

Biyolojik Örneklerde Nitrik Oksit Ölçümü : Diazotizasyon Yöntemi

Bahar TUNÇTAN*^o, Nurettin ABACIOĞLU*

Biyolojik Örneklerde Nitrik Oksit Ölçümü : Diazotizasyon Yöntemi

Özet : Nitrik oksit (NO) küçük, dayanıklı olmayan, potansiyel olarak toksik, hücre membranlarını kolaylıkla geçebilen diatomik bir serbest radikaldir. Bu inorganik gazın fizyolojik bir haberci olarak sinir, immün ve kardiyovasküler sistemlerde önemli bir düzenleyici olduğu düşünülmektedir. Normal fonksiyonlara aracılık etmesinin yanısıra septic şok, hipertansiyon, felç ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patofizyolojik durumlarda rolü olduğu gösterilmiştir. Spektrofotometrik olarak nitrojen oksitlerin belirlenmesi için uygun olan diazotizasyon yöntemi, özellikle immün sistem aracılıklı olarak aşırı miktarlardaki NO oluşumunun düzenlenmesi üzerinde çeşitli bileşiklerin etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bu derlemede NO'nun stabl ürünleri olan nitrit ve/veya nitrat miktarlarının ölçümü için kullanılan diazotizasyon yöntemi ve diğer yöntemler tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Nitrik oksit, biyolojik örnek, ölçüm, diazotizasyon.

Geliş Tarihi : 28.1.1998
Düzeltili Tarihi : 20.3.1998
Kabul Tarihi : 14.4.1998

Measurement of Nitric Oxide in Biological Samples : Diazotization Method

Summary : Nitric oxide (NO) is a small, unstable, potentially toxic, diffusible, diatomic free radical. Although only recently established as a physiological messenger, NO is increasingly appreciated as a major regulator in the nervous, immune and cardiovascular systems. Besides mediating normal functions, NO has been implicated in pathophysiological states as diverse as septic shock, hypertension, stroke and neurodegenerative diseases. This assay is often suitable for evaluating the effects of various compounds on the regulation of immune system-mediated NO overproduction. The detection of nitrogen oxides using a spectrophotometric technique is particularly suited to this role. This article discusses the diazotization method and other methods for quantitation of nitrite and/or nitrate, end products of NO.

Key words: Nitric oxide, biological sample, measurement, diazotization.

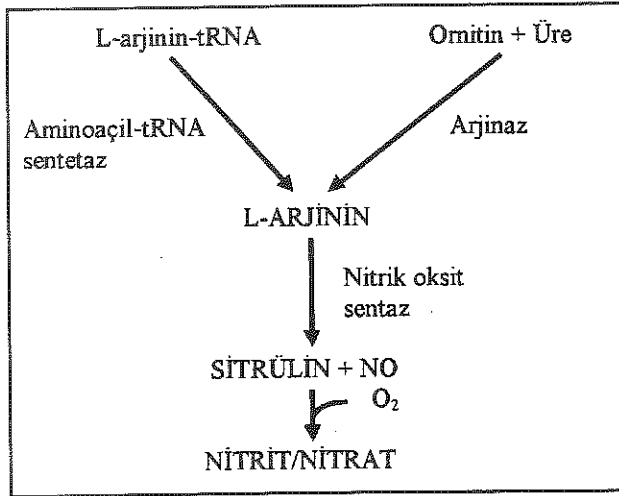
GİRİŞ

Nitrik oksit (NO), hayvanlar ve insanlarda önemli biyolojik etkileri olan atmosferik bir gaz ve serbest radikaldir. NO'nun memeli hücreleri tarafından sentezlendiğinin keşfi ile^{1,2}, NO metabolizmasının iki ürünü olan nitrit ve nitratın ölçülmesi ile ilgili yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır. NO, nöronal, endotelial ve indüklenabilir NO sentaz (NOS)lar (sırasıyla nNOS veya tip I, eNOS veya tip II ve iNOS veya tip III) aracılığıyla, yarı esansiyel bir amino asit

olan L-arjininin terminal guanidino atomlarının, N-oksidasyonu sonucu vücutta pek çok yerde oluşmaktadır^{3,4,5} (Şekil 1). NO, santral ve periferik sinir sistemi^{6,7,8}, immün^{9,10}, kardiyovasküler^{11,12,13}, solunum¹⁴, renal¹⁵ ve endokrin¹⁶ sistemlerde bir çok fizyolojik ve patofizyolojik olayda rol oynamaktadır. Özellikle patofizyolojik olaylarda NO miktarının direkt ve/veya indirekt yöntemlerle ölçülmesi, bu serbest radikalin rolünün daha iyi anlaşılmasına önemli katkılar sağlamaktadır. Hastalıkların teşhis ve tedavisi açısından önemli bir indikatör adayı olan

* Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Eteler 06330 Ankara.

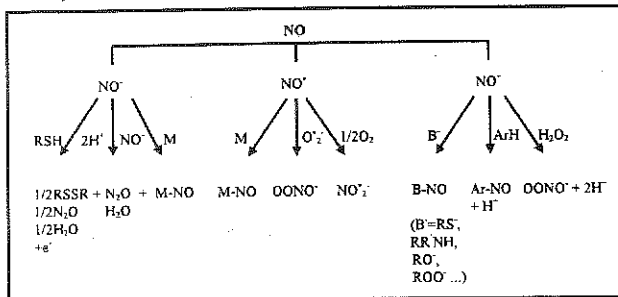
^o Correspondence



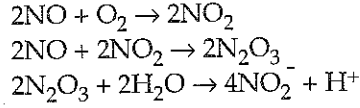
NO'nun ölçümü için pratik, güvenilir ve ucuz yöntemler geliştirilmesi de pek çok çalışmanın başlıca içeriğini oluşturmaktadır. Bu derlemede, NO indikatörü olarak, onun stabl ürünleri olan nitrit ve/veya nitrat miktarlarının ölçümünde sıklıkla kullanılan diazotizasyon yöntemi tartışılmış ve diğer yöntemler de örneklenmiştir.

