

Pirrolize Protein Behçet Hastalığında Yeni Bir Oksidatif Stres Belirteci Olabilir mi?

May Pyrrolized Protein Be a New Oxidative Stress Marker in Behçet's Disease?

Seval Kaya

M.D.
Department of Biochemistry
Faculty of Medicine, Erciyes University
sevalkaya@erciyes.edu.tr

Kader Köse

Prof., Ph.D.
Department of Biochemistry
Faculty of Medicine, Erciyes University
kkose@erciyes.edu.tr

Cevat Yazıcı

Assoc. Prof. M.D.
Department of Biochemistry
Faculty of Medicine, Erciyes University
yazici@erciyes.edu.tr

Serap Utaş

Prof., M.D.
Department of Dermatology
Faculty of Medicine, Erciyes University
sutas@erciyes.edu.tr

Murat Borlu

Assoc. Prof., M.D.
Department of Dermatology
Faculty of Medicine, Erciyes University
muratborlu@erciyes.edu.tr

*This study was presented at XXth National Biochemistry Congress,
29 October-01 November 2008, Nevşehir- Turkey.*

Submitted : November 17, 2008
Revised : June 15, 2009
Accepted : December 01, 2009

Corresponding Author:

Dr. Seval Kaya,
Department of Biochemistry
Faculty of Medicine, Erciyes University
Kayseri-Turkey

Telephone : +90- 352 4374937
E- mail : sevalkaya@erciyes.edu.tr

Özet

Amaç: Bu çalışma, patogeneğinde oksidatif stresin de rol oynadığı öne sürülen Behçet Hastalığı'nda, oksidatif şartlarda oluştuğu bilinen pirrolize proteinin bir belirteç olup olmayacağını araştırmak ve ayrıca güçlü bir antioksidan olduğu bilinen N-asetilsistein (NAC)'in pirrolize protein seviyeleri üzerine etkisini incelemek amacıyla yapıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, 40 Behçet hastası ve 20 sağlıklı gönüllü (kontrol) alındı. NAC (2x600 mg/gün NAC) ve plasebo (2x600 mg/gün plasebo) olmak üzere rasgele 2 gruba ayrılan Behçet hastalarına bir aylık tedavi protokolü uygulandı. NAC ve plasebo gruplarından tedavi öncesi ve sonrası elde edilen serum örneklerinde ve kontrol grubunda spektrofotometrik olarak pirrolize protein düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Behçet hastalarında kontrolle karşılaştırıldığında tedavi öncesi yüksek bulunan pirrolize protein düzeylerinin; bir aylık tedavi sonucunda, plasebo grubunda değişmediği; buna karşılık NAC grubunda anlamlı şekilde azaldığı ve kontrol değerlerine ulaştığı belirlendi.

Sonuç: Bulgularımız, Behçet hastalığında aşırı süper oksit radikal üretiminin, protein oksidasyonuna neden olduğu ve pirrolize protein tayininin, oksidatif stresin gösterilmesinde bir belirteç olabileceğini destekler niteliktedir. Ayrıca, güçlü bir antioksidan olan NAC'in, Behçet hastalığını da içeren oksidatif stresle ilişkili birçok hastalığın tedavi protokolüne eklenebilmesi olasılığı, yeni bir çalışma alanı oluşturabilir.

Anahtar kelimeler: **Asetilsistein; Behçet Sendromu, Piroller/kan.**

Abstract

Purpose: This study was planned to investigate whether pyrrolized-protein that occurred in oxidative conditions may be a marker for Behçet's disease suggesting that oxidative stress might play a role in its pathogenesis, and also examine the effect of N-acetylcysteine (NAC), known as a potent antioxidant, on pyrrolized-protein levels.

Material and Methods: This study was performed on 40 Behçet's patients and 20 healthy volunteers. Treatment protocol for one-month was applied to Behçet's patients randomly subdivided into two groups NAC (2x600mg NAC/day) and placebo (2x600mg placebo/day). Pyrrolized-protein was measured in sera obtained from patient groups at the beginning and at the end of the study, and from controls once.

Results: When compared to controls, pyrrolized-protein, found to be higher in both patient groups before treatment, were not changed in Placebo group; but significantly decreased and also attained to control values in NAC group after one-month treatment.

