

ANTİ-İNFLAMATUVAR AJANLARIN NİTRİK OKSİT YANITI ÜZERİNE ETKİLERİ*

Zeynep GÜLAY, Mine YÜCESOY, Nuran YULUĞ

ÖZET

Nitrik oksit (NO), konak immün yanıtından çok gelişimine kadar pek çok süreçte rol alan bir serbest radikal gazdır. Nitrik oksitin yangı gelişiminde de önemli olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda, diklofenak sodyum, tenoksikam, piroksikam ve sodyum salisilat gibi çeşitli anti-inflamatuvar ajanların NO yanıtı üzerine etkileri, fare peritoneal makrofajlarının kullanıldığı bir in-vitro deney sistemi ile incelenmiştir. bu amaçla, fare peritoneal makrofaj kültürleri 1. ve 2. günlerde lipopolisakkarit (LPS; 1µg/ml) ile uyarıldıktan sonra, nitrit düzeyleri belirlenmiştir. Kontrollerde, 1. gün 28.9 ± 12.8 µM ve 2. gün de 35.6 ± 16.1 µM düzeyine ulaşan nitrit miktarlarının, belirtilen ajanların değişen yoğunlukları ile doza bağımlı olarak azaldığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, bulgularımız nonsteroidal anti-inflamatuvar ajanların etki mekanizmaları arasında makrofajlardan nitrik oksit salınımının da yer alabileceğini göstermiştir. Çeşitli hastalıkların tedavisi sırasında anti-inflamatuvar ajanların uygulanması ile bu mekanizmanın farklı yönlerde etkili olabileceği düşünülmelidir.

SUMMARY

Modulation of nitric oxide response by nonsteroidal anti-inflammatory drugs.

Nitric oxide (NO) is a free radical gas that has been show to mediate a diverse set of functions ranging from septic shock to host immune responses. NO has also been implicated as an important mediator of inflammation. In this study, we evaluated the effects of several nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) including diclofenac sodium, tenoxicam, piroxicam, and sodium salicylate on NO production in an in-vitro murine peritoneal macrophage model. The cells were incubated with varying concentrations (1,3,10 mM) of NSAIDs 1 or 2 days prior to lipopolysaccharide (LPS) stimulation (1 µg/ml) and NO production was assessed by nitrite accumulation in culture supernatants. Nitrite production after LPS stimulation which reached to 28.9 ± 12.8 µM on the first, and 35.6 ± 16.1 µM on the second day in the control wells, decreased in a dose dependent manner with varying concentrations of the NSAIDs.

Our results indicate that, the inhibition of NO production by macrophages, represents another mechanism of action for NSAIDs. This mechanism may have altering effects in-vivo when these agents are used for the treatment of different ailments.

* 11. Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (2-6 Haziran 1996, Kuşadası).
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Inciraltı, İzmir.

GİRİŞ

Nitrik oksit (NO) endotelial hücreler, makrofajlar ve hepatositler gibi birçok hücre tarafından üretilen ve konak bağışık yanıtından çok gelişimine kadar pek çok süreçte rol alan bir serbest radikal gazdır (2,5,8). NO, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerince L-arjininden sentezlenir (5). Kalsiyuma bağlı bir enzim olan yapısal NOS izoformu (cNOS), homeostazda görev almaktadır (5,9). Bunun yanı sıra, enzimin makrofajlarda bulunan bir de indüklenebilir izoformu (iNOS) bulunmaktadır (5,9). Bu enzimin aktivitesi ise, yangı, konak bağışık yanıtı ve doku zedesinin tamiri sırasında artmakta ve yüksek düzeyde NO salınımına neden olmaktadır (9). Yangı sırasında NO sentezinin artması ve eritem, ödem gibi bazı klasik yangı bulgularının NOS inhibitörlerince engellenmesi, nitrik oksitin yangı gelişiminde ve yangısal hastalıkların etiopatogenezinde önemli olabileceğini düşündürmektedir (9,14). Romatoid artrit, osteoartrit, ankilozan spondilit gibi yangısal hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların, prostaglandin sentez ve salınımını engelledikleri bilinmektedir (3). Ancak, etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, yangı bulgularının sağaltımında kullanılan bazı non-steroidal anti-inflamatuvar ajanların (diklofenak sodyum, piroksikam, tenoksikam ve sodyum salisilat) NO salınımı üzerine etkilerini fare peritoneal makrofajlarının kullanıldığı in-vitro bir deney sistemi ile incelenmiştir. Böylelikle, bu ajanların anti-inflamatuvar etkilerinin, NO yanıtı ile ilgisinin araştırması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvanları

Peritoneal hücre eldesi için 8-12 haftalık, dişi Swiss-albino fareler kullanılmıştır (n=4).