NO'nun Biyokimyası

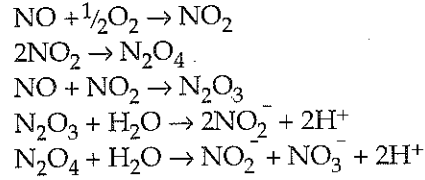
NO'nun yarı ömrü oldukça kısadır. Dokudaki yarı ömrü 10-60 saniye kadardır; ancak ortamda doku olmaması ve oksijen varlığında yarıömrü 4 dakikaya kadar uzayabilir¹⁷. Ancak yine de uygun in vivo ve in vitro koşullarda nitrit ve nitrat birikimi, NOS aktivitesinin izlenmesi ve ölçülmesinde kullanılmaktadır. NO oluşuktan sonra redoks reaksiyonlarıyla farklı şekiller kazanır ve hızla, spontan olarak moleküler oksijen ile birleşerek çeşitli nitrojen oksitleri oluşturur^{18,19,20} (Şekil 2).



Şekil 2. NO'nun redoks reaksiyonlarıyla oluşan şekilleri¹⁸. NO⁻, nitroksil anyonu; NO^{*}, nitrik oksit radikali; NO⁺, nitrozonyum; N₂O, nitroz oksit; OONO⁻, peroksinitrit; NO₂, nitrit; H₂O₂, hidrojen peroksit; SH, sülfidril; R, alkil ya da aril; M, redoks metali; B, baz; Ar, aromatik.



Fizyolojik koşullarda NO, stabil anyonik ürünleri olan nitrit ve nitrate okside olmaktadır (yaklaşık 3:2 oranında). Oksijenlenen solüsyonlarda nitritin, nitrate dönüşümü oldukça yavaştır ve nitrat oluşumu düşüktür^{19,21}.



NO Ölçümünde Kullanılan Yöntemler

Biyolojik sistemlerde NO konsantrasyonlarının ölçümü, NO'nun in vivo olarak düşük miktarlarda oluşması ve oluşuktan sonra hızla oksijen ile etkileşerek reaksiyona girmesi ölçümünü zorlaştırmaktadır. Son yıllarda NO ölçümünün direkt, doğru, hızlı ve kolay bir şekilde yapılabilmesine olanak tanıyan yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır²².

İndirekt Yöntemler

Biyolojik örneklerde guanilil siklaz²³ ve NOS aktivitesi²⁴, damar ve/veya damar dışı düz kas preparatlarının kullanıldığı biyoesey yöntemi ile gevşetici etki²⁵, trombosit agregasyonunun inhibisyonu²⁶, L-arjinin analogları ve metilen mavisi^{27,28} gibi NO sentezini inhibe eden veya etkisini önleyen maddelerin kullanılması, ayrıca L-arjinin²⁹, sGMP³⁰ ve L-sitrülin³¹ gibi L-arjinin/NO/sGMP kaskadında rolü olan maddelerin ölçülmesi, NO'nun varlığı ile ilgili olarak bilgi verebilmektedir. Bu yöntemlerin özgünlükleri birbirine göre çok farklıdır ve NO oluşumu ile ilgili olarak indirekt bir bilgi sağlamaktadır. Sadece sGMP veya sitrülin konsantrasyonlarının ölçümü, NO miktarları ile ilgili olarak kantitatif bir bilgi sağlayabilir. NO tayini için kullanılan bu indirekt yöntemlerde, özellikle L-arjinin analogları kullanıldığında, spesifik olduğu düşünülen NOS inhibitörlerinin aslında spesifik olmamaları ve bir L-arjinin analogu olarak NOS inhibisyonu yapan N^G-monometil-L-arjininin NO sentezini artırması nedeniyle elde edilen bilgilerin güvenilirlikleri tartışmalı olabilmektedir^{32,33,34}.

Direkt Yöntemler

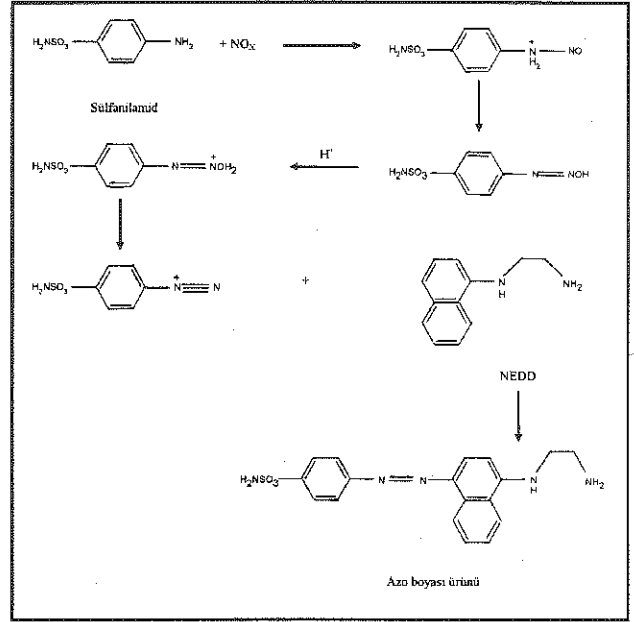
NO'nun miktar tayinine olanak sağlayan direkt yöntemler bulunmaktadır. NO ölçümü için sıklıkla kullanılan aletli yöntemler spektroskopik ve elektroanalitik yöntemlerdir. Bu yöntemler ile ilgili bilgiler Tablo 1'de verilmiştir. Bu yöntemlerden başka, fluorometri⁴¹, gaz^{22,42} ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi⁴³ gibi yöntemler de kullanılmaktadır.

Örneğe Uygun Olarak Yöntem Seçimi

Çalışılan materyal ile ilgili olarak NO ölçümü için uygun yöntem seçilmelidir. Örneğin sıvı (kan, idrar ve tükürük gibi), gaz, doku ya da hücre olmasına göre uygun preparat hazırlama ve ölçüm yönteminin seçilmesi, NO miktarlarının doğruya yakın bir şekilde belirlenebilmesine olanak tanıyabilecektir.

