

# Astım hastalarında serum nitrik oksit düzeyleri\*

Nuh Korkmaz<sup>1</sup>, Selim Uzunoğlu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Keskin Lisesi, Kırıkkale

<sup>2</sup>Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa

**Amaç:** Astım tanısı nedeniyle tedavi görmekte olan hastalarda Nitrik Oksidin (NO) son ürünleri olan serum nitrit, nitrat ve nitrit + nitrat düzeylerini ölçmek ve bu hastaların tedavisinde serumdaki NO'nun prognostik değerinin olup olmadığını belirlemektir. **Yöntem:** 20 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu ile astımı olan 43 kişi çalışmaya alındı. Hastalık derecelerine göre bireylerin grubu belirlendi. Serumdaki NO'nun son ürünleri olan nitrit ve nitrat, Griess reaksiyonu ile saptandı. **Bulgular:** Hafif intermittan ve hafif persistan hastaların serumlarında ortalama nitrit+nitrat düzeyleri 45.8 µmol/L olarak bulunurken, orta ve ağır persistan hastaların serumlarında bu değerler nitrit+nitrat için 54.3 µmol/L bulundu. İki grup arasındaki fark anlamlı bulunmadı. **Sonuç:** Elde edilen veriler, serum nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının astımlı hastaların tedavisinin izlenmesinde doğrudan belirteç olamayacağı ama yardımcı prognostik marker olarak kullanılabileceği şeklinde yorumlandı.

Anahtar kelimeler: Nitrik oksit, Griess reaksiyonu, astım

## The levels of serum nitric oxide in patients with asthma

**Objective:** The aim of this study was to determine the levels of nitrite, nitrate and nitrite+nitrate, which are the derivatives of serum NO in the patients with asthma and to find out whether NO in the serum has a prognostic value in medical treatment of asthma. **Method:** A control group of 20 healthy people and a study group of 43 patients of asthma were participated in this study. The patients were included into groups according to the intensity of their asthma. The nitrite and nitrate levels of serum NO derivatives were determined by Griess reaction. **Results:** The mean level of nitrite+nitrate in the serum were found to be 45.8 µmol/L in the the first group of patients with low intermittance and persistence. The mean level of nitrite+nitrate in the serum were 54.3 µmol/L in the second group of patients with medium and heavy persistence. The differences in the two groups was not significant. **Conclusion:** The obtained data was interpreted as serum nitrite and nitrate concentrations are not primary markers in the monitoring the treatment of the patients with asthma, but they may be used as secondary prognostic markers.

Key words: Nitric oxide, Griess reaction, asthma

## Genel Tıp Derg 2006;16(2):65-69

\*Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalı, Moleküler Biyoloji programı öğrencisi Nuh Korkmaz'ın 2003 yılında tamamladığı yüksek lisans tez çalışmasının özetidir.

Yazışma adresi: Selim Uzunoğlu, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Muradiye Kampüsü, 45047, Muradiye, Manisa.

e-posta: selim@bayar.edu.tr

Nitrik Oksit (NO), hem insan hücreleri tarafından biyokimyasal yolla sentezi yapılan endojen sinyal molekülüdür, hem de solunum yoluyla kirlenmiş havadan alınan ve zararlı etkilere sahip bir ekzojen gaz molekülüdür. Kirlenmiş atmosferden solunumla vücuda giren veya aşırı sentezlenen NO, serbest radikal olması nedeniyle potansiyel karsinojendir (1).

Endojen NO, sitozolik bir enzim olan Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından sentezlenir (2-5). Memeli sisteminde NOS enziminin üç değişik formuna rastlanır. Bunlar yapısal enzim olan nöronal

NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS) ile indüklenebilir NOS (iNOS)'tur. NO'nun üretiminin değişmesi hipertansiyon, diyabet ve kalp rahatsızlıklarıyla ilişkilidir (6-8). eNOS ile bağlantılı olduğu düşünülen hastalıkların NO'nun az üretimi veya sinyalindeki problemlerden kaynaklandığı öngörülmektedir (9). iNOS'un en önemli fonksiyonu enfeksiyonlu durumlardadır. iNOS'un sentezlemiş olduğu NO, bağışıklık sisteminin bir düzenleyicisidir. Ayrıca astım ve romatizma sonucu iNOS, NO sentezini gerçekleştirir (10,11).

