

Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda renal eritropoietinin nitrik oksid düzeylerine etkisi

Mehmet Akdoğan, Mehmet Tuğrul Sezer, Emin Şavik, Duygu Kumbul Doğuç

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Sakarya.
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD, Nefroloji BD, Isparta.
Şanlıurfa Çocuk Hastalıkları Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, Şanlıurfa.
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Isparta.

Özet

Nitrik oksid (NO) kan basıncının düzenlenmesinde önemli katkıları olan güçlü bir vazoaaktif maddedir. Kronik böbrek yetmezliği (KBY) nedeniyle hemodiyaliz (HD) uygulanan hastalarda en sık görülen komplikasyonlardan birisi HD sırasında meydana gelen hipotansiyondur. Bu hastalarda endojen NO üretiminin arttığı veya azaldığı yönündeki bilgiler tam olarak açıklanamamıştır. Ayrıca KBY, böbrek eritropoietin (EPO) üretimini azaltarak anemiye neden olur. EPO, KBY anemisinin tedavisinde kullanılmaktadır. EPO'nun mekanizması tam bilinmemekle birlikte kan basıncını yükselttiği bilinmektedir. Bu nedenle çalışmamızda EPO alan ve almayan KBY hasta gruplarında, EPO'nun NO düzeylerinde meydana getirdiği değişikliklerin araştırılması planlanmıştır. Çalışmayı Isparta Devlet Hastanesi HD ünitesinde HD uygulanan yaş ortalaması 45±16 olan 17 KBY hastası oluşturmuştur. Olgulardan HD başlangıcı 0. Dakika (dk.), 60. dk. 120. dk. ve HD sonunda (240. dk), sistolik kan basınçları ve serum NO düzeyleri ölçülmüştür. HD uygulanan ve EPO alan KBY hastalarında, EPO almayanlara göre HD'in 180. dk. ve 240. dk'sında serum NO düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş saptanmıştır (p<0.05). Sonuç olarak HD sırasında EPO'nun hipertansiyona neden olduğu azalmış olan serum NO düzeylerinin katkıda bulunabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kan Basıncı, Hemodiyaliz, Nitrik Oksid

Abstract

The effect of renal erythropoietin on nitric oxide levels in patients with chronic renal failure

Nitric oxide (NO) is a strong vasoactive substance which contributes to the regulation of blood pressure. One of the most frequently complications seen during haemodialysis (HD) in patients with chronic renal failure (CRF) is hypertension. It was could not explain clearly that endogen production of NO increases or decreases in this patients. Moreover, CRF causes anemia via decreasing production of renal erythropoietin (EPO). EPO is used for the treatment of anemia caused by CRF. Although the mechanism of effect of EPO is not known, it is known that it increase blood pressure. For this reason, it is planned in this study that the changes in NO levels caused by EPO in patients with CRF taking and not taking EPO. Patients with CRF (n= 17) and mean age was 45±16 year to whom HD was applied in HD unit of Isparta Government Hospital were included in this study. Systolic blood pressure and serum NO levels were determined at the beginning 0th minute (min.), 60th min., 120th min., 180th min. and at the end of the HD (240th min.). NO levels were determined by using spectrofotometric method. Statistically, significant decrease in NO levels was found at 180th and 240th min. of HD in EPO taking patients according to not taking patients with CRF(p<0.05). In conclusion; It is suggested that hypertension caused by EPO during HD may results from decreased serum NO levels.

Key Words: Blood Pressure, Hemodialysis, Nitric Oxide

Yazışma Adresi: Dr. Mehmet Akdoğan
Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, 54055 - Sakarya, Türkiye.
Tel: +090 264 255 22 30 Fax: +090 264 255 21 02
E-mail: makdogan2009@gmail.com

