



İDRAR HIPOKSANTİN, KSANTİN DÜZEYLERİNDE YAŞ VE CİNSİYETE BAĞLI DEĞİŞİKLİKLER

Ceyda KABAROĞLU¹, Zuhâl PARILDAR¹, İnci GÜNER, Dilek ERDENER¹, Sara HABİF¹,
Işıl MUTAF¹, Nevbahar TURGAN¹,

AGE and GENDER DEPENDENT ALTERATIONS ON URINARY HYPOXANTHINE, XANTHINE LEVELS

Özet: Pürin nükleotidleri bir dizi tepkime sonucunda hipoksantin, ksantin ve son ürün olarak da ürik aside yıkılmaktadır. İskemi ATP sentezini azaltmakta, yıkılımını arttırmakta olup, pürin metabolizması bu nedenle iskemik hasarda büyük önem taşımaktadır. Bu metabolizmada son ürünler olan hipoksantin ve ksantin iskeminin ekstraellüler markırları olarak kabul edilmektedirler. Bu ara ürünler, bugüne kadar perinatal asfiksi, serebral iskemi, akut solunum distressi sendromu ve preeklampsi gibi çeşitli klinik durumlarda çalışılmıştır. Bu çalışmada idrar hipoksantin ve ksantin düzeylerinin yaş ve cinsiyete bağlı olarak değişiklik gösterip göstermediğinin araştırılması amaçlandı. 120 sağlıklı olgu (15-69 yaş, 87 kadın, 33 erkek) yaşlarına göre beş ayrı gruba ayrıldı ve herhangi bir saatte verilen idrar örneklerinde hipoksantin ve ksantin düzeyleri HPLC ile tayin edildi. Yaş ve cinsiyete bağlı olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı, ancak hipoksantin ve ksantin atılımı arasında pozitif bir korelasyon saptandı. Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler sağlıklı kişilerde hipoksantin ve ksantin düzeylerinin yaş ve cinsiyete bağlı olarak değişmediğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hipoksantin, ksantin, yaş, cinsiyet

Summary: Purine nucleotides are degraded through a regulated series of reactions with the formation of hypoxanthine, xanthine and finally uric acid. Ischemia leads to increased ATP degradation and decreased ATP synthesis and purin metabolism is of great importance in the ischemic damage. Among the end products of this metabolism, hypoxanthine and xanthine are extracellular markers of ischemia. The measurement of this intermediates have been studied extensively in many clinical conditions including perinatal asphyxia, cerebral ischemia, acute respiratuar distress syndrome and preexlampsia. The aim of this study was to investigate if there is any variation in the urinary hypoxanthine and xanthine levels according to age and gender. For this purpose 120 healthy subjects (15-69 yr, 87 females, 33 males) were divided into five different age groups. Urine samples were collected randomly and hypoxanthine and xanthine levels were determined by HPLC. No significant differences were observed according to age and gender. There was a significant correlation between hypoxanthine and xanthine levels. In conclusion, the results of this study suggested that urinary hypoxanthine and xanthine levels are not dependent on age or gender.

Key Words: hypoxanthine, xanthine, age, gender

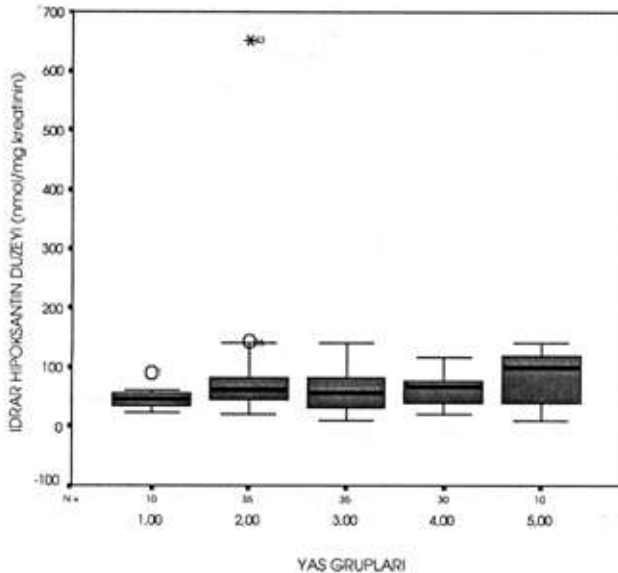
GİRİŞ

Pürin metabolizması nükleotid havuzlarının kontrolü ve geri dönüşümündeki yeri nedeni ile, kanser, viral hastalıklar gibi klinik durumlarda ve bazı kalıt-

