

# Hemodiyaliz Hastalarında Farklı Diyaliz Membranlarının Polimorfonükleer Lökosit Oksidatif Stresi Üzerine Etkisi

## *Effect of Different Dialyzer Membranes on the Oxidative Burst Status of Polymorphonuclear Leukocytes in Hemodialysis Patients*

Cem İlgen<sup>1</sup>, Levent Yamanel<sup>2</sup>, Fatih Bulucu<sup>1</sup>, Vokan İnal<sup>1</sup>, Ahmet Aydın<sup>3</sup>, İ. Hakkı Koçar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> İç Hastalıkları AD, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Etlik-Ankara

<sup>2</sup> Yoğun Bakım Kliniği, Acil AD, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Etlik-Ankara

<sup>3</sup> Eczacılık Bilimleri BD, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Etlik-Ankara

### ÖZET

Bu çalışmada, son dönem böbrek yetmezlikli (SDBY) hemodiyaliz hastalarının nötrofil (PMNL) intraselüler antioksidan enzim aktiviteleri ve farklı diyaliz membranlarının bu enzimler üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya SDBY mevcut 15 hasta ve kontrol grubu olarak 15 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Hastalar polisülfon (P) ve kuprofan (C) membranları ile diyalize alınmış, her bir diyaliz öncesi ve sonrası, venöz kanda nötrofil süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri saptanmıştır. Hastaların prediyaliz PMNL SOD (p=0.285 P-diyaliz, p=0.512 C-diyaliz) ve GSH-Px (p=0.285 P-diyaliz, p=0.486 C-diyaliz) aktiviteleri ile post-diyaliz PMNL SOD (p=0.838 P-diyaliz, p=0.744 C-diyaliz) ve GSH-Px (p=0.512 P-diyaliz, p=0.870 C-diyaliz) aktiviteleri kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Farklı hemodiyaliz membranları kullanımıyla PMNL SOD (p=0.460 P-diyaliz, p=0.532 C-diyaliz) ve GSH-Px (p=0.773 P-diyaliz, p=0.570 C-diyaliz) aktivitelerinde, diyaliz sonrası dönemde diyaliz öncesi döneme göre istatistiksel olarak belirgin bir farklılık saptanmamıştır. Sonuç olarak, son dönem böbrek yetmezlikli hemodiyaliz hastalarının PMNL oksidatif stres durumları kontrol vakalarından farklı değildir. Bunun yanında, sentetik (polisülfon) veya selüloz (kuprofan) membran kullanımı, PMNL SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerini etkilememektedir.

**Anahtar Kelimeler:** son dönem böbrek yetmezliği, hemodiyaliz membranları, oksidatif stres

### ABSTRACT

In this study, we aimed to investigate whether there is an abnormality in intracellular antioxidant enzyme activities of polymorphonuclear leukocytes (PMNL) of end-stage renal disease (ESRD) patients who had been treated with hemodialysis and how do the different types of dialyzer membranes affect these enzyme activities. Fifteen ESRD patients undergoing hemodialysis treatment were enrolled into the study and they were dialyzed with polysulphone (P) and cuprophane (C) membranes in two consecutive hemodialysis sessions. Superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in PMNLs from the venous blood samples of the patients, obtained before and after each hemodialysis session, were determined. A control group consisting of 15 healthy subjects was also included. Predialysis PMNL SOD (p=0.285 for P-dialysis, p=0.512 for C-dialysis) and GSH-Px (p=0.285 for P-dialysis, p=0.486 for C-dialysis) activities of the patients were not different from those of the controls. Similarly, postdialysis PMNL SOD (p=0.838 for P-dialysis, p=0.744 for C-dialysis) and GSH-Px (p=0.512 for P-dialysis, p=0.870 for C-dialysis) activities of the patients did not show difference from control data. Hemodialysis with both types of membranes did not cause a statistically significant change in PMNL SOD (p=0.460 for P-dialysis, p=0.532 for C-dialysis) and GSH-Px (p=0.773 for P-dialysis, p=0.570 for C-dialysis) activities. In conclusion, there is no difference between ESRD patients undergoing hemodialysis and controls with respect to PMNL oxidative stress status.

