

KRONİK HEMODİYALİZ HASTALARINDA LİPİD PEROKSİDASYONU

LIPID PEROXIDATION IN CHRONIC HEMODIALYSIS PATIENTS

Hasan Kaya, Fevzi Polat*, A. Rıza Odabaş**, Ramazan Çetinkaya**, İlhamı Kiki

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı,
• Biyokimya Anabilim Dalı, **Nefroloji Bilim Dalı, ERZURUM

ÖZET

Bu çalışmada kronik hemodiyaliz hastalarında diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası serbest radikal ve antioksidanların durumunu araştırmayı amaçladık. Bunun için yaş ortalaması 49,4±14.1 yıl olan 20 hemodiyaliz hastası ile yaş ortalaması 45.0±11.4 yıl olan 16 sağlıklı kontrol grubunda lipid peroksidasyonu (LP) 'nun bir göstergesi olan eritrosit ve plazma malondialdehid (MDA) düzeyi ve antioksidan savunma sisteminin parametreleri olan eritrosit glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerinin aktiviteleri ölçüldü. Kontrol grubuna göre eritrosit ve plazma malondialdehid seviyesi hasta grubunda daha yüksek (p<0.0001), GPx ve SOD enzim aktivitesi hasta grubunda daha düşük (sırasıyla, p<0.0001 ve p<0.0001), katalaz enzim aktivitesi ise kontrol grubuna daha düşük (p<0.0001) bulundu. Hasta grubunda hem eritrosit hem de plazma MDA düzeyi diyaliz sonrası daha düşük (sırasıyla; p<0.0001, p<0.0001), GPx ve katalaz enzim aktivitesi diyaliz sonrası daha yüksek (p<0.05) bulundu. SOD enzim aktivitesinin diyaliz öncesi ve sonrası değerleri arasında fark bulunamadı (p>0.05). Bu çalışma sonucunda, hemodiyaliz hastalarında LP'nun sağlıklı kişilere göre arttığı ve hemodiyalizin tedavisinin oksidatif stresi azalttığı kanaatine varıldı.

SUMMARY

In this study, we aimed to investigate the condition of oxidative stress and antioxidative defence system in chronic hemodialysis patients. So, the malondialdehyde (MDA) levels, as the marker of lipid peroxidation, and the activities of glutathione peroxidase (GPx), catalase and superoxide dismutase (SOD) being components of enzymatic antioxidative defence system were measured in 20 patients, mean age 49,4±14.1 years with chronic hemodialysis and 16 healthy volunteers, mean age 45,0±11.4 years. Both erythrocyte and plasma MDA levels of the hemodialysis patients were found to be increased compared to the control group (p<0.0001). GPx and SOD enzyme activity were lower in hemodialysis patients group compared to the control group (p<0.0001 and p<0.0001, respectively) and catalase enzyme activity was higher in the group of hemodialysis patients compared to the control group (p<0.0001). In hemodialysis patients groups, both erythrocyte and plasma MDA level was lower after the dialysis compared to the level before hemodialysis and GPx and enzyme activity were found to be high after hemodialysis compared to the level before hemodialysis, (p<0.0001, p<0.05 and p<0.05, respectively). We could find no difference in SOD enzyme activity before and after hemodialysis (p>0.05). It was concluded as a result of this study that LP was high in hemodialysis patients compared to healthy subjects and that hemodialysis treatment reduced oxidative stress.

Anahtar kelimeler: Hemodiyaliz, Lipid peroksidasyonu

Key words: Hemodialysis, Lipid peroxidation

GİRİŞ

Serbest radikaller (SR) vücutta fizyolojik olarak oluşabilen ve paylaşılmamış bir elektron içeren reaktif moleküllerdir. Normal koşullarda SR intraselluler ve ekstraselluler antioksidan savunma mekanizmaları ile detoksifiye edilerek dengede tutulmaktadır. Endojen veya eksojen nedenlerle artmış SR protein, lipid ve nükleik asitler gibi önemli moleküllerle etkileşerek yıkıcı reaksiyonları başlatabilirler. Vücutta SR düzeyindeki aşırı artışın veya antioksidan savunma sisteminde bir yetersizliğin kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık ve kanser gibi sayısız hastalıkların oluşmasında rol olduğu kabul edilmektedir (1-4). Kronik renal yetmezlikli hastalarda da serbest radikallerin artması ve antioksidan savunma mekanizmalarının azalması neticesinde lipid peroksidasyonu (LP) artmaktadır (5-8).

