

ORTEOARTRİTDE NİTRİK OKSİT VE MALONDİALDEHİD DÜZEYLERİ

Erhan YILMAZ*, **Seval YILMAZ****,
Lokman KARAKURT**, **Erhan SERİN*****

ÖZET

Giriş: Osteoartritin fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, kırıkda hasarı ve enflamasyonun oluşumunda rolü olduğu bildirilen nitrik oksit ve oksijen radikallerinin sinovyal sıvı düzeylerini ölçmeyi amaçladık.

Hastalar ve Yöntem: Sinovyal sıvı örnekleri normal ve osteoartritli bireylerin dizlerinden iğne aspirasyonu ile elde edildi. Osteoartritli 15 olgunun yaş ortalaması 57 idi ve örnekler diz protezi cerrahisi sırasında alındı. Yaş ortalaması 26 olan kontrol grubuna ait örnekler ise, herhangi bir eklem içi lezyon saptanmayan, tanısal artroskopi uygulanmış 15 olgudan elde edildi. Sinovyal sıvı örneklerinde; nitrik oksit düzeyi Griess reaksiyonu ile, malondialdehid düzeyleri de Satoh yöntemiyle spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Bulgular: Osteoartritli olguların sinovyal sıvı- larındaki nitrik oksit ve malondialdehid düzeyleri, kontrol grubuna oranla belirgin derecede yüksek olarak ölçüldü ($p < 0.01$ ve $p < 0.001$).

Tartışma: Enflamatuvar sitokinlerin uyarısı ile sinovyal doku ve kırıkda oluşan metabolik olaylar sonucunda, nitrik oksit ve reaktif oksijen radikalleri açığa çıkmaktadır. Kırıkda hasarının başlamasında rol oynayan bu radikallerin baskılanması ile osteoartritin tedavisinde yeni aşamalar kaydedilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Osteoartrit, Sinovyal sıvı, Nitrik oksit, Lipid peroksidasyon, Malondialdehid.*

SUMMARY

NITRIC OXIDE AND MALONDIALDEHYDE LEVELS IN OSTEOARTHRITIS

Introduction: Nitric oxide and oxygen radicals has been considered as an important mediator in inflammatory phases and in loss of cartilage. The objective of this study was to evaluate the nitric

oxide and oxygen radical levels in the synovial fluid of osteoarthritic knee.

Patients and Method: Synovial fluid was collected during the knee arthroplasty of 15 cases with osteoarthritis (group I) and during the diagnostic knee arthroscopy of 15 cases (group II) without osteoarthritis. Mean age was 57 years in group I and 26 years in group II. Synovial fluid level of nitric oxide was measured spectrophotometrically utilizing the Griess reaction and synovial fluid level of malondialdehyde level was measured spectrophotometrically utilizing the Satoh method. The synovial fluid levels of nitric oxide and malondialdehyde of groups were compared.

Results: Synovial fluid levels of nitric oxide and malondialdehyde in group I were found higher than group II, and this difference was statistically significant ($p < 0.01$ for nitric oxide, $p < 0.001$ for malondialdehyde).

Discussion: Cytokines induce nitric oxide and reactive oxygen radicals synthesis by stimulating the synovial and chondral tissue metabolism. By inhibition of these radicals synthesis, chondral tissue damage and osteoarthritis may be prevented.

Key Words: *Osteoarthritis, Synovial fluid level, Nitric oxide, Lipid peroxidation, Malondialdehyde.*

GİRİŞ

Osteoartrit; genetik, mekanik ve biyokimyasal etkenlerin etkisi ile ileri yaşlarda oldukça sık görülen bir eklem hastalığıdır^{1,2}. İnsan eklem kırıkdağında yaşlanma ile birlikte kondrosit sayısında azalma ve matriks komponentlerinin yıkımında artmayı içeren bir dizi değişiklikler oluşur³. Kırıkdağın yaş ile ilişkili olarak oluşan dejenerasyonu osteoartritin gelişiminde majör risk etkenidir, fakat yaşlanmanın osteoartrit etiolojisindeki mekanizması henüz açıklığa kavuşmamıştır^{3,4}.

* Doç. Dr., Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Elazığ.

