

44999

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**HEMODİYALİZ HASTALARINDA ERİTROPOİETİNİN
OKSİDAN STRES VE ANTİOKSİDAN SAVUNMA
SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

DR. CANER ÇAVDAR

UZMANLIK TEZİ

44999

TEZ YÖNETİCİSİ

DOÇ. DR. TANER ÇAMSARI

İZMİR - 1995

ÖNSÖZ

İç hastalıkları uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve birikimleriyle yetişmemi sağlayan tüm hocalarıma, tezimin hazırlanmasında değerli katkıları nedeniyle Sayın Doç. Dr. Taner ÇAMSARI'ya, Fizyoloji ABD Başkanı Sayın Prof. Dr. Hamit ÖZGÖNÜL, Sayın Doç. Dr. İlgi ŞEMİN ve Fizyoloji ABD araştırma görevlilerine, Hemodiyaliz ve Periton Diyalizi Ünitesi hemşirelerine ve tezimin yazılmasında emeği geçen Sayın Gülçin ÖZBEN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Caner ÇAVDAR

İÇİNDEKİLER

I) Genel Bilgiler	1-10
1) Serbest Radikal ve Antioksidan Savunma Kavramları	1-4
2) Böbrekteki Antioksidan Enzimler (İşlevleri ve Düzenlenmesi)	5-7
3) Kronik Böbrek Yetmezliği Olan Hastalarda Oksidan Stres ve Antioksidan Savunma Sistemindeki Değişiklikler	8-10
II) Gereç ve Yöntem	11-15
III) Sonuçlar	16-23
IV) Tartışma	24-27
V) Sonuç	28
VI) Özet	29-30
VII) Kaynaklar	31-35

GENEL BİLGİLER

1- SERBEST RADİKAL VE ANTIOKSİDAN SAVUNMA KAVRAMLARI

Serbest radikal atomik yada moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen partikülleri de denmektedir. Orbitalerde çiftler halinde bulunan elektronlar çok stabil olduğundan, serbest radikaller başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozarlar (1). Organizmada pek çok türde reaktif oksijen partikülü (ROP) oluşabilir (Tablo 1) (2). Ancak en çok oluşanı lipid yapılarla olanıdır.

Tablo 1 : Reaktif Oksijen Partikülleri (Oksidanlar)

1 - Radikaller :	Süperoksit radikal	(O ₂ ⁻)
	Hidroksil radikal	(OH ⁻)
	Alkoksil radikal	(LO ⁻)
	Peroksil radikal	(LOO ⁻)
2 - Radikal olmayanlar:	Hidrojen peroksit	(H ₂ O ₂)
	Lipidhidroperoksit	(LOOH)
	Hipoklorik asit	(HOCl)
3 - Diğer :	Singlet Oksijen	

Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle reaktif oksijen partikülleri süperoksit (O₂⁻) ve hidroksil (OH⁻) gibi radikaller, ayrıca hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi radikal olmayanlar için ortak olarak kullanılan bir terimdir. Bu maddeler oksidanlar olarak da adlandırılırlar (3).

Tablo 2'de ise oksidanların in vivo ortamdaki kaynakları görülmektedir (4).

Tablo 2 : Oksidanların Kaynakları

I - Normal biyolojik işlemler

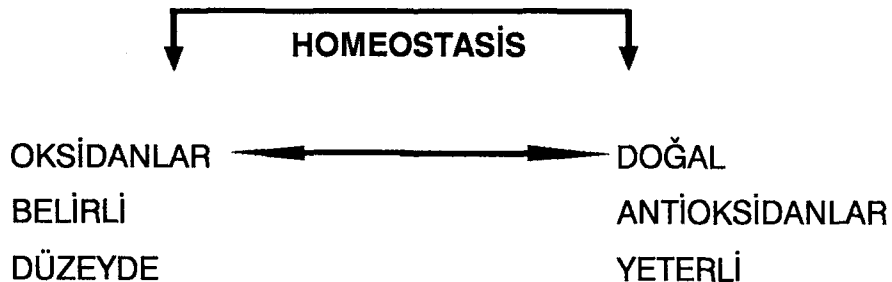
- 1- Oksijenli solunum
- 2- Katabolik ve anabolik işlemler

II - Oksidatif stres yapıcı durumlar

- 1- İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - intoksikasyon
- 2- Ksenobiotik maddelerin etkisi
 - a) İnhale edilenler
 - b) Alışkanlık yapan maddeler
 - c) İlaçlar
- 3- Oksidan Enzimler
 - a) Ksantin oksidaz
 - b) Indolamin dioksijenaz
 - c) Triptofan dioksijenaz
 - d) Galaktoz oksidaz
 - e) Siklooksijenaz
 - f) Lipooksijenaz
 - g) Monoamino oksidaz
- 4) Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
- 5) Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler)
- 6) Uzun süreli metabolik hastalıklar
- 7) Diğer nedenler : Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

III - Yaşlanma Süreci

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Belirli bir üst düzeye kadar olabilen oksidan molekül artışı yine vücutta daima belirli bir düzeyde bulunan doğal endojen antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir (5). Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge (Homeostasis) içindedir (Şekil 1).



Şekil 1 : Oksidan ve antioksidan dengesi.

Oksidanlar belirli düzeyin üzerinde oluşur veya antioksidanlar yetersiz olursa (veya antioksidanların düzeyi artarsa) yani homeostasis bozulursa sözkonusu oksidan meleküller, organizmanın yapı elemanları olan protein, lipid, karbohidrat, nükleik asit ve yararlı enzimlerini bozarak zararlı etkilere yol açarlar (Tablo 3) (6,7).

Tablo 3: Artmış Oksidanların Zararları

- Hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar,
- Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler,
- DNA'yı tahrip ederler,
- Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar,
- Litik enzimleri aktive ederler (Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipooksigenaz, siklooksigenaz, ksantin oksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz),
- Hücrenin potasyum kaybını arttırırlar,
- Trombosit agregasyonunu arttırırlar,
- Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar,
- Hücre dışındaki kollagen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar,
- Kapiller geçirgenliği bozarlar.

Membran lipidleri, oksidanların en önemli hedeflerindedir. Membran lipid peroksidasyonu sonucu membran bütünlüğü bozulur, membran proteinleri ve membran reseptörleri ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar. Membran lipid hasarı sonucu sitotoksik olarak bilinen malondialdehid (MDA) gibi yan ürünler de oluşur (8).

Memeli hücrelerinde oksidan ürünlere karşı korunma bazı prensipler içinde gerçekleşmektedir (Tablo 4) (1).

Tablo 4 : Oksidanlarla Mücadele Aşamaları

- 1- Oksidanları arttırıcı etkenlerden uzaklaşmak,
- 2- Tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları kırmak,
- 3- Oksidan salgılayan hücreleri etkisizleştirmek,
- 4- Artmış oksidanları etkisizleştirecek antioksidanları kullanmak.

Oksidanların organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenler olarak özellikle oksidatif stres yapıcı nedenlerin ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi, bunlardan uzak durulması ve varsa etkileri ile mücadele edilmesi ilk yapılması gereken girişim olmalıdır.

İkinci girişim ise doku hasarına yol açan olayın etkisiyle tetiklenen biyokimyasal reaksiyonları bir veya birkaç basamağında kırmaktır. (Lipid peroksidasyonu inhibitörleri, siklooksigenaz inhibitörleri)

Üçüncü mücadele yolu oluşan mediyatörlerle aktive olan nötrofiller başta olmak üzere inflamatuvar hücrelerin lezyon yerine hücumunu ve orada aşırı birikimini önlemektir (1).

Oksidan moleküllerle mücadelede üzerinde durulacak esas girişim, belirli düzeyi aşmış oksidanlara doğrudan etki edip onları inaktif hale getiren antioksidanlardır. Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır. İnsanda en bellibaşlı hücre içi antioksidanlar superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir (1). SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez, GPx 'de ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda SOD, GPx ve CAT enzimlerinin aktivitesi çok sınırlıdır. Bu nedenle hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin, seruloplasmin, albumin, bilirubin, beta karoten ve alfa-1 antitripsin sorumludur (9,10,11,12).

2- BÖBREKTEKİ ANTIOKSİDAN ENZİMLER (İşlevleri ve Düzenlenmesi)

Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında reaktif oksijen partiküllerinin (ROP) akut - kronik ve/veya immün - immün olmayan böbrek hastalıklarında patofizyolojik önemleri saptanmıştır (Tablo 5) (13). Böbrek dokusu veya idrarda oksidan hasar ürünlerinin saptanması yanında ROP inhibitörleriyle koruyucu etkinin gösterilmesi bu ilişkiyi kanıtlamıştır.