Hemodiyalizin SR'in oluşumunu artırıp artırmadığı hala tartışmalıdır (3,9,10). Bu çalışmada hemodiyalizin LP'na etkisini araştırmak için, hemodiyaliz hastalarında diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası LP'nun bir göstergesi olan eritrosit ve plazma malondialdehid (MDA) düzeylerini, antioksidan savunma sisteminin üyeleri olan eritrosit glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri araştırıldı.

HASTALAR VE YÖNTEM

Çalışmaya en az 6 ay, haftada 3 kez kronik hemodiyaliz tedavisi gören 20 kişiden oluşan hasta grubu (12 kadın, 8 erkek; yaş ortalaması 49,4±14.1 yıl) ile 16 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu (8 kadın, 8 erkek; yaş ortalaması 45.0±11.4 yıl) alındı. Hastaların hepsi haftada üç kez dört saat süre ile Fresenius ve Nipro marka cihazlarda hemodiyalize girmektedir. Kan akım hızı 300 ml/dk ve diyalizat akım hızı 500 ml/dk idi. Diyalizde 1-1.5 m ölçülerinde polisülfon hollow-fiber membranlar ve bikarbonatlı diyalizat solüsyonları kullanıldı. Sigara içenler ve diabetik olanlar çalışma kapsamına alınmadı.

Hâsta ve kontroi grubundaki kişilerin hepsinden 4 mi açlık ven kanı 0,5 ml EDTA çözeltilisi içeren tüplere alındı. Numunelerin bekletilmeden plazması ayrıldı. Eritrositler buzda soğutulmuş serum fizyolojik ile üç kez yıkandı. Plazma ve eritrositler kullanılacağı güne kadar - 20 OC'de saklandı. Çalışma günü eritrositler redistile soğuk su ile dilüe edildi. Eritrosit membranları analiz öncesi 10000g de 15 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı.

Eritrosit süspansiyonların hemoglobin konsantrasyonları siyanomethemoglobin metoduna göre tayin edildi. (11). Eritrosit-glutatyon peroksidaz enzim aktivitesi Paglia ve Valentina'nın (12), katalaz enzim aktivitesi Aebi'nin (13), SOD enzim aktivitesi Sun ve arkadaşlarının (14), MDA düzeyleri Cynamon ve arkadaşlarının (15) tarif ettiği yöntemle ölçüldü. Plazma MDA düzeyleri ise Ohkawa ve arkadaşlarının (16) tarif ettiği yöntemle ölçüldü.

İstatistiksel olarak kontrol ve hasta gruplarının karşılaştırılmasında ve diyaliz öncesi ve sonrası değerlerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi uygulandı.

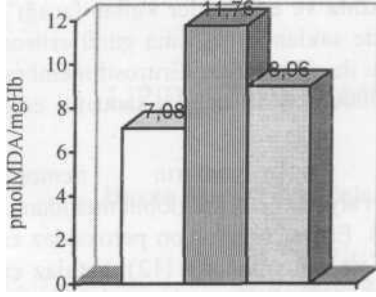
SONUÇLAR

Eritrosit ve plazma malondialdehid seviyesi hasta grubunda daha yüksek ($p<0.0001$), antioksidan enzimlerden GPx ve SOD enzim aktivitesi hasta grubunda daha düşük (sırasıyla; $p<0.0001$, $p<0.0001$). katalaz enzim aktivitesi ise hasta grubunda daha yüksek ($p<0.0001$) bulundu. Hasta grubunda hem eritrosit hem de plazma MDA düzeyi diyaliz sonrası daha düşük (sırasıyla, $p<0.0001$ ve $p<0.0001$), GPx ve katalaz enzim aktivitesi diyaliz sonrası daha yüksek ($p<0.05$) bulundu. SOD enzim aktivitesinin diyaliz öncesi ve sonrası değerleri arasında fark bulunamadı ($p>0.05$). Kontrol ve hasta grubunda elde edilen sonuçlar **Tablo 1** ve **Şekil 1**'de gösterildi.

