

## Derleme

# Nitrik Oksit Ölçüm Yöntemleri

## Methods for Measurement of Nitric Oxide

Şenay BALCI FİDANCI<sup>1</sup>, Lülüfer TAMER GÜMÜŞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

### Özet

Nitrik oksit, birçok sistemde önemli görevlere sahip ve bununla birlikte birçok hastalıkla ilişkilidir. Bu nedenle tanımlanması ve miktar tayini önemlidir. Nitrik oksit ölçüm yöntemleri, değerlendirilen hastalıklar ve örnek çeşitlerine göre farklılık gösterir. Nitrik oksitin yarılanma ömrünün çok kısa olması, *in vivo* olarak düşük miktarlarda oluşması ve oluştuktan sonra hızla moleküler oksijen ile etkileşerek reaksiyona girmesi ölçümünü güçlendirmektedir. Bu yüzden nitrik oksit ölçümünde standart bir yöntem olmamakla birlikte çalışma konusuna göre güvenilir sonuçlar elde etmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Nitrik oksit, elektrokimyasal ve kemilüminesans gibi yöntemler ile direk ölçülebilir de, nitrik oksit metabolizmasının son ürünleri olan nitrit ve nitrat miktarlarının ölçülmesi hızlı ve basit bir yöntem olarak daha sık kullanılmaktadır. Bu nedenle bu derlemede nitrik oksit düzeyinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** nitrik oksit; nitrit; nitrat; ölçüm yöntemleri

### Abstract

Nitric oxide has significant tasks in most systems, and also is associated with many diseases. Therefore, its identification and quantification are important. Measurement methods for nitric oxide differ based on the type of the assessed diseases and the samples. Nitric oxide measurement is difficult because of its dramatically short half-life, formation in trace amounts under *in vivo* conditions, and subsequent rapid reaction with molecular oxygen. Thus, various methods have been used to obtain reliable results although there isn't any reported standard method. Even though, nitric oxide can be measured directly using electrochemical and chemiluminescent methods, the measurement of the amount of nitrite and nitrate, end products of nitric oxide metabolism, have been used more frequently as fast and simple methods. Therefore, in this article, it was aimed to compare the methods used for determination of nitric oxide levels.

**Keywords:** nitric oxide; nitrite; nitrate; measurement methods

---

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2011;4(3):1-8

Geliş Tarihi : 21.09.2012

Kabul Tarihi : 27.11.2012

Yazışma Adresi: Araş. Gör. Şenay BALCI FİDANCI, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 33100 Mersin

Tel : 0324 337 43 00/1530

Faks : 0324 337 43 05

E-posta: sbfidanci@hotmail.com

## Giriş

Nitrik oksit (NO), pek çok hücrede nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından katalizlenen reaksiyon ile sentezlenmekte ve L-arginin ile O<sub>2</sub> molekülleri, NO ve sitrüllin moleküllerine dönüştürülmektedir. NO'nun sentez reaksiyonu sırasında moleküler O<sub>2</sub>'nin yanı sıra kofaktör olarak flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), tetrahidrobiopterin (BH<sub>4</sub>) ve hem kullanılır. Bu kofaktörler arasında elektron transferleri gerçekleşmektedir (1). NOS enziminin üç izoformu tanımlanmış olup, ikisi yapısal (cNOS), üçüncüsü ise indüklenebilir (iNOS) formdur. İmmun sistemde bulunan iNOS, sitokin ve diğer bileşikler tarafından uyarılabilen formdur. cNOS ise endotel hücrelerde bulunan ve vazodilatasyondan sorumlu endotelial NOS (eNOS) ve sinir sisteminde bulunan nöronal NOS (nNOS) olarak iki grupta incelenir (2).

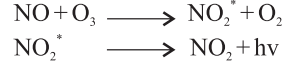
Nitrik oksit, molekül ağırlığı 30.006 gr/mol olup renksiz ve son derece toksik bir gazdır. NO, serbest radikal yapısındadır ve yarı ömrü çok kısa olup 20-30 saniyedir. NO lipofilik özellikte olup, yüksek konsantrasyonlardaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda çözünme özelliği gösterir. Düşük konsantrasyonlarda ise, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilir. Havadaki NO, kısa sürede oksijenle oksitlenerek NO<sub>2</sub>'ye dönüşür. NO'nun, üzerinde yük taşınamaması ve eşlenmemiş elektron bulundurması onu önemli bir mesajcı yapar. Yani yüksüz olduğu için hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçer ve eşlenmemiş bir elektrona sahip olması nedeni ile hızlı reaksiyona girer (3,4).

Nitrik oksitin immün sistemde, sinir sisteminde, kardiyovasküler sistemde önemli görevleri vardır. Bunlar; endotel kaynaklı vazokonstriktörlerin etkilerine karşı koymak, trombosit adezyonu ve agregasyonunu, lökosit adezyon ve infiltrasyonunu ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu engellemek ve düşük molekül ağırlıklı lipoprotein oksidatif modifikasyonunu önlemek olarak özetlenebilir (5).

