

HEMODİYALİZ HASTALARINDA PROTEİN OKSİDASYON ÜRÜNLERİ

(Hemodialysis and Protein Oxidation Products)

Alev Kural*, Cihan Coşkun*, Yasemin Döventaş*, Hatice Seval*, Filiz Basınoğlu*,
Berrin Berçik İnal**, Macit Koldaş***

Özet

Amaç: Bu çalışmada kronik hemodiyaliz programında olan hastalarda protein oksidasyon ürünlerinin diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası değişimleri ve bu değerlerin kontrol grubuna göre farklı olup olmadıklarını araştırmayı amaçladık.

Materyal ve Metod: En az 12 aydır kronik hemodiyaliz programında bulunan 67 (37erkek, 30 kadın) gönüllü hasta çalışmaya alındı. Hastaların kullandıkları diyalizlere ait bilgi dosyalarından elde edildi. Hastaların tümü haftada üç kez 4 saat bikarbonatlı hemodiyaliz tedavisi görmekteydiler. Hemen hafta ortası diyaliz seansı öncesinde ve diyaliz bittikten yaklaşık 30 dakika sonra alınıp -20 °C'de saklanan kan örneklerinde İleri Oksidasyon Protein Ürünü ("Advanced Oxidation Protein Product" AOPP) ve İleri Glikozillenmiş Son Ürün ("Advanced Glycation End Product" AGE) düzeyleri tayin edildi. Kontrol grubu 39 (14 erkek, 25 kadın) sağlıklı gönüllü bireyden oluşturuldu. AOPP spektrofotometrik, AGE ise spektrofluorometrik yöntemle çalışıldı. Konsantrasyon düzeyleri arasındaki ilişki SPSS 12.0 paket istatistik programında nonparametrik Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi, P<0.05 anlamlı kabul edildi.

Sonuç: AOPP/Albumin ve AGE/Total Protein oranları kontrol grubunda sırasıyla 7.53±1.67 µM/g Albumin ve 3.73±1.85 AU/g Total Protein olarak bulundu. Her iki parametre de, kontrol grubunda hasta grubunun diyaliz öncesi ve sonrası ortalama değerlerine göre anlamlı düşük bulundu (P<0.001). AOPP düzeyleri diyaliz sonrasında (13.76±3.66 µM/g Alb.) öncesine (11.95±3.19 µM/g Alb) oranla anlamlı olarak yüksek (P<0.001), AGE düzeyleri ise diyaliz sonrasında (10.48±4.54 AU/g Total Protein), diyaliz öncesine (12.79±4.74 AU/g Total Protein) göre anlamlı olarak düşük bulundu (P<0.001). Sonuç olarak, oksidatif stres parametrelerinin kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda yüksek bulunması, bu hastaların antioksidan tedavi ile desteklenmesinin yerinde olacağını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Hemodiyaliz, AOPP, AGE

Summary

Aim: We aimed in this study to investigate the alterations in protein oxidation products during pre and post-dialysis period in chronic hemodialysis patients as well as to compare these differences with the healthy control group, whether they are different.

Material and method: 67 volunteer patients (37 male, 30 female) in chronic hemodialysis programme for at least 12 months were included in the present study. Information about the dialysers was provided from

the patient's files. All the patients were receiving bicarbonate hemodialysis therapy four hours twice a week. Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) and Advanced Glycosylated End Product (AGE) levels were measured in blood samples collected before and 30 minutes after dialysis in mid-week and preserved at -20 °C. Control group comprised of 39 (14 male, 25 female) healthy volunteers. Two blood samples, one before and one after dialysis in the patient group and one blood sample from the control group was collected. AOPP was measured through spectrophotometric method; AGE was measured through spectrofluorometric method. The relationship between concentration differences was detected by using Mann Whitney U test and the values were presented as \pm SD. SPSS 12.0 was used for statistical analysis and a P value smaller than 0.05 was accepted as being significant.