**Keywords:** end stage renal failure, dialyzer membranes, oxidative stress

*Nefroloji Dergisi 2004;13 (1) 26-29*

### Giriş

Hemodiyaliz (HD) ve sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) tedavisi gören kronik böbrek yetmezlikli (KBY) hastalarda bakteriyel enfeksiyon insidansı daha yüksek bildirilmektedir (1-3). Bu hastalarda enfeksi-

yon riskinin kronik böbrek yetmezliği tedavisindeki gelişmelere rağmen yüksekliğinin, savunma mekanizmasındaki bir bozukluğun işareti olduğu düşünülmektedir. Bu konu üzerinde yapılan bazı çalışmalarda, hastaların lökosit fagositik kapasitesinde bir azalmadan bahsedilmektedir (3,4). Üremik hastaların granülosit oksidatif aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar da elde edilmiştir. Üremik hastalarda polimorfonükleer lökosit (PMNL) oksidatif aktivitesinin arttığını (12-18), azaldığını (4-11) veya değişmediğini ileri süren (19-22) birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, HD hastalarının kontrollere göre PMNL oksidatif stres durumu ve iki farklı membranla yapılan HD tedavisinin PMNL oksidatif metabolizması üzerine etkileri incelenmiştir.

### Gereç ve Yöntem

Çalışmaya HD tedavisi gören 15 KBY hastası (12 erkek ve 3 kadın) dahil edilmiştir. Yaş ortalaması  $42.8 \pm 14.5$  yıl (25-67 yaş), ortalama HD süresi  $27.7 \pm 21.9$  aydır (6-74 ay). Hastalarda çalışma süresince herhangi bir enfeksiyöz veya sistemik hastalık saptanmamış olup antibiyotik, steroid veya herhangi bir immünoşüpresif tedavi mevcut değildir. Kontrol grubu, ortalama yaşı  $34.0 \pm 5.7$  yıl olan (24-48 yaş) 15 sağlıklı gönüllüden (12 erkek ve 3 kadın) oluşmaktadır.

Hastalara haftada üç kez, dörder saatlik seanslar halinde HD tedavisi uygulanmaktadır. Hastalara, birbirini izleyen iki planlı HD seansında polisülfon (Hemoflow F5, Fresenius Polysulphone, UF.4.0, 1.2 m<sup>2</sup>, Almanya) ve kuprofan (Baxter CF Capiller Flow Dialyzer Model 15.11, 1.2 m<sup>2</sup>, ABD) membranlar ile HD uygulanmıştır. Her HD seansından bir saat önce ve sonra, heparinize tüplere (Lithium heparin, 454029/A020102 Greiner bio-one) 10 ml venöz kan örneği alınmıştır. Hasta ve kontrollerden alınan her bir 10 ml'lik kan örneği 3 ml fosfat tamponlu salin (PBS) ile dilüe edilerek, 7 ml Histopaque (d: 1.119-1, Histopaque, Sigma Diagnostics, Inc. St. Louis MO 63178 ABD) eklenmiştir. Karışım oda ısısında 30 dk 500 g ile santrifüje edilmiştir. Santrifüj sonrası her bir tüp karışımında; eritrosit, trombosit, Histopaque, mononükleer hücre, PBS, PMNL ve plazma katmanları oluşmuştur. PMNL katmanı kapiler Pasteur pipeti ile aspire edilerek 2 ml Hank's solüsyonu ile (HBSS, Biological Industries, Beit Haemeks, İsrail) dilüe edilmiştir. Daha sonra bu solüsyon, 250 g ile 5 dk santrifüje edilerek süpernatant ayrılmıştır. Dipte kalan hücre tabakası 2 ml HBSS ile dilüe edilerek, 250 g ile 5 dk santrifüje edilmiştir. Bu işlem bir kez daha tekrarlanmış, kırmızı kan hücrelerinin tamamen temizlenmesini sağlamak ama-

