

Bir Grup Kronik Böbrek Yetmezliği Hastasında Hemodiyalizin C, E ve A Vitamini Düzeyleri Üzerine Olan Etkisi

[The Effect of Hemodialysis on the Levels of Vitamin C, E and A in a Group of Chronic Renal Failure Patients]

Fatma Meriç Yılmaz⁽¹⁾

Nermin Çelebi⁽¹⁾

Murat Duranay⁽²⁾

Hınc Yılmaz⁽²⁾

Nuran Kazan⁽¹⁾

Doğan Yücel⁽¹⁾

(1) S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, Cebeçi-Ankara

(2) S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Diyaliz Bölümü, Cebeçi-Ankara

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı, Cebeçi-Ankara
Tel: +90 312 363 33 30/5505
Faks: +90 312 362 18 57
E-Mail: fatmamericyilmaz@hotmail.com

Kayıt tarihi 7 Mayıs 2003; kabul tarihi 12 Eylül 2003
[Received 7 May 2003; accepted 12 Sept. 2003]

ÖZET

Çalışmamızda, S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Diyaliz Bölümünde haftada üç kere düzenli olarak klasik membranlar kullanılarak diyalize alınan ve B12 vitamini ve folik asit dışında herhangi bir vitamin desteği almayan 21 hastanın giriş ve çıkış kanlarında ve bilinen herhangi bir hastalığı olmayan 20 normal bireyde (kontrol grubu) C, E ve A vitamini düzeyleri ile ürik asit, total bilirubin ve albumin düzeyleri karşılaştırıldı. Hasta grubu (6 K, 15 E) yaş ortalaması 42.2 ±13.7 idi. Kontrol grubu (6 K, 15 E) yaş ortalaması ise 40.7±18.57 idi.

Sonuçlar Student t testi ile karşılaştırıldığında C vitamini düzeyi açısından giriş değerleri ile kontroller arasında anlamlı fark bulunmadığı (p>0.05), çıkış değerlerinin kontrol grubundan ve giriş değerlerinden anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi (p<0.001, p<0.001). E vitamini düzeyi açısından giriş değerleriyle kontroller arasında anlamlı fark bulunmadığı (p>0.05), çıkış değerlerinin kontrol grubundan ve giriş değerlerinden anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi (p<0.001, p<0.001). A vitamini düzeyleri giriş ve çıkış kanları arasında anlamlı farklılık göstermedi (p>0.05); giriş ve çıkış değerleri kontrol grubundan anlamlı derecede yüksekti (p<0.001, p<0.001).

Sonuç olarak, suda çözünen antioksidanların diyaliz süreci boyunca membranlardan belirgin olarak kaybedildikleri, oksidan ajanların üretiminin artması ve rejenerasyonun C vitamini kaybına bağlı olarak azalması nedenleri ile diyaliz boyunca E vitamini düzeyinin azaldığı, A vitamini düzeyinin ise değişmediği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Hemodiyaliz, C vitamini, A vitamini, E vitamini, oksidatif stres

ABSTRACT

Twenty-one patients (15 male, 6 female, mean age 42.2±13.7) in the chronic hemodialysis program of Ankara Education and Research Hospital Dialysis Unit were included the study. All of the patients were dialysed three times a week using classical membranes and neither of them received vitamin supplement except folic acid and vitamin B12. We studied vitamin C, E, A and total bilirubin, albumin, uric acid levels before and after dialysis and compared with those from twenty apparently healthy control subjects (14 male, 6 female, mean age 40.7±18.57).

The results were analyzed with Student's t test. Vitamin C levels did not show any significant difference between the predialysis group and control group (p>0.05). It was significantly reduced in the postdialysis group when compared with predialysis and control samples (p<0.001, p<0.001). Vitamin E levels were significantly reduced in the postdialysis group when compared with predialysis and control groups (p<0.001, p<0.001); there was no significant difference between control and predialysis group (p>0.05). Vitamin A levels were higher than control group in dialysis groups (p<0.001, p<0.001); there was no significant difference between predialysis and post dialysis groups (p>0.05).