Conclusion: AOPP/Alb and AGE/total protein values of the control group were found as 7.53 ± 1.67 μ M/g Albumin and 3.73 ± 1.85 AU/g Total Protein, respectively. A significant decrease was observed in both parameters in the control group compared with pre- and post-dialysis values of the patients ($p < 0.0001$). We determined a significant increase in post-dialysis value of AOPP (13.76 ± 3.66 μ M/g Albumin) compared to the pre-dialysis (11.95 ± 3.1 μ M/g Albumin) ($p < 0.001$). However, we found a significant decrease in the post-dialysis value of AGE (10.48 ± 4.54 AU/g Total Protein) when compared to the pre-dialysis value (12.79 ± 4.74 AU/g Total Protein) ($p < 0.001$). As a result; to add antioxidants to the treatment of patients with chronic renal failure may be considered wise, because of their high results of oxidative stress parameters.

Key words: Haemodialysis, AOPP, AGE

* Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Uzman Doktor

** Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Asistan Doktor

*** Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Şef Muavini

◆ Biyogerontoloji Kongresinde Poster olarak (2006, Eylül) sunulmuştur.

GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), giderek azalan glomeruler filtrasyon oranı (GFO) ile yansıtıldığı gibi, nefron kaybına bağlı olarak böbrek fonksiyonlarının yıllar içerisinde ilerleyici ve geri dönüşümsüz olarak kaybedilmesidir ⁽¹⁾. Farklı temellere dayanan ve son dönem böbrek yetmezliği ile sonuçlanan çok sayıda böbrek hastalığının varlığı; KBY etyolojisini açıklamak üzere, birbirinden farklı birçok mekanizmanın öne sürülmesine neden olmakta, glomerüler hücreler, nötrofil, monosit/makrofajlar, trombositler, kompleman ve koagülasyon sistemi, sitokinler ve büyüme faktörleri, trombosit aktive edici faktör (PAF) gibi biyoaktif lipidler, anjiyotensin II, endotelin, nitrik oksit (NO) ve serbest oksijen radikalleri (SOR) gibi birçok mediatörün, renal hasar oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmektedir. Renal hücrelerin enerji üretimini ve transport fonksiyonlarını bozabilen SOR; morfolojik lezyonların oluşumundan ve proteinlere karşı

glomerüler geçirgenliğin artmasından da sorumlu tutulmaktadır (2,3). Hastalıkların patogenezinde ve/veya ilerlemesinde oksidatif stresin rolünü araştırmak için, uygun belirteçlerin kullanılması gerekmektedir. SOR kaynaklı oksidatif hasarın tayini için en çok protein, lipid ve nükleik asit gibi biyomoleküllerin oksidatif ürünlerine yönelik testler kullanılmaktadır (4). Oksidatif stresi belirlemede, lipid oksidasyonunu yansıtan ölçümler de yapılabilmesine karşın daha stabil ve uzun ömürlü protein oksidasyon ürünlerinin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (4,5). Yüksek derecede okside proteinler olarak, ilk defa Witko-Sarsat ve arkadaşları (6) tarafından üremik hastaların plazmasında tanımlanan İleri Okside Protein Ürünleri (AOPP), KBY sürecini yansıtan, güvenilir bir oksidatif stres belirteci olarak kabul edilmektedir. Üremik hastalarda, oksidatif stresle karbonil stres arasındaki ilişkiyi destekleyecek şekilde, plazma AOPP ile İleri Glikozillenmiş Son Ürünlerin (AGE) düzeyleri arasında, pozitif ilişki bulunması, AOPP'nin monosit aktivasyonu ile de ilişkili olduğunu göstermektedir (6,7).

