

Hafif Astımlı Hastalarda Serum Nitrik Oksit ve 3-Nitrotirozin Düzeyleri

LEVELS OF NITRIC OXIDE AND NITROTYROSINE IN SERUM OF PATIENTS WITH MILD ASTHMA

Mukadder ÇALIKOĞLU*, Ali ÜNLÜ**, Bahar ULUBAŞ*, Bahadır ERCAN**, Behzat ÇİMEN***, Lülüfer TAMER**, Arzu KANIK****

* Dr., Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları AD, MERSİN

** Dr., Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, MERSİN

*** Dr., Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, ANKARA

**** Dr., Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik AD, MERSİN

Özet

Hava yollarında nitrik oksit (NO) ve süperoksit anyonların reaksiyonu oldukça reaktif bir oksijen türü olan peroksinitrit oluşumu ile sonuçlanır. Oluşan peroksinitrit stabil son ürün olan 3-nitrotirozini oluşturmak üzere proteinlerdeki tirozin rezidüleri ile reaksiyona girer.

Amaç: Bu çalışmada hafif astımlı hastaların serumlarında nitratlayıcı türlerin bir markırı olan ve serumda nitrik oksitin direk bir göstergesi olarak kabul edilen nitrit, nitrat toplamı ile 3-nitrotirozin düzeylerinin artış artmadığının belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya sigara içmeyen 22 hafif astımlı hasta ile sigara içmeyen 13 sağlıklı kişi alındı. Tüm bireylerin serum nitrit, nitrat düzeyleri spektrofotometrik yöntem ve 3-nitrotirozin düzeyleri yüksek performanslı likid kromatografi ile ölçüldü.

Bulgular: Her iki grupta da serum nitrit ve nitrat değerlerinin toplamı (kontrol: 24.90 ± 3.20 mmol/L; hasta: 24.42 ± 3.37 mmol/L, $p>0.05$) ve 3-nitrotirozin (kontrol: 3.11 ± 0.97 nmol/mg protein; hasta: 6.82 ± 1.79 nmol/mg protein; $p>0.05$) değerleri benzerdi. Hasta ve kontrol grubunda hem serum nitrit+nitrat değerleri ile FEV1 ($p>0.05$, $r=-0.068$), hem de 3-nitrotirozin değerleri ile FEV1 ($p>0.05$, $r=-0.224$) arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı.

Sonuç: Çalışmamızın sonucunda hafif astımlı hastalarda serumdaki NO ve 3-nitrotirozin düzeylerinin hastalığın temel karakteri olan inflamasyonu ve oksidatif stresi belirlemede kullanışlı bir gösterge olmayacağı kanısına vardık.

Anahtar Kelimeler: Astım, Nitrik Oksit, 3-Nitrotirozin

T Klin Allerji Astım 2001, 3:126-130

Summary

The reaction of nitric oxide and superoxide anions in the airway results in the formation of peroxynitrite, a highly reactive oxidant species. Peroxynitrite reacts with tyrosine residues in proteins to form the stable product 3-nitrotyrosine.

Objective: The aim of the study was to determine whether nitrite plus nitrate and 3-nitrotyrosine, as marker of nitrating species, may be increased in serum of patients with asthma.

Methods: Non-smoker control (n:13) and non-smoker asthma patients (n:22) were participated into this study. Serum nitrite-nitrate levels were measured by spectrophotometrical method and 3-nitrotyrosine levels were detected by high performance liquid chromatography.

Results: Serum nitrite plus nitrate (control: 24.90 ± 3.20 mmol/L; patients: 24.42 ± 3.37 mmol/L, $p>0.05$) and nitrotyrosine (control: 3.11 ± 0.97 nmol/mg protein; patients: 6.82 ± 1.79 nmol/mg protein, $p>0.05$) concentrations were similar in both groups. No correlation was observed in nitrite plus nitrate and FEV1 ($p>0.05$, $r=-0.068$); 3-nitrotyrosine and FEV1 ($p>0.05$, $r=-0.224$) in patients and control groups.

