

## HEMODİYALİZ HASTALARINDA ERİTROSİT MEMBRAN LİPİD PEROKSİDASYONU VE ANTİOKSİDATİF HOMEOSTAZİS DEĞİŞİKLİKLERİ

### RED BLOOD CELL MEMBRANE LIPID PEROXIDATION AND CHANGES OF ANTİOKSİDATİF HOMEOSTAZİS IN PATIENTS ON CHRONIC HEMODİYALİZİS

Alpaslan Ersoy, **Kamil Dilek**

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı, BURSA

Serbest radikaller organizmada, hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hetnde çevresel faktörlerin etkisi ile oluşabilmektedir. Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle başta lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA olmak üzere oksidlenebilen tüm hücre elemanları ile etkileşmektedirler (1).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksidleyici bir radikalın membran yapısında bulunan poliansature yağ asidi zincirindeki metilen gruplarından bir hidrojen atomu uzaklaştırması ile başlamaktadır. Lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikal, hidroksil radikalidir. Lipid peroksidasyonu membran yapı ve bütünlüğünün bozulması, oluşan serbest radikallerin, çeşitli hücre bileşenleri üzerine etkisi ve son ürünlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olmaktadır (2).

Serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarı, hücrel koruyucu sistemlerin etkinlik derecelerine bağlıdır. Enzimatik serbest radikal temizleyicileri, süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalazdır. Katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri, reaktif hidroksillerin hasarlayıcı etkilerine karşı sınırlı direkt korunma sağlayabilirler. Bununla birlikte, düşük molekül ağırlıklı serbest radikal temizleyicileri (antioksidanlar), serbest radikallerle direkt reaksiyona girebilirler. Ve onları en azından daha az zararlı, daha stabil metabolitlerine döndürürler (1). Suda çözünen askorbik asid ve ürik asid gibi antioksidanlar aköz fazda kalan oksijen radikallerini temizlerler. Yağda çözünen - tokoferol gibi antioksidanlar ise membrandaki lipofilik serbest radikalleri daha az toksik forma indirgerler (3). Değişen şartlar altında, ürik asid, glutatyon, transferrin, sistein gibi diğer küçük moleküller, serbest radikal temizleyicisi olarak etki edebilirler (1).

Bir çok araştırmacı, kronik hemodiyaliz hastalarında eritrosit membran lipid peroksidasyonunu incelemiştir. Hemodiyalize girmeyen ve serum

kreatinini 5 mg/dl üzerindeki hastalarda da eritrosit membran lipid peroksidasyonunda artış olduğu bildirilmiştir (4). Bu, lipid peroksidasyon anormalliğinin diyaliz süresinden ziyade renal yetmezlikle ilgili olduğunu düşündürmektedir. Sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) hastalarında eritrosit malonilaldehid düzeyini hafif yüksek, kronik hemodiyaliz hastalarında düşük bulan Taccone-Gallucci ve ark (5), SAPD'nin eritrosit bütünlüğünü değiştiren plazma oksidanlarını uzaklaştırmada kronik hemodiyalizden daha etkili olduğunu düşünmüşlerdir. Miguel ve Linares (6) ise, hemodiyaliz öncesi ve sonrası eritrosit lipid peroksidasyonunu karşılaştırdıklarında; diyaliz sonrası malonilaldehid düzeyinin anlamlı arttığını bildirmişlerdir. Daha önce merkezimizde yapılan bir çalışmada da, kronik hemodiyaliz hastalarında plazma ve eritrosit lipid peroksidasyonunun sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında anlamlı yüksek olduğu ve bir ay süreyle 300 mg/gün vitamin E tedavisi ile anlamlı azaldığı gösterilmiştir (7). Antioksidan ajan olarak eritrosit tokoferol tüketiminin artması hemolize duyarlılığı arttırmaktadır. Farklı çalışmalarda kronik hemodiyaliz hastalarında eritrosit tokoferol seviyeleri ya normal (8), ya da anlamlı düşük (9,10) bulunmuştur.