ciyla, 3 ml lizat solüsyonu (Lysing Solution, San Jose, CA 95131, ABD) eklenen karışım 10 dk enkübe edilmiştir. Enküstasyon sonrası 250 g ile 5 dk tekrar santrifüje edilerek PMNL tabakası sıgır fetus serumu (Biomedical Industries, İngiltere) ve Hank's solüsyonu ile dilüe edilmiştir. İzole edilen PMNL süspansiyonu, Coulter sayacı ile sayımı yapılarak -80°C ısıda muhafaza edilmiş, hasta ve kontrol grubuna ait örneklerin süperoksit dizmutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri aynı anda çalışılmıştır.

PMNL süspansiyonu, hücre lizatı elde edebilmek amacıyla, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.8) ile homojenize edilerek buzla soğutulmuş, 1000 g ile 10 dk +4°C'de santrifüje edilmiştir. GSH-Px aktivitesi Aydın ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle ölçülmüştür (23). Reaksiyon karışımı; pH 7.6, 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 2 mmol/L redükte glutatyon (GSH), 0.2 mmol/L NADPH, 4 mmol/L sodyum azid ve 1000 Ü glutatyon redüktaz (GR) içeren 50 mmol/L tristampondur. Reaksiyon karışımının 950 ml'si 50 ml lizat ile karıştırılarak, 37°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon 8.8 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile başlatılarak üç dakikalık NADPH soğurma azalması 340 nm ile ölçülmüştür. PMNL lizatı enzim aktivitesi Ü/ml olarak verilmiştir.

CuZn-SOD aktivitesi de Aydın ve arkadaşlarının yöntemi ile ölçülmüştür (23). PMNL lizat örnekleri 10 mM fosfat tampon (pH 7.0) ile 400 kat dilüe edilmiştir. Dilüe lizatın 25 ml'si, 850 ml substrat solüsyonu [0.05 mmol/L zantin ve 0.0025 mmol/L 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür (INT), 50 mmol/L CAPS ve 0.94 mmol/L EDTA pH 10.2 içeren tampon solüsyonu] ile karıştırılmıştır. Karışıma 125 ml ksantin oksidaz (80 Ü/L) eklenerek 505 nm'de 3 dakikalık soğurma artışı izlenmiştir. Standart saptamalar için 25 ml fosfat tampon veya 25 ml değişik standart konsantrasyonlar kullanılmıştır. CuZn-SOD aktivitesi Ü/ml olarak belirtilmiştir.

Lizat örneklerindeki enzim aktiviteleri 10<sup>7</sup> PMNL için hesaplanmıştır. Hastaların HD seansından önceki ve sonraki PMNL enzim aktiviteleri ölçülerek sağlıklı kontrollerle ve farklı HD membranları için karşılaştırılmıştır.

İstatistiksel analiz SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program) istatistik programı ile yapılmış, enzim aktivite sonuçları ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Karşılaştırmalar için; Fisher (hasta/kontrol cinsiyet karşılaştırması), Mann-Whitney U (hasta/kontrol karşılaştırması) ve Wilcoxon (pre-/post-diyaliz enzim aktivitesi karşılaştırması) testleri kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0.05$  olarak kabul edilmiştir.