Canlılarda birçok hastalıkla ilişkili NO'nun tanımlanması ve miktarının tayini normal ve patolojik durumlardaki değerinin belirlenmesi önemlidir. Ancak NO'nun yarılanma ömrünün çok kısa olması ve NO'nun *in vivo* olarak düşük miktarlarda oluşması ve oluştuktan sonra hızla moleküler oksijen ile etkileşerek reaksiyona girmesi ölçümünü güçleştirmektedir (3,4). Bu yüzden NO ölçümünde standart bir yöntem olmamakla birlikte çalışma konusuna göre güvenilir sonuçlar elde etmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. NO elektrokimyasal ve kemilüminesans gibi yöntemler ile direk ölçülebilir de, NO metabolizmasının son ürünleri olan NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ve NO<sub>3</sub><sup>-</sup> miktarlarının ölçülmesi hızlı ve basit bir yöntem olarak daha sık kullanılmaktadır.

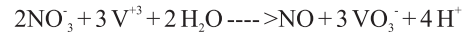
## Nitrik Oksit Düzeylerinin Kemilüminesans Yöntem ile Belirlenmesi

Bu yöntemde prensip, NO'nun O<sub>3</sub> ile etkileşmesi sonucunda açığa çıkan ışığın spektroskopik olarak ölçümüne dayanmaktadır. O<sub>3</sub>, NO ile tepkimesinde uyarılmış durumdaki nitrojen dioksit (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>) oluşur. NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>'nin normal formuna dönerken yaydığı foton kemilüminesans yöntemiyle ölçülür (6).

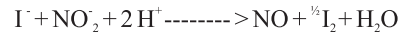


Nitrik oksit düzeyini, NO ve O<sub>3</sub> arasındaki gaz faz kemilüminesana dayalı teknikle ölçen bu direkt yöntemde yüksek derecede hassas dedektöre sahip olan NO analizörü kullanılır. NO-kemilüminesans analizörü, bir reaksiyon kabini, yayılan ışığı toplayıp elektrik sinyaline dönüştüren bir ışık detektörü ve bir kaydediciden oluşur. Düşük sabit basıncındaki reaksiyon kabine analiz edilecek örnek ve ozon jeneratöründe oluşan ozon gelir. Kabinden çıkan O<sub>3</sub>, NO ve NO<sub>2</sub> gibi gazlar kömür filtreden geçirilerek atılır. Elektron olarak uyarılmış nitrojen dioksitin emisyonu spektrumunda infrared bölgenin yakınındadır ve termoelektrik olarak soğutulmuş kırmızıya hassas fotomultiplier tüp tarafından tespit edilir. Gaz fazındaki NO için <1 ppb iken sıvı örnekler için ise tespit aralığı yaklaşık olarak 1 pikomolardır (7).

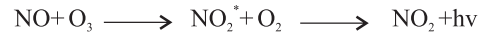
Nitrik oksit, biyolojik sistemlerde oksijen varlığında hızla oksidasyon ürünleri olan NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ve NO<sub>3</sub><sup>-</sup>'e dönüşür. Bunlar uçucu olmadıkları ve O<sub>3</sub> ile reaksiyona girmedikleri için, öncelikle NO'ya indirgenmeleri gerekir. NO<sub>2</sub>, oda sıcaklığında birçok indirgeyici ajanla NO'ya indirgenebilir. NO<sub>3</sub>'ün NO'ya dönüşmesi için kuvvetli indirgeyici ajanlar ve yüksek sıcaklıklar gerekmektedir. Nitratı ölçmek için HCl içindeki vanadidum (III) kloridin, nitratı NO'ya çevirmesinden yararlanır (8).



NO<sub>2</sub><sup>-</sup>'i ölçmek için glasiyel asetik asit içindeki KI'nın NO<sub>2</sub><sup>-</sup>'i, NO çevirmesinden yararlanır (8).



NO-kemilüminesansı, NO'nun O<sub>3</sub> ile olan reaksiyonunda oluşan NO<sub>2</sub>'nin uyarılmış durumda olması esasına dayanır (8).



Gaz formundaki NO için en uygun yöntem olan kemilüminesans yöntem, genellikle göğüs hastalıklarında, astım, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, sarkoidoz gibi hastalıklarda NO düzeylerinin saptanmasında kullanılır. Ölçümü ilaç kullanımı, sigara, alkol, gebelik, kafein, yaş ve cinsiyet gibi faktörler etkileyebilir (9).

Tekrarlanabilir, doğrudan ve yüksek duyarlılık ile ölçüm, sulu ya da gaz halindeki örneklerde analiz kolaylığı, hızlı ve güvenilir olması yöntem için avantaj sayılsa da, biyolojik ortamdan NO ayırmanın güçlüğü, ortamda O<sub>3</sub> ile etkileşebilen maddelerin (amonyum, olefin, sülfür gazları gibi) bulunması, zaman ve maliyet faktörleri nedeniyle bu yöntemin rutinde tercih edilmemesine neden olmaktadır (10).