Solunum yolu fonksiyonları üzerinde endojen NO'nun birçok etkisi vardır (12). İnsan ve hayvan akciğerlerinde NOS izoformlarının etkisinin ve NO üretiminin olduğu yerler pulmoner vasküler endotel hücreleri, düz kas hücreleri, solunum yolu epitel hücreleri, trombositler, non adrenerejik non kolinerjik nöronlar, makrofajlar, mast hücreleri ve nötrofillerdir. Bütün NOS izoformları solunum yolu epitellerinde bulunmasına rağmen en fazla bulunan iNOS'tur. Vasküler endotel tarafından sentezlenen NO, vazodilatör olarak kan basıncını düzenlemede rol alır. NO'nun dilatör etkisi, solunum yolundaki düz kaslarda düzenleyici bir role sahiptir (13).

Astım, bronşiyollerdeki düz kasların solunumu zorlaştıracak düzeyde daralması ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Astımlı hastaların ekshalasyon havasında yüksek miktarda bulunan NO'nun solunum yolundaki epitel hücreleri ve makrofajlardaki iNOS'ların sentezinden ve aktivitesinden kaynaklandığı gösterilmiştir (12,13).

Bazı akciğer hastalıklarında, ekshalasyon havasındaki NO seviyesi yükselmektedir. Ayrıca KOAH'da ekshalasyon havasında NO seviyesinin astımlı hastalarınkinden düşük olduğu bulunmuştur. Sigara kullanımı ve henüz tam olarak bilinmeyen bazı etkenler, ekshalasyon havasında NO seviyesini düşürerek, hastalık gelişimini gizlemekte ve erken tanıyı önlemektedir. NO'nun kararlı son ürünleri, bronkoalveolar lavaj ve tükürükte ölçülebilmektedir (13).

Bu çalışmada astım tanısı konmuş hastaların serumlarındaki nitrit, nitrat ve nitrit+nitrat değerleri kontrol grubu ile karşılaştırılarak, farklı olup olmadığının ve serumdaki NO değerlerinin tedavinin izlenmesinde belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırılması amaçlandı.

## Yöntem

Çalışma grubunu, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Polikliniğine gelen (yaşları  $43 \pm 21$ ) 43 astımlı hasta oluşturdu. Kontrol grubu (yaşları  $44 \pm 14$ ) 20 sağlıklı gönüllü kişiden oluşturuldu. Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalının önerileri doğrultusunda çalışma grubunu oluşturan hastalar, Grup 1 (Hafif İntermittan ve Hafif Persistan) ve Grup 2 (Orta ve Ağır Persistan) olarak gruplandırıldı. Çalışma grubunu oluşturan hastaların 32'si Grup 1 ve 11'i Grup 2'de yer aldı.

NO oksijen ile hızla reaksiyona girerek nitrite dönüştüğünden, "Griess Reaksiyonu" yöntemi kullanılarak nitrit üzerinden NO ölçümlenmektedir. Bu çalışmada, Cortas ve Wakid (14)'in spektrofotometrik yöntemi uygulandı. Ölçümlerin istatistiksel analizinde GraphPad 2.1 yazılımı kullanıldı. Grupların tanımlayıcı istatistiklerinin elde edilmesinde kolon istatistikleri tercih edildi. Ölçüm değerleri standart normal dağılım göstermediği için, nonparametrik hipotez testlerinden Mann-Whitney U testi uygulandı.

## Bulgular

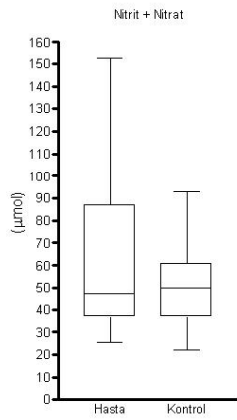
Çalışma ve kontrol gruplarının nitrit, nitrat ve nitrit+nitrat bulgularının Mann-Whitney U Testi sonuçları Tablo 1'de verildi. Çalışma ve kontrol gruplarının ortalama nitrit, nitrat nitrit+nitrat ölçüm değerleri bakımından gözlenen farklar, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Çalışma ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin serumlarında saptanan nitrit+nitrat düzeylerinin dağılışı, Box-Whisker plot grafiği olarak Şekil 1'de gösterildi.