sal hastalıklarda büyük önem taşımaktadır (1,2,3). Pürin metabolizmasında yıkım ürünleri olan hipoksantin ve ksantin hücre membranlarını geçerek ekstrasellüler sıvılarda birikebilmekte ve akut respiratuar distress sendromu, perinatal asfiksi gibi bazı klinik durumlarda ekstrasellüler iskemi markırları olarak

kabul edilmektedirler(4,5). Doku hipoksisine bağlı olarak ATP'nin AMP'e yıkımı artmakta ve oksijen yokluğunda yeniden sentez edilememesi nedeni ile, inozin üzerinden hipoksantin, ksantine yıkılmaktadır (4,6,7). Ksantin dehidrogenaz/oksidaz, vücutta yaygın olarak dağılmış olan bir enzim olup endojen pürinlerin yıkımında rol almakta ve sırası ile hipokantinden ksantin, ksantinden de ürik asid sentezini katalizlemektedir. Normal koşullarda dehidrogenaz formunda olan bu enzim, elektron alıcısı olarak $NA-D^{+}$ 'i kullanırken, hipoksik dokuda ve iskemi/reperfüzyon hasarında oksidaz formuna dönüşmekte ve elektron alıcısı olarak oksijeni kullanarak, O_2^{-} ve H_2O_2 radikallerini oluşturmaktadır (7,8). Hipoksi/reperfüzyon, iskemik koşullar, çeşitli sitokinler ksantin dehidrogenaz/oksidaz üretimini ve dehidrogenaz formunun oksidaz formuna dönüşümünü arttırmaktadırlar. Hipoksantin, ksantin birikimi de enzimin oksidaz formuna dönüşümünü arttırmaktadır (4,7). Başlangıçta geri döndürülebilir bir olay olan bu dönüşüm, bir süre sonra proteoliz nedeni ile geri döndürilemeyen bir evreye gelmektedir.

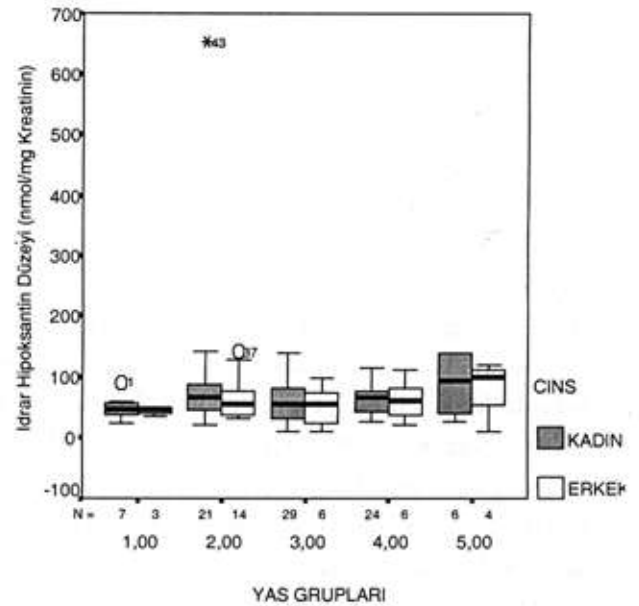
Şekil 1: (a) Kadın + erkek



Ekstrasellüler sıvılarda bulunan hipoksantin ve ksantin düzeyleri, oksidatif stres ile ilişkili perinatal asfiksi, akut respiratuvar distress sendromu, serebral iskemi, preeklampsi gibi çeşitli klinik durumlarda yay-