** Yrd. Doç. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Elazığ.

*** Yrd. Doç. Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ.

Osteoartritde eklem içindeki enflamatuar etkenlerin biyokimyasal uyarısı ile sinovyal doku, kıkırdak ve subkondral kemikte yapısal ve işlevsel değişikliklerin başlamasına yol açan bir dizi olaylar zinciri gelişmektedir^{1,2,5}. Kondrositlerle beraber sinovyal fibroblastlar ve sinovyal membrandaki makrofaj benzeri hücreler aktiflenir. Bunun sonucunda matriks metallo proteinazlar (MMP), prostoglandin- E_2 (PG E_2) ve nitrik oksit (NO) gibi katabolik etkenler açığa çıkar. Açığa çıkan NO ve PG E_2 ; matriks sentezinde azalma ve yıkımında artma, kondrosit hücre ölümü ve hastalıkla ilişkili diğer yapısal değişikliklere neden olurlar^{1,2,5-9}.

NO; moleküler oksijen, süperoksit anyonu (O_2^-), sülfhidril ve tiol grupları ile hemoglobin demirine yüksek affinite gösteren iki atomlu serbest bir radikaldır^{4,10,11}. İnflamatuar olaylarda indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olarak adlandırılan bir enzim tarafından sentezlenir. Bu enzim hem eklem içi hem de eklem dışı pek çok hücre grubu tarafından sentezlenebilmektedir. iNOS'un eklem içi kaynakları; sinovyal fibroblastlar, sinoviositler, sinovyal doku monosit/makrofajları, endotelial hücreler, kondrositler ve osteoblastlardır^{7,8,10,12-14}. Konsantrasyonuna ve hücreyel kaynağına bağlı olarak NO hem proinflamatuar hem de antiinflamatuar özellik gösterir^{4,8,10,13,15}. NO oksijen varlığında nitrit ve nitrate, diğer reaktif oksijen radikallerinin varlığında ise önce peroksinitrite ($ONOO^-$) sonra da hidroksil radikallerine (OH ve H_2O_2) dönüşür^{16,17}. Peroksinitrit, kondrositlerdeki lipid peroksidasyonunu başlatan sitotoksik bir radikaldır. Radikallerin membran lipidlerine etkisi sonucunda ise malondialdehid (MDA) adı verilen bir ürün ortaya çıkmaktadır¹⁸. Peroksinitrit ve reaktif oksijen radikalleri ile hücre dışı matriks yıkımı aktiflenmekte ve kıkırdak dejenerasyonuna yol açan oksidatif hasar ortaya çıkmaktadır¹⁹.

Çalışmamızda; genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan osteoartritde eklem içindeki enflamasyonla ilişkili olarak gelişen biyokimyasal reaksiyonların göstergeleri olan nitrit ve MDA'nın sinovyal sıvı düzeylerini belirlemek ve bu düzeylerin eklem hastalığı öyküsü olmayan sağlıklı, genç bireylerin sonuçları ile karşılaştırılması amaçlandı.

HASTALAR VE YÖNTEM

Sinovyal sıvı örnekleri osteoartrit nedeniyle diz protezi yapılan ve yaş ortalaması 57 (52-64) olan 15 olgu ile artroskopi yapılan ve yaş ortalaması 26 (21-33) olan 15 normal diz olgusundan elde edildi. Ortalama hastalık süresi 4 (3-5) yıl olan osteoartritli

olguların tanısında klinik ve radyolojik tanı araçları kullanıldı. Kontrol grubunu oluşturan hastalar ise; travma geçirmemiş, menisküs lezyonu şüphesi ile tanısız artroskopi yapılan ve menisküs lezyonu ile birlikte herhangi bir kondral ve sinovyal patolojisi olmayan hastalardan oluşuyordu.

Osteoartritli olgular ile artroskopi yapılan olgularda, cerrahiye başlamadan önce iğne aspirasyonu ile sinovyal sıvı örnekleri alındı. Sinovyal sıvı örnekleri NO ve MDA düzeylerinin saptanması için +20 °C'de bekletildi. Örnekler $ZnSO_4$ ve NaOH ile deproteinize edilerek 15.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Nitrik oksidin son stabil ürünü olan nitrit düzeylerinin saptanması amacıyla sıvı içerisindeki nitratlar nitrat redüktaz ile nitrite redüklendi ve toplam nitrit düzeyi Griess²⁰ reaksiyonuyla spektrofotometrik olarak 545 nm dalga boyunda ölçüldü. NO düzeyleri mmol/L cinsinden saptandı.

