

## PROTEİN OKSİDASYONUNUN KLİNİK ÖNEMİ\*

Ufuk ÇAKATAY, Refik KAYALI

**Background.**- Oxidative modifications of enzymes and structural proteins play a significant role in the etiology and/or progression of several human diseases. Oxidatively modified amino acids and their derivatives are being used as markers to assess protein oxidation, and new ones are being currently added to the list. Protein carbonyl content is the most general and well-used biomarker of severe protein oxidation. 3-Nitrotyrosine is thought to be a relatively specific marker of protein oxidation mediated by peroxynitrite. Increased concentrations of both protein carbonyls and 3-Nitrotyrosine have been documented in various human diseases. Rapid and recent progress in the identification of oxidized proteins should provide new diagnostic (possibly pre-symptomatic) biomarkers for oxidative damage, and yield basic information to aid the establishment of an efficacious antioxidant therapy.

Çakatay U, Kayalı R. The clinical importance of protein oxidation. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 140-149.

Serbest radikallerin biyolojik materyallerdeki varlığı yaklaşık 50 yıl kadar önce keşfedilmiştir.<sup>1</sup> Bu olaydan kısa bir süre sonra, Denham Harman oksijen radikallerinin in vivo enzimatik reaksiyonların ürünü olarak meydana gelebileceği hipotezini ortaya atmıştır.<sup>2</sup> Denham Harman 1956'da serbest radikalleri Pandora'nın felaketler kutusuna benzeterek, bunların büyük çaplı hücrel hasar, mutagenез, kanser ve biyolojik yaşlanmanın dejeneratif sürecinden sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür.<sup>2</sup> McCord ve Fridovich'in süperoksit dismutazı keşfinden sonra, organizmadaki serbest radikalleri inceleyen bilim dalı ikinci bir çağa girmiş ve sonuç olarak araştırmacıların çoğu serbest radikallerin biyolojideki önemi konusunda ikna olmuştur.<sup>3</sup> Günümüzde çok sayıda araştırmacı serbest radikallerin DNA, proteinler, lipitler ve hücrenin diğer bileşenleri üzerinde sebep olduğu oksidatif hasarı araştırmaktadır.

Radikal aracılı protein oksidasyonu XX. yüzyılın ortalarından beri araştırılmış olmakla birlikte bu reaksiyonların ürünlerinin in vivo oksidatif hasarın spesifik, genel belirteçleri olarak kullanılması ancak son yıllarda gerçekleşmiştir. Bunun nedeni oluşan ürünlerin yapısının bilinmemesi ve bu ürünleri biyolojik materyalde saptayacak duyarlı metotların mevcut olmamasıdır.<sup>4</sup> Protein oksidasyonunun protein

karbonil (PCO) gibi belirteçlerinin in vivo protein oksidasyonunun derecesini gösterecek bir araç olarak kullanılması ise nispeten daha uzun bir geçmişe dayanmaktadır.<sup>5</sup>

### PROTEİN OKSİDASYONU BELİRTEÇLERİNİN KLİNİK ÖNEMİ

Proteinler oksidanlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir.<sup>6-9</sup> Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipit ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinlerde dahil olmak üzere diğer hücrel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar.<sup>6-9</sup>

Pek çok sayıda mekanizmanın protein oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir.<sup>6-9</sup> Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar: PCO oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, 3-nitrotirozin (3-NT), ditirozin (diTyr), oluşumu olarak sıralanabilir.<sup>6-10</sup> Potansiyel olarak

\***Anahtar Kelimeler:** Protein oksidasyonu, Reaktif oksijen türevleri, hastalıklar; **Key Words:** Protein oxidation, Reactive oxygen species, human diseases; **Alındığı Tarih:** 26 Ağustos 2004; Doç. Dr. Ufuk Çakatay: İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvarı, 34390, Çapa, İstanbul. Dr. Refik Kayalı: İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Biyokimya Anabilim Dalı, 34303, Cerrahpaşa, İstanbul. **Yazışma Adresi (Address):** Doç. Dr. Ufuk Çakatay, Şenesenler Abdüllezal Paşa Sok. No: 9/7 Bostancı, İstanbul

bütün amino açıl yan zincirleri oksidatif modifikasyona uğrayabilme özelliğindedir. Bu yüzden, çok sayıda ve farklı çeşitte oksidatif protein modifikasyonu olmasına bağlı olarak, protein oksidasyonunun tek bir evrensel belirteci yoktur. Bazı oksidatif protein modifikasyonları, hem oksidasyona uğrayan amino asit bakiyesi, hem de oluşturulan ürünler bakımından gayet spesifikdir. Bazı oksidatif protein modifikasyonlar ise global özellik taşır, çok sayıda amino asit bakiyesinde değişikliğe yol açarak, yine çok sayıda ürün oluşturabilir.<sup>9</sup> Spesifik modifikasyonlara tirozin'nin ditirozine dönüşümü, global modifikasyonlara ise Pro, Arg, Lys, ve Thr amino asitlerinin yan zincirlerinin, 4-hidroksi-2-nonenal ile reaksiyonu sonucunda oluşan PCO'ler örnek olarak gösterilebilir.<sup>9</sup> Protein oksidasyonunun saptanmasında HPLC, ELISA, izotop dilüsyon gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi, Western blot ve spektrofotometri teknikleri kullanılmaktadır.<sup>9</sup> 3-NT, diTyr gibi spesifik belirteçler biyolojik materyallerde oldukça düşük düzeyde bulunduğundan, bu belirteçlerin düzeylerinin saptanması oldukça duyarlı ve pahalı yöntemleri gerektirmektedir.<sup>9</sup> Bu yöntemlerin uygulanması oldukça yüksek maliyetlidir.