Çalışma grubunu oluşturan bireylerin hastalık derecelerine göre yapılan Grup 1 (Hafif İntermittan + Hafif Persistant) ve Grup 2 (Orta Persistant + Ağır Persistant) şeklindeki sınıflandırmaya ait nitrit+nitrat düzeylerinin dağılışı, Şekil 2'de verildi.

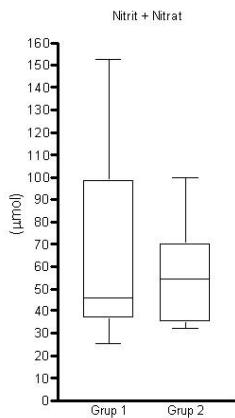
Elde edilen bulgulara göre hafif intermittan ve hafif persistan hastaların serumlarında ortalama nitrit+nitrat düzeyleri  $45.8 \mu\text{mol/L}$  olarak bulunurken, orta ve ağır persistan hastaların serumlarında bu değerler nitrit+nitrat için  $54.3 \mu\text{mol/L}$  bulundu. İki grup arasındaki fark anlamlı

**Tablo 1. Çalışma ve kontrol gruplarının nitrit, nitrat ve nitrit+nitrat bulgularının Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmesi**

	Ortalama Değer		Mann-Whitney U testi sonucu
	Hasta	Kontrol	
Nitrit (µmol/L)	2.10	2.3	P=0.8767
Nitrat (µmol/L)	45.0	46.6	P=0.4923
Nitrit+Nitrat(µmol/L)	47.5	50.0	P=0.5697



**Şekil 1. Çalışma ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin serumlarında saptanan nitrit+nitrat düzeylerinin grafiği (Box-Whisker)**



**Şekil 2. Çalışma ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin hastalık derecelerine göre serumlarında saptanan nitrit+nitrat düzeylerinin grafiği (Box-Whisker): Grup 1: Hafif intermittan+hafif persistant Grup 2: Orta persistant+ağır persistant**

bulunmadı.

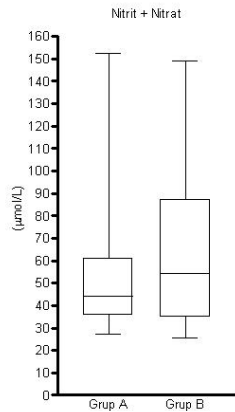
Çalışma grubunu oluşturan hastalar, ayrıca kullandıkları ilaçlara göre Grup A ve Grup B olmak üzere iki grupta toplandı. İnhaler kısa etkili beta 2 agonist ve inhaler steroid kullananlar Grup A'da, inhaler kısa ve uzun etkili beta 2 agonist ve inhaler steroid ilaçları alan hastalar Grup B'de toplandı. Grup A ve B'deki bireylerin serumlarında saptanan nitrit+nitrat düzeylerinin karşılaştırmalı Box-Whisker plot grafiği Şekil 3'de gösterilmektedir. Grup A hastalarının serumlarında ortalama nitrit+nitrat düzeyleri 44.0 µmol/L, Grup B'nin ortalama nitrit+nitrat düzeyleri 54.3 µmol/L olarak belirlendi. Grup A ve Grup B ilaçlarını kullanan hastaların serumlarında saptanan ortalama nitrit+nitrat düzeylerinde gözlenen farklar, istatistiksel olarak önemsiz bulundu ( $p>0.05$ ).