Müracaat tarihi: 24.06.2011
Kabul tarihi: 04.05.2012

Giriş

Nitrik oksit (NO) yarı ömrü çok kısa olan bir serbest radikal olup, L-arginin metabolizmasının bir ürünü olarak ortaya çıkar. Reaksiyon NO sentaz tarafından katalizlenir. NO, ilk kez endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak tanımlanmıştır (1-4). Günümüzde bir çok memeli hücre ve dokularının fonksiyonlarını düzenlediği anlaşılmıştır (5). Kronik böbrek yetmezliği (KBY) nedeniyle hemodiyaliz (HD) uygulanan hastalarda en sık görülen komplikasyonlardan birisi HD sırasında meydana gelen hipotansiyondur (6). Bu hastalarda endojen NO üretiminin arttığı veya azaldığı yönündeki bilgiler tam olarak açıklanamamıştır (7). Ayrıca KBY, böbrek eritropoietin (EPO) üretimini azaltarak anemiye neden olmaktadır. Rekombinat DNA teknolojisi ile üretilen EPO, KBY anemisinin tedavisinde kullanılmaktadır. EPO'nun mekanizmasının tam bilinmemekle birlikte kan basıncını yükselttiği bilinmektedir (8-10). HD hastalarının HD sırasında NO konsantrasyonları ile HD sırasında meydana gelen tansiyon değişiklikleri arasında negatif bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir (8). NO'nun in vivo koşullarda ölçülemeyecek kadar kısa ömürlü bir molekül olmasına rağmen, oksidasyon ürünleri ölçüm için stabil moleküllerdir. Bu ürünler serumdaki nitrit ve nitratlardır (9-10). Biz de bu çalışmamızda EPO alan ve almayan KBY hasta gruplarında, EPO'nun NO düzeylerinde meydana getirdiği değişikliklerin araştırılması planlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Isparta Devlet Hastanesi Hemodiyaliz Ünitesinde KBY nedeniyle HD uygulanan 19 hasta dâhil edilmiştir. Her seansı 3-3,5 saat olan, haftada 2-3 kez HD seansına giren, bir ay süreyle EPO alan, yaş ortalaması 45±16.21 yıl olan, 2'si kadın, 12 KBY hastası çalışmaya alınmıştır. Ayrıca haftada 2-3 kez HD 'e giren, bir ay süreyle EPO almayan KBY hastasının yaş ortalaması 45.14±7.69 yıl olan, 3 'ü kadın, 7 hasta alınmıştır. Recombinant human erythropoietin 2000- 4000 İÜ, 50 İÜ/kg, subkutan olarak 2-3 kez/hafta uygulanmıştır.

Tüm hastalarda bikarbonat diyalizat, diyalizör olarak sellülosetetik membran (HEMOPHAN) kullanılmıştır. HD sırasında standart heparin (diyaliz başına 2000 Ü ardından 1000 Ü/saat şeklinde) Nexparin 5000 İÜ/ml uygulanmıştır.

Çalışmanın yapılacağı gün hastaların tuz, kafein içeren içecekler, sigara kullanmamaları, buğday, sarımsak, yeşil sebzeler, sığır eti yememeleri tenbih edildi ve en son öğünden en az 12 saat sonra çalışmaya

başlanılmıştır. Kan örnekleri ve tansiyon ölçümleri diyalize girişte, 60, 120, 240. Dakikalarda alınmıştır. Hemen 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edilip serumları ayrılmıştır. Hemodiyalize giriş ve çıkışta BUN ile kreatinin (KRE) çalışılmıştır. Diğer tüm numunelerden NO ölçmek amacıyla NO oksidasyon ürünlerinden Nitrit + Nitrat düzeylerine bakılmıştır. Serum NO düzeyleri Boehringer Mannheim (kat. No. 1756281) marka kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre numunede bulunan nitratın, nitrat redüktaz enziminin varlığında indirgenmiş NADPH + H⁺ yoluyla nitrite indirgenmesi ve oluşan nitrit, sufanilamid ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorür ile kırmızı menekşe diazo rengini oluşturması, 550 nm'de absorbansının okunarak NO miktarı nitrit + nitrat M/L olarak saptanmıştır.

Serum kreatinin konsantrasyonu Jaffe metodu, kan üre azotu (BUN) ise ezimatik yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Veriler, aritmetik ortalama ± SD şeklinde sunulmuştur. Parametrik veriler Mann- Whitney U ve Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testleri ile Friedman eşleştirilmiş çok örnek testleri ile karşılaştırılmıştır. Anlamlılık düzeyi, p0.05 olarak kabul edilmiştir.