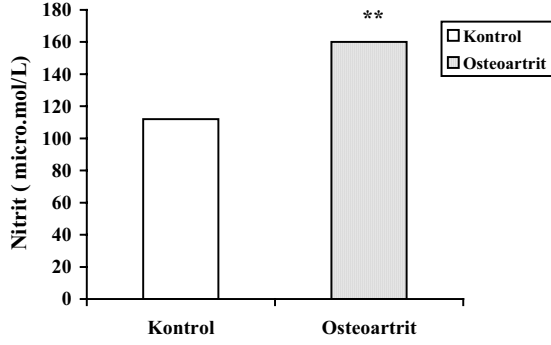
Malondialdehid (MDA) tayini Satoh²¹'un geliştirdiği spektrofotometrik bir yöntem ile yapıldı. Bu yöntem, lipid peroksidasyonunun aldehid ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asitin reaksiyonu esasına dayanmaktadır. MDA, tiobarbitürik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorpsiyonunun 532 nm'de spektrofotometrik ölçümü ile lipid peroksidasyonun derecesi ve MDA düzeyi nmol/ml cinsinden saptanmaktadır.

Osteoartritli olgular ile kontrol grubunu oluşturan olguların sinovyal sıvılarından NO ve MDA düzeylerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasında "Bağımsız örneklerde t" testi kullanıldı. NO ve MDA düzeyleri ile osteoartrit ile arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için de Spearman korelasyon testi yapıldı.

BULGULAR

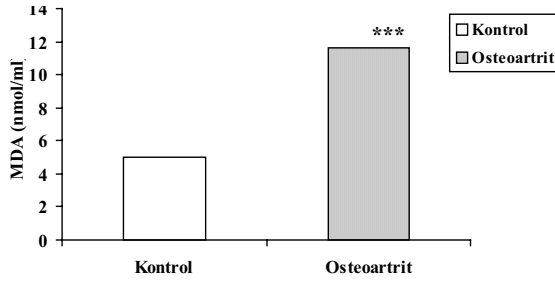
Osteoartritli olgulardan elde edilen sinovyal sıvı örneklerinde nitrik oksitin son metaboliti olan total nitrit düzeyi $160 \pm 34.15 \mu\text{mol/L}$ iken, kontrol grubunda bu düzey $112.75 \pm 24.14 \mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. Kontrol grubuna oranla osteoartritli olgulardaki sinovyal sıvı nitrit düzeyi anlamlı şekilde yüksek olarak saptandı ($p < 0.01$) (Şekil 1).

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan malondialdehid düzeyleri ise osteoartritli olgularda $11.62 \pm 3.45 \text{ nmol/ml}$ iken, kontrol grubunda $5.01 \pm 1.38 \text{ nmol/ml}$ olarak saptandı. Sinovyal sıvı MDA düzeyinin, kontrol grubuna göre osteoartritli olgularda anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$) (Şekil 2).



** P < 0.01 (t: 3,97)

Şekil 1: Sinovyal sıvı nitrit düzeyleri.



*** P < 0.001 (t: 4,812)

Şekil 2: Sinovyal sıvı malondialdehid düzeyleri.

NO ve MDA düzeyleri ile osteoartrit arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki olduğu gözlemlendi (NO için r_s : 0.600 ve $p=0.002$, MDA için r_s : 0.774 ve $p<0.001$).

TARTIŞMA

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz adı verilen ve üç izoformu bulunan bir enzim ailesi tarafından L-arginin amino asidinden sentezlenen serbest bir radikaldir. Yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS = konstitüsyonel nitrik oksit sentaz) adı verilen izoformu nöronların ve endotelial hücrelerin yapısında bulunarak dolaşımın ve sinir işlevlerinin düzenlenmesinde görev alır. Buna karşın indüklenebilir iNOS'un ise; immun regülasyon, enflamasyon ve artritlerin oluşumunda rol aldığı ve osteoartrit, osteoporoz, inflamatuvar artrit ve eklem protezlerinde aseptik gevşeme gibi eklemi ilgilendiren birçok olayda iNOS aracılığı ile oluşan nitrik oksitin sorumlu olduğu bildirilmiştir^{9,15-17,22,23}.

Düşük konsantrasyondaki nitrik oksitin kırıkta matrisi üzerine yararlı etkileri vardır^{11,16}. Ancak yüksek konsantrasyondaki nitrik oksitin kondrosit fonksiyonlarını zararlı yönde etkilediği ve

kondrositlerde; metalloproteinaz aktivasyonu ile kollojen (özellikle tip II) ve proteoglikan sentezini baskıladığı, interleukin-1 reseptörlerinin salınımında ve kondrosit proliferasyonunda azalma ile birlikte kondrosit hücre ölümüne yol açtığı bildirilmiştir^{3,11,19}. Yavaş ilerleyen ve hücre düzeyindeki kesin nedenleri tam olarak bilinmeyen osteoartritte, kırıkta yıkımı muhtemelen kondrositler tarafından üretilen bu katabolik etkenlerin serbestleşmesi ve sentezi ile ilişkilidir¹⁶.