### Nitrik Oksit Düzeylerinin Elektron Paramanyetik Rezonans Yöntemi ile Belirlenmesi

Işınlanan ürünün soğurduğu doz miktarı ve ışınlama sonucunda oluşan çiftlenmemiş elektrona sahip moleküller radikallerin miktarları, yapıları ve kararlılıkları elektron paramanyetik rezonans (EPR) spektroskopisi yardımıyla direkt belirlenir. Gaz, sıvı ve katı bir maddenin EPR tekniği ile incelenmesinde, atom ya da molekülde eşlenmemiş bir elektronun manyetik momentinin yön değiştirmesi esas alınır. Burada temel nokta, incelenecek atom ya da molekülün paramanyetik özellik göstermesi gerektiğidir. Çünkü bir madde eşlenmemiş bir veya bir kaç elektron içeriyorsa o madde paramanyetikdir. Paramanyetik madde kuvvetli bir manyetik alana konulduğunda alan çizgilerini çekerler ve üzerlerinden kolayca geçmesini sağlarlar. Bunun sonucunda, alanın yokluğunda rastgele yönelen spinler, alanla etkileştiğinde alana paralel ve antiparalel olarak yönelirler. Sistemin almış olduğu bu iki durum, farklı iki enerji değerine karşılık gelir. Bu iki enerji değerinin farkına eşit bir enerji verildiğinde EPR de spin durumları arasındaki geçişler gözlenir. EPR paramanyetik iyonun yörüngesi ve etkileştiği çekirdekler hakkında ayrıntılı bilgiler verir. Bu yöntem ile herhangi bir paramanyetik madde incelenebilir ve yapısı aydınlatılabilir. EPR spektrumundaki rezonans çizgilerinin genişliği ve bu çizgilerin yapısından faydalanılarak eşlenmemiş elektronun yeri ve çevresi hakkında bilgi edinilir (11).

Serbest radikal yapısında olan NO'nun nitronlar veya nitrozo bileşikler gibi nitroksitler veya hemoglobinin ile etkileşimi sırasında oluşan enerji miktarı ve manyetik alan şiddeti bu yöntemle ölçülebilir. NO kısa ömürlü bir bileşik olduğundan, EPR yöntemi ile tayini için NO'yu bağlayan ve stabilize eden kompleks yapıdaki paramanyetik moleküller kullanılır. Kullanılan başlıca moleküller; Hem-Fe(II), Fe(II) kompleksleri ve Endojen Fe(II)-Tiyollerdir. NO'nun *in vivo* ortamda ölçümü kısa yarı ömrü dolayısıyla çok daha zordur. Birkaç yararlı yöntemden birisi NO'nun Fe-ditiyokarbamat dönüş tuzağı (spin trapping) yöntemidir. Oluşan mononitrozildemir EPR ile ölçülür. Radikalleriyle tuzaklandığı hücre içi ölçümler için asetillenmiş formda floresan boya türleri kullanılmaktadır. Oluşan ürün DAF-2(4,5-diaminofluoreskan)'dir. (12,13).

Yöntemin avantajları, sulu ortam, hücreler ve dokularda basit ve yüksek duyarlılık ile ölçüm yapılabilmesi olarak sıralanırken, donanımın oldukça özel ve pahalı olması, ortamın pH'sına bağlı olarak NO-hemoglobin etkileşmesi ve sonuçların doğru alınmaması dezavantajları arasında yer alır (14).

### Nitrik Oksit Düzeylerinin Methemoglobin Spektrofotometrisi Yöntemi ile Belirlenmesi

Nitrik oksitin, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ve NO<sub>3</sub><sup>-</sup>'e okside olması NO metabolizmasının asıl yoludur. Plazma ve diğer fizyolojik sıvılarda veya tamponlarda NO tamamen nitrite okside olur ve saatlerce stabil olarak kalır. Bunun için NO, öncelikle moleküler O<sub>2</sub> ile reaksiyona girer. NO ve NO<sub>2</sub> kanda hızla NO<sub>3</sub><sup>-</sup> okside olur. *In vivo* NO ve NO<sub>2</sub><sup>-</sup>'nin NO<sub>3</sub><sup>-</sup>'a okside olması tam net olamamakla birlikte çeşitli mekanizmalar öne sürülmüştür. Bunlardan biri, NO otoksidasyonu ile oluşan NO<sub>2</sub>'nin hızla NO<sub>3</sub><sup>-</sup>'e dönüşümünden oksihemoglobin veya oksimiyoglobin gibi oksihemoproteinlerle oksidasyonunun sorumlu olduğudur (15). Düşük konsantrasyondaki NO'nun hemoglobine bağlanma affinitesi oksijene göre oldukça yüksektir. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'yu önce NO<sub>2</sub><sup>-</sup>'ye ardından NO<sub>3</sub><sup>-</sup>'e oksitler. Hemoglobinin nitrozasyonu oksijenin dokulara taşınmasında önemlidir ve hemoglobine oksijen bağlanmasını değiştirmektedir. Dolaşımdaki oksihemoglobin NO için kuvvetli bir oksidan olup onun etkilerini engelleyen bir inhibitördür (16,17).

Nitrik oksit, oksihemoglobin ile tepkimeye girerek nitrat ve methemoglobin oluşturur. Methemoglobin oluşumu spektrofotometre ile izlenir. Oksihemoglobin veya oksimiyoglobinin kullanılabilirdiği bu indirekt yöntem, NO tayinlerinin standart yöntemlerinden biridir. Hemoglobin veya miyoglobin, görünür alanda yaygın bir absorpsiyon spektrumuna ve farklı oksidasyon düzeylerindeki absorpsiyonları dalga boyuna bağlı olarak değişir. NO'nun deoksihemoglobin ile tepkimesiyle oluşan nitrozil hemoglobin, 560 nm'deki absorpsiyon azalması ile spektroskopik olarak izlenebilir. NO ve nitrik oksitten kaynaklanan oksidanların oluşumu, ortamdaki hemoglobin veya miyoglobinin absorpsiyon spektrumları izlenerek incelenebilir (18,19).