**Tablo 1. Hasta ve kontrollerin karakteristikleri**

	Hasta	Kontrol
N	15	15
Kadın/Erkek (n)	3/12	3/12
Ortalama yaş (yıl)*	42.8±14.5	34.0±5.7
HD** süresi (ay)*	27.7±21.9	

\* Ortalama ± standart sapma  
\*\* HD: Hemodiyaliz

## Sonuçlar

Hasta ve kontrol grubunun karakteristik özellikleri **Tablo 1**'de sunulmuştur. Yaş ve cinsiyet açısından her iki grup benzerdir ( $\chi^2=0.000$ ,  $p=1.000$ , yaş için  $p=0.137$ ). **Tablo 2**'de hasta ve kontrol gruplarının diyaliz öncesi ve sonrası PMNL SOD ve GSH-Px aktiviteleri görülmektedir.

Hastaların prediyaliz ( $p=0.285$  polisülfon,  $p=0.512$  kuprofan) ve postdiyaliz ( $p=0.838$  polisülfon,  $p=0.744$  kuprofan) PMNL SOD aktivitelerinde kontrollere göre bir farklılık gösterilememiştir. Benzer şekilde, prediyaliz (polisülfon  $p=0.389$ , kuprofan  $p=0.486$ ) ve postdiyaliz (polisülfon  $p=0.512$ , kuprofan  $p=0.870$ ) PMNL GSH-Px aktiviteleri de istatistiksel farklılık içermemektedir. Her ne kadar HD ile PMNL SOD ( $p=0.460$  polisülfon,  $p=0.532$  kuprofan) ve GSH-Px ( $p=0.773$  polisülfon,  $p=0.570$  kuprofan) aktivitelerinde bir azalma göze çarpsa da, bunun istatistiksel anlamlılığı saptanmamıştır.

## Tartışma

HD hastalarında artmış PMNL oksidatif aktivitesinden bahseden çalışmalar mevcuttur (13-15,17). Jacobs ve arkadaşları, HD hastalarında prediyaliz PMNL  $H_2O_2$  üretiminde artış gözlemişlerdir (13). Hemodiyaliz hastaları üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, sağlıklı bireylere göre artmış bazal PMNL  $H_2O_2$  üretiminden bahsedilmek-

tedir (14). Lucchi ve arkadaşları HD hastalarında, hücrel ve doku hasarına yol açabilecek, artmış PMNL reaktif oksijen üretimi tespit etmişlerdir (15). Yapılan bir çalışmada ise, HD öncesinde artmış granülosit SOD ve düşük GSH-Px aktivitelerinin yanında, HD'nin bu aktiviteleri indüklediği saptanmıştır (17). Bunun yanında, HD hastalarında PMNL oksidatif aktivitesinin azaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (6,7,10,24). Otsubo ve arkadaşlarının çalışmasında, uyarılmamış enzim aktivitesi kontrol grubundakine benzer bulunurken, uyarılma sonrasında belirgin biçimde düşük bulunmuştur (6). Bu çalışma, HD hastalarında nötrofillerin intraselüler oksidatif aktivitesinin azaldığını düşündürmektedir. Shurtz-Swirski ve arkadaşlarının çalışmasında, HD hastalarının SOD ve GSH-Px aktivitesi azalmış bulunmuştur (10). Yapılmış olan iki farklı çalışmada da, HD hastalarında PMNL süperoksit anyon üretimi düşük bulunmuş, HD tedavisi süresince bu düşüş devam etmiştir (7,24). Bizim çalışmamızda, düzenli HD hastalarındaki pre- ve posthemodiyaliz PMNL SOD ve GSH-Px aktiviteleri kontrol grubununkiyle karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışmamızdaki HD hastalarının indirekt oksidatif stres bulguları, Paul ve arkadaşlarının bulguları ile benzerdir (20). Paul ve arkadaşlarının çalışmasında, 1., 4. ve 10. HD seansı sonrasında, PMNL süperoksit anyon üretiminde ve oksijen tüketiminde sağlıklı bireylere göre farklılık saptanmamıştır (20).