Spesifik modifikasyonlar risk açısından değerlendirildiğinde; global modifikasyonlara göre protein molekülünün daha küçük bir kısmında etkili olması nedeniyle, protein fonksiyonları için daha az bir risk taşır.<sup>9</sup> Leeuwenburgh ve arkadaşları<sup>11</sup> yaptıkları bir çalışmada; insan aort'unun aterosklerotik bölgelerinde, erken yağ izlerinin bulunduğu alandaki diTyr düzeyini normal aort dokusundakiyle karşılaştırıldığında 11 kat arttığını ortaya koymuşlardır. İnsan kaynaklı, bir başka çalışmada; ilerlemiş aterosklerotik plaklardaki intima proteinlerinin diTyr içeriği, normal arterlerin intima proteinlerinin çok üzerinde bulunmuştur.<sup>12</sup> Fu ve arkadaşları<sup>12</sup> bu çalışmada aterosklerotik ve normal arterlerin intima proteinlerinin diTyr içeriğini, intima dokusunun yaş ağırlığının miligramı başına  $0.63 \pm 0.41$ ,  $4.75 \pm 5.17$  pmol olarak saptamışlardır. Bu düzeylerdeki diTyr'in saptanması oldukça duyarlı bir kantitatif metot olan izotop dilüsyon gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi ve HPLC ile mümkün ola-

bilmektedir. Proteinin PCO içeriği ise oksidatif stresin rol oynadığı çeşitli patolojik durumlarda önemli ölçüde artmaktadır. Evans ve arkadaşları<sup>13</sup> çeşitli patolojik beyin dokusu örneklerindeki PCO düzeylerinin 8 nmol/mg protein düzeyine kadar çıktığını bildirmişlerdir.

Lipit peroksidasyon ürünleri ile karşılaştırıldığında, PCO gruplarının oksidatif stres belirteci olarak kullanılmasının bazı avantajları vardır. PCO'in bu avantajları arasında nispeten erken dönemde oluşması ve stabil olması sayılabilir.<sup>9</sup> Yanlış katlanmış proteinler, doğal proteinlere göre geri dönüşümsüz bir protein modifikasyonu olan karbonilasyona daha yatkındır. Karbonilasyona uğramış protein onarılmayacağından, proteozom kompleksinin rol oynadığı proteolitik metabolik yola yönlendirilir.<sup>7,9</sup> Hücreler oksidasyona uğramış proteinleri saatler ve günler içinde yıktığı halde, lipit peroksidasyon ürünlerini dakikalar içinde yıkmaktadır.<sup>14,15</sup> Hastalarda erken dönemde oluşan PCO grupları, oksidatif stresin diğer parametreleri olan glutasyon disülfid (GSSG) ve malondialdehit ile karşılaştırıldığında uzun dönem kan dolaşımında kalır.<sup>16</sup> PCO'lerinin yüksek düzeyde bulunması sadece oksidatif stresteki artışı değil, aynı zamanda protein fonksiyon bozukluğunu göstermektedir.<sup>9</sup> PCO'lerinin kimyasal olarak dayanıklılığı, PCO'ni laboratuvar ölçümleri için uygun bir parametre haline getirmektedir. PCO'nin  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de 3 ay süreyle stabil olduğu gösterilmiştir.<sup>17</sup>

Geçen on yıl içerisinde, çeşitli hastalıklardaki protein oksidasyonunun artışı ile ilgili makalelerde ve bu makalelerdeki sonuçları özetleyen derlemelerin sayısında, önemli bir yükselme eğilimi izlenmektedir<sup>18-83</sup> (Tablo 1).

Bu makalelerde genellikle hastalığın ilerlemesi ile protein oksidasyonundaki artış arasında kuvvetli bir ilişki olduğu ifade edilmektedir. Pek çok hastalıkta, oksidatif stresin bir sebep mi yoksa primer hastalık sürecinin bir sonucu mu olduğu açık değildir. Diğer taraftan, protein oksidasyonu, protein fonksiyon bozukluğu ve hastalıklar arasındaki ilişkiler de büyük ölçüde açıklığa kavuşmamıştır. Bununla birlikte enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonlarının hastalıkların etyolojisinde ö-

nemli rol oynayabileceği kesinlik kazanmıştır. Günümüzde oksidatif stres çalışmalarındaki en büyük çaba, çeşitli insan hastalıklarında spesifik olarak okside olmuş proteinlerin tanımlanması üzerine yoğunlaşmaktadır.