Conclusion: We conclude that nitrite plus nitrate and nitrotyrosine formation in serum may not be a usefull marker of oxidative stress in mild asthma patients.

Key Words: Asthma, Nitric Oxide, 3-Nitrotyrosine

T Klin J Allergy-Asthma 2001, 3:126-130

Geliş Tarihi: 15.08.2001

Yazışma Adresi: Dr.Mukadder ÇALIKOĞLU
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
Göğüs Hastalıkları AD,
Zeytinlibahçe Caddesi 33070 MERSİN

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım gibi inflamatuvar hava yolu hastalıklarında, hava yollarında artmış oksidan yük veya azalmış antioksidan kapasite olarak ifade edilen oksidatif stresin varlığından söz edilmektedir (1-3). Astımlı hasta-

ların ekspiryum havalarında nitrik oksit (NO) düzeyinin arttığı (4,5) ve bu durumun hava yollarındaki ödem ve inflamasyona katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (5,6). Güçlü bir serbest radikal olan NO hastalar ve sağlıklılarda solunumsal fonksiyonları birçok yönden etkileyebilir. Üretilen NO ekspiryum havası ile atılabilir, vücutta nitrit ve nitrat moleküllerine metabolize edilebilir, veya peroksinitrit oluşturmak üzere süperoksit (O₂-) ile reaksiyona girer. NO'in radikal özelliği ve kısa yarı ömrü sebebiyle direk olarak saptanması zordur. Bu yüzden plazmada NO üretiminin ölçümü için en sık bu radikalın plazmadaki stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrat ölçümü kullanılmaktadır (7). NO ile O₂- arasındaki reaksiyon, oldukça yüksek reaktif bir oksijen türü olan peroksinitrit oluşumu ile sonlanır (8). Peroksinitrit tirozin rezidülerindeki hidroksil grubunun 3 pozisyonundaki uygun noktaya bir nitro grubu ekleyerek 3-nitrotirozini (3-NT) oluşturur (9). Ayrıca peroksinitrit kobaylarının hava yollarında aşırı cevaba yol açar (10), pulmoner surfaktan proteinini inhibe eder (11) ve pulmoner epitel hücrelerinde hasara yol açar (12). NO de myeloperoksidaz veya hipokloröz asit ile reaksiyona girip, 3-NT oluşumunu destekleyebilir (13). İnflamatuvar olaylarda söz konusu olan bu mekanizma sayesinde 3-NT reaktif nitrojen türlerinin (RNS) değerlendirilmesinde bir göstergesi olabilir (14,15). Çalışmamızın amacı astımlı hastaların hava yollarında inflamasyonun birer kanıtı olduğu düşünülen RNS ve NO oluşumunun serumdaki düzeylerini saptamak ve inflamasyonu yansıtıp yansıtmadıklarını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları polikliniğine başvuran 22 sigara içmeyen, hafif astımlı ve kontrol grubunu oluşturmak üzere 13 sigara içmeyen sağlıklı gönüllü alındı. Atopi, 13 adet standart aeroallerjen (D. farinei, D. Pteronyssinus, Çim polenleri, Tahıl polenleri, Ağaç polenleri, Yabani ot polenleri, Küf mantarları, Hayvan epitelleri) kullanılarak prick yöntemi ile yapılan deri testleri ile değerlendirildi (Stallergenes S.A.-Pasteur Fransa). Çalışmaya katılan tüm bireylerin eozinofil sayısını belirlemek için sabah EDTA'lı tüplere alınan venöz kan örnekleri kullanıldı. Alınan kan örneklerindeki eozinofil sayımı için lazer optik okuyucu ile çalışan

