

# İNFLAMASYONDA NİTRİK OKSİT YANITI

Hüseyin BASKIN

Nitrojenin reaktif oksidleri, 1980'li yılların sonuna kadar *Achromobacter cycloclastes*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus halodenitrificans...* (14,23,46) gibi doğada yaygın olarak bulunan bakteri türleri tarafından üretilen ve yalnızca akciğer hastalıklarını alevlendiren ya da yiyeceklerin korunmasında kullanılan maddeler olarak bilinirdi (33). Bu yıllarda yapılan çalışmalarдан elde edilen sonuçlar, nitrik oksit (NO) ile ilgili disiplinlerarası araştırmaları tetikledi. Bu sonuçlara göre NO, memeli hücrelerinin bilinen biyoaktif salgı ürünlerini içinde en düşük molekül ağırlığını taşımaktaydı. Yüksek kimyasal etkinliğinin anlamı ise, yarı ömrünün kısalığı ve ilişkilerindeki özgüllüğünün minimal olmasıydı (33). İlginç olan bir başka araştırma sonucu, bu çok basit ve hızla kaybolup giden karışık reaktanın nöroiletim ile damarsal tonüs mekanizmalarını kontrol edebileceğini gösterdi (21). Yine çok ilginç bir başka sonuç da, bu maddenin mikropları ve tümör hücrelerini yok edebilmesiydi (31,44). Bu aşamalardan sonra bilim adamları kendilerine memeli hücrelerinin NO'su nasıl ürettiğini, bu kadar çok ve karışık fizyolojik mekanizmayı nasıl harekete geçirebildiğini sormaya başlıdilar. Bu konuya 1981-1986 yılları arasında 10 bilimsel yayın kaynak olurken, 1987-1992 yılları arasında bu sayı 500'ü buldu ve daha sonra da bu sayılar katlanarak, çalışma mekanizmaları açıklandıka da farklı alanlara ve ortak çalışmalara yayılarak bugüne gelindi.

Araştırmalarda başlangıçlarına gidersek, 1980'li yıllarda karsinogenezin analizi çalışmalarında, memeli hücrelerinin nitrojenden inorganik oksitler oluşturduğu bulundu. Da-ha düşük nitratlı diyetle beslenen insanlarda, endojen bir nitrat sentezi olduğu bulundu (18). Normal koşullar altında, insanlarda yaklaşık 1mmol/gün endojen bir nitrat sentezi olduğu bilinmekteydi (47). Bu sentezin ilk anda barsakljların mikrobiyal metabolizması sonucunda ortaya çıktıği düşünüldüse de, daha sonra "germ-free" hayvanlarda memeli orijinli olduğu gösterildi (16). Yine insan deneklerde yineleyen infeksiyonlarda idrarla atılan nitratın keskin biçimde arttığı (18), sıçanlar ve farelerde de bu artışın inflamatuar, infeksiyöz maddeler injekte edildiğinde taklit edildiği görüldü (16).

İlerleyen araştırmaların bir başka kolunda da, aktive olmuş fare makrofajlarının solunu-numu baskılıyıcı ve sitotoksik etkisinin biyokimyasal nedenleri araştırılırken makrofajların demir eksikliği ve demir-sülfat enzimlerinin baskılanmasıyla tümör hücreleri ve fungslarda oksidatif bir hasar oluşturduğu kanıtlandı (20,34). Hücre dışındaki ortamda bulunan L-arjinin ise bu tür sitotoksik bir etkide gerekli ve yeterli bir metabolitti (27,43,45). Bu sitotoksik etki ile ilgili çalışmalarla kısa sürede helmintler, protozoonlar ve mikrobakterilerle ilgili çalışmalar eklendi (34). Çok önemli bir başka araştırma sonucunda ise, nitrojenin reaktif oksitlerinin üretiminin, nitrogene bağlı L-arjinin analoglarıyla baskılandığı bulundu. Bu tür analogların kullanımı NO araştırmalarında tam anlamıyla bir köşe taşı oluşturdu (2,19,24,25). Vazodilatasyonla ilgili araştırmalarda NO'in trombosit agregasyonunu baskıladığı (29) ve damar genişlemesine neden olduğu (15) saptandı. Bunun üzerine endotel-yumdan salınan labil, damar gevşetici maddeye Endotelyumdan Kaynaklanan Gevşetici Etken (Endothelium-Derived Relaxing Factor=EDRF) adı verildi. İki farmakoloji grubu bu konuda yaptıkları çalışmalar sonucunda bu iki maddenin aslında, NO adı altında birleştirilebileceğini gösterdi. Çünkü her iki madde de aynı özellikleri taşıyordu (22,36).