İndirgenmiş hemoglobinin (Fe<sup>2+</sup>), NO tarafından methemoglobine (Fe<sup>3+</sup>) oksidasyonu sırasında oluşan NO<sub>3</sub><sup>-</sup>'ün verdiği absorpsiyon spektroskopik ölçümü olan methemoglobin spektrofotometrisi, kolaylık ve kısa sürede ölçüm yapılabilir. Ortamda bulunan nitrozil gruplarının da ölçülmesi istenmeyen bir durum olarak ortaya çıkar (18,19).

## Nitrik Oksit Düzeylerinin Elektrokimyasal Yöntemler ile Belirlenmesi

Elektrokimyasal yöntemler, spesifik elektrotlar üzerinde NO oksidasyonu sırasında oluşan akımın ölçülmesidir. Bu yöntemin ölçüm esası, NO'nun gaz geçirgen bir membrandan geçerek ince bir elektrolit tabakasından difüzyonu ve takiben ölçüm elektrotlarını okside etmesine dayalıdır. Bu oksidasyon, membranın dışındaki NO'nun konsantrasyonu ile orantısal bir akım yaratır. Biyolojik örneklerdeki NO'nun *in situ* olarak direkt ölçülebilmesini sağlar. Reaksiyon zamanı uzundur (20).

Biyosensörler, genel olarak analiz edilecek madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren biyoaktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sisteminde kombinasyonu ile oluşturulurlar. Biyosensörlerin ana görevi biyolojik bir olayı elektrik sinyaline dönüştürmesidir. Biyosensörler, biyobileşen (biyoreseptörler) ve fiziksel bileşen (transduserler) olmak üzere iki ana kısımdan oluşur (21).

Biyosensörlerin gelecekte önemli uygulamalarından biri süperoksit ve NO gibi kısa ömürlü, hormonlar ve nörotransmitterler gibi düşük konsantrasyonlu maddelerin *in vivo* tayinidir (21).

1962 yılında, Glukozoksidadaz (GOD) enzimi  $O_2$  elektrodu ile kombine edilerek kanın glukoz düzeyinin ölçülmesi ile yeni bir analitik sistem oluşmuştur. Bu sistem bir yandan biyolojik sistemin yüksek spesifitesini (enzim) diğer taraftan ise fiziksel sistemin (elektrod) tayin duyarlılığını birleştirmiş ve geniş spektrumlu bir uygulama olanağı bulmuştur. Klasik elektrokimya ile sadece anyon ve katyonları belirleyen sensörler hazırlanabilirken sisteme biyomateriyalin de katılması ile diğer birçok maddenin tayini mümkündür (21).

Clark elektrodu kullanılan yöntemde, 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 yapılmaktadır. Bu yöntemde, nM düzeyinde ölçüm yapılabilmektedir (20).

Kullanılan elektrodun NO'ya spesifik olması, yüksek miktarların ölçülebilmesi, dokularda lokal olarak oluşan NO'nun ölçülebilmesi ve kısa zamanda yanıt alınabilmesi avantaj sağlarken, elektrotları ayıran yarı geçirgen membrandan geçebilen oksijen ile reaksiyona girerek  $NO_2^-$  oluşumu ile duyarlılığın azalması dezavantajdır (20).

Porfirinik mikroelektrot kullanılarak, NO oksidasyonunun polimerik metalporfirin (n-tipi yarı iletken) üzerinde olması ve oluşan akımın amperometrik olarak ölçülmesi sağlanmaktadır. Yöntemin avantajı, kullanılan elektrodun NO'ya spesifik olması, yüksek miktarların ölçülebilmesi, alıcının küçük olması ve hızlı yanıt verebilmesi, NO salıverilme kinetiğinin çalışılabilmesi,

endotel ve düz kas hücre kültürlerinde NO'nun ölçülebilmesidir. Ancak ortamda bulunan katekolaminlerin de ölçülebilmesi dezavantajdır (20).

## Nitrik Oksit Düzeylerinin Kapiller Elektroforez Elektrokimyasal Yöntemi ile Belirlenmesi

Kapiller elektroforezde elektriksel bir alan altında ve bir iletken ortam altında (genellikle sulu bir ortam) yüklü parçacıkların ya da moleküllerin hareketleri yanında elektroozmotik hareketlilik denilen ikinci bir hareketlilik vardır. Elektriksel alan uygulandığı andan itibaren kapiller içerisindeki yüklü ve yüksüz parçacıklar, elektroozmoz ve elektroforetik hareketliliğin etkisi altında kalırlar (22).

Elektroozmotik akış: Ergitilmiş silika yüzeyinin negatif yüklü olması, içerisindeki çözeltinin sürekli pozitif yüklenmesine yol açar. Elektrotlar arasına potansiyel uygulandığında pozitif yüklenmiş çözelti katoda doğru akar. Böylece anottan katoda doğru sürekli bir akış vardır (22).