Cell Dyne 3500 (Abbott, USA) otoanalizörü kullanıldı. Astım tanısı Amerikan Toraks Topluluğu'nun kriterlerine göre koyuldu (16) ve astım şiddeti Dünya Sağlık Organizasyonu Ulusal Enstitü rehberine dayanarak belirlendi (17). Buna göre hafif astımlı hasta grubu, haftada iki veya daha az semptomu sahip, birinci saniyedeki beklenen zorlu ekspiratuvar hacim (FEV₁) değeri >%80 ve gerektiğinde b₂ agonist kullanan hastalardan oluşturuldu. Tüm hastalar çalışmaya başlamadan önce en az dört hafta boyunca herhangi bir solunum yolu enfeksiyonu geçirmemiş, stabil peryotta, lökotrien antagonisti ve kortikosteroid kullanmayan hastalardı.

Solunum Fonksiyon Testleri: Tüm bireylere Vmax 22 Sensor Medics cihazı kullanılarak solunum fonksiyon testleri yapıldı. Zorlu vital kapasite (FVC) ve FEV₁ beklenen değerlerinin % olarak sonuçları değerlendirilmeye alındı.

Nitrit ve nitrat ölçümü: Nitrit ve nitrat düzeyleri spektrofotometrik metod ile saptandı (Roche, Mannheim, Germany). Nitrat redüktaz enzimi varlığında nitratın nitrite indirgenmesine ve oluşan nitritin sulfanilamid ve N-etilendiamine dihidroklorid ile reaksiyona girerek oluşan kromojenin 550 nm'de ölçümü prensibine dayanır. NO'nun serumdaki direk göstergeleri olarak kabul edilen nitrit + nitrat değerleri ölçüldü (7).

3-Nitrotirozin ölçümü: Serum örnekleri ilk olarak 6 N HCl içinde 100°C de 24 saat inküasyon ile hidrolize edildi. Daha sonra örnekler HP 1050 DAD HPLC (high performance liquid chromatography) sistemi kullanılarak analiz edildi. Analitik kolon 5 mm por ölçülü spherisorb ODS-2 ters faz kolonu idi (4.6 x 250 mm, Alltech, USA). Sitrat-asetat tamponu izokratik şartlar altında dakikada 1ml gidecek şekilde mobil faz olarak kullanıldı. 3-NT pikleri UV detektörde 274 nm dalga boyunda ölçüldü. 3-NT pikleri retansiyon süresine göre belirlendi ve ekzojen 3-NT eklenerek piklerin büyütülmesi ile doğrulandı (18).

İstatistiksel Değerlendirme: Veriler ortalama değer ± standart hata olarak sunuldu. Değişkenlerin normal dağılımı Kolmogorov Smirnov testi kullanılarak kontrol edildi. Astımlı hastalar ve sağlıklılar arasındaki farkların değerlendirilmesi, normal şekilde dağılmayan değişkenlerin logaritmik transformasyonundan sonra, Student-t testi ile analiz

edildi. Değişkenler arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon testi kullanılarak hesaplandı. Anlamlılık $p < 0,05$ olarak tanımlandı.