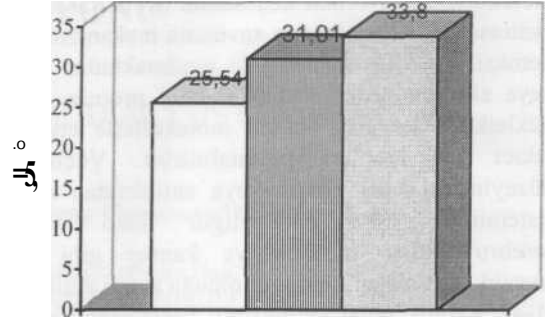
Tablo1: Hasta ve kontrol gruplarındaki antioksidanlar ve malondialdehid değerleri

	Kontrol (n= 16)	Diyaliz öncesi (n=20)	Diyaliz sonrası (n=20)
Eritrosit malondialdehid, pmolMDA/mgHb	7,08 ±0,1	11,76 ±0,3	8,96 ±0,8.
Plazma malondialdehid, nmolMDA/ml	2,54 ±0,2	4,33 ± 0,3	3,70 ±0,3
Glutatyon peroksidaz, U/gHb	66,01 ± 14,1	47,19 ±5,6	51,90 ±4,4
Katalaz, U/gHb	25,54 ±3,6	31,01 ±3,0	33,80 ±2,6
Süperoksit dismutaz, U/gHb	2447 ± 300	1989± 159	1921± 149

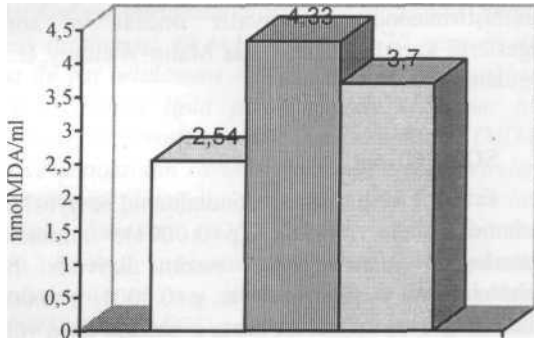
Eritrosit malondialdehid



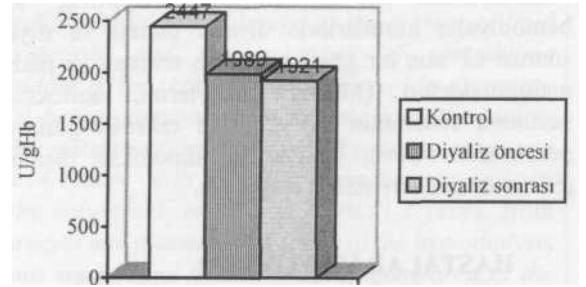
Katalaz aktivitesi



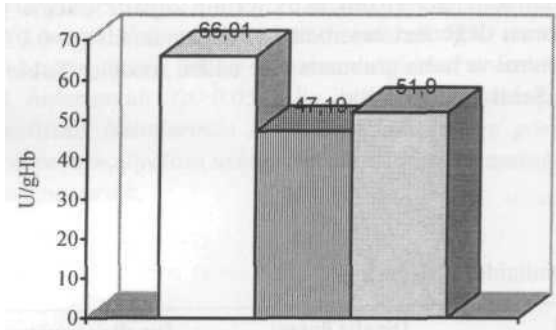
Serum malondialdehid



Süperoksit dismutaz aktivitesi



Glutatyon peroksidaz aktivitesi



Şekil 1: Hasta ve kontrol grubunda bulunan sonuçların ortalamaları

ürünlerinden birisi de malondialdehid. Eritrosit ve plazma MDA düzeyi in vivo serbest radikaller aracılığı ile oluşan doku hasarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (4,5,9,17).

Genel olarak hemodiyaliz hastalarında SR artmış, antioksidan savunma sistemi azalmıştır (5). Hemodiyalizde kullanılan membranın neden olduğu nötrofil ve kompleman sisteminin aktivasyonu ve antikoagülasyon için kullanılan heparine bağlı serbest yağ asitlerinin artması LP'nun artmasına yol açabilir (1,5).