gın olarak araştırılmış ve iskemi göstergeleri olarak kullanılmıştır (6,8,9). İskemi düzeylerini 2-3 gün gibi uzun sayılabilecek bir süre boyunca gösterebilmeleri nedeni ile kan yerine idrar örneklerinde bakılması tercih edilen bu parametreler, ayrıca, multipl skleroz, miyelopati, inme, epilepsi ve viral menenjitte glutamat aracılığı ile oluşan eksitotoksiteyi belirlemek üzere beyin omurilik sıvısında (10), neonatal asfiksiyi belirleyebilmek için de amnion sıvısında ölçülebilmektedirler. Bu ön bilgilerin ışığı altında, bu çalışmada, idrar hipoksantin ve ksantin düzeylerinin yaş ve cinsiyete bağlı olarak bir değişiklik gösterip göstermediğinin araştırılması ve kendi toplumumuzdaki referans değerlerini belirleyecek bir çalışmanın başlatılması amaçlandı.

Şekil 1: (b) Kadın ve erkeklerde ayrı ayrı yaşa bağlı idrar hipoksantin düzeyleri.



ARAÇ-GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Laboratuvarına ayaktan başvuran, bilinen herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan, yaşları 15-69 arasında değişen (tüm grubun yaş ortalaması 36.79, kadın ve erkeklerin yaş ortalaması sırası ile



37.98 ve 35.60) yüz yirmi (87 kadın; 33 erkek) sağlıklı olgu dahil edildi. Olgular yaşlarına göre, grup 1 (6-15 yaş, n=10), grup 2 (16-30 yaş, n=35), grup 3 (31-45 yaş, n=34), grup 4 (46-60 yaş, n=29) ve grup 5 (>61 yaş, n=12) olmak üzere 5 ayrı gruba ayrıldı. Olgulardan, sağlık durumları, sigara ve alkol tüketimi, pürinden zengin gıda tüketimi, fiziksel aktiviteleri gibi yaşam tarzları ve ilaç kullanımları ile ilgili olarak ayrıntılı bilgi alındı. Tüm olgulara, yapılacak olan tetkikler ile ilgili bilgi verilerek, onayları alındı. Gece açlığı sonrasında alınan kan örneklerinden santrifüj sonrasında elde edilen serum, aynı gün içinde üre, ürik asid ve kreatinin tayininde kullanılırken, alınan idrar örneklerinde ürik asid, kreatinin düzeyleri tayin edildi ve belirli miktarda idrar örneği, hipoksantin ksantin çalışılmak üzere, analiz süresine kadar -20°C'de saklandı.

YÖNTEM

Serum üre, ürik asid ve kreatinin düzeyleri ile idrar ürik asid ve kreatinin düzeyleri standard laboratuvar yöntemleri ile Technicon Dax 48 otomatik analizöründe (Bayer Diagnostics, Toshiba, Tokyo, Japan), idrar hipoksantin, ksantin düzeyleri ise HPLC'de UV dedeksiyonu ile Kurtz ve arkadaşlarının yürürlüğe koyduğu yöntemin modifiye edilmesi ile çalışıldı (11). 1 ml idrar örneği 0.45 µm por çapındaki fitrelerden geçirildikten sonra, distile su ile 1/10 oranında sulandırıldı ve HPLC'ye uygulandı. Çalışma için EC 150/4.6 Nukleozil 100-5 C18 5µm kolon (Macherey_nagel, Düren, Germany) kullanıldı. Mobil faz olarak 20 µmol potasyum fosfat tampon (pH 3.0) ile 40° c kolon sıcaklığında, 1 ml/dk'lık akış hızında izokratik bir ayırım sağlandı. Hipoksantin ve ksantin ölçümü 254 nm'de, UV dedektör ile yapıldı.