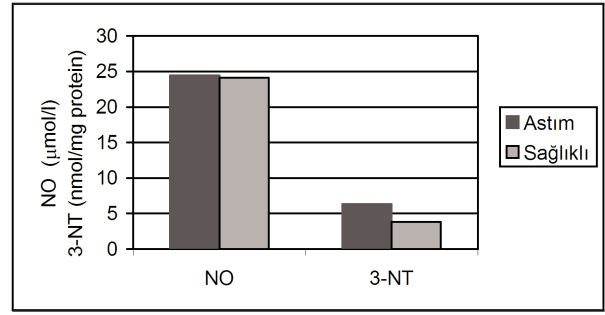
Bulgular

Çalışmaya katılan 35 kişinin özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Serumdaki ortalama NO (sağlıklılar: 24.90 ± 3.20 mmol/L; astımlılar 24.42 ± 3.37 mmol/L, $p > 0.05$) ve 3-NT (sağlıklılar: 3.11 ± 0.97 nmol/mg protein; astımlılar: 6.82 ± 1.79 nmol/mg protein; $p > 0.05$). Sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Serumdaki NO ve 3-NT düzeyleri arasında her iki grupta da korelasyon yoktu (hasta: $p > 0.05$, $r = 0.246$; kontrol: $p > 0.05$, $r = -0.228$) (Şekil 2). Hasta grubunda serum NO düzeylerinin atopik (22.15 ± 3.06 mmol/L) ve atopik olmayan (27.14 ± 6.56 mmol/L) hastalardaki değerlendirilmesinde anlamlı fark saptanmadı ($p > 0.05$). Atopik hastalardaki ortalama serum 3-NT değeri $0.62 + 0.16$ nmol/mg protein, nonatopik hastalardaki 3-NT değeri ise $0.48 + 0.15$ nmol/mg protein olup sonuçlar istatistiksel olarak anlamsızdı ($p > 0.05$). Kan eozinofil sayısı bakımından hastalarda yapılan değerlendirmede NO açısından anlamlı farklılık saptanmadı (eozinofil sayısı $> 3\%$ olan hastalarda: 19.76 ± 7.52 mmol/L; eozinofil sayısı $< 3\%$ olan hastalarda: 27.08 ± 3.14 mmol/L; $p > 0.05$). Hasta grubunda NO ile periferik eozinofili arasında bir korelasyon yoktu ($p > 0.05$, $r = -0.231$). Ayrıca hasta grubunda NO ile FEV1 arasında herhangi bir korelasyon saptanmadı ($p > 0.05$, $r = -0.068$). Benzer şekilde serum 3-NT düzeyleri ile FEV1 arasında ($p > 0.05$, $r = -0.224$) ve serum 3-NT düzeyleri ile kan eozinofilisi arasında ($p > 0.05$, $r = 0.246$) hasta gruplarında bir korelasyon saptanmadı.

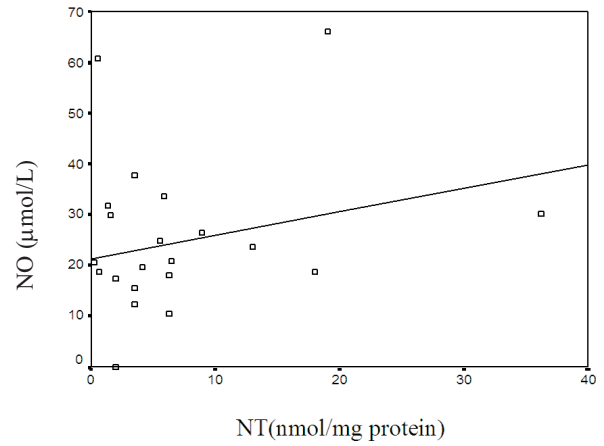
Tablo 1. Çalışmaya katılanların özellikleri

	Sağlıklılar (n=13)	Hastalar (n=22)
Yaş (yıl)	29.38 ± 1.89	40.77 ± 1.93
Cinsiyet, (E/K)	8/5	4/18
FEV1 (% beklenen)	95.84 ± 2.51	91.04 ± 2.17
FEV1/FVC(%)	82.76 ± 0.34	74.09 ± 1.37
Atopi (n)	0	12
Serum eozinofilisi (n)	0	14

Veriler ortalama değer ve ortalama hata olarak belirtilmiştir. FEV1: 1. saniyedeki zorlu ekspratuvar akım; FVC: Zorlu vital kapasite



Şekil 1. Astımlı ve sağlıklılarda 3-Nitrotirozin (3NT) ve nitrit+nitrat (NO) düzeyleri. (3NT için $p > 0.05$; NO için $p > 0.05$)



Şekil 2. Astımlı hastaların serumlarında 3-nitrotirozin (NT) ve nitrit+nitrat (NO) düzeyleri arasındaki ilişki ($p > 0.05$, $r = 0.246$)

