

Osteoartrit Kıkırdığında Oksidatif Stres; Karşılaştırmalı Çalışma

Alev Kural¹, Cemal Kural², Mahmut Ercan Çetinus³, Ersin Erçin², Hatice Seval⁴, Macit Koldaş⁴

¹Bakırkoy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul

²Bakırkoy Dr. Sadi Konuk Eğitim Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, İstanbul

³Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, İstanbul

⁴Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, İstanbul

Eur J Basic Med Sci 2014;4(3): 83-88

Received: 15-07-2015

Accepted: 20-08-2015

Correspondence (Yazışma Adresi):

Uzm.Dr. Alev Kural

Bakırkoy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi A Blok Biyokimya Laboratuvarı Bakırkoy-İSTANBUL

E-mail. alevkural@hotmail.com

Tel. 0212 4147171-5070

Faks. 0212 4091194

Oxidative Stress in osteoarthritis Cartilage; A Comparative Study

ABSTRACT

The role of increased reactive oxygen species (ROS) and/or decrease in antioxidant enzyme levels in pathogenesis of osteoarthritis (OA) is controversial. In our study we investigated antioxidant enzyme activities and oxidative stress in cartilage samples of OA patients. In our study, cartilage samples were obtained from 26 subjects (18 women, 8 man) with severe hip osteoarthritis who underwent total hip replacement and as control group; cartilage samples were obtained from 25 subjects (16 women, 9 man) who underwent hemiarthroplasty for femoral neck fracture. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GP), catalase (CAT) enzyme activities and lipid hydroperoxide (LPO) levels were studied with Cayman Chemical brand kits (Ann Arbor, USA). Cartilage samples of patients with hip OA had significant higher amounts of SOD, CAT and GP antioxidant enzyme activities and oxidant LPO levels ($p=0.044$, $p=0.028$, $p=0.015$, $p=0.001$ respectively). Correlation analysis showed a weak positive relationship between SOD and LPO and between CAT and LPO ($r=0.426$, $p=0.01$; $r=0.358$ $p=0.002$ respectively). Oxidative stress cannot be held responsible for cartilage damage in the pathogenesis of osteoarthritis as a single factor. Studies through synovial fluid analysis with more patient numbers should be helpful to understand the pathogenesis of osteoarthritis in future research.

Key Words: Cartilage, osteoarthritis, oxidative stress, antioxidant

ÖZET

Osteoartrit (OA) patogenezinde artmış reaktif oksijen türevleri (ROT) ve/veya azalan antioksidant enzimlerin rolü tartışmalıdır. Çalışmamızda, OA hastalarının eklem kıkırdaklarında antioksidant enzim aktiviteleri ve oksidatif stres araştırılmıştır. Çalışmamızda, hasta grubu olarak ileri kalça eklemi OA nedeniyle total kalça protezi yapılan 26 (18 kadın, 8 erkek) hasta ve kontrol grubu olarak femur boyun kırığı nedeniyle parsiyel protez yapılan 25 (16 kadın, 9 erkek) hastadan alınan kıkırdak doku örnekleri kullanıldı. Radyolojik ve makroskopik OA bulguları olan, romatoid artrit, lokal eklem enfeksiyonu ya da gut gibi sekonder hastalık hikayesi olan hastalar kontrol grubuna dahil edilmedi. Doku homojenatlarından süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GP), Katalaz (KAT) enzim aktiviteleri ve lipid hidropereksit (LPO) düzeyleri Cayman Chemical marka kitler (Ann Arbor, USA) kullanılarak ölçüldü. OA hasta grubunda, kontrol grubuna göre antioksidant etkili SOD, KAT, GP

enzim aktiviteleri ve oksidan olan LPO düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0.044$, $p=0.028$, $p=0.015$, $p=0.001$ sırasıyla). Korelasyon analizi yapıldığında SOD ile LPO ve KAT ile LPO arasında pozitif yönde zayıf anlamlı ilişki olduğu saptandı ($r=0.426$, $p=0.01$; $r=0.358$ $p=0.002$ sırasıyla). OA etyopatogenezinde, kıkırdak harabiyetinde oksidatif stres tek başına sorumlu tutulamaz. İleriki çalışmalarda hasta sayısının artırılması ve eklem sıvılarında çalışmaya dahil edilmesi yol gösterici olabilir.