Aktive makrofajların son derecede reaktif bir ürünü olan NO, gaz formunda bir düzenleyicidir. Anstabildir ve etkisi kisadır. Oluşumundan 5-10 saniye sonra su ve oksijen ile, nitrit ve nitratlara okside olur (3). L-arjinin'in bir guanidino nitrojeni beş elektronluk bir oksidasyona girer ve bir N-hidroksil-L-arjinin ara ürün yoluyla gaz formunda bir radikal olan NO'yu verir. Nikotin Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) bu ara ürünün oluşumu için ve ileri oksidasyon için de bir elektron verir. Her iki basamak da, Flavo Adenin Dinükleotid (FAD) ve Flavo Mono Nükleotid (FMN) içeren bir enzim olan Nitrik Oksit Sentaz (NOS) ile katalizlenir. Özet olarak L-arjinin, oksijen ve NADPH yardımcı substratlar; FMN, FAD, hem ve tetrahidrobiyopiterin yardımcı faktörler ve; NO ile L,sitrülin de bir dioksigenaz olan NOS ile katalizlenen bir reaksiyonun yan ürünleridir (32).

Iki tip NOS vardır: temel (constitutive) tip (cNOS) ve; lipolisakkardır (LPS) ve sitokinlerin inflammatuar lökositleri uyarmasıyla üretilen induklenebilir (inducible) tip (iNOS). cNOS sitozoliktir, Ca<sup>2+</sup>/kalmoduline bağımlıdır, glukokortikoidlerden etkilenmez ve reseptör veya fizyolojik uyarımlar sonucunda kısa süreli NO üretir. Hücresel kaynakları endotelyal hücreler ve bazı merkezi nöronlar, pankreas adacıklarındaki beta hücreleri ile renal makula densa hücreleridir. iNOS sitozoliktir, Ca<sup>2+</sup>dan bağımsızdır, diğer yardımcı faktörler gibi tetrabiyopiterine gereksinim duyar, üretimi glukokortikoidlerle baskılanır ve hücresel kaynakları makrofajlar, karsinoma hücreleri, inflammatuar nötrofiller ve astrositlerdir (33).

Biyolojik sistemlerde NO'in kısa yarı-ömürü doğrudan tanınmasında problem oluşturur. NO biyosentezi yaklaşık olarak 12 saatlik bir induksiyon zamanına gereksinim duyan ve en az 3 gün süren stabil bir ürün olan nitritin birikimiyle tespit edilebilir. NO gazı, oluşumundan birkaç saniye sonra nitrit ve nitratlara dönüsür. Söz konusu kimyasal olaya dayanarak yapılacak deneylerde nitrit birikimi değerlendrilerek NO yanıtını üzerine yorum yapmak mümkünündür. Nitrit, son ürün olarak bir kromoforun oluştuğu ve klasik olarak "Griess Reaksiyonu" olarak bilinen bir reaksiyon sonucunda tespit edilebilir (17).

Aktive olan makrofajlar, bakteri ve protozoonlar gibi mikroorganizmalara karşı özgül olmayan sitotoksik bir aktivite gösterirler (39). Benzer biçimde mikroorganizmalar ve LPS uygulaması da makrofajların, neoplastik hücrelere karşı sitotoksitese gösterecekleri şekilde davranışlarını değiştirir (35). Makrofajlar NO salımında işlevleri bilinen ve geniş araştırma konusu olmaya devam eden sitokinlerin etkileri altında dayanırlar. Bilinen ilk mekanizma, interferon-gama (IFN) ile "Tumor Necrosis Factor"-alfa (TNF-alfa)'nın sinerjistik olarak üretimini artırdığıdır (1). Deneyel uygulamalarda anti-TNF-alfa'nın NO üretimini yarı yarıya azalttığı görülmüştür (8). Ayrıca interleukin-1 (IL-1), IL-4, IL-10, IL-12 NO üretimine destek olurken (30), IL-13 üretimi baskılamaktadır (11).

