

Testosteronun Tavşanlarda Karaciğer Antioksidan Sistemi Üzerine Etkisi

Nurettin AYDİLEK¹Mesut AKSAKAL²¹ Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa / Türkiye² Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Elazığ / Türkiye

ÖZET

Bu çalışmada, testosteron hormonunun tavşan karaciğer dokusunda antioksidan sistem üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Materyal olarak canlı ağırlıkları ortalama 2600 gr olan 24 adet erkek Yeni Zellanda Tavşanı kullanıldı. Tavşanlar 8'erli 3 gruba ayrıldı. I. grup kontrol olarak kullanılırken, II. gruptakilere 40 gün boyunca testosteron propiyonat (10 mg, gün aşırı) enjekte edildi. III. gruptakiler ise bilateral kastre edildi. Testosteron grubundaki lipid peroksidasyon (malondialdehide) seviyesi kastrasyon grubuna göre yüksek bulundu ($p<0.05$). Glutatyon peroksidaz aktivitesi, E vitamini ve indirgenmiş glutatyon seviyeleri testosteron grubunda azalırken ($p<0.05$), kastrasyon grubundaki artışlar anlamlı bulunamadı. Beta karoten seviyesinde ise anlamlı bir değişim görülmedi. Sonuç olarak testosteron hormonu karaciğerde oksidatif stresi artırırken, kastrasyon bunun tersi etkiler gösterdiği görüldü.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, Karaciğer, Lipit Peroksidasyon, Tavşan, Testosteron

Effects of Testosterone on The Liver Antioxidant System in Rabbits

SUMMARY

This study was carried out to investigate the effects of testosterone on the antioxidant system of liver in rabbit. The material of the research consisted of 24 New Zealand male rabbit with average body weight of 2600 g. The rabbits were divided into 3 groups, each group having 8 rabbits. The first group was used as a control. The second group was injected with testosterone propionate (10 mg every other day) and the third group was castrated bilaterally. The levels of lipid peroxidation (malondialdehyde) were significantly higher in the testosterone group than the castration group ($p<0.05$). While the activity of glutathione peroxidase, the levels of vitamin E and reduced glutathione in the testosterone group were significantly decreased ($p<0.05$), they were nonsignificantly increased in the castration group. No significant differences were observed in the beta carotene levels among groups. As a result; a significant elevation in oxidative stress in the liver tissue was noticed in response to testosterone treatment, while castration had an opposite effect.

Key words: Antioxidant, Lipid Peroxidation, Liver, Rabbit, Testosterone

GİRİŞ

Serbest radikaller, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, alerji, diyabet, katarakt gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynayan ve bu nedenle son zamanlarda üzerinde en çok çalışılan konular arasında yer almaktadır. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküller olup bu elektronlarını paylaşabilmek için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerler. Radikallerle reaksiyona giren moleküllerin bir elektronu azaldığı için onlar da reaktif hale gelir ve bu reaksiyon zincirleme olarak devam eder. Mitokondrial, endoplazmik ve nükleer elektron transport sistemlerinde (sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi normal metabolik olaylar sırasında bol miktarda serbest radikal üretilir. Bu radikallerin oluşumunu ve meydana getireceği hasarı önlemek için vücutta bir çok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Eğer bu radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşarlarsa hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli bileşenlerinde hasara neden olurlar. Lipitler serbest radikal hasarına karşı en hassas yapılardır. Serbest radikaller, yağ asitlerindeki doymamış bağlarla kolayca reaksiyona girerek lipitlerin peroksidasyonuna (LPO) neden olurlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidatif hasarı kendi kendini devam ettiren zincirleme

bir reaksiyon olup geri dönüşümsüz membran hasarlarına neden olur (2). Hücre yüzeyindeki hormon reseptörleri, DNA, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ve Na^+K^+ -ATP az gibi enzimler LPO sırasında inaktive olur. Böylece LPO, hücrelerde dejeneratif, mutajenik ve karsinojenik bozukluklara neden olabilir (9).

Antioksidatif savunma mekanizmaları; A, E, C vitaminleri, β -karoten, indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi bazı vitamin ve kimyasal maddeler ile çeşitli antioksidan enzimlerden oluşur. E vitamini, yapısındaki fenolik hidroksil grubundan dolayı güçlü bir antioksidan özellik gösterir. Zincir kırıcı antioksidatif etkinliği ile membran fosfolipitlerinde bulunan PUFA'yı serbest radikal hasarından koruyan ilk savunma hattını oluşturur (2). En önemli antioksidan enzimler; süperoksit anyonunu H_2O_2 'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve H_2O_2 'yi suya indirgeyen katalazdır (8).