Bizim çalışmamızda, HD hastalarında birbirini izleyen farklı günlerde ve farklı HD membranları kullanımı ile PMNL SOD ve GSH-Px aktivitelerinde istatistiksel olarak belirgin bir değişiklik saptanmamıştır. Bu bulgu, literatürdeki bazı çalışmalarla uyumludur (13-15,17). Rhee ve Klein kronik böbrek yetmezliğinde PMNL oksidatif metabolizmasını geri dönüşümlü olarak artırabilen bir serum faktöründen/faktörlerinden bahsetmektedir (16,14). Bizim çalışmamızdaki HD seansları arasındaki süre daha uzun olsaydı, prediyaliz enzim aktivitelerinde belirgin bir artış saptanabilirdi.

**Tablo 2. Hasta ve kontrollerin PMNL SOD ve GSH-Px aktiviteleri (pre- ve postdiyaliz)**

	Hastalar (n=15)				Kontroller (n=15)
	Polisülfon		Kuprofan		
	Prediyaliz	Postdiyaliz	Prediyaliz	Postdiyaliz	
SOD*	85.79±25.60	60.42±21.32	84.73±29.73	52.50±15.02	59.64±26.75
GSH-Px**	25.08±7.31	18.81±3.47	27.04±7.06	22.47±6.89	17.42±4.19

\* SOD: Süperoksit dismutaz, (Ü/10<sup>7</sup> PMNL)

\*\* GSH-Px: Glutatyon peroksidaz, (Ü/10<sup>7</sup> PMNL)

Her ne kadar bazı yayınlarda diyaliz membranlarında granülosit aktivasyonu ve serbest radikal üretiminden bahsedilse de (17), diğer bazı yayınlar ve bizim verilerimiz bunu desteklememektedir (7,13,20). Bizim bulgularımıza göre, diyaliz seansları sonrasında PMNL SOD ve GSH-PX aktivitelerindeki azalma belirgin değildir. Kuprofan membranı ile diyaliz PMNL SOD aktivitesini %38.03 ve GSH-PX aktivitesini %16.9; polisülfon membranı ile diyaliz ise PMNL SOD aktivitesini %29.57 ve GSH-PX aktivitesini %25 kadar azaltmaktadır. Yine de, bu düşüşler istatistiksel olarak anlamlı değildir. Benzer biçimde, değişik çalışmalarda Pawlicki, Jacobs ve Paul, HD'nin diyalizden önceki oksidatif durumu değiştirmediklerini iddia etmektedirler (7,13,20). Jacobs ve arkadaşları, HD ile indüklenen komplemant aktivasyonunun PMNL oksidatif aktivitesinde daha fazla artışa neden olmadığını ileri sürmektedir (13). Bunun yanında Shettler ve arkadaşları, PMNL SOD ve GSH-Px aktivitelerinin düşük akımlı polisülfon membran HD ile belirgin olarak indüklendiğini bildirmişlerdir (17).

Sonuç olarak, düzenli HD hastalarında PMNL oksidatif aktivitesinde kontrollere göre bir farklılık yoktur. Bunun yanında, polisülfon ve kuprofan diyaliz membranları HD hastalarının PMNL oksidatif aktivitesinde bir değişikliğe neden olmayıp, bu membranların kullanıldığı hastalar arasında PMNL SOD ve GSH-Px enzim aktiviteleri açısından da bir farklılık yoktur.