As a result, the significant difference of vitamin C values between pre and postdialysis samples is thought to be related with the loss of water soluble antioxidants through the membranes during the dialysis session, and the decreased vitamin E level may be related to the production of oxidant agents and diminished regeneration because of the decreased vitamin C level.

Key Words: Hemodialysis, vitamin C, vitamin A, vitamin E, oxidative stress

GİRİŞ VE AMAÇ

Hemodiyaliz hastalarında oksidan ajanların üretimi ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki denge sızlığın önemli bir morbidite kaynağı olduğu bilinmektedir (1, 2). Artmış oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikallerin LDL'nin oksidasyonunu arttırdığı, amiloid oluşumunu indüklediği, düzenleyici proteinlerin hasarına yol açtığı ve eritropoetin gen ekspresyonunu baskıladığı bilinmektedir. A, E ve C vitaminleri antioksidan özellikleri olan vitaminlerdir ve diyaliz hastalarında özellikle suda çözünen bir molekül olan C vitamininin diyaliz boyunca membranlardan kaybedildiği yolunda yayınlar mevcuttur (1). Son yıllarda bu sebeple diyaliz hastalarının C ve E vitamini preparatları ile desteklenmesi ve hemolipodiyaliz gibi yaklaşımlar gündeme gelmiştir.

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hemodiyaliz Ünitesinde düzenli hemodiyaliz protokolündeki hastalar, klasik tek kullanımlık membranlar kullanılarak haftada üç kere diyalize alınmaktadır. Hastalara B12 vitamini ve folik asit dışında vitamin takviyesi yapılmamakla birlikte diyetlerinde meyve-sebze ağırlıklı beslenmeleri önerilmektedir. Biz çalışmamızda düzenli olarak uzun süreli (>6 ay) hemodiyalize giren hastalarda, antioksidan özelliği olan vitaminlerin (A, E ve C vitaminleri) plazma düzeylerinde sağlıklı kontrollere göre ne gibi değişiklikler olduğunu, bu parametrelerin tek bir diyaliz seansından ne şekilde etkilendiğini ve böylece hastalara diyet dışında vitamin takviyesi gerekip gerekmediğini görmeyi amaçladık. Hastalara yapılan yaklaşımların, özellikle verilen diyetin standardizasyonu açısından yalnızca düzenli olarak aynı bölümde diyalize alınan hastaları çalışmaya dahil ettik. Ayrıca rutin olarak ölçülmekte olan plazma antioksidanları -total bilirubin, albumin ve ürik asit- düzeylerini de ölçerek diyaliz öncesi ve sonrası değerleri kontrol grubununkilerle karşılaştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Diyaliz Bölümünde haftada üç kere düzenli olarak klasik modifiye edilmemiş membranlar kullanılarak diyalize alınan ve B12 vitamini ve folik asit dışında herhangi bir vitamin takviyesi almayan 21 hastanın giriş ve çıkış kanlarında ve bilinen herhangi bir hastalığı olmayan 20 kontrolde C, A, E vitaminleri ile ürik asit, total bilirubin ve albumin düzeyleri karşılaştırıldı. Hasta grubumuz 6 kadın, 15 erkek hastadan oluşuyordu, yaş ortalaması 42.2±13.7 idi. Altı kadın 14 erkekten oluşan kontrol grubu, yaş ortalaması 40.7±18.57 olan, bilinen bir hastalığı bulunmayan ve sigara kullanmayan bireylerden oluşuyordu. Çalışma için yerel etik kurul onayı alındı ve çalışmaya katılanlar sözel olarak bilgilendirildi.

Diyaliz öncesi ve sonrasında alınan hasta kan örnekleri pıhtılaşma için yarım saat bekletildi, 1500 g'de 5 dakika santrifüj edildi, serumları ayrıldı; ayrılan serumlar + 4 °C 'de bekletilerek en geç iki gün içinde toplu olarak analiz edildi.