Erkek cinsiyet hormonu olan testosteron, anemi, hipogonadizm, gelişme geriliği gibi durumlarda ve anabolik etkinliğinden dolayı kas kitlesini artırmak amacıyla kullanılmaktadır (13). Testosteronun dozu ve kullanım süresine göre, bilirubin seviyesinde yükselme, alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat amino transferaz (AST) aktivitelerinde artış, kolestatik sarılık, karaciğer fonksiyon bozuklukları ve genellikle iyi huylu hepatik neoplazm ve karsinomlara yol açtığı

bildirilmektedir (12, 14). Fakat testosteronun prooksidan-antioksidan özellikleri konusunda yapılan çalışmalar hem az hem de sonuçlar çelişkilidir (7, 11, 19, 22). Bunun için bu çalışmada testosteron hormonunun karaciğer dokusundaki antioksidan veya oksidan etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada, Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 24 adet 2600±300 gr ağırlığında erkek Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Tavşanlar özel tel kafeslerde (12 saat aydınlık) barındırılarak, bileşimi Tablo 1'de verilen ticari tavşan yemi (Elazığ Yem Fabrikası) ile ad libitum beslendi.

Tablo 1: Tavşan Yemi Bileşimi

Yem Maddesi	%
Arpa	20
Mısır	48,8
B. Kepek	10
Soya	10,5
Balık Unu	2
Et Kemik Unu	4
Tuz	0,9
D. Fosfat	0,6
Kireç Taşı	2,8
Methionin	0,2
Vit.- Min Karması *	0,2

* Ca; % 1.5, P; % 0.8, Na; % 0.35, Mn; 8 mg/kg, Zn; 50 mg/kg

A Vit; 8000 IU/kg, E Vit; 10 mg/kg, K Vit; 1 mg/kg, D Vit; 800 IU/kg, B₂ Vit; 3 mg/kg, B₁₂ Vit; 5 mcg/kg

Denekler aşağıdaki gibi 3 gruba ayrıldı;

a- Kontrol grubu (n=8)

b- Testosteron uygulama grubu (n=8); bu gruptaki tavşanlara gün aşırı 0,5 ml zeytinyağında çözödürölen 10 mg testosteron propionat derialtı enjekte edildi.

c- Kastrasyon grubu (n=8); F.Ü. Vet. Fak. Cerrahi A.B'de rutin kastrasyon teknikleri ile bilateral kastre edildi ve 15 gün iyileşmeleri beklendi.

40 günlük uygulama süresinden sonra 12 saatlik açlık periyodunu müteakiben doku örnekleri alınarak -30 °C'de donduruldu. Bir hafta sonra dokular Potter-Elvehjem cam homojenizatörde Tris HCl (pH 7.4) tamponuyla homojenize edilerek analizler yapıldı.

E vitamini analizleri, Desai (5)'nin bildirdiği metoda göre yapılmıştır. 0.5 gr doku, 0.5 ml KOH (%60) ve 2 ml askorbik asit (%1, etil alkolde) ilavesi ile saponofiyeye edilerek 70 °C'de 30 dakika ısıtıldı. Soğutulan örneklerin üzerlerine 2 ml su ve 0.5 ml n-hexan ilave edilerek faz ayırımı yapıldı. Tüplerden alınan 4 ml süpernatanttaki n-hexan 40°C'deki azot gazında uçurularak tekrar 2 ml metanol içinde çözödüröldü. Metanol ekstraktına, bathophenanthroline ve orthofosforik asit ilave edilerek spektrofotometrede 536 nm'de ölçümler yapıldı. Spektrofotometrik kalibrasyon

için metanolde çözödürölen α-tokoferol standardı kullanıldı.

Lipit peroksidasyon (MDA) analizi, tiyobarbiturik asitle reaksiyona giren maddelerin (TBARS) ölçümü ile yapıldı. Bunun için Matkovics ve ark. (18) tarafından modifiye edilen Placer ve ark. (20) metodu kullanıldı. TBARS değerleri, malondialdehit (nmol/gr doku) olarak ifade edildi.

Glutasyon peroksidaz aktivitesi, Lawrence ve Burk'un bildirdiği metoda göre spektrofotometrik (Shimadzu 2R/UV-Vis. Kyoto Japan) olarak ölçöldü (15). İndirgenmiş glutasyon analizi, Sedlak ve Lindsay'ın metodununa göre yapıldı (23). Beta karoten seviyeleri Suzuki ve Katoh (29) tarafından bildirilen metoda göre ölçöldü. Dokuların protein analizleri ise Lowry ve ark. (16)'ın metoduna göre yapıldı.

