

Eritropoietin: Yapısı, Metabolizması ve Etki Mekanizması

Kağan Üçok¹ Bünyamin Kaptanoğlu² Hakkı Gökbel³ Mansur Tatlı⁴ Mehmet Kara⁵

¹Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, KONYA.

²Uzm.Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA.

³Doç.Dr. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, KONYA.

⁴Uzm.Dr. 1 Nolu Ana-Çocuk Sağlığı Merkezi, KONYA.

⁵Dr. Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, KONYA.

Özet

Eritropoietin molekül ağırlığı 30400 dalton olan bir alfa globulindir. Başlıca üretim yeri böbrektir, fakat karaciğer ve doku makrofajları gibi ekstrarenal dokularda da eritropoietin sentezlenebilir. Doku hipoksisi eritropoietin üretiminin başlıca uyarandır. Hormonun sentezini kontrol eden hücreler kanın O₂ kapasitesi, O₂ basıncı ve affinitesindeki değişikliklere cevap verirler. Ayrıca lokal kan akımı ve hücrelerin O₂ tüketimi de bir miktar rol oynayabilir. Eritropoietin CFU-E (Colony Forming Units-Erythroid) ve BFU-E (Burst Forming Units-Erythroid), hücre membranındaki spesifik reseptörleri etkiler ve böylece bu hücrelerin çoğalmasını ve CFU-E hücrelerinin proeritroblastla dönüşmesini sağlar.

Anahtar Kelimeler: Eritropoietin, eritropoietinin yapısı, eritropoietinin metabolizması, eritropoietinin etki mekanizması.

Erythropoietin: Structure, Metabolism and Mechanism of Effect

Abstract

Erythropoietin is an alpha-globulin whose molecular weight is 30400 dalton. Its main production site is kidney, but little erythropoietin can also be synthesized in the extrarenal tissues such as liver and tissue macrophages. Tissue hypoxia is essential stimulus of erythropoietin production. The cells controlling the synthesis of the hormone appear to respond to changes in the O₂ capacity, the O₂ tension, and the affinity of the blood. In addition, the rates of the local blood flow and of the cellular O₂ consumption may play some role. Erythropoietin affects the specific receptors in CFU-E (Colony Forming Units-Erythroid) and BFU-E (Burst Forming Units-Erythroid) cell membranes and therefore promotes proliferation of these cells and transforming of CFU-E to proerythroblast.

Key Words: Erythropoietin, structure of erythropoietin, metabolism of erythropoietin, mechanism of effect of erythropoietin.

Eritropoietin molekül ağırlığı 30400 dalton (Da), spesifik aktivitesi 200000 IU/mg olan 166 aminoasitli, glikoprotein kısmı fazla bir alfa-globulindir (1-3). Dolaşımdaki olgun hormon 165 aminoasitten ibarettir. Glikolizasyon sahaları 24, 38 ve 83. pozisyonlardaki aspartil'e bağlı CH arasında birer N-bağı (toplam 3) ve 126. pozisyonundaki seril'e bağlı CH arasındaki O-bağıdır. Glikolizasyon sahaları eritropoietinin fonksiyonu için temel değildir; asialoeritropoietinin hızlı hepatik klirensine engel olur (4). 7, 161 ve 29, 33 pozisyonundaki sisteinler arasında birer disülfid bağı vardır. Biyolojik aktivite belli amino asitlerle net şarjı ile değişir (5).

Eritropoietinin peptid iskeleti 18 kDa, glikoprotein kısmı ise 30 kDa molekül ağırlığındadır.

Karbonhidrat kısmı molekülün yaklaşık % 40'ını oluşturur. Siyalik asitle zenginleşmiş dört kompleks karbonhidrat zinciri vardır ve üçü N-bağı, biri O-bağı şeklindedir (6). Bunlar fruktoz, mannoz, N-asetilglukozamin, galaktoz ve N-asetilnöraminik asitten ibarettir. N-bağ zinciri başlıca tetra-antenary kompleksinden meydana gelmesine rağmen, kısa O-bağ zinciri 4 şeker rezidüsünden ibarettir. İnsanlarda N-bağ zincirinin şeker biçiminde kişiden kişiye değişen farklılıklar vardır (7).