Tablo 5 : Reaktif oksijen partiküllerinin patogenezinde rol oynadığı düşünölen böbrek hastalıkları

- Glomeröler hastalıklar

- Minimal lezyon hastalığı
- Membranöz nefropati
- Nötrofil infiltrasyonu sonucu gelişen hasarlar

- Akut Böbrek Yetmezliği

- Post - iskemik
- Toksik (Cis-platinum, gentamisin, kontrast ilaçlar, myoglobüri, hemoglobüri, radyasyon, hemolitik - üremik sendrom)

- Obstrüktif nefropati

- Pyelonefrit

ROP kaynakları böbrek hücreleri, nötrofiller veya dolaşımdaki diğör hücreler olabilir. Glomeröler mesangial hücreler kompleman 5b-9-membran kompleksleriyle reaksiyona girdiklerinde ROP sentezliyebilirler. Böbreklerde oluşun ve doku hasarına yol açan oksidan radikaller, antioksidan savunma sistemleriyle temizlenirler. Puromisin aminonökleozid ile oluşturulan renal toksisite

yoğun proteinüriyle karakterizedir ve gelişen glomerüler lezyon ultrastrüktürel olarak minimal lezyon hastalığıyla aynıdır. Glomerülde ksantin oksidaz aktivitesi ve aldehid düzeyi (nonspesifik lipid peroksidasyon ürünü) artmış olarak saptanır (14,15). Superoksit dismutaz (SOD) veya katalaz (CAT) enziminin eksojen olarak uygulanmasıyla işlevsel ve yapısal iyileşme hızlandırılabilir. Bu spesifik antioksidan enzimlerin etkinliği iskemi/reperfüzyon hasarı gibi birçok deneysel çalışmada gösterilmiştir (16,17).

Endojen antioksidan enzimler, böbreklerin oksidan hasarına karşı gelişen temel savunma sistemidir: E vitamini ve selenyumdan fakir diyetle beslenen hayvanlarda antioksidan aktivitede yetersizlik nedeniyle yoğun proteinüri ve glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalma saptanmıştır (18). Sıçanlar üzerindeki çalışmalarda dietiltiokarbamat ile SOD depresyonu yapıldığında puromisin aminonükleozide bağlı nefrotoksisitenin şiddetlendiği gözlenmiştir (18).

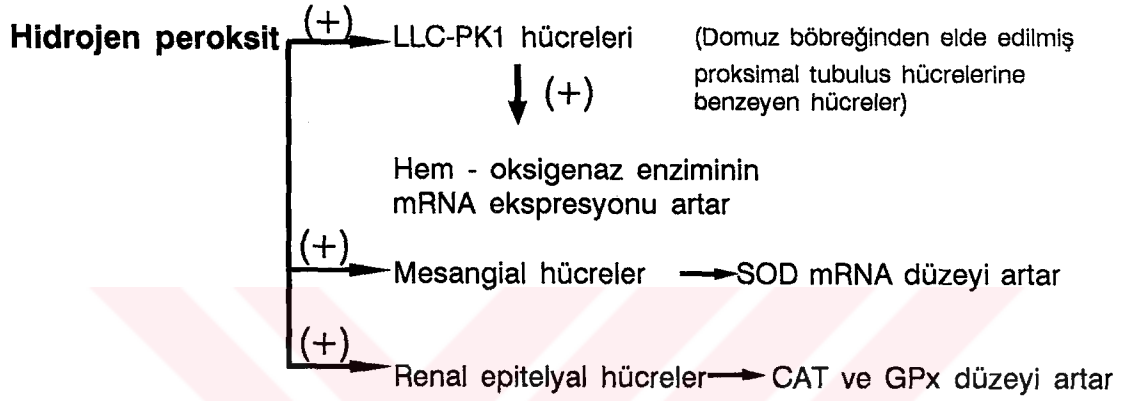
Rhabdomyolize bağlı gelişen akut böbrek yetmezliği oksidan stresin önemli rol oynadığı klinik tablolardandır. Dimetiltiüre veya desferrioksamin uygulanmasıyla güçlendirilen antioksidan savunma sonucu azalmış olan GFR üzerine olumlu etki yapılırlar (18,19).

Oksidatif böbrek hasarında endojen antioksidan enzimlerin belirgin koruyucu etki göstermeleri yukarıda belirtilen iki çalışmanın da ortak noktasıdır. Minimal lezyon hastalığında tedavide kullanılan glikokortikoidler glomerüler ayaksı çıkıntı kaybını ve glomerüler lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumunu azaltırlar, antioksidan enzimleri arttırlar (15).

Renal Antioksidan Enzimlerin Lokalizasyonu ve Regülasyonu: Renal antioksidan enzimler postnatal gelişim gösterirler. Oberley ve arkadaşları, hamster böbreklerinde SOD ve CAT enzimlerinin immünohistokimyasal yöntemlerle lokalizasyonlarını araştırmışlardır. Bu çalışmada doğumdan önce pozitif boyanmanın olmadığı, doğumdan sonra ilk pozitif boyanmanın juxtamedüller bölgeden başladığı ve izlemde kortikal nefronlara doğru genişleme gösterdiği saptanmıştır (20). Diğer hücrelerde olduğu gibi böbrek hücrelerinde de birçok biyolojik uyarıyla antioksidan enzimlerin aktivitesi artar. Örneğin sıçanlarda glomerüler mesangial hücreler hidrojen peroksitle enkübe edilecek

olursa SOD aktivitesi anlamlı olarak artar (18). İskemi/reperfüzyon modelinde SOD, GPx ve CAT birlikte artar. Glomerüler endotelial hücreler metilprednisolon ile enkübe edildiğinde ortamda SOD ve CAT enzim düzeyinin arttığı görülebilir (up-regülasyon).

Aşağıdaki örneklerde de görüleceği gibi böbrekler oksidan hasara uğradıktan sonra ortamdaki lokal antioksidan savunma genlerinin aktivasyonu sonucu antioksidan enzimlerin regülasyonu sağlanır (18,19):



Sonuç olarak böbrekler, oksidan stres karşısında antioksidan savunmasını kullanır. Bu savunma doğal ve tedavi edici uyarıcılarla güçlendirilebilir. Böylece birçok böbrek hasarına karşı yeni tedavi yaklaşımları geliştirilebilir.

3- KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ OLAN HASTALARDA OKSİDAN STRES VE ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER

Kronik böbrek yetmezliğinde (KBY) serbest radikaller (lipid peroksidasyonu) artmış, antioksidan savunma ise azalmıştır (21,22,23,24).

KBY kompleks bir patolojidir. Ateroskleroz, kardiyak tutulum ve amiloidoz gibi sistemik etkilerin oluşmasında serbest radikallerin aşırı üretilmesinin de katkısı olabilir. Üremik hastalardaki aneminin nedenlerinden biri de eritrosit membranlarındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunun artması ve/veya enzimatik antioksidan savunma sistemindeki yetersizliktir (25,26,27).

Tablo 6'da HD hastalarında artmış lipid peroksidasyonu ve azalmış antioksidan savunma sebepleri özetlenmiştir (28,29,30,31,32).

M.J. Richard ve arkadaşlarının 1991 yılında yaptıkları çalışma ile üremik hastalarda hemodiyaliz (HD) ile selenyum ve çinko kaybı sonucu antioksidan metaloenzim aktivitelerinin azaldığı ve HD gören grupta lipid peroksidasyonun arttığı saptanmıştır (25).

Matkovics ve arkadaşları 1988 yılında yaptıkları çalışmalarında eritrosit SOD ve CAT aktivitelerinde HD öncesi azalma ve HD sonrası normalleşme saptamışlardır. Lipid peroksidasyonunda ise artma olduğunu bildirmişlerdir (26).

Tablo 6: HD hastalarında artmış lipid peroksidasyonu ve azalmış antioksidan savunma sebepleri .

Artmış lipid peroksidasyonu (Oksidan stres)	Azalmış antioksidan savunma
Üremiye bağlı toksik metabolitler	Üremik hastalarda beslenme bozukluğu sonucu eksik alım,
Hemodiyalizin etkisi	HD'le kayıpla plasmada E vitamini ve iz elementlerin (bakır çinko-selenyum)eksikliği.
a) Hemodiyaliz membranları nedeniyle lökosit ve kompleman sisteminde aktivasyon	
b) Heparinin etkisiyle serbest yağ asidi artımı	Eritrosit Na ⁺ -K ⁺ ATP-az ve asetilkolin esteraz enzim aktivitesinde azalma
c) Diyalizat sıvısı (Kloramin ve iz elementlerin konsantrasyon farkı)	Eritropoietin eksikliği (veya etkisine direnç)
e) Diyaliz sırasında hastalardan iz element ve vitamin kaybı	Üremiye bağlı toksik metabolitlerin antioksidan savunma enzimlerini inhibe etmesi.
f) Termal hasar	

Rudko ve arkadaşları 8 HD hastasında yaptıkları çalışmalarında rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen insan eritropoietininin (r-HuEPO) hızlanmış lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan yüksek malondialdehid (MDA) düzeyini normalleştirdiğini bildirmişlerdir (33).

Djordjevic ve arkadaşları ise 9 HD hastasında yaptıkları çalışmalarında r-HuEPO tedavisiyle SOD ve CAT enzimi aktivitelerinde hemoglobin konsantrasyonundaki artışa paralel olacak şekilde artma olduğunu saptamışlardır (34).

Zachee ve arkadaşları ise 1993 yılında yaptıkları çalışmalarında KBY hastalarında r-HuEPO tedavisinin üreminin pro-oksidan etkisiyle oluşan eritrosit yıkımını azaltmadığını saptamışlardır (35).

Yukarıda belirtilen çalışmalarda, HD tedavisi gören KBY hastalarında r-HuEPO'nun oksidan stres ve antioksidan savunma üzerine etkileri gösterilmiş fakat çalışma sonuçlarında farklılıklar gözlenmiştir. Ayrıca r-HuEPO'nun bu sistemler üzerine hangi mekanizmalarla etki yaptığı da net olarak açıklanmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, HD tedavisi gören hastalarda r-HuEPO'nun oksidan stres ve antioksidan savunma sistemleri üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.