AGE: Glukoz fazlalığı oksidatif stresi artırır, lökosit endotel etkileşimini kuvvetlendirir ve lipoproteinler, apolipoproteinler ve pıhtılaşma faktörleri dahil vücuttaki her proteinin glikozillenmesine yol açar. Zamanla, karmaşık dehidrasyon ve oksidasyon reaksiyonlarından sonra ileri glikozillenme ürünleri oluşur. AGE, kollajenin ve özellikle damar duvarında bulunan ekstrasellüler matriks proteinlerinin çapraz bağlanmasını indükleyerek LDL partiküllerinin birikimine yol açabilir. Daha da ötesi "AGE-modifiye LDL" okside olmasına yol açacak kadar uzun bir yarı ömre sahiptir. AGE endotel hücre fonksiyonunu bozarak aterotrombozu da artırır (8).

AOPP ve Protein oksidasyonu: Reaktif oksijen ürünleri (ROS), direkt olarak proteinler üzerine etki ederek okside olmuş aminoasitlerin oluşumuna yol açtıkları gibi, indirekt yolla karbonhidrat ve lipidlerin otooksidasyonu sonucu ortaya çıkan reaktif karbonil bileşiklerinin (RCO) etkisi ile de ileri glikozillenmiş son ürünlerine (AGE) ve ileri lipoksidasyon son ürünlerine (ALE) dönüşürler. ROS, tirozin aminoasidini direkt olarak okside ederek ditirozin yapısını oluşturup protein yapıda agregasyona ve fragmentasyona yol açarlar. Bu karşılıklı bağlar ile oluşan ürüne "İleri Oksidasyon Protein Ürünleri" (AOPP) adı verilir (9). Kimyasal yapısı halen araştırılmakta olan AOPP'nin kendi klirensini de önleyebilen yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu, disülfid köprüleri ve/veya tirozin çapraz bağlanmalarını içeren albümin agregatlarından oluştuğu ve saf albüminden farklı olduğu kromotografik ve elektroforetik tekniklerle gösterilmiştir. Bu nedenle oksidatif modifikasyona uğrayan albumin'in son çapraz bağlanma ürünleri AOPP olarak tanımlanmıştır (10). AOPP'nin, invitro şartlarda H₂O₂'den çok HOCl'ye maruz kalan saf/plazma albümin örneklerinde oluştuğu belirlendiğinden, in vivo olarak aktif nötrofillerce üretilen HOCl'nin AOPP oluşturabileceği düşünülmektedir (11). Bu çalışmada üremik hastalarda oksidatif stres belirteçlerinin kontrol grubuna göre farkı ile hemodiyaliz öncesi ve sonrasındaki konsantrasyon değişkenliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışma grubu : En az 12 aydır kronik hemodiyaliz programında bulunan 67 (37 erkek, 30 kadın) gönüllü hasta çalışmaya alındı. Hastaların kullandıkları diyalizlere ait bilgi dosyalarından elde edildi. Hastaların tümü haftada üç kez 4 saat bikarbonatlı hemodiyaliz tedavisi görmekteydiler. Hemen hafta ortası diyaliz seansı öncesinde ve diyaliz bittikten yaklaşık 30 dakika sonra alınan kan örnekleri -20 °C'de saklanarak AOPP ve AGE düzeyleri tayin edildi. Kontrol grubu 39 (14 erkek, 25 kadın) sağlıklı gönüllü bireyden oluşturuldu. Yaş ortalamaları hasta grubunda 57±12 yıl, kontrol grubunda 34.4±7.6 yıl olarak bulundu.

Örnekler: Hasta grubundan diyaliz öncesi ve sonrası olmak üzere iki, kontrol grubundan bir kan örneği alındı. AOPP için EDTA'lı plazma, AGE için ise serum örnekleri uygun koşullarda ayrılarak analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı. AOPP plazma örnekleri bu ısıda 6 ay kadar stabildir.