Lipid peroksidasyonunun ana reaksiyon ürünü malonilaldehidin (MDA) serum konsantrasyonunun ve eritrosit malonilaldehid içeriğinin artması (8,11), üremik serumun antioksidatif aktivitesinin azalması (12), vitamin E uygulanımı ile intradiyalitik hemolizin azalması (13) kronik hemodiyaliz hastalarında antioksidatif homeostazis değişikliklerini gösteren bulgulardır.

Zachee ve ark (14), kronik hemodiyaliz hastalarında eritropoietin tedavisinden sonrada eritrositlerin deformabilitesinin düzelmediğini ve eritrosit yaşam süresindeki kısalmanın devam ettiğini gözlemlemiştir. Eritrositlerin oksidatif

duyarlılıklarının artmasının, direkt olarak deforme olabilmeye yeteneklerindeki değişikliklerle ilgili olduğu sonucuna varmışlardır. Dolaşımdaki eritrositlerin yaşam süresi, mekanik özelliklerini etkileyen faktörlerle (hücresel deformabilite) ilgili gözükmetedir. Hücre şekli ve yüzey alanı veya hücre hacmi oranı gibi ekstrinsik özellikler, internal viskozite ve membran mekanik davranışı gibi intrinsik özellikler hücresel deformabiliteyi oluşturmaktadır (15). Hemodiyaliz hastalarının eritrositlerinde glukoz metabolizmasında bozukluk gösterilmiştir (16). Hemodiyaliz hastalarında, serbest radikallerin başlattığı eritrosit membran lipid peroksidasyonu sonucu eritrosit deformabilitesinin bozulmasının ve splenik sekestrasyonun, eritrosit yaşam süresinde azalmaya neden olan en önemli faktörler olduğu bildirilmiştir (17,18).

Eritrositlerin oksidatif strese karşı savunma yolları vardır. Bir çok araştırmacı, kronik hemodiyaliz hastalarında eritrosit süperoksid dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde azalma bildirmişlerdir (8,19). Matkovics ve ark (20), süperoksid dismutaz ve katalaz aktivitesinin diyaliz öncesi düşük iken diyaliz sonrası normale döndüğünü gözlemlemişlerdir. Shainkin-Kestenbaum ve ark (21), hemodiyaliz hastalarında eritrosit süperoksid dismutaz aktivitesinin normal kontrollere göre düşük olduğunu göstermişlerdir. Süperoksid dismutaz aktivitesi, çinko ve bakıra bağımlıdır. Kronik hemodiyaliz hastalarında her iki iyonun konsantrasyonlarında azalmanın, enzim aktivitesini etkileyebileceği bildirilmiştir (19). Ayrıca bu hastalarda, hidrojen peroksid ve süperoksid iyonu üretimi artışı ile süperoksid dismutaz enzimi inaktif olabilir. Alüminyum artışının da bu enzimin aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (8). Glutatyon peroksidaz ise selenyuma bağımlıdır. Bu nedenle, aktivitesi kan selenyum düzeyi ile ilişkilidir (8,19). Hemodiyaliz hastalarında serum selenyum düzeyi düşük bulunmuştur (11). Seth ve ark (22), üremik hastaların eritrositlerinde glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Costagliola ve ark (23), kronik hemodiyaliz hastalarında GSH uygulanmasının renal anemi üzerine etkisini kontrollü bir çalışmada incelemişlerdir. Ortalama hemoglobin ve hematokrit seviyeleri tedavinin 90. ve 120.günleri arasında normal değerlere ulaşmıştır. Maksimal etkiyi ise 120. günde gözlemlemişlerdir. Desteği kestiklerinde değerlerin hızla tedavi öncesine döndüğünü izlemişlerdir. Dolayısıyla bu enzimlerin aktivitelerindeki azalma, eritrositlerde oksidatif hasara eğilime neden olarak renal anemiye katkıda bulunabilir.

