



## ARAŞTIRMA

# NAZAL MUKOZA VE NAZAL POLİP DOKULARINDA NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ

Dr. Erdoğan OKUR<sup>1</sup>, Dr. Fatma İNANÇ<sup>2</sup>, Dr. İlhami YILDIRIM<sup>1</sup>, Dr. Mehmet Akif KILIÇ<sup>1</sup>,  
Dr. Metin KILINÇ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>KSU, KBB Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye  
<sup>2</sup>KSU, Biyokimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

### ÖZET

Amaç: Nazal polipozis (NP) paranazal sinüslerin kronik inflamatuvar bir hastalığı olup patofizyolojisi halen tam olarak bilinmemektedir. Kronik inflamasyon, nitrik oksit (NO) gibi çeşitli metabolitlerin oluşumuna yol açmaktadır. NO immünite ve vücut savunmasındaki temel rollerinin yanında DNA hasarına yol açabilen mutajenik ve sitotoksik etkiler gösterebilmektedir. Bu çalışmanın amacı, nazal polip ve kontrol dokularında NO düzeylerini araştırmaktır. Metot: Dokular, endoskopik sinüs cerrahisi uygulanan 23 nazal polipozisli olgu ve septum deviasyonu ve konka hipertrofisi nedeni ile septoplasti ve konkaplasti uygulanan 14 olgudan alındı. Alınan dokular serum fizyolojik ile yıkanarak kan artıkları temizlendi. Dokular homojenize edildikten sonra satüfije edildi ve NO ölçümü için süpernatant kullanıldı. Nitrik oksit düzeyi total nitrit olarak Griess metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. İstatistik analiz için Mann-Whitney U-testi kullanıldı. Bulgular: Ortalama NO düzeyi, nazal polip dokularında  $0,0718 \pm 0,0125$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein ve kontrol dokularında  $0,0418 \pm 0,006$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein olarak bulundu ( $p < 0,05$ ). Sonuç: Çalışmamızda nazal polip dokularında NO düzeyinin kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı. Artmış NO oluşumunun hastalığın oluşumunda ve devamında bir rolü olabilir ancak NO'un NP'lerdeki rolünü aydınlatmak ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: nitrik oksit (NO), nazal polip

### NITRIC OXIDE LEVELS OF NASAL MUCOSA AND NASAL POLYP TISSUES

#### SUMMARY

Objective: Nasal polyp (NP) is a chronic inflammatory disease of the sinuses, pathophysiology of which is still unknown clearly. Chronic inflammation may lead to the production of various metabolites including NO. NO, along with its many essential roles in immunity and host defence, can also undergo reactions that may result in cytotoxic or mutagenic effects leading to direct DNA damage. The aim of the study was to investigate nitric oxide (NO) level in nasal polyps and normal mucosa. Methods: Tissue specimens were obtained from 23 patients undergone endoscopic sinus surgery for nasal polyposis and 14 patients (as a control group) undergone septoplasty and turbinoplasty for septal deviation and lower turbinate hypertrophy. All tissue specimens obtained were washed with physiological saline to remove blood. Tissues were homogenized and then centrifuged, and supernatants were used for NO measurement. NO level was measured as total nitrite by the method of Griess spectrophotometrically. For statistical analysis, Mann-Whitney U-test was used. Results: Mean NO level was found to be  $0.0718 \pm 0.0125$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein in polyps and  $0.0418 \pm 0.0060$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein in control nasal mucosa. In patients with NP, mean tissue NO levels were significantly higher than those of control nasal mucosa ( $P < 0.05$ ). Conclusion: The present study showed significant increase in NO level in NP tissues compared to control. Excess formation of NO may have a role in the development or maintenance of the disease but further studies are needed to elucidate the role of NO in NP.

Keywords: nitric oxide (NO), nasal polyp

## GİRİŞ

Birçok araştırmaya konu olmasına rağmen patofizyolojisi halen tam olarak bilinmeyen nazal polipozis (NP) paranazal sinüslerin kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. NP dokusunda inflamatuvar hücreler bulunmakta ve oluşumunda en belirgin faktör inflamasyon gibi görünmektedir. Kronik inflamasyon, nitrik oksit (NO) gibi çeşitli metabolitlerin oluşumuna yol açmaktadır.