Conclusion: Our results may suggest that enhanced production of ROS in Behçet's disease may lead to protein oxidation and pyrrolized-protein determination which may be used as an oxidative-stress "marker". In addition, the probability of NAC addition to the treatment protocols of several diseases related to oxidative stress, including Behçet's disease, may lead to new study areas.

Key words: **Acetylcysteine; Behçet's Disease: Pyrroles/blood.**

Giriş

İlk kez 1937 yılında Türk dermatolog Dr. Hulusi Behçet (1) tarafından üveit, oral ve genital ülserasyonlardan oluşan bir triad olarak tanımlanan Behçet hastalığı, günümüzde kronik, immünoenflamatuvar, vaskülitik bir multisistemik hastalık olarak kabul edilmektedir (2). Hastalığın etyolojisi kesin olarak bilinmemekle beraber; kemotaksi, fagositoz, ve serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin üretimi gibi nötrofil fonksiyonlarında gözlenen artışın, patogeneze ile ilişkili olabileceği görüşü gün geçtikçe önem kazanmaktadır (3, 4).

SOR'un etkisiyle biyomoleküllerin modifiye olduğu ve hatta hasar gördüğü bilinmektedir (5). Lipit peroksidasyonunun toksisitesi, peroksidasyon sırasında üretilen, doymamış veya dikarbonilik aldehitlerin açığa çıkmasına bağlanabilir (6). Lipit peroksidasyon ürünlerinden; malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-alkenal, 4,5-epoksi-2-alkenal gibi aldehitler; proteinlerdeki reaktif grupları modifiye ederek, proteinler üzerinde okside lipit/amino asit reaksiyon ürünü (OLAARP) olarak adlandırılan birtakım değişikliklere yol açarlar. OLAARP oluşumu, proteinlerin varlığında, lipit peroksidasyonunun nihai sonucu olarak kabul edilmektedir (7). İmmünolojik yöntemlerle tanımlanan çok sayıda OLAARP içerisinden (8), pirroller gibi sadece birkaçı, kimyasal-spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilebilecek stabiliteye sahiptir (9).

Proteinlerin serbest amino gruplarıyla lipit peroksidasyon ürünlerinin reaksiyonu sonucu yaygın şekilde oluşan pirrolize proteinler, organizmanın maruz kaldığı oksidatif stresin gösterilmesinde bir belirteç olarak kullanılabilir (10). N-asetilsistein (NAC)'in güçlü antioksidan etkisi, redükte glutatyon prekürsörü olmasına ve doğrudan SOR'u toplayabilmesine bağlanmaktadır (11).

Bu çalışmada, Behçet hastalarında, protein oksidasyon ürünleri üzerinden oksidatif stresin varlığını göstermek amacıyla; serum pirrolize protein düzeyleri ölçüldü ve mevcut tedavi protokolüne ilave edilen NAC'ın, oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen bu parametre üzerindeki etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı tarafından takip ve tedavileri yapılan 40 Behçet hastası ve 20 sağlıklı gönüllü (kontrol), çalışmaya dahil edildi. Uluslararası Çalışma Grubu (International Study Group-ISG) (12) kriterlerine göre Behçet tanısı almış olan hastaların cinsiyet dağılımı, 14 erkek (% 35) ve 26

kadın (% 65); erkek/kadın (E/K) oranı da 0,53 olarak belirlendi. Yaşları 16–52 yıl arasında değişen hastalarda ortalama \pm SD yaş, $35,65 \pm 10,33$ yıl olarak bulundu. Çalışma öncesi; klinik ve laboratuvar yönünden değerlendirilen hastaların Behçet hastalığı dışında başka bir sistemik rahatsızlıklarının olmamasına dikkat edildi.