Anahtar kelimeler: Kıkırdak, osteoartrit, oksidatif stres, antioksidan

GİRİŞ

Serbest oksijen radikalleri, elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok metabolik işlev için gereklidir. Zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasara neden olabilir. Uzun süredir serbest oksijen radikallerinin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklar ile ilişkili olduğu bilinmektedir (1). Hücreler, serbest oksijen radikal hasarından korunmak için glutatyon ve diğer antioksidant enzim sistemleri gibi düşük molekül ağırlıklı antioksidant moleküller içeren antioksidant sistemler taşırlar (1,2).

Çinko ve bakır içeren metalloenzim olan süperoksid dismutaz (SOD), serbest oksijen türevleri karşısında temel savunma elementidir. İnsan vücudundan üç ayrı SOD bulunur: SOD1 veya CuZnSOD, temel olarak sitozolde lokalizedir. SOD2 veya MnSOD, mitokondride bulunur. SOD3, hücre dışı SOD (HD-SOD) olarak bilinir ve pozitif yüklü heparin bağlama bölgesiyle tetramerik bir glikoprotein olarak salgılanır. Negatif yüklü proteoglikan ve kollajene bağlanarak dokuların hücre dışı matriksinde lokalize olur. Bu konumda, savunmasız proteinleri ve hücre dışı matriks makromoleküllerini oksidant hasardan koruyabilir (3,4). Glutatyon, lizozomlar ve organellerin membran stabilizasyonu için esansiyeldir. Ayrıca bu tripeptidin serbest radikallerden oluşan süperoksitlerin oluşturduğu hasara karşı hücre membranını koruduğu bilinmektedir. Glutatyon konsantrasyonu glutatyon sentetaz, glutatyon peroksidaz (GP) ve glutatyon redüktaz (GR) ile düzenlenir. GP hücrelerin mitokondri ve sitoplazmalarında bulunmaktadır (5,6,7). Katalaz (KAT) enzimi, O₂ toksisite ve lipid peroksidasyonuna karşı hücreleri korumak için hidroperoksitin su ve oksijene ayrışmasını katalize eden başka etkili bir enzimdir (1). Lipid hidroperoksit (LPO), hücre ve hücre dışı matriks bileşenleri ile yüksek ölçüde

reaktif çeşitli hidroperoksit ve aldehit ürünleri üretir. Lipid radikaller aynı zamanda hücre içi çeşitli hücresel fonksiyonları etkileyen, sinyal molekülleri işlerler. Kıkırdak yaşlanması ve osteoartrit (OA) oluşumunda, lipid kaynaklı oksidatif stresin rolü hakkında yeterli bilgi yoktur (1,7).

Osteoartrit (OA) periartiküler dokular, membran, sinovyal doku, subkondral kemik, kıkırdak ve eklemi ilgilendiren bir hastalıktır (8). Eklem kıkırdağındaki metabolik ve yapısal değişikliklerin hastalık sürecinin ilerlemesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Eklem kıkırdağı, eklem yüzeyinde düzgün ve kaygan bir yüzey oluşturan yüksek derecede özelleşmiş ve benzersiz yapıda tasarlanmış bir biyomateriyaldir (9). Kıkırdak seyrek olarak yerleşik hücreler ve kondrositler tarafından sentezlenen, çoğunlukla avasküler, anöral ve alenfatik bir ara maddeden oluşmuştur. Hücre dışı ara madde (HDM), kıkırdağın fonksiyon özelliklerinden sorumlu olan kollajenler (özellikle tip 2 kollajen) ve proteoglikanlardan meydana gelmektedir. Kondrositler, HDM dönüşüm ve devamlılığında sorumlu olarak belirleyici rol oynamaktadır. OA kıkırdak dejenerasyonunun yıkım ve yapım arasındaki dengesizlikten kaynaklandığı düşünülmektedir (9,10).