Anti-inflamatuvar ajanlar

Deneylerimizde diklofenak sodyum (Ciba-Geigy), piroksikam (Deva Ltd.), tenoksikam (Roche) ve sodyum salisilat (Sigma Chem. Comp.) kullanılmıştır. Terapötik plazma konsantrasyonları sırası ile, 0.1-1 mM, 1-3 mM, 0.5-1 mM ve 1-3 mM'a ulaşan bu ajanlar, son konsantrasyonları 1,3,10 mM düzeylerinde olacak şekilde fare peritoneal hücre kültürlerine eklenmiştir.

Peritoneal hücre kültürlerinin hazırlanması ve deney sistemi

Farelerin peritoneal kavitelesinin fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile yıkanmasıyla toplanan peritoneal hücreler, PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra, sayıları 5×10^5 olacak şekilde RPMI 1640 besiyeri (fenol kırmızısı ve antibiyotik içermeyen, %10 fetal kalf serumu "FCS", L-glutamin, 1×10^{-6} M 2-merkaptöetanol eklenmiş) içerisinde süspansiyon edilmiştir (7). Bu süspansiyon 96 çukurlu plastik hücre kültür plaklarına dağıtılmıştır. Plaklar, 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 2 saat inkübe edildikten ve non-adheran hücreler uzaklaştırıldıktan sonra, kontrol çukurlarına sadece RPMI 1640 besiyeri, test çukurlarına ise aynı besiyeri içerisinde değişen konsantrasyonlardaki (1 mM, 3 mM, 10 mM) anti-inflamatuvar ajanlardan eklenmiştir. Her konsantrasyon için üç çukur kullanılmıştır. Anti-inflamatuvar ajanlarla temas süresinin NO yanıtına etkilerinin incelenmesi amacıyla, 1 ve 2 gün inkübasyondan sonra, test ve kontrol çukurlarına 1 µg/ml LPS (*Serratia marcescens* lipopolisakariti, Sigma Chem. Comp.,

St Louis, Mo, ABD) eklenmiştir. Uyarım esnasında bazı çukurlara LPS yanında 1 mM L-NMMA NG monomethyl L-arginine, Sigma) konmuştur. Bir gece 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyon sonrası kültür süpernatantları toplanmıştır.

Nitrit düzeylerinin ölçümü

NO üretimi, bunun stabil bir son ürünü olan nitrit (NO₂) düzeylerinin ölçülmesi ile değerlendirilmiştir (6). Bu amaçla, süpernatantlardan 50 µl alınarak üzerine eşit miktarda Griess ayrırıcı (%1 sülfanilamid / %0.1 naftiletilen diamin dihidroklorid / %2.5 H₃PO₄) ilave edilmiştir. Nitrit konsantrasyonu, renk değişimi standart sodyum nitrit solüsyonununki ile karşılaştırılarak 550 nm dalga boyunda, spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

İstatistiksel testler

Anti-inflamatuvar ajanların LPS ile uyarılan nitrit salınımına etkisi Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi ile değerlendirilmiştir (4).

BULGULAR

Lipopolisakkarit (1 µg/ml) ile uyarılan kontrol kültürlerinde, 1. gün 28.9±12.8 µM ve 2. gün de 35.6±16.1 µM nitrit üretimi saptanmıştır.

Kültürler, 1,3,10 mM diklofenak sodyum ile 37°C'de 24 saat inkübe edildiğinde LPS ile uyarılan nitrit üretiminin sırası ile %6.6 (p>0.05), %14.8 (p>0.05) ve %35.6 (p<0.05) oranında azaldığı ve ön inkübasyon sürelerinin 2 güne çıkarılması ile bu inhibitör etkinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca, bir günlük ön inkübasyon ile ancak suprafarmakolojik dozlarda (10 mM) belirgin olan düşüşün iki günlük terapötik konsantrasyonlarda da görüldüğü belirlenmiştir.

Belirtilen dozlarda piroksikam ile 1 günlük inkübasyon sonucunda LPS ile uyarılan ortalama nitrit miktarlarının doza bağımlı şekilde %2.4-%22.7 oranında, sürenin iki güne uzatılması ile de %10.4-%23.7 oranında düştüğü ancak bu etkinin istatistiksel açıdan önemli olmadığı saptanmıştır.