Sonuçlar

EPO alan HD hastalarında EPO almayan HD hastalarına göre 180. dakika ve 240. dakikadaki NO düzeylerinde anlamlı bir düşüş tespit edildi. (p<0.05). Ayrıca EPO almayan hastaların kan basınçları, EPO alan hastalara göre azalmıştır. Ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Tartışma

Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda en sık karşılaşılan akut komplikasyonlardan birisi hipotansiyondur (6). İntradiyalitik hipotansiyon (İDH) son dönem böbrek yetmezliği olup diyalize giren vakalarda diyaliz sırasında % 25-50 arasında görülür ve önemli bir morbidite nedenidir (25-27). Ayrıca kronik böbrek yetmezliği olan hastaların değişmez bulgusu anemidir. KBY nde aneminin ortaya çıkmasını sağlayan en önemli defekt sağlıklı bireylerin vücutlarında % 90 oranı ile böbreklerden üretimi yapılan EPO nun böbrek hasarı nedeni ile üretiminin yapılamamasıdır. O nedenle böbrek hastalığının başlangıcında dikkatten kaçabilen anemi, üremi geliştikçe belirgin hale gelir. Anemi ciddi bir problem haline geldiğinde ise hastanın diyalize alınma zamanı gelmiştir (28,29). Anemisi olan hastalarda anemiyi düzeltmek için intravenöz veya subkutan olarak EPO

tedavileri yapılmaktadır. Uzun süreli EPO tedavisinin arterial kan basıncında normale göre belirgin yükselmeye yol açtığı görülmüş (24) olmasına rağmen EPO bağımlı hipertansiyonun mekanizması tam anlaşılammıştır. Bu hastalarda karşılaşılan aneminin tedavisinde kullanılan EPO'in en önemli yan etkisi ise hipertansiyondur. EPO kullanımına bağlı hipertansiyon gelişmesinin mekanizmaları arasında; hematokritteki yükselme sonucu kan viskozitesinin artması, bundan dolayı vasküler direnç artışı, hipoksik vazodilatasyonun kaybı, NO' i hemoglobinin bağlamaması, volüm yükselmesi, artmış endotelin üretimi, doku renin-anjiyotensin aktivitelerindeki artış ve EPO'nun direkt vazominör etkisi sayılabilir (11-20).

Biz kronik HD hastalarındaki EPO kullanan ve kullanmayan hastalarımızın NO metabolitlerinin ve kan basıncı (kb) düzeyleri açısından karşılaştırmak istedik. Deneysel hayvan çalışmalarında NO metabolitlerinden NO oksidasyon ürünleri olan Nitrit ve Nitratın idrardaki düzeyleri ölçülmüştür (21). Ancak hastalarımızda olduğu gibi oligoüri durumunda serumdaki düzeyleri de değerlendirilebilir. Çalışmamızda EPO kullanılan hastalarda EPO kullanmayanlara göre NO metabolitleri düzeyinin daha düşük olduğu saptandı (p0.05). Bu bulgu ile EPO 'un NO üzerindeki etkisinin akut değil daha uzun sürede ortaya çıktığını gösterebiliriz. EPO tedavisini takip eden artmış hemoglobin düzeyinin, NO i artmış bağlama ve inaktivasyonu ile HT'nin gelişimine katkıda bulunabilir (17). Buna zıt olarak ta NO aktivitesinin EPO tedavisi alınması sonucunda arttığı da güncel çalışmalarda gösterilmiştir (22). Ayrıca NO sisteminde EPO verilmesinin etkileri CRF de farklı olabilir. CRF de NO metabolizması tartışmalı bir konu olmuştur. Sonuç itibari ile NO sisteminin artmış veya azalmış aktivitesi ileri sürülmektedir (30-32). Üremik hastalarda de novo HT' un gelişimi veya önceden var olan HT' un şiddetlenmesi klinikte EPO' nun ilk kullanımından hemen sonra tanımlanmıştır (33,34). Farklı sonuçlar, NO'in çok labil bir molekül olmasından ya da metabolik farklılıklarından kaynaklanabilir. Öte yandan çalışmamızda, iki grup arasında sistolik ve diastolik kan basınçları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Ancak 1. Grupta bazal kb düzeyi 180. ve 240. dk'lardaki diastolik kan basıncından daha düşüktür (p0.05). Bilindiği kadarı ile EPO'in kan basıncı üzerindeki etkisi de akut değildir. Çoğu hemodiyaliz hastasında ortaya çıkan hipertansiyonun oluş sebeplerinden biri olan volüm yükü yapılacak olan ultrafiltrasyonla