Diazotizasyon Yöntemi

Hemen hemen her biyolojik örnekte nitrit ölçümü için kullanılacak standart bir spektroskopik yöntemdir. Diazotizasyon yöntemi ilk kez 1879'da Griess tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem, nitritin asidik ortamda primer bir aromatik aminle (sülfanilamid) diazotizasyonu ve N-(1-naftil)etilendiamin (NEDD) ile renkli bir azo türevi oluşturması esasına dayanır (Griess reaksiyonu)⁴⁴ (Şekil 3). Sonuçta oluşan bileşik 545-555 nm dalga boyundaki ışığı absorblayabilen mor bir azo boyasıdır. Bu yöntemde kullanılan örnek hacmi 1 ml



Şekil 3. Diazotizasyon reaksiyonunda, nitrozillenmiş sülfanilamidin NEDD ile etkileşmesi sonucu azo boyası oluşumundaki reaksiyonlar.

kadardır ve 5×10^{-8} - 5×10^{-5} M arasında duyarlı ölçüm yapılabilmektedir. Eğer kültür plaklarında oto-analizör ile ölçüm yapılacaksa örnek hacmi 100 µl kadardır. Ortamın asiditesi, belirli molaritelerdeki fosforik asit, hidroklorik asit veya glasiyel asetik asit gibi asitlerin kullanılmasıyla sağlanabilmektedir. Diazotizasyon yöntemiyle nitrit/nitrat ölçümünün yapıldığı biyolojik örnekler Tablo 2'de verilmiştir.

Diazotizasyon yöntemi nitrit iyonlarına duyarlı olduğundan, ortamdaki nitratın nitrite indirgenmesi, in vivo olarak serum, plazma, idrar ve diğer vücut

Tablo 2. Diazotizasyon yöntemiyle NO (nitrit/nitrat) ölçümünün yapıldığı biyolojik örnekler.

Tür	Örnek	Tür	Örnek
İnsan	Serum ^{44,45,46}	Sıçan	Serum ^{61,62,63}
	Plazma ^{44,47}		Plazma ^{55,64}
	İdrar ^{44,48,49}		İdrar ^{29,61}
	Tükürük ^{44,49,50}		Feçes ⁶⁵
	Gastrik sıvı ^{44,50}		Makrofaj hücre kültürü ^{66,67}
	Süt ⁴⁴		Damar düz kası hücre kültürü ⁶⁸
	Feçes ⁵⁰		Kondrosit hücre kültürü ⁶⁹
	Makrofaj hücre kültürü ^{24,27}		Lenfosit hücre kültürü ⁶⁹
	Keratinosit hücre kültürü ⁵¹		Mezangiyal hücre kültürü ⁷⁰
	Astrojitoma hücre kültürü ⁵²		Serebellum doku kültürü ⁷¹
Fare	Serum ^{53,54}	Sinoviyal doku kültürü ⁷²	
	Plazma ^{55,56}		
	İdrar ^{56,57}		
	Makrofaj hücre kültürü ^{56,58}		
	Meme adenokarsinom hücre kültürü ⁵⁹		
	Mikroglia hücre kültürü ⁶⁰		

Tablo 1. NO'nun direkt ölçümü için kullanılan yöntemler

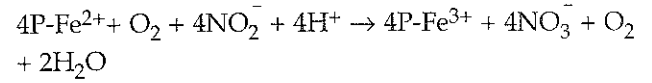
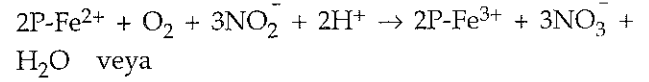
Yöntem	Prensip	Örnek hacmi (ml)	Ölçüm sınırları (M)	Avantaj	Dezavantaj
Kemilüminesans ^{22,35}	NO'nun ozonla etkileşmesi sonucunda açığa çıkan ışığın spektroskopik ölçümü	2.0	2×10^{-8} - 2×10^{-7}	Direkt ve yüksek duyarlılıkla ölçüm; gerekli gaz halindeki örneklerde analiz kolaylığı; klinikte NO inhalasyonu sırasında NO ve nitrit düzeylerinin izlenebilmesi	Biyolojik ortamdan NO ayırmanın güçlüğü; ortamda ozonla etkileşebilen maddelerin (amonyum, olefin, sülfür gazları gibi) bulunması; NO'nun kullanılan materyale yapışması
Elektron paramanyetik rezonans ^{22,36}	NO'nun nitronlar veya nitrozo bileşikler gibi nitroksitler veya hemoglobinle etkileşme sırasında oluşan enerji miktarı ve manyetik alan şiddetinin spektroskopik ölçümü	0.25	$4 \cdot 10^{-6}$ - 5×10^{-5}	Sulu ortam, hücreler ve dokularda basit ve yüksek duyarlılıkla ölçüm yapılabilmesi	Donanımın oldukça özel ve pahalı olması; ortamın pH'sına bağlı olarak NO-hemoglobin etkileşmesi ve sonuçların doğru alınmaması
Methemoglobin spektrofotometri ^{22,37}	İndirgenmiş hemoglobinin (Fe^{2+}) NO tarafından met-hemoglobine (Fe^{3+}) oksidasyonu sırasında oluşan NO_3^- 'ün verdiği absorbansın spektroskopik ölçümü	1.0	2×10^{-9} - 1×10^{-6}	Kolaylıkla ve kısa sürede ölçüm yapılabilmesi	Ortamda bulunan nitrozil gruplarının da ölçülmesi
Elektrokimyasal yöntemler ²²	Spesifik elektrotlar üzerinde NO oksidasyonu sırasında oluşan akımın ölçülmesi			Biyolojik örneklerdeki NO'nun in situ olarak ölçülebilmesi	
Clark elektrodu ¹⁾³⁹	Platin (anot) ve gümüş (katot) elektrotlardan oluşan modifiye oksijen elektrodu üzerinde sabit bir akım uygulandıktan sonra NO'nun anot üzerinde oksidasyonu ve bu sırada oluşan değişikliğin amperometrik ölçümü	0.1	1×10^{-6} - 3×10^{-4}	Kullanılan elektrodun NO'ya spesifik olması; yüksek miktarların ölçülebilmesi; dokularda lokal olarak oluşan NO'nun ölçülebilmesi; kısa zamanda yanıt alınabilmesi	Elektrotları ayıran yarı geçirgen membrandan geçebilen oksijen ile reaksiyona girerek nitrit oluşumu ile duyarlılığın azalabilmesi
Porfirinik mikroelektrot ⁴⁰	NO oksidasyonunun polimerik metalporfirin (n-tipi yarı iletken) üzerinde olması ve oluşan akımın amperometrik olarak ölçülmesi	1×10^{-9}	1×10^{-8} - 3×10^{-3}	Kullanılan elektrodun NO'ya spesifik olması; yüksek miktarların ölçülebilmesi; alıcının küçük olması ve hızlı yanıt verebilmesi; NO salınım kinetiğinin çalışılabilmesi; endotel ve düz kas hücre kültürlerinde NO'nun ölçülebilmesi	Ortamda bulunan katekolaminlerin de ölçülmesi

