

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. LÖKOSİTLER	3
2. 1. 1. Tanım ve Sınıflandırma.....	3
2. 1. 2 Nötrofiller (Polimorf Çekirdekli Akyuvarlar)	6
2. 1. 3 Nötrofillerde Proteinaz Sistemi.....	9
2. 2 SİTOKİNLER	10
2. 2. 1 TNF (Tumor Necrosis Factor):.....	11
2. 3 RESPIRATORY BURST	14
2. 3. 1 Respirator Burst Enzimleri	19
2. 4. TAURİN	46
2. 4. 1 Genel Özellikleri:.....	46
2. 4. 2 Taurin Sentezi ve Transportu.....	47
2. 4. 3 Taurinin Etki Mekanizmaları ve Dokulardaki Konsantrasyonu:	49
2. 4. 4 Taurin Fonksiyonları:.....	50
2. 4. 5 Taurin ve Taurokloramin'in Antioksidan Özelliği:	50
2. 4. 6 Taurinin Ca^{++} Homeostazisi Üzerine Etkisi.....	57
2. 4. 7 Taurin ve Kardiovasküler Etkileri:	57
2. 4. 8 Taurinin Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri:.....	58
2. 4. 9. Taurinin Lipit Metabolizması Üzerine Etkileri:	58
2. 4. 10 Taurin ve Kolesterol Metabolizması:.....	59
2. 4. 11 Taurin ve Okuler Hastalıklar:.....	59
2. 4. 12 Taurin ve Detoksifikasyon:	59
2. 4. 13 Taurin ve Alzheimer:.....	60
3. GEREÇLER VE YÖNTEM	61
3. 1 GEREÇLER	61
3. 1. 1 KULLANILAN DENEY HAYVANLARI	61
3. 1. 2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	61
3. 1. 3 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	62
3. 2 YÖNTEMLER	63
3. 2. 1 Deney Hayvanlarının Hazırlanması	63
3. 2. 2 Lökosit İzolasyonu:	64
3. 2. 3 Lökosit süspansiyonlarında Protein Miktarının Ölçümü:.....	65
3. 2. 4 Lökositlerde NO_2^- ve NO_3^- Tayini:.....	66
3. 2. 5 Lökosit Süspansiyonlarında MPO Aktivitesi Ölçümü	67
3. 2. 6 Lökosit süspansiyonlarında Taurin Miktarının Ölçümü	68
3. 2. 7 Lökosit süspansiyonlarında Tauroklorin Miktarının Ölçümü	70
3. 2. 8 Serumda $TNF\alpha$ Düzeylerinin Ölçülmesi	72
3. 3 SONUÇLARIN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	73
4. BULGULAR	74
4. 1 LÖKOSİT SÜSPANSİYONLARINDA NO_2^- - NO_3^- -NOX ÖLÇÜM SONUÇLARI	74
4. 2 LÖKOSİT SÜSPANSİYONLARINDA MPO ENZİM AKTİVİTESİ SONUÇLARI:.....	76
4. 3 SERUM $TNF\alpha$ ÖLÇÜM SONUÇLARI	77
4. 4 LÖKOSİT SÜSPANSİYONLARINDA TAURİN VE TAUROKLORİN ÖLÇÜM SONUÇLARI	79
5. TARTIŞMA	81
6. ÖZET.....	87
7. KAYNAKLAR.....	88

1. GİRİŞ

Nötrofiller akut inflamatuvar cevaba aktif bir şekilde katılan hücrelerdir. Bu hücrelerin en önemli fonksiyonu çeşitli bakterisidal ajanlar üreterek mikroorganizmaları ortadan kaldırmaktır. Ancak bu hücreler tarafından üretilen reaktif oksidanlar çevre dokuya da zarar vermektedir ²⁷.