GEREÇ VE YÖNTEM

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Nefroloji biriminde izlenen ve son dönem böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz (HD) tedavisi gören hastalardan 15 tanesi çalışmaya alınmıştır. Çalışma grubundaki 15 hastadan ise 13'ü istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. 13 HD hastası (4 erkek - 9 kadın) 'nın yaş ortalaması $41,4 \pm 17$ (14-70 yıl) olup; ortalama hemodiyaliz süresi 18,4 aydır (4-36 ay). Üremik ve anemik olmayan 13 kişi de (7 erkek, 6 kadın) kontrol grubu olarak seçilmiştir. Kontrol grubunun yaş ortalaması $45,6 \pm 12,9$ yıldır.

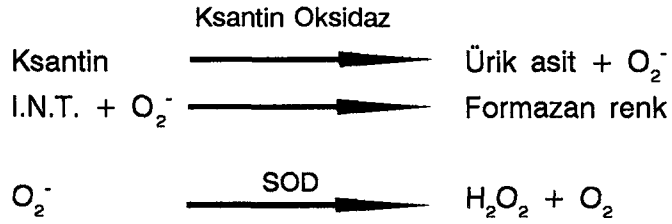
Son 3 ay içinde kan transfüzyonu yapılanlar, demir depo hastalığı saptananlar, sigara içenler ve r-HuEPO kullanım öyküsü olan hastalar çalışmaya alınmamıştır. HD hastalarına diyaliz seansında kuprofan membran ve asetatlı diyalizat kullanılmıştır. Hastalara haftada üç kez dörder saatlik hemodiyaliz tedavisi uygulanmıştır. HD tedavisi gören ve hemoglobin değeri 10-11gr/dl (Htc %30-33) nin altında olan hastalardan r-HuEPO (Epoetin- α , CILAG^R) 3x4000Ü/hafta subkutan (SC) tedavisine başlamadan önce ve hedef hemoglobin değeri 10-11 gr/dl (Htc %30-33)'ye ulaşıldığı dönemde (diyaliz seansından önce) 10 cc heparinli periferik venöz kan alınmıştır. Kan alınırken turnike uygulanmamıştır. Alınan heparinli periferik venöz kan örneğinden oksidan stresi tayin etmek için plazma MDA, antioksidan savunma için total GPx ve eritrosit SOD düzeylerine bakılmıştır.

Eritrosit SOD ve total kan GPx aktiviteleriyle plazma MDA miktarları Shimadzu UV-1201 V spektrofotometri cihazı ile saptanmıştır. r-HuEPO tedavisi öncesi ve sırasında elde edilen değerler Wilcoxon eşleştirilmiş 2 örnek testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile çalışma grubu ise Mann-Whitney U testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

1- Eritrosit SOD aktivitesinin ölçülmesi :

Eritrosit SOD aktivitesi Randox'un RANSOD (Kat. No. SD 125) kiti ile araştırılmıştır. SOD'un rolü oksidatif enerji süreçleri arasında oluşan toksik süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu

sağlamaktır. Çalışma yöntemi , süperoksit radikalleri oluşturmak üzere ksantin ve ksantin oksidazı kullanır. Oluşan süperoksit radikalleri 2-4-iodophenil - 3-4 nitrophenol - 5-phenyltetrazolium chloride (INT) ile reaksiyona girerek, kırmızı formazan renk oluşturur. Yöntemin esası, bu reaksiyonun SOD tarafından inhibisyon derecesine dayanır.



Spektrofotometrik işlem :

Dalga boyu : 505
Küvet : 1cm ışık yolu
Sıcaklık : 37 derece
Ölçüm : Havaya karşı

A : Örneklerin Hazırlanması

0.5 ml heparinize tam kan 3.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek plazması uzaklaştırıldı. Daha sonra eritrositler, 3 ml %0.9 NaCl ile dört kez yıkandı. Yıkanmış eritrositlere 2 ml soğuk redistile su eklenip, +4 derecede 15 dakika bekletildi. Elde edilen hemolizat 0.01 molar fosfat tampon (pH : 7.0) ile seyreltildi. 25 kat seyreltme (seyreltme kat sayısı : 100) ile, örneklerin inhibisyon yüzdesi %30-60 arasında olacak şekilde ayarlandı. Seyreltilmiş örneğe 1.7 ml karışım substrat eklenip iyice karıştırıldı. Kör için, 0.05 ml fosfat tampona 1.7 ml karışım substrat eklendi. Daha sonra örnekler ve köre 0.25ml ksantin oksidaz eklendi ve aynı anda süre başlatıldı. 30 saniye sonra başlangıç absorbansı (A1) ve bundan 3 dakika sonra son absorbans (A2) okundu.

B. Standartların Hazırlanması

Standart eğri için standart solüsyonun ardarda dilüsyonları 0.01 molar fosfat tampon (pH :7.0) ile yapıldı.

S5	5ml	S6	5ml fosfat tampon
S4	5ml	S5	5ml fosfat tampon
S3	5ml	S4	5ml fosfat tampon
S2	5ml	S3	6ml fosfat tampon
S1 : Kör (fosfat tampon)			

Daha sonra apsis standart konsantrasyonu, ordinat inhibisyon yüzdesini gösterecek şekilde grafik çizildi.

C- Sonuçların Hesaplanması :

Standart ve örnekler için δA

$$\frac{A2 - A1}{3} = \delta A \text{ standart veya örnek}$$

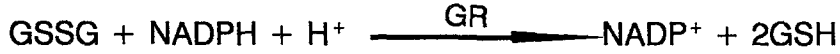
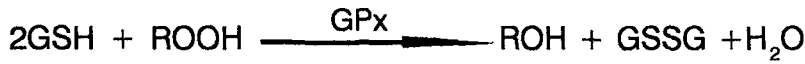
$$100 - \frac{\delta A \text{ std./dak.}}{\delta A \text{ kör/dak.}} \times 100 = \text{İnhibisyon yüzdesi (\%)}$$

Her bir standart konsantrasyon için inhibisyon yüzdesi hesaplandı ve grafikte işaretlendi. Aynı formül ile örneklerin inhibisyon yüzdesi hesaplandı. Bu inhibisyon yüzdeleri kullanılarak örneklerin SOD ünite/ml olarak değerleri standart eğriden bulundu. SOD ünite/ml x seyreltme faktörü = SOD ünite/ml tam kan değeri hesaplandı. Bu yöntem ile ölçülen eritrosit SOD aktivitesi SOD ünite/gr. hemoglobin olarak ifade edildi.

$$\frac{\text{SOD Ü/ml}}{\text{gr Hb/ml}} = \text{SOD Ü/gr Hb}$$

2- Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

GPx aktivitesi Randox'un RANSEL (Kat. No. RS 504) kiti ile saptandı. Bu ölçüm Paglia ve Valentine'in tanımladığı metoda dayanır (36). GPx, kümene hidroperoksit ile glutasyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında, okside glutasyon (GSSG) süratle indirgenmiş formuna çevrilir bu sırada NADPH, NADP⁺'e okside olur. Spektrofotometrede 340 nm'de absorbanstaki azalma ölçülür.



Spektrofotometrik işlev:

Dalga boyu	:	340
Küvet	:	1cm ışık yolu
Sıcaklık	:	37 derece
Ölçüm	:	Havaya karşı

A - Örneklerin Hazırlanması

Heparinize tam kan kullanıldı.

İnsan kan örneklerinin seyreltilmesi için Drabkin solüsyonu kullanıldı. Bu işlemin nedeni, insan kanında yanlış olarak yüksek değerler verebilen peroksidazların pozitif interferansını önlemektir. 0.05 ml heparinize tam kana 1 ml seyreltici ajan eklenip 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 1 ml Drabkin solüsyonu eklendi ve bu işlemten sonra 20 dakika içinde örnekler değerlendirildi. Seyreltilmiş örneğe 1 ml solüsyon eklenip karıştırıldı. Kör için 0.02 ml distile suya 1 ml solüsyon eklendi. Daha sonra köre ve örneklere 0.04 ml kümen eklenip 1 dakika sonra kör ve örneğin başlangıç absorbanları okundu, aynı anda süre başlatıldı. Bundan 1(A1) ve 2 dakika (A2) sonra absorbanlar tekrar okundu.

B - Sonuçların Hesaplanması

GPx konsantrasyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Ü/L hemolizat = 8412 x δA 340 nm/dk

$\delta A = \delta$ örnek - δ kör

$$\delta A \text{ (örnek veya kör için)} = \frac{A1 + A2}{2}$$

Ü/L hemolizat x 41 = Ü/L tam kan hesaplandı. (Ü/L hemolizat seyreltme faktörü ile çarpıldı).

GPx aktivitesi Ü/gr Hb olarak ifade edildi.

3- MDA Ölçümü

MDA (Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler : TBARM) Satoh ve Yagi'den modifiye edilen yöntemle saptandı (37).

- 1- Kapalı santrifüj tüplerine 0.5 ml örnek, 4ml N/12 H₂SO₄ eklenip karıştırıldı,
- 2- Üzerine %10'luk fosfotungstik asit eklendikten sonra oda ısısında 5 dakika bekletildi,
- 3- 3000/dk'da 10 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı,
- 4- Presipitata 2.5 ml H₂SO₄ eklenip karıştırıldıktan sonra yeniden santrifüj edilip süpernatant atıldı,
- 5- Örnek ve köre 2.5 ml, standarda (0.5 ml) 2 ml N/12 H₂SO₄ ve her birine 3'er ml tiyobarbitürik asit konulup karıştırıldı,
- 6- Örnek standart ve kör tüpleri 60 dakika kaynar su banyosunda tutuldu, sonra soğutuldu,
- 7- Oluşan pembe renk 3ml n-bütil alkol ile ekstrakte edildi,
- 8- Örnek ve standartların absorbansları, köre karşı 530 nm'de okundu,
- 9- Apsis standart konsantrasyonunu, ordinat absorbans değerlerini gösterecek şekilde grafik çizildi. Örneklerin MDA miktarları grafikten bulunup nm/ml olarak ifade edildi.