Oksidatif hasar, kollajenin mekanik özelliklerini bozabilir (11). HDM' deki proteoglikanlar veya hücre dışı sıvılar reaktif oksijen türevleri (ROT) tarafından bölünebilir (12). Aşırı oksidantlar tarafından yapısal proteinlerde oluşturulan hasar, normal yükler altında bile kıkırdağın mekanik hasara uğramasına ve su tutma kapasitesinin değişmesine neden olabilir. Kollajen lif hasarıyla bağlantılı olarak, OA gelişen kıkırdakta azalmış gerilim gücü görülebilir (13). İlginç olarak kollajen liflerdeki bu hasarın, kondrositlerin çevresinden köken aldığı gösterilmiştir. Kondrositler, ROT' nin kaynağıdır. Perisellüler alanlarda bulunan başlangıç kollajen hasarı ROT temizlenmesi eksikliği ile beraberdir (14). Yetişkin eklem kıkırdağı avasküler ve bundan dolayı da hipoksik bir dokudur, hücreler buna iyi bir adaptasyon göstermelidirler. ROT, hücre fizyolojisi içinde hem hücre içi sinyalleşme hem de hücre yıkımında yer almaktadır (9) .

Çalışmamız, OA patogenezinde oksidatif stres ve antioksidant mekanizmaların olası rolünü göstermek için planlanmıştır. Bu amaç için, protez cerrahisi yapılan OA hastalarına ait femur başı kıkırdak dokuları ile kontrol grubu olarak femur boyun kırıklarına bağlı cerrahi geçiren hastalara ait kıkırdak dokuları kullanılmıştır.

Tablo 1. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri.

	OA (n= 26)	Kontrol (n= 25)	p
Yaş (Yıl)	68±9	71±8	0.220
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	18/8	16/9	0.699
Vücut Kütle İndeksi	29±3	30±3	0.244

OA: Osteoartrit

MATEYAL VE METOD

Çalışmamıza, hasta grubu olarak ileri kalça eklemi osteoartriti nedeniyle total kalça protezi yapılan 26 hasta ve kontrol grubu olarak femur boyun kırığı nedeniyle parsiyel protez yapılan 25 hasta dahil edildi. Radyolojik ve makroskopik OA bulguları olan, romatoid artrit, lokal eklem enfeksiyonu ya da gut gibi sekonder hastalık hikayesi olan hastalar kontrol grubuna dahil edilmedi. Tüm hastalardan yazılı bilgilendirilmiş onam alındı ve çalışma protokolü kurumsal etik kurulları tarafından gözden geçirilip onaylandı. Tüm olguların boy, kilo ve yaşları kaydedildi ve vücut kitle indeksleri [VKİ; ağırlık (kg) / boy² (m²)] hesaplandı.

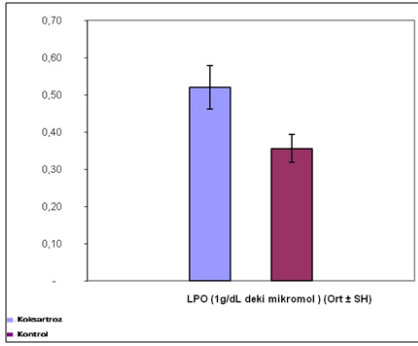
Hasta grubunda, kırık doku örnekleri femur başının posterolateral ve anterolateral kenarında mevcut olan reziduel normal görünümlü kırıkdaktan elde edildi (Şekil 1a). Kontrol grubunda kırık doku örnekleri femur boynu kırığı tanısı ile kalça parsiyel protezi ameliyatı sırasında çıkarılan femur başından alındı (Şekil 1b). Tüm kırık dokuları % 0.9 NaCl ile bir kaç kez yıkandı ve yaklaşık 1 gr ağırlığındaki ıslak numuneler analiz gününe kadar - 80 °C'de saklandı.

Analiz sırasında tüm işlemler buz üstünde gerçekleştirildi. Homojenizasyon için tartılan numuneler nazikçe 10 mmol/L fosfat tamponlu salin ile süspansiyon haline getirildi (doku/tampon, 1/10). Kırık doku örnekleri, buz banyosunda homojenize edildi (Micra Art grinder, DS-8/P, Benchmarks, Germany) (15).