İstatistiksel analizler SPSS (10.1) programı ile yapıldı. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandıktan sonra gruplar arası farklılıklar Tukey testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Anlamlılık derecesi, p<0.05 kabul edildi (1).

BULGULAR

Çalışmada elde edilen veriler Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2: Karaciğer antioksidan sisteme ait veriler (ortalama ± standart sapma)

	Kontrol	Testosteron	Kastrasyon
MDA (nmol/gr)	4.13±0.68 ab	4.79±0.68 a	4.02±0.31 b
GSH (nmol/gr)	0.6±0.10 a	0.48±0.09 b	0.66±0.08 a
E vitamini (µgr/gr)	3.57±0.57a	2.50±0.48 b	4.10±0.82 a
β-karoten (µgr/100 gr)	60.51±12.52	52.50±10.66	60.95±6.47
GSH-Px (IU/gr prot.)	40.09±11,19	27.18±6.41	49.00±5.50
	a	b	a

Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler birbirinden farklı bulunmuştur (p<0.05)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Feingold ve ark. (7) erkek ve dişi ratlar üzerinde yaptığı çalışmada, kastre edilen ratlarda karaciğer E vitamini konsantrasyonunun önemli şekilde artarak ovariectomie yapılan dişilerdeki seviyeye yükseldiğini bildirmektedir. Aynı çalışmada, kastre edilen hayvanlara testosteron sipiyonat uygulamasının E vitamini konsantrasyonundaki artışı inhiye ettiği görölmüştür. Çalışmamızda testosteron uygulaması sonucu E vitamini seviyesinde önemli bir düşüş görölrken (p<0.05), kastrasyonun ise E vitamini seviyesinde önemsiz bir artışa neden olduğu görölmüştür. (Tablo 2). Testosteron uygulaması sonucu E vitamini konsantrasyonunun azalışı nedeni, artan oksidatif stres (LPO) karşısında önemli bir radikal inhibitörü olan E vitamininin kullanılmış olması veya testosteronun E vitamini emilim ve dağılımını üzerine etkili olan lipoprotein metabolizmasını olumsuz yönde etkilemesi olabilir (10). E vitamini yağda çözönen bir vitamin olduğundan bağırsaklardan emilebilmesi için safra asitleri ve misel oluşumu gereklidir. Pankreas ve

safranın azalması E vitamini absorpsiyonu oldukça zayıflar. Safra stazı, kolestatik karaciğer hastalıkları ve pankreatitis gibi malabsorpsiyon sorunları E vitamini eksikliği ile sonuçlanır (27). Daha önce belirtildiği gibi testosteron uygulamaları safra stazı, kolestatik sarılık gibi karaciğer bozukluklarına yol açtığından (24), E vitamini emilimini indirek olarak engelleyerek karaciğerdeki E vitamini konsantrasyonunda düşüşe neden olabilir.

Sreelatha ve ark.(28), testosteron uyguladıkları normal ratlarda karaciğer ve kalp dokusunda LPO'nun arttığını bildirmektedir. Diğer taraftan Mooradian (19), bir serbest radikal indükleyicisi olan 2,2'-azobis (2-amino-propane) dihidroklorid (AAPH) ve çeşitli steroid hormonlarla yaptığı in vitro deneylerde 17- α ve β östradiolün radikal üretimini inhibe ederken testosteronun anlamlı olmamakla birlikte radikal üretimini artırdığını bildirmektedir. Çalışmamızda testosteron grubundaki MDA seviyesi kontrol grubuna göre artmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Tablo 2). Fakat testosteron grubundaki MDA seviyesinin kastrasyon grubuna kıyasla önemli şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Dokularda E vitamini seviyesinin azalması ile birlikte, hepatik GSH-Px, katalaz, ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimler inaktive olur ve karaciğerde lipit peroksit seviyesi artabilir (6). Ayrıca, Mooradian (19)'nın vitaminsiz ortamlarda yaptığı çalışmada bildirdiği gibi testosteron hormonu yalnız başına prooksidatif bir etkiye de sahip olabilir. Uzun süre testosteron kullanımı sonucu görülen karaciğer fonksiyon bozuklukları ve hepatik tümör oluşumlarının (24), bir nedeninin de oksidatif stresteki artış olabileceği düşünülmektedir.