Eritropoietinin termal inaktivasyona direnci büyük ölçüde karbonhidrat zincirinin tam olmayışına bağlıdır. İn vivo çalışmalarda karbonhidrat kısmı, hormonun metabolik akibetini tayinde önemlidir. Eritropoietin terminal N-asetil nöra-

minik asit kısmının yokluğunda (asialoeritropoietin), karaciğerde galaktoz bağlayan reseptörler tarafından hızlı bir şekilde temizlenir. İn vitro şartlarda asialoeritropoietinin sağlam hormona göre daha yüksek aktiviteye sahip olmasının nedeni eritropoietin reseptörlerine daha hızlı bağlanmasıdır (5).

Plazma eritropoietini nisbeten ısıya ve pH'ya dayanıklı, asidik bir alfa 2-globulindir. İnsan üriner eritropoietini saflaştırılmış ve benzer biyolojik aktivite, molekül ağırlığı ve amino asit dizilişi olan iki fraksiyon (alfa ve beta) tesbit edilmiştir, fakat bunların elektroforetik hareketliliği ve karbonhidrat kompozisyonu farklıdır (8). Jel kromatografisi ile 3 tip insan eritropoietini izole edilmiştir. Serumda elektroforez zonu ile ayrılmış 20-30 farklı immunoreaktif eritropoietin formu gösterilmiştir. Eritropoietin formları günlük değişim gösterir. Ayrıca anemik ve polisitemik hastalarda eritropoietinin elektroforetik hareketi karşılaştırıldığında şarj farklılıkları görülmüştür (9). İnsan üriner eritropoietini ile rekombinant eritropoietin, amino asit sıralanışları, disülfid bağlarının pozisyonu, glikolizasyon yerleri ve sekonder yapıları açısından benzerdirler (7). Rekombinant ürünleri hiçbir yeni yapısal eleman içermez; N-Asetil nöraminik asit 2 α -6 galaktoz bağı eksiktir. Doğal hormonda ise hem bu bağ, hem de N-Asetil nöraminik asit 2 α -3 galaktoz bağı vardır (6). Sialilasyondaki (sialik asitle birleşme) farklılıklar insan eritropoietini ile reHuEPO (rekombinant human erythropoietin) arasındaki in vivo etki farklılıklarından sorumlu olabilir. Rekombinant ürünlerin biyolojik aktiviteleri hücre tipini belirleyen gene göre değişir (10). N-bağ şeker zincirinin daha fazla dallanması, belirgin şekilde yüksek in vivo biyolojik aktiviteden sorumludur (6).

Anemisi olmayan kişilerde ortalama serum eritropoietin konsantrasyonu 4-48 U/ml'dir (11-13). Sonuçlardaki farklılık laboratuvarların standart eritropoietin hazırlaması ve assay rejimindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Kan hemoglobin düzeyleri farklı olmasına rağmen, sağlıklı kadınlarda ve erkeklerde serum eritropoietin konsantrasyonu açısından fark yoktur. Eritropoietin düzeyleri yaştan bağımsızdır. Normoksik kişilerde ve solunumsal yetmezliği olan hastalarda, eritropoietin değerlerinin öğleden önce düşük, gecenin erken saatlerinde daha yüksek olduğu, ılımlı bir sirkadiyen ritim tesbit edilmiştir (12). Menstrual siklus sırasında eritropoietin seviyelerinde belirgin bir dalgalanma olmaz. Hamileliğin 3. ayından sonra eritropoietin konsantrasyonu dilüsyon anemisine eşlik eder şekilde yükselir ve

35-80 U/ml değerlerine ulaşır (5).

Üretim, Metabolizma ve Yıkımı

Eritropoietin yapımı 7. kromozomda lokalize bir gen tarafından düzenlenir ve % 90-95'i böbreklerde, % 5-10'u böbrek dışı dokularda meydana gelir (14).

Üretim Yerleri:

1-Böbrek: Doğumdan hemen sonra böbrek, eritropoietinin esas üretim yeri olma özelliğini karaciğerden devralır. Hipokside eritropoietin üretimindeki artış cAMP oluşumu ile birlikte dir (15). Normal hayvanların böbreklerinden çok az eritropoietin izole edilebilir. Hipoksi, anemi, karboksihemoglobinemi veya kobalt verilmesi ile uyarıldıktan sonra kemirgen böbreklerinden önemli miktarda eritropoietin izole edilebilmiştir (16).

Eritropoietin aktivitesi esas olarak hipoksik böbrek korteksinde görülür. Bir araştırmada renal kortikal interstisyel hücrelerde eritropoietin üretildiği bildirilmiştir (1). Yapılan birçok immunohistolojik ve in situ hibridizasyon çalışmaları, eritropoietinin böbrekteki üretim yeri hakkında açık bir bilgi vermemiştir. Birçok bilim adamı eritropoietin üretim yerinin peritübüler hücre endotelini olduğunu söylemekle birlikte, tübüler orijini olabileceğine dair deliller de vardır (5).

