. PVDF membran 3 kez 10 dakika PBS ile yıkandı.
16. 3,3 μ l peroxidase conjugate sekonder antikor, PVDF membrana eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
17. PVDF membran 3 kez 5 dakika PBS ile yıkandı.

Protein Ekspresyon Düzeylerinin Saptanması

18. PVDF membran Lumi-Light^{PLUS} kemilüminesans substrat (1:1 oranında luminol ve peroxidase) ile 1 dk. muamele edildi.
19. Kemilüminesans Görüntüleme sistemi ile protein bandları belirlendi.

Image J programı kullanılarak proteinlerin band yoğunlukları ölçüldü ve protein ekspresyon düzeyleri kantitatif olarak saptandı.

3.7.4. İKİNCİ NORMALİZASYON

İkinci normalizasyon işlemi için, çalışılan her bir hedef proteinin ekspresyon düzeyleri aktin beta (ACTB) housekeeping proteini ile karşılaştırılarak belirlendi.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sürekli değerler kantitatif veriler için ortalama $\pm$ standart hata (S.E.) ve kalitatif veriler için yüzde olarak sunuldu. Her bir genotipin beklenen frekansları hesaplanarak ve gözlenen değerlerle bunları karşılaştırarak Hardy-Weinberg eşitlik (HWE) testi gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak kabul edildi. Kategorik değişkenlerin analizi için χ^2 testi veya Fisher's exact test kullanıldı. İki sürekli değişken arasındaki korelasyonu değerlendirmek için Pearson korelasyon katsayıları hesaplandı. İki bağımsız grup arasındaki farklılıkları değerlendirmek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. İki bağımlı grup arasındaki değişkenler Wilcoxon testi kullanılarak karşılaştırıldı. Tüm analizler istatistiksel yazılım paketi (SPSS, 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. HEMODİYALİZ TEDAVİSİ GÖREN KRONİK BÖBREK HASTALARINA AİT KLİNİK VERİLER

Hemodiyaliz öncesi ve sonrası olarak değerlendirmeye alınan kronik böbrek yetmezliği olan hastaların klinik özelliklerinin dağılımları Tablo-12’de verilmiştir. İki grup arasında; üre, kreatinin, CRP ve ürik asit düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi.

	H.Öncesi (n=20)	H.Sonrası (n=20)	P^a
Üre	119,14 + 31,01	45,38 + 20,63	<0,001
Kreatinin	8,97 + 2,15	4,12 + 1,72	<0,001
Kalsiyum	8,55 + 0,96	9,12 + 0,89	0,052
Albumin	3,66 + 0,54	3,36 + 0,7	0,129
Şeker	83 + 37,71	78,38 + 31,59	0,669
CRP	9,02 + 6,4	5,38 + 4,93	0,046
Ürik asit	6,54 + 1,66	4,49 + 1,21	<0,001
Hemoglobin	13,1 + 3,01	9,27 + 1,41	0,196

Tablo 12: Kronik böbrek yetmezliği hastalarının klinik özellikleri.

S.D., Standart sapma; CRP:C-reaktif protein.

^aStudent- t testi

4.2. HEMODİYALİZ TEDAVİSİ ÖNCESİ VE SONRASI XRCC1 VE PARP1 MRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİ

XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyonlarının diyaliz öncesi ve sonrası düzeyleri Tablo-13’de verilmiştir. XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyonlarının diyaliz öncesi ve sonrası düzeyleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil-7).

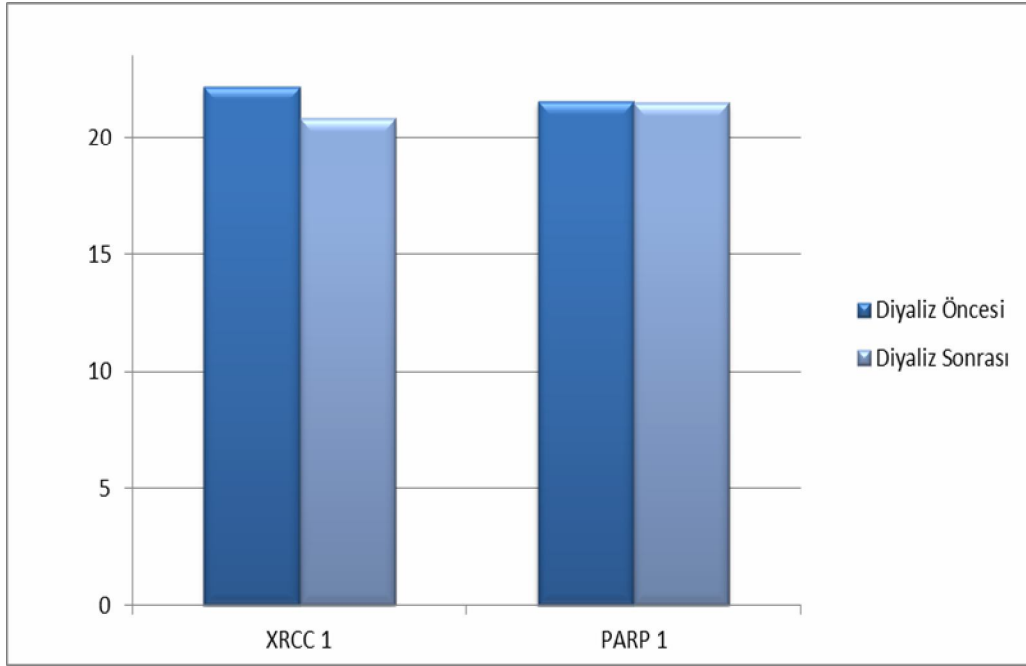
mRNA ekspresyon düzeyi	Diyaliz Öncesi (n=20)	Diyaliz Sonrası (n=20)	P ^a
XRCC1	0,0029 ± 0,0019	0,0027± 0,0015	0,715
PARP1	0,0019 ± 0,0013	0,0019 ± 0,0014	0,980

Tablo 13: Diyaliz öncesi ve sonrası gruplarında XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeyleri.

Sonuçlar ort. ± S.D. olarak verilmiştir.

S.D., Standart deviasyon.

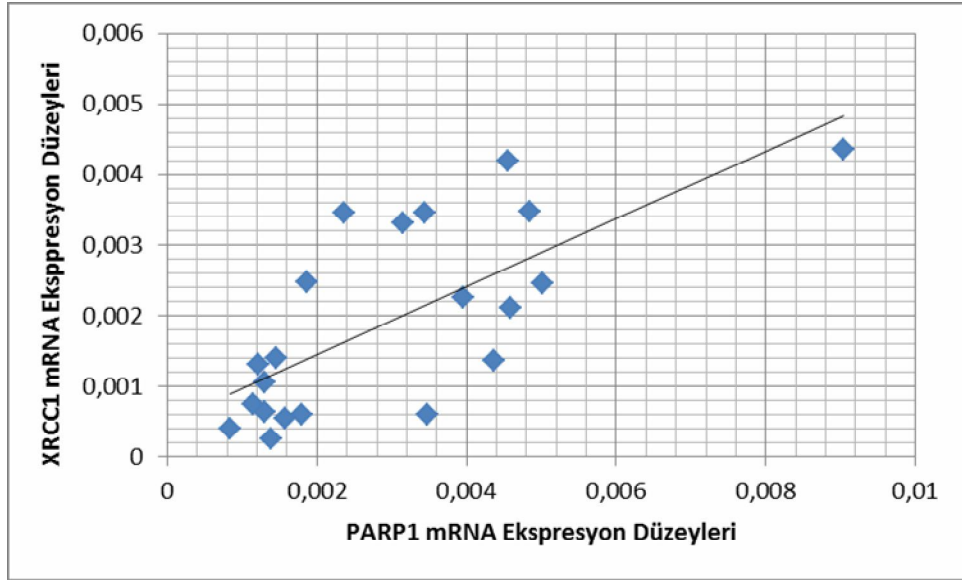
^aMann-Whitney U testi



Şekil 7: Diyaliz öncesi ve sonrası XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeyleri.

