

## ACNE VULGARİSLİ OLGULARDA PLAZMA NİTRAT/ NİTRİT DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

### *EVALUATION OF PLASMA NITRATE/NITRITE LEVELS IN PATIENTS WITH ACNE VULGARIS*

Neslihan YILDIRIM\*, Pervin VURAL\*, Mukaddes CANBAZ\*, Dilek K. SELÇUKİ\*\*

#### ÖZET

**Amaç:** Akne açık ve kapalı komedon oluşumu, eritemli papül ve püstüller, nodüller, psödokistler ve bazen de nedbe oluşumu ile karakterizedir. Acne vulgaris etyopatogenezinde sebum salgılamında artış, duktal hiperkeratinizasyon (hiperkornifikasyon), foliküllere Propionibacterium Acnes kolonizasyonu ve inflamasyonun olduğu düşünülmektedir. Nitrik oksit (NO), derinin keratinosit, fibroblast, endotel, Langerhans ve mast hücrelerinde bulunan nitrik oksid sentaz (NOS) tarafından oluşturulan bir inorganik moleküldür. Sitokinlerin etkisi ile keratinosit ve mast hücrelerinde NOS induklenmektedir. Oluşan NO guanilat siklazı stimüle ederek keratinosit ve mast hücrelerinde mitojenik etkili olan cGMP düzeylerinin artmasına ve böylece hiperkeratinizasyona neden olmaktadır. Bu çalışmanın amacı nitrik oksit düzeylerinin acne vulgarisin etyopatogenezindeki rolünü incelemektir.

**Gereç ve yöntem:** Bu çalışmaya Acne Vulgaris tanısı konmuş 30 hasta ile, yapılan sistemik muayeneleri sonucu sağlıklı oldukları saptanan 16 kişi kontrol grubu olarak alındı. Gerek deney, gerekse kontrol grubunu oluşturan olgulardan sabah aç karına alınan venöz kan örneklerinde NO'nin metabolik ürünleri olan nitrat/nitrit (NOx) düzeylerine Griess reaksiyonu ile bakıldı. Elde edilen sonuçlar Student's t testi kullanılarak kıyaslandı.

**Bulgular:** Deney grubunda nitrat/nitrit düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiki yönden anlamlı (p< 0,05) bir artış gözlemlendi.

**Sonuç:** Sonuç olarak, akneli olgulardaki plazma nitrat/nitrit düzeylerindeki artışın bu bileşiklerin üretiminin hızlanmasına bağlı olduğu söylenebilir.

**Anahtar kelimeler:** Acne vulgaris, nitrik oksit, hiperkeratinizasyon

#### ABSTRACT

**Objective:** Acne is characterized by open and close comedon, erythematous papules, pustules, pseudocysts, nodules and scar formation. Factors playing role at the etiopathogenesis include increased sebum secretion, ductal hyperkeratinization (hypercornification), Propionibacterium Acnes colonization at the follicles and inflammation. Nitric oxide (NO) is an inorganic molecule which is synthesized by NO synthetase (NOS) found in keratinocyte, fibroblast, endothel, Langerhans and mast cells of the skin. NOS found in the keratinocytes and mast cells is induced by cytokines. Produced NO stimulates guanylate cyclase which increases cGMP levels; cGMP has mitogenic effects on keratinocytes and mast cells, therefore causes hyperkeratinization. The aim of this study was to evaluate the role of nitric oxide levels in the etiopathogenesis of acne vulgaris.

**Materials and methods:** Study group was composed of 30 patients diagnosed as acne vulgaris and 16 healthy subjects were included as the control group. Blood was taken early in the morning at fasting from both groups. The metabolic products of NO - plasma nitrite/nitrate were measured by Griess reaction. Statistical evaluation of the data was performed using the Student's t test.

**Results:** Plasma nitrite/nitrate levels of the study group were significantly elevated in patients with acne vulgaris when compared to the controls (p<0.05).

**Conclusion:** As a conclusion, elevation of plasma nitrite/nitrate levels are probably due to the increased production of these compounds in patients with acne vulgaris.