AGE tayini: Hasta ve kontrol grubuna ait serumlar PBS ile (pH 7.4) 1/50 oranında seyreltildi. Biorad marka spektrofloretrade maksimum eksitasyon 350 nm, maksimum emisyon 440 nm dalga boylarındaki floresans yoğunluğu "Arbitrary Unit" (AU) olarak kaydedildi. AU/g protein oranları bulundu (12).

AOPP tayini: Reaktif olarak Chloramine-T (n-chloro-p-toluene sulfonamide sodyum tuzu) stok çözeltisi (10 mmol/L), 1.16 mol/L potasyum iyodür (KI), glacial asetik (%100 v/v) ve PBS (20 mmmol/L) kullanıldı.

Chloramine-T stok çözeltisi PBS ile 100 kat seyreltilerek 100 µmol/L konsantrasyonda ana standart çözeltisi hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi için bu çözeltiden PBS (20 mmol/L, pH 7.0) ile seyreltilerek 12.5, 25, 50, 75, 100 µmol/L konsantrasyonlarda Chloramine-T standartları hazırlandı. Chloramine-T stok çözeltisinin (10 mmol/L) stabilitesi 5°C de 3-4 ay iken seyreltilmiş çözeltinin (100 µmol/L) stabilitesi 5°C'de 3-4 gündür. Çalışma öncesinde oda ısısına getirilen örnekler daha önceden Olympus AU 2700 cihazına uyarlanmış olan programda çalışıldı. Bunun için, 40 µL plazma üzerine 160 µL PBS reaktifi eklenip karıştırılır 25 sn inkübe edilir. Karışımın absorbansı 340 nm'de okutulur. Sonra 20 µL asetik asit eklenip, 25 sn inkübe edilir. Son olarak 10 µL KI çözeltisi eklenir ve tekrar 25 sn inkübe edilip absorbans yeniden okutulur. Ölçülen AOPP konsantrasyonları Chloramine-T ünitesi ile µmol/L olarak belirlenip, albumine göre düzeltilmiş değerleri hesaplanır (µmol/L/g albumin). Tüm basamaklar 37°C'de tek küvette gerçekleştirilir. Zaman aralıkları, her basamak için, kullanılan analizörün program karakteristiklerine göre 25 sn veya daha uzun olacak şekilde ayarlanabilir ⁽¹³⁾. İstatistiksel analizler SPSS 12.0 paket istatistik programında nonparametrik Mann-Whitney U testi ile yapıldı. P<0.05 anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Diyaliz öncesi ve diyaliz sonrası değerler arasında hem AOPP (P<0.001) hem de AGE (P<0.001) konsantrasyonlarının ortalamaları arasında anlamlı fark bulundu. Kontrol grubu ortalaması ile hem diyaliz öncesi hem de diyaliz sonrası değerlerinin ortalamaları arasında anlamlı fark vardı (P<0.005). **Tablo 1**'de olguların dağılımı, **Tablo 2** ve **Şekil 1**'de tüm verilerin dağılımı toplanmıştır.