İnflamasyon şartları altında uyarılan polimorfonüveli lökositlerde (PMN) O_2 kullanımı artmakta ve bu olay respiratuar burst (solunum patlaması) olarak tanımlanmaktadır. Nötrofiller membrana bağlı NADPH oksidaz katalizi ile O_2 'in bir elektron indirgenmesi ile süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) anyonu üretmektedir. $O_2^{\cdot-}$ üretimi mikrobial öldürme ile beraber yakın doku hasarına da yol açan oksidatif olaylar serisini başlatır. $O_2^{\cdot-}$ ya spontan olarak veya süperoksit dismutaz (SOD) ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'i oluşturur. H_2O_2 ve Cl^- miyeloperoksidaz (MPO) tarafından kullanılır ve çok toksik bir oksidan olan hipokloröz asitler (HOCl) oluşur ^{27, 83, 125}. "Hem" yapısına sahip olan MPO, PMNL'lerin primer auzorofilik granüllerinde depo edilir ve değişik uyarılarla aktive olduktan sonra hem ekstraselüler çevreye ve hem de fagolizozomal kompartmanlara salgılanır ^{11,109}. Bu enzim aktivitesinin regülasyonu primer olarak $O_2^{\cdot-}$ üretimi, H_2O_2 varlığı ve diğer kosubstratlar ile yapılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar nötrofillerde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ile oluşan nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)'in de MPO'nun peroksidaz aktivitesinde önemli rol oynadığını göstermiştir ¹⁰⁹. Araştırmalara göre iNOS ve MPO nötrofillerin primer granülleri içinde birlikte bulunmakta ve örneğin bakterinin sindirilmesi gibi fagositik aktivasyon sırasında her iki enzim fagolizozomlara ve ekstraselüler çevreye salgılanmakta ve bu şekilde bakteriyel proteinler nitratlanarak yok edilmektedir ^{11, 109}. $NO^{\cdot}$ ileri derecede aktif bir radikaldır. Bir taraftan $O_2^{\cdot-}$ anyonu ile reaksiyona girerek ileri derecede toksik peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$)'i oluştururken diğer taraftan O_2 ile reaksiyona girerek nitrit ($NO_2^{\cdot-}$) ve nitrat ($NO_3^{\cdot-}$) gibi reaktif nitrojen türevlerini (RNS) üretmektedir ^{47, 83}.

Gram $\varnothing$ bakterilerin dış membranlarının bir integral bileşeni olan endotoksinler nötrofiller ile ilişkiye girerek değişik sitokinlerin sentezini uyarmaktadır. Bu proteinler yeni RNA sentezi aracılığı ile iNOS'u aktive etme yeteneğine sahiptirler. Yapılan çalışmalarda bu hücrelerde iNOS aktivasyonu ile oluşan $NO^{\cdot}$ sentezinin endotoksine ve sitokinlere maruz kalmadıkça gözlenemeyeceğine işaret edilmektedir. Ancak endotoksin verilmesinden sonra iNOS indüksiyonu ile $NO^{\cdot}$ sentezi için 4-8 saatlik bir sürenin gerekliliği vurgulanmaktadır ^{26, 70}.

$NO^{\cdot}$ 'in son ürünleri olan $NO_2^{\cdot-}$ ve $NO_3^{\cdot-}$ bir çok sayıdaki reaktif oksijen türevleri (ROS) ile reaksiyona girerek yeni biyolojik olarak aktif türleri oluşturmaktadır. Son yıllarda $NO_2^{\cdot-}$ 'in HOCl ile fizyolojik

pH'da birleşerek çok güçlü klorlayıcı bir ajan olan nitril klorür (NO_2CI)'ü oluşturduğu belirtilmiştir ^{47, 83, 109}. Bu sistem $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-NO}_2^-$ sistemidir. Oluşan NO_2CI , tirozin içeren fenolik bileşikler dimerleştirme, klorlama ve nitratlama ve bu şekilde hem bakteriyal proteinleri etkileyerek organizmanın savunmasını sağlamakta hem de çevre dokuya zarar vermektedir ^{47, 83, 109}. HOCl, kloraminleri oluşturmak üzere aminler ile de kolaylıkla reaksiyona girer. Taurin ve diğer aminler uyarılan nötrofillerde toplanan kloramin türevlerinin %90'ından sorumludur. Taurin nötrofillerin sitoplazmasında en fazla bulunan serbest amino asittir. Taurin, HOCl ile reaksiyona girerek uzun ömürlü, HOCl'e göre daha az toksik ve daha az reaktif olan taurokloramin (Tau-CI)'i oluşturur. $\text{MPO-H}_2\text{O}_2$ -Halid sisteminin bir ürünü olan Tau-CI antimikrobial ve antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Tau-CI'in fagositik hücreler tarafından oluşturulan proinflamatuvar mediatörlerin miktarını regüle ettiği, iNOS'u inhibe ettiği bildirilmiştir ^{74, 83, 84, 123, 133}. İnsan nötrofillerinde $\text{NO}^\bullet$ oluşumu ile ilgili son derece karışık bulgular mevcuttur. Bazı araştırmacılar çok düşük ancak bazı ajanlarla aktivasyondan sonra artabilen $\text{NO}^\bullet$ miktarına işaret etmişlerdir. Diğer bazı araştırmacılar ise $\text{NO}^\bullet$ aktivitesini ve $\text{NO}^\bullet$ metabolitlerinin insan nötrofillerinin sitokinler ile aktivasyonundan sonra bile tayin etmekte yetersiz kalmışlardır ⁴³. Araştırmacılar taurin ile NO_2^- arasında HOCl ile reaksiyona girmek için bir yarışma olduğunu bu şekilde ya Tau-CI ya da NO_2CI oluşabileceğini önermektedirler ⁸³. Nötrofillerde oluşan RNS'nin antibakterisidal etkileri ve oksidatif doku harabiyetlerine ilişkin yoğun çalışmalar yapılmasına rağmen büyük bir çoğunluğu hücre kültürü ile yapılan in vitro çalışmalardır ^{27, 43, 83, 138}. İn vivo şartlarda nötrofillerin uyarılmasından sonra $\text{MPO-H}_2\text{O}_2$ -Halid sistem aktivitesinin NO_2^- ve taurin ile ilişkisini araştıran ve bu şekilde bu hücrelerin fonksiyonları hakkında karar veren bir bilgiye rastlanmamıştır.

Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızın amacı kobaylara endotoksin uyguladıktan sonra PMN lökositleri izole edip bu hücrelerde MPO aktivitesini ölçtükten sonra HOCl ile reaksiyon için yarışan NO_2^- ve taurin miktarlarını karşılaştırmak ve $\text{MPO-H}_2\text{O}_2$ -Halid sistemin bir ürünü olan Tau-CI seviyelerini tayin ederek endotoksemide PMN'lerin anti-inflamatuvar özelliklerini değerlendirmektir.

Çalışmamızın ikinci amacı: endotoksin ile birlikte antioksidan bir aminoasit olan taurin uyguladıktan sonra yukarıdaki parametreleri ölçerek deneysel olarak verilen taurinin PMN'lerin anti-bakterisidal ve anti-inflamatuvar fonksiyonları üzerine etkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. LÖKOSİTLER

2. 1. 1. Tanım ve Sınıflandırma

Akyuvarlar (lökositler) vücudun koruyucu sisteminin mobil üniteleridir. Lökositlerin en önemli özelliği inflamasyon bölgesine taşınarak orada enfeksiyona karşı hızlı ve etkin bir yanıt oluşturmalarıdır⁵¹. Dokulara göç ederek çok yönlü işlevlerini yerine getirirler.

Sitoplazmalarında bulunan granüllerin tipine göre iki gruba ayrılır: granülositler (çok çekirdekli akyuvarlar) ve agranülositler (tek çekirdekli akyuvarlar). Bu sınıflandırmaya göre toplam yedi farklı lökosit vardır.

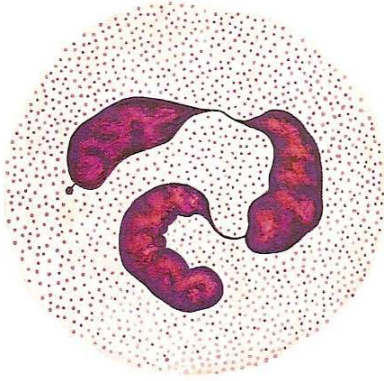
I. Granülositler

1. Çomak çekirdekli nötrofiller
2. Parçalı çekirdekli nötrofiller
3. Parçalı çekirdekli eozinofiller
4. Parçalı çekirdekli bazofiller

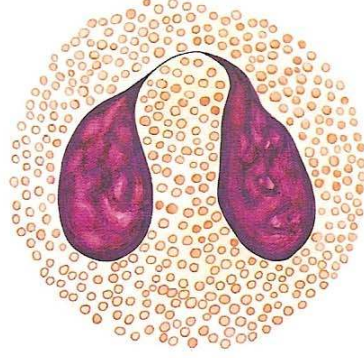
II. Agranulositler

5. Monositler
6. Lenfositler
7. Plazma hücreleri

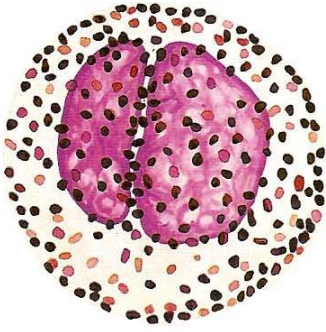
Kan dolaşımında iken granülositler de agranülositler de küre biçimindedir ancak bazıları kan damarlarını terk edip dokulara geçtiklerinde amipsi bir şekil alır. Granülositler iki ya da daha fazla loblu bir çekirdek içerirler⁶⁴.