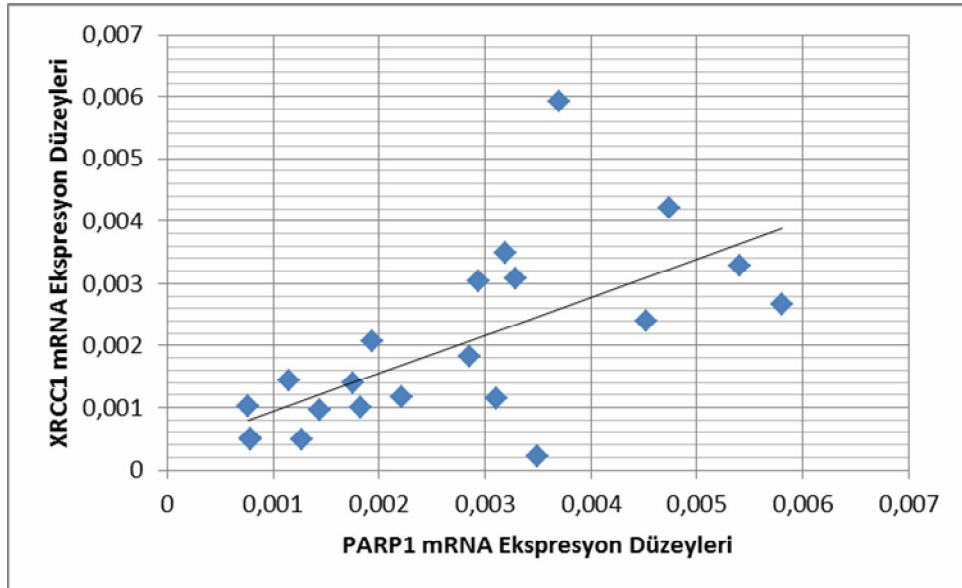
Çalışmamızda ayrıca, diyaliz öncesi ve sonrası gruplarındaki XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeylerini parametrik olmayan Pearson Korelasyon testi ile karşılaştırdık.

Diyaliz öncesi grubundaki XRCC1 mRNA düzeyleri ile PARP1 mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde yüksek derece bir korelasyon gözlemlendi ($r=0,771$; $p<0.0001$) (Şekil 8).



Şekil 8: Diyaliz öncesi, XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeylerinin korelasyonu.

Diyaliz sonrası grubundaki XRCC1 mRNA düzeyleri ile PARP1 mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında ise yine istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde orta derece bir korelasyon gözlemlendi ($r=0,641$; $p=0,002$) (Şekil 9).



Şekil 9: Diyaliz sonrası, XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyon düzeylerinin korelasyonu.

4.3. HEMODİYALİZ TEDAVİSİ ÖNCESİ VE SONRASI XRCC1 VE PARP1 PROTEİN EKSPRESYON DÜZEYLERİ

Hemodiyaliz öncesi ve hemodiyaliz sonrası XRCC1 ve PARP1 protein ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, XRCC1 ve PARP1 protein ekspresyon düzeyleri açısından diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

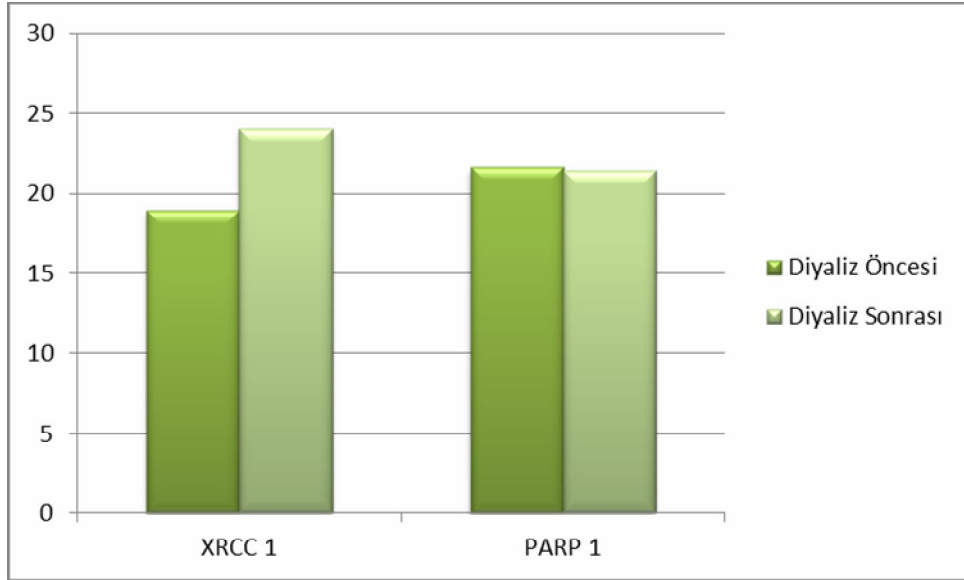
Protein Ekspresyon Düzeyi	Diyaliz öncesi (n=20)	Diyaliz sonrası (n=20)	P ^a
XRCC1	0,392 ± 0,25	0,589 ± 0,568	0,178
PARP1	0,241 ± 0,018	0,241 ± 0,021	0,918

Tablo 14: Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası, XRCC1 ve PARP1 protein ekspresyon düzeyleri.

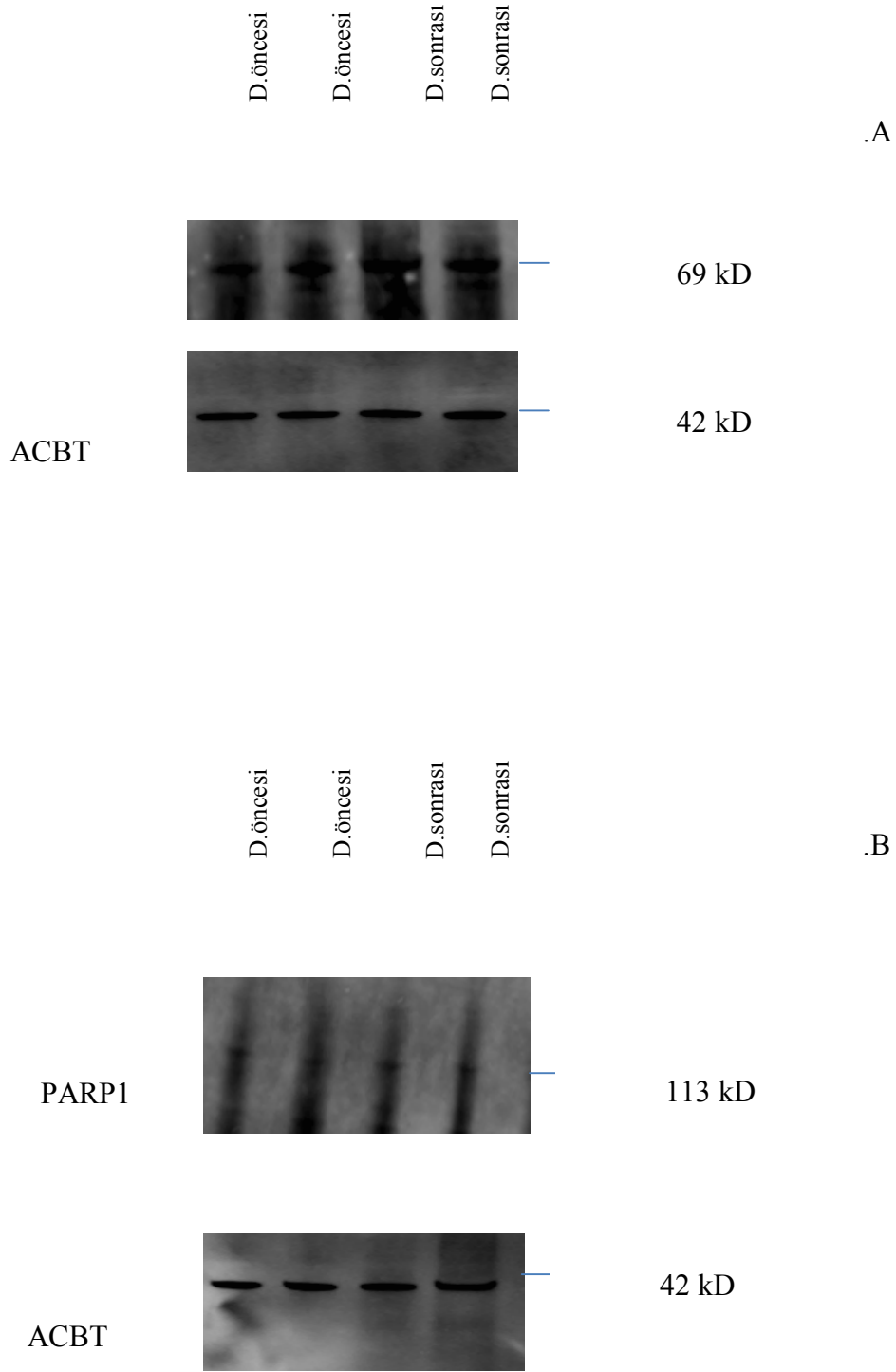
Sonuçlar ort. ± S.D. olarak verilmiştir.