### **PROTEİN OKSİDASYONU İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR**

**Alzheimer Hastalığı:** Alzheimer hastalığının patojenezinde protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen türevlerinin oluşumu ile etkili olan oksidatif stresin varlığı kesin bir şekilde gösterilmiştir.<sup>8</sup> Oksidatif stresin, Alzheimer hastalığında primer mi, yoksa sekonder bir olay mı olduğu kesin olmasa da, nöronal kayba yol açan önemli bir nörodejeneratif faktör olduğu açıktır.<sup>18-20</sup> Yaşlanmış beyinde sıklıkla görülen oksidatif hasar, Alzheimer hastalığında daha da şiddetli olarak görülmektedir.<sup>8</sup>

Alzheimer hastalığında PCO düzeylerinin  $\beta$ -amiloid plaklar bakımından zengin olan hi-

pokampus ve inferiör parietal lobülde arttığı, az dejeneratif özellik gösteren serebellumda ise değişmediği gösterilmiştir.<sup>21</sup> Bu artış, yukarıda adı geçen anatomik bölgelerde görülen histopatoloji ile uygunluk göstermektedir.<sup>21</sup> Alzheimer hastalığında, kreatin kinaz-BB, enolaz, glutamin sentaz, kitin C-terminal hidrolaz L-1,  $\beta$ -aktin ve akson oluşumunda rol oynayan dihidroprimidinaz'la ilişkili-protein-2'nin spesifik olarak karbonilasyona uğradığı ortaya konulmuştur.<sup>22,23</sup> Alzheimer'lı beyinde görülen bu karbonilasyon olaylarının olası sonuçları arasında; kreatin kinaz ve enolaz'la ilişkili olarak enerji tüketimi'nin artması, proteozomal degradasyonun inhibisyonuna bağlı olarak (kitin C-terminal hidrolaz L-1) hasar görmüş, yanlış katlanmış veya agregasyona uğramış proteinlerin düzeylerindeki artış, dentrit uzunluğundaki azalmayla ilişkili olarak (dihidroprimidinaz'la ilişkili-protein-2) nöronlar arası iletişimin azalması sonucu yetersiz bellek ve glutamin sentaz aktivitesindeki azalmaya bağlı toksisite sayılabilir.<sup>24,25</sup>

**Tablo 1.** Protein oksidasyonu ile ilişkili hastalıklar ve oksidatif modifikasyonları.

<b>Hastalık</b>	<b>Oksidatif modifikasyon tipi</b>	<b>Kaynaklar</b>
Alzheimer hastalığı	PCO, 3-NT, diTyr	21-30
Amiyotrofik lateral skleroz	PCO, 3-NT, diTyr	31-38
Diyabet	PCO, P-SH	39-46
Duchenne ve Becker kas distrofisi	PCO	47
Jüvenil kronik artrit ve Romatoid artrit	PCO	48,49
Katarakt oluşumu	PCO	50
Koroner kalp hastalığı	PCO	51
Kronik akciğer hastalığı	PCO	52-55
Kronik böbrek yetmezliği/üremi	PCO, P-SH, Klorotirozin	56-68
Kronik hepatit C	PCO	69
Kistik fibroz	PCO	70
Mesane kanseri	PCO	71
Parkinson hastalığı	PCO, 3-NT	72-75
Polikistik over hastalığı	PCO	76
Preeklampsi	PCO	77-80
Psöriasis	PCO	81
Sepsis	PCO	82
Sistemik amiloidoz	PCO	66
Varikosel	PCO	83

Histokimyasal metotlarla beyin dokusundaki amiloid birikimlerinde 4-hidroksinonenalin varlığı saptanmıştır.<sup>26</sup> Lipit peroksidasyonunun oldukça reaktif bir ürünü olan akroleinin nörofibriller ağ taşıyan nöronlardaki proteinlere bağlanarak PCO türevlerinin oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir.<sup>27</sup> Conrad ve arkadaşları<sup>28</sup> tarafından Alzheimer'lı hastaların plazma PCO düzeylerinin arttığı bildirilmektedir. Diğer taraftan çeşitli çalışmalarda<sup>29,30</sup>, 3-NT ve diTyr<sup>2</sup> in Alzheimer hastalarının postmortem beyin dokusu ve ventriküler serebrospinal sıvı örneklerinde arttığı ortaya konulmuştur.

**Amiyotrofik lateral skleroz:** Hızlı ilerleyen nörodejeneratif bir hastalık olan amiyotrofik lateral skleroz (ALS) motor nöron güçsüzlüğü ile başlayan ve ölüme kadar giden bir süreç izler. Nöropatolojik olarak motor nöronların kaybı hem motor kortekste, hem de omurilikte meydana gelir. Hastalığın patojenezinde oksidatif hasar önemli rol oynamaktadır.<sup>31</sup> ALS'li hastalarda glia hücrelerinde ve omurilik dokusunda yüksek düzeyde oluşan süperoksidin kaynağı artmış siklooksijenaz-2 aktivitesidir.<sup>32</sup>

ALS'li hastalarla yapılan çeşitli çalışmalarda<sup>33-35</sup> PCO düzeylerinin frontal korteks, motor korteks ve omurilikte arttığı, immünohistokimyasal olarak yapılan bir başka çalışmada ise omurilikte 4-hidroksinonenal ile modifikasyona uğramış proteinlerin düzeyinde de artış görüldüğü bildirilmektedir.<sup>36</sup> Diğer çalışmalarda 3-NT düzeylerinin omurilik ve serebrospinal sıvıda arttığı saptanmıştır.<sup>37,38</sup> Ayrıca, ALS'li hastaların serebrospinal sıvı örneklerinde Mn süperoksit dismutazın nitrazyona uğradığı da bildirilmektedir.<sup>37</sup>