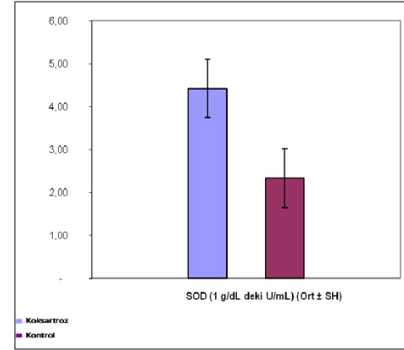
SOD (U/ml), GP (nmol/dk/mL) KAT (nmol/dk/mL) aktiviteleri ve LPO (µM) düzeyleri, Cayman Chemical marka kitler (Ann Arbor, USA) kullanılarak ölçüldü (Katolog numaraları sırasıyla; 706002, 703102, 705002, 707002). Analizin ölçüm içi varyasyon katsayısı sırasıyla % 3.2, % 5.7, % 3.9 ve % 3.8, ölçümler arası varyasyon katsayısı ise sırasıyla % 3.7, % 7.2, % 4.2 ve % 9.9 idi.

İstatistiksel analiz için, NCSS 2007 İstatistiksel Yazılım (Utah, ABD) programı kullanıldı. Veri tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin yanı sıra değerlendirilmede (ortalama, standart sapma, ortalamanın standart hatası, ortanca ve çeyrek değerler genişliği) bağımsız t testi, normal dağılım ile ikili gruplar karşılaştırmak için kullanıldı. Mann-Whitney U testi anormal dağılımı ile ikili grupların

**Şekil 1a.** Hasta grubuna ait femur başı örneği**Şekil 1b.** Kontrol grubuna ait femur başı örneği



Şekil 2a. Lipit hidroperoksit seviyeleri



Şekil 2b. Süperoksit dismutaz aktiviteleri

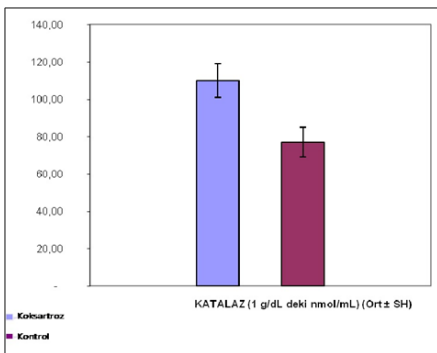
karşılaştırılmasında, Ki-kare testi, nitel veri analizi için kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

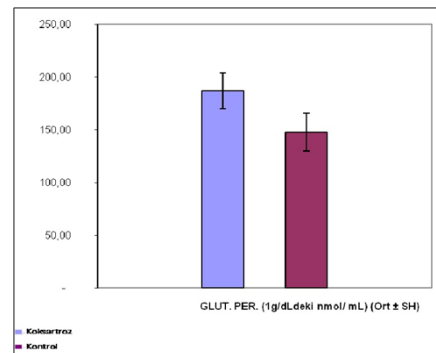
Hastalara ait demografik özellikler tablo 1'de gösterilmiştir. SOD, KAT, GP enzim aktiviteleri ve LPO seviyeleri tablo 2 ve şekil 2 (a-d)'de gösterilmiştir. OA hasta grubunda, kontrol grubu olarak kabul edilen femur boyun kırığı sebebiyle parsiyel protez yapılan hastalara göre antioksidant etkili SOD, KAT, GP enzim aktiviteleri ile birlikte oksidan olan LPO düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p=0.044$, $p=0.028$, $p=0.015$, $p=0.001$ sırasıyla). Korelasyon analizi yapıldığında SOD ile LPO ve KAT ile LPO arasında pozitif yönde zayıf anlamlı ilişki olduğu saptandı ($r=0.426$, $p=0.01$; $r=0.358$, $p=0.002$ sırasıyla).