Serum C vitamini ölçümü, 2,4-dinitrofenilhidrazin kullanılarak yapıldı. Yöntemde askorbik asit, ortamda

bakır varlığında dehidroaskorbik asit ve diketogulonik asit oluşturacak şekilde okside edilir. Bu ürünler ise 2,4-dinitrofenilhidrazin ile muamele edilerek bis-2,4-dinitrofenilhidrazon oluşumu sağlanır, bu maddenin sülfirik asit varlığında yeniden düzenlenmesi sonucu oluşan ürünün 520 nm.'de verdiği absorpsiyon okunur. Askorbik asit dışındaki kromojenlerin interferanslarından etkilenmeyi önlemek için reaksiyon, tiyüüre varlığında gerçekleştirilir. Çalışmada kalibratör olarak 2.5, 5, 10 ve 20 mg/L konsantrasyonlarda, deiyonize su içinde hazırlanan askorbik asit çözeltileri kullanıldı (3). Yöntemin güvenilirliğini belirlemek için iki farklı düzeyde hazırlanan örnek havuzunun yirmibirer kere çalışılmasıyla çalışma içi tekrarlanabilirlik değerlendirildi.

Serum A ve E vitamini düzeyleri HPLC yöntemiyle, Agilent 1100 cihazında silikondioksit kolon ve Chromsystem kitleri kullanılarak analiz edildi. Pompa hızı 1.5 mL/dk, basınç 55 (±10) Barr idi. Bir serum havuzu hazırlanarak aynı örneğin ardarda 10 defa çalışılmasıyla ölçümlerin çalışma içi tekrarlanabilirliği saptandı.

Ürik asit analizi Bayer Advia 1650 cihazında Bayer kiti ile (Bayer Diagnostics; Trinder yöntemi, ürikaz/peroksidaz), total bilirubin ve albumin analizleri Beckman LX20 cihazında, cihazın orijinal kitleriyle Diazo ve Bromcresol Purple yöntemleri kullanılarak yapıldı.

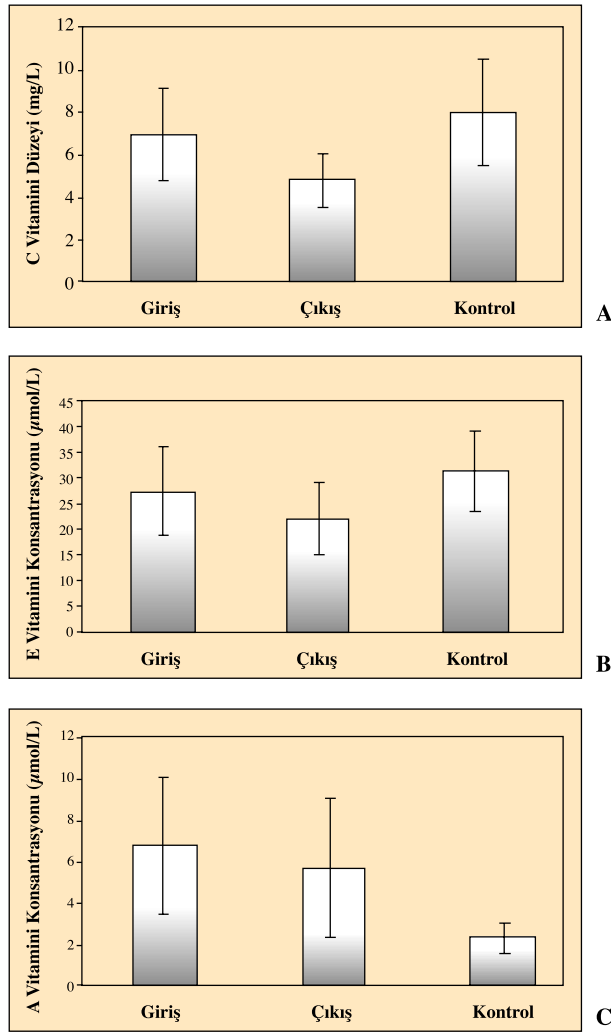
İstatistiksel analiz, "SPSS for Windows version 10.0" paket istatistik programı ile yapıldı. Gruplar arası farkın önemi Student t testi ile analiz edildi ve ortalamalar arasındaki fark p< 0.05 ise anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hasta grubunda giriş kanlarında ortalama C vitamini düzeyi 6.96 ± 2.19 mg/L, çıkış kanlarında 4.85 ± 1.25 mg/L, kontrol grubunda ise 8.04 ± 2.49 mg/L idi (şekil 1A). Sonuçlar Student t testi ile karşılaştırıldığında vitamin C düzeyi açısından giriş değerleri ile kontroller arasında anlamlı fark bulunmadığı (p>0.05), çıkış değerlerinin kontrol grubundan ve giriş değerlerinden anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi (p<0.001, p<0.001). Yöntem için hesaplanan CV değerleri %6.89 ve %3.78 idi (sırasıyla 3.48±0.24 mg/L ve 10.04±0.38 mg/L).