1) Clark elektrodu prensibiyle çalışan dijital NO metre (ISO-NO Mark II, World Precision Instrument) geliştirilmiştir ve piyasada satılmaktadır.

sıvılarında ve in vitro olarak hücre kültür sistemlerinde oluşan NO'nun gerçeğe yakın miktarlarda ölçümüne olanak tanıyabilmektedir. İndirgeme için kullanılan yöntemlerden biri, örneğin bakırla kaplı kadmiyum kolonlardan geçirilmesi veya uygun partikül büyüklüğündeki kadmiyum tozlarıyla muamele edilmesidir⁴⁴. Bu yöntemde özellikle proteinli materyal ile çalışıldığında indirgeme işleminden sonra kolonların rejenere edilmesi gerekmektedir. L-arjinin analoglarının kullanıldığı çalışmalarda, Griess reaksiyonu ile nitrit/nitrat düzeyleri ölçüldüğünde, bu maddelerin kadmiyum/bakırla etkileşip Griess reaktifi ile nitritle elde edilene benzer bir absorbans verdiği gösterilmiştir⁷³. Bu nedenle bu indirgeme yöntemi kullanılmamalıdır.

Literatürde sıklıkla kullanılan bir diğer indirgeme yöntemi ise, bakteriyel nitrat redüktaz (özellikle *Escherichia*, *Aspergillus* ve *Pseudomonas* türlerinden elde edilen) enziminin kullanılmasıdır^{74,75}. Bazı araştırmacılar serum, plazma veya idrar örneklerinin ölçümden önce deproteinize edilmelerini önermektedir. Deproteinizasyon için kullanılan yöntemler ultrafiltrasyon, çinkosülfat, kadmiyum ve çeşitli asitler gibi maddelerle örneğin muamelesidir^{44,45,74}. Ancak, sonuçların serum veya plazma proteinlerinden anlamlı bir şekilde etkilenmediği de gösterilmiştir⁵⁵. Serum örneklerinin toplandıktan sonra dondurularak ya da +4°C'de saklanması, örnekteki nitrit miktarlarını anlamlı şekilde etkilemediği bildirilmiştir⁴⁵. Plazma örneklerinde yapılan nitrit ölçümünün ise, nitritin hemoglobin ile hızla etkileşmesi sonucu hatalı sonuçlar verebileceği ileri sürülmüştür. Hemsiz plazmada nitritin nitrata dönüşme oranı 5:1 olarak bildirilmiştir⁷⁶. Diğer yandan dilüe heparinize plazmanın veya lenf sıvısının Griess reaktifi ile asidifikasyonunun örnekte gözle görülebilir precipitasyona neden olabileceği, ancak örneğin önceden çinko ile muamele edilmesi veya ultrasantrifügasyon ile bu olayın önlenemediği bildirilmiştir⁷⁷. Griess yönteminin bir dezavantajı, ortamda KCl, Ca(NO₃)₂, NH₄Cl, MgSO₄ ve CuSO₄ gibi maddelerin 10⁻⁴ M'dan daha düşük konsantrasyonlarda bulunması durumunda ± %0.2 kadar hatalı sonuçlar verebilmesidir⁷⁸.

İdrar veya plazmada ölçülen nitrat sadece endojen olarak oluşan NO'yu değil, aynı zamanda diyet ve barsakta bakteriyel metabolizmadan gelen nitratı da yansıtmaktadır. Araştırmacılar, deney hayvanları ve insanlarda NOS aktivitesinin in vivo çalışıldığı durumlarda nitrit/nitratsız diyet veya düşük nitrit/nitrat içerikli (≤ 180 µmol/gün, insanlar için) diyet uygulanmasını önermektedirler^{65,74}. Maksimum iNOS aktivitesi olsa bile plazma, idrar ve diğer vücut sıvılarında oluşan NO'nun çoğunun nitrata yıkıldığı ileri sürülmüştür^{57,74}. Diğer yandan, oluşan nitratın nitrite indirgenmesine dair bulgular da vardır. Nitritin plazma, serum ve idrarda düşük miktarlarda bulunmasının nedeni, nitritin vasküler sisteme geçtiğinde oksihemoproteinlerle (oksihemoglobin veya oksimiyoglobin) etkileşmesidir⁷⁹; sonuçta sitokiyometrik olarak nitrat ve hemoglobin oluşur¹⁹.



Bu olay NO'nun plazma, serum ve idrar gibi örneklerde neden nitrat olarak belirlenebildiğini açıklamaktadır. Ancak, nitrit vasküler sisteme katılmadan vücut sıvılarına geçerse tamamen nitrata okside olmayabilir; plevral, perikardiyal ve peritoneal sıvılar, eklem sıvısı ve eksüdatif sıvılarda anlamlı miktarlarda nitrit bulunabilir⁷⁵.