Tartışma

Serum NO ve 3-NT düzeylerinde astımlı hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında anlamlı farklılık bulmadık. Birçok araştırmacı tarafından astımlı hastaların oral ekspiryum havasında artmış NO varlığı saptanmıştır (19-22). Bu konudaki çalışmalarda NO ve metabolitlerinin ölçümlerinde genellikle ekspiryum havası veya balgam kullanılmış olup serum ölçümlerinin yapıldığı çalışmalar sınırlıdır. 3-NT ölçümü için ise çoğunlukla ekspiryum havası ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Son çalışmalarda astımlı hastaların hava yolu epitelinde, hava yollarındaki inflamatuvar hücrelerde ve akciğer parankiminde 3-NT için güçlü bir immünoaktivitenin varlığı bildirilmektedir (23, 24). Hanazava ve ark. astımlı hastaların ekspiryum havasında 3-NT düzeyinin sağlıklılara göre yükseldiğini saptamışlardır (25). Bir başka çalışmada solunum fonksiyonları henüz

normal olan, akciğer hastalığı dışı herhangi bir sebeple ölen, hafif astımlı hastaların hava yolları ve akciğer parankiminin 3-NT ile yoğun bir şekilde boyandığı gösterilmiştir (26). Ichinose ve ark. ise RNS'nin üretiminin bir göstergesi olan 3-NT immünoreaktivitesini, astımlı hastaların eozinofillerinde ve kronik obstrüktif akciğer hastalarının (KOA) makrofaj ve nötrofillerinde göstermişlerdir (27). Onların araştırmasında astımlı ve KOA'lı hastaların indüklenmiş balgamlarındaki hücrelerin sağlıklı kişilerdekine göre belirgin derecede artmış 3-NT boyanması gösterdiği de bildirilmiştir. Fakat, bu yoğun 3-NT boyanması KOA'lı hastaların balgamlarından elde edilen hücrelerde astımlılara göre daha belirgin bulunmuştur. Buna dayanarak araştırmacılar, RNS ile artırılan oksidatif stresin özellikle KOA'lı hastaların hava yollarında daha belirgin olduğunu ileri sürmektedirler. Çalışmalarında hasta ve kontrol grupları arasında plazma 3-NT düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Biz de hafif astımlı hastalar ile sağlıklı kontrolleri serum 3-NT ve NO değerleri açısından karşılaştırdığımızda anlamlı farklılık bulmadık. Ichinose ve ark.'nın çalışmasında 3-NT immünoreaktivitesi gösteren hücrelerle hava yolu obstrüktif değişiklikleri (FEV1) arasında, KOA'lı hastalarda anlamlı negatif korelasyon saptanırken, astımlı hastalarda böyle bir ilişkiye rastlanmamıştır (27). Bu çalışmada da serum 3-NT ve NO düzeyleri ile FEV1 arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı. Astımlı hastaların indüklenmiş balgamlarındaki eozinofil sayısı ile ekspiryum havasındaki NO düzeyleri arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (28). Bizim çalışmamızda, aynı örnekler kullanılmamakla beraber, serum NO değerleri ile kan eozinofil düzeyleri arasında bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. Ayrıca serum 3-NT düzeyleri ile kan eozinofil düzeyleri arasında da bir ilişki saptanmadı. Bu bulgular serum 3-NT ve NO düzeylerinin kan eozinofil değerleri ile bağlantısının olmadığını düşündürmektedir. Benzer şekilde serum 3-NT ve NO düzeylerin atopik ve atopik olmayanlar arasında da anlamlı fark göstermediği saptandı. Oysa ki Groutz ve ark. ekshal NO düzeyleri ile atopi arasında pozitif bir ilişkinin varlığından söz etmektedirler (29).