SONUÇLAR

Değerlendirmeye yaşları 14 ile 70 arasında değişen (ort $41,4 \pm 17$) toplam 13 HD tedavisi gören KBY hastası alınmıştır (4 erkek - 9 kadın). Bu hastaların ortalama HD süresi 18.4 aydır (4-36 ay).

Çalışmaya alınan hastaların yaş-cinsiyet-diyaliz süresi ve KBY etyolojisine göre dağılımı Tablo 7'deki gibidir.

Tablo 7 : Çalışmaya alınan hastaların dağılımı

Hasta No	Diyaliz Şekli	Diyaliz Süresi (ay)	Yaş (yıl)	Cinsiyet	Tanı
1	HD	6	49	Erkek	Kr Pyelonefrit
2	HD	13	23	Kadın	Amiloidoz (FMF)
3	HD	12	61	Erkek	Hipertansif nefroskleroz
4	HD	2	19	Kadın	Henoch - Schönlein
5	HD	4	60	Kadın	Diyabetik nefropati
6	HD	22	62	Kadın	KBY (Etyoloji ?)
7	HD	17	60	Kadın	Hipertansif nefroskleroz
8	HD	36	60	Kadın	KBY (Etyoloji?)
9	HD	36	70	Kadın	Polikistik Böbrek (ADPKD)
10	HD	21	28	Kadın	Alport sendromu
11	HD	14	14	Erkek	KBY (Etyoloji ?)
12	HD	27	46	Kadın	Diyabetik nefropati
13	HD	29	32	Kadın	Kr. Pyelonefrit

İki hasta ise aşağıda belirtilen sebeplerden dolayı çalışma dışı bırakılmıştır:

- 1 hastanın başka hastaneye sevk edilmesi,
- 1 hastanın metastatik kolon ve serviks karsinomu nedeniyle exitus olması.

Kontrol grubunun plazma MDA- total GPx ve eritrosit SOD değerleri Tablo 8'de görülmektedir.

Tablo 8 : Kontrol grubunun sonuęları

Kontrol grubu	MDA (nm/ml)	SOD (/gr Hb)	GPX (/gr Hb)	Hgb (gr/dl)
Kontrol 1	0.75	643.382	74.811	13.6
Kontrol 2	0.30	1162.25	85.65	15.1
Kontrol 3	1.3	1699.12	115.98	11.3
Kontrol 4	0.4	408.45	95.94	14.2
Kontrol 5	0.3	556.39	53.16	13.0
Kontrol 6	1.3	1098.59	47.36	14.2
Kontrol 7	0.25	939.65	199.20	11.6
Kontrol 8	0.95	562.09	84.53	15.3
Kontrol 9	0.90	1493.51	172.45	15.4
Kontrol 10	0.05	1015.38	176.43	13.0
Kontrol 11	0.5	487.50	175.32	12.0
Kontrol 12	0.8	570.47	50.92	14.9
Kontrol 13	0.3	458.06	47.84	15.5

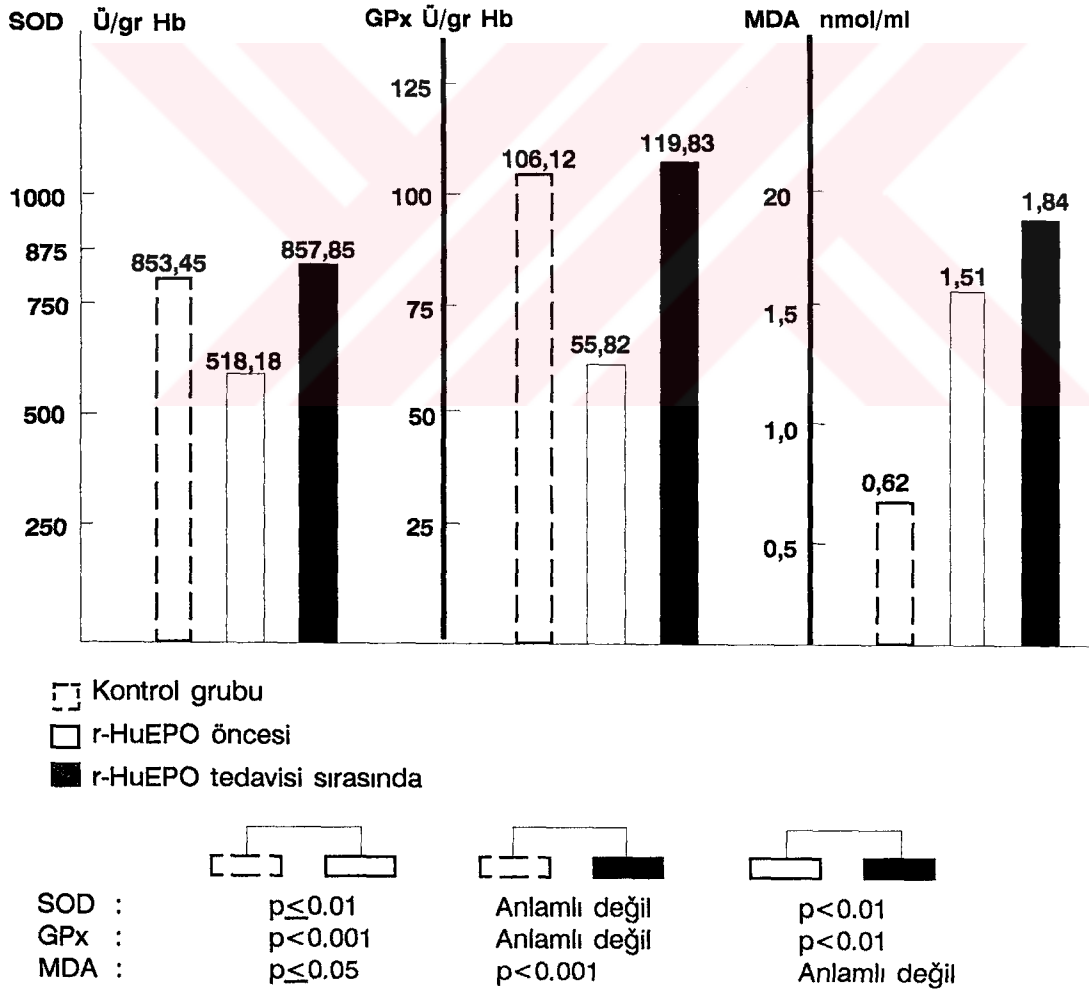
HD tedavisi gören hastalarda 3x4000 Ü r-HuEPO tedavisine geçilmeden önce ve daha sonra idame tedavisi sırasında alınan plazma örneklerinden elde edilen MDA-total GPx-eritrosit SOD sonuçları Tablo 9'da, kontrol grubu ile çalışma grubunun ortalama sonuçları ise Şekil 2'de görülmektedir.

Tablo 9 : Çalışma Grubunun Sonuçları.