Elektroforetik hareketlilik: Elektriksel etki altındaki farklı büyüklük ve yükteki parçacıklar farklı hızlara sahip olarak hareket etmektedirler. Bu durumda eksi yüklü parçacıklar anoda, artı yüklü parçacıklar katoda doğru akacaklar, nötral moleküller ise bu alandan etkilenmeyeceklerdir (22).

Moleküllerin birbirlerinden ayrılması, elektroozmotik akış yönünde negatif elektroda doğrudur. Örnekteki (+) iyonlar, elektroozmotik akış ve iyon hareketinin aynı yönde olması nedeniyle kapiller çıkışa daha erken gelirler. Örnekteki (-) iyonlar, aynı zamanda kapiller çıkışa hareket ederler, ama hızları daha yavaştır. Örnek iyonları kapiller çıkışa doğru göçtüğünden optik, kondüktimetrik, elektrokimyasal, kütle spektroskopik veya radyoaktivite dedektörleri gibi farklı detektör tipleriyle saptanabilir. Kapiller elektroforezde, kapiller seçimi, tampon seçimi, voltaj ve akım, dedektör seçimi önemlidir (22).

Bu yöntem ile NO indirekt ölçümlerinde  $NO_2^-$  ve  $NO_3^-$  tayini yapılmaktadır. Ters elektroozmatik akışla yüksek ayrılma sağlanarak  $NO_2^-$  ve  $NO_3^-$  ayrımı yapılan veya UV dedektörle  $NO_2^-$  ölçümü yapılan çalışmalar vardır (23,24). Örnek hacmi pL-nL düzeyindedir.

Nitrik oksit ölçümünde bu yöntem duyarlılığı, test maliyetinin düşüklüğü, az miktarda reaktife ve numuneye ihtiyaç duyulması, otomasyona uygunluğu ve test çeşitliliğinden dolayı birçok yöntemin önüne geçmektedir (22).

## Nitrik Oksit Düzeylerinin Florometrik Yöntemi ile Belirlenmesi

Nitrik oksit düzeyinin florometrik yöntemler ile



saptanmasında, naftotriazololün floresansı 375 nm eksitasyon ve 415 nm emisyon özelliklerinden yararlanılarak ölçülür ve 10 nM derşimindeki NO'in direkt tayinine olanak verir. Florometrik yöntemlerde en çok kullanılan bileşik, 2,3-diaminonaftalendir (DAN). Aromatik diamino bileşigi olan diaminonaftalen, reaktif nitrojen oksit türleri ile nitrozasyona uğradığında yoğun floresans özelliğı olan 2,3 naftotriazol'ü (NAT) oluşturur. Bu florometrik yöntemle ortamda oluşan NO'in %80'ni ölçülebilir. NO düzeyinin belirlenmesinde florometrik bir substrat olan sesamol (3,4-methylenedioxyphenol) kullanılmaktadır (25). Ayrıca, hem grubu ile NO'in yüksek hızla reaksiyona girmesini ve bağılı olduğu floresanın ışınmasını baskılama özelliğı bulunan bir floro-for-hem prob çifti (FHP) kullanılarak da ölçüm yapılabilir (26). Kolorometrik yöntemlere göre daha hassas ölçüm yapılabilir (13).

### Nitrik Oksit Düzeylerinin Gaz Kromatografisi Yöntemi İle Belirlenmesi

Bir karışımda gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaştırılabilen bileşenlerin birbirinden ayrılması amacıyla gaz kromatografisi yöntemi kullanılır. Bu yöntemde ayrılma, bileşenlerin farklı katı yüzeylerdeki farklı adsorpsiyon ilgilerine göre gerçekleşir. Numunede bulunan bileşenler bir cihazla spektrum haline getirilir ve bu spektrumda bulunan her pik ayrı bir bileşeni gösterir. Gaz halindeki bir molekül olan NO'nun gaz kromatografisiyle direkt ölçülmesi mümkündür. Ancak duyarlılığının çok düşük olması ve maliyet sorunları yüzünden tercih edilmemektedir (18). NO'nun metabolitleri olan NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub> tayinlerinde kullanılan birçok analitik yöntemlere ek olarak kütle spektrometresi tabanlı, doğruluk bakımından hassas, özgülüğü yüksek gaz kromatografisi-kütle spektrometresi'nin (GC-MS) kullanıldığı çalışmalarda bulunmaktadır (27).

### Nitrik Oksit Düzeylerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Belirlenmesi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC), bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Dedektör, kolon ve pompa seçimi önemlidir (28).

Nitrik oksit prekürsörü olan L-Arjinin düzeyleri ve

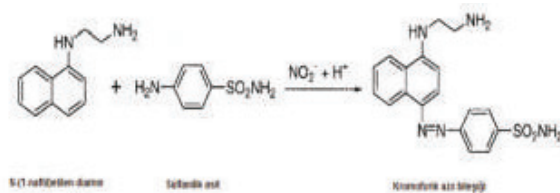
eNOS'nin endojen yarışmalı inhibitörü olan asimetrik dimetilarginin (ADMA)'nın ölçümü ile indirekt NO ölçümü HPLC ile yapılabilir. Ölçümde floresans dedektör kullanılır. ADMA, vasküler endotelial hücreler de dahil birçok dokuda normal protein döngüsü sırasında arginin kalıntılarının metilasyonu ile elde edilmekte ve dimetilarginin dimetilaminohidrolaz aracılığıyla sitruline metabolize olmaktadır ve eNOS'un üretim ve biyoyararlanımını azaltmaktadır (29,30).