Sonuçta, biz hafif astımlılarla sağlıklı kontroller arasında serum NO ve 3-NT düzeyleri açısından anlamlı bir fark bulmadık. RNS'nin serumda

saptanmasının, astımın temel özelliği olan inflamasyonu yansıtmadığı ve hafif astımda hastalığın monitorizasyonunda kullanılmasının uygun olmadığı kanısına vardık. Bu yöndeki çalışmaların farklı şiddetteki astımlı hastalarda ve serum, balgam, ekspiryum havası, doku gibi değişik örneklerinin karşılaştırılarak yapılmasının daha faydalı olabileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, and MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1055-60.
2. Repine JE, Bast A, Lankhorst I and the Oxidative Stress Study Group. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. State of art. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:341-57.
3. Djukanovic F, Roche WR, Wilson JW, et al. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:434-57.
4. Barnes PJ, and Kharitonov SA. Exhaled nitric oxide -a new lung function test. *Thorax* 1996; 51:233-7.
5. Türkteş H, Türkteş İ. Gelecekte Astma Tedavisi. In: İpek Türkteş, Haluk Türkteş, ed. *Astma*. Ankara: Bozkır Matbaacılık. 1998:233-47.
6. Barnes PJ. Pathophysiology of asthma. *Br J Clin Pharmacol* 1996;42:3-10.
7. Moshage H, Kok B, Huizenge JR, and Jansen PLM. Nitrite and nitrate determination in plasma: A critical evaluation. *Clin Chem* 1995;41:892-6.
8. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990; 87: 1620-4.
9. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 438-45.
10. Sadeghi-Hashjin G, Folkerts G, Henricks PA, et al. Peroxynitrite induces airway hyperresponsiveness in guinea pigs in vitro and in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1697-701.
11. Haddad IY, Ischiropoulos H, Holm BA, et al. Mechanism of peroxynitrite induced injury to pulmonary surfactants. *Am J Physiol* 1993;265: 555-64.
12. Malaton S, Hu P, Ischiropoulos H, and Beckman SC. Peroxynitrite inhibition of oxygen consumption and ion transport in alveolar type 2 pneumocytes. *Chest* 1994; 105:74-8.
13. Beckman J, Koppenol W. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:1424-37.
14. Van der Vliet A, Eiserich JP, Shigenaga KM, and Cross CE. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in the respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1-9.

15. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, et al. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998;391:393-7.
16. American Thoracic Society. Standards for diagnosis of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136: 225-44.
17. National Institutes of Health: National Heart, lung and Blood Institute. 1997. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. NIH, Washington, DC. Publication No. 97-4051.
18. Yaman H, Ünlü A, Karabıçak U, Çimen B, Balabanlı B, Erbil MK, et al. Measurement of 3-Nitrotyrosine by High Performance Liquid Chromatography. *Klin J Med Res* 2000; 18:26-30.
19. Alwing K, Weitzberg E, Lundberg JM. Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J* 1993; 6:1368-70.
20. Person MG, Zetterstrom O, Argenius V, et al. Single breath oxide measurement in asthmatic patients and smokers. *Lancet* 1994; 343:146-7.
21. Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994;343: 133-5.
22. Barnes P, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease. *Thorax* 1993;4:1034-43.
23. Saleh D, Ernst P, Lim S, et al. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. *FABES J* 1998; 12:929-37.
24. Kaminsky DA, Mitchell J, Carroll N, et al. Nitrotyrosine formation in the airways and lung parenchyma of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:747-54.
25. Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1273-6.
26. Laitinen LA, Laitinen A, Haahtela T. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:697-704.
27. Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, et al. Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:701-6.
28. Jatakanon A, Lim S, Kharitonov SA, et al. Correlation between exhaled nitric oxide, sputum eosinophils, and methacholine responsiveness in patients with mild asthma. *Thorax* 1998; 53:91-5.
29. Gratziau C, Lingos M, Dassiou M, and Roussos H. Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *Eur Respir J* 1999;14:897-901.