E vitamini düzeyleri hasta grubu giriş kanlarında ortalama 27.5 ± 8.6 µmol/L, çıkış kanlarında 22.2 ± 6.9 µmol/L, kontrol grubunda ise 31.5 ± 8 µmol/L olarak bulundu (şekil 1B). Sonuçlar karşılaştırıldığında E vitamini düzeyi açısından giriş değerleriyle kontroller arasında anlamlı fark bulunmadığı (p>0.05), çıkış değerlerinin kontrol grubundan ve giriş değerlerinden anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi (p<0.001, p<0.001). E vitamini için 33.22±0.40 µmol/L konsantrasyonundaki serum havuzunda hesaplanan CV değeri %1.20 idi.

A vitamini düzeyleri hasta grubu giriş kanlarında 6.84 ± 3.3 µmol/L, çıkış kanlarında 5.8 ± 3.4 µmol/L, kontrol grubunda ise 2.4 ± 0.7 µmol/L olarak bulundu (şekil 1C). Sonuçlar karşılaştırıldığında A vitamini düzeyi açısından giriş ve çıkış değerlerinin kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi (p<0.001, p<0.001). A vitamini için 2.24±0.07 µmol/L konsantrasyonundaki serum havuzunda hesaplanan CV değeri %3.12 idi



Şekil 1 A. Hasta (giriş, çıkış) ve kontrol grubu ortalama C vitamini değerleri
 B. Hasta (giriş, çıkış) ve kontrol grubu ortalama E vitamini değerleri
 C. Hasta (giriş, çıkış) ve kontrol grubu ortalama A vitamini değerleri

Hasta grubunda giriş kanlarında ortalama ürik asit düzeyi 7.57 ± 1.42 mg/dL, çıkış kanlarında 2.99 ± 0.82 mg/dL, kontrol grubunda ise 5.19 ± 1.12 mg/dL olarak bulundu. Ürik asit değerleri girişte kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek ($p < 0.001$), çıkışta ise belirgin olarak düşük bulundu ($p < 0.001$). Çıkış düzeyleri yine giriş düzeylerinden anlamlı derecede düşüktü ($p < 0.001$). Total bilirubin düzeyleri giriş kanlarında ortalama 0.62 ± 0.20 mg/dL, albumin 3.46 ± 0.36 g/dL; çıkış kanlarında total bilirubin 0.74 ± 0.23 mg/dL, albumin 3.82 ± 0.33 g/dL; kontrol grubunda total bilirubin 0.79 ± 0.36 mg/dL, albumin 3.90 ± 0.26 g/dL olarak bulundu. Total bilirubin düzeyi giriş ve çıkış kanları arasında anlamlı fark göstermezken ($p > 0.05$, $p > 0.05$) çıkış kanlarında giriş kanlarından anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$). Albumin düzeyleri açısından çıkış ve kontrol kanları arasında anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$), çıkış ve kontrol kanları arasındaki düzeyler giriş değerlerinden anlamlı derecede yüksekti ($p = 0.001$, $p < 0.001$).

TARTIŞMA

Sağlıklı bir erişkinde oksidatif stres ve antioksidan savunma mekanizmaları arasında bir denge söz konusudur. Hemodiyaliz hastalarında bu dengenin bozulmasına bağlı morbidite artışı olduğu yolunda güçlü kanıtlar olmasına karşın moleküler düzeyde bu olayı hangi komponentlerin etkilediği yolunda literatürde bir birlik yoktur (1). Hemodiyaliz sırasında kullanılan biyolojik olarak uygunsuz membranların, lipopolisakkarit ve sitokin indükleyici maddeler ile inflamatuvar hücrelerin serbest radikal ve oksidan ürünler oluşturmaya neden olabileceği belirtilmektedir (1). Bu olay dolaşımdaki albumin gibi proteinlerin proteolitik degradasyonu ve protein çapraz bağlanması ile oksidasyonuna, LDL'nin oksidasyonuna ve eritrositlerin mikrohemolizle sonuçlanan hasarına neden olabilir. Hemodiyaliz hastalarındaki oksidatif stresin suda çözünen antioksidanlar olan ürik asit ve C vitamini kaybına da bağlı olabileceği üzerinde durulmaktadır (1).