1,3,10 mM tenoksikam ilavesi ile yine artan dozlarla nitrit yapımındaki düşüşün de arttığı ancak ön inkübasyon süresinin önemli bir değişikliğe yol açmadığı belirlenmiştir.

Sodyum salisilatın da özellikle supra farmakolojik düzeylerde (10 mM) LPS ile uyarılan nitrit düzeylerini etkin bir biçimde azalttığı gözlenmiştir.

Bulgular tabloda gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Romatoid artrit, ülseratif kolit, Crohn hastalığı gibi yangısal hastalıklarda NO yapımının artması ve eritem, ödem gibi yangısal bulguların nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörleri ile ortadan kaldırılabilmesi NO'nun yangı gelişiminde de önemli olduğunu düşündürmektedir.

Salvemini ve arkadaşları (11), NO'nun siklooksijenaz 2 (COX-2) aktivitesini doza bağımlı olarak etkilediğini göstermişlerdir. Ayrıca, endotoksinlerin ve yangısal sitokinler olarak bilinen IL-1, TNF α'nın NO üretimini arttırdığı ve romatizmal hastalıkların etyopatogenezinde rol oynadıkları da bildirilmektedir (1,6).

Tablo. Anti-inflamatuar ajanların peritoneal makrofajlardan nitrik oksit salımmına etkileri.

	1. g ü n*			2. g ü n*		
	Nitrit (µM)	İnhibisyon (%)**	p	Nitrit (µM)	İnhibisyon (%)**	p
Kontrol (Besiyeri)	1.4 ± 0.6			1.7 ± 0.5		
Kontrol+LPS	28.9 ± 12.8			35.6 ± 16.1		
Diklofenak sodyum+LPS						
1 mM	27.0 ± 13.1	6.6	>0.05	31.2 ± 14.2	12.3	<0.05
3 mM	24.6 ± 10.7	14.8	>0.05	29.5 ± 12.8	17.1	<0.05
10 mM	18.6 ± 7.4	35.6	<0.05	19.2 ± 12.1	46.2	<0.05
Piroksikam+LPS						
1 mM	28.2 ± 12.7	2.4	>0.05	31.9 ± 15.4	10.4	>0.05
3 mM	26.4 ± 12.8	8.6	>0.05	30.9 ± 16.1	13.2	>0.05
10 mM	20.9 ± 11.3	22.7	>0.05	27.2 ± 11.3	23.6	>0.05
Tenoksikam+LPS						
1 mM	28.9 ± 10.2	-	>0.05	32.2 ± 16.0	9.6	>0.05
3 mM	25.1 ± 11.2	13.1	>0.05	29.7 ± 14.3	16.6	>0.05
10 mM	19.2 ± 9.7	33.5	<0.05	27.6 ± 13.2	22.5	>0.05
Sodyum salisilat+LPS						
1 mM	29.0 ± 11.5	-	>0.05	35.4 ± 15.8	0.6	>0.05
3 mM	26.8 ± 12.7	7.3	>0.05	28.3 ± 15.7	20.5	>0.05
10 mM	22.5 ± 22.1	22.1	<0.05	24.7 ± 12.1	32.0	<0.05

* Anti-inflamatuar ajanlar ile inkübasyondan sonra LPS ile uyarı günü

** LPS ile uyarılan kontrole göre nitrit düzeyinde azalma yüzdesi

Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar, yangı ve buna bağlı ağrı gelişiminde önemli olan prostaglandin sentezi ve salınımını engellemektedirler (3,13). Ancak bu aktiviteleri, tüm anti-inflamatuvar etkinliklerini açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Örneğin, sodyum salisilat analjezik, antipiretik, anti-inflamatuvar özellikle olmasına rağmen siklooksijenazlar üzerine etkisizdir (3). Bu nedenle, başka etki mekanizmaları olabileceği belirtilmektedir (3). Biz de çalışmamızda, bu ajanların NO yanıtı üzerine etkilerini araştırdık. İncelenen ajanlar arasında diklofenak sodyumun terapötik plazma düzeylerinde iki günlük inkübasyon sonrasında, NO üretimini önemli ölçüde azalttığı, tenoksikam ve sodyum salisilatın ise ancak suprafarmakolojik düzeylerde benzer etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Amin ve arkadaşları (1), aspirin ve hidrokortizonun indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS) ve nitrit yapımını önemli ölçüde azalttığını, sodyum salisilat ile ise bu etkinin ancak suprafarmakolojik konsantrasyonlarda görülebildiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada, NO salınımının kısmi inhibisyonun yangısal yanıtı baskılamakta yeterli olabileceği belirtilmektedir (1).