## Kaynaklar

1. Cohen G, Haag-Weber M, Horl WH: Immune dysfunction in uremia. *Kidney Int* 1997 (Suppl); 62:S79-82.
2. Haag-Weber M, Horl WH: Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia. *Semin Nephrol* 1996;16:192-201.
3. Mailloux LU, Bellucci AG, Wilkes BM, Napolitano B, Mossey RT, Lesser M, Bluestone PA: Mortality in dialysis patients: analysis of the causes of the death. *Am J Kidney Dis* 1991;18:326-335.
4. Sharma A, Tripathi AK, Kalra OP, Chakrabaty AK: Impaired function of neutrophils in uraemic patients. *Natl Med J India* 2000;13:121-124.
5. Hirabayashi Y, Kobayashi T, Nishikawa A, Okazaki H, Aoki T, Takaya J: Oxidative metabolism and phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes in patients with chronic renal failure. *Nephron* 1988;49:305-312.
6. Otsubo H, Kaito K, Shiba K: Flowcytometric analysis on neutrophil intracellular enzyme activity in patients on hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kansenshogaku Zasshi* 2000;74:73-81.
7. Pawlicki L, Trznadel K, Kedziara J, Blaszczyk J, Sibinska E, Luciak M: Generation of active oxygen compounds by whole blood granulocytes in patients with chronic renal failure. *Pol Arch Med Wewn* 1991;86:94-100.
8. Porter CJ, Burden RP, Morgan AG, Daniels I, Fletcher J: Impaired

9. Porter CJ, Burden RP, Morgan AG, Daniels I, Fletcher J: Impaired polymorphonuclear neutrophil function in renal failure and its correction by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1995;71:133-137.
10. Swirski RS, Mashlach E, Kristal B, Sholnik T, Shasha SM: Antioxidant enzymes activity in polymorphonuclear leukocytes in chronic renal failure. *Nephron* 1995;71:176-179.
11. Vanholder R, Dell'Aquila R, Jacobs V, Dhondt A, Veys N, Waterloss MA, Van Landschoot N, Van Biesen W, Ringoir S: Depressed phagocytosis in hemodialyzed patients: in vivo and in vitro mechanisms. *Nephron* 1993;63:409-415.
12. Eckardt KU, Eckardt H, Harber MJ, Asscher AW: Analysis of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst activity in uremic patients by using whole blood chemiluminescence. *Nephron* 1986;43:274-278.
13. Jacobs AA Jr, Ward RA, Wellhausen SR, McLeish KR: Polymorphonuclear leukocyte function during hemodialysis: relationship to complement activation. *Nephron* 1989;52:119-124.
14. Klein JB, McLeish KR, Ward RA: Transplantation, not dialysis, corrects azotemia-dependent priming of the neutrophil oxidative burst. *Am J Kidney Dis* 1999;33:483-491.
15. Lucchi L, Cappelli G, Acerbi MA, Spattini A, Lusvarghi E: Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes and serum opsonin activity in chronic renal failure. *Nephron* 1989;51:44-50.
16. Rhee MS, McGoldrick MD, Meuwissen HJ: Serum factor from patients with chronic renal failure enhances polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism. *Nephron* 1986;42:6-13.
17. Schettler V, Wieland E, Methe H, Schuff-Werner P, Müller GA: Oxidative stress during dialysis: effect on free radical scavenging enzyme (FRSE) activities and glutathione (GSH) concentration in granulocytes. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2588-2593.
18. Takahashi K, Imada A: Phagocytic activity and oxygen radicals production of neutrophils in patients with chronic renal failure. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1991;33:565-574.
19. Abrutyn E, Solomons NW, St Clair L, MacGregor RR, Root RK: Granulocyte function in patients with chronic renal failure: surface adherence, phagocytosis, and bactericidal activity in vitro. *J Infect Dis* 1997;175:1-8.
20. Paul JL, Roch-Arveiller M, Man NK, Luong N, Moatti N, Raichvarg D: Influence of uremia on polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism, in end-stage renal disease and dialyzed patients. *Nephron* 1991;57:428-432.
21. Nagai T, Kuriyama M, Kawada Y: Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1997;17:167-174.
22. Ward RA, McLeish KR: Polymorphonuclear leukocyte oxidative burst is enhanced in patients with chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1697-1702.
23. Aydın A, Orhan H, Sayal A, Özata M, Şahin G, İşimer A: Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001;34:65-70.
24. Jendryczko A, Grzeszczak W: Releasing activity of superoxide radicals by neutrophils and monocytes in hemodialyzed patients with chronic renal failure. *Pol Arch Med Wewn* 1994; 92:475-482.