Vücutta çok yaygın ve farklı fonksiyonlarda karşımıza çıkan NO, sitokrom P-450 redüktaz

homoloğu olan ve nitrik oksit sentaz (NOS) olarak bilinen enzimlerce L-argininden sentezlenir.

NOS'ın, nöronal NOS (nNOS), endotelial NOS (eNOS), uyarılabilir NOS (iNOS) olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. nNOS (tip 1 NOS), ilk olarak sinir dokusunda, eNOS (tip 3 NOS) ise endotel hücrelerinde tanımlanmış olup her ikisi de kalsiyum bağımlıdır. Bu iki enzim yapısal enzimler olup cNOS enzimleri olarak adlandırılır. iNOS (tip 2 NOS), ilk olarak endotoksinler ve sitokinler aracılığıyla karaciğer hücreleri ve makrofajlarda uyarılan bir enzim olarak tanımlanmıştır, kalsiyuma bağımlı değildir<sup>1</sup>. İlk olarak "rodent" makrofajlarında tanımlanan tip 2 NOS'un sadece proinflamatuvar sitokinler veya bakteriyel lipopolisakaritlerce indüklendikten sonra ortaya çıktığı bildirilmiştir<sup>2</sup>. Bu

İletişim kurulacak yazar: Dr. Erdoğan Okur, KSU, KBB Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye, Tel: +90 344 221 23 37 Faks: +90 344 221 23 71 E-mail: erdoganokur@yahoo.com

Gönderilme tarihi: 31 Mart 2005, revizyon isteme tarihi : 12 Mayıs 2004, yayın için kabul edilme tarihi: 18 Mayıs 2005



form inflamasyonda rol alan çoğu hücre tarafından oluşturulmakta ve uyarılabilir NOS olarak adlandırılmaktadır<sup>3</sup>. Lundberg ve ark.<sup>4,5</sup> sağlıklı bireylerde dışarı verilen havadaki NO'nun çoğunun üst hava yollarından kaynaklandığını alt solunum yollarının katkısının minimal olduğunu bildirmişlerdir. Tip 2 NOS'ın esas olarak paranazal sinüslerde oluştuğu ve dışarı verilen havadaki NO üretiminin çoğunluğundan sorumlu olduğu belirtilmiştir<sup>5</sup>. İlk olarak endotel hücrelerinde tanımlanan NO, nöronlar, fibroblastlar, trombositler, makrofajlar, nötrofiller ve epitel hücreler gibi birçok hücre tipinde üretilmektedir. Otokrin ve parakrin hücrel mesajcı olarak işlev gördüğü, birçok fizyolojik ve inflamatuvar süreçte önemli bir mediyatör olduğu vurgulanmıştır<sup>2,6</sup>. NO'in, antiviral ve bakteriyostatik aktivitesi nedeniyle, mikroorganizmalara karşı üst solunum yollarında birincil savunmayı oluşturduğu bildirilmiştir<sup>7,8</sup>. Diğer taraftan pro- ve antiinflamatuvar etkilerinin yanında NO, DNA hasarına yol açabilen sitotoksik ve genotoksik etkiler gösterebilmektedir<sup>9,10</sup>. Bu yüzden, üst solunum yolları fizyolojisi, immünolojisi ve birincil savunmadaki işlevlerine rağmen NO üst solunum yolları patolojilerinde de rol oynayabilir.

Bu çalışmanın amacı nazal polip dokularında ve normal nazal mukoza dokularında NO düzeylerini araştırmaktır.

## HASTALAR VE YÖNTEM

Dokular, endoskopik sinüs cerrahisi uygulanan 23 nazal polipozisli olgu ile septum deviasyonu ve konka hipertrofisi nedeni ile septoplasti ve konkaplasti uygulanan 14 olgudan alındı. Çalışma Tıp Fakültesi etik kurulu tarafından onaylandı ve olgulardan bilgilendirilmiş onay alındı. Nazal polipli olguların yaşları 16-67 arasında olup ortalaması  $41.1 \pm 2.4$  yıl idi. Kontrol grubunun yaşları 16-60 arasında olup ortalaması  $38.5 \pm 3.7$  yıl idi.