İSTATİSTİK

Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık, Kruskal-Wallis 1-Way Anova testi kullanılarak değerlendirildi. Korelasyonlar için Pearson korelasyon analizi kullanıldı. İki grup arasındaki farkın belirlenmesinde Mann-Whitney U non-parametrik testi kullanıldı ve

p<0.005 düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Diğer sonuçların değerlendirilmesinde ise p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Tablo 1'de tüm yaş gruplarına ait klinik veriler ve istatistiksel anlamlılık dereceleri özetlenmektedir. Şekil 1 ve 2'de idrar hipoksantin ve ksantin düzeyleri yalnızca yaş gruplarına, hem yaş grupları hem cinslere göre şematize edilmektedir. İdrar örneklerindeki hipoksantin ve ksantin düzeylerinde yaşa bağlı olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. Ancak 2. grupta yer alan erkeklerde ksantin düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu. İdrar örneklerinde hipoksantin, ksantin düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptandı (r=0.571, p<0.0001).

TARTIŞMA

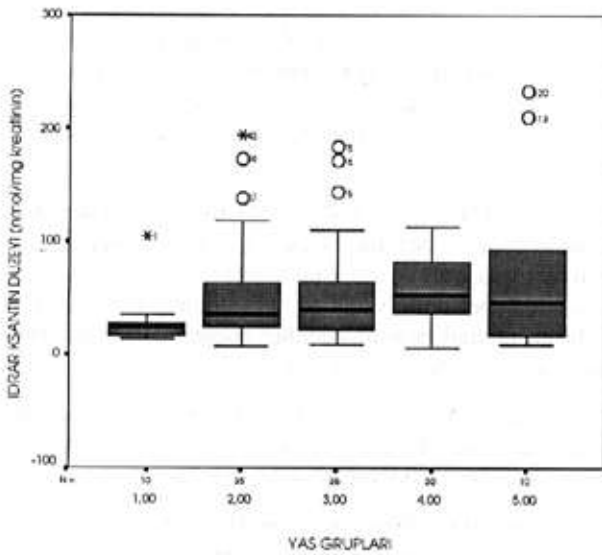
Pürin bazlarının ksantin oksidaz yolu ile metabolize edilmeleri, serbest radikal oluşumunda önemli kaynaklardan birini oluşturmaktadır. Doku hipoksisi gelişen durumlarda ATP sentezi bozularak ADP, AMP, adozin, inozin ve hipoksantine yıkılmaktadır. Hipoksantin, reperfüzyon-reoksijenasyon aşamasında, substrat olarak moleküler oksijen, hipoksantin ve ksantini kullanan ksantin oksidaz aracılığı ile ksantin ve ürik aside yıkılırken, süperoksid radikali de üretilmektedir. Süperoksid radikali hidrojen peroksid ile etkileşerek lipid peroksidasyon basamaklarının başlamasında ilk adımı oluşturan hidroksil radikalini üretmektedir. Beyin dokusu gibi doymamış yağ asitlerinden zengin dokular, bu peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olup, erken evrede iskeminin belirlenebilmesi, bu yolağın bazı ilaçlarla durdurulabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (6).

Hipoksantin ve ksantin, 2-3 gün gibi bir süre boyunca idrar atılımlarının devam etmesi ve iskeminin daha uzun bir süre boyunca saptanabilmesini sağladığı için idrar örneklerinde tayin edildi. Böbrek iş-

Tablo 1: Yaş gruplarına ilişkin klinik veriler (Sonuçlar ortalama \pm SD olarak verilmiştir)

	Grup 1 (6-15 yaş)	Grup 2 (16-30 yaş)	Grup 3 (31-45 yaş)	Grup 4 (46-60 yaş)	Grup 5 (>61 yaş)
N	10	35	35	30	10
Yaş (yıl)	14.5 \pm 0.97	23.82 \pm 4.23	38.54 \pm 4.13	49.6 \pm 3.54	66.40 \pm 3.06
Cins (K/E)	7 / 3	21 / 14	29 / 6	24 / 6	6 / 4
Serum Kreatinin (mg/dL)	1.11 \pm 0.13	1.17 \pm 0.28	1.10 \pm 0.26	1.12 \pm 0.31	1.14 \pm 0.15
Serum ürik asit ^{a, b} (mg/dL)	4.89 \pm 1.78	3.26 \pm 1.42	2.73 \pm 1.23	2.97 \pm 1.27	4.11 \pm 1.46
İdrar Hipoksantin (nmol/ mg kreatinin)	47.92 \pm 18.31	83.32 \pm 104.13	59.55 \pm 35.29	63.20 \pm 25.81	86.16 \pm 46.86
İdrar Ksantin (nmol/mg kreatinin)	30.5 \pm 26.74	52.92 \pm 45.79	52.66 \pm 43.25	55.51 \pm 28.34	78.97 \pm 79.98
İdrarda ürik asit ^c (mg/mg kreatinin)	0.46 \pm 0.16	0.42 \pm 0.03	0.55 \pm 0.12	0.45 \pm 0.03	0.45 \pm 0.14