düzelebilmektedir. Volüm yükünün azaltılması ile hastaların sadece %5-10'unda hipertansiyon dirençli olarak kalabilmektedir (35). Çalışmamızda her iki grup ultrafiltrasyon (UF) miktarı açısından karşılaştırılmamış olmakla birlikte hastaların kan basıncı düzeylerine göre UF'a müdahale edilmesi kan basıncı farklılığı olmamasını açıklayabilir. Bu sonuçlar Altın-tepe ve ark. larının kronik hemodiyaliz programına devam eden 57 hasta üzerinde yapmış oldukları çalışmada sıkı ultrafiltrasyon uygulaması ile volüm kontrolü sağlanan hastaların çoğunda kan basıncının kontrol altına alındığı tespitine de uymaktadır (36). Öte yandan daha önce de belirtildiği gibi akılda tutulması gerekir ki EPO'in kan basıncı üzerindeki etkisini sağlayan birçok değişik mekanizma bulunmaktadır.

Tablo 1. Hemodiyaliz esnasında sistolik ve diastolik kan basınçlarının kayıtları

	Gruplar	Grup I	Grup II
Sistolik Kan Basınçları (mmHg)	0. dk	133±21.3	117±17.9
	60. dk	138±20.3	120±15.2
	120. dk	137±17.1	121.4±16.7
	180. dk	134±18.3	112.8±17
Diastolik Kan Basınçları (mmHg)	240. dk	138±19.9	118.5±19.5
	0. dk	76±6.5	74.2±5.3
	60. dk	80±4.2	71.4±8.9
	120. dk	80.8±13.1	70±8.1
	180. dk	83.3±14.9	71.4±8.9
	240. dk	83±12.3	72.8±7.5

Tablo 2. Hemodiyaliz esnasında iki grubun serum nitrit + nitrat (M/L) düzeyleri

Grup	Grup I	Grup II
0. dk	29.2±5.4*	36.7±4.4
60. dk	27.2±4.8	33.3±6.3
120. dk	28.4±5.7	32.5±7.4
180. dk	30.8±4.4*	39.1±8.6
240. dk	25.2±4.6**	36.9±5.6

*:p<0.05, **:p<0.001

Sonuç olarak çalışmamızda EPO kullanan hastalarda NO metabolit düzeyleri, kullanmayanlara göre daha düşük bulunmuştur. HD hastalarında EPO ve kan basıncı ilişkisinde NO düzeylerindeki değişiklik tek neden olmasa bile kısmen sorumlu olabilir. Bu konuda daha geniş hasta grubunda çalışma yapılmasının yararlı olacağına inanmaktayız.