Antioksidatif sistemin hemodiyaliz tedavisi ile nasıl etkilendiği açık değildir. Radikal saldırısıyla önceden, lipid peroksidasyonu ile çoğu hasarlanmış

eritrositlerde hemoliz oluşması muhtemeldir. Miguel (6), hemodiyaliz sonrası eritrosit MDA konsantrasyonunda artış bulmuşlardır. Hemolizin in vivo hemodiyaliz sırasında vitamin E uygulaması ile azaldığına dair bilgi vardır. Hemodiyaliz sırasında muhtemel lipid peroksidasyonu, antioksidatif sistem aktivitesinin azalması ve reaktif oksijen türleri oluşumunun artması sonucu olabilir. Maher ve ark (24), hemodiyaliz başladıktan sonra 30 dakika içinde serbest radikal aktivitesinde belirgin artış bildirmişlerdir. Schmidtman ve ark (13), hemodiyaliz hastalarında diyaliz öncesi üremik serumun süperoksid anyon yakalama kapasitesinin arttığını, diyaliz sırasında ise %50 azaldığını göstermişlerdir. Bunu antioksidanların (yani ürik asid, askorbik asid gibi) diyalizat içine kaybına bağlamışlardır. Onlar, geçici lökopeni sırasında pulmoner kapillerlerde sekestre olan  $c_{50}$  aktive nötrofiller ile reaktif oksijen türleri oluşumunun intradiyalitik oksidatif hasara katkıda bulunabileceğini düşünmüşlerdir. Serbest yağ asidlerinde heparine bağlı artışta buna neden olabilir. Serbest ansature yağ asidleri, fosfolipid gibi esterleştiği zaman serbest radikal saldırılarına daha duyarlı olabilirler. Daha az nötrofil aktivasyonuna neden olan diyaliz membranları ile serbest radikal reaksiyon ürünlerinde daha az artış ve daha az hipoksi olduğu bildirilmiştir (25).

Bu literatür verilerine göre, renal anemi patojenezinde oksidatif hasar olasılığı ve hemodiyalizin oksidatif hasarı başlatıcı etkisi rol oynayabilir. Lipid peroksidasyonu ile oksidatif hasar hemolizle sonlanabilir.

Vitamin E ve C, serbest peroksid radikallerinin zararlı etkilerine karşı organizmayı koruyan doğal antioksidanlardır. Serum lipid peroksidleri üzerine askorbik asid ve -tokoferol arasındaki sinerjistik etki iyi bilinmektedir. Askorbik asid, tokoferol ile membran iç yüzeyinde veya dış yüzeyinde etkileşmektedir (26).

Literatürde, vitamin C'nin hemodiyaliz hastalarında lipid peroksidasyonu üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlamadık, kronik hemodiyaliz hastalarına farklı dozlarda (100, 1000 ve 2000 mg/gün) askorbik asid vererek renal anemi ve lipid profili üzerine etkisini incelediğimizde, vitamin C tedavisinin bu parametreleri etkilemediğini bulduk (27,28).

Askorbik asidin düşük kan konsantrasyonlarında antioksidan etkisinin azalıp, prooksidan etkisinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (3). İn vitro incelemelerde reaksiyon; sistemde endojen peroksid, oksijen ve demir gibi metal iyonları varlığında, düşük askorbat konsantrasyonlarında lipid peroksidasyonu ile sonlanırken yüksek konsantrasyonlarda ise antioksidan özellik göstermiştir (26). Askorbik asidin antioksidan

etkisinin konsantrasyona bağımlı olduğu rapor edilmiştir (29). Girotti ve ark (30), oksidasyon sırasında şayet lipid hidroperoksidleri membranda mevcutsa askorbik asidin membranda lipid peroksidasyonunu tetikleyebileceğini ve bu etkinin 10 mM dan daha az redükten konsantrasyonlarda başladığını bildirmişlerdir. İn vivo koşullarda askorbik asidin prooksidan etkisinin önemsiz olduğu gösterilmiştir (31).

Bütün bu bilgiler ışığında, askorbik asid yüksek konsantrasyonlarda aköz radikalleri kolayca yakalayarak, lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve -tokoferol ile sinerjistik etki göstererek, eritrosit yaşam süresini olumlu etkileyebilir. Fakat çalışmamızda 2000 mg/gün vitamin C alan hastalarımızda ortalama hemoglobin, hematokrit ve eritrosit düzeylerinde görülen değişikliklerin tedavi kesildikten sonra anlamlı azalmaması, bu hastalarda renal anemiyi etkileyebilen başka faktörlerde olduğunu düşündürmektedir (27).