Diazotizasyon yöntemiyle nitrit/nitrat ölçümü ile ilgili olarak uygulamaya ilişkin pek çok ön işlem tanımlanmıştır. Daha önce de anlatıldığı gibi, araştırmacılar 1) hayvan veya insanlara belli miktarlarda nitrit/nitrat içeren diyet uygulanması, 2) deneylerde nitrit/nitratsız su kullanılması, 3) nitratın nitrite indirgenmesi, 4) örneklerin deproteinize edilmesi ve 5) serum örneklerinin dondurularak saklanması gibi ön işlemler uygulanmasından sonra nitrit/nitrat ölçümünün en az hatayla yapılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Buna karşın literatürde yapılan pek çok çalışmada, yukarıda sayılan ön işlemlere başvurmaksızın diazotizasyon uygulamasına ilişkin ör-

nekler bulunmaktadır^{24,62,74}. Laboratuvarımızda yapılan çalışmaların sonuçları, başlangıçta L-arjinin/NO yolağı aktive edilmişse nitratın nitrite indirgenmesi ve deproteinizasyon işlemleri yapılmadan da örneklerde nitrit miktarlarının ölçülebileceğini göstermektedir. Bundan sonraki bölümde, laboratuvarımızda nitrit ölçümü ile ilgili olarak yapılan çalışmalardan örnekler verilmiş ve diazotizasyon yöntemi anlatılmıştır.

Diazotizasyon Yöntemiyle Nitrit Ölçümünde Kullanılan Maddeler ve Araç-Gereçler

Sülfanilamid (Merck), NEDD (Merck), H₃PO₄ (Merck), sodyum nitrit (Sigma), nitrit/nitratsız distile su; santrifüj, 96 kuyucuklu düz tabanlı kültür plakları (Greiner), kültür plağı okuyucusu (Diagnostic Pasteur).

H₃PO₄'ün %85'lik çözeltisinden %2.5'lik çözeltisi suda hazırlanır. %2.5'lik H₃PO₄ içinde, sülfanilamid %1 ve NEDD %0.1'lik olacak şekilde çözülür. Sodyum nitritin suda (eğer hücre kültüründe çalışılıyorsa kullanılan besi yerinde) 0.25-50 µM aralığında dilüsyonları hazırlanır. Serum örnekleri 2000 devirde 15 dakika santrifüj edilerek ayrılır.

Makrofaj Hücre Kültürü Süpernatantı ve Serum Örneklerinde Nitrit Ölçümü

Çalışmalarımızda, Böyum'un tanımladığı yöntem uyarınca⁸⁰, sağlıklı ve tüberkülozlu deneklerin periferik heparinize venöz kanlarından izole edilen monosit/makrofaj hücre kültüründen belirli zamanlarda toplanan süpernatantta²⁷, aynı deneklerin periferik kanlarından ayrılmış serum örneklerinde⁴⁶, fare ve sıçanlarda yapılan septik şok ve ağrı ile ilgili çalışmalarda da fare veya sıçanlardan alınan kandan ayrılan serum örneklerinde^{54,63,81} nitrit miktarları diazotizasyon yöntemiyle ölçülmüştür.

Kültür süpernatantı veya serumdan alınan 100 µl örnek üzerine 50 µl sülfanilamid çözeltisi ve 50 µl NEDD çözeltisi bir kültür plağında eklenmiştir. Oda sıcaklığında 15 dakika bekleyen kültür plakları, kül-

tür plağı okuyucusuna yerleştirilerek örneklerin verdiği absorbanslar 620 nm referans filtreye karşı 550 nm'de okunmuştur. Ölçümler en az 3 kere yapılmıştır.

Nitrit Miktarlarının Hesaplanması

Distile suda okunan absorbans değerlerinin ortalamaları hesaplanır (n > 10). Ortalama değer kör olarak kabul edilir. Sodyum nitritin çeşitli dilüsyonları ile elde edilen absorbanslardan yararlanılarak (absorbans değerlerinden kör değeri çıkartılır) kalibrasyon doğru denklemleri belirlenir. Örneklerde okunan absorbans değerlerinden, bu denklemler kullanılarak örneklerdeki nitrit miktarları hesaplanır.

a) Örnekten dilüsyon yapılmamışsa;

Örnekten okunan absorbans değeri, kalibrasyon denklemine yerleştirilir ve buradan örnekteki nitrit konsantrasyonu hesaplanır.

$$[\text{NO}_2]_{\text{örnek}} = \frac{\text{Absorbans}_{\text{örnek}} - a}{b} \quad (\text{Denklem 1})$$

a: kesişim; b: eğim

b) Örnekten dilüsyon yapılmışsa;

Dilüe örnek için okunan absorbans değerinden kör için okunan absorbans değeri çıkartılır; bulunan değer dilüe örnekteki nitrit için absorbans değeridir. Bu değer kalibrasyon denklemine yerleştirilir ve buradan hesaplanan nitrit konsantrasyonu dilüsyon faktörüyle çarpılarak örnekteki nitrit konsantrasyonu hesaplanır.

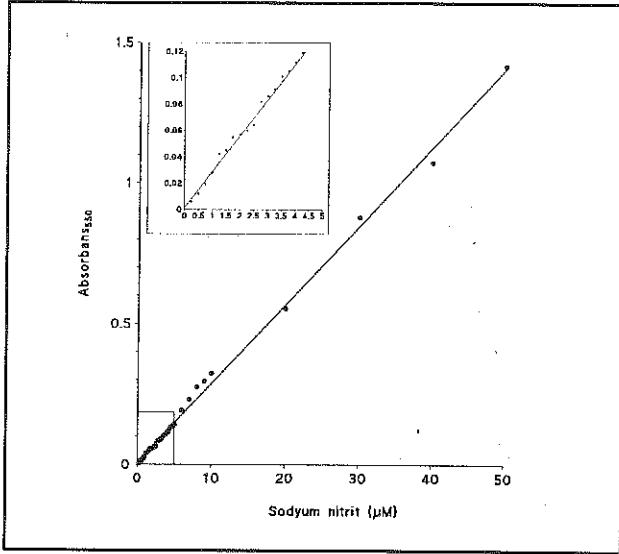
$$[\text{NO}_2]_{\text{örnek}} = \frac{\Delta \text{Absorbans} - a}{b} \times \text{Dilüsyon faktörü} \quad (\text{Denklem 2})$$

$$\Delta \text{Absorbans} = c - (d \times e)$$

a: kesişim; b: eğim; c: dilüe örnek için okunan absorbans değeri; d: kör için okunan absorbans değeri; e: kısım olarak dilüe örnekteki su miktarı / kısım olarak örnek miktarı