### Nitrik Oksit Düzeylerinin Kolorometrik Yöntem İle Belirlenmesi

Nitrik oksitin karakterize edilmiş en önemli hedef molekülleri; demir, kükürt ve oksijen türevi yapılarıdır. NO lipofilik özellikte olup, yüksek konsantrasyonlardaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda çözünme özelliğı gösterir. Düşük konsantrasyonlarda ise, ortamda oksijen varlığında dahi stabilitesini koruyabilir. Havadaki NO, kısa sürede oksijenle oksitlenerek NO<sub>2</sub>'ye dönüşür. NO ve tekrar NO'ya dönüşebilen nitrojen oksitleri (NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> vb), güçlü nitroze edici ajanlardır ve primer ile sekonder aminleri nitrozleyerek, nitrozaminleri oluştururlar (31,32). Aerobik sulu çözeltilerde NO, hızla oksijen ile tepkimeye girerek reaktif türler oluştururlar. NO'nun bu reaktif ürünlerinin kimyasal bileşiklerle tepkimeleri, kolorometrik indirekt tayine olanak sağlar. Oksijenli ortamda ferrosiyanid, NO-bağımlı tepkimeler sonucu ferrisiyanide oksitlenir. Sülfonamid ve 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABST), NO varlığında nitrozasyona uğrayarak renkli bileşikler oluştururlar (18).

Nitrit ölçümü için kullanılan kolorimetrik yöntemlerin çoğu azo boyalarının oluşumu temeline dayanmaktadır. Örneklerdeki NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub> miktarları iki aşamalı yöntem ile ölçülmektedir. Öncelikle NO<sub>3</sub> enzimatik dönüşüm veya metalik kadmiyum ile NO<sub>2</sub> indirgenir. Oluşan toplam NO<sub>2</sub> ise hemen hemen her örnekte kullanılabilecek bir yöntem olan Griess yöntemi ile ölçülür. Griess yöntemi nitritin asidik ortamda primer bir aromatik amin ile (sülfanilamid) diazotizasyonu ve N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorit (NED) ile mor renkli bir azo ürünü oluşturması esasına dayanır (10,33).

Griess reaksiyonu;



Griess reaksiyonu,  $\text{NO}_2^-$  iyonlarına duyarlı olduğundan, ortamdaki  $\text{NO}_3^-$ 'ün,  $\text{NO}_2^-$ 'e indirgenmesi *in vivo* olarak oluşan NO'nun gerçeğe yakın miktarlarda ölçümüne olanak tanımaktadır. Griess yönteminin submikromolar düzeyde NO ölçümü için uygun olmadığı, ancak,  $\text{NO}_2^-$  ve birlikte bulunan nitroksitlerin ölçümü için en uygun ölçüm yöntemi olduğu da düşünülmektedir (10,33). Duyarlılık limitinin 0.1-1  $\mu\text{M}$  kadar olduğu bildirilmiştir (34).

Nitrik oksit ölçümü yapılırken özellikle  $\text{NO}_2^-$  ölçümü tercih edilse de NO metabolizması sonucu, biyolojik sistemlerde  $\text{NO}_2^-$  hem demiri içeren proteinler varlığında nitrate okside olmaktadır. Fizyolojik koşullarda NO yaklaşık 3:2 oranında  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NO}_3^-$ 'e okside olmaktadır. Oluşum oranları örneğe bağlı olarak değişiklik gösterdiğinden, NO metabolizmasının derecesinin en iyi göstergesi olarak nitrit ve nitratın birlikte ölçülmesidir (10).

$\text{NO}_3^-$ 'ü,  $\text{NO}_2^-$ 'e indirgeme yöntemlerinde enzimatik ve enzimatik olmayan yöntemler kullanılır. Enzimatik olmayan yöntemde indirgeme için, bakır ile kaplı kadmiyum kolonlardan geçirilmesi veya belli büyüklükteki kadmiyum tozları ile muamele edilmesi gerekmektedir. Ancak L-arjinin analoglarının kullanıldığı çalışmalarda, bu maddelerin kadmiyum/bakır ile etkileşip Griess reaksiyonu sonucunda  $\text{NO}_2^-$  ile elde edilene benzer bir absorbans verdiği gösterilmiştir. Bundan dolayı, bu indirgeme yönteminin kullanılmaması önerilmektedir. Enzimatik yöntemlerden ilki ilk kez Wu ve Brosnan (35) tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntemde  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NO}_3^-$ 'ün NADPH-nitrat redüktaz kullanılarak eş zamanlı ölçümü yapılmaktadır. Yöntemin esasını  $\text{NO}_3^-$ 'ün NADPH kullanarak  $\text{NO}_2^-$ 'e indirgenmesi ve oluşan toplam  $\text{NO}_2^-$  Griess yöntemi ile ölçülmesi oluşturur (35).

Bu yöntemin yüksek miktarlardaki NADP+'nin Griess reaksiyonu sırasında renk oluşumu ile etkileşimini önlemek için Verdon ve ark. (36) tarafından modifiye edilen şekilde ise, bir glukoz-6-fosfat (G-6-F)/G-6-F dehidrojenaz NADPH oluşturucu sistem kullanılmaktadır (36).