Nötrofilik granülosit



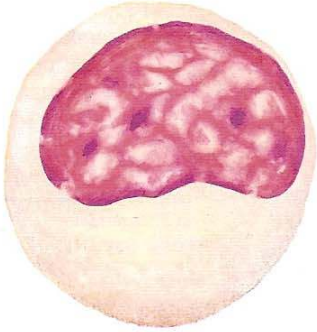
Eozinofilik granülosit



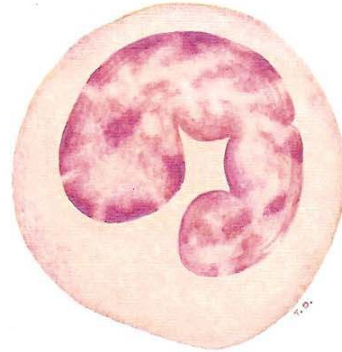
Bazofilik granülosit



Lenfosit



Monosit



Monosit

Şekil 1. Lökosit çeşitleri (Junqueira LC, C. J. Basic Histology. Nobel Tıp. Sf 234)

Tüm granülositler yaşam süresi birkaç gün olan ve bölünmeyen terminal hücrelerdir; bağ dokusunda apoptozis ile ölürler. Ortaya çıkan hücre kalıntıları makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır ve bir inflamatuvar yanıtı yol açmaz. Bölünmeyen hücreler olarak granülositler fazla protein

sentezlemezler. Bu hücrelerde golgi kompleksi ve granüllü endoplazmik retikulum gelişmemiştir. Az sayıda mitokondri içerirler (düşük enerjili metabolizma, sitrik asit döngüsü daha az önem taşır) ve metabolizmaları daha çok glikolize dayanır. Bu nedenle glikojen içerirler ve inflamasyonlu alanlar gibi oksijenin az olduğu bölgelerde işlev görebilirler. Nötrofillerin anaerobik ortamlarda yaşamlarını sürdürebilmeleri, bu hücrelere büyük avantaj sağlar çünkü inflamasyonlu ve nekrotik dokular gibi oksijenin yetersiz olduğu yerlerde bakterileri öldürebilir ve artıkların ortadan kaldırılmasını sağlayabilirler ⁶⁴.

Agranülositlerin çekirdekleri yuvarlak ya da çentikli ve tek lobludur. Yetişkin insanda 1mm³ kanda 6000-10000 (ortalama 7000) kadar lökosit bulunur. Akyuvarların sayısal oranları şu şekildedir:

Tablo 1. Akyuvar Tiplerine Göre μ L Başına Sayıları ve Yüzdeleri

Akyuvar Tipi	μ L başına yaklaşık sayıları	Yaklaşık yüzdeleri
Nötrofil	5000	% 60 – 70
Eozinofil	150	% 2 – 4
Bazofil	30	% 0.5
Lenfosit	2400	% 28
Monosit	350	% 5

Akyuvarlar vücudun yabancı maddelere karşı hücresel ve humoral savunmasından sorumludur. Dolaşımdaki kanda küre biçiminde ve hareketsiz hücrelerdir ancak yabancı bir nesne ile karşılaştıklarında şekil değiştirerek yassılaşabilir ve hareketlenebilirler. Akyuvarlar endotelin bağlantı yerinden geçerek venülleri ve kılcalları terk ederler ve diapedez (Yunanca: dia, içinden; pedesis, atlamak, geçmek) yoluyla bağ dokusuna geçerler. Bu süreç granülositlerin ve monositlerin kandan dokulara tek yönlü akışını içerir (lenfositler tekrar dolaşıma dönebilirler). Mikroorganizmalarla enfekte alanlarda diapedez artar. İnflamasyonlu bölgelerde esas olarak hücresel ve mikroorganizma kökenli kimyasal maddeler salınır ve bu maddeler diapedezi artırır. Kimyasal mediatörler aracılığı ile özgül hücrelerin bölgeye çekilmesi kemotaksis olarak adlandırılır. Bu olay akyuvarların, inflamasyon durumunda koruyucu özelliklerine gereksinim duyulan yerlerde hızla toplanmasını sağlar ^{64, 94, 102}.

2. 1. 2 Nötrofiller (Polimorf Çekirdekli Akyuvarlar)

2. 1. 2. 1 Yapım, Dağılım ve Yıkılımları

Nötrofiller, kemik iliğinde bir seri mitotik bölünme, farklılaşma ve olgunlaşma sonucunda oluşurlar. Kemik iliğinde hem kendini yenileme yeteneği olan hem de değişik hematopoetik seri hücrelerini oluşturabilme kapasitesine sahip pluripotent ana hücreler mevcuttur. Uygun uyarım ile bu ana hücreler unipotent yönlendirilmiş hücrelere farklılaşırlar. Unipotent yönlendirilmiş hücreler hem çoğalma hem de bir hematopoetik seri hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahiptir. Myeloblast, granülositer serinin öncül hücresi olup promyelositlere (peroksidaz +) farklılaşır. Nötrofilik serinin ilk prekürsörü nötrofilik myelosittir. Myelosit safhasından sonra hücreler bölünme yeteneğini kaybederler. Bu safhadan sonra sitoplazma ve nükleusta farklılaşmalar başlar. Myelositlerin olgunlaşması: myelosit → metamyelosit → stab → parçalı (nötrofil) sırasına göre olur ⁶⁴.