Yapılan çalışmalar, askorbatın insan kan ve plazmasındaki en etkili sıvı faz antioksidanı olduğunu göstermiştir (4). Oksidatif stres sırasında lipid hidroperoksitlerin oluşumu nedeniyle zamana bağlı olarak antioksidanların kaybı şu sırayla ortaya çıkmaktadır: askorbat (C vitamini) > protein tiyoller > ürik asit > α -tokoferol (E vitamini). Hemodiyaliz hastalarında askorbik asit düzeyleri normalin altındadır, ayrıca diyaliz sürecinde de suda çözünen antioksidanların yaygın (difüz) kaybı söz konusudur. C vitamini, E vitamininin rejenerasyonu için de gereklidir ve E vitamini/C vitamini oranındaki herhangi bir kayma, bu antioksidanlardan herhangi birinin prooksidan hale geçmesine ve serbest radikal oluşumunu artırmasına neden olabilir (1). Literatürde vitamin C'nin diyaliz süreci boyunca membranlardan kaybedildiği yolunda birçok yayın vardır (5-9). Ayrıca, düzenli olarak hemodiyalize giren hastalarda giriş kanlarında da kontrol grubuna oranla daha düşük C vitamini düzeyine rastlandığı rapor edilmektedir (1). Morena ve ark. hemodiyaliz hastalarında C vitamininin belirgin olarak kaybolduğunu ve buna paralel olarak oksidatif stresin bir göstergesi olan malondialdehitin arttığını göstermişlerdir (5).

C vitamini açısından diyaliz öncesi dönemle kontrol grubu arasında anlamlı farklılığa rastlanmamakla birlikte, diyaliz sonrası C vitamini düzeyleri diyaliz öncesi değerlerden anlamlı derecede düşük olduğundan, C vitamininin diyaliz boyunca membranlardan belirgin olarak kaybedildiği düşünüldü. Diyaliz öncesi dönemde düşüklük gözlenmemesi hastalara önerilen meyve-sebze ağırlıklı diyetle bağlandı.

E vitamininin diyaliz hastalarındaki düzeyi konusunda literatürde farklı bulgular mevcuttur. Diyaliz seansı boyunca E vitamini konsantrasyonunda anlamlı değişiklik olmadığını bildiren yayınlar yanında (9), E vitamini düzeyinin çıkış kanlarında girişten düşük bulunduğu çalışmalar da mevcuttur (10, 11). Srinivasa ve ark. tek kullanımlık ve çok kullanımlık (re-use) diyaliz membranlarının etkisini araştırmış ve ilk kez kullanılan membranlarda E vitamini düzeyinin diyaliz boyunca anlamlı derecede azaldığını, yeniden kullanımda ise bu farkın gözlenmediğini bildirmişlerdir (1). E vitamini plazmanın lipoprotein fraksiyonuyla ilişkili olduğundan, bu kaybın

diyaliz membranından kayıpla bağlantılı olduğu düşünülemez. Nitekim diyalizatta E vitamini bulunup bulunmadığını inceleyen çalışmalarda E vitamininin diyalizata geçişinin olmadığı sonucuna varılmıştır (9). Reaktif oksijen türlerinin yanısıra, peroksidasyona uğramış zar lipidleri de (örneğin yağ asitlerinin peroksi türevleri), E vitamini ile tepkimeye girerek tüketimine neden olurlar. Bu nedenle E vitamininin diyaliz boyunca azalması, reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu gösteren bir sonuç olarak düşünülebilir. Tek kullanımlık membranlarda bu azalmanın gösterilmiş olması, membranların yeniden kullanımında daha az kompleman aktivasyonu ve daha az reaktif oksijen radikal üretimi olduğunu gösteren çalışmalarla da uyumludur (12). E vitamini düzeyindeki azalmanın, ayrıca E vitamininin rejenerasyonu için gerekli olan C vitamininin düzeyindeki azalma ile ilişkili olduğu da düşünülebilir. Bizim çalışmamızda diyalize giren tüm hastalar tek kullanımlık polisintan membranlarla diyalize alınıyordu ve çıkış kanlarındaki E vitamini düzeyleri girişten anlamlı derecede düşüktü. Kontrol kanları ile giriş kanları arasında anlamlı farka rastlanmadı, bu olay literatürdeki diğer yayınlarla da uyumlu idi (9, 13).