S.D., Standart deviasyon

^aMann-Whitney U testi



Şekil 10: Diyaliz öncesi ve sonrası XRCC1 ve PARP1 protein ekspresyon düzeyleri.



Şekil 11: (A) Hemodiyaliz öncesi ve hemodiyaliz sonrası XRCC1 ve ACTB protein ekspresyonu düzeyleri (B) Hemodiyaliz öncesi ve hemodiyaliz sonrası PARP1 ve ACTB protein ekspresyonu düzeyleri.

4.4. HEMODİYALİZ TEDAVİSİ ÖNCESİ VE SONRASI XRCC1 GEN VE PROTEİN EKSPRESYONU İLE KLİNİK VERİLERİN KORELASYONU

XRCC1 gen ekspresyon sonuçları ile hastaların klinik verileri arasındaki ilişki araştırılmıştır (Tablo-15). Hemodiyaliz öncesi ve hemodiyaliz sonrası durumlarda herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

XRCC1 protein ekspresyon sonuçları ile hastaların klinik verileri arasındaki ilişki araştırılmıştır (Tablo-16), Hemodiyaliz öncesi üre ve kreatin değerleri ile XRCC1 protein ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Bununla beraber hemodiyaliz sonrası XRCC1 protein ekspresyon sonuçları ile klinik veriler arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır (Tablo-16).

	Diyaliz Öncesi		Diyaliz Sonrası	
	r	p	r	p
ÜRE	-0,233	0,308	0,326	0,149
KREATİNİN	-0,313	0,167	-0,103	0,657
KALSİYUM	-0,050	0,828	0,180	0,434
ALBUMİN	0,180	0,435	0,194	0,401
ŞEKER	-0,311	0,171	0,082	0,724
CRP	-0,210	0,361	0,193	0,402
ÜRİK ASİT	-0,172	0,455	0,213	0,354
HEMOGLOBİN	-0,243	0,289	0,333	0,141

Tablo 15: XRCC1 mRNA ekspresyonunun hastaların klinik verileri ile korelasyonları.

	Diyaliz Öncesi		Diyaliz Sonrası	
	r	p	r	p
ÜRE	0,452	0,040*	-0,074	0,750
KREATİNİN	0,568	0,007*	-0,124	0,594
KALSIYUM	0,193	0,403	0,139	0,547
ALBUMİN	0,255	0,266	-0,062	0,791
ŞEKER	0,276	0,225	-0,239	0,297
CRP	-0,246	0,281	-0,050	0,831
ÜRİK ASİT	0,036	0,875	0,170	0,460
HEMOGLOBİN	0,245	0,285	-0,415	0,061

Tablo 16: XRCC1 protein ekspresyonunun hastaların klinik verileri ile korelasyonları.

4.5. HEMODİYALİZ TEDAVİSİ ÖNCESİ VE SONRASI PARP1 GEN VE PROTEİN EKSPRESYONU İLE KLİNİK VERİLERİN KORELASYONU

PARP1 gen ekspresyon sonuçları ile hastaların klinik verileri arasındaki ilişki araştırılmıştır (Tablo-17). Hemodiyaliz öncesi ve hemodiyaliz sonrası durumlarda herhangi bir korelasyon saptanmamıştır.

PARP1 protein ekspresyon sonuçları ile hastaların klinik verileri arasındaki ilişki araştırılmıştır (Tablo-18), Hemodiyaliz öncesi kreatin değerleri ile PARP1 protein ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Hemodiyaliz sonrası ise, PARP1 protein ekspresyon düzeyleri ile CRP ve ürik asit değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde negatif bir korelasyon saptanmıştır (Tablo-18).

	Diyaliz Öncesi		Diyaliz Sonrası	
	r	p	r	p
ÜRE	-0,172	0,455	0,179	0,439
KREATİNİN	-0,169	0,464	-0,041	0,861
KALSIYUM	-0,243	0,289	0,053	0,818
ALBUMİN	0,349	0,121	0,090	0,698
ŞEKER	-0,388	0,082	0,167	0,469
CRP	0,028	0,903	0,316	0,162
ÜRİK ASİT	0,239	0,296	0,289	0,204
HEMOGLOBİN	-0,249	0,276	0,354	0,116

Tablo 17: PARP1 mRNA ekspresyonunun hastaların klinik verileri ile korelasyonları.

	Diyaliz Öncesi		Diyaliz Sonrası	
	r	p	r	p
ÜRE	0,995	0,064	0,644	0,555
KREATİNİN	1,000	0,011*	0,512	0,657
KALSIYUM	0,784	0,427	0,560	0,622
ALBUMİN	-0,915	0,265	-0,617	0,576
ŞEKER	-0,281	0,819	0,194	0,876
CRP	-0,073	0,953	-1,000	0,014*
ÜRİK ASİT	0,095	0,939	-0,998	0,043*
HEMOGLOBİN	0,734	0,475	-0,512	0,657

Tablo 18: PARP1 protein ekspresyonunun hastaların klinik verileri ile korelasyonları.

5. TARTIŞMA

Otuz-kırk yıl önce, SDBY’i olan hastalar günler-haftalar içinde kaybedilirdi. Diyaliz teknolojisinde sağlanan gelişmeler, bu hastalarda önce yaşam süresini uzatmış, daha sonra yaşam kalitesinin artmasını sağlamıştır. KBY medikal tedavisinde kullanılan yeni ilaçların bulunması ve geliştirilmesi ile vasküler girişim yolu yaratmada sağlanan başarılar da bu hastalarda yaşam süresi ve kalitesinin artmasına katkıda bulunmuştur.

Son dönem böbrek yetmezliği olan hastaların sayısı her yıl yaklaşık %10 civarında artış göstermektedir (Rooijens ve ark., 2005). Bu artışı göz önünde bulundurduğumuzda diyaliz tedavisine olan ihtiyaç gün ve gün atmaktadır. Farklı sosyal, tıbbi ve ekonomik özellikleri olan hastalarda kullanılacak tedavi modeli, hastaların yaşam kalitelerini kaldığı yerden en iyi şekilde sürdürebilecekleri şekilde seçilmelidir. Farklı diyaliz tedavilerinin yaşam kalitesi üzerine etkisini araştıran çalışmalar bulunmaktadır (Mittal ve ark., 2001, Altıntepe ve ark., 2005).