**Diabet:** Diyabette oksidan/antioksidan oranındaki dengesizliğe bağlı olarak görülen sistemik oksidatif stres PCO düzeylerinde artışa yol açmaktadır. Karbonil stresin artışında; hiperlisemi, hiperlipidemi, oksidatif stres ve/veya reaktif karbonil türevlerinin detoksifikasyonundaki azalmanın etkili olabileceği bildirilmektedir.<sup>8</sup> PCO düzeylerindeki artış hem Tip 1<sup>39-42</sup> hem de Tip 2<sup>43</sup> diyabette görülmektedir. Komplikasyonsuz diyabetik çocuklar ve adolesanlarda, kontrol grupları karşılaştırıldığında

plazma PCO düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır.<sup>39</sup> Bu durum oksidatif protein hasarının diyabetin erken dönemlerinde başladığını ve ileriki evrelerde arttığını göstermektedir. Komplikasyonsuz Tip 1 diyabetik hastalardaki oksidatif protein hasarı diğer bir çalışmada da teyit edilmiştir.<sup>40</sup> Bu çalışmada komplikasyonsuz Tip 1 diyabetik hastalarda, oksidatif protein hasarının belirteci olan plazma PCO düzeylerinin kontrollere göre arttığı, diğer belirteçler olan 3-NT ve P-SH düzeylerinin ise değişmediği bildirilmektedir. Bir başka çalışmada plazma PCO düzeylerinin komplikasyonlu Tip 1 diyabetik hastalarda, komplikasyonsuz Tip 1 diyabetik hastalara göre daha yüksek olduğu, 3-NT düzeylerinin ise değişmediği ortaya konulmuştur.<sup>41</sup>

Son yıllarda diyabetteki mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile oksidatif stres arasındaki ilişki çeşitli araştırmacıların makalelerinde yer almaya başlamıştır.<sup>44-46</sup> Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu diyabetle ilgili patolojiye çeşitli şekillerde katkıda bulunur; mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun hücre ve sistem düzeyinde enerji açlığının oluşmasını arttırdığı bildirilmektedir.<sup>44</sup> Mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak oluşan serbest radikaller ve difüzyona uğrayabilen prooksidanlar diyabetik komplikasyonların oluşumuna katkıda bulunur. Oluşan bu ürünlere örnek olarak malondialdehit ve hidroksialkenaller gibi reaktif lipit peroksidasyon ürünleri gösterilebilir. Bu kusur kendi kendine daimi bir şekilde çevrimsel olarak artarak, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olan reaktif aldehitlerin oluşturduğu oksidatif hasara yol açmaktadır. Mitokondriyal reaktif oksijen türevlerinin oluşumundaki artış antioksidanların tüketimine ve bunun yanı sıra antioksidanlara gereksinim duyulan ekstramitokondriyal alanlardan mitokondri gibi diğer bölgelere antioksidanların, yönlendirilmesine neden olur. Bu yüzden diyabette mitokondriyal antioksidan düzeyleri artmış bulunsa bile ekstrasellüler serbest radikal hasarındaki artış antioksidan yetersizliği ile ilişkilidir.<sup>44</sup>

Diyabetteki karbonil stresin, üremi ve aterosklerozla birlikte tedavisinde; redoks modü-

lasyonu, reaktif karbonil türevlerinin detoksifikasyonu ve karbonil stresin inhibisyonu gibi tedavi yaklaşımların faydalı olabileceği yönünde çeşitli görüşler vardır.<sup>8</sup>

**Kronik akciğer hastalığı:** Çok sayıda çevresel ve enfeksiyöz uyaran kronik akciğer hastalığına yol açabilir. Bu uyaranlar içerisinde en önemlisi mekanik ventilasyon ve oksijen toksisitesidir. Yeni doğanlar, özellikle prematüre doğanlar artmış pulmoner bozukluk riski taşımaları nedeni ile yüksek konsantrasyonda oksijen içeren mekanik ventilasyona ihtiyaç gösterir. Mekanik ventilasyon prematüre bebeklerin hayatta kalmaları için gerekli olmasına karşın, toksik yan etkileri çok sık görülmektedir. Bu yan etkiler içinde en önemlisi bronkopulmoner displazidir.<sup>8</sup>

Prematüre bebekler mekanik ventilasyon nedeniyle supra-fizyolojik oksijen konsantrasyonlarına (hiperoksi) maruz kalır, diğer taraftan bu durum azalmış sürfaktan konsantrasyonları ile birleşince; antioksidan savunmada azalma meydana gelir. Hiperoksi ile indüklenmiş akciğer hasarı ve hücre ölümünün mekanizmaları karmaşıktır. Bu mekanizmalar yüksek düzeyde reaktif oksijen türevlerinin (ROS) oluşumu, antioksidan savunma mekanizmalarının kaybı, sitokin aracılı enflamasyon, strese duyarlı genlerin ve apoptotik-regülatör genlerin ifadesini kontrol eden sinyal transdüksiyon yollarının modülasyonu ile ilişkilidir.<sup>8</sup>