Son yıllarda, invazif grup A streptokok infeksiyonları gibi infeksiyonlar sırasında nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların kullanımının şok ve çoklu organ yetmezliğine neden olabildiği de bildirilmektedir (10,12). Anti-inflamatuvar ajanlar, ateş düşürücü ve yangı giderici etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılmalarına rağmen, kemotaksis ve fagositoz gibi bazı bağışık işlevleri de bozabilmekte, ayrıca TNF üretimini arttırabilmektedirler. TNF üretimindeki bu artışın feed-back inhibitör işlevi gösteren PG E₂'nin yapımını önlemelerine bağlı olabileceği, bu nedenlerle infeksiyon seyrinde ancak antibiyotik tedavisine başlandıktan sonra anti-inflamatuvar ajan kullanılmasının güvenli olacağı belirtilmektedir (12).

Çalışmamızda da görüldüğü gibi, incelediğimiz anti-inflamatuvar ajanlar doğal immünitenin bir parçası olan NO üretimini de etkilemektedirler. NO, tümör hücreleri ve çeşitli patojen mikroorganizma türlerine karşı sitotoksik etkilidir. Bu nedenle, NO yapımının bozulması sonucunda, bazı infeksiyonların daha invazif seyredebileceği düşünülmelidir. Bunun yanı sıra, NO'nun vazodilatatör etkisi ile septik şok gelişimine neden olan mediatör olduğu da bildirilmektedir (2,5,8). Böyle bir durumda ise, NO üretiminin önlenmesi gerekmektedir. Bu işlevsel çeşitlilik nedeniyle, NO sistemi ve bunu etkileyen çeşitli ajanlara ilgi giderek artmaktadır.

Sonuç olarak, bulgularımız non-steroidal anti-inflamatuvar ajanların etki mekanizmaları arasında, makrofajlardan NO salınımının baskılanmasının da yer alabileceğini göstermektedir. Çeşitli hastalıkların tedavisi sırasında anti-inflamatuvar ajanların uygulanması ile bu mekanizmanın farklı yönlerde etkili olabileceği düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

- 1- Amin AR, Vyas P, Attun M, Leszczynska-Piziale J, et al: The mode of action of aspirin-like drugs: effect on inducible nitric oxide synthase, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7926 (1995).
- 2- Anggard E: Nitric oxide: mediator, murderer and medicine, *Lancet* 343: 1119 (1994).
- 3- Clark WG, Brater DC, Johnson AR: Nonsteroidal anti-inflammatory antipyretic analgesics, "Clark WG, Brater DC, Johnson AR (eds): *Goth's Medical Pharmacology*, 3 baskı" kitabında s.364, CV Mosby Co, St Louis (1988).
- 4- Dawson-Saunders B, Trapp RG: *Basic and Clinical Biostatistics*, 2. baskı, Appleton and Lange, Connecticut (1994).

- 5- De Groode, Fang FC: NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide, *Clin Infect Dis 21 (Suppl 2)*: S162 (1995).
- 6- Ding AH, Nathan C, Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production, *J Immunol 141*: 2407 (1988).
- 7- Mishell BB, Shigi SM: *Selected Methods in Cellular Immunology*, 3rd ed, WH Freeman and Co, New York (1980).
- 8- Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J 6*: 3051 (1992).
- 9- Nathan C, Xie Q: Nitric oxide synthases: roles, tolls, controls, *Cell 78*: 915 (1994).
- 10- Rimailho A, Riou B, Richard C, Auzepy P: Fulminant necrotizing fasciitis and non-steroidal anti-inflammatory drugs, *J Infect Dis 155*: 143 (1987).
- 11- Salvemini D, Misko TP, Masferrer J L, Seibert K, Currie MG, Needleman P: Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes, *Proc Natl Acad Sci USA 90*: 7240 (1993).
- 12- Stevens DR: Could non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) enhance the progression of bacterial infections to toxic shock syndrome, *Clin Infect Dis 21*: 977 (1995).
- 13- Vane J: Towards a better aspirin, *Nature 367*: 215 (1994).
- 14- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, et al: Inducible isoform of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation, *Proc Natl Acad Sci USA 90*: 2046 (1994).