## Tartışma

Yapılan araştırmalar, astım hastalarının solunum ile dışarı verdikleri NO konsantrasyonunun sağlıklı insanlarınkinden yüksek olduğunu göstermektedir (13-15). NO'nun alveolar makrofajlardaki NOS'lar tarafından sentezlendiği ve astım hastalığında önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (16). Jiang ve arkadaşlarının (17) domuzlar üzerinde yaptıkları deneylerde astımlı olanlarda iNOS sentezinin arttığı buna bağlı olarak NO'nun seviyesinde artış olduğu saptanmıştır. Bu artış sitotoksositeye ve bronş aşırı cevaphılığında yükselişe neden olmaktadır (17). Kazanawa ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (18), benzer şekilde astım hastalarının balgamındaki NO miktarının sağlıklı insanlarınkinden yüksek seyrettiği bulunmuş ve balgamdaki NO son ürünlerinin, allerjik solunum yolu inflamasyonunda değerlendirilebileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızın kontrol grubuna ait ortalama serum nitrit ve nitrat değerleri (2.3 ve 46.6 µmol/L), Köksal ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmanın (10) kontrol grubu değerlerine (2.17 ve 57.74 µmol/L) çok yakın olması, ölçümlerin doğru yapıldığı şeklinde yorumlandı.

Garnier ve arkadaşlarının (19) yaptığı çalışmada solunum yolu ile havaya verilen NO konsantrasyonunun solunum yolu inflamasyonu için bir marker olduğu, ancak astımın niteliği hakkında herhangi bir bilgi vermediği belirtilmektedir. Sippel



Şekil 3. Çalışma grubunu oluşturan bireylerin kullandıkları ilaçlara göre serumlarında saptanan nitrit+nitrat düzeylerinin grafiği (Box-Whisker): Grup A: İnhaler kısa etkili beta 2 agonist+inhaler steroid Grup B: İnhaler kısa etkili beta 2 agonist+inhaler uzun etkili beta2 agonist+inhaler steroid

ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma (20) da, Garnier ve arkadaşlarının (19) bulgularını desteklemekte ve solunum yolu ile havaya verilen NO'nun astım hastalığının bir markeri olduğu, ancak hastalığın şiddeti ile ilişkili olmadığı belirtilmektedir. Yukarıdaki literatür verilerine benzer şekilde, bizim çalışmamızda da serum nitrit, nitrat ve nitrit + nitrat konsantrasyonları ile astımın ağırlık derecesi arasında bir bağlantı saptanamadı.

Mevcut literatürler incelendiğinde (13,15-23), astım hastalarının hem solunum ile havaya verdiği hem de balgamdaki NO konsantrasyonunun sağlıklı insanlarınkine göre yüksek olduğu görülmektedir. Wang ve arkadaşlarının (15), Agusti ve arkadaşlarının (21), Tsujino ve arkadaşlarının (22) yaptıkları çalışmalar, tedavi gören ve steroid ilaçları kullanan astım hastalarının solunum ile havaya verdikleri NO miktarı ile balgamdaki NO miktarının azalarak sağlıklı insanlardaki seviyesine geldiğini göstermektedir.

Kharitonov ve Barnes'ın yaptığı çalışmada (24) akut astımlılarda, steroide dirençli astım hastalarında veya inhale steroid dozu azaltılan hastalarda solunum ile havaya verilen NO miktarı artmaktadır. Dupont ve arkadaşlarının (25) tedavi gören hastalardaki ölçümlerinde ise NO konsantrasyonu azalmaktadır. Tedavi gören hastalardaki NO konsantrasyonunun

düşüşünün nedeni, steroidlerin NOS enzimini inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır (26). Bazı çalışmalarda (24, 27) steroid tedavisi uygulamasında NO'nun iyi bir marker olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda kontrol ve çalışma grubu serumlarındaki nitrit ve nitrat miktarları arasında anlamlı bir farkın bulunmamasının nedeni, hastaların tedavi altında olması ve steroid ilaçları kullanmaları olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada sağlıklı kontrol grubunun serumdaki ortalama nitrit ve nitrat değerleri, astımlı hastaların serumdaki nitrit ve nitrat değerleri ile karşılaştırıldığında ikisi arasında anlamlı fark bulunmadı. Bu sonuç, serum nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının astımlı hastaların tedavisinin izlenmesinde doğrudan belirteç olamayacağı ama yardımcı prognostik marker olarak kullanılabilmesi şeklinde değerlendirildi.