Hemodiyaliz, son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda kandaki toksik maddelerin seviyesinin azaltıldığı hayat kurtarıcı bir işlemdir. Bununla beraber diyaliz tedavisinde kullanılan membran veya kontamine olmuş diyalizat sıvıları ROT üretiminin artmasına, artan ROT miktarını karşıtı antioksidan savunma sistemi yetersiz kalmaktadır (Sies, 1997). ROT’ların verdiği hücresel hasar Bagatini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla gösterilmiştir. Tarng ve arkadaşları HD tedavisi gören hastalarda oluşan DNA hasarını Vitamin C desteğı alan ve almayan olarak ayırmış; 8-OHdG DNA hasar belirteci seviyesini incelemiştir. Vitamin C desteğı alan HD hastalarında almayanlara göre 8-OHdG seviyesinin azaldığını tespit etmişlerdir. Bagatini çalışmasında Tip II diyabetli HD tedavisi gören hastalarda, HD öncesi ve sonrası Comet Assay yöntemi ile DNA hasar düzeylerini araştırmış ve HD tedavisinden sonra DNA hasar düzeyinin, HD tedavisinden önceki DNA hasar düzeyinden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Williams ve ark., 2000). Oluşan bu hasarlardan baz modifikasyonları ve tek zincir kırıkları BER mekanizması ile onarıldığı bilinmektedir (Razqallah, 2008). Bu

mekanizmada yer alan XRCC1 ve PARP1 birlikte çalışarak oluşan bu hasarların onarımında birlikte rol alırlar (Ahmeda ve ark., 2008). Biz de çalışmamızda HD tedavisi gören KBY hastalarında XRCC1 ve PARP1 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerini HD öncesi ve sonrası dönemde incelemeyi amaçladık. XRCC1 veya PARP1 mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri ile diyaliz süreci arasındaki ilişkiyi araştıran literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda HD öncesi ve sonrası dönemde XRCC1 ve PARP1 gen ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Pang ve arkadaşları, HepG2 hepatositlerinde in vitro olarak uygulanan hiperglisemi ile oluşturdukları oksidatif DNA hasarında, XRCC1 ve PARP1 mRNA ve protein ekspresyon düzeyini incelemişlerdir (Jing ve ark., 2012). Bu çalışmada düşük ve yüksek olarak iki farklı doz kullanarak oluşturdukları DNA hasarlarında, hem XRCC1 hem de PARP1 mRNA ve protein ekspresyonlarında anlamlı bir değişim tespit etmemişlerdir. Pang ve arkadaşları ayrıca, uygulama süreleri ile ekspresyonların değişimlerini de incelemişler; XRCC1 mRNA ekspresyonu için hem düşük doz hem de yüksek doz uygulamada 6 güne kadar çıkardıkları uygulama süresinde herhangi bir değişim görmemişlerdir. PARP1 mRNA ekspresyonunda ise yüksek dozda herhangi bir anlamlı fark tespit edilmezken, düşük doz uygulamada 6 gününde ilk güne kıyasla istatistiksel olarak anlamsız bir düşme tespit etmişlerdir. PARP1 protein ekspresyonlarında da uygulama süresi ve uygulanan doz açısından herhangi bir anlamlı fark tespit etmemişlerdir.

Bu çalışmanın sonuçları bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Özellikle XRCC1 ve PARP1 mRNA ekspresyonları diyaliz sürecinin oluşturduğu kısa süreli değişimlerden çok fazla etkilenmemektedir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz PARP1 ile XRCC1 arasındaki pozitif korelasyon bulgusu da Pang ve arkadaşlarının çalışması ile uygunluk göstermektedir. Bu çalışmada XRCC1 ve PARP1 dışında başka BER mekanizması ile ilgili protein (OGG1, Pol β , Lig3) ekspresyonlarına da bakılmış, diğer proteinlerde farklı sonuçlar alınırken XRCC1 ve PARP1'deki sonuçlar birbirine paralel çıkmıştır.

Hemodiyaliz sürecinin farklı süreçlerde rol oynayan gen ekspresyonuna olan etkisini inceleyen çalışmalar vardır.

Maroti ve arkadaşları, oksidatif strese karşı koruyucu rol oynayan Heme oxygenase-1 (HO-1) geninin ekspresyon düzeyini HD öncesi ve sonrası dönemde araştırmıştır. Bu çalışmada hastalar tedavi aldıkları süre baz alınarak kısa süreli ve uzun süreli tedavi grubu olarak iki gruba ayrılmıştır. Kısa süreli tedavi grubundaki hastalarda HO-1 mRNA ekspresyonu, uzun süre tedavi görenlere kıyasla yüksek tespit edilmiştir. Kısa süreli tedavi grubundaki hastalarda, bazalde yüksek olan HO-1 mRNA ekspresyonunun HD tedavisi sonrası düştüğü fakat bu düşüşün anlamlı olmadığı tespit edilmiştir, ayrıca 48 saat sonra bile bu düzey bazal düzeye göre düşük olarak kalmıştır. Diğer yandan uzun süre tedavi gören hastalarda düşük olan bazal HO-1 mRNA düzeyi HD tedavisi sonrası artmış fakat 48 saat sonra bazal düzeye geri dönmüştür. HO-1 mRNA ekspresyonunun, uzun süreli bir adaptasyon süreci ile ilişkili olarak değiştiğini vurgulayarak, uzun süre tedavi gören hastalardaki düşük HO-1 mRNA düzeyinin bu hastalardaki ateroskleroza yatkınlığa yol açtığını söylemişlerdir.

Zanetti ve arkadaşları HD tedavisi gören hastalarda apoptoz regülasyonunda görev alan p66 ile oksidatif süreçle ilişkili TNF- α ve PTX3 mRNA düzeylerini kontrol grubuyla karşılaştırmış ve HD tedavisi gören hastalarda her 3 gen ekspresyonunda artmış olduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber, bu çalışmada hemodiyaliz sürecinin etkisi araştırılmamıştır.

Calo La ve arkadaşları ise SDBY hastalarında standart HD tedavi yöntemi ile HRF (Haemodiafiltration with on-line regeneration of ultrafiltrate) yönteminin oksidatif strese markırlarının ekspresyonuna olan etkisini karşılaştırmıştır. HD'e kıyasla HRF yönteminin uygulandığı hastalarda, p22phox ve PAI-1 mRNA ekspresyonunun azaldığı, HO-1 mRNA ekspresyonunda ise değişme olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca HRF yönteminin uygulandığı hastalarda, HD tedavisi uygulanan hastalara kıyasla plazma Ox-LDL miktarının azaldığını da tespit edilmiştir.

XRCC1 veya PARP1 protein ekspresyon düzeylerini HD öncesi ve sonrası dönemlerde araştırdığımızda, HD öncesi ve sonrası dönemlerde herhangi bir fark tespit edilmedi. Ayrıca hastaların bazılarında PARP1 protein ekspresyonu tespit edilmedi. Bunun sebebi PARP1 proteinin hem DNA onarım mekanizmasında hem de apoptozda görev alması olabilir.

PARP1 proteini hücre içinde bütün formda veya iki parçaya ayrılmış formda bulunabilir. PARP1'in bütün formu DNA onarımında rol oynarken, apoptoz sürecine

giren hücrelerde PARP1 proteini kaspaz 3 tarafından iki parçaya bölünür ve bu parçalar apoptoz sürecinde rol oynar (Damien ve ark., 2001). Bizim çalışmamızda PARP1 proteinini tespit etmek için kullandığımız antikör bütün olan formuna spesifik olduğu için, apoptotik süreçte yer alan parçalara bağlanmamaktadır. Bu nedenle, ekspresyon görmediğimiz hastalarda süreç apoptoza kaymış olabilir. PARP1 protein ekspresyonunun kontrolünde kullanılan post-translasyonel modifikasyon, Pang ve arkadaşlarının bulgusunu da desteklemektedir. Bu çalışmada da PARP1'in post-translasyonel modifikasyonu vurgulanmaktadır. Özellikle yüksek hiperglisemi ile oluşturulan DNA hasarlarında, PARP1'in post-translasyonel modifikasyona uğradığı belirtilmektedir.

Kronik böbrek yetmezliği olan diyaliz tedavisi gören hastalarda apoptoz oranının arttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Saad ve arkadaşları ESRD'li çocuklarda, T ve B lenfositlerinde apoptoz belirteç olan Annexin V'i flowsitometri yöntemi ile incelemişler ve kontrol grubuna kıyasla hasta grubunda apoptotik T ve B lenfositlerin daha yüksek oranda tespit etmişlerdir. Zahran ve arkadaşları da KBY'li hastaların nötrofillerinde annexin V ve CD18 ekspresyonunun kontrol grubuna kıyasla daha yüksek tespit etmişlerdir.