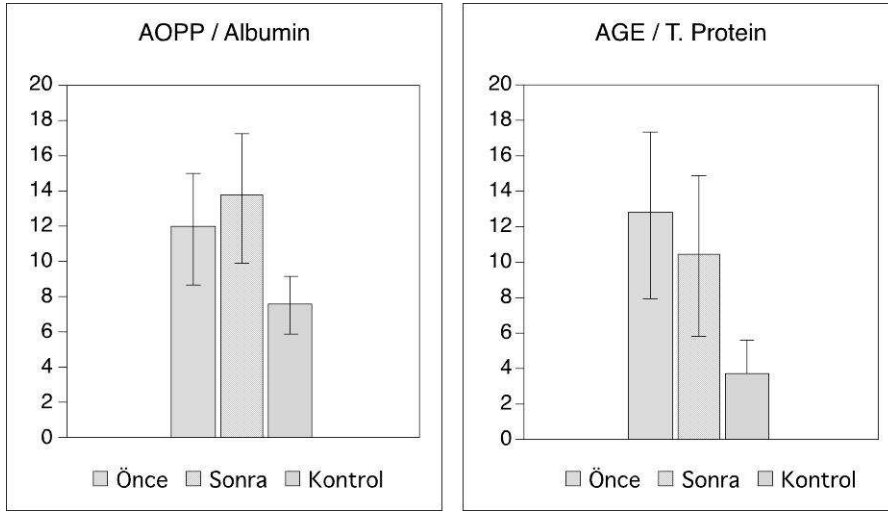
Tablo 1. Olguların dağılımı

	Hemodializ Hastaları	Kontrol Grubu
Vaka Sayısı	67	39
Yaş (Yıl)	57±12	34.4±7.6
Kadın/Erkek	30/37	25/14
Sigara (+)	22	9

Tablo 2. Çalışmada elde edilen bulguların dağılımı

	AOPP/Alb (µmol/g Albumin)	AGE/T.Protein (AU/g T. Protein)
Hemodializ Öncesi	11.95±3.19	12.79±4.74
Hemodializ Sonrası	13.76±3.66	10.48±4.54
Kontrol Grubu	7.53±1.67	3.73±1.85

Şekil 1. Bulguların grafik gösterimi (Ortalama ± SD)



TARTIŞMA

Replasman tedavisi alan/almayan tüm kronik böbrek yetmezliği olan hastalar artmış bir oksidatif stresle karşı karşıyadır. Ancak oksidatif stresin neden hemodiyaliz hastalarında daha belirgin olduğu halen tartışılmakta ve hatta diyaliz ortamı, oksidatif stres için bir model kabul edilmektedir. Üremik toksinlerin yanı sıra, diyalizin dolaşımdaki nötrofil ve monositleri SOR oluşturmak üzere tetiklediği, vitamin kaybıyla antioksidan gücünün zayıfladığı ve böylece diyaliz hastalarında oksidatif stresin oluşabileceği varsayılmaktadır (14,15).

Hemodiyalizde, kan-membran etkileşimi nedeniyle, immun hücrelerin tekrarlayan aktivasyonu, prooksidan durumun daha da kötüleşmesine neden olmaktadır. Her seansta artan oksidatif stres; hem karbonil stresi artıran başlıca faktörlerden biri, hem de hastalardaki yüksek morbitide/mortalite oranının ve kronik komplikasyonların sorumlusu olarak düşünülmektedir (16). Diğer bir görüş ise, oksidatif stresle ilişkili en önemli faktörün, hemodiyaliz işleminden çok, inflamasyonun derecesi ve tedavinin süresi olduğunu öne sürmektedir (17). Literatürde, hemodiyaliz öncesi yüksek olan AOPP düzeylerinin, hemodiyaliz sonrası yükseldiği (6) ya da değişmediği (18) bildirilmektedir. Witko-Sarsat ve arkadaşları (6), membran tipinden etkilenmeyen AOPP'nin değişmemesini, diyaliz sonunda normale yakın buldukları nötrofil oksijen radikal üretimine bağlamışlardır. Biz de yaptığımız çalışmada KBY hasta grubunun AOPP düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek ve yine diyaliz sonrası AOPP düzeylerini anlamlı yüksek bulduk ($P < 0.001$). AOPP'nin mononükleer fagositleri aktive ederek, nötrofiller ve monositler arasında sitokin benzeri proinflamatuvar medyatör gibi davrandıkları da öne sürülmekte ve AOPP ve AGE'nin hem oluşum mekanizması hem de yapısal açıdan benzerlik göstermeleri nedeniyle, biyolojik aktivitelerinin de birbirleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (6,14,15). Üremide artan oksidatif stres ile AGE oluşumuna neden olan glioksal, metilglioksal, dehidroaskorbat, pentozidin gibi bileşiklerin arttığı gözlenmiştir. AGE'nin üremide artışını açıklayan mekanizmalardan biri klirensteki azalmaya bağlı olarak vücutta birikebileceği, diğeri ise artan oksidatif stres nedeniyle lipid ve karbonhidratlardan reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunun artmasıdır (19,20). Wagner ve arkadaşlarının yaptığı yayında, AGE düzeylerinin renal fonksiyonla ve özellikle kreatinin seviyeleriyle korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (21).