A vitamini prekürsörü olan β -karoten, düşük oksijen basınçlarında güçlü bir singlet oksijen tutucusu ve serbest radikal reaksiyonları için önemli bir substrattır. Serbest radikallerle reaksiyona girerek okside olan β -karotenler, E vitamini tarafından tekrar redükte edilirler. Karaciğerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (4, 25). Çalışmamızda β -karotenle ilgili veriler Tablo 2'de verilmiştir. Testosteron grubundaki β -karoten seviyesi kontrol ve kastrasyon gruplarına kıyasla azalmış fakat bu anlamlı bulunmamıştır. Boileau ve ark. (3), kastre edilen ratların karaciğerlerinde β -karoten gibi bir karotenoid olan likopen konsantrasyonunun arttığını, buna mukabil kastre edilen ratlara testosteron uygulamasıyla bu seviyenin kontrol grubu seviyesine düştüğünü bildirmektedir. Testosteron grubundaki artan oksidatif strese (LPO) karşı antioksidatif aktiviteye sahip olan β -karoten oksidasyonu sonucu konsantrasyonu azalmıştır. Ayrıca yağda çözülen karotenlerin emilim ve dağılımı da E vitamini benzediğinden testosteron hormonunun β -karoten emilimini de inhibe edeceği söylenebilir (26). Bunun yanında β -karoten seviyesinin oksidatif stresten E vitamini kadar etkilenmemesi, okside olan β -karotenin E vitamini tarafından redükte edilmesi ve Tsuchihashi ve ark. (30) belirttiği gibi sıvı fazda şekillenen radikallere

karşı E vitamini öncelikle tüketilip β -karotenin korunmuş olmasına bağlanabilir.

İndirgenmiş glutatyon, bol miktarda tiyol ihtiva eden, düşük moleküler ağırlıklı bir maddedir. GSH, sahip olduğu sülfhidril grubu ile oksidatif hasar ve toksik maddelere karşı hücreleri korur. GSH, dokularda açığa çıkan lipit peroksitler, H_2O_2 , askorbik asit ve serbest radikalleri indirger ve GSH-Px enzimi için kofaktör olarak görev yaparak sonuçta okside olur (2, 9). Çalışmamızda yukarıda bahsedildiği gibi testosteron grubunda oksidatif stres artışı ve E vitamini seviyesi ile GSH-Px aktivitesindeki düşüşe paralel olarak GSH seviyesi azalmıştır ($p<0.05$). Kastrasyon grubundaki artış ise anlamlı görülmemiştir.

Glutatyon peroksidaz enzimi (GSH-Px), hücreleri organik hidroperoksitler ve H_2O_2 tarafından oluşturulan oksidatif tahribata karşı GSH kullanarak korur (17). Prohaska ve Sunde, erkek ratlarda karaciğer GSH-Px aktivitesinin dişilerinkinden daha düşük olduğunu bildirmektedir (21). Igarashi ve ark. (11), kastre ettikleri ratların karaciğerlerinde GSH-Px aktivitesi artarken, sonradan testosteron uygulamasıyla bunun kontrol grubu seviyesine düştüğünü bildirmektedir. Çalışmamızda oksidatif stresin arttığı testosteron grubunda GSH-Px aktivitesi düşerken ($p<0.05$), kastrasyon grubunda ise bu aktivite artışının anlamlı olmadığı gözlenmiştir (Tablo 2). Testosteron grubunda artan serbest radikallerin enzimatik dismutasyonu sonucu enzimler tükenir veya yine bu radikallerin etkisi sonucu GSH-Px aktivitesi inhibe olabilir (31). Ayrıca GSH-Px enziminin substrat olarak ihtiyaç duyduğu GSH'nin seviyesi testosteron grubunda azaldığı için GSH-Px aktivitesinin inhibisyonuna neden olabilir. Bununla birlikte cinsiyet hormonlarının kendileri de GSH-Px indüksiyonunu etkileyebilir.

Sonuç olarak, testosteron hormonunun oksidatif stresi (MDA) artırırken GSH-Px aktivitesi ve E vitamini ve GSH seviyesinde azalmaya neden olduğu görülmüştür.

KAYNAKLAR

- 1- **Akgül A (1997):** Tıbbi Araştırmalarda İstatistiksel Analiz Teknikleri, SPSS Uygulamaları. Yüksek Öğretim Kurulu Matbaası. Ankara.
- 2- **Akkuş İ (1995):** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları., Konya.
- 3- **Boileau TWM, Clinton SK, Zaripheh S, Monaco MH, Donovan SM, Erdman JW (2001):** Testosterone and food restriction modulate hepatic lycopene isomer concentrations in male f344 rats. J. Nutr. 131, 1746-1752.
- 4- **Chaudiere J, Ferrari IL.(1999):** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. food and chemical toxicology. 37, 949-962.
- 5- **Desai, ID (1984):** Vitamin E analysis methods for animal tissues. Methods Enzymol. 105, 138-147.
- 6- **Fang YZ, Yang S, Guoyao W (2002):** Free radicals, antioxidant, and nutrition. Nutrition. 18, 872-879.