#### Teşekkür:

Bu çalışmada kullanılan kontrol ve hasta gruplarının oluşturulmasında gerekli kolaylığı sağlayan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı ile Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı akademik ve idari personeline teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

1. Koşay S, Bayındır O, Ülker S. Nitrik oksit'in patolojik olaylardaki rolü. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi; 1996
2. Smutzer G. Research tools for nitric oxide. Scientist 2001;15:23.
3. Gren I, Chabrier P. From basic research to clinical applications. Euroconference on NO. October 15-16 Paris:1998
4. Moncada S. Nitric oxide as a biological mediator-a ten year perspective. Euroconference on NO. October 15-16 Paris:1998
5. MacAllister RJ, Vallance P. Endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis: how important are they? Exp Nephrol 1998;6:195-9.
6. Moncada S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. J R Soc Med 1999;92:164-9.
7. Wever RM, Luscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. Circulation 1998;97:108-12.
8. Lloyd-Jones DM, Bloch KD. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. Annu Rev Med 1996;47:365-75.
9. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest 1997;100:2153-7.

10. Koksall N, Yildirim Z, Gokirmak M, Hasanoglu HC, Mehmet N, Avci H. The role of nitric oxide and cytokines in asthma-like syndrome induced by sulfur dioxide exposure in agricultural environment. *Clin Chim Acta* 2003; 336:115-22.
11. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997;100:2417-23.
12. Stirling RG, Kharitonov SA, Campbell D, Robinson DS, Durham SR, Chung KF, et al. Increase in exhaled nitric oxide levels in patients with difficult asthma and correlation with symptoms and disease severity despite treatment with oral and inhaled corticosteroids. *Asthma and Allergy Group. Thorax* 1998;53:1030-4.
13. Sade K, Kivity S. Nitric oxide in asthma. *Isr Med Assoc J* 2002;4:196-9.
14. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990;36:1440-3.
15. Wang Y, Wang C, Tong Z. The changes of NO<sub>2</sub>-/NO<sub>3</sub>- level in sputum from patients with asthma and their clinical implications. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1999;22:453-6.
16. Du J, Cui D, Tian D. The role of nitric oxide in the pathogenesis of asthma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1997;20:153-6.
17. Jiang D, Li H, Shi Y. The role of nitric oxide and nitric oxide synthase in the pathogenesis of asthma. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 1998;21:204-7.
18. Kanazawa H, Shoji S, Yamada M, Fujii T, Kawaguchi T, Kudoh S et al. Increased levels of nitric oxide derivatives in induced sputum in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:624-9.
19. Garnier P, Fajac I, Dessanges JF, Dall'Ava-Santucci J, Lockhart A, Dinh-Xuan AT. Exhaled nitric oxide during acute changes of airways calibre in asthma. *Eur Respir J* 1996;9:1134-8.
20. Sippel JM, Holden WE, Tilles SA, O'Hollaren M, Cook J, Thukkani N et al. Exhaled nitric oxide levels correlate with measures of disease control in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:645-50.
21. Agusti AG, Villaverde JM, Togores B, Bosch M. Serial measurements of exhaled nitric oxide during exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999;14:523-8.
22. Tsujino I, Nishimura M, Kamachi A, Makita H, Munakata M, Miyamoto K et al. Exhaled nitric oxide--is it really a good marker of airway inflammation in bronchial asthma? *Respiration* 2000;67:645-51.
23. Kanazawa H, Shoji S, Yoshikawa T, Hirata K, Yoshikawa J. Increased production of endogenous nitric oxide in patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Exp Allergy* 1998;28:1244-50.
24. Kharitonov SA, Barnes PJ. Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J* 2000;16:781-92.
25. Dupont LJ, Rochette F, Demedts MG, Verleden GM. Exhaled nitric oxide correlates with airway hyperresponsiveness in steroid-naive patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:894-8.
26. Kharitonov SA, Yates DH, Barnes PJ. Inhaled glucocorticoids decrease nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:454-7.
27. Beck-Ripp J, Griese M, Arenz S, Koring C, Pasqualoni B, Bufler P. Changes of exhaled nitric oxide during steroid treatment of childhood asthma. *Eur Respir J* 2002;19:1015-9.