

## NİTRİK OKSİT: GENEL ÖZELLİKLERİ

Lütfiye EROĞLU

Son yılların en ilgi çekici molekülü olan nitrik oksit (NO), iki atom içeren, 30 molekül ağırlığında, membranlardan kolayca difüze olabilen, gaz yapısında bir serbest radikaldir (5,9). Yeni saptanan her endojen molekülde olduğu gibi NO'ye de pek çok fizyolojik/patolojik işlevlerde önemli roller biçilmiş ve biçilmeye devam edilmektedir. Daha şimdiden sayıları 15,000'i aşmış olan çalışmalar yoğunlaştıkça NO'in gerçek değeri anlaşılacaktır.

### TARİHÇESİ (9)

Bakterilerdeki varlığının uzun yıllardır bilinmesine karşın memelilerdeki önemi yeni yeni anlaşılan NO ile ilgili çalışmaların başlangıcını Furchgott grubunun 1980 yılında yaptıkları deneyler oluşturmuştur. Tavşan aort şeritlerinde asetilkolinle olan gevşemenin ancak endotel varlığında gerçekleştiğine işaret edilerek, söz konusu etkinin oluşumuna aracılık eden dayanıksız bir madde olasılığı üzerinde durulmuştur. Araştırmacılar tarafından "endotel kaynaklı gevşetici faktör" (Endothelium Derived Relaxing Factor=EDRF) olarak adlandırılan bu maddenin arterler, venler, kılcal damarlar gibi çeşitli damar yapılarında bulunduğu, farklı bazı vazodilatör maddeler uygulandığında da salındığı gösterilmiştir. Daha sonra 1987'de Moncada grubu EDRF'nin NO ile aynı madde olduğunu saptamıştır.

Diğer yandan 1981'de Tannenboum ve öğrencileri düşük nitrat diyeti ile beslenen sıçanların idrarında bol miktarda nitrat saptamışlar ve buna endojen bir kaynak aramışlardır. İnfeksiyöz diyareli bir hastanın idrarında da bol miktarda nitrat görülmesi inflamasyon-nitrat ilişkisini gündeme getirmiştir. Bakteriye endotoksinin sıçana verilmesinin inflamasyona ve nitrat oluşumuna neden olması, genetik olarak makrofajsız farelerde nitrat atılımının azalması makrofaj-nitrat ilişkisini düşündürmüştür. Daha sonra aynı gruptan Hibb, kültür ortamından argininin kaldırılmasının nitrit-nitrat oluşumunu engellediğini, makrofajlarda spesifik bir enzimin arginini ara bir ürüne dönüştürdüğünü, o ara ürünün de nitrit-nitratı oluşturduğunu belirlemiş, sonuçta makrofajların T hücreleri ya da endotoksin ile aktive olarak argininden toksik bir madde oluşturup mantar, bakteri ve tümör hücrelerini öldürdüğünü öne sürerek makrofajlardaki NO işlevine ilk göndermeyi yapmıştır. Bu arada Murad organik nitratların etkinliklerini NO üzerinden oluşturduklarını bildirmiştir.

Bu çalışmaları ile Furchgott, Murad ve Ignarro 1998 Nobel Tıp Ödülü'nü kazanmışlardır.

### FİZİKSEL-KİMYASAL ÖZELLİKLERİ (2,4,9,12)

NO oda sıcaklığında, atmosferik basınç altında gaz durumundadır. Ancak biyolojik sistemlerin çoğunda çözünmüş nonelektrolit biçimindedir, diğer deyişle işlevlerini oluştururken çoğu kez gaz durumunda değildir. Bununla birlikte akciğer ve paranasal sinüs havasında gaz olarak bulunur. Sulu ortamlarda difüzyon hızı saniyede 40 mikrondur. Suda çözünürlüğü çok düşük olan NO membran ve hücrelerin lipid fazında selektif olarak çözünür.