Bizim çalışmamızda, diyaliz sonrası AGE seviyesindeki düşmenin diyaliz sonrası azalmış kreatinin sebebiyle olabileceğini bu literatüre dayanarak söyleyebiliriz. Ve yine literatüre benzer şekilde hemodiyaliz

öncesi ve sonrası değerlerle kontrol grubu arasında AGE düzeyleri yönünden anlamlı fark bulundu ($P<0.001$).

SONUÇ

Oksidatif stres göstergelerinden AOPP ve AGE'nin kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda anlamlı yüksek bulunması, artmış kardiyovasküler mortalite/morbidite ile de ilişkili oksidatif stresin önlenmesi için, başta hemodiyaliz olmak üzere tüm son dönem böbrek yetmezlikli hastaların antioksidanlarla desteklenmesi, ek bir tedavi olarak düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. Akpolat T, Utaş C: Hemodiyaliz Hekimi El Kitabı. Kayseri, Anadolu Yayıncılık, 2001
2. England BK, Mitch WE: Mechanisms of progression of renal insufficiency. In: Massry SG, Glasscock RJ (eds). Textbook of Nephrology 3rd ed, Volume 2 Baltimore, Williams and Wilkins, 1995;1262-1269.
3. Heinzlmann M, Mercer-Jones MA, Passmore JC: Neutrophils and renal failure. *Am J Kidney Dis* 1999;34: 384-399.
4. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329:23-28.
5. Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of antioxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:1151-1163.
6. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49:1304-1313.
7. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161:2524-2532.
8. Yenigün M. *Her yönüyle Diabetes Mellitus*. 2. Baskı. 2001:165
9. Altered redox status in patients with Diabetes Mellitus Type 1. *Pharmacological Research* 2005; 51:375-380.
10. Yazıcı C, Köse K: Kronik Böbrek Yetmezliğinde 'Oksidatif stres ve Biyomarker'ları. *Türk Nefroloji Dializ ve Transplantasyon Dergisi* 2004; 13(3):117-124.
11. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V: Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 59 (Suppl. 78):108-113.
12. Kalousova M, Skrha J, Zima T: Advanced Glycation End Products and Advanced Oxidation Protein Products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002; 51:597-604.
13. Selmeçci L, Seres L, Antal M, Lukacs J: Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(3):294-297.
14. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V: Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 59 (Suppl.78):S108-S113.
15. Kitiyakara C, Gonin J, Massy Z, Wilcox CS: Non-traditional cardiovascular disease risk factors in end stage renal disease: oxidative stress and hyperhomocysteinemia. *Curr Opin Nephrol Hyperten* 2000; 9:477-487.
16. Amore A, Coppo R: Immunological basis of inflammation in dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(Suppl 8): 16-24.
17. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt PJ, Kebede M, Salama L: Oxidative stress and hemodialysis: role of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:335-340.
18. Ward RA, Ouseph R, Mc Leish KR. Effects of high-flux hemodialysis on oxidant stress. *Kidney Int* 2003; 63:353-359.
19. Massy ZA, Nguyen-Khoa T, Beauvais CH. Oxidative stress and chronic renal failure: markers and management. *J Nephrol* 2002; 15:336-341.
20. Miyata T, Sugiyama S, Saito A, Kurokawa K. Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity ('carbonyl stress'). *Kidney Int* 2001; 59:25-31.
21. Wagner Z, Wittman I, Mazak I. Carboxymethyllysine levels in patients with type 2 diabetes: role of renal function. *Am J Kidney Dis* 2001; 785-791.