Aşırı demir, askorbat oksidatif katabolizmasını hızlandırabilmektedir. Demir, membran lipid peroksidasyonu ile dokuda hasar yapabilmektedir. Askorbat varlığında bu etki artmaktadır (32,33). Biyolojik membranlarda lipid peroksidasyonu reaksiyonlarının başlamasında demirin rolü, çeşitli sistemlerde araştırılmıştır. Ferrik demir veya ferrik klatlar, ferrik demiri ferröz demire indirgeyen indirgeyici bir ajan varlığında lipid peroksidasyonunu başlatabilirler. Braughler ve ark (34), sıçan beyin sinaptosomal membranlarında bu etkiyi incelemişlerdir.  $H_2O_2$  ve askorbat düşük konsantrasyonlarda, sırasıyla  $Fe^{+3}$  veya  $Fe^{+2}$  ile lipid peroksidasyonunu arttırmasına rağmen  $H_2O_2$  veya askorbat (aşın demir varlığında) yüksek konsantrasyonlarda, lipid peroksidasyonunu inhibe etmişlerdir. Bu veriye göre,  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  mutlak oranı lipid peroksidasyonunu başlatmada primer tayin edici bir faktör olabilir. İn vitro bir çalışmada, askorbik asidin kuprik iyonu kupröz iyonuna indirgeyerek prooksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir (35). Bu sonuçlar, ortamda askorbat varlığında metal iyonlarının (demir, bakır gibi) lipid peroksidasyonunu başlatabileceğini düşündürmektedir. Vitamin C'nin beklenen antioksidan etkisi, prooksidan etkisiyle dengelenebilir.

Sonuç olarak diyaliz olgularında lipid peroksidasyonunun, antioksidatif enzim sistemlerinin ve antioksidanların oynadığı rolleri daha iyi anlayabilmek için daha büyük hasta gruplarında, uzun süreli ve detaylı araştırmaların planlanmasına ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

#### KAYNAKLAR

1. Sinclair AI, Barnett AH, Lunec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *Br J Hosp Med* 1990,43:334-344.
2. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993, 57 (Suppl.): 715S-725S.
3. Rees S. Ascorbic acid and lipid peroxidation. The cross-over effect. *Acta Biochim Biophys Hung* 1987, 22: 241-9.
4. Taccon-Gallucci M, Giardini O, Lubrano R et al. Red blood cell lipid peroxidation in predialysis chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1987, 27(5): 238-241.
5. Taccone-Gallucci M, Giardini O, Lubrano R et al. Red blood cell membrane lipid peroxidation in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Am J Nephrol* 1986,6:92-95.
6. Miguel A, Unares M. Evidence of increased susceptibility to lipid peroxidation in red blood cells of chronic renal failure patients. *Nephron* 1988, 50: 64-5.
7. Yalçın AS, Yurtkuran M, Dilek K et al. The effect of plasma and erythrocyte lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *Clin Chimica Acta* 1989, 185: 109-112.
8. Paul JL, Sail ND, Soni T et al. Lipid peroxidation abnormalities in hemodialyzed patients. *Nephron* 1993, 64: 106-9.
9. Giardini O, Taccone-Gallucci M, Lubrano R et al. Effects of alpha-tocopherol administration on blood cell membrane lipid peroxidation in hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1984,21 (3): 174-7.
10. Dasgupta A, Hussain S, Ahmad S. Increased lipid peroxidation in patients on maintenance hemodialysis. *Nephron* 1992,60:56-9.
11. Maher ER, Wickens DG, Griffin JFA et al. Neutropenia and plasma free radical reaction products during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1988, 3: 277-283.
12. Kurodo M, Asaka S, Tofuku Y et al. Serum antioxidant activity in uremic patients. *Nephron* 1985, 41: 293-8.
13. Schmidtman S, MiillerM, vonBaehr R et al. Changes of antioxidative homeostasis in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1992, 3 (Suppl.): 71-4.
14. Zachee P, Ferrant A, Daelemans R et al. Oxidative injury to erythrocytes, cell rigidity and splenic hemolysis in hemodialyzed patients before and during erythropoietin treatment. *Nephron* 1993, 65: 288-293.
15. Bull BS, Breton-Gorius J, Beutler E. Morphology of erythron, in Williams WY, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA (eds): *Hematology*. Fourth Ed. NewYork, Me Graw Hill, 1991, Chap.30, pp: 297-316