2-Böbrek dışı yerler: Nefrektomili hayvan ve insanlarda hipoksemiye cevap olarak böbrek dışında eritropoietin salgılandığı gösterilmiştir (17). Ekstrarenal kaynaklı eritropoietin sekresyonu da hipoksi şiddetinin artması ile artar (17). Renal ve ekstrarenal eritropoietin arasında yapı ve fonksiyon farklılığı rapor edilmemiştir. Böbrek ve karaciğer dışında kalan dokularda (doku makrofajları, glomus karotikumlar ve tükrük bezleri) eritropoietin üretildiğine dair deliller yeterli değildir (18).

a-Karaciğer: Eritropoietin fetal hayatta karaciğerde sentezlenir. Doğumdan hemen sonra karaciğerin eritropoietin salgısının ve hipoksiye duyarlılığının azaldığı, koyunlarda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (19). Ekstrarenal eritropoietinin esas üretim yeri karaciğerdir. Ciddi anemiye rağmen üremik hastalarda kan eritropoietin seviyeleri nisbeten düşüktür. Karaciğerin neden bu ekşiği kapatmadığı düşünülebilir. Son zamanlarda kronik böbrek yetmezliğinde ekstrarenal alanlarda eritropoietin üretimini inhibe eden humoral mediatörlerin olabileceği ileri sürülmektedir.

Karaciğerde eritropoietin üretim yeri olarak safra kanalı epiteli, retikuloendotelial sistem hücreleri, Kupffer hücreleri, sentrilobuler epitel hücreleri üzerinde durulmuştur (5).

b-Doku makrofajları: Polisitemide böbrek ve karaciğerden eritropoietin salgısı azalmasına rağmen kanda bir miktar eritropoietin bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar bu durumun doku makrofajlarına (özellikle kemik iliği ve daaktaki) bağlı olduğunu ileri sürmektedirler (18). Eritropoietinin doku makrofajlarında üretimi ile ilgili deliller henüz yetersizdir.

Metabolizma ve Yıkım

Eritropoietinin dolaşımdaki yarı ömrü 5-6 saattir (1). Diğer glikoproteinler gibi eritropoietin de kandan oldukça yavaş temizlenir. Terminal silyalik asit rezidüleri hormonun karaciğerde galaktoz reseptörlerine bağlanmasına, hücre içine alınmasına ve yapısının bozulmasına engel olur. Eritropoietinin plazma klirensi 10 ml/dk'dan azdır. Eritropoietin katabolizmasında hepatic metabolizma en önemli yeri tutar. Az miktarda idrarla da atıldığı gösterilmiştir (1,20). Bunlara ek olarak eritropoietik dokular tarafından kullanıldığı, kemik iliği hipoplazisi olanlarda yarı ömrünün daha uzun olduğu gösterilmiştir (21).

İntravenöz yolla verildiğinde eritropoietinin kanda maksimuma ulaşma süresi 4 ± 0.5 saat, yarılanma zamanı ise 8 saattir. Üç aylık tedaviden sonra yarılanma süresi 6.8 saate düşmektedir. Subkutan reHuEPO uygulamasında ise maksimuma ulaşma süresi 11 saat, yarılanma zamanı ise 24 saattir (14).

Eritropoietin Üretiminin Stimüle Edilmesinde Doku Hipoksisi: Dolaşımdaki eritrosit sayısı eritropoietin tarafından doğrudan doğruya feedback mekanizmayla kontrol edilmez, eritropoietin üretiminde esas uyarıcı doku hipoksisisidir. O₂ duyarlılığının eritropoietin üretimini MFO'lar (microsomal mixed-functional oxidases) içeren bir heme proteini aracılığı ile kontrol ettiği gösterilmiştir (22). Ayrıca protein kinaz A ve C'nin eritropoietin yapımında rolü olduğuna dair çalışmalar vardır (23). Eritropoietin sentezini etkileyen faktörler şunlardır:

1-Düşük kan oksijen kapasitesi: Plazma eritropoietin aktivitesi kanın oksijen taşıma kapasitesini büyük ölçüde artırır. Hemogloblin konsantrasyonu veya hematokrit ile eritropoietin aktivitesi arasında zıt bir doğrusal ilişki vardır

(12,24). Hipoplastik anemilerde aneminin derecesine göre eritropoietin aktivitesi artar. Kronik enflamatuvar veya malign hastalıklarda ise eritropoietin aktivitesi düşüktür. Akut kanama hem insanlarda hem hayvanlarda eritropoietin salgısını artırır (17). Dehidratasyona bağlı psödopolisitemide, kan transfüzyonunu takiben ortaya çıkan gerçek polisitemide olduğu gibi, eritropoietin üretimi baskılanır.