Alınan bütün dokular serum fizyolojik (0.9 % NaCl) ile yıkanarak kan artıkları temizlendi ve biyokimyasal analizler yapılmaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Çalışma öncesi dokular 1.15 % KCl solüsyonu içinde 14.000 devirde 30 dakika homojenize edildi. Daha sonra homojenat 10.000 xg'de 30 dakika santrifüj edildi ve NO ölçümü için süpernatant kullanıldı. Nitrik oksit düzeyi total nitrit olarak Griess metodu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü<sup>11</sup>. Doku protein analizi Lowry yöntemi ile çalışıldı<sup>12</sup>. Sonuçlar  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein olarak verildi.

İstatistik analizler SPSS-X (Release 4.1) programı ile yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesi için Mann-Whitney U-testi kullanıldı. Veriler

ortalama  $\pm$  standard hata olarak verildi. P değeri 0.05 altında ise anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Tablo 1'de grup verilerinin karşılaştırılması ve anlamlılık değerleri verilmiştir. Ortalama NO düzeyi, nazal polip dokularında  $0,0718 \pm 0,0125$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein ve kontrol dokularında  $0.0418 \pm 0.0060$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  protein olarak bulundu. Nazal polip dokularında NO düzeyi kontrollere göre istatistiki olarak anlamlı derecede daha yüksek idi ( $p < 0.05$ ).

		Nazal polip (n=23)	Kontrol mukoza (n=14)	P değeri
NO ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Ortalama	$0.0718 \pm 0,0125$	$0.0418 \pm 0.0060$	0.022
	Median	0,0570	0.0395	
	Min-max	0.03-0.31	0.01-0.09	

**Tablo 1.** Nazal polipli olgularda ve kontrollerde NO düzeyleri (ortalama  $\pm$  standart hata)  
n= olgu sayısı

## TARTIŞMA

Science dergisi tarafından 1992 Aralık sayısında "yılın molekülü" seçilen, hücrel haberleşmedeki rolünü ortaya çıkaran Robert Furchgott, Louis Ignarro ve Ferid Murad adlı araştırmacılara 1998 Nobel Tıp Ödülü'nü kazandıran NO, son 10 – 15 yılda pek çok araştırmaya konu olmuştur. Lipofilik, kimyasal stabilitesi olmayan, reseptöre bağımlı olmadan kolayca diffüze olabilen ve bilinen en düşük ağırlıklı biyoaktif memeli hücresi sekresyonudur. NO 3-5 saniye gibi çok kısa bir yarılanma ömrüne sahiptir<sup>13,14</sup>. NO'un kendi üretimi üzerine negatif "feed back" etkisi mevcuttur.

Nitrik oksitin üst solunum yollarında antiviral ve bakteriyostatik aktivitesi nedeniyle, mikroorganizmalara karşı birincil savunmayı oluşturduğu vurgulanmıştır<sup>7,8</sup>. Yine, NO'in üst solunum yolları mukozasında silya aktivitesini hızlandırdığı belirtilmiştir<sup>15</sup>. Diğer taraftan, alerjik rinit, viral rinit ve kronik sinüzitli hastaların burun biyopsi ve mukoza sürüntülerinde iNOS aktivitesi saptanmıştır<sup>16,17</sup>. Sanders ve ark.<sup>7</sup> normal kişilerin burun sürüntülerindeki epitelyal hücrelerde iNOS bulunduğunu göstermişlerdir. Ramis ve ark.<sup>18</sup> nazal polip dokularında nazal mukoza ile karşılaştırıldığında daha yüksek düzeylerde total NOS aktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Yazarlar nazal poliplerin esas olarak iNOS aktivitesi içerdiğini, fakat nazal mukozada tespit edilen bütün NOS aktivitesinin ise yapısal formda olduğunu, hem nazal polip dokularında hem de nazal mukozada NOS aktivitesinin epitelyal hücrelerde bulunduğunu vurgulamışlardır. Özcan ve ark.<sup>19</sup> nazal polip ve antrokoanal polipli olgularda iNOS aktivitesini



incelemişler ve alerjik nazal polip ile antrokoanal polipli olgularda stromal inflamatuvar hücrelerin ve epitelyal hücrelerin sitoplazmalarında orta ve yüksek şiddette iNOS protein ekspresyonu olduğunu ancak gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığını saptamışlardır. Karlıdağ ve ark<sup>20</sup> nazal polipli olgularda NO düzeyini çalışmışlar ve kontrollere göre nazal polipli olgularda NO düzeyinin anlamlı olarak yüksek olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda nazal polip dokularında total NO düzeyi kontrol nazal mukozaya göre istatistiki olarak anlamlı derecede daha yüksek idi. Sonuçlarımız Ramis ve ark'nın bulgularını destekler nitelikteydi. NOS tipi ve lokalizasyonunun belirlenmemiş olması çalışmamızın eksik tarafı olmakla birlikte Ramis ve ark'nın bulguları ile birlikte düşünüldüğünde NO'in, nazal poliplerin oluşumunda veya sürecin kronikleşmesinde bir rolü olabileceğini akla getirmektedir.