a: Grup 3 > Grup 1 ($p < 0.005$) b: Grup 4 > Grup 1 ($p < 0.005$)
c: Grup 2 > Grup 3, Grup 5 ($p < 0.005$)



Şekil 2: (a) Kadın + erkek

levlerindeki bir azalmanın eşlik ettiği durumlarda, idrar atılımı da etkilenebileceğinden sonuçlar kreatinin ile orantılanarak ifade edildi. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, hipoksantin ve ksantin düzeyleri, yaş ve cinsiyete bağlı olarak bir değişiklik göstermemektedir. Ancak 2. grupta (16-30 yaş), erkek olgularda ksantin düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Literatür bilgilerinde hipoksantin , ksantin atılımının yaş ile artış gösterdiği, ayrıca kişinin fiziksel aktivitesi ile de yakın derecede ilişkili olduğu bil-

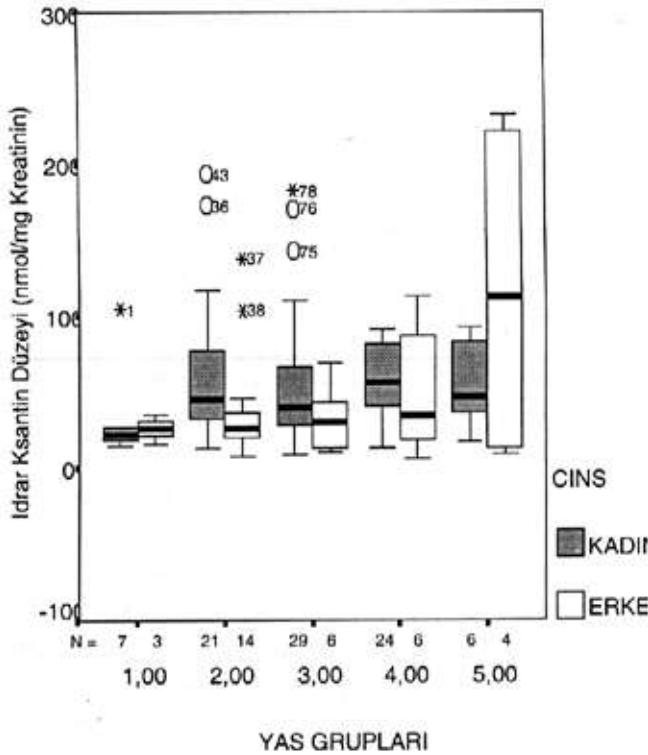
dirilmektedir (12,13). 15-30 yaş grubundaki erkeklerle

rin daha fazla fiziksel aktivite gösteriyor olmaları bu yükselmeye rol almış olabilir. 65 yaşın üzerindeki olgularda hipoksantin, ksantin düzeylerinin diğer gruplardan yüksek olmasına karşın, anlamlı olmamasının nedeni, standard sapmalarının yüksek olması ve bu grupta yer alan olgu sayımızın çok olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Çalışmada ayrıca hipoksantin ve ksantin düzeyleri arasında anlamlı bir pozitif korelasyon belirledik. Ksantin atılımının guaninden önemli derecede etkilendiği bildirilmesine karşın (14) biz bu yönde bir sonuç elde etmedik. Chen ve arkadaşlarının, ürik asit / kreatinin oranının perinatal asfiksiyi en az hipoksantin-ksantin /kreatinin oranı kadar doğru olarak belirlediğini bildirmelerine karşın (15) biz ürik asidin idrar düzeyleri ile hipoksantin, ksantin arasında da anlamlı bir korelasyon bulamadık. Bu durum, ürik asit düzeylerinin pürin metabolitlerinin yıkımı kadar, de novo pürin sentezi artışından da etkilenmesi ile açıklanabilir. Ancak, iskemik durumlarda ürik asit / kreatinin oranı ile hipoksantin-ksantin /kreatinin oranı arasında bir korelasyon olup olmadığını ayrıca incelenmesi gerekir düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak, bu çalışmada ekstrasellüler sıvılarda kolay uygulanabilir bir HPLC yöntemi ile idrar hipoksantin, ksantin düzeylerinin ölçülmesi sonucunda, yaş ve cinsiyete bağlı bir değişiklik belirlenmemiştir.