TARTIŞMA

Çalışmamızda yaptığımız kıkırdak doku analizlerinde, hem oksidan hem de antioksidan enzim aktivitelerini OA tanısı olan hasta grubunda, kontrol grubuna göre göre yüksek bulduk. Literatürde, kıkırdak dokusunda SOD, GP, KAT, LPO enzim aktivitelerini çalışan yayına rastlanmadı. OA gelişiminde, genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. ROT, eklem kıkırdığındaki tip 2 kollojen ve proteoglikanların yıkımına sebep olmaktadır. Beraberinde yaşlanma, kadın cinsiyet, genetik yatkınlık, fazla kilolu olmak gibi eklem yük bindiren faktörlerin varlığı dejeneratif artrit riskini artırmaktadır (16). Kıkırdak avasküler ve hipoksik bir dokudur. Bu yüzden, doku düzenlenmesinde ROT rolü tartışmalıdır. Kıkırdak dokusunda, oksijen konsantrasyonu yüzeyden daha derin bölgelere doğru % 1 ila % 5 arasında değişmektedir. Kondrositlerin % 21 oksijen içeren kültür ortamında ROT ürettiği gözlenmiştir. Kondrositler, NADPH oksidaz benzeri komplekse sahiptir.



Şekil 2c. Katalaz aktiviteleri



Şekil 2d. Glutasyon peroksidaz aktiviteleri

Tablo 2. Hasta ve kontrol grubunun kırıkta doku örneklerindeki SOD, KAT, GP enzim aktiviteleri ve LPO düzeyleri

	OA (ort±SH)	Kontrol (ort±SH)	p
SOD (U/mL)	4.42±0.68	2.33±0.68	0.044
KAT (nmol/dk/mL)	109.97±8.97	76.95±8.15	0.028
GP (nmol/dk/mL)	186.76±16.86	78±17.72	0.015
LPO (µM)	0.52±0.06	0.36±0.04	0.001

OA: Osteoartrit, SOD: süperoksit dismutaz, KAT: katalaz, GP: glutatyon peroksidaz, LPO: Lipit hidroperoksit
Ort: ortalama; SH: ortalamanın standart hatası

Bununla birlikte, düşük oksijen basıncı seviyelerinde ROT üretiminin nasıl etkilendiği hakkında bilinenler sınırlıdır. (16,17).

Oksidatif stres ve OA incelendiğinde kırıkta yaşlanma ile beraber, moleküler yapı ve kırıkta matriks değişmektedir. Yaşlanma ile kırıkta ve kontrositler OA patogenezi ve ilerlemesinde asıl rolü oynamaktadır. İnflamatuvar eklem hastalıklarında ise SOD enzimi koruyucu rol oynamaktadır (18).

Yılmaz ve ark. OA hasta grubunda, eklem sinovyal sıvısı nitrik oksit (NO) ve malondialdehid düzeylerini anlamlı yüksek bulmuşlardır. İnflamatuvar etkenlerin NO ve oksijen radikalleri oluşumunu etkilediği belirtilmiştir (19). Benzer olarak yapılan başka bir çalışmada diz OA patogenezi ROT' nin rolü, fazla üretiminin protein, lipid, nukleik asit ve matriks yapılarını bozduğu vurgulanmıştır (20). ROT oluşumunu engelleyen ya da oksidatif stresi azaltan antioksidant tedavilerin OA tedavisinde etkili olabileceği ileri sürülmüştür (19,20).

Literatürde, OA hastalarında antioksidan düzeyleri hakkında çelişkili sonuçlar vardır. Bu farklı sonuçlar çalışılan numuneye de bağlı olabilir. Fitowska ve arkadaşları, kalça OA hastalarının sinovyal membranlarında SOD aktivitesinin ROT ilişkili arttığını bildirmiştir (12). İleri derece diz OA hastalarının eklem sıvısında HD-SOD düzeyleri azalmıştır. Geç dönem OA hastalarında, hücrelerin hücre dışı SOD salgısını devam ettirme yetenekleri kaybolmaktadır (14). Regan ve arkadaşları, eklem sıvısında azalan HD-SOD seviyelerin etiolojide önemli olduğunu belirtmişlerdir (13). Buna karşılık, bir başka çalışmada diz OA ile başvuran hastaların eklem sıvısında total SOD düzeyleri yüksek bulunmuştur (21).

Çalışmamızın limitasyonlarından birincisi hasta sayımızın yeterli olmaması, ikincisi ise kırıkta dokusunun sağlam

hastalardan alınamayacağı sebebiyle kontrol grubu olarak femur boyun kırığı tanısı ile başvuran hastalardan protez ameliyatı nedeniyle çıkarılan femur başından alınan normal kırıkta örneklerinin kullanılmasıdır.