A vitamini de E vitamini gibi yağda çözünen, daha zayıf olmakla birlikte antioksidan özelliği bulunan bir vitamindir. Kronik böbrek yetmezlikli hastalarda serum A vitamini düzeyinin yüksek bulunduğu bilinmektedir. Bu artış, azalmış A vitamini atılımı, retinolün retinoik asite dönüşümünde azalma ve retinol bağlayan protein (RBP) miktarındaki artış ile açıklanabilir (14). Bu çalışmada da giriş ve çıkış kanları arasında anlamlı farka rastlanmadı; giriş ve çıkış değerleri kontrol grubundan belirgin olarak yüksekti. Bu sonuçlar da literatürle uyumlu idi (13,15)

Antioksidanların kaybını engellemek amacıyla; E vitamini ile işlem görmüş diyaliz membranları, C vitamini infüzyonu, E vitamininin lipozomlara tutturulduğu, C vitamininin ise doğrudan diyalizata eklendiği hemolipodiyaliz gibi bir çok tedavi protokolü geliştirilmiştir (6). Eiselt ve ark. E vitamini ile işlem görmüş diyaliz membranların ve C vitamini infüzyonunun, kısa ve uzun dönemde lipid peroksidasyonuna olan etkilerini ölçerek araştırmış, kısa dönemde modifiye edilmemiş seluloz membranlarla yapılan diyaliz sonrası lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı, E vitamini ile işlem görmüş diyaliz membranlarının ve C vitamini infüzyonunun bu artışı

engellediği sonucuna ulaşmıştır (6). Uzun dönemde ise E vitamini ile işlem görmüş diyaliz membranlarının diyaliz öncesi lipid peroksidasyonu ürünlerini de azalttığı, membranın etkisinin C vitamini infüzyonu ile daha fazla artmadığı gösterilmiştir (6). Nonmodifiye membran ile yüksek doz C vitamini verilmesinin de yine lipid peroksidasyon ürünlerinin artışı engellediği görülmüş ve bu olay C vitamininin endojen E vitamini rejenerasyonunu hızlandırmasına bağlanmıştır.

Literatürde ürik asitin, diyaliz hastalarında diyaliz öncesi dönemde kontrol grubuna göre yüksek, diyaliz sonrası dönemde ise hem diyaliz öncesine, hem de kontrol grubuna oranla anlamlı derecede düşük bulunduğu bildirilmektedir (1). Bizim bu çalışmadaki bulgularımız da ürik asit düzeyleri açısından literatürle uyumlu idi. Çalışmada rutin çalışılan parametrelerden antioksidan özelliği bulunan total bilirubin ve albumin düzeylerine de bakılmış ve her iki parametre de giriş kanlarında çıkış kanlarından daha düşük bulunmuştur. Bu durum, diyaliz öncesi hastalarda var olan hemodilüsyona bağlı olduğu düşünülmüştür. Albumin seviyesi diyaliz öncesi dönemde kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuş, çıkış kanlarıyla kontrol grubu kanları arasında anlamlı farka rastlanmamıştır. Bu durum da diyaliz öncesi var olan sıvı fazlasının diyaliz işlemiyle çekilmesi ve hemodilüsyonun normale dönmesi şeklinde yorumlanmıştır.