NO paylaşılmamış elektron taşıyıcı ve paramagnetiktir. NO'nun biyolojik sistemlerdeki kimyasal etkileşimleri bu paylaşılmamış elektronun stabilizasyonu ile karakterizedir. Bir radikal olarak süperoksit, hidroksil gibi radikallerden daha az reaktiftir, yani daha stabil

paylaşılmamış elektron taşıyıcısıdır.

Biyolojik aktivitesi molekülün şeklinden çok molekülünün küçüklüğüne, reaktivitesine, difüzyon hızına bağlıdır. Yarılanma ömrü 3-10 saniyedir.

### NO SENTEZİ (2,4,9,12,13)

NO'nun depolanma özelliği olmayıp, isteme yanıt olarak sentezlenir. Birbirinden bağımsız iki monooksijenaz reaksiyonu ile oksijen varlığında bir aminoasit olan L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığı ile önce ara ürün Ng-hidroksi L-arginin ve ardından NO ile L-sitruilin oluşur. Bu oluşumda nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin mononükleotid (FMN), flavin adenin dinükleotid (FAD), tetrahidrobioplerin (BH-4) kofaktör olarak görev alırlar. NO oksijen ve su ile nitrat ve nitritlere dönüşür. NO asidik ve redüklenmiş koşullarda örneğin iskemide nonenzimatik olarak nitritten de oluşur.

NOS (3,5,8,10,12,13): Biosentezi katalize eden bu enzim ilk kez 1989'da tanımlanmış, 1990'da izole edilmiş, 1991'de de klonlanmıştır. Yapısında hem taşıyan ve sitokrom P-450 redüktaz ile % 60 homolog olan NOS, diğer adı ile NADPH diaforaz enziminin nNOS=nöronal, eNOS=endotelial ve iNOS=immünojenik ya da indüklenebilen olmak üzere 3 değişik geni vardır (Tablo ). Her 3 enzim formu da değişik hücre ve dokularda yer alır. Örneğin eNOS yalnızca endotelde değil, trombositlerde ve beyinde bazı yapılarda, nNOS beyin, medulla spinalis, periferik sinir sistemi dışında bronş ve trakeanın epitelinde ve iskelet kasında bulunur. Ayrıca başka NOS'lar ve NOS benzeri enzimler de bulunmaktadır.

Tablo. NOS izoformları ve özellikleri (5).

	eNOS	nNOS	iNOS
Aktivasyon	Ca-kalmodülün	Ca-kalmodülün	gen ekspresyonu
Yerleşim	membran>>sitosol	sitosol?	sitosol>>membran
NO yapımı	düşük (pmolar)	düşük (pmolar)	yüksek (µmolar)
İşlev	hücre sinyali	hücre sinyali	sitotoksik sitostatik sitoprotektif

NOS'lar "inducible (indüklenebilir=iNOS)" ve "constitutive (yapısal=cNOS)" olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Normal koşullarda nNOS ve eNOS yapısal olup, aktivasyon için protein sentezi gerekmez. cNOS'ın aktivasyonu kalsiyum-bağımlıdır. nNOS enzimin katalitik aktivitesi için pek çok regülasyon noktası vardır. Ca-kalmodülün bağımlı protein kinaz, cGMP-bağımlı protein kinaz ve protein kinaz A tarafından fosforlandığında aktivitesini yitirirken, bir protein fosfataz olan kalsinörin ile defosforlandığında aktivite kazanır. Ayrıca ko-faktörlerin düzeyi de sentezi etkiler.

iNOS makrofajlardan insan hepatositlerinden ve kondositlerinden klonlanmıştır. iNOS kalmodülün bağlamakla beraber aktivasyonu için Ca-bağımsızdır. Bakteriye liposakkaritler, sitokinler (interlökin-1, -2, -6, tümör nekrozis faktör vb) gibi immünojenik uyarılara yanıt olarak sentezlenir. Oysa bu uyarılar cNOS'u baskırlarlar. Makrofajlar normalde NOS proteinini taşımazlar, ancak sitokinlerle uyarılınca bol miktarda ve uzun süreli NOS oluşur. Sonuçta bol miktarda sentezlenen NO bakteri ve tümör dokusuna saldırırken patolojik doku hasarı da oluşturur.