**Key words:** Acne vulgaris, nitric oxide, hyperkeratinization.

Dergiye geldiği tarih/Date received: 11.02.2005

\* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

\*\* İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Dermatoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul

**GİRİŞ**

Akne tüm dünyada özellikle gençler ve genç erişkinler arasında sıklıkla görülen, psikolojik etkileri çok ciddi olabilen bir hastalıktır. Akne insidansı %30 ile %66 arasında değişmektedir. Gençlerin %15'inde major akne denilen klinik form, %85'inde ise daha hafif olan minor form görülmektedir. Akne açık ve kapalı komedon oluşumu, eritemli papül ve püstüller, nodüller, psödokistler ve bazen de nedbe oluşumu ile karakterizedir. Akne Vulgaris'e neden olan patoloji tam olarak bilinmemesine karşın, hastalığın etyopatogenezinde rol oynayan etmenler dört grupta toplanabilir: 1) Sebum salınımında artış, 2) duktal hiperkeratinizasyon (hiperkornifikasyon), 3) foliküllere *Propionibacterium acnes* kolonizasyonu, ve 4) inflamasyon. Komedon ya da siyah nokta aknenin temel lezyonu olarak kabul edilmektedir. Komedonlar foliküler hiperkeratoz ile keratin ve sebum birikiminden oluşmaktadır. Komedona bağlı olarak foliküllerin ağzında dilatasyon gelişmekte ve zamanla komedonların çevresinde inflamasyonun gelişmesiyle papüller oluşmaktadır (3). Foliküler florada predominant olarak *Propionibacterium Acnes* bulunmaktadır (6). Bu mikroorganizma tarafından salgılanan birçok inflamatuvar faktörün etkisiyle foliküller giderek genişleyip rüptüre olup püstül gelişmektedir. Rüptüre olma sonucu dermiste birçok iritan madde yayılmakta ve yaygın bir inflamasyona yol açmaktadır (3).

Bir inorganik molekül olan nitrik oksit (NO) vücuttaki birçok doku ve hücrede sentez edilip bir parakrin mediatör olarak görev yapmaktadır. Nitrik oksit sentezinde rol oynayan nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin izoformları, derinin keratinosit, fibroblast, endotel, Langerhans ve mast hücrelerinde bulunmuştur (1, 9, 14). Akne Vulgaris'in gelişmesinde ilk değişiklik olan foliküler hiperkeratinizasyonun mekanizmasını açıklayan bilgiler oldukça kısıtlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, epidermal hücrelerinden salgılanan TNF $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$  ve IFN $\gamma$  gibi pro-inflamatuvar sitokinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Sitokinlerin etkisiyle keratinosit ve mast hücrelerinde NOS indüklenmektedir. Oluşan NO guanilat siklaz enzimini stimüle ederek keratinositlerde ve mast hücrelerinde potent mitojenik etkili olan cGMP düzeylerinin artmasına ve böylece hiperkeratinizasyona ve keratinosit proliferasyonuna neden olmaktadır (5,15). Buna karşın NOS'ın kofaktörü olan kalmodulin inhibitörlerinin keratinosit proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (7).

Her ne kadar geçtiğimiz uzun yıllar boyunca dermatologlar güneş ışığını akne tedavisinde kullanmışlar olsa da,

UV ışınlarının akne lezyonları üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Bazı hastalarda yaz mevsiminde akne şikayetleri azalırken, bazılarında ise artmaktadır (8). Yapılan çalışmalarda UVB'nin komedon oluşumunu artırdığı ve bunun da akne şiddetini artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, UVB ışınlarının etkisiyle keratinositlerde doza bağımlı artan NO salgılanmasından söz edilmektedir (2).

Bu bilgilerin ışığında, plazma nitrik oksit düzeylerinin akne vulgaris'in etyopatogenezindeki rolünü incelemek amacıyla bu çalışmayı gerçekleştirdik.

**GEREÇ ve YÖNTEM**

Çalışmaya İstanbul Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalının polikliniğine başvuran ve klinik muayene sonucu Akne Vulgaris tanısı konmuş olan ve herhangi bir sistemik hastalığı olmayan toplam 30 hasta dahil edildi. Hastaların yaşları 18-30 arası (ortalama  $23,5 \pm 4$  yıl) değişmekteydi. Hastaların 24'ü kadın, 6'sı erkekti. Akne süresi 2 ay-10 yıl arasında (ortalama 3,4 yıl) değişmekteydi. Hastaların 20'sinde II. derece, 10'unda III. derece akne saptandı. Kontrol grubu herhangi bir sistemik ve deri hastalığı olmayan, yaşları 20-40 arası (ortalama  $27,25 \pm 8,08$  yıl) değişen 13 kadın ve 3 erkek olmak üzere 16 sağlıklı kişiden oluşturuldu. Gerek kontrol gerekse deney grubu olgularından bir gece açlık sonrası sabah saat 10.00-11.30 arasında venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı, 1000 x g'de 10 dakika santrifüj edilip plazmaları ayrıldı ve -40 °C'de saklandı. Bir serbest radikal olan nitrik oksit, oksijenli ortamda stabil değildir ve spontan olarak moleküler oksijen ile reaksiyona girerek çeşitli nitrojen ürünlerine dönüşmektedir. Bu oluşan ürünlerden en stabil olanlarının NO<sub>2</sub>- (nitrit) ve NO<sub>3</sub>- (nitrat) olduğu gösterilmiştir (4). Plazma nitrat/nitrit konsantrasyonlarını tayin etmek için Grisham metodu kullanıldı (4). NO<sub>3</sub>-, *Aspergillus* nitrat redüktaz enzimi yardımı ile NO<sub>2</sub>- haline dönüştürüldü ve bunu takiben NO<sub>2</sub>- 'nin tayini Griess reaksiyonu ile spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar Student's t testi ve Pearson korelasyon testi ile değerlendirildi.