Sonuç olarak, suda çözünen antioksidanlar diyaliz süreci boyunca membranlardan belirgin olarak kaybedilmektedirler. E vitamini ise diyaliz işlemine bağlı artış gösteren lipid peroksidasyonu nedeniyle tüketilmekte ve C vitamini eksikliği nedeniyle de rejener edilememektedir. Hastalara vitamin takviyesi yapılmamasına ve diyaliz boyunca C ve E vitaminlerinin kaybedildiğinin gösterilmesine rağmen, diyaliz öncesi dönemde her iki vitamin açısından kontrol grubuyla anlamlı farka rastlanmaması, hastaların bu kaybı diyetleriyle kompanse edebildiklerini göstermektedir. Tek kullanımlık membran kullanılması, E vitamininin de diyaliz boyunca azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle antioksidan vitaminlerin kaybının oksidatif stresi de arttırdığı göz önüne alınarak, diyaliz sırasında E ve C vitamini kaybının önlenmesine yönelik bahsedilen tedavi prensiplerinin uygulanmasının, oksidatif strese bağlı olarak oluşabilecek olası hasarları engelleyebileceği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Wratten ML, Tetta C, Ursini F, Sevanian A. (2000) Oxidant stress in hemodialysis: Prevention and treatment strategies. *Kidney Int.* 58, 126-132.
2. Dursun E, Ozben T, Suleymanlar G, Dursun B, Yakuboglu G. (2002) Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, 1009-13
3. Stanley TO, Turnbull JB, Howerde ES. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues and fluids. *Methods Enzymol.*, 3-11
4. Frei B, England L, Ames B. (1989) Ascorbate is an outstanding

antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6377-81

5. Morena M, Cristol JP, Bosc JY, Tetta C, Forret G, Leger CL, Delcourt C, Papoz L, Descomps B, Canaud B. (2002) Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 17,422-7
6. Eiselt J, Racek J, Trefil L, Opatrný K Jr. (2001) Effects of a vitamin E-modified dialysis membrane and vitamin C infusion on oxidative stress in hemodialysis patients. *Artif. Organs* 25, 430-6

7. Wang S, Eide TC, Sogn EM, Berg KJ, Sund RB. (1999) Plasma ascorbic acid in patients undergoing chronic haemodialysis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 55,527-32
8. Bohm V, Tiroke K, Schneider S, Sperschneider H, Stein G, Bitsch R. (1997) Vitamin C status of patients with chronic renal failure, dialysis patients and patients after renal transplantation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 67, 262-6
9. Hultqvist M, Hegbrant J, Nilsson-Thorell C, Lindholm T, Nilsson P, Linden T, Hultqvist-Bengtsson UN. (1997) Plasma concentrations of vitamin C, vitamin E and/or malondialdehyde as markers of oxygen free radical production during hemodialysis. *Clin. Nephrol.* 47, 37-46
10. Srinivasa Rao PV, Dakshinamurty KV, Saibaba KS, Sheela RB, Venkataramana G, Sreekrishna V, Ambekar JG, Jayaseelan L. (2001) Oxidative stress in haemodialysis: immediate changes caused by passage of blood through the dialyser. *Ann. Clin. Biochem.* 38, 401-5
11. Srinivasa Rao PV, Dakshinamurty KV, Saibaba KS, Raghavan MS, Vijayabhaskar M, Sreekrishna V, Ambekar JG, Jayaseelan L. (2001) Oxidative stress in haemodialysis-intradialytic changes. *Redox Rep.* 6, 303-9
12. Zvkowska-Szczechowska E, Moczulski D, Grzeszczak W, Gosek K, Augustyn M, Staszewicz P. (1996) The effect of haemodialysis with frequent use of cuprophane and polysulfone membranes on activation of complement in patients with chronic renal failure. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 96, 458-68
13. Zima T, Janebova M, Nemecek K, Bartova V. (1998) Retinol and alpha-tocopherol in hemodialysis patients. *Ren. Fail.* 20, 505-12
14. Vannucchi MTI, Vannucchi H, Humphreys M. (1992) Serum levels of vitamin A and retinol binding protein in chronic renal patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 62, 107-12
14. Komindr S, Thirawitayakom J, Taechangam S, Puchaiwatananon O, Songchisomboon S, Domrongkitchaiporn S. (1996) Nutritional status in chronic hemodialysis patients. *Biomed. Environ. Sci.* 9, 256-62