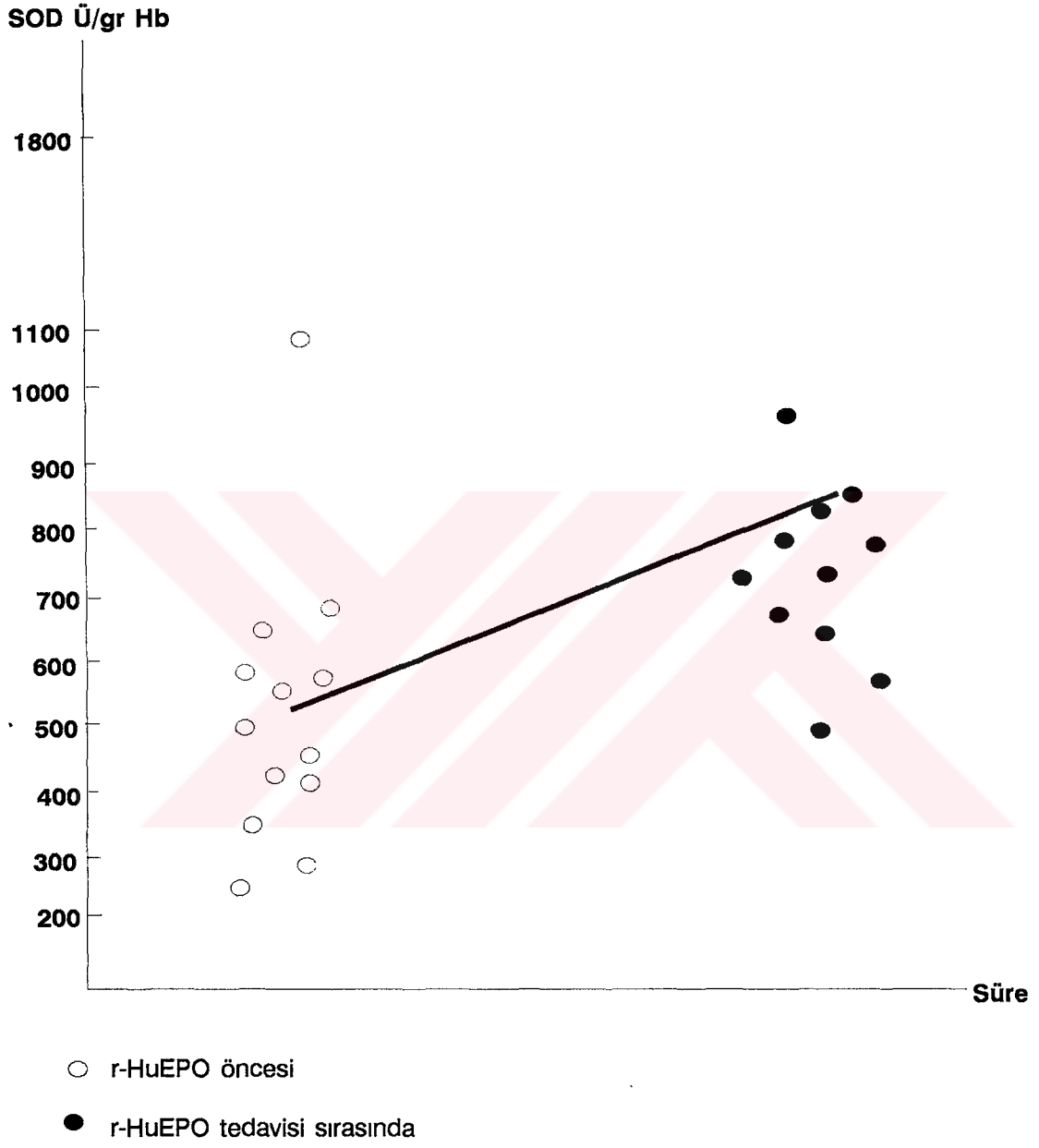
n	EPO Öncesi SOD (Ü/gr Hb)	EPO Sonrası SOD (Ü/gr Hb)	EPO Öncesi GPX (Ü/gr Hb)	EPO Sonrası GPX (Ü/gr Hb)
1	420.000	490.74	75.876	116.560
2	1082.350	1633.30	53.762	66.104
3	298.969	850.40	83.556	66.077
4	453.333	712.87	55.182	112.687
5	409.090	970.30	40.312	129.761
6	645.161	1600.00	50.064	78.558
7	348.837	784.30	84.217	65.935
8	500.000	552.00	31.766	154.511
9	529.549	647.06	42.266	273.884
10	261.538	629.90	54.386	52.955
11	548.078	805.60	54.678	141.824
12	564.102	762.80	35.373	170.919
13	675.373	712.87	64.345	128.053

n	EPO Öncesi MDA (nm/ml)	EPO Sonrası MDA (nm/ml)	EPO Öncesi Hgb (gr/dl)	EPO Sonrası Hgb (gr/dl)
1	0.30	1.60	9.5	10.8
2	3.40	1.15	8.5	12.0
3	1.00	1.25	9.7	10.7
4	1.95	3.20	7.5	10.1
5	1.60	1.90	7.7	10.1
6	1.35	0.50	6.5	10.9
7	1.15	1.20	8.6	10.2
8	0.20	1.90	7.6	12.5
9	0.50	2.05	5.1	6.8
10	5.85	1.95	6.5	12.7
11	0.80	2.05	8.2	10.7
12	1.10	2.50	7.8	11.3
13	0.50	1.95	6.7	10.1

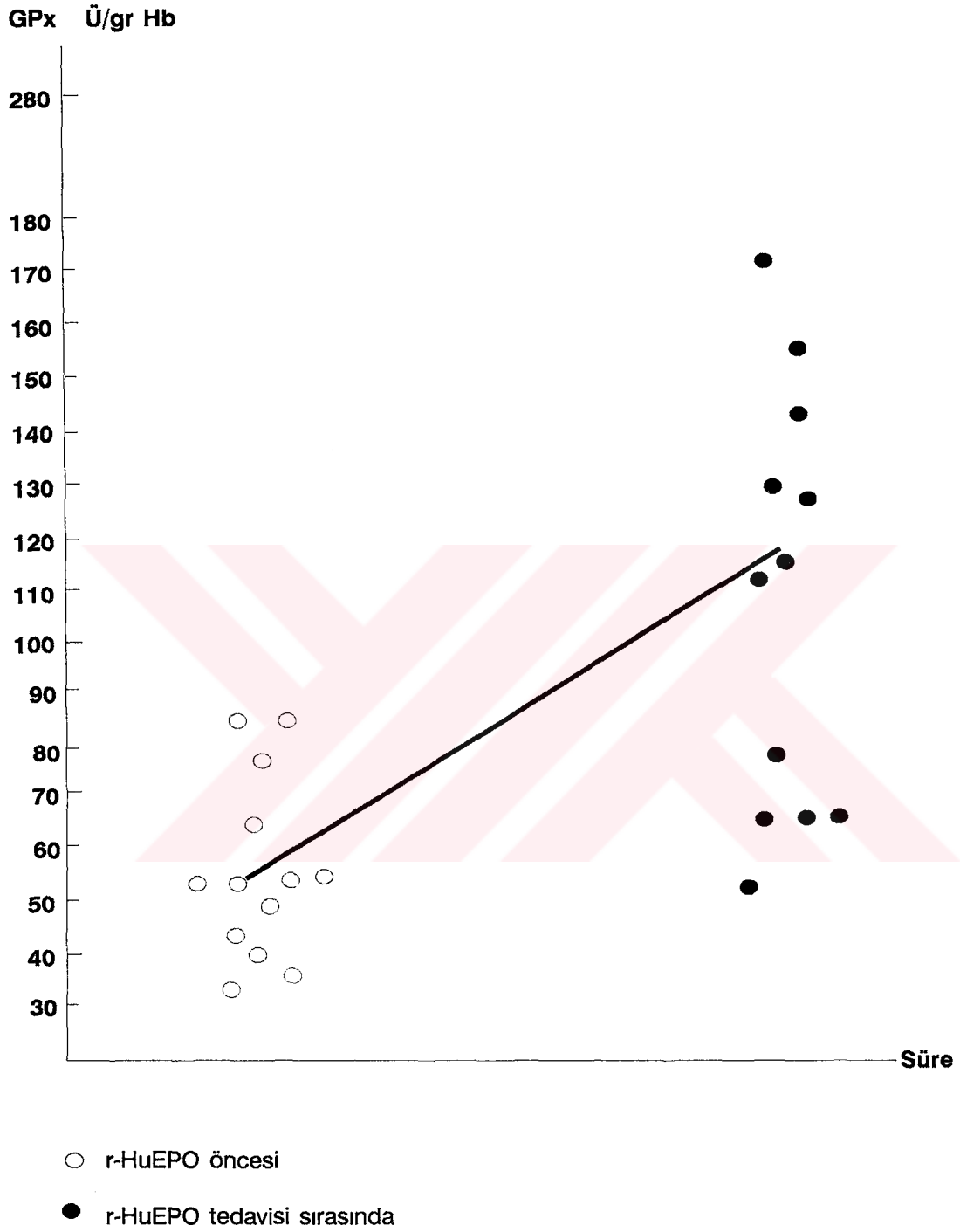
r-HuEPO öncesi HD grubunda kontrol grubuna göre plazma MDA değeri anlamlı olarak yüksek ($p \leq 0.05$), eritrosit SOD ve total GPx enzim düzeyleri ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur (sırası ile $p \leq 0.01$ ve $p < 0.001$). r-HuEPO tedavisiyle aynı HD hasta grubunda bu kez SOD ve GPx değerlerinde tedavi öncesine göre anlamlı olarak artma (sırası ile $p \leq 0.01$ ve $p < 0.01$) saptanmıştır. Bu değerler kontrol grubunun değerlerine yakındı ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. r-HuEPO tedavisiyle plazma MDA düzeyinde tedavi öncesine göre artış saptanmıştır fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ise anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p < 0.001$). Hemogloblin değerlerinde ise tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır ($p < 0.01$). (Şekil 2,3,4,5,6)