Benzer tedavi protokolü (kolşisin ve/veya azotiyopürin içeren preparatlar) ile tedavi olan Behçet hastaları, her grupta 20 hasta olacak şekilde, rasgele 2 gruba ayrıldı. NAC grubu, NAC preparatı olarak Asist[®] (4 hafta süreyle, 2x600 mg/gün); plasebe grubu da Asist[®] ile aynı ambalaj, şekil, renk ve büyüklükte Bilim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. tarafından hazırlanan kapsülleri (4 hafta süreyle, 2x600 mg/gün) kullandı. Klinik inceleme ve laboratuvar sonuçlarına göre, sistemik hastalığı olmayan; son bir aydır hiçbir ilaç kullanmayan, 17–58 yaş arasında, 8 erkek ve 12 kadın olmak üzere toplam 20 sağlıklı kişi ($36,75 \pm 11,48$ yıl), kontrol grubu olarak çalışmaya alındı.

Çalışma öncesi, tüm hasta ve sağlıklı gönüllülerden bilgilendirilmiş gönüllü oluru alındı (Etik Kurul karar no: 05-160). Çalışma sırasında, NAC ve plasebo grubunu oluşturan hastalardan, tedavi öncesi ve sonrası olmak üzere toplam iki kez; kontrol grubunu oluşturan sağlıklı gönüllülerden sadece bir kez düz kan alındı. Tüpler, 30 dakika (dk) içerisinde, 4°C'de 2000 g'de 10 dk santrifüj edildi, ayrılan serum örnekleri ependorf tüplerde -70°C'de dondurularak saklandı.

Serum pirrolize protein düzeyleri, Hidalgo ve arkadaşları (9) tarafından geliştirilen ve Martinez-Cruz ve arkadaşları (10) tarafından modifiye edilen metoda göre tayin edildi. Pirrolize proteinlerin, asidik ortamda ve yüksek sıcaklıkta, dimetilaminobenzaldehit (DMAB) ile etkileşimi sonucu oluşan mavi-mor renkli Ehrlich reaksiyon ürünlerinin renk şiddeti, 570 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (9, 10).

Gruplardan elde edilen verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Tüm değişkenlerin normal dağılıma uygun olduğu belirlenince, veri analizinde parametrik testlerin uygulanmasına karar verildi. Verilerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar "SPSS 15.0 for Windows" paket bilgisayar programı ile karşılaştırıldı. Behçet hastalarının total olarak kontrol grubuyla karşılaştırılması, Student "t" testi ile yapıldı. Ayrıca Kontrol, NAC ve Plasebo gruplarının birbirleriyle karşılaştırılmasında ANOVA ve post-ANOVA (Scheffe prosedür) testleri kullanıldı. NAC ve Plasebo gruplarında, grup içi tedavi öncesi ve sonrası

karşılaştırmaları, eşleştirilmiş Student “t” testi ile yapıldı. Tüm karşılaştırmalarda, anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

Bulgular

Kontrol, NAC ve plasebo gruplarında tayin edilen serum pirrolize protein düzeyleri, Tablo I’de gösterildi. Pirrolize protein düzeyleri, tedaviden önce her iki hasta grubunda da, kontrol grubu değerlerinden daha yüksek bulundu ($p < 0,05$). Tedaviden sonra NAC grubunda pirrolize protein düzeyleri anlamlı şekilde azaldı ($p < 0,05$); plasebo grubunda ise anlamlı bir değişiklik olmadı ($p > 0,05$).

Birbirine karşılaştırılan hasta gruplarının serum pirrolize protein düzeyleri arasında, tedaviden önce bir fark olmamasına rağmen ($p > 0,05$); tedaviden sonraki pirrolize protein düzeylerinin NAC grubunda anlamlı düzeyde daha düşük olduğu ($p < 0,05$) tespit edildi (Tablo I). Grup içi karşılaştırmalarda; serum pirrolize protein düzeylerinin, tedavi süresince NAC grubunda anlamlı şekilde azaldığı ($p < 0,05$); Plasebo grubunda ise değişmediği ($p > 0,05$) görüldü (Tablo I).

Tablo I. Çalışma Gruplarının Pirrolize Protein Düzeyleri

Gruplar	N	Pirrolize Protein (nmol/mg protein)	ANOVA F Değeri	p
Kontrol	20	1.12 ± 0.15		
NAC				
Tedavi öncesi	20	1.81 ± 0.16*	107,6	0,000
Tedavi sonrası	20	1.05 ± 0.17◇	65,74	0,000
Plasebo				
Tedavi öncesi	20	1.71 ± 0.18*	107,6	0,000
Tedavi sonrası	20	1.79 ± 0.32*,◆	65,74	0,000

Kontrol, NAC (N-asetilsistein) ve plasebo grupları arasında post-ANOVA test sonuçları: *Kontrol grubundan, ◆NAC grubundan farklı. ◇Grup içi anlamlı fark. (Eşleştirilmiş Student t test). $p < 0,05$.