2-Düşük arteriyel oksijen basıncı: İspiratuar O₂ basıncının azalması dokulara giden O₂ miktarını azaltır ve eritropoietinin hipoksinin derecesi ile orantılı olarak artmasına sebep olur. Yüksek rakımlarda yaşayanlarda hemoglobin miktarı yüksektir. Buna hematokrit, kan viskozitesi ve kardiyak iş yükündeki artma eşlik eder. Diğer taraftan anemik hastaların saf O₂ soluması serum eritropoietin seviyesinde azalmaya sebep olur.

3-Artmış kan oksijen affinitesi: Kan O₂ affinitesindeki artış eritropoietin salgısını da artırır. Orak hücreli anemide olduğu gibi O₂ affinitesinin azalması ise eritropoietin salgısını azaltır. Akut karbonmonoksit maruz kalma eritropoietin salgısını en fazla artıran faktörlerdendir ve sigara içenlerde hemoglobin artışı buna bağlıdır. pH'nın eritropoietin seviyesine güçlü etkisi O₂ affinitesini etkilemesi ile (5).

4-Düşük böbrek kan akımı: Böbrek kan akımının güçlü otoregülasyonundan dolayı böbrek O₂ kullanımı kalp ve akciğer kan akımı değişikliklerinden az etkilenir. Böbrek kan akımı azalınca oksijenlenme bozulur ve eritropoietin salgısı artar. Böylece meydana gelen viskozite artışı ile perfüzyon hızında azalma olur ve doku hipoksisi artar. Bunun sonucunda yine eritropoietin salgısı artar. Bu şekilde polisitemi kısır döngüsü gelişir.

Hormonların eritropoietin üretimine etkileri bilinmektedir. Glikokortikoidler, tiroid hormonları, büyüme hormonu, vazopressin, testosteron eritropoietin sentezini artırır (1).

Eritropoietinin Etki Mekanizması

Eritropoietin kemik iliğinde eritroid serinin ön hücreleri olan BFU-E, diferansiye BFU-E ve CFU-E'den spesifik olarak eritroblast gelişimini artırır (25,26). Eritropoietin CFU-E ve BFU-E hücrelerinin yüzeyindeki spesifik reseptörleri etkileyerek bu hücrelerin çoğalmasını, CFU-E'nin proeritroblastta dönüşmesini sağlar, proeritroblast ve bazofilik eritroblastların proliferasyonunu artırır, oluşan proeritroblastın 4 günden bi-

raz daha fazla sürede olgun normoblastlara, bunların da retikülositlere dönüşmesini temin eder (14).

Eritropoietin reseptörü: Diğer protein hormonlar gibi eritropoietin de spesifik hücre membran reseptörüne bağlanarak etki eder. Bu reseptör tek transmembran alanlı lineer bir proteindir. Transmembran alanı yapı olarak IL2 (interlökin-2) reseptörünün beta zincirinin aynısıdır. Bir hücrede 4000'den az eritropoietin reseptörü bulunur (3). Eritropoietinin reseptöre bağlanmasını takiben eritropoietin-reseptör kompleksi hücre içine alınır ve sitoplazmada GTP-bağlayıcı protein vasıtasıyla taşınır. Eritropoietin hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunu hızlı bir şekilde artırır. Hücre içi Ca^{++} 'un eritropoietinin hücre içi transportunda rol aldığı bilinmektedir (5). Mesajın nükleusa nasıl taşındığı kesin olarak bilinmemekle beraber, hedef hücre nükleusunda protein kinaz C aktivasyonunu ve protein fosforilasyonunu stimüle ettiği ileri sürülmektedir (27).