Histolojik olarak, nazal polipler nazal mukozadan farklılık gösterir. Nazal polipler bazofil, mast hücresi, eozinofil gibi inflamatuvar hücrelerin bulunduğu ödemli bir stroma ile bunu çevreleyen solunum epitelinde oluşur. Bu inflamatuvar hücreler sitokinler başta olmak üzere lökotrienler, eozinofilik katyonik protein, "major basic protein" gibi inflamatuvar medyatörler salgırlar. Nazal polip dokularında sitokinlerin arttığı gösterilmiştir<sup>21</sup>. Sitokinler hücresel büyüme, inflamasyon, immünite, doku onarımı ve hematopoez gibi önemli biyolojik olaylarda rol oynayan, düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir. Diğer taraftan sitokinler ve yukarıda saydığımız diğer ürünler alt ve üst solunum yolu epitelinde hasar oluşturabilirler. Sitokinlerin süperoksit anyonu ve iNOS üretimini arttırdıkları gösterilmiştir<sup>22</sup>. Nazal poliplerde artmış NO düzeyinin sitokin artışıyla bir bağlantısı olabilir.

Bazal değerlerinde NO normal fizyolojik olaylarda hayati rol oynar. Bununla birlikte NO ile aşırı stimülasyon, hücrelerin tahribine yol açar. Retiküloendotelyal hücreler veya polimorfonükleer lökositler, sitokinler tarafından aktive edildiğinde yüksek konsantrasyonda nitrik oksit ve süperoksit anyonu üretebilirler. NO tek sayıda elektron içeren renksiz, gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikal olup pek çok organ sisteminin yanı sıra alt ve üst hava yollarında da üretilmektedir. NO, yüksek ve sabit bir hızda radikal sonlandırma reaksiyonu ile daha toksik bir oksidan olan peroksinitrit oluşturmak üzere süperoksit anyonu ile reaksiyon verir<sup>23, 24</sup>. Her ne kadar bazal değerlerinde normal fizyolojik süreçlerde hayati rol oynasa da, artmış NO, değişik yollarla DNA hasarına yol açabilen sitotoksik ve mutajenik etkiler gösterebilmektedir<sup>9,10,25</sup>. Biyolojik

sistemlerde üretilen yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun zararlı etkileri üç mekanizma ile gerçekleşir. Bunlardan ilki, NO'nun oksijene benzer şekilde hücre içine geçerek, paylaşılmamış elektronu bulunan bir molekül olduğu için hücre içinde proteinlerin yapısında bulunan demir gibi geçiş metallere bağlanması ve ortama serbest demir salınmasına neden olmasıdır. İkincisi, otooksidasyon ile N-nitroso bileşiklerini oluşturarak DNA'ya zarar veren N2O3 oluşturmasıdır. Son olarak da nitrik oksit, oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek DNA, proteinler ve hücre membran lipidlerini okside eden peroksinitrit üretir<sup>25</sup>. Bu yüzden, üst solunum yolları fizyolojisi, immünolojisi ve birincil savunmadaki işlevlerine rağmen NO aşırı üretildiğinde üst solunum yollarında nazal polip dahil bazı patolojilerde rol oynayabilir. Nazal polip patogenezi ile NO artışı arasında bir bağlantı olduğu kanıtlanabilirse, gerek nitrik oksit temizleyiciler ile gerekse de iNOS'un selektif olarak inhibe edilmesi yoluyla bazal düzeydeki salınımı olumsuz etkilemeden, sadece aşırı salınımının kontrol altına alınması ve artan miktarın etkisiz hale getirilmesiyle aşırı üretimin zararlı etkilerine karşı korunma sağlanabilir.

Sonuç olarak, nazal polip dokularında NO düzeyinin kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunması nitrik oksit oluşumunun nazal polip etyopatogeneziinde bir rolü olabileceğini akla getirmektedir. Eğer NO ile NP patofizyolojisi arasında neden sonuç ilişkisi kesin olarak belirlenebilirse indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörleri veya nitrik oksit temizleyiciler nazal polip tedavisinde önemli yer tutabilir.