Şekil 2: (b) Kadın ve erkeklerde ayrı ayrı yaşa bağlı idrar ksantin düzeyleri.



KAYNAKLAR

1. Curto R, Voit EO, Sorribas A, Cascante M. (1997) Validation and steady-state analysis of a power-law model of purine metabolism in man. *Biochem J.* 324: 761-775.
2. Valik D, Jones JD. (1997) Hereditary disorders of purine and pyrimidine metabolism: identification of their biochemical phenotypes in the clinical laboratory. *Mayo Clin Proc.* 73(2): 719-25.
3. Safranow K, Machoy Z, Cicchanowski K. (2000) Analysis of purines in urinary calculi by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem.* 286(2): 224-30.
4. Quinlan GJ, Lamb NJ, Tilley R, Evans TW, Gutteridge MC. (1997) Plasma hypoxanthine levels in ARDS: Implications for oxidative stress, morbidity and mortality. *Am J Crit Care Med.* 155: 479-84.
5. Chen HJ, Yau KI, Tsai KS. (2000) Urinary uric acid/creatinine ratio as an additional marker of perinatal asphyxia. *J Formos Med Assoc.* 99(10): 771-4.
6. Marro PJ, Baumgart S, Delivoria-Papadopoulos M, Zirin S, Corcoran L, McGaurn SP, Davis LE, Clancy RR. (1997) Purine metabolism and inhibition of xanthine oxidase in severely hypoxic neonates going onto extracorporeal membran oxygenation. *Pediatr Res.* 1(4 Pt 1):513-20.
7. Many A, Hubel CA, Roberts JM. (1996) Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *Am J Obstet Gynecol.* 174(1 Pt 1):288-91.
8. Fellman V, Raivio KO. (1997) Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatr Res.* 41: 599-606.
9. Saugstad OD. (1996) Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta Paediatr.* 85:1-4.
10. Stover JF, Lowitzsch K, Kempinski OS. (1997) Cerebrospinal fluid hypoxanthine, xanthine and uric acid levels may reflect glutamate mediated excitotoxicity in different neurological diseases. *Neurosci Lett.* 238(1-): 25-8.
11. Kurtz TW, Kabra PM, Booth BE, Al-Bander HA, Portale AA, Serena BG, et al. (1986) Liquid chromatographic measurements of inosine, hypoxanthine and xanthine in studies of fructose-induced degradation of adenine nucleotides in humans and rats. *Clin Chem.* 32:782-6.
12. Harkness RA. (1988) Hypoxanthine, xanthine and uric acid in body fluids, indicators of ATP depletion. *Journal of Chromatography.* 429: 255-78.
13. Chung HY, Song SH, Kim HJ, Ikeno Y, Yu BP. (1999) Modulation of renal xanthine oxidoreductase in aging: gene expression and reactive oxygen species generation. *J Nutr Health Aging.* 3(1): 19-23.
14. Harkness RA, Coade SB, Walton KR, Wright D. 1983 Xanthine oxidase deficiency and 'Dalmatian' hypouricemia: incidence and effect of exercise. *J Inher Metab Dis.* 6(3): 114-20.
15. Chen HJ, Yau KI, Tsai KS. (2000) Urinary uric acid / creatinine ratio as an additional marker of perinatal asphyxia. *J Formos Med Assoc.* 99(10): 771-4.