İn-vivo endoksemi modelinde hepatositler iNOS mRNA'yı eksprese ederek 3 saatte ölçülebilen, 12-16 saatte doruğa çıkan iNOS düzeyi artışına neden olmaktadır. iNOS sentez

regülasyonu transkripsiyon düzeyindedir.

Ancak bu ayrımlar tam değildir, çünkü bazı travmatik, patolojik hatta fizyolojik (gebelik, kronik egzersiz vb.) durumlarda cNOS indüklenemediği gibi iNOS da insan bronşiyal epitel başta olmak üzere bazı dokularda yapısal (constitutively) olarak bulunmaktadır.

Diğer yandan patolojik koşullarda eNOS'un oluşturduğu aşırı NO yararlı olurken, nNOS ve iNOS'un oluşturduğu fazla NO zararlı etkilere yol açmaktadır.

### **NO İÇİN HÜCRESEL HEDEFLER (2,12)**

Zaman içinde NO'nin etkisi için pek çok hedef yapıların saptanması bu küçük molekülün ne kadar çok işlev yüklendiğinin işaretidir. Etkilediği hedefler hem fizyolojik, hem de patolojik rollerini belirlemektedir.

1- Hem taşıyan enzimler: Guanilil siklaz, NOS, siklooksijenaz, katalaz, peroksidaz, sitokrom c, indolamin 2,3-dioksijenaz.

2- Demir-sülfürlü enzimler: cis-akotinaz, ribonükleotid redüktaz, mitokondriyal kompleks I, II.

3- Proteinlerin nitrosilasyonu: NMDA-R, glutation, adenilat siklaz, nöroflamentler, protein kinaz C.

4- Mono-ADP ribozilasyonu: GAPDH.

5- Serbest radikallerle reaksiyon: Peroksinitrit.

6- DNA: Deaminasyon.

### **İŞLEVLERİ**

#### **A- HABERCI/MODÜLATÖR (1,3,7,9,12)**

NO nöronal ileti kavramlarında yeni ufuklar açmıştır. Çünkü NO klasik nörotransmitter/modülatörlerden farklı olarak; a-sinaptik vesikülde depolanmaz, istemle sentezlenir, b-spesifik salıverilme ya da geri kapılma mekanizmaları yoktur, c- spesifik membran reseptörleri yoktur, hedef hücreye doğrudan penetre olarak enzim sistemlerini doğrudan uyarır, d- spesifik enzimlerle metabolize olmaz, spontan oksidasyonla parçalanır ya da süperoksit, oksihemoglobin gibi bileşiklerce tutulur, e-salıverilmiş klasik nörotransmitterlerde milisaniye olan yarılanma ömrü NO için birkaç saniyedir.

#### **A1-PERİFERİK SİNİR SİSTEMİ**

Otonom sinir sisteminde solunum, gastrointestinal ve ürogenital kanal düz kaslarının gevşemesini sağlayan non-kolinerjik, non-adrenerjik iletide NO'nin spesifik nöronal haberci rolü iyice belirlenmiştir. Kalsiyumun N-tipi kanallardan girmesi nNOS'ı kalmodülün aracılığıyla aktive ederek NO oluşur. NO düz kas hücrelerine difüze olarak çözünür, guanilil siklazı uyarır (sGC), cGMP yükselir ve kas gevşer.