#### KAYNAKLAR

1. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem. 1994;269(19):13725-13728. (PMID: 7514592)
2. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med. 1993;329(27):2002-2012. (PMID: 7504210)
3. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? J Clin Invest 1997;100(10):2417-2423. (PMID: 9366554)
4. Lundberg JO, Rinder J, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Nasally exhaled nitric oxide in humans originates mainly in the paranasal sinuses. Acta Physiol Scand 1994;152(4):431-432. (PMID: 7701944)
5. Lundberg JO, Farkas-Szallasi T, Weitzberg E, Rinder J, Lidholm J, Anggaard A, Hokfelt T, Lundberg JM, Alving K. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. Nat Med 1995;1(4):370-373. (PMID: 7585069)
6. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. FASEB J 1992;6(12):3051-3064. (PMID: 1381691).
7. Sanders SP, Siekierski ES, Richards SM, Porter JD, Imani F, Proud D. Rhinovirus infection induces expression of type 2 nitric oxide synthase in human respiratory epithelial cells in



- vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(2):235-243. (PMID: 11174188)
8. Arnal JF, Flores P, Rami J, Murriss-Espin M, Bremont F, Pasto I, Aguilla M, Serrano E, Didier A. Nasal nitric oxide concentration in paranasal sinus inflammatory diseases. *Eur Respir J* 1999;13(2):307-312. (PMID: 10065673)
  9. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(7):3030-4. (PMID: 1557408)
  10. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer LK. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991;254(5034):1001-1003. (PMID: 1948068)
  11. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36:1440-1443. (PMID: 2387039)
  12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275. (PMID: 14907713)
  13. Gibaldi M. What is nitric oxide and why are so many people studying it? *J Clin Pharmacol* 1993;33(6):488-496. (PMID: 8366174)
  14. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 1993;7(2):349-360. (PMID: 8440411)
  15. Kim JW, Min YG, Rhee CS, Lee CH, Koh YY, Rhyoo C, Kwon TY, Park SW. Regulation of mucociliary motility by nitric oxide and expression of nitric oxide synthase in the human sinus epithelial cells. *Laryngoscope* 2001;111(2):246-250. (PMID: 11210869)
  16. Furukawa K, Harrison DG, Saleh D, Shennib H, Chagnon FP, Giaid A. Expression of nitric oxide synthase in the human nasal mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(2):847-850. (PMID: 8564142)
  17. Kang BH, Chen SS, Jou LS, Weng PK, Wang HW. Immunolocalization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in the nasal mucosa of patients with rhinitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000;257(5):242-246. (PMID: 10923935)
  18. Ramis I, Lorente J, Rosello-Catafau J, Quesada P, Gelpi E, Bulbena O. Differential activity of nitric oxide synthase in human nasal mucosa and polyps. *Eur Respir J* 1996;9(2):202-206. (PMID: 8777951)
  19. Ozcan C, Apa DD, Pata YS, Gorur K, Akbas Y. Expression of inducible nitric oxide synthase in antrochoanal polyps. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003;67(4):383-388. (PMID: 12663110)
  20. Karlidag T, İlhan N, Kaygusuz I, Keles E, Yalcin S, Yıldız M. Roles of free radicals, nitric oxide, and scavenging enzymes in nasal polyp development. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005;114(2):122-6. (PMID: 15757191)
  21. Bachert C, Gevaert P, Holtappels G, Cuvelier C, van Cauwenberge P. Nasal polyposis: from cytokines to growth. *Am J Rhinol* 2000;14(5):279-90. (PMID: 11068652)
  22. Cheng XS, Shimokawa H, Momii H, Oyama J, Fukuyama N, Egashira K, Nakazawa H, Takeshita A. Role of superoxide anion in the pathogenesis of cytokine-induced myocardial dysfunction in dogs in vivo. *Cardiovasc Res* 1999;42(3):651-659. (PMID: 10533605)
  23. Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 1986;137(10):3295-3298. (PMID: 3021851).
  24. Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 1997;272(5 Pt 2):H2327-2336. (PMID: 9176302)
  25. Tamir S, Tannenbaum SR. The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochim Biophys Acta* 1996;1288(2):F31-6. (PMID: 8876631)