**BULGULAR**

Kontrol ve hasta grubunda plazma nitrat/nitrit düzeyleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Akneli hastaların plazma nitrat/nitrit düzeylerinin kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak ( $p < 0,05$ ) artmış olduğu bulundu. Hastalığın derecesi ve plazma nitrat/nitrit düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon saptandı. ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,05$ ).

**Tablo 1: Kontrol grubu ile akneli hastalarda plazma nitrat/ nitrit düzeyleri (mmol /L) (ortalama  $\pm$  SS) ve p değeri**

	Kontroller n= 16	Acne Vulgarisli Hastalar n= 30	p değeri
Plazma nitrat/nitrit (NO <sub>x</sub> ) düzeyleri	25,52 $\pm$ 10,49	36,38 $\pm$ 13,22	p<0,05

**TARTIŞMA**

Tabloda yer alan değerlerin incelenmesinden de anlaşılacağı gibi Acne Vulgariste plazma nitrat/nitrit düzeyleri anlamlı olarak artmaktadır. Artmış plazma NOx düzeyleri ve Acne Vulgariste görülen artmış foliküler hiperkeratoz ile keratin ve sebum birikimi arasındaki ilişki nedir? Bir inorganik molekül olan nitrik oksit derinin keratinosit, Langerhans hücreleri, fibroblastlar, endotel ve mast hücrelerinde NOS enziminin etkisiyle oluşmaktadır. Bir selim hiperproliferatif deri hastalığı olan psöriaste plazma nitrat/nitrit konsantrasyonlarının hastalığın süresi ve derecesi ile paralel olarak arttığı gösterilmiştir (9, 10). Ayrıca Sirsjo ve arkadaşları (12) da, indüklenebilen NOS (iNOS)'un sentezinden sorumlu olan iNOS mRNA'nın ekspresyonunun da arttığını göstermişlerdir. Bizim çalışma grubumuzu oluşturan Acne Vulgarisli vakalarda bulunan artmış NOx seviyeleri muhtemelen lezyonlu derideki artmış NOx üretimi ile ilgilidir. Yükselmiş plazma NOx'un muhtemel kaynakları keratinositler olduğu gibi derinin diğer hücreleri (melanosit, Langerhans ve mast hücreleri) inflamatuvar ve vasküler endotelial hücreleri de olabilir. Böylece, artmış olan NOx Acne Vulgariste görülen artmış hiperkeratinizasyon, keratin ve sebumun birikiminin nedeni ya da sonucu olabilir. Nitrik oksidin bu yaygın dermatolojik problemin patogeneziindeki yeri nerededir? Akneli lezyonlarda gelişen inflamasyon sonucu aktiflenen inflamatuvar ve Langerhans hücreleri IL-1 $\beta$  ve TNF $\alpha$  gibi proinflamatuvar etkili sitokinleri üreterek nitrik oksit sentezini indüklemektedir (9). Oluşan nitrik oksit ise keratinositlerde guanilat siklazı aktifleyerek potansiyel mitojenik etkileri olan cGMP'nin keratinositlerde ve mast hücrelerinde birikmesine, keratinosit ve mast hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (11). Ayrıca IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  gibi sitokinlerin etkisiyle keratinositlerde proliferatif ve mitojenik etkili endotelin de sentezlenmektedir. Endotelin ise bir yandan keratinositlerin hiperproliferasyonuna neden olurken , diğer yandan belki de ETB reseptörlerinin aracılığı ile artmış olan nitrik oksit sentezini artırmaktadır (13).