Endojen NO'in kedi mezenterik venlerindeki endotelyuma, lökositlerin adezyonuna tonik bir baskılayıcı etki yaptığı görülmüştür. NOS inhibitörlerinin uygulanması nötrofillerdeki CD11/CD18 adezyon moleküllerinin sayısını arttırmış, aynı zamanda nötrofillerin damar duvarlarına tutunmalarını ve damar dışı dokuya göçlerini arttırmıştır (26). Bir başka deneyel çalışmada, LPS'e bağlı hepatotoksitese, barsak doku hasarı ve damar geçirgenliği NO inhibitörlerince baskılanmış ve NO donörü S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) ile patolojik hasar geri döndürülmüştür (9). Makrofajlardan kaynaklanan NO, yalnızca hücre içi parazitleri (41) ve neoplastik hücreleri öldürmekle kalmaz, aynı zamanda özgül lenfosit yanıklarının gelişimini de sağlar (33). Aktive olan makrofajlar, NO ve sitokinlerin salımını yoluyla bağışık yanıkları artırır veya baskılar. NO'in makrofajlardan kendiliğinden salımı ile lökositler, makrofajlardan kaynaklanan sitokinlere karşı duyarsızlaşabilirler (33).

Inflammatuar ve infeksiyöz bozuklıkların patogencinde NO merkezi bir rol oynar.

maktadır. NO'in toksisitesinin, süperoksid ile reaksiyonu sonucunda potent bir oksidan olan peroksinitrit vermesi sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Ancak incinmiş dokularda peroksinitritin rolü, genellikle 3-nitrotirozinin taranmasına dayanır. Yapılan deneysel bir çalışmada NO metabolizmasının temel son ürün olan nitritin, inflamatuar mediyatörler olan hipoklor asid ve miyeloperoksidaz ile, nitril klorid ve nitrojen dioksid oluşumu üzerinden tirozin nitrasyonuna yardımcı olduğu gösterilmiştir. Bu bilgi NO'in inflamatuar mekanizmayı düzenlediğini de göstermektedir (12).

Nitrik oksidin varlığı günümüzde insan granulomları ve histiositik reaksiyonlarda (13), *Helicobacter pylori* infeksiyonlarına bağlı prekanseröz gastritler de dahil olmak üzere bütün gastritlerde (38), selektif oligodendrosit ölümüne bağlı inflamatuar demiyelinizasyonda (42), oftalmatolojide üveitlerin fizyopatolojisinde (37), tip 1 diabetin oluşturduğu hayvan modellerinde beta hücre yıkımında (40), yine insanlarda görülen osteoartritlerde (4) kanıtlanmıştır. Deneysel otoimmun ansefalomyelitin yer aldığı bir çalışmada selektif bir iNOS inhibitörü olan aminoguanidin (AG) kullanıldığından, inflamasyon ve demiyelinizasyon azaltılarak, ansefalomyelitin gidişinden korunulmuştur. AG, merkezi sinir sistemindeki inflamatuar lezyonlarda nitrozotirozin sunumunu azaltmıştır (10). Yine deneysel oluşturulan bir osteoartrit çalışmasında, non-spesifik bir NO inhibitörü olan L-NAME'in intraartiküler injeksiyonuyla sıcaklık hiperaljezisi tamamen döndürülmüş ve eklemde fazla şışmesi ve ıslaması engellenmiştir (28).

NO üretiminde hücreler arası ilişkiler de ilgi çekici bir araştırma alanıdır. Fare peritoneal makrofajları ve splenositlerin kültürlerinde yapılan deneysel bir çalışmada, her iki hücrenin NO üretiminde sincerjistik olarak davrandıkları saptanmıştır (6). Hücre içi mikroorganizmalar da makrofajlarla ilişkilerinde ilginç sonuçlar vermişlerdir. Konuya ilgili bir deneysel modelde, Herpes simpleks tip 2 virusu fare makrofaj kültürlerinde NO üretiminde, IFN-gama ile doz-yanıt eğrisine bağlı olarak sincerjistik davranış olmuştur (8). Başka bir deneysel modelde ise hücre içi bir mikroorganizma olan *Salmonella typhimurium*'a karşı fare makrofajlarında oluşan NO yanıtı, NO inhibitörü N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) ile baskılanmış ancak makrofajlarda oluşan solunumsal patlama yanıtı (respiratory burst) bu baskılanmadan etkilenmemiştir (5). Fare peritoneal makrofajlarıyla yapılan bir başka deneye de HSV tip 2'ye karşı dirençli ve duyarlı farelerin makrofajlarının, HSV tip 2 ile karşılaşıklarında birbirlerinden farklı NO yanıtı verdikleri görülmüştür (7).

Kuşkusuz inflamatuar olgularda NO'in varlığının gösterilmiş olması ve fizyopatolojilerin açıklanması gelecekte nitrik oksidin baskılanması ve/veya kontrol altında tutulabilmesi yoluyla sağaltılarının düzenlenmesi yönünden önemli adımlardır. NO'in interdisipliner olguları ilgilendiren birçok alanda yer alması son derecede ilginçtir. Ancak, gelecekte inflamasyonla ilgili problemlerin NO inhibitörleriyle çözümünde, ülkemizde de hem deneysel, hem de klinik uygulamaların paralel götürüleceği ileri, interdisipliner çalışmalara gereksinim vardır.