Kaynaklar

- 1-Allan JE. Erythrokinetics. In: Williams WJ, Ernest B, Allan JE, Lichman MA, editors. Hematology, New York: McGraw Hill, 1991; 393-7.
- 2-Guyton AC. Textbook of Medical Physiology, Philadelphia: WB Saunders, 1991; 358-9.
- 3-Lappin TRJ. Structure-function relationships of erythropoietin. In: Pagel H, Weiss C, Jelkmann W, editors. Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin. Germany: Springer-Verlag, 1992; 3-14.
- 4-Spivak JL, Hogans BB. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. Blood 1989; 73: 90-9.
- 5-Jelkmann J. Erythropoietin: Structure, control of production, and function. Physiol Rev 1992; 72: 449-89.
- 6-Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, et al. Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells. Proc Natl Acad Sci 1989; 86: 7819-22.
- 7-Tsuda E, Goto M, Murakami A, et al. Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. Biochemistry 1988; 27: 5646-54.
- 8-Dordal MS, Wang FF, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. Endocrinology 1985; 166: 2293-9.
- 9-Wide L, Bengtsson C. Molecular charge heterogeneity of human serum erythropoietin. Br J Haematol 1990; 76: 121-7.
- 10-Goto M, Murakami A, Akai K, et al. Characterization and use of monoclonal antibodies directed against human erythropoietin that recognize different antigenic determinants. Blood 1989; 74: 1415-23.
- 11-Goldberg MA. Biology of erythropoietin. In: Garnick MB, editor. Erythropoietin in Clinical Applications. New York: Marcel Dekker, 1990; 59-104.
- 12-Wide L, Bengtsson C, Birgegard G. Circadian rhythm of erythropoietin in human serum. Br J Haematol 1989; 72: 85-90.
- 13-Wognum AW, Lansdorp PM, Eaves AC, Krystal G. An enzyme-linked immunosorbent assay for erythropoietin using monoclonal antibodies, tetrameric immune complexes, and substrate amplification. Blood 1989; 74: 622-8.
- 14-Döner E, Onat AO, Ayhan O ve ark. Son dönem böbrek yetmezliğindeki aneminin rekombinant human eritropoietin ile tedavisi. T Klin Tıp Bil 1992; 12: 272-5.
- 15-Fisher J, Nakashima J. The role of adenosine in hypoxic regulation of kidney production of erythropoietin. In: Pagel H, Weiss C, Jelkmann W, editors. Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin. Germany: Springer-Verlag, 1992; 29-51.
- 16-Caro J, Erslev J. Biologic and immunologic erythropoietin in extracts from hypoxic whole rat kidneys and in their glomerular and tubular fractions. J Lab Clin Med 1984; 103: 922-31.
- 17-Erslev AJ, Carlo J, Kansu E, Silver R. Renal and extrarenal erythropoietin production in anemic rats. Br J Haematol 1980; 45: 65-72.
- 18-Rich IN. A role of macrophage in normal hemopoiesis. II. Effect of varying

physiological oxygen tension on the release of hemopoietic growth factors from bone-marrow-derived macrophages in vitro. *Exp Hematol* 1986; 14: 746-51.

Yazışma Adresi:
Doç.Dr. Hakkı Gökbel
Selçuk Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

42080/KONYA

19-Flake AW, Harrison MR, Adzick NS, Zanjani ED. Erythropoietin production by the fetal liver in an adult environment. *Blood* 1987; 70: 542-5.

20-Gutmann FD, Schwartz JC. Pathogenesis of anemia secondary to chronic renal failure. In: Garnick MB, editor. *Erythropoietin in Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker, 1990; 105-40.

21-Stohlman F, Brecher G. Humoral regulation of erythropoiesis. Relationship of plasma erythropoietin level to bone marrow activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959; 100: 40-3.

22-Fandrey J, Jeklmann W, Siegers CP. Control of the production of erythropoietin in hepatoma cell cultures. *Funktionsanal Biol Syst* 1993; 13: 157-63.

23-Jeklmann W, Huwiler A, Fandrey J, Pfeilschifter J. Inhibition of erythropoietin production by phorbol ester is associated with down-regulation of protein kinase C-alpha isoenzyme in hepatoma cells, *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 1441-8.

24-Spivak JL, Barnes DC, Fuchs E, Quinn TC. Serum immunoreactive erythropoietin in HIV-infected patients. *J Am Med Assoc* 1989; 261: 3104-7.

25-Eckardt KU, Boutellier U, Kurtz A, et al. Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 1989; 66: 1785-8.

26-Umemura T, Papayan-Nopoulou T, Stamatoyan-Nopoulos G. The mechanism of expansion of late erythroid progenitors during erythroid regeneration: Target cells and effects of erythropoietin and interleukin-3. *Blood* 1989; 73: 1993-8.

27-Mason-Garcia M, Weill CL, Beckman BS. Rapid activation by erythropoietin of protein kinase C in nuclei of erythroid progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 490-7.