Kaynaklar

1. Furchgott, RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373–376.
2. Feelisch, M, te Poel M, Zamora R, Deussen A, Moncada S. Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature* 1994;368(6466):62–65.
3. Palmer, RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;158:348-352.
4. Bredt, DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:682-685.
5. Moncada, S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991;21(4):361–374.
6. Kim, KE, Neff M, Cohen B, Somerstein M, Chinitz J, Onesti G et al. Blood volume changes and hypotension during hemodialysis. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1970; 16:508-514.
7. Rysz, J, Luciak M, Kedziora J, Blaszczyk J, Sibinska E. Nitric oxide release in the peripheral blood during hemodialysis. *Kidney Int* 1997;51:294–300.
8. Yokokawa, K, Mankus R, Saklayen MG, Kohno M, Yasunari K, Minami M et al. Increased Nitric Oxide Production in Patients with Hypotension during Hemodialysis *Annals of Internal Medicine* 1995;123(1):35-37
9. Shultz, PJ, Tolins JP. Adaptation to Increased Dietary Salt Intake in the Rat Role of Endogenous Nitric Oxide. *The Journal of Clinical Investigation* 1993;91:642-650.
10. Marletta MA, Yoon PS, Lyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988;27: 8706-8711.
11. Abraham PA, Macres MG. Blood pressure in hemodialysis patients during amelioration of anemia with erythropoietin. *J Am Soc Nephrol* 1991;2:927–936.
12. Buckner FS, Eschbach JW, Haley NR, Davidson RC, Adamson JW. Hypertension following erythropoietin therapy in anemic hemodialysis patients. *Am J Hypertens* 1990;3:947–955.
13. Raine AEG, Roger SD. Effects of erythropoietin on BP. *Am J Kidney Dis* 1991;18:76–83.
14. Raine, AEG. Hypertension, blood viscosity and cardiovascular morbidity in renal failure: implications of erythropoietin therapy. *Lancet* 1988;1:97–99.
15. Steffen HM, Brunner R, Muller R, Dengenhardt S, Pollok M, Lang R et al. Peripheral hemodynamics, blood viscosity, and the renin-angiotensin system in hemodialysis patients under therapy with recombinant human erythropoietin. *Contrib Nephrol* 1989;76:292–298.
16. Neff MS, Kim KE, Persoff M, Onesti G, Swartz C. Hemodynamics of uremic anemia. *Circulation* 1971;43:876–883.
17. Martin J, Moncada S. Blood pressure, erythropoietin and nitric oxide. *Lancet* 1988;1:644. Letter.
18. Carlini R, Obialo CI, Rothstein M. Intravenous erythropoietin (rHuEPO) administration increases plasma endothelin and blood pressure in hemodialysis patients. *Am J Hypertens* 1993;6:103–107.
19. Eggena, P, Willsey P, Jamgotchian N, Truckenbrod L, Hu MS, Barrett JD et al. Influence of recombinant human erythropoietin on blood pressure and renin-angiotensin systems. *Am J Physiol* 1991;261:E642–E646.
20. Heidenreich, S, Rahn KH, Zidek W. Direct vasopressor effect of recombinant human erythropoietin on renal resistance vessels. *Kidney Int* 1999;39:259 –265.
21. Baylis, C, Vallance P. Measurement of nitrite, and nitrate (NO_x) levels in plasma and urine; what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1998;7:1–4.
22. Muntzel, M, Hannedouche T, Lacour B, Druke T. Effect of erythropoietin on hematocrit and blood pressure in normotensive and hypertensive rats. *J Am Soc Nephrol* 1992;3: 182–187.
23. Wilcox, CS, Deng X, Doll AH, Snellen H, Welch WJ. Nitric oxide mediates renal vasodilation during erythropoietin-induced polycythemia. *Kidney Int* 1993;44:430–435.
24. Vaziri, ND, Zhou M, Smith J, Oveisi F, Baldwin K, Purdy RD. In vivo and in vitro pressor effects of erythropoietin in rats. *Am J Physiol* 1995;269: F838–F845.
25. Kitamura M., Saito A.: Dialysis hypotension: a review of recent studies of causative factors; *Nephrology* 2001;6(3):109-112
26. Schreiber M.J. Clinical dilemmas in dialysis: Managing the hypotensive patient setting the

- stage; *Am J Kidney Dis* 2001;38(4),4:1-10.
27. Perazella MA. Pharmacologic options available to treat symptomatic intradialytic hypotension; *Am J Kidney Dis* 2001;38(4),4:26-36.
28. Eschbach J.W. The Anemia of Chronic Renal Failure: Pathophysiology and the Effects of Recombinant Erythropoietin *Kidney Int* 1989;35:134-148.
29. Faulds D., Sorkin E.M; r-HuEPO (Recombinant Human Erythropoietin Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic properties and Therapeutic Potential in Anemia and the Stimulation of Erythropoiesis *Drugs* 1989;6:863-899.
30. Aiello S, Noris M, Todeschini M, Zappella S, Foglieni C, Benigni A et al. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney Int* 1997;52:171-181.
31. Vaziri ND, Ni Z, Wang XQ, Oveisi F, Zhou XJ. Down-regulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH. *Am J Physiol* 1998;274(Renal Physiol.):642- 649.
32. MacAllister RJ, Whitley GS, Vallance P. Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int* 1994;45:737-742.
33. Casati S, Passerini P, Campise MR et al. Benefits and risks of protracted treatment with human recombinant erythropoietin in patients having hemodialysis. *Br Med J* 1987; 295:1017-1020.
34. Eschbach JW, Egrie JC, Downing MR, Browne JK, Adamson JW. Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin: results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl Med J* 1987;316:73-78.
35. Blumberg A, Nelp WD, Hegstrom RM, Scribner BH: Extracellular volume in patients with chronic renal disease treated for hypertension by sodium restriction. *Lancet* 1967;2:69-73.
36. Altıntepe L, Tonbul HZ, Mil S, Türk S, Yeksan M. Hemodializ Hastalarında Hipertansiyon Sıklığı ve Volüm Kontrolünün Önemi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi /Official Journal of the Turkish Society of Nephrology* 2002;11(1):32-35