Eleftheriadis ve arkadaşları, HD tedavisi gören hastalarda mitokondriyal hasar belirteci olarak sitokrom c düzeyini ve inflamasyon belirteci olarak IL-6 düzeyini ELISA yöntemiyle incelemişler. Kontrollere kıyasla hastalardaki sitokrom c ve IL-6 miktarının anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Friedrich ve arkadaşlarının çalışmasında da HD sürecinin apoptotik gen ekspresyonunu uyardığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada CD95/FAS, kaspaz 5, kaspaz 8, DR5/TRAILR2 gibi apoptotik ve Bcl-2, BAG3 gibi anti-apoptotik gen ekspresyonları incelenmiştir. CD95/FAS, kaspaz 8 ve DR5/TRAILR2 mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir artış gözlemlenmiş, kaspaz 5 ve Bcl-2 mRNA ekspresyonlarında da artış görülmüş fakat istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmemiştir. BAG3 mRNA ekspresyonunda ise anlamlı derecede azalma görülmüştür. Bu çalışmadaki sonuçlar, HD sürecinin daha çok apoptotik yollarla ilgili gen ekspresyonunda etkili olduğunu, bizim çalışmamızdaki DNA tamir yolağında etkili olmadığını göstermiştir. Bu çalışmada CRP düzeyi ile ekspresyon düzeyleri arasında herhangi bir korelasyon tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamızda da CRP düzeyi ile gen ekspresyonu arasında herhangi bir

korelasyon tespit edilmemiştir. Sadece HD sonrası süreçte PARP1 ekspresyonu ile CRP arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir.

Çalışmamızda gen ve protein ekspresyonlarının klinik verilerle ilişkisi araştırıldığında, gen ekspresyonları ile korelasyon gösteren herhangi bir parametre tespit edilmemiştir. Diğer yandan hemodiyaliz öncesi dönemde üre ve kreatin değerleri ile XRCC1 protein ekspresyon düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Ayrıca hemodiyaliz öncesi dönemde PARP1 protein ekspresyonu ile kreatin arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. Hemodiyaliz sonrası dönemde ise, CRP ve ürik asit değerleri ile negatif bir korelasyon saptanmıştır.

Üre, kreatinin ve ürik asit gibi moleküller böbrek fonksiyon bozukluğunu gösteren en temel biyo-belirteçlerdir. Yüksek üre düzeyinin DNA yapısında bulunan bazlara zarar vererek DNA hasarını meydana getirdiği gösterilmiştir. Bu nedenle üre ve kreatin ile indüklenen DNA hasarının DNA tamir sürecinde rol oynayan XRCC1 ve PARP1 protein düzeyi ile pozitif korelasyon göstermesi normal bir sonuçtur. DNA tamir mekanizmasında görev alan XRCC1 ve PARP1 proteinlerinin etkili olduğunu düşündürmektedir.

Üre döngüsünde zehirli olan amonyağın deaminasyonu sonucu zararsız olan ürik aside çevrildiği bilinmektedir. Bu durumda ürik asit düzeyi ile PARP1 protein ekspresyonu arasındaki negatif korelasyon apoptotik süreci işaret edebilir.

Kronik inflamasyon görülen KBY hastalarında CRP düzeyinin arttığı belirtilmiştir (Corredor ve ark., 2006). Bu durumun ayrıca apoptotik ve aterosklerotik süreci indüklediği ifade edilmektedir. HD sonrası negatif korelasyon bulgusu azalan CRP miktarının PARP1 proteininin apoptotik süreçten DNA tamir sürecindeki role yöneldiğini işaret edebilir.

Çalışmamızda, KBY görülen hastalarda, HD öncesi ve sonrası XRCC1 gen/protein ve PARP1 gen/protein ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Daha önce bu kurguda bir çalışma yapılmaması çalışmamızın özgün değerini ortaya koymaktadır. Elde ettiğimiz veriler özellikler HD süreci ile apoptotik yollar arasındaki ilişki bulgularını destekler niteliktedir. PARP1, hemen hemen bütün kaspazların hücresel hedeflerinden biridir ve PARP1'in kaspazlar tarafından kesilmesi (24-kD ve 89- kD'luk iki fragment) apoptoz işareti olarak kabul edilir (Björn ve ark., 2003) ki, bizim bulgularımız bunu desteklemektedir.

Çalışmamızın sonuçlarını göz önüne alarak hasta sayısı arttırılıp ve DNA tamir moleküllerinin yanında apoptozda rol alan moleküllerin yer aldığı, DNA hasar ve apoptotik markırların da araştırılacağı daha geniş çaplı bir çalışma mevcut durum hakkında daha bilgilendirici olabilir.

KAYNAKLAR

Abraham LK. (2006). Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş. Palme Yayıncılık., 365-366.

AJCC. (2010). Breast. İçinde Edge, S.B. ve ark., American Joint Committee on Cancer: AJCC cancer staging manual. (6th ed.). New York: Springer, 347–367.

Akpolat T, Utaş C., (1997) Hematolojik sorunlar ve eritropoietin kullanımı. Hemodiyaliz Hekimi El Kitabı. 154-167.

Altekruse, S.F., Kosary, C.L., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Waldron, W. ve ark. (eds.). (2010). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. Bethesda, MD: National Cancer Institute.

American Cancer Society. (2012). Breast Cancer Facts & Figures. Atlanta, GA: American Cancer Society.

Andreassen, C.N., Alsner, J., Overgaard, J. (2002). Does variability in normal tissue reactions after radiotherapy have a genetic basis—where and how to look for it? *Radiother Oncol*, 64, 131–140.

Andreassen, C.N., Alsner, J., Overgaard, M., Overgaard, J. (2003). Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol*, 69, 127-135.

Andreassen, C.N., Alsner, J., Overgaard, M., Sorensen, F.B., Overgaard, J. (2006). Risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis in relation to single nucleotide polymorphisms in TGFB1, SOD2, XRCC1, XRCC3, APEX and ATM – a study based on DNA from formalin fixed paraffin embedded tissue samples. *Int J Radiat Biol*, 82, 577–586.

Angelini, S., Kumar, R., Carbone, F., Maffei, F., Forti, G.C., Violante, F.S., Lodi, V. ve ark. (2005). Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionising radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes. *Mutat Res*, 570, 105-117.

Araujo, S.J., Wood, R.D., (1999). Protein complexes in nucleotide excision repair. *Mut Res*, 435, 23-33.

Badie, C., Dziwura, S., Raffy, S., Tsigani, T., Alsbeih, G., Moody, J. ve ark. (2008). Aberrant CDKN1A transcriptional response associates with abnormal sensitivity to radiation treatment. *Br J Cancer*, 98, 1845-1851.

Banath, J.P., Fushiki, M., Olive, P.L. (1998). Rejoining of DNA single and double-strand breaks in human white blood cells exposed to ionizing radiation. *Int J Radiol Biol*, 73, 649-660.

Barnett, .G.C., Coles, C.E., Elliot, R.M., Baynes, C., Luccarini, C., Conroy, D. ve ark. (2012). Independent validation of genes and polymorphisms reported to be associated with radiation toxicity: a prospective analysis study. *Lancet Oncol*, 13, 65-77.

Barnett, G.C., West, C.M.L., Dunning, A.M., Elliott, R.M., Coles, C.E., Pharoah, P.D.P. ve ark. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer*, 9, 134-142.

Bentzen, S., Harari, P., Tome, W., Mehta, M. (Eds.). (2008). *Radiation Oncology Advances*. New York: Springer.

Beskow, C., Skikuniene, J., Holgersson, A., Nilsson, B., Lewensohn, R., Kanter, L. Ve ark. (2009). Radioresistant cervical cancer shows upregulation of the NHEJ proteins DNA-PKcs, Ku70 and Ku86. *Br J Cancer*, 101, 816-821.

Beyzadeoğlu, M., Özyiğit, G., Ebruli, C. (2010). *Basic Radiation Oncology*. Berlin Heidelberg: Springer.

Bishay, K., Ory, K., Olivier, M.F., Lebeau, J., Levalois, C., Chevillard, S. (2001). DNA damage-related RNA expression to assess individual sensitivity to ionizing radiation. *Carcinogenesis*, 22, 1179-1183.