Farrell ve ark.²⁴ osteoartrit ve romatoid artritte sinovyal sıvı nitrit konsantrasyonunun serumdan yüksek olduğunu ve sinovyum tarafından nitrik oksit üretildiğini, bu durumun da endotelial hücreler, PNL ve makrofaj gibi nitrik oksit üreten hücrelerin enflamasyon sinovyum içerisinde bulunması ile ilişkili olduğunu açıklamışlardır. Bu çalışmada; osteoartritli olguların serum nitrit düzeyi $0.213 \mu\text{mol/L}$, osteoartritli olmayan olguların serum nitrit düzeylerini ise $0.142 \mu\text{mol/L}$ olarak bulmuşlardır ($p<0.05$). Osteoartritli olguların sinovyal sıvılarından nitrit düzeyini de $0.354 \mu\text{mol/L}$ olarak saptamışlardır²⁴. Bu çalışmada araştırmacıların sinovyal sıvıdaki NO düzeyini seruma göre daha yüksek konsantrasyonda bulmaları, eklemdeki enflamasyona bağlı olarak iNOS yolunun aktiflendiğinin bir göstergesidir. Çalışmamızda eklemdeki enflamasyonu ve bu enflamasyona bağlı olarak iNOS yolunun aktiflendiğini belirlemek için serum nitrit düzeyi yerine sinovyal sıvıdaki nitrit düzeyini belirlemek amaçlandı. Bu amaçla alınan sinovyal sıvı örneklerinde nitrit düzeyinin osteoartrit grubundaki olgularda kontrol grubuna oranla anlamlı şekilde yüksek olduğunu saptandı ($p<0.01$).

Min ve ark.³ eklem hastalığı öyküsü olmayan 40 yaşının altındaki ve 60 yaşının üzerindeki iki kontrol grubunun sinovyal sıvı NO düzeyleri ile 60 yaşının üzerindeki osteoartritli olguların sinovyal sıvı NO düzeylerini karşılaştırmışlardır. 60 yaşından büyük osteoartritli bireylerdeki sinovyal sıvı NO düzeylerinin özellikle 40 yaşından küçük olan kontrol grubu olgularına oranla belirgin bir biçimde 7 kat daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Onların bu bulgularına dayanarak bizde çalışmamızda kontrol grubumuzu eklem hastalığı öyküsü olmayan genç olgulardan oluşturulması tercih edildi.

Serbest radikallerin membran lipidlerine etkisi ile oluşan lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için MDA düzeylerine bakılmaktadır. Chaturvedi ve ark.²⁵ osteoartrit, romatoid artrit ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin serum ve sinovyal

sıvılarında MDA düzeylerini ölçmüşlerdir. Osteoartrit ve kontrol grubunda serum MDA düzeyleri romatoid artrit göre düşük iken, sinoviyal sıvıda osteoartrit ve romatoid artritli grup arasında herhangi bir fark saptamamışlardır. Haklar ve ark.¹⁶ sinoviyal sıvıda bir diğer serbest radikal olan süperoksit ($O_2\cdot$) radikal düzeyini ölçmüşler ve kondral lezyonu olan hastalarda, kontrol grubuna oranla süperoksit düzeyinin yüksek olduğunu saptamışlardır ($p<0.05$). Bizde osteoartritli olgularda sinoviyal sıvı MDA düzeyinin sağlıklı kontrol grubunu oluşturan bireylere oranla artmış olduğunu gözlemledik ($p<0.001$). Sinoviyal sıvı MDA düzeylerindeki yükseklik, eklemdeki reaktif oksijen radikallerinin varlığını açıkça ortaya koymaktadır.

Deneyisel olarak OA modeli oluşturulmuş hayvanlarda iNOS enziminin selektif baskılanması ile; ONOO-, IL-1 β , MMP, siklooksijenaz-2 ve NO üretiminde azalma olduğu ve buna bağlı olarak kırıkta lezyonlarının sayısı ve büyüklüğü ile osteofit sayısı ve büyüklüğünün azaldığı, osteoartrite bağlı erken lezyonların ilerlemesinde yavaşlama olduğu, sinoviyal membranda PMN hücre infiltrasyonu gibi akut enflamasyon bulgularının azaldığı saptanmıştır^{5,9,13,15}. Kabak ve ark.²⁶'ları sıçanlarda oluşturdukları deneyel artrit modelinde, eklemde NO sentaz oluşumunu engelleyecek profilaktik N^G-monometil-L-arginin (NMMA) ve indometazinin birlikte verilmesi ile nitrat düzeyinde azalma ve artrit tablosunda gerileme olduğunu gözlemlemiştir.