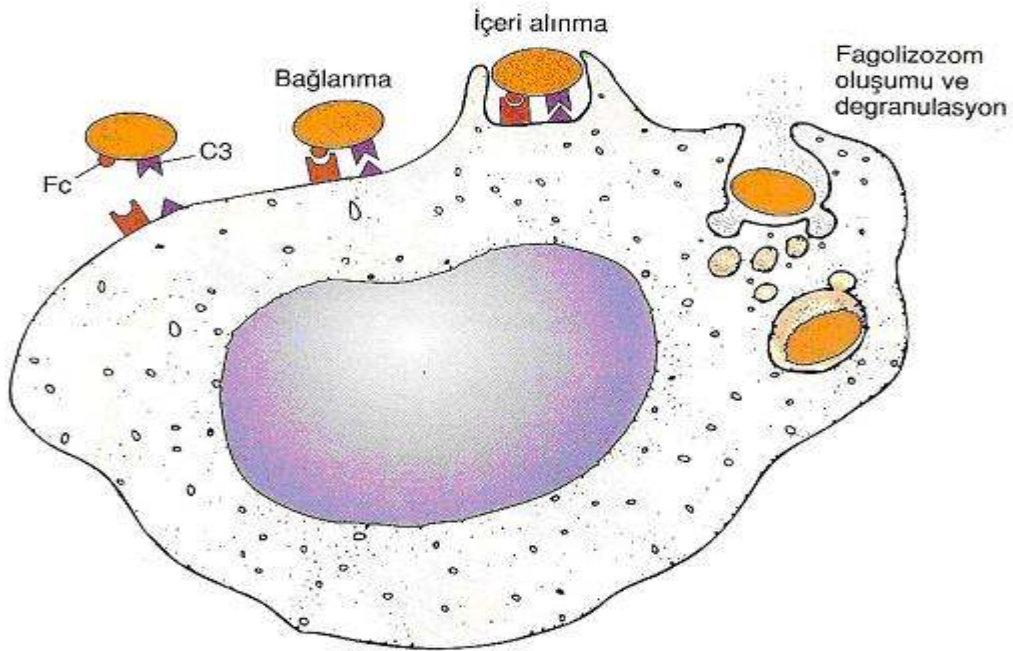
Nötrofillerin yaşam süreleri oldukça kısadır: kan dolaşımındaki yarı ömrü 6-7 saattir, apoptozis ile yaşamlarının sonlandığı bağ dokusunda ise 1-4 gün süreyle yaşamlarını sürdürürler. Nötrofiller kan dolaşımında iken inaktif ve küre biçimindedir, bir kısmı serbest şekilde bir kısmı da damar endoteline yapışık olarak bulunur ancak ekstraselüler matriksteki kollajen gibi solid bir substrata yapıştıklarında aktif amipsi hareketler sergilerler. İki tip nötrofil hareketi vardır. Bunlar: rastgele hareket ve kemotaksik bir faktör varlığında nötrofilin uyarıma doğru tek yönlü hareketidir. Hasara uğramış dokular, bazı bakteri ürünleri, C3a ve C5a gibi kompleman bileşikleri önemli kemotaksik faktörlerdir ⁶⁴.

Kemik iliğindeki nötrofil rezervinin, normalde 4-8 gün ihtiyacı karşılayabileceği gösterilmiştir ⁶⁶. Kan dolaşımına yeni katılan olgunlaşmamış nötrofillerin çekirdeği loblanma göstermez ve at nalı şeklindedir (band formu). Kanda band formundaki nötrofillerin sayısının artması, muhtemelen bir bakteriyel enfeksiyona karşı nötrofil üretiminde artış olduğunu gösterir (sola kayma) ⁶⁴

2. 1. 2. 2. Fonksiyonları

Nötrofillerin en önemli fonksiyonları vücudu mikroorganizmalara karşı korumaktır. Mikroorganizma invazyonlara karşı nötrofil cevabının çeşitli evreleri vardır ²¹. Bu evreler:

1. Kemotaksis
2. Fagositoz
3. İntrasellüler Öldürme
4. Sindirme



Şekil 2. Nötrofil Cevabının Evreleri (Robbins, Temel Patoloji, 2000, sf 32)

Nötrofiller bakterileri bulduklarında psödotopodlarıyla sararlar ve bakterileri nötrofil zarının oluşturduğu, fagozom olarak adlandırılan bir vakuol içinde hücre içine alırlar. Bakterinin sitoplazma içine alınmasından hemen sonra özgül granüller fagozom ile kaynaşır ve içerdikleri enzimler fagozoma boşalır. Fagozom zarındaki proton pompası aracılığı ile vakuol içindeki pH yaklaşık 5.0'e düşürülür; bu pH değeri lizozomal enzimlerin aktivitesinin en üst düzeyde gerçekleştirilmesi için uygundur. Daha sonra, azurofilik granüller enzimlerini asit ortama boşaltırlar ve mikroorganizmalar öldürülerek sindirilir. Nötrofillerde primer ve sekonder olmak üzere 2 tip lizozom granülü vardır. Bu granüller çeşitli hidrolazlar, oksijenazlar ve bazı enzimatik olmayan maddeleri içerirler. Sekonder

granüllerin, primer granüllerden daha önce fagositik vakuollere içeriklerini boşalttıkları sanılmaktadır ^{66, 95}.