Hemodiyaliz uygulanmayan kronik renal yetmezlikli hastalarda serum MDA düzeyi hemodiyaliz hastalarına göre düşük bulunmuş ve bu bulgulara dayanarak hemodiyalizin oksidatif stresi artırdığı söylenmiş (1,9). Bu görüşü destekler, benzer iki ayrı çalışmada kardiovasküler komplikasyon gelişen hemodiyaliz hastalarında serum MDA seviyesini

TARTIŞMA

Serbest radikaller çoğunlukla hücre membranında LP'na yol açarak hücre hasarına neden olurlar. LP hücre membran lipid tabakalarının bütünlüğünün, permeabilitesinin ve iyon transportunun bozulmasına yol açar ve neticede hücre ölür. LP'nun son

kardiyovasküler komplikasyon gelişmeyen hemodiyaliz hastalarına göre daha yüksek bulunmasıdır (10). Ancak, MDA'daki artış oluşan kardiyovasküler hastalığın kendisinin serbest radikal yükünü artırmasından dolayı olabilir. Bu nedenle hemodiyalizin oksidatif stresi arttırdığını söylemek zordur (9).

Yapılan bir çok çalışmada ise diyaliz sonrası eritrosit ve plazma MDA düzeyinde azalma ve bazı antioksidan enzim aktivitelerinde artma tespit edilmiştir (1,10). Bu bulgular ile, diyaliz ile üremik toksinlerin atılmasının LP'nu azaltacağı ve antioksidan enzim düzeyini arttıracığı söylenebilir. Tacconi-Gallucci ve arkadaşları serum kreatinin seviyesi 5 mg/dl'nin üzerinde olan hastalarda eritrosit membran LP'nun arttığını ve bu nedenle LP'nun diyaliz işleminden ziyade renal yetmezlikle ilgili olduğunu bildirmişlerdir (17). Ayrıca, Banni ve arkadaşları yüksek performanslı likid kromotografi kullanarak yaptıkları çalışmada lipid peroksidasyonu sırasında oluşan linoleik asit ve diğer bazı ürünlerin hemodiyaliz hastalarında kontrole göre farklı olmadığını rapor etmişlerdir (4). Bu çalışmada hastalarda diyaliz sonrası eritrosit ve plazma MDA düzeyinde önemli oranda azalma bulundu.

Normal kişilerde antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin düşük steady-state konsantrasyonlarında kalmalarını sağlar. Bu savunma sistemi organizmada oksidan stresin arttığı bazı klinik durumlarda da aktivitesini artırarak koruyucu etkinliğini sürdürmeye çalışır. Genel olarak SOD enzim sistemi, antagonist olmaktan çok, organizmayı serbest radikal hasarına karşı koruyucu bir sistemdir. Katalaz ve peroksidazlar hidrojen peroksidin steady-state konsantrasyonunu düşürmeye yardım ettikleri için serbest radikal temizleyicileri olarak kabul edilirler. SOD enzimi, katalaz ve GPx enzimleriyle beraber çalışmaktadır (18). Metabolik değişiklikler nedeniyle oluşan antioksidan savunma zaafı bütün sistemi etkileyecektir. Bunun sonucu olarak da özellikle poliansatüre yağ asidlerince zengin biyolojik sistemlerin peroksidasyon kaçınılmaz olacaktır (17).

Hemodiyaliz sırasında bakır, çinko, selenyum gibi eser elementlerin kaybı ve üremik enzim toksinlerin inhibisyonu yapması neticesinde SOD ve GPx enzim aktivitelerinin azalabileceği, bunun tersine üremik toksinlerin hemodiyaliz sırasında çıkarılması glikoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi antioksidan enzimlerin artabileceği bildirilmektedir (5,8). Hemodiyaliz hastalarında bazı antioksidanların normal veya hatta normalden yüksek bulunmasına rağmen, lipid peroksidasyonun artmış olmasının, sağlıklı kişilere göre antioksidan tüketiminin hemodiyaliz hastalarında fazla olmasına bağlı olabileceği bildirilmektedir (10).

Bu çalışmada diyaliz sonrası GPx ve katalaz enzimi aktivitesi daha yüksek (GPx için $p < 0.05$, katalaz için $p < 0.001$), SOD enzim aktivitesi daha düşük bulundu. Ancak, SOD enzim aktivitesindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$). Katalaz aktivitesini diyaliz hastalarında kontrol vakalarına göre daha yüksek bulduk. Hemodiyaliz hastalarında katalaz enzim aktivitesindeki bu artış, bu enzimin diğer antioksidanlara göre böbreklerde oldukça fazla bulunması ve artmış SR karşısında daha fazla aktivite göstermesine bağlı olabilir.