Blaszyk, H., Vaughn, C.B., Hartmann, A., McGovern, R.M., Schroeder, J.J., Cunningham, J. ve ark. (1994). Novel pattern of p53 gene mutations in an American black cohort with high mortality from breast cancer. *Lancet*, 343, 1195-1197.

Bonadonna, G., Veronesi, U., Brambilla, C., Ferrari, L., Luini, A., Greco, M. ve ark. (1990). Primary chemotherapy to avoid mastectomy in tumors with diameters of three centimeters or more. *J Natl Cancer Inst*, 82, 1539-1545.

Borgmann, K., Hoeller, U., Nowack, S., Bernhard, M., Röper, B., Brackrock, S. ve ark. (2008). Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may predict the risk of acute reaction after radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 71, 256-264.

Brady, L.W., Heilmann, H.P., Molls, M., Nieder, C. (Eds.). (2011). *Decision Making in Radiation Oncology*. Berlin Heidelberg: Springer.

Breast Cancer Linkage Consortium. (1999). Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 91, 1310-1316.

Brem, R., Cox, D.G., Chapot, B., Moullan, N., Romestaing, P., Gerard, J.P. ve ark. (2006). The XRCC1 _77T!C variant: haplotypes, breast cancer risk, response to radiotherapy and the cellular response to DNA damage. *Carcinogenesis*, 27, 2469-2474.

Burke, W., Daly, M., Garber, J., Botkin, J., Kahn, M.J., Lynch, P. ve ark. (1997). Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. Cancer Genetics Studies Consortium. *JAMA*, 277, 997-1003.

Burnet, N.G., Wurm, R., Nyman, J., Peacock, J.H. (1996). Normal tissue radiosensitivity-how important is it? *Clin Oncol*, 8, 25-34.

Caldecott, K.W. (2003). XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*, 2, 955-969.

Carles, J., Monzo, M., Amat, M., Jans, S., Miguel, M., Albanell, J. ve ark. (2006). Single-nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 66, 1022-1030.

Carlomagno, F., Burnet, N.G., Turesson, I., Nyman, J., Peacock, J.H., Dunning, A.M. ve ark. (2000). Comparison of DNA repair protein expression and activities

between human fibroblast cell lines with different radiosensitivities. *Int J Cancer*, 85, 845-849.

Chadha, M. (2011). Breast Cancer. İçinde Brady, L.W., Heilmann, H.P., Molls, M., Nieder, C. (Eds.), *Radiation Oncology An Evidence-Based Approach*. Berlin Heidelberg: Springer; 207-258.

Chalmers, A.J. (2004). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 and ionizing radiation: sensor, signaller and therapeutic target. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 16, 29-39.

Chang-Claude, J., Popanda, O., Tan, X.L., Kropp, S., Helmbold, I., Fournier, D.V. ve ark. (2005). Association between Polymorphisms in the DNA Repair Genes, XRCC1, APE1, and XPD and Acute Side Effects of Radiotherapy in Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*, 11, 4802-4809.

Chistiakov, D.A., Voronova, N.V., Chistiakov P.A. (2008). Genetic variations in DNA repair genes, radiosensitivity to cancer and susceptibility to acute tissue reactions in radiotherapy-treated cancer patients. *Acta Oncologica*, 47, 809-824.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast. (1997). Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet*, 350, 1047-1059.

Curtin, N.J. (2005). PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med*, 7, 1-20.

Deapen, D., Liu, L., Perkins, C., Bernstein, L., Ross, R.K. (2002). Rapidly rising breast cancer incidence rates among Asian-American women. *Int J Cancer*, 99, 747-750.

Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer*, 104, 1129-1137.

Delanian, S., Lefaix, J.L. (2007). Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin Radiat Oncol*, 17, 99-107.

Djuzenova, C.S., Mühl, B., Fehn, M., Oppitz, U., Müller, B., Flentje, M. (2006). Radiosensitivity in breast cancer assessed by the Comet and micronucleus assays. *Br J Cancer*, 94, 1194-1203.

Fang, Z., Kozlov, S., McKay, M.J., Woods, R., Birrell, G., Suprong, C.N. ve ark. (2010). Low levels of ATM in breast cancer patients with clinical radiosensitivity. *Genome Integr*, 1, 1-12.

Fenech, M. (1993). The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations. *Environ Health Perspect*, 101, 101-107.

Fischer, U., Janicke, R.U., Schulze-Osthoff, K. ve ark. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10, 76-100.

Gabelova, A., Farkasova, T., Gurska, S., Machackova, Z., Lucacko, P., Witkovsky, V. (2008). Radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes from healthy donors and cervical cancer patients; the correspondence of in vitro data with the clinical outcome. *Neoplasma*, 55, 182-191.

Ganguly, B.B. (1993). Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors: related the donor's age. *Mutat Res*, 295, 135-148.

Garcia-Quispes, W.A., Pastor, S., Galofre, P., Biarnes, F., Castell, J., Velazquez, A. ve ark. (2013). Influence of DNA-repair gene variants on the micronucleus frequency in thyroid cancer patients. *Mutat Res*, 750, 34-39.

Ginsberg, G., Angle, K., Guyton, K., Sonawane, B. (2011). Polymorphism in the DNA repair enzyme XRCC1: Utility of current database and implications for human health risk assessment. *Mutat Res*, 727, 1-15.

Giotopoulos, G., Symonds, R.P., Foweraker, K. Griffin, M., Peta, I., Osman A. ve ark. (2007). The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of telangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes. *Br J Cancer*, 96, 1001-1007.

Goncalves, A., Finetti, P., Sabatier, R., Gilabert, M., Adelaide, J., Borg, J.P. ve ark. (2011). et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 mRNA expression in human breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 1, 273-281.

Grabrick, D.M., Hartmann, L.C., Cerhan, J.R., Vierkant, R.A., Therneau, T.M., Vachon, C.M. ve ark. (2000). Risk of breast cancer with oral contraceptive use in women with a family history of breast cancer. *JAMA*, 284, 1791-1798.

Gurska, S., Farkasova, T., Gabelova, A. (2007). Radiosensitivity of cervical cancer cell lines: the impact of polymorphisms in DNA repair genes. *Neoplasma*, 54, 195-201.

Hall, E.J. (2000). *Radiobiology for the radiologist*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Hall, E.J. (2009). *Radiation biology for pediatric radiologists*. *Pediatr Radiol*, 39, 57-64.

Halperin, E.C., Perez, C.A., Brady, L.W. (Eds.). (2008). *Perez and Brady's Principles and Practice of Radiation Oncology*. (5th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Hamajima, N., Hirose, K., Tajima, K., Rohan, T., Calle, E.E., Heath, C.W. ve ark. (2002). Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer*, 87, 1234-1245.

Hao, B., Miao, X., Zhang, X., Sun, T., Liang, G., Zhao, Y. ve ark. (2006). A novel T-77C polymorphism in DNA repair gene XRCC1 contributes to diminished promoter activity and increased risk of non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 25, 3613-3620.

Herceg, Z., Wang, Z.Q. (2001). Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res*, 477, 97-110.

Herring, C.J., West, C.M., Wilks, D.P., Davidson, S.E., Hunter, R.D., Berry, P. (1998). Levels of the DNA repair enzyme human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1, APEX, Ref1) are associated with the intrinsic radiosensitivity of cervical cancers. *Br J Cancer*, 78, 1128-1133.

Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-374.

Hoeller, U., Borgmann, K., Bonacker, M., Kuhlmei, A., Bajrovic, A., Jung, H. ve ark. (2003). Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol*, 69, 137-144.

Hu, J.J., Smith, T.R., Miller, M.S., Mohrenweiser, H.W., Golden, A. (2001). Case LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*, 22, 917-922.

Hu, Z., Ma, H., Lu, D., Xhou, J., Chen, Y., Xu, L. ve ark. (2005). A promoter polymorphism (-77 T > C) of DNA repair gene XRCC1 is associated with risk of lung cancer in relation to tobacco smoking. *Pharmacogenet Genomics*, 15, 457-463.