Tablo 2. Nötrofil Granüllerinin İçerikleri

Primer (Azurofilik) Granüller	Sekonder (Spesifik) Granüller
Myeloperoksidaz	Laktoferrin
Asit fosfataz	Lizozim
Diğer asit hidrolazlar	Alkalen fosfataz
Lizozim	Kollojenaz
Argininden zengin katyonik proteinler	
Asit mukopolisakkarit	

Fagositik vakuole boşalan bu granüler komponentler antimikrobial özellik gösterirler. Fagositik vakuolde pH'ın azalması ve oksijen kullanımındaki artış, O_2^- anyonları ve H_2O_2 akümülyasyonuna neden olur. MPO, H_2O_2 ve diğer halojenler (Cl^- , I^- ,...) mikroorganizmalara karşı kuvvetli bir antimikrobial sistem oluşturur. Bu sistem için gerekli Cl^- lökositlerde vardır, I^- da ya ekstraselüler sıvıdan ya da tiroid hormonlarının deiyodinizasyonundan alınır ^{10, 62}.

Mikroorganizmanın fagositozunu sağlamak üzere nötrofillerin hücre membranında kompleman ve IgG molekülü için reseptörler mevcuttur. Bazı mikroorganizmalar fagosit edilmenden önce kompleman gibi serum faktörleri veya spesifik antikorlar ile kaplanır. Fagositozu kolaylaştıran bu maddelere opsonin ve bu olaya opsonizasyon denir. Opsonize eden antikorların ve komplementin bulunması fagositoz hızını 100 kat artırabilir ⁶⁴.

Nötrofil ve monositlerin en önemli fonksiyonu fagositozdur. Şüphesiz fagositoz yapan hücreler, fagosit edecekleri maddeler hakkında seçici olmaları gerekmektedir. Aksi halde fagositler tarafından vücudun kendi yapıları da fagosit edilmeli. Bir maddenin fagosit ediliş edilmemesi özellikle 3 faktöre bağlıdır:

1. Fagosit edilecek parçacığın yüzeyi düz olmayıp pürüzlü ise fagositoz kolaylaşır.

2. Vücudun doğal yapılarının çoğu negatif elektrik yükü taşıyan yüzeye sahiptirler. Akyuvarlar da negatif yüklü olduklarından birbirinden uzak dururlar. Öte yandan ölü doku ve yabancı partiküller, çoğunlukla pozitif yüklüdür ve fagositoz için elverişlidirler.
3. Vücudun fagositozu kolaylaştıran bir vasıtası daha vardır. Bazı maddeler opsonin adı verilen bir globulin molekülü ile birleştirilirler. Bu birleşmeden sonra fagositin yabancı yüzeye yapışması kolaylaşır.

Fagositler sindirim enzimlerinden başka bakterisid maddeler de taşırlar. Örneğin nötrofiller lizozim ve fagositin gibi maddeler taşırlar ki bunlar önemli bakterisidal maddelerdir. Nötrofillerde bulunan antimikrobiyal sistemin bileşenleri MPO, halojenler ve H_2O_2 'dir ^{51, 94, 95, 102, 127}.

2. 1. 3 Nötrofillerde Proteinaz Sistemi

Nötrofiller elastin, çeşitli tipte kollajen ve hücre dışı sahada bulunan diğer proteinleri hidroliz edebilen bir grup proteinaz taşır.

Tablo 3. Nötrofillerdeki Proteinazlar ile Plazma ve Dokulardaki Antiproteinazlar

Proteinazlar	Antiproteinazlar
Elastaz	α 1-Antiproteinaz
Kollagenaz	α 2-Makroglobulin
Gelatinaz	Sekretuar Lökoproteinaz inhibitörü
Katepsin G	α 1-Antikimotripsin
Plazminojen aktivatörü	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
	Metalloproteinazın doku inhibitörü

Bu tür enzimsel etki denetlenmeden yürüyecek olursa dokularda ciddi zedelenmelere neden olabilir. Bu proteinazların çoğu lizozomal enzim olup normal nötrofillerde esas olarak etkin olmayan öncüller halinde bulunur. Bu enzimler küçük miktarlarda normal dokulara salınır ve bu miktar inflamasyon sırasında belirgin bir şekilde artar. Elastaz ve diğer proteinazların etkinliği normalde, plazma ve hücre dışı sıvıda yer alan bir grup antiproteinaz tarafından denetim altında tutulur. Bunların herbiri,

kovalen olmayan bir karma oluşturarak bir veya daha fazla sayıda özgül proteinazla bağlanabilir ve böylece inhibisyona neden olur ⁹⁴.