Sonuç olarak; eklemdeki bazı inflamatuvar etkenlerin biyokimyasal uyarısı ile gelişen katabolik olaylar sonucunda NO ve oksijen radikalleri oluşmaktadır. Bunların selektif baskılanmasını sağlayacak ajanlar ile osteoartritin tedavisinde yeni aşamaların kaydedilebileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Hedbom E, Hauselmann HJ. Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 45-53.
- Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9): 1916-1926.
- Min BH, Kim HJ, Lim H, Park CS, Park SR. Effects of ageing and arthritic disease on nitric oxide production by human articular chondrocytes. *Exp Mol Med* 2001; 33(4): 299-302.
- Stefanovic-Racic M, Stadler J, Evans CH. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36(8): 1036-1044.
- Pelletier JP, Pelletier JM, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease. Potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001; 44(6): 1237-1247.
- Presle N, Cipolletta C, Jouzeau JY, Abid A, Netter P, Terlian B. Cartilage protection by nitric oxide synthase inhibitors after intraarticular injection of interleukin-1 β in rats. *Arthritis Rheum* 1999; 42(10): 2094-2102.
- Murrell GAC, Dolan MM, Jang D, Szabo C, Warren RF, Hannafin JA. Nitric oxide: an important articular free radical. *J Bone Joint Surg* 1996; 78-A: 265-274.
- Miyasaka N, Hirata Y. Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci* 1997; 61(21): 2073-2081.
- Amin AR, Attur M, Abramson SB. Nitric oxide synthase and cyclooxygenases: distribution, regulation, and intervention in arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11(3): 202-209.
- Jang D, Murrell GAC. Nitric oxide in arthritis. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(9): 1511-1519.
- Carlo MD, Loeser RF. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. *Arthritis Rheum* 2002; 46(2): 394-403.
- Bernardeau C, Demis-Labous E, Balchard H, Lamarque D, Breban M. Nitric oxide in rheumatology. *Joint Bone Spine* 2001; 68: 457-462.
- Nishida K, Doi T, Inoue H. The role of nitric oxide in arthritic joints: a therapeutic target? *Mod Rheumatol* 2000; 10: 63-67.
- Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, Kanno K et al. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 1995; 96: 2357-2363.
- Mello SBV, Novaes GS, Laurindo IMM, Muscara MN, Maciel FMB, Cossermelli W. Nitric oxide synthase inhibitor influences prostaglandin and interleukin-1 production in experimental arthritic joints. *Inflamm Res* 1997; 46: 72-77.
- Haklar U, Yüksel M, Veliöglü A, Türkmen M, Haklar G, Yalçın AS. Oxygen radicals and nitric oxide levels in chondral or meniscal lesions or both. *Clin Orthop* 2002; 403: 135-142.
- Cedergren J, Forslund T, Sundqvist T, Skogh T. Inducible nitric oxide synthase is expressed in synovial fluid granulocytes. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 150-155.
- Tiku ML, Shh R, Allison GT. Evidence linking chondrocyte lipid peroxidation to cartilage matrix protein degradation. Possible role in cortilope agong and the pathogenesis of osteoarth niths. *J Biol Chem* 2000; 275(26): 2069-2076.
- Mazetti I, Grigolo B, Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, Roseti L et al. Differential roles of nitric oxide and oxygen radicals in chondrocytes affected by osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Sci* 2001; 101: 593-599.
- Giovannoni G, Land JM, Keir G, Thompson EJ, Heales SJ. Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann Clin Biochem* 1997; 34 (Pt 2): 193-198.
- Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 1978; 90: 37-43.
- Wanchu A, Khullar M, Sud A, Bamberg P. Elevated nitric oxide production in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Rheumatol* 2000; 19: 360-364.

23. Lee MS, Trindade MCD, Ikenoue T, Schurman DJ, Goodman SB, Smith RL. Effects of shear stress on nitric oxide and matrix protein gene expression in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *J Orthop Res* 2002; 20: 556-561.
24. Farrel AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1219-1222.
25. Chaturvedi V, Handa R, Rao DN, Wali JP. Estimation & significance of serum & synovial fluid malondialdehyde levels in rheumatoid arthritis. *Indian J Med Res* 1999; 109: 170-174.
26. Kabak Ş, Halıcı M, Yakan B, Kutlubay R, Kula M. Tüberküloz artritini engellemede N^G-monometil -L-arginin ve indometazinin birlikte veya tek tek kullanımındaki etkinliği. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2002; 36(2): 155-161.