Hümmerich, J., Schneider, G.W., Popanda, O., Celebi, O., Claude, J.C., Kropp, S. ve ark. (2006). Constitutive mRNA expression of DNA repair-related genes as a biomarker for clinical radio-resistance: A pilot study in prostate cancer patients receiving radiotherapy. *Int J Radiat Biol*, 82, 593-604.

Jagtap, P., Szabo, C. (2005). Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 421-440.

Jeggo, P.A., Lobrich, M. (2005). Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle*, 4, 359-362.

Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C. ve ark. (2006). Cancer statistics, *CA Cancer J Clin*, 56, 106-130.

Joiner, M., van der Kogel, A. (Eds.). (2009). *Basic Clinical Radiobiology*. (2nd. ed.). Great Britain: Hodder Arnold.

Joslyn, S.A., West, M.M. (2000). Racial differences in breast carcinoma survival. *Cancer*, 88, 114-123.

Kato, N., Morita, H., Sugiyama, T., Kurihara, H., Tsubaki, S., Nabika, T. ve ark. (2000). Evaluation of the poly(ADP-ribose) polymerase gene in human stroke. *Atherosclerosis*, 148, 345-352.

Konopacka, M. (2003). Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. *Neoplasma*, 50, 380-382.

Kostylev, V.A. (2000). Medical physics: yesterday, today, and tomorrow. *Biomed Eng*, 34, 106-112.

Lacombe, J., Azria, D., Mange, A., Solassol, J. (2013). Proteomic approaches to identify biomarkers predictive of radiotherapy outcomes. *Expert Rev Proteomics*, 10, 33-42.

Lagerwef, S., Vrouwe, M.G., Overmeer, R.M., Fouteri, M.I., Mullenders, L.H.F. (2011). DNA damage response and transcription. *DNA Repair*, 10, 743-750.

Land, C.E., Boice, J.D., Shore, R.E., Norman, J.E., Tokunaga, M. (1980). Breast cancer risk from low-dose exposures to ionizing radiation: results of parallel analysis of three exposed populations of women. *J Natl Cancer Inst*, 65, 353-376.

Langelier, M.F., Servent, K.M., Rogers, E.E., Pascal, J.M. (2008). A third zincbinding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J Biol Chem*, 283, 4105–4114.

Lee, J.H., Tak, J.K., Park, K.M., Park, J.W. (2007). N-t-Butyl hydroxylamine regulates ionizing radiation-induced apoptosis in U937 cells. *Biochimie*, 89, 1509-1516.

Lehucher-Michel, M.P., Di Giorgio, C., Amara, Y.A., Laget, M., Botta, A. (1995). The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: Effect of smoking. *Mutagenesis*, 10, 329–332.

Lewanski, C.R., Gullick, W.J. (2001). Radiotherapy and cellular signaling. *Lancet Oncol*, 2, 366.

MacMahon, B. (2006). Epidemiology and the causes of breast cancer. *Int J Cancer*, 118, 2373-2378.

MacMahon, B., Purde, M., Cramer, D., Hint, E. (1982). Association of breast cancer risk with age at first and subsequent births: a study in the population of the Estonian Republic. *J Natl Cancer Inst*, 69, 1035-1038.

Masutani, M., Nozaki, T., Nakamoto, K., Nakagama, H., Suzuki, H., Kusuoka, O. ve ark. (2000). The response of Parp knockout mice against DNA damaging agents, *Mutat Res*, 462, 159–166.

McGuire, W.L., Clark, G.M. (1992). Prognostic factors and treatment decisions in axillary-node-negative breast cancer. *N Engl J Med*, 326, 1756-1761.

McGuire, W.L., Tandon, A.K., Allred, D.C., Chamness, G.C., Clark, G.M. 1990. How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*, 82, 1006-1015.

Miller, A.B., Howe, G.R., Sherman, G.J., Lindsay, J.P., Yaffe, M.J., Dinner, P.J. ve ark. (1989). Mortality from breast cancer after irradiation during fluoroscopic examinations in patients being treated for tuberculosis. *N Engl J Med*, 321, 1285-1289.

Min, J.H., Pavletich, N.P. (2007). Recognition of DNA damage by the Rad4 nucleotide excision repair protein. *Nature*, 449, 570-575.

Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., Iliakis, G. (2013). DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front Oncol*, 3, 1-18.

Mohrenweiser, H.W., Carrano, A.V., Fertitta, A., Perry, B., Thompson, L.H., Tucker, J.D. ve ark. (1989). Refined mapping of the three DNA repair genes, ERCC1, ERCC2, and XRCC1, on human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet*, 52, 11-14.

Mollahaliloğlu, S., Başara, B.B., Eryılmaz, Z. (Eds.). (2010). Sağlık İstatistikleri Yıllığı. Ankara: Kalkan Ofset.

Moller, P., Knudsen, E., Loft, S., Wallin, H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol*, 9, 1005-1015.

Moullan, N., Cox, D.G., Angele, S., Romestaing, P., Gerard, J.P., Hall, J. (2003). Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 1168–1174.

Nocentini, S. (1999). Rejoining kinetics of DNA single- and doublestrand breaks in normal and DNA ligase deficient cells after exposure to ultraviolet C and gamma radiation: an evaluation of ligating activities involved in different DNA repair processes. *Radiat Res*, 151, 423–432.

Odagiri, Y., Uchida, H., Shibasaki, S. (1997). Interindividual variation in cytogenetic response to X-ray and colchicine measured with the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutat Res*, 381, 1-13.

Osborne, C.K. (1998). Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat*, 51, 227-238.

Perez, E.A., Roche, P.C., Jenkins, R.B., Reynolds, C.A., Halling, K.C., Ingle, J.N. ve ark. (2002). HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc*, 77, 148-154.

Pinar, B., Henriquez-Hernandez, L.A., Lara, P.C., Bordon, E., Rodriguez-Gallego, C., Lloret, M. ve ark. (2010). Radiation induced apoptosis and initial DNA damage are inversely related in locally advanced breast cancer patients. *Radiat Oncol*, 5, 1-5.

Rieger, K.E., Hong, W.J., Tusher, V.G., Tang, J., Tibshirani, R., Chu, G. (2004). Toxicity from radiation therapy associated with abnormal transcriptional responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 6635-6640.

Robson, M.E., Boyd, J., Borgen, P.I., Cody, H.S. (2001). Hereditary breast cancer. *Curr Probl Surg*, 38, 387-480.

Rojo, F., Garcia-Parra, J., Zazo, S., Tusquets, I., Ferrer-Lozano, J., Menendez, S. ve ark. (2011). Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer. *Ann Oncol*, 23, 1156-1164.

Rosenstein, B.S. (2011). Identification of SNPs associated with susceptibility for development of adverse reactions to radiotherapy. *Pharmacogenomics*, 12, 267-275.

Rubin, P., (1983). *Clinical Oncology A Multidisciplinary Approach*. American Cancer Society.

Rzeszowska-Wolny, J., Polyvoda, O., Polanska, J., Wygoda, A., Hancock, R. (2008). Relationships between acute reactions to radiotherapy in head and neck cancer patients and parameters of radiation-induced DNA damage and repair in their lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 84, 635-642.

Sak, A., Fegers, I., Groneberg, M., Stuschke, M. (2008). Effect of separate depletion on ionizing radiation-induced cell cycle checkpoints and survival in human lung cancer cell lines. *Cell Prolif*, 41, 660-670.

Samanta, S., Dey, P. (2010). Micronucleus and Its Applications. *Diagn Cytopathol*, 40, 84-90.

Schairer, C., Lubin, J., Troisi, R., Sturgeon, S., Brinton, L., Hoover, R. (2000). Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA*, 283, 485-491.

Shall, S., De Murcia, G. (2000). Poly (ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res*, 460, 1–15.

Shivji, M.K.K., Podust, V.N., Hübscher, U., Wood, R.D. (1995). Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase ϵ in the presence of PCNA, RFC and RPA. *Bio-chemistry*, 34, 5011–5017.

Skiöld, S., Naslund, I., Brehwens, K., Andersson, A., Wersall, P., Lidbrink, E. ve ark. (2013). Radiation-induced stress response in peripheral blood of breast cancer patients differs between patients with severe acute skin reactions and patients with no side effects to radiotherapy. *Mutat Res*, (baskıda).