SONUÇ

Osteoartrit etyopatogenezi, kırıkta harabiyetin de oksidatif stres tek başına sorumlu tutulamaz. İleriki çalışmalarda eklem sinovyal sıvısında ve kırıkta bu parametrelerin beraber çalışması ve süperoksit dismutaz (SOD) enziminin alt grup tiplerinin araştırılması yol gösterici olabilir.

Onaylama

Yazarların hiçbirinin, hiçbir firma ya da mali kuruluşla finansal ilişkisi yoktur.

KAYNAKLAR

1. Kalpakcioglu B, Şenel K. The interrelation of glutathione reductase, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and glucose-6-phosphate in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 2008;27:141-5.
2. Karıncaoglu Y, Batcıoglu K, Erdem T, Esrefoglu M, Genc M. The levels of plasma and salivary antioxidants in the patient with recurrent aphthous stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2005;34:7-12.
3. Poole A, Flint M, Brent W. Beaumont. Chondrons Extracted From Canine Tibial Cartilage : Preliminary Report on their Isolation and Structure. *Journal of Orthopedic Research* 1988;6:408-19.
4. Poole A, Ayad S, Schofield R. Chondrons from articular cartilage. *J Cell Sci* 1988;90:635-43.

5. Islamov BI, Balabanova RM, Funtikov VA. Effect of bioresonance therapy on antioxidant system in lymphocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Bull Exp Biol Med* 2002;134:248-50.
6. Gul M, Kutay FZ, Temocin S, Hanninen O. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J Exp Biol* 2000;38:625-34.
7. Braven J, Ansari N, Figgitt DP et al. A comparison of glutathione reductase and glutathione peroxidase activities in patients with rheumatoid arthritis and healthy adults. *Br J Rheumatol* 1989;8:212-5.
8. Brooks PM. Impact of osteoarthritis on individuals and society: How much disability? Social consequences and health economic implications. *Curr Opin Rheumatol* 2002;14:573-7.
9. Sutipornpalangkul W, Morales NP, Harnroongroj T. Free Radicals in Primary Knee Osteoarthritis. *J Med Assoc Thai* 2009;92(6):268-74.
10. Aigner T, Zien A, Gehrsitz A, Gebhard PM, McKenna L. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum* 2001;44:2777-89.
11. Hollander AP, Pidoux I, Reiner A, Rorabeck C, Bourne R, Poole AR. Damage to type II collagen in aging and osteoarthritis starts at the articular surface, originates around chondrocytes, and extends into the cartilage with progressive degeneration. *J Clin Invest* 1995;96:2859-69.
12. Fitowska A, Ostałowska A, Dobrakowski M, et al. Protein metabolism in the synovial membrane in the hip osteoarthritis. *Pol Orthop Traumatol* 2012;11:77:21-6.
13. Regan E, Flannelly J, Bowler R, et al. Extracellular Superoxide Dismutase and Oxidant Damage in Osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52 (11):3479-91.
14. Regan EA, Bowler RP, Crapo JD. Joint fluid antioxidants are decreased in osteoarthritic joints compared to joints with macroscopically intact cartilage and subacute injury. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008;16:515-21.
15. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002;55:239-49.
16. Hapeta B, Koczy B, Fitowska A, et al. Metabolism and protein transformations in synovial membrane of a knee joint in the course of rheumatoid arthritis and degenerative arthritis. *Pol Orthop Traumatol* 2012;77:1-6.
17. Monboisse JC, Borel JP. Oxidative damage to collagen. *EXS* 1992;62:323-7.
18. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 2007;74:324-9.
19. Yılmaz E, Yılmaz S, Karakurt L, Serin E. Osteoartritte nitrik oksit ve malondialdehid düzeyleri. *Artroplastik Artroskopik Cerrahi Dergisi* 2004;15(1):7-11.
20. Sutipornpalangkul W, Morales PN, Harnroongroj T. Free radicals in primary knee osteoarthritis. *J Med Assoc Thai* 2009;92:268-71.
21. Ostałowska A, Birkner E, Wiecha M, et al. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:139-45.