Tartışma

Behçet hastalığında, prooksidan-antioksidan sistemler arasındaki dengenin bozulmasına bağlı olarak artan SOR üretiminin yani oksidan stresin etyolojiye katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (4). Son yıllara kadar, Behçet hastalarında in vivo oksidatif stresin varlığı, MDA gibi lipid peroksidasyonu yıkım ürünlerinin ya da enzimatik / nonenzimatik antioksidanların ölçümüne dayanarak gösterilmiştir (13, 14). Diğer taraftan, lipidlerle karşılaştırıldığında, proteinlerin oksidanlar için başlıca hedef olduğu; oksidatif protein hasarının daha kalıcı ve daha sitotoksik olduğu bilinmektedir (15). Sınırlı sayıda olmakla beraber, Behçet hastalarında oksidanlarla indüklenen protein hasarını kantitatif olarak belirleyen klinik çalışmalar giderek önem kazanmaktadır (16). Bu

nedenle, Behçet hastalığının fizyopatolojisinde protein oksidasyonuna bağlı olarak gelişen oksidatif stresin ortaya konulması, klinik bakımdan büyük önem taşıyabilir ve hatta yeni tedavi yöntemlerinin gelişmesine öncülük yapabilir.

Literatürde, patogenezinde oksidatif stresin rol oynadığı öne sürülen ateroskleroz ve renal yetmezlik gibi hastalıklarda, pirrolize protein düzeylerinin yükseldiği bildirilmektedir (17). Benzer şekilde, hidroksinonenal-pirrol bileşikleri, Alzhemier (18), Alexander (19) ve Parkinson (20) hastalarında yüksek düzeyde bulunmuştur. Bu çalışmada da, Behçet hastalarında pirrolize protein düzeylerinin yüksek bulunması; literatürle uyumlu olarak, Behçet hastalığında oksidatif stresin varlığını desteklemektedir.

Behçet hastalığının etyolojisi kesin olarak bilinmediğinden, belirli bir tedavi şekli de yoktur. Bununla beraber, enflamatuvar hücre birikimini önlemek amacıyla, bu hücrelerin aktivitelerini ve/veya sayılarını azaltmaya yönelik tedavi şekilleri üzerinde durulmaktadır (4). Günümüze kadar, Behçet tedavisinde kortikosteroitler, kolşisin, interferon, siklosporin A gibi immünoşüpresiflerin yaygın kullanılmasına rağmen (2); vitamin E (21) gibi antioksidanların tedavide kullanımı, henüz çok yeni yaklaşımlardır.

Sistein amino asidinin N-asetil türevi olan NAC, yıllardır mukolitik ajan olarak solunum sistemi hastalıklarında kullanılmaktadır. Oksidanlara maruz kalan NAC, sahip olduğu serbest tiyol gruplarıyla disülfid bağı oluşturarak; direkt olarak antioksidan etki göstermektedir. SOR ve oksidatif hasarın neden olduğu kanser, kalp hastalıkları, HIV enfeksiyonu, ağır metal toksisitesi gibi durumlarda NAC’ın etkili olduğu gösterilmiştir (11). Ayrıca, NAC’ın nötrofil, monosit, trombosit aktivasyonunu engelleyerek iskemi/reperfüzyon patomekanizmasında primer role sahip olduğu bildirilmiştir (22). Literatür taramasına göre, Behçet hastalarında tedavi amacıyla bir ay süreyle NAC kullanılan bu ilk çalışmada; hastaların serum pirrolize protein düzeylerinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, literatürde Behçet hastalarında serum pirrolize protein düzeylerinin yüksek bulunduğu bu ilk çalışmada; Behçet hastalığında oksidatif stresin arttığı, başlıca hedefin proteinler olduğu ve pirrolize protein tayininin, oksidatif stresin gösterilmesinde bir belirteç olabileceği söylenebilir. Ayrıca, protein oksidasyonunu baskıladığı gösterilen NAC’ın, Behçet’i de içine alan oksidatif stresle ilişkili birçok hastalığın tedavi protokolüne eklenme olasılığı, yeni bir çalışma alanı oluşturabilir.