Slonina, D., Biesaga, B., Urbanski, K., Kojs, Z. (2008). Comparison of chromosomal radiosensitivity of normal cells with and without HRS-like response and normal tissue reactions in patients with cervix cancer. *Int J Radiat Biol*, 84, 421-428.

Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A. ve ark. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 8418–8423.

Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., McBride, H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol*, 4, 529-536.

Sultana, R., Abdel-Fatah, T., Abbotts, R., Hawkes, C., Albarakati, N., Seedhouse, C. ve ark. (2013). Targeting XRCC1 deficiency in breast cancer for personalized therapy. *Cancer Res*, 73, 1621-1634.

Svensson, J.P., Stalpers, L.J., Esveldt-van Lange, R.E., Franken, N.A., Haveman, J., Klein, B. ve ark. (2006). Analysis of gene expression using gene sets discriminates cancer patients with and without late radiation toxicity. *PLoS Med*, 3, e422.

Tapias, A., Auriol, J., Forget, D., Enzlin, J.H., Scharer, O.D., Coin, F. ve ark. (2004). Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors. *J Biol Chem*, 279, 19074-19083.

Tobias, JS. (1996). The role of radiotherapy in the management of cancer – an overview. *Ann Acad Med Singapore*, 25, 371–379.

Tureson, I., Nyman, J., Holmberg, E., Odén, A. (1996). Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 36, 1065-1075.

Van Hoften, C., Burger, H., Peeters, P.H., Grobbee, D.E., Van Noord, P.A., Leufkens, H.G. (2000). Long-term oral contraceptive use increases breast cancer risk in women over 55 years of age: the DOM cohort. *Int J Cancer*, 87, 591-594.

Vens, C., Begg, A.C. (2010). Targeting Base Excision Repair as a Sensitization Strategy in Radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*, 20, 241-249.

Vral, A., Thierens, E., Baeyens, A., De Ridder, L. (2002). The micronucleus and G2-phase assays for human blood lymphocytes as biomarkers of individual sensitivity to ionizing radiation: Limitations imposed by intraindividual variability. *Radiat Res*, 157, 472-477.

Wang, Z., Wang, F., Tang, T., Guo, C. (2012). The role of PARP1 in the DNA damage response and its application in tumor therapy. *Front Med*, 6, 156-164.

Warnecke-Eberz, U., Vallböhmer, D., Alakus, H., Kütting, F., Lurje, G., Bollschweiler, E. ve ark. (2009). ERCC1 and XRCC1 gene polymorphisms predict

response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer. *J Gastrointest Surg*, 13, 1411-1421.

Weltin, D., Holl, V., Hyun, J.W., Dufour, P., Marchal, J., Bischoff, P. (1997). Effect of 6(5H)-phenanthridinone, a poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, and ionizing radiation on the growth of cultured lymphoma cells. *Int J Radiat Biol*, 72, 685-692.

West, C.C., Dunning, A.M., Rosenstain, B.B. (2012). Genome-wide association studies and prediction of normal tissue toxicity. *Semin Radiat Oncol*, 22, 91-99.

West, S.C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 435-445.

Widel, M., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek-Zwierzycka, K., Swierniak, A. (2003). Radiation-induced micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is correlated with normal tissue damage in patients with cervical carcinoma undergoing radiotherapy. *Radiat Res*, 159, 713-721.

Wiebalk, K., Schmezer, P., Kropp, S., Chang-Claude, J., Celebi, O., Debus, J. et al. (2007). In vitro radiation-induced expression of XPC mRNA as a possible biomarker for developing adverse reactions during radiotherapy. *Int J Cancer*, 121, 2340-2345.

Wittliff, J.L. (1984). Steroid-hormone receptors in breast cancer. *Cancer*, 53, 630-643.

Xie, X.X., Ouyang, S.H., Jin, H.K., Wang, H., Zhou, J.M., Hu, B.Q. (2012). Predictive Value of Xrcc1 Gene Polymorphisms for Side Effects in Patients undergoing Whole Breast Radiotherapy: a Meta-analysis. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13, 6121-6128.

Yanagisawa, T., Urade, M., Yamamoto, Y., Furuyama, J. (1998). Increased expression of human DNA repair genes, XRCC1, XRCC3 and RAD51, in radioresistant human KB carcinoma cell line N10. *Oral Oncol*, 34, 524-528.

Zijno, A., Saini, F., Crebelli, R. (2007). Suitability of cryopreserved isolated lymphocytes for the analysis of micronuclei with the cytokinesis-block method. *Mutagenesis*, 22, 311-315.

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Kronik böbrek hastalarında hemodiyaliz tedavisine bağlı olarak gelişen oksidatif stres sonucu oluşan genomik DNA hasarının tamiri ile ilişkili bazı DNA tamir genlerini incelemek üzere yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi “Hemodiyaliz Sürecinin DNA Hasarı ile İlişkili Gen ve Protein Ekspresyonuna Etkisi” dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ortak katılımı ile hemodiyaliz tedavisine bağlı oluşan genomik DNA hasarının tamiri ve bu tamir mekanizmasının işlevi ile ilgili bir araştırma gerçekleştirilecektir. Bu çalışmaya katılmanız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz doktorun veya çalışmanın beraber yürütüldüğü hekimler tarafından görevlendirilen bir hemşire tarafından, izniniz doğrultusunda kolunuzdan hemodiyalize girmeden önce 10 ml. Ve hemodiyaliz sonrası 10 ml kan almamız gerekmektedir. Bu kandan RNA ve protein elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden ve sosyal güvenlik kuruluşlarından herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Kan alınması sırasında oluşabilecek olası riskler:

1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz.

2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Yapılacak genetik testin getirebileceği olası yararlar: Böyle bir analiz ilgili hastalığın tedavi yönteminin geliştirilmesi açısından yararlı olacaktır. Şu anda bu çalışmanın hemen size veya diğer hastalara bir fayda olarak dönüp dönmeyeceğini

bilmiyoruz. Ancak tedavinin getirmiş olduğu sonuçların moleküler temelinin öğrenilmesi ileride tedaviye yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesinde fayda sağlayacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Araştırma hakkında ek bilgiye 0212 414 30 00-22659 'dan ulaşabilirsiniz.

Bilgilendirilmiş onay formundaki tüm açıklamaları okudum, dinledim, anladım. İstedğim soruları sordum ve cevaplarını aldım. Bu araştırmaya gönüllü olarak hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllü Adı ve Soyadı	İmzası
Tarih	

Açıklamaları yapan	
Araştırmacı Adı ve Soyadı	İmzası
Tarih	

Olur alım işlemini takip eden	
Kişinin Adı ve Soyadı	İmzası
Tarih	

ETİK KURUL KARARI

	Karar No:A-45	Tarih:03 Temmuz 2012
KARAR BİLGİLERİ	Prof.Dr. Mehmet GÜVEN'in danışmanlığında Yüksek Lisans Öğr. Selin ÜNAL'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI:	Prof. Dr. Fatih ALTINDAŞ

ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Fatih ALTINDAŞ (başkan)	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Öner SÜZER (başkan yardımcısı)	Tıbbi Farmakoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (raportör)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Rıza ALTIPARMAK	İç Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Mahmut Reha BAYAR	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Sebahattin SAİP	Nöroloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Fahri ERDOĞAN	Ortopedi ve Travmatoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK	Genel Cerrahi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Nuran Şenel BEŞE	Radyasyon Onkolojisi	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Ertan YURDAKOŞ	Fizyoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Hatun Hanzade DOĞAN	Deontoloji	İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Muhlis Cem AR	İç Hastalıkları	İst. Eğitim ve Araştırma Hast.	E	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	K	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	
Zümrüt GAMLI	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	K	E ☐ H ☐	E ☐ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Selin	Soyadı	Ünal
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	22/05/1988
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	
Email	unal.selin@hotmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Balıkesir Üniversitesi	2010
Lise	Sabancı Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
.			-
.			-
.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Ya zma*	KP DS/ÜDS Pu anı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	63	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	78		
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office, 2010	İyi