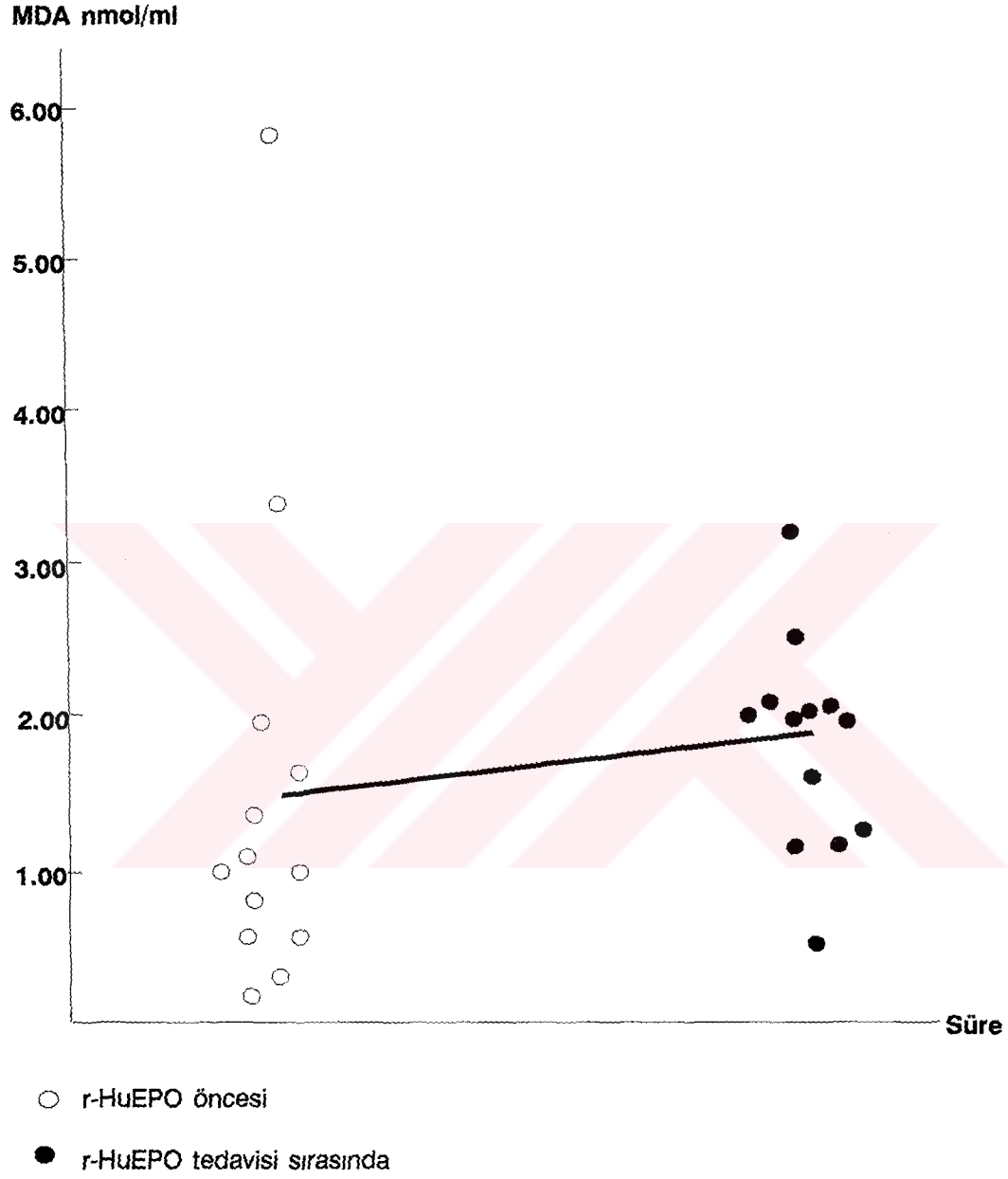
ŞEKİL 2 : Kontrol grubu ile çalışma grubunun ortalama SOD-GPx-MDA düzeyleri açısından karşılaştırılması.



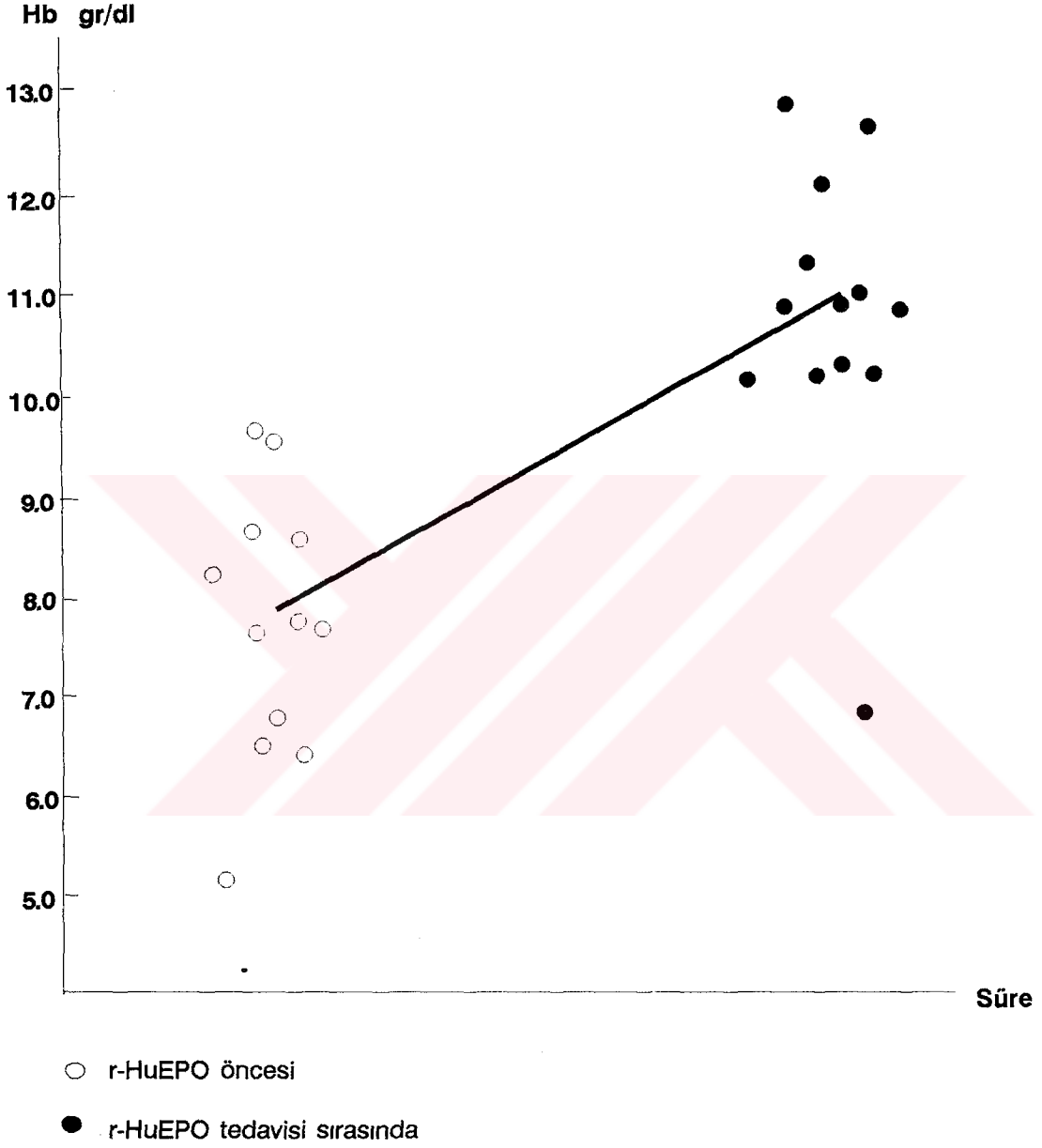
ŞEKİL 3 : Çalışma grubunda SOD sonuçları



ŞEKİL 4 :Çalışma grubunda GPx sonuçları



ŞEKİL 5 :Çalışma grubunda MDA sonuçları



ŞEKİL 6 :Çalışma grubunda r-HuEPO tedavisi ile hemogloblin düzeyindeki değişme

TARTIŞMA

KBY hastalarının çoğu anemiktir. Üremik dönemdeki aneminin en önemli sebepleri eritropoietin eksikliği, eritrosit yarı ömründe kısalma, eritropoezi inhibe eden toksik metabolitler ve trombositlerdeki nitel bozukluklar sonucu gelişen kan kayıplarıdır (38,39,40,41). Bu hastalarda eritrosit yarı ömründeki kısalmanın bir sebebi de oksidan stresteki artmadır. Üremik hastalarda eritrositlerde glikoz metabolizma bozukluğu ve pentoz-fosfat şant aktivitesinde azalma sonucu hidrojen peroksit ile hidroksil radikallerinin sentezi artar ayrıca üremik toksinler tarafından antioksidan enzimler inhibe edilir. Artmış serbest radikaller ve azalmış antioksidan savunma sonucu eritrosit membranındaki lipid peroksidasyonu hızlanır, eritrosit deformabilitesi etkilenir ve eritrositlerin splenik sekestrasyonu artarak eritrosit yarı ömrü kısalır (42,43). KBY'deki anemi tedavisinde kullanılan r-HuEPO kemik iliğindeki eritrosit öncü hücrelerini uyararak hemoglobin sentezini artırır. Perifere genç eritrositler dökülür. Zachee ve arkadaşları HD hastalarında r-HuEPO tedavisiyle eritropoezdeki hızlanmaya paralel olarak periferik kanda retikülositoz saptamışlardır (44). Eschbach ve arkadaşları ise periferic genç eritrositler dökülmesi nedeniyle r-HuEPO'nun eritrosit yarı ömrünü uzattığını bildirmişlerdir (45).

r-HuEPO'nun kronik böbrek yetmezliğindeki anemi tedavisinde oldukça etkili olması (45,46) ve eritrosit yarı ömrünü uzatması nedeniyle HD tedavisi gören hastalarda artmış lipid peroksidasyonu ve azalmış antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri de araştırılmıştır (28,34,47,48).

Bozfakioğlu ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarıyla HD tedavisi gören hastalarda r-HuEPO tedavisiyle eritrosit lipid peroksidasyonunda ve glutatyon peroksidaz enzim düzeyinde değişme olmadığını bildirmişlerdir (28).

Turi ve arkadaşları ise r-HuEPO tedavisiyle HD hastalarında glutatyon düzeyinde artma olduğunu, MDA düzeyinin değişmediğini (yüksek kaldığını), SOD ve GPx enzimlerinin kontrol grubuna göre düşük düzeyde olduğunu bildirmişlerdir (47).

Luciak ve arkadaşları da r-HuEPO tedavisiyle MDA konsantrasyonunun etkilenmediğini, eritrosit CAT aktivitesinin arttığını saptamışlardır (48).

Djordjevic ve arkadaşları da eritropoietinin sadece anemiye düzeltmediğini aynı zamanda antioksidan savunmanın birer elemanları olan SOD ve CAT enzimlerini de arttırdığını bildirmişlerdir (34).