## KAYNAKLAR

- 1- Abbas K A, Lichtman H A, Pober S J (eds): *Cellular and Molecular Immunology*, p. 270, WB Saunders Co, Philadelphia (1994).
- 2- Aisaka K, Gross S S, Griffith O W, Levi R N N: N-methylarginine, an inhibitor of endothelium-driven nitric oxide synthase; is a potent pressor agent in the guinea pig: Does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem Biophys Res Commun* 160: 881 (1989).

- 3- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson D J: Nitric oxide gas signals by binding directly to an enzyme inside the target cell, *Cell* 15: 728 (1994).
- 4- Baskın H, Baskın Y, Güner G, Kutluk Ş D, Karaoğlan O: Role of nitric oxide in osteoarthritis, *Biyokim Derg* 23: 18 (1998).
- 5- Baskın H, Çakır N, Yuluğ N: The interaction between nitric oxide and respiratory burst response of mouse macrophages against an intracellular pathogen, *Balkan Clin Lab*, In press (1998).
- 6- Baskın H, Ellerman-Eriksen S, Lovmand J, Mogensen C S: Fare peritoneal makrofajları ve splenositlerinin, oksijene bağlı bir savunma dizgesindeki etkileşimleri, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 25: 16 (1995).
- 7- Baskın H, Ellerman-Eriksen S, Lovmand J, Mogensen C S: Herpes simpleks tip 2'ye genetik olarak dirençli ve duyarlı fare makrofajlarının nitrik oksit yanıtları, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 25: 20 (1995).
- 8- Baskın H, Ellerman-Eriksen S, Lovmand L, Mogensen C S: Herpes simplex type-2 synergizes with interferon-gamma in induction of nitric oxide production in macrophages through autocrine secretion of tumor necrosis factor-alfa, *J Gen Virology* 78: 195 (1997).
- 9- Billiar T R, Curran R D, Hardrecht B G, Stuehr D J, Dmetris A J, Simmons R L: Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: N-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage, *J Leukocyte Biol* 48: 565 (1990).
- 10- Brenner T, Brocke S, Szafer F, Sobel R A, Parkinson J F, Perez D H, Steinman L: Inhibition of nitric oxide synthase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* 158: 2940 (1997).
- 11- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri J G, Dower S K, Sims J E, Montavani A: Inhibition of IL-1 by IL-13, *Science* 261: 472 (1993).
- 12- Eiserich J P, Hristova M, Cross C E, Jones A D, Freeman B A, Halliwell B, van der Vliet A: Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils, *Nature* 22: 391 (1998).
- 13- Fachetti F, Vermi W, Fiorentini S, Chilosì M, Caruso A, Duse M, Notarangelo L D, Badolato R: Expression of iNOS in human granulomas and histiocytic reactions, *Am J Pathol* 154: 145 (1999).
- 14- Goden J W, Turley S, Teller D C, Adman E T, Liu M Y, Payne W J, LeGall J: The 2.3 angstrom x-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*, *Science* 253: 438 (1991).
- 15- Gruetter C A, Barry B K, McNamara D B, Gruetter D Y, Kadowitz P J, Ignarro L J: Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine, *J Cyclic Nucleotide Res* 5: 211 (1979).
- 16- Green L C, Tannenbaum S R, Goldman R: Nitrate synthesis in the germ-free and conventional rat, *Science* 212: 56 (1981).
- 17- Green L C, Wagner D A, Glogowski J, Skipper P L, Wishnok J S, Tannenbaum S R: Analysis of nitrate, nitrite, and (<sup>15</sup>N) nitrate in biological fluids, *Anal Biochem* 126: 131 (1982).
- 18- Green L C, Wagner D A, Luzuriaga de R K, Istfan N, Young V R, Tannenbaum S R: Nitrate biosynthesis in man, *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7764 (1981).
- 19- Gross S S, Stuehr D J, Aisaka K, Jaffe E A, Levi R, Griffith O W: Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase: cell type selective inhibition by N-amino-arginine, N-nitroarginine, and N-methylarginine, *Biochem Biophys Res Commun* 170: 96 (1990).