2. 2 SİTOKİNLER

Sitokinler enfeksiyon hastalıklarında ve immün yanıtın düzenlenmesinde rol alan, başlıca lenfositler ve monosit/makrofajlar tarafından salgılanan polipeptid yapılardır ¹¹². Hücreler arası sinyal iletimi, aktivasyon ya da engellenmeyi yönlendiren mediyatörlerdir. Bu proteinler immün sistem hücrelerinin çoğalmasını, farklılaşmasını ve işlevlerini düzenlerler. Kısaca şu özelliklere sahiptirler:

- Bir sitokin birden fazla hücre grubunu etkileyebilir,
- Bir sitokin birden fazla biyolojik aktivitesi olabilir,
- Bir hücre birden fazla sitokin üretebilir,
- Bir hücre birden fazla sitokinden etkilenebilir,

Kendi üretildikleri hücreleri (otokrin etki) ve yakın çevredeki diğer hücreleri (parakrin etki) etkileyebildikleri gibi; sistematik etkileri de (endokrin etki) vardır. Sistemik akut-faz reaksiyonlarını stimüle eden bu sitokinlerin; endotel, lökositler ve fibroblastlar üzerine lokal etkileri bulunmaktadır ^{7, 30}.

Sitokinlerin molekül ağırlıkları 6.000–60.000 dalton arasında değişmektedir. Sitokinler hedef hücre yüzeyindeki özgül reseptörlere bağlanarak işlev görürler ve çok küçük dozlarda güçlü etki oluşturabilirler.

T lenfositler işlevlerinin çoğunda sitokinleri kullanırlar. T lenfositler tarafından salgılanan sitokinlere lenfokin denir. Lenfokinler kazanılmış immün yanıtta hücrel ve humoral immünitinin vazgeçilmez üyeleridir. IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IFN γ , GM-CSF (Granülosit Makrofaj-Koloni Uyarıcı Faktör) ve TNF β lenfokinlerden bazılarıdır. Monokinler ise aktive monosit-makrofaj hücrelerinden salınan, IL-1, IL-8, TNF α , IFN β gibi sitokinlerdir ^{1, 112, 131}.

Sitokinler etkilerine göre başlıca 4 ana grupta değerlendirilebilirler:

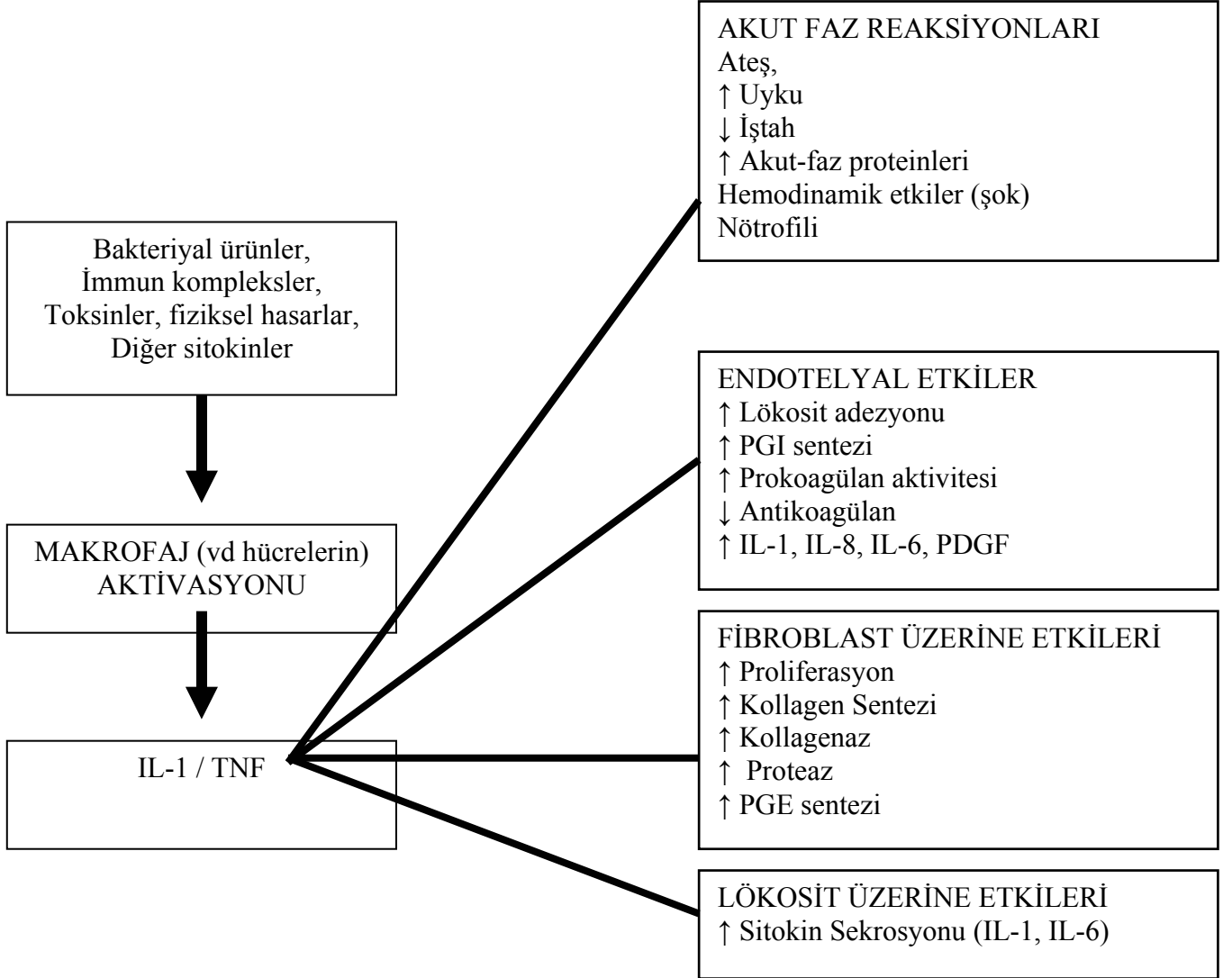
- Doğal immün yanıtta etkin olanlar: IFN α -, IFN β , IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, TNF α
- Lenfositlerin aktivasyonu, çoğalması ve farklılaşmasında etkin olanlar: IL-2, IL-4, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, TGF β