Ventilasyon uygulanan prematüre bebeklerin kronik akciğer hastalığı gelişenlerinden alınan bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı örneklerinde oksidatif stresin varlığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>52-55</sup> Az miktarda elde edilebilen BAL sıvısı örneklerinde, PCO düzeylerinin saptanabilmesine yönelik ilk çalışma 1994 yılında Gladstone ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.<sup>52</sup> Bu çalışmada PCO düzeylerinin BAL sıvısında teknik olarak saptanabileceğinin yanı sıra, mekanik ventilasyon uygulanan bebeklerden elde edilen BAL sıvısı numunelerindeki PCO düzeylerinin anlamlı düzeyde arttığı saptanmıştır. Nötrofil miyeloperoksidaz aktivitesi sonucu oluşan ve kuvvetli bir oksidan olan hipoklorik asit, proteinler üzerine etki ederek PCO türevlerinin oluşumuna yol açar.<sup>8,54</sup> Buss

ve arkadaşları<sup>54</sup> yaptıkları bir çalışmada ventilasyon uygulanan prematüre bebeklerin trakeal aspiratlarındaki PCO düzeylerinin arttığını ve bu artışın miyeloperoksidaz aktivitesi ile korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

**Kronik böbrek yetmezliği:** Oksidatif stresin kronik böbrek yetmezliği'nin ilerlemesinden sorumlu olduğu bildirilmektedir. Diyaliz hastalarında, diyalizle birlikte reaktif oksijen türevlerinin oluşumunda artış ve majör antioksidan sistemlerde kronik azalma görülmektedir.<sup>8,56</sup> Artmış oksidatif stresin kaynakları ve mekanizmaları konusunda görüş birliği yoktur.<sup>56</sup> Bazı araştırmacılar<sup>57,58</sup> diyaliz tedavisinin oksidatif hasardaki artışın asıl nedeni olduğu yönünde bulgular ortaya koyarken, diğerleri<sup>59,60</sup> kronik böbrek yetmezliğinden oksidatif stresdeki artışı sorumlu tutmaktadır. Son evredeki böbrek yetmezliğinde görülen aneminin tedavisinde kullanılan demir preparatları, kronik böbrek yetmezliğindeki artmış oksidatif stresin diğer bir kaynağıdır.<sup>61</sup>

Kronik böbrek yetmezliği hastalarında ve kronik hemodiyaliz tedavisi uygulanan hastalarda PCO oluşumu ve P-SH gruplarının oksidasyonu ile karakterize edilen plazma protein oksidasyonunun esas hedefi albumindir.<sup>62,63</sup> Önemli bir plazma antioksidanı olan albuminin oksidasyonuna bağlı olarak, plazmanın antioksidan savunmasının azalmasıyla, bu grup hastalarda oksidatif stresle indüklenmiş doku hasarına ve kardiyovasküler hastalığa yönelik önemli bir risk oluşmaktadır.<sup>8</sup> Kronik böbrek yetmezliği hastalarında idrar albuminin karbonil içeriğinde, plazma albuminine göre %71 oranında artış görülmüştür.<sup>64</sup> Kas güçsüzlüğü ve azalmış egzersiz kapasitesi, kronik üremi hastalarında sık rastlanan şikayetlerdir. Hemodiyaliz tedavisi gören üremili hastaların iskelet kası protein ve lipidlerindeki artmış oksidatif hasarın, ilerki evrelerde görülen miyopatilerin patojenezinde rol oynadığı ileri sürülmektedir.<sup>65</sup> Bu hastalarda, ileri glikasyon son ürünleri (AGE) ve ileri lipoksidasyon son ürünlerinin (ALE) plazma ve matriks proteinlerindeki düzeyleri normalin çok üstündedir. Reaktif dikarbonil bileşiklerinin ve/veya glikoksidasyon ve lipoksidasyon ürünlerinin birikimi karbonil st-

resi olarak adlandırılmaktadır.<sup>66</sup> Üremiye bağlı karbonil stres proteinlerde geri dönüşümsüz oksidatif modifikasyonlara yol açarak, hemodiyaliz hastalarında uzun dönemde ortaya çıkan komplikasyonlar olan amiloidoz ve aterosklerozaya neden olmaktadır.<sup>67,68</sup>

**Parkinson Hastalığı:** Parkinson hastalığı Alzheimer'dan sonra ikinci en sık rastlanılan nörodejeneratif hastalıktır. Hastalarda substantia nigra'daki dopaminerjik nöronların kaybına bağlı olarak, ilerleyici özellikle hareket bozukluğu görülür.