Toplam  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NO}_3^-$  miktarının ölçümü için çeşitli firmalar tarafından geliştirilen ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay-Enzime Bağlı İmmünosorban Yöntem) kitleri bulunmaktadır. ELISA kitleri ile hızlı ve güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir.

Enzimatik yöntemlerden bir diğeri de,  $\text{NO}_3^-$ 'ün format-nitrat redüktaz kullanarak  $\text{NO}_2^-$ 'e dönüşümü kullanılarak, Taniguchi ve ark. (37) tanımladıkları yöntemdir. Destekleyici elektron taşıyıcısı olarak FMN ilave edilir. Oluşan kompleks format-dehidrojenaz aktivitesi ile  $\text{FMNH}_2$ 'ye indirgenir.  $\text{FMNH}_2$  daha sonra nitrat-redüktaz aktivitesi ile  $\text{NO}_3^-$ 'ü  $\text{NO}_2^-$ 'e indirgemek

için kullanılır. Bu reaksiyonlar sonucunda oluşan  $\text{NO}_2^-$  miktarları ise Griess yöntemi ile ölçülür. NADPH ve NADP+'nin tersine, FMN Griess reaksiyonu ile etkileşmez (38).

### Nitrik Oksit Düzeylerinin Nitrik Oksit Sentaz Ekspresyonu ile Belirlenmesi

Nitrik oksit seviyesini belirlemede kullanılan diğer bir yöntemde NO sentezinden sorumlu NOS enzimlerinin ekspresyonlarının gösterilmesi ile NO'nun direkt ölçümüdür. Günümüzde NOS enzimlerinin yerleşiminin gösterilmesi için kullanılan yöntemler arasında immünohistokimyasal ve *in situ* hibridizasyon yöntemleri bulunmaktadır. NOS enzimlerinin mRNA ekspresyonu için kullanılan yöntemler arasında; Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), Northern-blot ve ribonükleaz-koruma analizi gibi yöntemler kullanılmaktadır. NOS enzimlerinin protein ekspresyonu içinde en sık kullanılan yöntem Western-blot analizidir. Western blot, elektroforez işlemiyle poliakrilamid jelde göç ettirilen proteinlerin immunolojik yöntemlerle tespitidir. Blotlamadan önce, çalışılan numunedeki proteinler, elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilmektedir. Protein elektroforezi SDS-PAGE, proteinlerin ayrıştırılması ve saflaştırılmasında kullanılan temel biyokimyasal yöntemlerden biridir. Elektroforez işlemi takiben, jeldeki proteinlerin membrana transferleri (blotlama), spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama), özgül antikolarla tepkime ve en son adımda proteinlerin görüntülenmesi aşamasıdır (38).

eNOS, iNOS ve nNOS Western blot tekniği ile çapraz reaksiyon vermeyen antikolar kullanılarak saptanabilmektedir (38).

eNOS, iNOS ve nNOS bazı durumlarda dokularda düşük düzeyde bulunmaları nedeniyle saptanamazlar. RT-PCR ile çok düşük düzeylerdeki NOS mRNA'ları saptanabilir (38).

NOS aktivitesi ve dolayısıyla NO ölçümü için kullanılan bu yöntemlerin dışında spesifitesi farklı ve NO miktarı ile ilgili olarak doğrudan olmayan sonuçlar veren yöntemler de vardır. Damar ve/veya damar dışı düz kas preparatlarının kullanıldığı biyoanaliz yöntemi, trombosit agregasyonunun inhibisyonun ölçülmesi, L-arjinin, siklik guanozin monofosfat (cGMP), L-sitrülin, biyopterin ve  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  gibi NO metabolizmasının dayanıklı son ürünlerinin ölçülmesi NO'nun varlığı ile ilgili olarak bilgi vermektedir. Sadece cGMP veya sitrülin konsantrasyonlarının ölçümü, NO miktarları ile ilgili olarak kantitatif bir bilgi sağlayabilir. NO ölçümü için kullanılan bu yöntemlerin özellikle L-arjinin analogları kullanıldığında yanlış bilgiler elde edilebilir (38).

Sonuç olarak, NO büyük ölçüde ve hızla NO<sub>2</sub> ve NO<sub>3</sub>'e dönüştüğünden bu temele dayalı olan Griess reaktifıyla ölçüm diğer yöntemlere göre daha kolay, güvenilir, tekrarlanabilir ve maliyeti az olmasından dolayı tercih edilen yöntemdir. Testin kullanımı özellikle plazma ve serum örnekleri için daha güvenilir olsa da idrar ve balgam örneklerinde de çalışılmaktadır. Bu yöntemde, ortamdan proteinlerin uzaklaştırılması ve nitrat redüktaz ile NO<sub>3</sub>'ün NO<sub>2</sub>'e indirgenmesi ölçüm yapılırken dikkat edilmesi gereken durumlardır (39).