Örnek

Sodyum nitritin 0.25-50 µM konsantrasyon aralığında diazotizasyon yöntemiyle ölçülen absorbens değerleri Tablo 3'de, kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4'de verilmiştir. Kalibrasyon eğrisi bir doğrusallık göstermektedir.



Şekil 4. Sodyum nitrit konsantrasyonlarına karşı okunan absorbens değerleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisi.

Tablo 3. Sodyum nitrit konsantrasyonlarına karşı okunan absorbens değerleri.

Konsantrasyon (µM)	Absorbans	Konsantrasyon (µM)	Absorbans
0.25	0.006	4.00	0.112
0.50	0.012	4.25	0.119
0.75	0.019	4.50	0.132
1.00	0.028	4.75	0.135
1.25	0.042	5	0.142
1.50	0.045	6	0.192
1.75	0.055	7	0.230
2.00	0.057	8	0.275
2.25	0.060	9	0.295
2.50	0.064	10	0.324
2.75	0.082	20	0.554
3.00	0.086	30	0.878
3.25	0.091	40	1.073
3.50	0.101	50	1.416
3.75	0.105		

$$Y_{\text{Absorbans}} = 0.005 + 0.029 X[\text{NO}_2^-]; r^2 = 0.9959$$

a) Dilüe edilmemiş serum örneğinde nitrit konsantrasyonunun hesaplanması

Denklem 1'e göre;

$$\text{Absorbans}_{\text{Örnek}} = 0.048; a = 0.005; b = 0.029$$

$$[\text{NO}_2^-]_{\text{Örnek}} = (0.048 - 0.005) / 0.029 = 1.48 \text{ (M)}$$

b) Dilüe edilmiş serum örneğinde nitrit konsantrasyonunun hesaplanması

1:5 oranında dilüe edilmiş (1 kısım serum + 4 kısım su) bir serum örneği için Denklem 2'ye göre;

$$a = 0.005; b = 0.029; c = 0.026; d = 0.0056; e = 4/5 = 0.8$$

$$\Delta_{\text{Absorbans}} = 0.026 - (0.0056 \times 0.8) = 0.022$$

$$[\text{NO}_2^-]_{\text{Örnek}} = \frac{0.022 - 0.005}{0.029} \times 5 = 2.93 \text{ µM}$$

SONUÇ

Bir çok hastalığın patojenezinde rolü olması nedeniyle gerek nNOS veya eNOS gerekse iNOS aracılığıyla oluşan NO'nun ölçümü, biyolojik etkileri kadar önemlidir. Biyolojik örneklerde NO ölçümü için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Kullanılacak analitik yöntemin dikkatle seçilmesi ile daha başarılı sonuçlar elde edilebilir. Bunlardan diazotizasyon yöntemi, pek çok örnekte (serum, plazma, idrar, hücre kültürü süpernatantları gibi) duyarlı, ucuz, basit ve hızlı bir şekilde ölçüm yapılabilmesi bakımından sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntem, özellikle hücre aracılığıyla immün yanıtın efektor bir bileşeni olarak sitokinle uyandırmada aşırı miktarlarda oluşan NO'nun rolünün aydınlatılmasına önemli katkılar sağlayabilmektedir.

KAYNAKLAR

- Hibbs JB, Vavrin V, Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells, *J. Immunol.*, 138(2), 550-565, 1987.
- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature*, 333, 664-666, 1988.
- Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins, *J. Vasc. Res.*, 31, 131-143, 1994.
- Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur. Respir. J.*, 10, 699-707, 1997.

5. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenic factor in autoimmunity, *Immunol. Today*, 13(5), 157-160, 1992.
6. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule, *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 175-195, 1994.
7. Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord, *Pain*, 52, 127-136, 1993.
8. Zhang J, Snyder SH. Nitric oxide in the nervous system, *Annu. Rev. Toxicol.*, 35, 213-233, 1995.
9. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate, *Biochem.*, 27, 8706-8711, 1988.
10. Denis M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates, *J. Leukoc. Biol.*, 49, 380-387, 1991.
11. Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system, *Eur. Heart J.*, 14(Suppl. I), 10-15, 1993.
12. Lorente JA, Landin L, Renes E. Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of septic shock, *Crit. Care Med.*, 21, 759-767, 1993.
13. Förstermann U, Mugge A, Alheid U, Haverich A, Frolich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilatation in atherosclerotic human coronary arteries, *Circ. Res.*, 62, 185-190, 1988.
14. Barnes PJ, Belvisi MG. Nitric oxide and lung disease, *Thorax*, 48, 1034-1043, 1993.
15. Bachmann S, Mundel P. Nitric oxides in the kidney: synthesis, localization and function, *Am. J. Kidney Dis.*, 24(1), 112-129, 1994.
16. Corbett JA, McDaniel ML. Perspectives in diabetes. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of β -cells? Possible therapeutic interactions in IDDM, *Diabetes*, 41, 897-903, 1992.
17. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels, *Trends Biochem. Sci.*, 17, 399-402, 1992.
18. Stamler JS, Singel DJ., Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science* 258, 1898-1902, 1992.
19. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8103-8107, 1993.
20. Marletta MA. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents, *Chem. Res. Toxicol.*, 1, 249-257, 1988.
21. Tracey WR. Spectrophotometric detection of nitrogen oxides using azo dyes, *Neuroprotocols*, 1(2), 125-131, 1992.
22. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models, *FASEB J.*, 7, 349-360, 1993.
23. Kondo K, Mitchell JA, de Nucci G, Vane JR. Simultaneous measurement of endothelium-derived relaxing factor by bioassay and guanylate cyclase stimulation, *Br. J. Pharmacol.*, 98, 630-636, 1989.
24. Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE, Haney AF, Granger DL. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, bioprotein, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages, *Blood*, 86(3), 1184-1195, 1995.
25. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288, 373-376, 1980.
26. Kita Y, Hirasawa Y, Maeda K, Nishio M, Yoshida K. Spontaneous nitric oxide release accounts for the potent pharmacological actions of FK409, *Eur. J. Pharmacol.*, 257, 123-130, 1994.
27. Tunçtan, B, Okur, H., Çalşır, C.H., Abacıoğlu, H., Çakıcı, İ., Kanzik, İ., Abacıoğlu, N. Comparison of nitric oxide production by monocyte/macrophages in healthy subjects and patients with active pulmonary tuberculosis, *Pharmacol. Res.* 37, 3, 219-226, 1998.
28. Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S. Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide, *Br. J. Pharmacol.*, 108, 833-837, 1993.
29. Reckelhoff JF, Kellum JA, Blanchard EJ, Bacon EE, Wesley AJ, Kruckeberg WC. Changes in nitric oxide precursor, L-arginine, and metabolites, nitrate and nitrite, with aging, *Life Sci.*, 55(24), 1895-1902, 1994.
30. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 9265-9269, 1987.
31. Hecker M, Mitchell JA, Harris HJ, Katsura M, Thiemermann C, Vane JR. Endothelial cells metabolize NG-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 167, 1037-1043, 1990.
32. Bogle RG, Moncada S, Pearson CD, Mann GE. Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell L-arginine transporter, *Br. J. Pharmacol.*, 105, 768-770, 1992.
33. Peterson DA, Peterson DC, Archer S, Weir EK. The nonspecificity of specific nitric oxide synthase inhibitors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 187, 797-801, 1992.
34. Archer SL, Hampl V. NG-monomethyl-L-arginine causes nitric oxide synthesis in isolated arterial rings: trouble in paradise, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 188(2), 590-596, 1992.
35. Chung S-J, Fung H-L. Removal of ammonia interference in the redox chemiluminescence assay of nitric oxide, *Anal. Lett.*, 25, 2021-2036, 1992.
36. Arroyo C, Kohno M. Difficulties encountered in the detection of nitric oxide (NO) by spin trapping techniques. A cautionary note, *Free Radic. Res. Commun.*, 14, 145-155, 1991.

37. Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF release from cultured endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 154(1), 236-244, 1988.
38. Gustafsson L, Leone A, Persson M, Wiklund N, Moncada S. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea-pigs and humans, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181, 852-857, 1991.
39. Schmidt K, Klatt P, Mayer B. Reaction of peroxynitrite with oxyhaemoglobin. Interference with photometrical determination of nitric oxide, *Biochem. J.*, 301, 645-647, 1995.
40. Malinski T, Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor, *Nature*, 358, 676-678, 1992.
41. Muller CD, Schuber F. Fluorometric determination of polystyrene latex: application to the measurement of phagosomes and phagocytosis, *Anal. Biochem.*, 152, 167-171, 1986.
42. Pai T, Payne W, LeGall J. Use of chemiluminescence detector for quantitation of nitric oxide produced in assays of denitrifying enzymes, *Analyt. Biochem.*, 166, 150-157, 1987.
43. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S, Westfelt UN, Peterson A-S, Waagstein F. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ. Res.*, 73, 1121-1127, 1993.
44. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids, *Anal. Biochem.*, 126, 131-138, 1982.
45. Wong HR, Carcillo JA, Burckart G, Kaplan SS. Nitric oxide production in critically ill patients, *Arc. Dis. Child*, 74, 182-189, 1996.
46. Tunçtan B, Çalışır CH, Uludağ O, Okur H, Çakıcı İ, Abacıoğlu N. Aktif pulmoner tüberkülozlu hastaların serum nitrit ve TNF(düzeyleri üzerine anti-tüberküloz tedavinin etkisi, XIV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Tekirova, Antalya, 2-7 Kasım, P93, 1997.
47. Shi Y, Li H-Q, Shen C-K, Wang J-H, Qin S-W, Liu R, Pan J. Plasma nitric oxide levels in newborn infants with sepsis, *J. Pediatr.*, 123, 435-438, 1993.
48. Evans TG, Rasmussen K, Wiebke G, Hibbs JB. Nitric oxide synthesis in patients with advanced HIV infection, *Clin. Exp. Immunol.*, 97, 83-86, 1994.
49. Wagner DA, Schultz DS, Deen WM, Young VR, Tannenbaum SR. Metabolic fate of an oral dose of ¹⁵N-labeled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid, *Cancer Res.*, 43, 1921-1925, 1983.
50. Tricker AR, Pfundstein B, Kalble T, Preussmann R. Secondary amine precursors to nitrosamines in human saliva, gastric juice, blood, urine and faeces, *Carcinogenesis*, 13(4), 563-568, 1992.
51. Heck DE, Laskin DL, Gardner CR, Laskin JD. Epidermal growth factor suppress nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing, *J. Biol. Chem.*, 267(30), 21277-21280, 1992.
52. Mollace V, Colasanti M, Persichini T, Bagetta G, Lauro GM, Nistico G. HIV gp120 glycoprotein stimulates the inducible isoform of NO synthases in human cultured astrocytoma cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 194(1), 439-445, 1993.
53. Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM. Nitric oxide expression in the spleen, but not in the liver, correlates with resistance to blood-stage malaria in mice, *J. Immunol.*, 155, 5306-5313, 1995.
54. Uludağ O, Tunçtan B, Altuğ S, Zengil H, Abacıoğlu N. p-Benzokinin ile oluşturulan abdominal konstriksiyon modelinde mepiraminin etkileri ve serum nitrit düzeylerinin kronoritmisitesi (I), XIV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Tekirova, Antalya, 2-7 Kasım, P105, 1997.
55. Tracey WR, Tse J, Carter G. Lippolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthases inhibitors, *J. Exp. Ther.*, 272(3), 1011-1015, 1995.
56. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7738-7742, 1985.
57. Granger DL, Hibbs JB, Broadnax LM. Urinary nitrate excretion to murine macrophage activation. Influence of dietary L-arginine and oral NG-monomethyl-L-arginine, *J. Immunol.*, 146(4), 1294-1302, 1991.
58. Cartwright JE, Johnston AP, Whitley GJ. Inhibition of nitric oxide synthases by antisense techniques: investigations of the roles of NO produced by murine macrophages, *Br. J. Pharmacol.*, 120, 146-152, 1997.
59. Lepoivre M, Boudbid H, Petit J-F. Antiproliferative activity of gamma-interferon combined with lipopolysaccharide on murine adenocarcinoma: dependence on an L-arginine metabolism with production of nitrite and citrulline, *Cancer Res.*, 49, 1970-1976, 1989.
60. Jun CD, Kim SH, Soh CT, Kang SS, Chung HT. Nitric oxide mediates the toxoplasmastatic activity of murine microglial cells in vitro, *Immunol. Invest.*, 22(8), 487-501, 1993.
61. Carter EA, Derojas-Walker T, Tamir S, Tannenbaum SR, Yu Y-M, Tompkins RG. Nitric oxide production is intensely and persistently increased in tissue by thermal injury, *Biochem. J.*, 304, 201-204, 1994.
62. Ruetten H, Southan GJ, Abate A, Thiernemann C. Attenuation of endotoxin-induced multiple organ dysfunction by 1-amino-2-hydroxy-guanidine, a potent inhibitor of inducible nitric oxide synthases, *Br. J. Pharmacol.*, 118, 261-270, 1996.
63. Güney HZ, Tunçtan B, Uluoğlu C, Uludağ O, Abacıoğlu N, Zengil H. Siçanlarda serum nitrit düzeylerindeki zaman bağımlı değişikliklerin incelenmesi, XIII. Ulusal ve Uluslararası Farmakoloji Kongresi, Tekirova, Antalya, 5-8 Kasım, Bildiri Özetleri, s. 115, 1996.