- 20- Hibbs B J Jr, Taintor R R, Vavrin Z, Granger L D, Drapier J C, Amber J T, Lancaster R J Jr: Synthesis of nitric oxide from a terminal guanidino nitrogen atom of L-arginine: A molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron, "Moncada S, Higgs E A (eds): *Nitric Oxide from L-arginine: A Bioregulatory System*, kitabında s. 189, Elsevier Press, New York (1990).
- 21- Ignarro J J: Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 535 (1990).
- 22- Ignarro L J, Buga G M, Wood K S, Byrns R E, Chaudhuri G: EDRF produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265 (1987).
- 23- Johnson C, Henshaw J, McInnes G: Impact of aircraft and surface emissions of nitrogen oxides on tropospheric ozone and global warming, *Nature* 355: 69 (1992).
- 24- Kilbourn R G, Gross S S, Jubran A, Adams J, Griffith O W, Levi R, Lodato R: N-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide, *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3629 (1990).
- 25- Kilbourn R G, Jubran A, Gross S S, Griffith O W, Levi R, Adams J, Lodato R: Reversal of endotoxin-mediated shock by N-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase, *Biochem Biophys Res Commun* 172: 1132 (1991).
- 26- Kubes P, Suzuki M, Granger D N: Nitric oxide: An endogenous modulator of leukocyte adhesion, *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4651 (1991).
- 27- Kwo N S, Nathan C F, Gilker C, Griffith O, Feldman P, Wiseman J: L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase: The ureido oxygen derives from dioxygen, *J Biol Chem* 265: 13442 (1990).
- 28- Lawand N B, Willis W D, Westlund K N: Blockade of joint inflammation and secondary hyperalgesia by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, *Neuroreport* 8: 895 (1997).
- 29- Mellion B T, Ignarro L J, Ohlstein E H, Potecorvo E G, Hyman A L, Kadowitz P J: Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators, *Blood* 57: 946 (1981).
- 30- Minty A, Chalon P, Derocq J M, Dumont X, Guillemot J C, Kaghad M, Lahit C, Leplatois P, Li-auzun P, Miloux B: Stimulator cytokines for nitric oxide, *Nature* 362: 248 (1993).
- 31- Miwa M, Steuehr D D, Marlette M A, Wishnok J S, Tannenbaum S R: Nitrosation of amines by stimulated macrophages, *Carcinogenesis* 8: 955 (1987).
- 32- Moncada S, Palmer R M J, Higgs E A: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol Rev* 43: 109 (1991).
- 33- Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells, *FASEB J* 6: 3051 (1992).
- 34- Nathan C, Hibbs B Jr: Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity, *Curr Opin Immunol* 3: 65 (1991).
- 35- Old L J, Clarke D A, Benaceraff B: Effect of BCG infection on transplanted tumors in the mouse, *Nature* 184: 291 (1959).
- 36- Palmer R M J, Ferrige A G, Moncada S: Nitric oxide release accounts for the biological activity of EDRF, *Nature* 327: 524 (1987).
- 37- Parks D J, Cheung M K, Chan C C, Roberge B G: The role of nitric oxide in uveitis, *Arch Ophthalmol* 112: 544 (1994).
- 38- Pignatelli B, Bancel B, Esteve J, Malaveille C, Calmels S, Correia P, Patricot L M, Laval M, Dyandrat N, Ohshima M: iNOS, anti-oxidant enzymes and Helicobacter pylori infections in gastritis and gastric precancerous lesions in humans, *Eur J Cancer Prev* 7: 439 (1998).

- 39- Remington J S, Merigan T C: Resistance to virus challenge in mice infected with protozoa or bacteria, *Proc Soc Exp Biol Med* 131: 1184 (1969).
- 40- Rothe H, Kolb H: Strategies of protection from nitric oxide toxicity in islet formation, *J Mol Med* 77: 40 (1999).
- 41- Sadick M D: Nitric oxide, *The Macrophage* 3: 265 (1992).
- 42- Smith K J, Kapoor R, Felts P A: Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species, *Brain Pathol* 9: 69 (1999).
- 43- Stuehr D, Kwon N S, Nathan C, Griffith O, Feldman P, Wiseman J: N-hydroxyl-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine, *J Biol Chem* 266: 6259 (1991).
- 44- Stuehr D J, Nathan C F: Nitric oxide: A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells, *J Exp Med* 169: 1543 (1989).
- 45- Tayeh M A, Marletta M A: Macrophage oxidation to nitric oxide, nitrite, and nitrate, *J Biol Chem* 264: 19654 (1989).
- 46- Vierck R A, Murad E, Green B D, Joshi P, Pike C P, Hieb R, Harbaugh G: Origin of the shuttle glow, *Nature* 354: 48 (1990).
- 47- Wagner D A, Schultz D S, Deen W M, Young V R, Tannenbaum S R: Metabolic fate of oral dose of <sup>15</sup>N-labelled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid, *Cancer Res* 43: 1921 (1983).