### Kaynaklar

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357(Pt 3):593-615.
- Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik Etkileri. *Türk Klin Tıp Bilim* 2000; 20(2):107-11.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120(3):227-37.
- Star RA Nitric oxide. *Am J Med Sci* 1993; 306(5):348-58.
- Radak D, Cvetkoviæ Z, Tasiæ N, Petroviæ B, Lackoviæ V, Djordjeviæ-Deniæ G. The content of copper and zinc in human ulcerated carotid plaque. *Srp Arh Celok Lek* 2004; 132(3-4):80-4.
- Ridnou LA, Sim JA, Hayward MA, Wink DA, Martin SM, Buettner GR, Spitz DR. A Spectrophotometric Method for the Direct Detection and Quantitation of Nitric Oxide, Nitrite and Nitrate in Cell Culture Media. *Anal Biochem* 2000; 281(2):223-9.
- Archer L, Shultz PJ, Warren JB, Hampl V, Demaster EG. Preparation of standards and measurement of nitric oxide, nitroxyl, and related oxidation products. *Methods* 1995;7(1):21-34.
- Brama RS, Hendrix SA. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem* 1989; 61(24):2715-8.
- ATS/ES Recommendations for Standardized Procedures for the Online and Offline Measurement of Exhaled Lower Respiratory Nitric Oxide and Nasal Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 912-30.
- Gharavn El-Kadi AO. Measurement of nitric oxide in murine Hepatoma cells by reversed phase HPLC with fluorescence detection. *J Pharm Sci* 2003; 6(2):302-7.
- Weil JA. A Review of the EPR Spectroscopy of the Point Defects in Alpha-Quartz: The Decade 1982-1992. Helms CR, Deal BE. In *The Physics and Chemistry of SiO<sub>2</sub> and the Si-SiO<sub>2</sub> Interface:2*, Plenum Press, New York, USA, 1993;131-44.
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994;120(3):227-37.
- Kılınç A, Kılınç K. Nitrik oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Ankara, Palme yayınevi, 2003;1:68.
- Hogg N. Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radic Biol Med* 2010;49(2):122-9.
- Yallampalli DVM, Smith MB, Sharon MS. Steroid hormones modulate the production of NO and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 1994;134(4):1971-4.
- Buga GM, Griscavage JM, Rogers NE, Ignarro LJ. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ Res* 1993;73(5):808-12.
- Hegesh E, Sniloah J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chim Acta* 1982;125(2):107-15.
- Archer S. Measurement of Nitric oxide in Biological Models. *Faseb J* 1993;7(2):349-60.
- Murphy ME, Noack E. Nitric Oxide Assay Using Hemoglobin Method. *Methods Enzymol* 1994:233;241-49.
- Hirst DG, Robson T. Nitric oxide physiology and pathology. *Methods Mol Biol* 2011;704:1-13.
- Pohanka M, Skládal P. Electrochemical biosensors—principles and applications. *J Appl Biomed* 2008;6:57-64.
- Li SFY. Capillary Electrophoresis-Principles, Practice and Applications, Journal of Chromatography Library, Elsevier, Amsterdam, 1992;52:582.
- Miyado T, Nagai H, Takeda S, Saito K, Fukushi K. Development of a novel running buffer for the simultaneous determination of nitrate and nitrite in human serum by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* 2003;1014(1-2):197-202.
- Lee J, Ban E, Yi S, Yoo Ys. New method for analyzing the nitrite level in PCI2 cells using capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2003;1014(1-2):189-95.
- Abe S, Nakabayashi S, Murayama J, Sano Y, Ohno K, Maeda M, Arakawa H. Development of a novel fluorometric assay for nitric oxide utilizing sesamol and its application to analysis of nitric oxide-releasing drugs. *Luminescence* 2010;25(6):456-62.

26. Chen O, Uzlaner N, Priel Z, Likhtenshtein GI. Novel fluorescence method for real-time monitoring of nitric oxide dynamics in nanoscale concentration. *J Biochem Biophys Methods* 2008;70(6):1006-13.
27. Tsikas D. Measurement of nitric oxide synthase activity in vivo and in vitro by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2004;279:81-103.
28. Gündüz T. *Instrumental Analiz*. 5. Baskı, Ankara, Gazi Kitabevi, 1999; 441.
29. Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999;43(3):542-8.
30. Cooke P. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004;109(15):1813-8.
31. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298(Pt 2):249-58.
- 32.- Monca S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharm Rev* 1991;43(2):109-41.
33. Ridnou LA, Sim JA, Hayward MA, Wink DA, Martin SM, Buettner GR, Spitz DR. A Spectrophotometric Method For the Direct Detection and Quantitation of Nitric Oxide, Nitrite and Nitrate in Cell Culture Media. *Anal Biochem* 2000;281(2):223-29.
34. Nagan T. Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* 1999;14(6):283-90.
35. Wu, Y, Brosnan, JT. Macrophages can convert citrulline into arginine. *Biochem. J* 1992;281(Pt 1):45-8.
36. Verdo CP, Burton BA, Prior RL. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem* 1995; 224(2):502-8.
37. Taniguchi S, Takahashi K, Noji S. Nitrate. In: Bergmeyer H. *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 7. Basel: Verlag Chemie Weinheim, 1985:578-85.
38. Xia Y, Zweier JL. Direct measurement of nitric oxide generation from nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(23):12705-10.
39. Moshae H, Stegeman CA, Jansen PL. Determination of nitrite and nitrate in stored urine. *Clin Chem* 1998;44(8 Pt 1):1780-1.