#### **A2-SANTRAL SİNİR SİSTEMİ**

Glutamatın NMDA reseptörünü uarması hücre içi kalsiyum düzeyinin artışına ve sonuçta nNOS'ın aktivasyonu ile NO oluşumuna yol açar. Burada da hedef enzim sGC'dir. NO, nörotransmitterlerin salıverilmesinin ve endokrin fonksiyonlarının düzenlenmesinde, sinaptik plastisitede, hafıza ile ilgili olarak "long-term potentiation"da görev alır. Ayrıca, nöronlarda eNOS, endotel hücresinde eNOS bulunur. Endoteldeki eNOS serebrovasküler kan akımını düzenler. İnflamasyon, travma, iskemi gibi bazı patolojik koşullarda astrosit ve mikroglia'daki iNOS indüklenir.

#### **A3-PARAKRİN SİSTEM**

Asetilkolin, bradikinin, P maddesi gibi agonistlerin endotel hücresinde reseptörlerine bağlanmaları ile ve/veya reseptör uyarılmadan pulsatil akım, hipoksi, mekanik deformasyon gibi uyarılarla hücre içi kalsiyumun artması eNOS'ı aktive ederek NO oluşmaktadır.

Burada da NO'in hedef enzimi sGC'dir. Artmış cGMP ile dilatasyon sağlanmaktadır. Ayrıca yırtılma basıncı (shear stress) gibi sürekli uyarılar sonucu da sentezi artan NO dilatör bir tonus oluşturmaktadır.

### **B-İMMUN SİSTEM REGÜLASYONU (4,9)**

İmmunolojik uyarı ile makrofajlar, nötrofiller, hepatositler, endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, astrosit ve mikroglia hücrelerinde bulunan iNOS aktive olur. Makrofajların endotoksin ve sitokinlerle uyarılması sonucu sentezlenen NO mikroorganizmalar, tümör hücreleri ve kısmen de vücut hücreleri için sitotoksik ve sitostatik etki oluşturur. NO, ayrıca güçlü immunosupresandır.

### **C- PATOLOJİK DURUMLAR (2,6,7,11,12)**

NO, pek çok madde gibi iyi-kötü yanları birlikte taşımaktadır. Aşırı yapımı ve süperoksit anyonu ile peroksinitrit oluşturması NO'in sitotoksik, nörotoksik gibi zararlı etkilerinin ortaya çıkmasında başlıca etkenlerdir.

### **KAYNAKLAR**

- 1- Brann DW, Bhat GK, Lamar CA, Manesh VB: Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation, *Neuroendocrinology* 65: 385 (1997).
- 2- Dawson VL, Dawson TM: Physiological and toxicological actions of nitric oxide in the central nervous system, *Adv Pharmacol* 34: 323 (1995).
- 3- Garthwaite J, Boulton L: Nitric oxide signaling in the central nervous system, *Annu Rev Physiol* 57: 683 (1995).
- 4- Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities, *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376: 327 (1995).
- 5- Moncada S, Higgs A, Furchgott R: XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in nitric oxide research, *Pharmacol Rev* 49: 137 (1997).
- 6- Muijers RBR, Folkerts G, Henricks PAJ, Sadeghi-Hashjin G, Nijkamp: Peroxide: Two-faced metabolite of nitric oxide, *Life Sci* 60: 1833 (1997).
- 7- Paakkari I, Lindsberg P: Nitric oxide in the central nervous system, *Ann Med* 27: 369 (1995).
- 8- Rao VLR, Butterworth R: Neuronal nitric oxide synthase and hepatic encephalopathy, *Met Brain Dis* 13: 175 (1998).
- 9- Synder SH, Bredt D: Biological roles of nitric oxide, *Scientific Amer* 5: 28 (1992).
- 10- Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR: Inducible nitric oxide synthase in the liver: Regulation and function, *Biochem (Moscow)* 63: 766 (1998).
- 11- Vincent VAM, Tilders FJH, Van Dam A-M: Production, regulation and role of nitric oxide in glial cells, *Med Inflamm* 7: 766 (1998).
- 12- Yun HY, Dawson VL, Dawson TM: Neurobiology of nitric oxide, *Crit Rev Neurobiol* 10: 291(1996).
- 13- Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P: Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues, *Nature Med* 1: 804 (1995).