- 7- Feingold IB, Penelope AL, Howard DC (1993):** Regulation of adrenal and hepatic α -tocopherol content by androgens and estrogens. *Biochim Biophys Acta.* 1176,192-196.
- 8- Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G (1991):** Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in blood. *Clin. Chem.*, 37, 11, 1932-1937.
- 9- Halliwell B, Gutteridge JMC (1996):** Free Radicals in Biology and Medicine. 2nd Edition Clarendon Pres, Oxford.
- 10- Herrera E, Barbas C (2001):** Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.* 57, 1, 43-56.
- 11- Igarashi T, Satoh T, Ono S, Iwashita K, Hosokawa M, Ueno K, Kitagawa H (1984):** Effect of steroidal sex hormones on the sex-related differences in the hepatic activities of gamma-glutamyltranspeptidase, glutathione S-transferase and glutathione peroxidase in rats. *Res. Commun. Pathol. Pharmacol.* 45,2,225-232.
- 12- Ishak KG, Zimmerman HJ (1987):** Hepatotoxic effects of the anabolic/androgenic steroids. *Semin. Liver Dis.*, 7,230-236.
- 13- Kayaalp SO (2000):** Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. Baskı. Hacettepe-Taş Kitabevi, Ankara.
- 14- Kosaka A, Takahashi H, Yajima, Y (1996):** Hepatocellular carcinoma associated with anabolic steroid therapy. *J. Gastroenterol.*, 31, 450-454.
- 15- Lawrence RA, Burk RF (1976):** Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 952-958.
- 16- Lowry OH, Rosebrough NJ, Far, AL, Randall RJ (1951):** Protein measurement with the folin- phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 17- Mates JM, Gomez CP, Castro I (1999):** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochem.* 32, 8, 595-603.
- 18- Matkovics B, Szabo L, Varga IS (1988):** Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways (in Hungarian) *Laborat. Diagn.* 15, 248-249.
- 19- Mooradian AD (1993):** Antioxidant properties of steroids. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 45, 6, 509-511.
- 20- Placer ZA, Cushmann LL, Johnson BC (1966):** Estimation of products of lipid peroxidation (as malondialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 16, 359-364.
- 21- Prohaska JR, Sunde RA (1993):** Comprasion of liver glutathione peroxidase activity and mRNA in female and male mice and rats. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 105, 1, 111-116.
- 22- Proshina MP, Matiushin AI (1982):** Effect of hormones on lipid peroxidation in the heart and liver. *Farmakol. Toksikol.* 45,1,24-26.
- 23- Sedlak J, Lindsay,RHC.(1968):** Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with ellmann's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192-205.
- 24- Shahidi NT (2001):** A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clinical Therapeutics.* 23, 9, 1355-1389.
- 25- Sies H, Stahl, W, Sundquist AR (1992):** Antioxidant functions of vitamins: vitamins E and C, beta carotene and other caratenoids. *Annals of the New York Academy of Science.* 669, 7-20.
- 26- Silveira ER, Morena F (1998):** Natural retionids and β -carotene: from food to their actions on gene expression. *J. Nutr. Biochem.* 9, 446-456.
- 27- Sokol RJ (1993):** Vitamin E Deficiency and neurological disorders. In "Vitamin E in Health and Disease", Ed., Packer, L., Fuchs, J. Marcel Dekker, New York.
- 28- Sreelatha KKT, Menon VP, Leelamma S (1993):** Testosterone and lipid peroxide metabolism in orchidectomised rat. *Indian J. Exp. Biol.* 31, 4, 323-326.
- 29- Suzuki J, Katoh N (1990):** A simple and cheap method for measuring vitamin A in cattle using only a spectrophotometer. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52, 1282-1284.
- 30- Tsuchihashi H, Kigoshi M, Iwatsuki M, Niki E. (1995):** Action of β -carotene as antioxidant against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 323, 137-147.
- 31- Turi S, Nemeth I, Ilona W (1991):** Erythrocyte defense mechanisms aganist free oxygen radicals in haemodialysed uremic children. *Pediatr. Nephrol.* 5, 179-1