Substantia nigra nöronlarında, Lewy cisimcikleri adı verilen sitoplazmik eozinofilik inklüzyonların görülmesi, Alzheimer'ın en önemli histopatolojik özelliğidir.<sup>31</sup>

Parkinson hastalığında substantia nigra, bazal gangliyon, globus pallidus, substantia innominata, frontal korteks ve serebellum dahil tüm beyin bölgelerinde PCO düzeylerinde artış görülmektedir.<sup>72</sup> Lewy cisimciklerinde ve dejenerasyona uğramış nöronların amorf birikintilerinde 3-NT'nin varlığı immünokimyasal olarak gösterilmiştir.<sup>73</sup> Diğer bir çalışmada; serobros-pinal sıvıda nitrat, beyinde ise nitrozil grubu içeren protein düzeylerinin arttığı bildirilmiştir.<sup>74</sup> Ayrıca serobros-pinal sıvıdaki mangan süperoksid dismutazının nitrasyona uğradığı saptanmıştır.<sup>75</sup>

**Preeklampsi:** Gebelikte en sık rastlanan bir komplikasyon olan (%3-10) preeklampsi, maternal ve fetal morbidite ve mortaliteye yol açabilmektedir.<sup>77</sup> Preeklampsi etyolojisi kesin olarak bilinmese de; vasküler endotelin fonksiyon bozukluğu ile ilişkili artmış vazokonstriksiyonla kendini gösteren maternal hipertansiyona bağlı, uteroplasental kan akışının azalmasıyla gelişen bir bozukluktur.<sup>78</sup> Zusterzeel ve arkadaşları<sup>79</sup> gebe kadınların plazma PCO düzeylerinin, gebe olmayan kadınlara göre önemli derecede yüksek olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar preeklampsili kadınların plazma PCO düzeylerini normal gebelere göre anlamlı derecede yüksek olarak bulmuşlardır. Serdar ve arkadaşları<sup>80</sup> serum PCO ve MDA düzeylerinin şiddetli preeklampside, hafif preeklampsiye göre daha yüksek olduğunu, serum antioksidan düzeylerinin ise bu artışa

paralel olarak azaldığını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar plasenta ve uterus mukozasının, artmış lipid peroksidlerinin ve PCO'nin kaynağı olabileceği görüşünü öne sürmüşlerdir.

**Sepsis:** Sepsis, gram negatif organizmalardan bakteriyal endotoksinin salınmasıyla kendini gösteren kompleks bir sendromdur. Enflamasyona bağlı olarak oluşan tümör nekroz faktör  $\alpha$ , reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu uyararak oksidatif stres ve protein hasarının düzeyini artırır. Çocuklar ve immün sistemi baskılanmış hastalarda mortalite oranının %50 olduğu bildirilmektedir.<sup>8</sup>

Winterbourn ve arkadaşları<sup>82</sup> travmaya bağlı sepsis geçirmekte olan yoğun bakım hastalarının plazma ve BAL sıvılarında PCO ve tiyobarbitürik asitle reaksiyona giren madde (TBARS) konsantrasyonlarını yüksek olarak saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, hastalarındaki PCO düzeylerinin birkaç gün içinde düşse de, yine de kontrol değerlerinin üstünde olduğunu, ayrıca PCO, TBARS ve nötrofil aktivasyonunun bir indeksi olan miyeloperoksidaz düzeyleri arasında kuvvetli bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

## SONUÇ

Oksidasyona uğramış spesifik proteinlerin tanımlanmasındaki güncel ve hızlı ilerlemeler ile protein oksidasyonu mekanizmalarının aydınlatılması oksidatif stresin etkili olduğu hastalıkların iç yüzünü kavramamıza yardımcı olacaktır.

## ÖZET

Enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonları çok sayıda hastalığın etyolojisi ve/veya ilerlemesinde önemli rol oynar. Oksidatif modifikasyona uğramış amino asitler ile bu amino asitlerin türevleri protein oksidasyonunu değerlendirmede kullanılmakta ve yenileri de güncel olarak listeye eklenmektedir. Protein karbonil içeriği, protein oksidasyonunun en genel ve kullanışlı biyomarker'dır. 3-Nitrotirozinin peroksinitrit aracılı protein oksidasyonunun nispeten spesifik belirteci olduğu

düşünülmektedir. Çeşitli hastalıklarda, hem protein karbonil hem de 3-Nitrotirozinnin artmış konsantrasyonlarının bulunduğu bildirilmektedir. Okside proteinlerin tanımlanmasındaki hızlı ve yeni ilerlemeler, oksidatif hasar için yeni tanısal (olasılıkla pre-septomatik) biyomarker'lar sağlayarak, etkili antioksidan tedavinin oluşturulmasına yardımcı temel bilgiyi kazandırmalıdır.