16. Yawata Y, Jacob HS. Abnormal red cell metabolism in patients with chronic uremia: Nature of the defect and its persistence despite adequate hemodialysis. *Blood* 1975, 45 (2): 231-9.
17. Rosenmund A, Binswanger U, Straub PW. Oxidative injury to erythrocytes, cell rigidity, and splenic hemolysis in haemodialysis uremic patients. *Ann Intern Med* 1975,82:460-5.
18. Stocks J, Offerman EL, Modeli CB et al. The susceptibility to autoxidation of human red cell lipids in health and disease. *Br J Haematol* 1972, 23: 713-724.
19. Richard MJ, Arnaud J, Jurkovitz C et al. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1991, 57: 10-5.
20. Matkovics B, Laszio A, Varga SZI et al. Changes and correlations of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and serum neutral lipids due to haemodialysis treatment in chronic uraemic patients. *Int Urol Nephrol* 1988, 20 (5): 559-564.
21. Shainkain-Kestenbaum R, Caruso C, Berlyne GM. Reduced superoxide dismutase activity in erythrocytes of dialysis patients: A possible factor in the etiology of uremic anemia. *Nephron* 1990, 55: 251-3.
22. Seth RK, Saini AS, Aggorwai SK. Glutathion peroxidase activity and reduced glutathion content in erythrocytes of patients with chronic renal failure. *Scand J Haematol* 1985, 35: 201-4, 1985.
23. Costogliola C, Romano L, Scibelli G et al. Anemia and chronic renal failure a therapeutical approach by reduced glutathione parenteral administration. *Nephron* 1992,61:404-8.
24. Maher ER, Wickens DG, Griffin JFA et al. Increased free-radical activity during haemodialysis? *Nephrol Dial Transplant* 1987, 2: 169-171.
25. Kuwahara T, Markert M, Wauters JB. Neutrophil oxygen radical production by dialysis membranes. *Nephrol Dial Transplant* 1988, 3: 661-5.
26. Negre-Salvayre A, Affany A, Hariton C et al. Additional antilipoperoxidant activities of alpha-tocopherol and ascorbic acid on membrane-like systems are potentiated by rutin. *Pharmacology* 1991, 42: 262-272.
27. Ersoy A, Dilek K, Yavuz M et al. Kronik hemodiyaliz hastalarında vitamin C'nin farklı dozlarda kullanımının renal anemi üzerine etkisi. XIII. Ulusal Böbrek Hastalıkları, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi, 22-26 Ekim 1996, İstanbul, Özet kitabı, s: 142.
28. Ersoy A, Dilek K, Yavuz M et al. The effect of administration of vitamin C in different doses on lipid profile in chronic haemodialysis patients. XXXIV Congress of the European Renal Association European Dialysis and Transplant Association, September 21-24, 1997, Geneva, Switzerland, Abstracts p: 187.
29. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KV. The Antioxidant efficiency of vitamin C is concentration dependent. *Biochim Biophys Acta* 1986, 884: 119-123.
30. Girotti AW, Thomas .IP., Jordan .IE. Prooxidant and antioxidant effects of ascorbate on photosensitized peroxidation of lipids in erythrocyte membranes. *Photochem Photobiol* 1985, 41 (3): 267-276.
31. Niki E. Vitamin C as an antioxidant. *World Rev Nutr Diet* 1991,64:1-30.
32. Roeser HP. The role of ascorbic acid in the turnover of storage iron. *Semin Hematol* 1983, 20 (2): 91-8.
33. Aruomo OI, Halliwell B. Superoxide dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation? *Biochem J* 1987,241:273-8.
34. Braugher JM, Duncan LA, Chase RL. The involvement of iron in lipid peroxidation importance of ferric to ferrous ratios in initiation. *J Biol Chem* 1986, 261 (22): 10282-9.
35. Stadtman ER. Ascorbic acid and oxidative in activation of proteins. *Am J Clin Nutr* 1991, 54 (Suppl.): 1125S-1128S.