64. Zingarelli B, Southan GJ, Gilad E, O'Connor M, Salzman AL, Szabo C. The inhibitory effects of mercaptoalkylguanidines on cyclooxygenase activity, *Br. J. Pharmacol.*, 120, 357-366, 1997.
65. Green C, Tannenbaum SR, Goldman R. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat, *Science*, 212, 56-58, 1981.
66. Sherman MP, Aeberhard EE, Wong VZ, Griscavage JM, Ignarro LJ. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthases activity in rat alveolar macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191(3), 1301-1308, 1993.
67. Keller R, Geiges M, Keist R. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor cell killing by activated macrophages, *Cancer Res.*, 50, 1421-1425, 1990.
68. Schini VB, Durante W, Elizondo E, Scott-Burden T, Junquero DC, Schafer AI, Vanhoutte PM. The induction of nitric oxide synthases activity is inhibited by TGF- β_1 , PDGF_{AB} and PDGF_{BB} in vascular smooth muscle cells, *Eur. J. Pharmacol.*, 216, 379-383, 1992.
69. Kondo S, Ishiguro N, Iwata H, Nakashima I, Isobe K-I. The effects of nitric oxide on chondrocytes and lymphocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197 (3), 1431-1437, 1993.
70. Hirahashi J, Kakaki T, Hishikawa K, Marumo T, Yasumori T, Hayashi M, Suzuki H, Saruta T. Endothelin-1 inhibits induction of nitric oxide synthases and GTP cyclohydrolase I in rat mesengial cells, *Pharmacology*, 53, 241-249, 1996.
71. up SJ, Green BG, Grant SK. 2-Iminobiotin is an inhibitor of nitric oxide synthases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204(2), 962-968, 1994.
72. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie Q-W, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase, *J. Exp. Med.*, 178, 749-754, 1993.
73. Nithipatikom K, Pratt PF, Campbell WB. Nitro-L-arginine interferes with the cadmium reduction of nitrate/Griess reaction method of measuring nitric oxide production, *Eur. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 34, 133-137, 1996.
74. Hibbs JB, JR, Westenfelder C, Taintor R, Vavrin Z, Kablitz C, Baranowski RL, Ward JH, Menlove RL, McMurry MP, Kuschner JP, Samlowski WE. Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy, *J. Clin. Invest.*, 89, 867-877, 1992.
75. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with the Griess reaction. Methods: A Companion to Methods in *Enzymology*, 7, 78-83, 1995.
76. Benjamin N, Vallance P. Plasma nitrite as a marker of nitric oxide production, *Lancet*, 344, 960, 1994.
77. Grisham MB, Johnson GG, Gautreaux MD, Berg RD. Measurement of nitrate and nitrite in extracellular fluids: a window to systemic nitric oxide metabolism, Methods: A Companion to Methods in *Enzymology*, 7, 84-90 1995.
78. Karayannis MI, Piperaki EA, Maniadaki MM. Kinetic determination of nitrite based on the Griess reaction and stopped flow technique, *Anal. Lett.*, 19(1&2), 13-23, 1986.
79. Kosaka H, Imaizumi K, Imai K, Tyuma I. Stoichiometry of the reaction of oxyhemoglobin with nitrite, *Biochim. Biophys. Acta*, 581, 184-188, 1979.
80. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21 (Suppl. 97), 77-89, 1968.
81. Tunçtan B, Uludağ O, Altuğ S, Abacıoğlu N. iNOS ve COX-2 inhibisyonunun LPS ile farede olutturulan septik tok modelindeki rolü, XIV. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Tekirova, Antalya, 2-7 Kasım, P92, 1997.