Kaynaklar

1. Behçet H. *Über rezidivierende aphthose, durch ein virus verursachte geschwüre am mund, am auge und an den genitalien.* *Dermatol Wochenschr* 1937; 105: 1152-1157.
2. Störk S, Kneitz C, Bröcker EB, Hoyer C, Ertl G, Angermann CE. *Adamantiades-Behçet's disease (German).* *Med Klin (Munich)* 2008; 103: 143-152.
3. Pronai L, Ichikawa Y, Nakazawa H, Arimori S. *Enhanced superoxide generation and the decreased superoxide scavenging activity of peripheral blood leukocytes in Behçet's disease--effects of colchicine.* *Clin Exp Rheumatol* 1991; 9: 227-233
4. Evereklioglu C. *Current concepts in the etiology and treatment of Behçet disease.* *Surv Ophthalmol* 2005; 50: 297-350.
5. Sies H. *Oxidative stress: oxidants and antioxidants.* *Exp Physiol.* 1997; 82: 291-295.
6. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.* *Free Radic Biol Med.* 1991; 11: 81-128.
7. Zamora R, Alaiz M, Hidalgo FJ. *Feed-back inhibition of oxidative stress by oxidized lipid/amino acid reaction products.* *Biochemistry* 1997; 36: 15765-15771.
8. Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y. *Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2696-2701.
9. Hidalgo FJ, Alaiz M, Zamora R. *A spectrophotometric method for the determination of proteins damaged by oxidized lipids.* *Anal Biochem* 1998; 262: 129-136.
10. Martinez-Cruz F, Guerrero JM, Osuna C. *Melatonin prevents the formation of pyrrolized proteins in human plasma induced by hydrogen peroxide.* *Neurosci Lett* 2002; 326: 147-150.
11. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. *N-Acetylcysteine-a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency.* *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7: 355-359.
12. [No author listed] *Criteria for diagnosis of Behçet's disease.* *International Study Group for Behçet's Disease. Lancet* 1990; 335: 1078-1080.
13. Köse K, Doğan P, Aşçıoğlu M, Erkiliç K, Aşçıoğlu Ö. *Oxidative stress and antioxidant defenses in plasma of patients with Behçet's Disease.* *Tohoku J Exp Med* 1995; 176: 239-248.
14. Köse K, Yazici C, Çambay N, Aşçıoğlu O, Doğan P. *Lipid peroxidation and erythrocyte antioxidant enzymes in patients with Behçet's disease.* *Tohoku J Exp Med* 2002; 197: 9-16.
15. Berlett BS, Stadtman ER. *Protein oxidation in Aging, Disease, and oxidative stress.* *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-20316.
16. Yazici C, Kose K, Calis M, Demir M, Kirnap M, Ates F. *Increased advanced oxidation protein products in Behçet's disease: a new activity marker?* *Br J Dermatol.* 2004; 151:105-111.
17. Kaur K, Salomon RG, O'Neil J, Hoff HF. *(Carboxyalkyl)pyrroles in human plasma and oxidized low-density lipoproteins.* *Chem Res Toxicol.* 1997; 10: 1387-1396.
18. Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG, Smith MA. *4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease.* *J Neurochem* 1997; 68: 2092-2097.
19. Castellani RJ, Perry G, Harris PL, et al. *Advanced lipid peroxidation end-products in Alexander's disease.* *Brain Res.* 1998; 787: 15-18.
20. Castellani R, Smith MA, Richey PL, Perry G. *Glycooxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease.* *Brain Res.* 1996; 737: 195-200.
21. Kökçam İ, Naziroglu M. *Effects of vitamin E supplementation on blood antioxidants levels in patients with Behçet's disease.* *Clin Biochem* 2002; 35: 633-639.
22. Thies JC, Teklote J, Clauer U, et al. *The efficacy of N-acetylcysteine as a hepatoprotective agent in liver transplantation.* *Transpl Int* 1998; 11 Suppl 1: 390-392.