Kuprofan membran kullanımında geçici nötropeni, kompleman aktivasyonu ve pulmoner disfonksiyon oluşur. Hemodiyalizde kullanılan membran tipinin LP'na etkisinin değişik olduğu kabul edilmektedir. Bazı araştırmacılar polisulfon membran kullanılan hemodiyaliz hastalarında kuprofan membran kullanılan hemodiyaliz hastalarına göre oksidatif stresin daha az olduğunu rapor etmişlerdir (1,2,8,17). Bu çalışmada hastaların hepsinde polisulfon membran kullanıldığından dolayı LP'na membranların etkisini karşılaştıramadık.

Kronik renal yetmezi ikli hastaların çoğu anemiktir. Membran lipidlerinin oksidasyonu değişik patolojik şartlarda eritrositlerin yaşlanması ve yıkılmasına sebep olur. Bu hastalarda, özellikle pentoz fosfat yolun aktivitesindeki bir defekten dolayı NADPH yapımının azalması SR'in birikimine neden olur. Bunun neticesi eritrositlerin LP'na yatkınlığı artmaktadır (1,2,5-7). İlave olarak, bazı araştırmacılar kronik renal yetmezlikte gözlenen aneminin oluşmasında eritrositlerin antioksidan kapasitesinin azalmasının katkısı olduğunu rapor etmişlerdir (7).

Bu çalışma sonucunda, hemodiyaliz hastalarında LP'nun sağlıklı kişilere göre arttığı ve hemodiyalizin tedavisinin oksidatif stresi azalttığı kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH and et al. Q .1 Med 1994;87:679-683.
2. Dasgupta A, Hussaain S, Ahmad S. Increased lipid peroxidation in patients on maintenance hemodialysis. Nephron 1992; 60: 56-59.
3. Cavanagh EMV, Ferder L, Carrasquedo F and et al. Higher levels of antioxidant defences in enalapril-treated versus non-enalapril-treated hemodialysis patients. Am J Kidney Dis 1999; 34: 445-455.
4. Banni S, Lucchi L, Baraldi A and et al. No direct evidence of increased lipid peroxidation in hemodialysis patients. Nephron 1996; 72: 177-183.
5. Çavdar C, Camsari T, Semin I, and et al. Lipid peroxidation ant antioxidant activity in chronic

- haemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Scand J Urol Nephrol* 1997; 31: 371-375.
6. Giardini O, Taccone-Gallucci T, Lubrano R and et al. Evidence of red blood cell membrane lipid peroxidation in haemodialysis patients. *Nephron* 1984; 36: 235-237.
 7. Yalçın AS, Yurtkuran M, Dilek K and et al. The effect of vitamin E therapy on plasma and erythrocyte lipid peroxidation in chronic hemodialysis patients. *Clinica Chimica Acta* 1989; 185: 109-112.
 8. Anderton JG, Thomas TH, Wilkinson R. Increased susceptibility to membrane lipid peroxidation in renal failure. *Nephron* 1996; 74: 373-377.
 9. Boaz M, Matas Z, Biro A and et al. Serum malondialdehyde and prevalent cardiovascular disease in hemodialysis. *Kidney Int* 1999; 56: 1078-1083.
 10. Boaz M, Matas Z, Biro A and et al. Comparison of hemostatic factors and serum malondialdehyde as predictive factors for cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 438-444.
 11. Fairbanks VF, Klee GG. Measurement of hemoglobin concentration in whole blood. In: Tietz (ed) *Textbook of Clinical Chemistry*. WB Saunders, Philadelphia 1986, pp 1532-1534.
 12. Paglia DE, Valentina WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
 13. Aebi H. Catalase. in: Bergmeyer HU (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York 1974, pp 673-684.
 14. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
 15. Cynamon HA, Isenberg IN, Nguyen CH. Erythrocyte malondialdehyde release in vitro: a functional measure of vitamin E status. *Clinica Chimica Acta* 1985; 151: 169-176.
 16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
 17. Taccone-Gallucci M, Giardini O, Lubrano R and et al. Red blood cell lipid peroxidation in predialysis chronic renal failure. *Clin Nephrol* 1987; 27: 238-241.
 18. Erden M. Serbest radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri* 1992; 12: 201-207.