### KAYNAKLAR

1. Commoner B, Townsend J, Pake GE. Free radicals in biological materials. *Nature* 1954; 174: 689-691.
2. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11: 298-300.
3. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase; an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
4. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1151-1163.
5. Stadtman ER. Protein modification in aging. *J Gerontol* 1988; 43: 112-120.
6. Shacter E. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* 2000; 319: 428-436.
7. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. 2003; 25: 207-218.
8. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Mol Med* 2003; 9: 169-176.
9. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
10. Çakatay U, Telci A. Oksidatif protein hasarı ve saptanmasında kullanılan marker'lar. *Tıp Fak Dergisi* 2000; 63: 314-317.
11. Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, Mueller DM, Pennathur S, Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem* 1997; 272: 3520-3526.
12. Fu S, Davies MJ, Stocker R, Dean RT. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J* 1998; 333: 519-525.
13. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods Enzymol* 1999; 300: 145-156.
14. Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J Biol Chem* 1996; 271: 15504-15509.
15. Siems WG, Zollner H, Grune T, Esterbauer H. Metabolic fate of 4-hydroxynonenal in hepatocytes: 1,4-dihydroxynonenone is not the main product. *J Lipid Res* 1997; 38: 612-622.
16. Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Sitte N, Grune T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1080-1086.
17. Griffiths HR. Antioxidant and protein oxidation. *Free Radic Res* 2000; 33: S47-58.
18. Butterfield DA, Drake J, Pocernich C, Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol Med* 2001; 7: 548-554.
19. Butterfield DA, Castegna A, Lauderback CM, Drake J. Evidence that amyloid  $\beta$ -peptide induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 655-664.
20. Butterfield DA, Lauderback CM. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid  $\beta$ -peptide-associated free radical oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1050-1060.
21. Hensley K, Hall N, Subramaniam R, Cole P, Harris M, Aksenov M, Aksenova M, Gabbita SP, Wu JF, Carney JM. Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *J Neurochem* 1995; 65: 2146-2156.
22. Aksenov M, Aksenova M, Butterfield DA, Markesbery WR. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. *J Neurochem* 2000; 74: 2520-2527.
23. Aksenov M, Aksenova M, Butterfield DA, Geddes JW, Markesbery WR. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2001; 103: 373-383.
24. Castegna A, Aksenov M, Aksenova M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part I. Creatine kinase BB, glutamine synthase, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L-1. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 562-571.
25. Castegna A, Aksenov M, Thongboonkerd V, Klein JB, Pierce WM, Booze R, Markesbery WR, Butterfield DA. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II. Dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* 2002; 82: 1524-1532.

26. Ando Y, Brannstrom T, Uchida K, Nyhlin N, Nasman B, Suhr O, Yamashita T, Olsson T, El Salhy M, Uchino M, Ando M. Histochemical detection of 4-hydroxynonenal protein in Alzheimer amyloid. *J Neurol Sci* 1998; 156: 172-176.
27. Calingasan NY, Uchida K, Gibson GE. Protein-bound acrolein: a novel marker of oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1999; 72: 751-756.
28. Conrad CC, Marshall PL, Talent JM, Malakowsky CA, Choi C, Gracy RW. Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 678-681.
29. Hensley K, Maidt ML, Yu Z, Sang H, Markesbery WR, Floyd RA. Electrochemical analysis of protein nitrotyrosine and dityrosine in the Alzheimer brain indicates region-specific accumulation. *J Neurosci* 1998; 18: 8126-8132.
30. Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C. Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1999; 269: 52-54.
31. Beal MF. Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 797-803.
32. Almer G, Guegan C, Teismann P, Naini A, Rosoklija G, Hays AP, Chen C, Przedborski S. Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 49: 176-185.
33. Bowling AC, Barkowski EE, McKenna-Yasek D, Sapp P, Horvitz HR, Beal MF, Brown RHJr. Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1995; 64: 2366-2369.
34. Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, Bowling AC, Baik MJ, MacGarvey U, Kowall NW, Brown RHJr, Beal MF. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 1997; 69: 2064-2074.
35. Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, Mantle D. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. *Ann Neurol* 1995; 38: 691-695.
36. Pedersen WA, Fu W, Keller JN, Markesbery WR, Appel S, Smith G, Kasarskis E, Mattson MP. Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients. *Ann Neurol* 1998; 44: 819-824.
37. Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, Nagahiro Y, Shimizu K, Umegae N, Hayase N, Shiono H, Kobayashi S. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 2000; 47: 524-527.
38. Tohgi H, Abe T, Yamazaki K, Murata T, Ishizaki E, Isobe C. Remarkable increase in cerebrospinal fluid 3-nitrotyrosine in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 46: 129-131.
39. Dominguez C, Gussinye M, Ruiz E, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of Type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 1998; 21: 1736-1742.
40. Telci A, Çakatay U, Salman S, Satman İ, Sivas A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 50: 213-223.
41. Çakatay U, Telci A, Salman S, Satman İ, Sivas A. Oxidative protein damage in type 1 diabetic patients with and without complications. *Endocr Res* 2000; 26: 365-379.
42. Martin-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, Dominguez C. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1563-1574.
43. Telci A, Çakatay U, Kayalı R, Erdoğan C, Orhan Y, Sivas A. Oxidative protein damage in plasma of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 2000; 32: 40-43.
44. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal malondialdehyde, and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 81-128.
45. Santos DL, Palmeira CM, Seica R, Dias J, Mesquita J, Moreno AJ, Santos MS. Diabetes and mitochondrial oxidative stress: a study using heart mitochondria from the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Mol Cell Biochem*. 2003; 246: 163-170.
46. Kayalı R, Çakatay U, Telci A, Akçay T, Sivas A, Altuğ T. Decrease in mitochondrial oxidative protein damage parameters in the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 315-321.
47. Haycock JW, Mac Neil S, Mantle D. Differential protein oxidation in Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuroreport* 1998; 9: 2201-2207.
48. Renke J, Popadiuk S, Korzon M, Bugajczyk B, Wozniak M. Protein carbonyl groups content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 101-104.
49. Mantle D, Falkous G, Walker D. Quantification of protease activities in synovial fluid from rheumatoid and osteoarthritis cases: comparison with antioxidant and free radical damage markers. *Clin Chim Acta* 1999; 284: 45-58.
50. Boscia F, Grattagliano I, Vendemiale G, Micelli-Ferrari T, Altomare E. Protein oxidation and lens opacity in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2461-2465.



51. Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Sitte N, Grune T. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1080-1086.
52. Gladstone IMJr, Levine RL. Oxidation of proteins in neonatal lungs. *Pediatrics* 1994; 93: 764-768.
53. Schock BC, Sweet DG, Halliday HL, Young IS, Ennis M. Oxidative stress in lavage fluid of preterm infants at risk of chronic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L1386-L1391.
54. Buss H, Darlow BA, Winterbourn CC. Elevated protein carbonyls and lipid peroxidation products correlating with myeloperoxidase in tracheal aspirates from premature infants. *Pediatr Res* 2000; 47: 640-645.
55. Ramsay PL, DeMayo FJ, Hegemier SE, Wearden ME, Smith CV, Welty SE. Clara cell secretory protein oxidation and expression in premature infants who develop bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 155-161.
56. Mayer B, Zitta S, Greilberger J, Holzer H, Reibnegger G, Hermetter A, Oetl K. Effect of hemodialysis on the antioxidative properties of serum. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1638: 267-272.
57. Morane M, Cristol JP, Canaud B. Why hemodialysis patients are in prooxidant state? What could be done to correct the pro/antioxidant imbalance. *Blood Purif* 2000; 18: 191-199.
58. Miyazaki H, Matsuoka H, Itabe H, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Hemodialysis impairs endothelial function via oxidative stress: effects of vitamin E-coated dialyzer. *Circulation* 2000; 101: 1002-1006.
59. Hirayama A, Nagase S, Gotoh M, Takemura K, Tomida C, Ueda A, Aoyagi K, Terao J, Koyoma A. Hemodialysis does not influence the peroxidative state already present in uremia. *Nephron* 2000; 86: 436-440.
60. Himmelfarb J, McMenamin ME, Loseto G, Heinecke JW. Myeloperoxidase catalysed 3-chlorotyrosine formation in dialysis patients. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1163-1169.
61. Peuchant E, Carbonneau MA, Dubourg L, Thomas MJ, Perromat A, Clerc M. Lipoperoxidation in plasma and red blood cells of patients undergoing haemodialysis: vitamin A, E and iron status. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 339-346.
62. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int* 2000; 58: 2571-2578.
63. Himmelfarb J, McMonagle E. Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int* 2001; 60: 358-363.
64. Agarwal R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F863-F869.
65. Lim PS, Cheng YM, Wei YH. Increase in oxidative damage to lipids and proteins in skeletal muscle of uremic patients. *Free Radic Res* 2002; 36: 295-301.
66. Miyata T, Ueda Y, Saito A, Kurokawa K. Carbonyl stress and dialysis-related amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 25-28.
67. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K, Baynes JW. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of carbonyl stress in long-term uremic complications. *Kidney Int* 1999; 55: 389-391.
68. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin T. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001; 44: 129-146.
69. De Maria N, Colantoni A, Fagioli S, Liu GJ, Rogers BK, Farinati F, Van Thiel DH, Floyd RA. Association between reactive oxygen species and disease activity in chronic hepatitis C. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 291-295.
70. McGrath LT, Patrick R, Mallon P, Dowey L, Silke B, Norwood W, Elborn S. Breath isoprene during acute respiratory exacerbation in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2000; 16: 1065-1069.
71. Yılmaz İA, Akçay T, Çakatay U, Telci A, Ataus S, Yalçın V. Relation between bladder cancer and protein oxidation. *Int Urol Nephrol* 2003; 35: 345-350.
72. Alam ZI, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Jenner P, Halliwell B. A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem* 1997; 69: 1326-1329.
73. Good PF, Hsu A, Werner P, Perl DP, Olanow CW. Protein nitration in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 338-339.
74. Shergill JK, Cammack R, Cooper JM, Mann VM, Schapira AHV. Detection of nitrosyl complexes in human substantia nigra, in relation to Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 298-305.
75. Aoyama K, Matsubara K, Fujikawa Y, Nagahiro Y, Shimizu K, Umegae N, Hayase N, Shiono N, Kobayashi S. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 2000; 47: 524-527.
76. Fenkci V, Fenkci S, Yılmaz M, Serteser M. Decreased total antioxidant status and increased oxidative stress in women with polycystic ovary syndrome may contribute to the risk of cardiovascular disease. *Fertility and Sterility* 2003; 80: 123-127.
77. Patrick T, Roberts JM. Current concepts in preeclampsia. *Maternal Child Nursing* 1999; 24: 193-201.

78. Van Wijk MJ, Kublickiene K, Boer K, Van Bavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res* 2000; 47; 38-48.
79. Zusterzeel PL, Rütten H, Roelofs HM, Peters WH, Steegers EA. Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic women as markers for oxidative stress. *Placenta* 2001; 22: 213-219.
80. Serdar Z, Gür E, Çolakoğullar M, Develioğlu O, Sarandöl E. Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2003; 268; 19-25.
81. Dimon-Gadal S. Increased oxidative damage to fibroblast in skin with and without lesions in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2000; 114; 984-989.
82. Winterbourn CC, Buss IH, Chan TP, Plank LD, Clark MA, Windsor JA. Protein carbonyl measurements show evidence of early oxidative stress in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000; 28: 143-149.
83. Chen SS, Chang LS, Wei YH. Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1328-1334.