Hernekadar yıllar boyunca güneş ışığı akne tedavisinde kullanılmış olsa da , UV ışınlarının akne lezyonları üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Güneş ışınlarının etkisiyle bazı hastalarda lezyon sayısı ve şiddeti azalırken bazılarında artmaktadır (8). Bazı çalışmalarda güneş ışınlarının önemli bir fraksiyonunu oluşturan UVB'nin komedon oluşumunu ve akne şiddetini artırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte UVB'nin etkisiyle keratinositlerde doza bağımlı artan NO salgılanmasından bahsedilmektedir (2). Bizim çalışma grubumuzu oluşturan akneli olgular ve kontroller arasında güneşe maruz kalma oranı açısından bir fark tespit edilmemiştir. Akneli derinin UV ışınlarına daha hassas olması muhtemelen gibi görülmektedir. UVB ışınlarının etkisiyle bir yandan keratinosit ve mast hücrelerinde IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL1 $\alpha$  gibi sitokinlerin sentezi artmaktadır; bu sitokinler ise artmış iNOS ekspresyonuna dolayısıyla artmış NO üretimine neden olmaktadır. Diğer yandan, UVB ışınları hücre membranı yağ asitlerinin fotoperoksidasyonunu tetikleyerek reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna

neden olmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri ise reaktif peroksinitrit anyonu oluşturmak üzere, keratinositlerde sentezlenen NO ile reaksiyona girerek, deri destruksiyonu ve lezyon oluşumunu başlatmaktadır.

Sonuç olarak, artmış olan plazma nitrat/nitrit düzeylerinin akneli lezyonlarda artmış NO üretimi ile ilgili olduğu söylenebilir. Artmış lezyonel NO üretimi ise mitojenik ve proliferatif etkileri ile keratinositlerin ve mast hücrelerinin proliferasyonuna, hiperkeratinizasyonuna (yani hiperkeratinizasyonuna), keratin ve sebum birikimine neden olmaktadır. Diğer yandan ise, artmış NO'nun akne de görülen hiperkeratinizasyon ve mast hücre proliferasyonunun bir sonucu olduğunu söyleyebiliriz.

**KAYNAKLAR**

1. Bull HA, Hottersall J, Chowdhury N, Cohen J, Dowd PM. Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 655-660.
2. Deliconstantinos G, Vassilki V, Stravide JC. Alterations of nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of human keratinocytes by ultraviolet B radiation. Potential role for peroxynitrite in skin inflammation *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 1727-1738.
3. Downing DT, Stewart ME, Wertz PW, Strauss JS. Essential fatty acids and acne. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14: 221-225.
4. Grisham MB, Johnson GG, Lancaster JR. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol* 1996; 268: 237-246.
5. Ignarro JL. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 485-490.
6. Leyden JJ, Mc Ginley KJ, Kils OH, Kligman AM. Propionibacterium levels in patients with and without acne vulgaris. *J Invest Dermatol* 1975; 65: 382-384.
7. MacNeil S, Griffin M, Coke AM, Pettett M, Dawson RA, Owen R, Blackburn GM. Calmodulin antagonists of improved potency and specificity for use in the study of calmodulin biochemistry. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 1717-1723.
8. Mills OH, Kligman AM. Ultraviolet phototherapy and photochemotherapy of acne vulgaris. *Arch Dermatol* 1978; 114: 221-223.
9. Morhenn VB. Langerhans cells may trigger the psoriatic disease process via production of nitric oxide. *Immunol Today* 1997; 18: 433-436.
10. Örem A, Aliyazicioğlu R, Kiran E, Vanizor B, Cimmocodit G, Deger O. The relationship between nitric oxide production and activity of the disease in patients with psoriasis. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1606-1607.
11. Romero-Graillet C, Aberdam E, Biagioli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R. Ultraviolet B irradiation acts through the nitric oxide and cGMP signal transduction pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* 1996; 271: 28052-28056.
12. Sirsjo A, Karlsson M, Gidlof A, Rollman O, Torma H. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in psoriatic skin and cytokine-stimulated cultured keratinocytes. *Br J Dermatol* 1996; 134: 643-638.
13. Tsuboi R, Sato C, Shi C. Endothelin -1 acts as an autocrine growth factor for normal keratinocytes. *J Cell Physiol* 1994; 159: 213-220.
14. Wang R, Chahary A, Shen YJ, Scott PG, Tregdet EE. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 419-427.
15. Wilkinson DI, Liu S.C and Orenberg EK. Cyclic nucleotide content of passaged keratinocytes in culture during various growth stages. *J Invest Dermatol* 1981; 77: 385-388.