Yukarıda özetlenen çalışmalarda r-HuEPO'nun gösterdiği farklı etkiler r-HuEPO'nun etkisine direnç gelişmesi gibi faktörlerle açıklanabilir.

Chakraborty ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, aç bırakılan sıçanlarda serum eritropoietin düzeyinin azaldığını ayrıca bununla birlikte eritrositlerdeki SOD, GPx, CAT enzimlerinin de azaldığını ve eritropoietin tedavisiyle bu enzim aktivitelerinin normalleştiğini bildirmişlerdir (32).

Bu çalışmada r-HuEPO öncesi HD grubunda kontrol grubuna göre plazma MDA değeri anlamlı olarak yüksek ($p \leq 0.05$), eritrosit SOD ve total GPx enzim düzeyleri ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur (sırasıyla $p \leq 0.01$ ve $p < 0.001$).

Bu sonuçlar Tablo 6'da belirtilen üremiye bağlı toksik metabolitler, hemodiyaliz tedavisi, renal antioksidan enzim fonksiyonlarında azalma ve eritropoietin eksikliği gibi faktörlerle açıklanabilir: Üremiye bağlı toksik metabolitlerin antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmada etkili oldukları düşünülmektedir. Vanella, Koçak ve Seth'in yaptıkları çalışmalarda üremik hastalarda HD öncesi düşük konsantrasyonlardaki SOD ve GPx enzimlerinde HD sonrası yükselme olması bu düşüncüyü desteklemektedir (23,24,49). Üremik hastanın eritrositleri normal plazmaya konulursa eritrosit işlevlerinde düzelme gözlenmesi üremik ortamın önemini göstermektedir (45). HD işleminin kendisi de lipid peroksidasyonunu (oksidan stres ve hücre hasarını) ve dolayısıyla plazma MDA düzeyini artırabilir. Bunun bellibaşlı sebepleri HD membranları nedeniyle lökosit ve kompleman sistemlerinin aktivasyonu, heparinin lipolizi uyararak serbest yağ asitlerini artırması ve SOD, GPx enzimlerinin yapısındaki bakır, çinko ve selenyum gibi iz elementlerin diyalizle kaybıdır. Ayrıca diyalizatta bulunan kloraminin plazmaya geçişi ve diyaliz sırasındaki termal hasar da diğer etkenlerdir. Böbrek işlevlerindeki bozulma nedeniyle böbreğin antioksidan enzimlerinde azalma da bir başka etkenidir (28,29,30,31,47).

r-HuEPO tedavisiyle aynı HD hasta grubunda bu kez SOD ve GPx düzeylerinde tedavi öncesine göre anlamlı olarak artma (sırasıyla $p \leq 0.01$ ve $p < 0.01$) saptanmıştır. Bu değerler kontrol grubu değerlerine yakın olarak bulunmuş ve aralarında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. Plazma MDA düzeyinde ise r-HuEPO öncesine göre artış saptanmıştır fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p < 0.001$). r-HuEPO tedavisi başlanan aynı HD hasta grubunda tedavi sırasında SOD ve GPx enzim düzeylerinin artması ve kontrol grubu değerlerine ulaşması r-HuEPO'nun eritropoezi uyararak ortama genç eritrositleri kazandırmasıyla açıklanabilir.

Eschbach ve Zachee yaptıkları çalışmalarında HD hastalarında r-HuEPO tedavisiyle hemoglobin ve retikülositte artış olduğunu saptamışlardır (44,50).

Bu çalışmada hemoglobinde saptadığımız anlamlı artış ($p < 0.01$) ortama genç eritrositlerin katıldığını göstermektedir. Üremik hastaların kan dolaşımına kazandırılan bu genç eritrositlerin oksidan strese karşı dirençleri fazladır ve dolayısıyla deformabilite özellikleri de daha fazladır (43,51). Kikuchi ve Icardi çalışmalarında HD hastalarında eritrosit membran deformabilitesinin azaldığını fakat r-HuEPO tedavisiyle ortama genç eritrositlerin katılmasıyla azalan deformabilitede iyileşme olduğunu bildirmişlerdir (51,52). Bir başka çalışmada r-HuEPO'nun eritropoezi uyarmasıyla dolaşıma dökülen genç eritrositlerin antioksidan enzimler yönünden zengin olduğu ve dolayısıyla bu genç eritrositlerin antioksidan savunmayı olumlu yönde etkileyebileceği bildirilmektedir (35). Chakraborty ve arkadaşlarının aç bırakılan sıçanlarda serum eritropoietin düzeyinde ve buna paralel olacak şekilde eritrosit membranındaki antioksidan enzimlerde azalma olduğunu, ve azalan enzim düzeylerinin eritropoietin tedavisiyle düzeldiğini göstermeleri; eritropoietinin bu enzimler üzerine olumlu etkisinin olduğunu desteklemektedir. Chakraborty, eritropoietinin bu etkisini, antioksidan enzimler yönünden zengin oldukları kabul edilen genç eritrositlerin dolaşıma kazandırılmasıyla açıklamıştır (32).

r-HuEPO tedavisi sırasında antioksidan enzim düzeyinde artma sonucu oksidan stres ve lipid peroksidasyonunun azalması ve dolayısıyla plazma MDA düzeyinin tedavi öncesine göre daha düşük olmasını beklemek hatalı bir düşünce değildir. Nitekim Chakraborty ve arkadaşları, eritropoietin tedavisiyle antioksidan enzimlerde artmayla birlikte MDA'da düşme saptamışlardır (32). Üremik olan ve HD tedavisi gören hastalarda ise, Rudko ve arkadaşları r-HuEPO'nun hızlanmış lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan yüksek MDA düzeyini normalleştirdiğini (33), Bozfakioğlu, Turi ve Luciak ise MDA düzeyinin değişmediğini (yüksek kaldığını) bildirmişlerdir (28,47,48). Sunulan çalışmada ise plazma MDA düzeyinde istatistiksel anlamı olmayan bir artış saptanmıştır. r-HuEPO tedavisine rağmen, HD sırasında nötrofil ve kompleman sisteminin aktivasyonu, heparinin etkisi, iz elementlerin eksikliği ve üremik ortamın devamlılığı ile oluşan lipid peroksidasyonu sonucunda plazma MDA düzeyi yine de yüksek saptanabilir (28,29,30).

Sonuç olarak bu çalışmada r-HuEPO tedavisiyle SOD ve GPx'de sağlanan artışın oksidan strese karşı bir etki oluşturduğu, r-HuEPO tedavisi sonrası hemoglobinde saptanan artış nedeniyle düşünülmüştür.

SONUÇ

3x4000Ü/hafta subkutan yolla uygulanan rekombinant insan eritropoietini (r-HuEPO) ile hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) ve total glutatyon peroksidaz (GPx) enzim düzeylerinin tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı (sırasıyla $p \leq 0.01$ ve $p < 0.01$) ve kontrol grubu değerlerine ulaştığı fakat plazma malondialdehid (MDA) düzeyinde ise tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı olabilecek etki oluşmadığı saptanmıştır. r-HuEPO'nun antioksidan savunma üzerine saptanan bu olumlu etkisinin dolaşıma genç eritrositleri kazandırmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

ÖZET

Kronik böbrek yetmezliği (KBY) olan hastaların hemen hemen tümü anemiktir. KBY'deki anemi etyolojisinde ana faktör eritropoietin eksikliğidir. Üremik hastaların eritrosit membranlarındaki poliansatüre yağ asitlerinin artmış oksidasyonu böbrek yetmezliğindeki anemiye ağırlaştırabilir. Üremik hastalarda rekombinant insan eritropoietini (r-HuEPO) tedavisi ile anemi doza bağlı olarak düzeltilebilir.

r-HuEPO'nun KBY hastalarındaki anemi tedavisinde oldukça etkili olması ve yaşam kalitesini yükseltmesi nedeniyle, bu çalışmada r-HuEPO'nun hemodiyaliz tedavisi gören hastalarda artmış lipid peroksidasyonu ve azalmış antioksidan savunma üzerine etkisi araştırılmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Nefroloji biriminde izlenen ve son dönem böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz (HD) tedavisi gören hastalardan 13 tanesi çalışmaya alınmıştır. 13 HD hastasının (4 erkek ve 9 kadın) yaş ortalaması $41,4 \pm 17$ yıl (14-70) olup ortalama hemodiyaliz süresi 18.4 aydır (4-36 ay). Üremik ve anemik olmayan 13 sağlıklı kişi de (7 erkek 6 kadın) kontrol grubu olarak seçilmiştir. Kontrol grubunun yaş ortalaması 45.6 ± 12.9 yıldır. Son 3 ay içinde kan transfüzyonu yapılanlar, demir depo hastalığı saptananlar, sigara içenler ve r-HuEPO kullanım öyküsü olan hastalar çalışmaya alınmamıştır.

HD hastalarına diyaliz sırasında kuprofan membran ve asetatlı diyalizat kullanılmıştır. Hastalara haftada üç kez dörder saatlik standart HD tedavisi uygulanmıştır.

HD tedavisi uygulanan ve hemoglobin değeri 10 -11 gr/dl (Htc. %30-33) 'nin altında olan hastalardan 3×4000 Ü/haftada r-HuEPO (Epoetin- α , CILAG[®]) subkutan tedavisine başlamadan önce ve hedef hemoglobin değeri 10-11gr/dl (Htc. %30-33)'ye ulaşıncaya HD seansından önce 10 cc heparinli periferik venöz kan alınmıştır.

Alınan heparinli venöz kan örneğinden oksidan stresi tayin etmek için plazma malondialdehid (MDA), antioksidan savunma için total glutatyon peroksidaz (GPx) ve eritrosit süperoksit dismutaz (SOD) enzim düzeylerine bakılmıştır.

Eritropoietin tedavisi öncesi ve sırasında alınan değerler Wilcoxon eşleştirilmiş 2 örnek testi ile ayrıca kontrol grubu ile çalışma grubu ise Mann-Whitney U testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

	Ort. SOD Ü/gr Hb	Ort. GPx Ü/gr Hb	Ort. MDA nmol/ml
Kontrol grubu	853,45	106,12	0,62
r-HuEPO tedavisi öncesi	518,18	55.82	1,51
r-HuEPO tedavisi sırasında	857,85	119.83	1,84

Tabloda da görüldüğü gibi HD tedavisi uygulanan hastalarda r-HuEPO ile eritrosit SOD ve total GPx enzim düzeylerinin tedavi öncesine göre arttığı (sırasıyla $p \leq 0.01$ ve $p < 0.01$) ve kontrol grubu değerlerine ulaştığı fakat plazma MDA düzeyinde ise tedavi öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı olabilecek etki oluşmadığı saptanmıştır. r-HuEPO'nun antioksidan savunma üzerine saptanan bu olumlu etkisinin dolaşıma genç eritrositleri kazandırmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- 1) Halliwell B. Drug antioxidant effects. *Drugs* 42(4): 569-605; 1991
- 2) Southorn P. Free radicals in medicine . I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 63: 381-389; 1988
- 3) McCord J. Human disease, free radicals, and the oxidant/ antioxidant balance. *Clin Biochem* 26: 351-357; 1993
- 4) Carroll E. Cross. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107: 526-545; 1987
- 5) Southorn P. Free radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 63: 390-408; 1988
- 6) Orrenius S, Mc Conkey DJ, Bellomo G et al. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Sciences* 10: 281-285; 1989
- 7) Halliwell B. Reactive oxygen species in living system: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91: 14S-21S; 1991
- 8) Draper R, Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica* 20 (9): 901-907; 1990
- 9) Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochemical Journal* 266: 213-219; 1990
- 10) Davies MJ. Detection of myoglobin-derived radicals on reaction of metmyoglobin with hydrogen peroxide and other peroxidic compounds. *Free Radic Res* 10: 361-370; 1990
- 11) Stocker R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 9: 101-112; 1990
- 12) Chiswick M, Gladman G, Sinha S et al. Vitamin E supplementantation and periventricular hemorrhage in the newborn. *Am J Clin Nutr* 53: 370S-372S; 1991
- 13) Ichikawa et al. Renal antioxidant enzymes. *Kidney Int* 45: 1-9; 1994

- 14) Endou H, Koseki C, Yamada H. Evaluation of nephrotoxicity using isolated nephron segment, in *Nephrotoxicity of Antibiotics and Immunosuppressants*, edited by Tanabe T, Hook JB, Endou E, Amsterdam, Elsevier, 207-216; 1986
- 15) Kawamura T, Yoshioka T, Bills T et al. Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int* 40: 291-301; 1991
- 16) Steinberg D. Antioxidants and atherosclerosis. *Circulation* 84: 1420-1425; 1991
- 17) Repine J. Oxidant - Antioxidant balance: Some observations from studies of ischemia-reperfusion in isolated perfused rat hearts. *Am J Med* 91: 30-45S; 1991
- 18) Hara T, Miyai H, Iida T et al. Aggravation of puromycin aminonucleoside nephrosis by the inhibition of endogenous superoxide dismutase. *Proc XIth Int Congr Nephrol* p 442; 1990
- 19) Voest E, Vreugdenhil G, Marx M. Iron-chelating agents in non-iron overload conditions. *Ann Intern Med* 120: 490-499; 1994
- 20) Oberley TD, Oberley LW, Slattery AF et al. Immunohistochemical localization of antioxidant enzymes in adult syrian hamster tissue and during kidney development. *Am J Pathol* 137: 199-214; 1990
- 21) Giardini O, Gallucci M, Lubrano R et al. Evidence of red blood cell membrane lipid peroxidation in haemodialysis patients. *Nephron* 36: 235-237; 1984
- 22) Miguel A, Miguel AI, Linares M et al. Evidence of an increased susceptibility to lipid peroxidation in red blood cells of chronic renal failure patients. *Nephron* 50: 64-65; 1988
- 23) Koçak N, Toker A, Yalçın S. Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with chronic renal failure. *Med Bull İstanbul* 19: 69-74; 1986
- 24) Seth RK, Saini AS, Aggarwal SK. Glutathione peroxidase activity and reduced glutathione content in erythrocytes of patients with chronic renal failure. *Scand J Haematol* 35: 201-204; 1985

- 25) Richard M, Arnaud J, Jurkovitz C et al. Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 57: 10-15; 1991
- 26) Matkovics B, Laszlo A, Varga SZ 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* 20(5): 559-564; 1988
- 27) Vanella A, Geremia E, Pinturo R et al. Superoxide dismutase activity and reduced glutathione content in erythrocytes of uremic patients on chronic dialysis. *Acta Haemat* 70: 312-315; 1983
- 28) Bozfakioğlu S, Alptekin N, Seçkin S et al. Red cell lipid peroxidation and antioxidant system in chronic renal failure patients treated with recombinant human erythropoietin. *Nephron* 61: 228-229; 1992
- 29) Schmidtmann S, Baehr R, Precht K. Free radicals induce increased lysis of red blood cells after haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 5: 600-603; 1990
- 30) Maher E.R., Wickens D.G., Griffin JF et al. Increased free-radical activity during haemodialysis ? *Nephrol Dial Transplant* 2: 169-171; 1987
- 31) Kuroda M, Asaka S, Tofuku Y et al. Serum antioxidant activity in uremic patients. *Nephron* 41: 293-398; 1985
- 32) Chakraborty M, Ghosal J, Biswas T et al. Effect of erythropoietin on membrane lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase of rat rbc. *Biochem Med Metal Biol* 40: 8-18; 1988
- 33) Rudko I, Balashova T, Ermolenko V. The role of lipid peroxidation and Na⁺ - H⁺ exchange in the membranoprotective action of erythropoietin. *Bio-News Scientific NR* 28: 5-41; 1993
- 34) Djordjevic V, Dyordjevic V.B. Pejovic M et al. Antioxidant enzymes in erythrocytes of patients on maintenance hemodialysis treated with human recombinant erythropoietin (rHuEPO). *Bio News Scientific NR* 30: 3-33; 1993

- 35) 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* 65: 288-293; 1993
- 36) Paglia DE, Valantine WN. *J Lab Clin Med* 70-158; 1967
- 37) Mutaf I. M. Eksperimental diyabette plazma ve doku lipid peroksidleri. Doktora tezi. Ege Üniv. Tıp Fak. Biyokimya ABD, 1990
- 38) Koch KM, Patyna WD, Shaldon S et al. Anemia of the regular hemodialysis patient and its treatment. *Nephron* 12: 405-419; 1974
- 39) Shaw AB. Haemolysis in chronic renal failure. *Brit Med J* 2: 213-216; 1967
- 40) Naets JP. Hematologic disorders in renal failure. *Nephron* 14: 181-194; 1975
- 41) Eschbach and Adamson. Anemia of end-stage renal disease. Editorial review. *Kidney Int* 28: 1-5; 1985
- 42) Vijoen M, Oliveria A, Milne F. Physical properties of the red blood cells in chronic renal failure. *Nephron* 59: 271-278; 1991
- 43) Rosenmund A, Binswanger U, Straub PW et al. Oxidative injury to erythrocytes, red cells rigidity, and splenic hemolysis in hemodialyzed uremic patients. *Am Intern Med.* 82 (4): 460-465; 1975
- 44) Zachee P, Van Hove L, Hauglustaine D et al. Effect of recombinant human erythropoietin on reticulocyte age in hemodialysis patients. *Nephron* 62: 366-367; 1992
- 45) Eschbach JW. The anemia of chronic renal failure. Pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Kidney Int* 35: 134-148; 1989
- 46) Eschbach JW, Adamson J. Recombinant human erythropoietin: Implications for nephrology. *Am J Kidney Dis* 11(3): 203-209; 1988
- 47) Turi S, Nemeth I, Varga I. The effect of erythropoietin on the cellular defence mechanism of red blood cells in children with chronic renal failure. *Pediatr Nephrol* 6(6): 536-541; 1992
- 48) Luciak M, Kedziora J, Blaszczyk J et al. Does recombinant human erythropoietin therapy modify intradialytic erythrocyte oxidative metabolism in chronic uremic patients. *Bio News Scientific* 28(6): 31; 1993

- 49) Vanella A, Geremia E, Pinturo R. Superoxide dismutase activity and reduced glutathione content in erythrocytes of uremic patients on chronic dialysis. *Acta Haemat* 70: 312-315; 1983
- 50) Eschbach JW, Egrie J, Downing M.R et al. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. *New Eng J Med* 316 (2): 73-78; 1987
- 51) Icardi A, Paoletti E, Traverso GB et al. Red cell membrane during erythropoietin therapy in hemodialysis and hemodiafiltration. *Int J Artif Organs* 14 (3): 147-149; 1991
- 52) Kikuchi Y, Koyama T, Koyama Y et al. Red blood cell deformability in renal failure. *Nephron* 8-14; 1981