- İnflamasyon yanıtında etkin olanlar: IFN, TNF β , IL-5, IL-10, IL-12, IL-16, IL-18, MIF (göç önlenim faktörü, Migration Inhibitory Factor) .
- Lökositlerin çoğalması ve farklılaşmasında etkin olanlar: GM-CSF, M-CSF (monosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör), G-CSF (granülosit koloni uyarıcı faktör), IL-1, IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, IL-18, SCF (kök hücre faktörü, Stem cell Factor) ^{24, 132}.

2. 2. 1 TNF (Tumor Necrosis Factor):

TNF gram $\emptyset$ bakterilere yanıtın başlıca mediyatörüdür. Diğer enfeksiyon ajanlarına doğal yanıtta da önemli rol oynar. Yapısal ve işlevsel olarak birbirine benzeyen iki şekli vardır: TNF α (kaşektin) ve TNF β (lenfotoksin). TNF α , başlıca makrofajlardan salgılırken TNF β , T hücrelerinden salgılanmaktadır. Deney farelerinde bakteriyel lipopolisakkaridlere (LPS) yanıt sırasında ortaya çıktığı bulunmuş ve tümör dokusu taşıyan farelerde tümör büyüklüğünü azalttığı saptanmıştır ^{103, 108, 131}. Düşük konsantrasyondaki LPS'nin farelerde mononükleer fagositlerin işlevlerini uyardığı ve B hücrelerinin poliklonal aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda ise LPS'nin doku zedelenmesi, yaygın damar içi pıhtılaşma (disseminated intravascular coagulation, DIC) ve şok tablosu sonrasında ölüme neden olduğu gösterilmiştir ^{131, 140}. Artık LPS'nin bu etkileri TNF aracılığıyla yaptığı bilinmektedir. TNF'nin başlıca hücresel kaynağı LPS ile uyarılmış makrofajlardır. Bununla birlikte antijenle uyarılmış T hücreleri, aktive NK hücreleri ve aktive mast hücreleri de bu proteini salgılayabilirler. T hücreleri tarafından üretilen IFN γ , LPS ile uyarılmış makrofajların TNF sentezini artırır. Böylece TNF doğal ve kazanılmış bağışıklığın ortak bir mediyatörüdür ve özgül yanıtla akut enflamasyon arasında bir köprü oluşturur ¹.

TNF insanda 6. kromozomda yerleşen tek bir genin ürünüdür ve yaklaşık 25 kD ağırlığındadır. Farklı genlerle kodlanan iki farklı TNF reseptörü tanımlanmıştır. Biri 55 kD (TNF-RI), diğeri 75 kD (TNF-RII) ağırlığındadır ^{1, 108}.



Şekil 3. İnflamasyonda TNF'nin Başlıca Etkileri (Robbins, Temel Patoloji, 2000, sf 38)

TNF'nin biyolojik etkileri, plazma konsantrasyonuna göre değişiklik göstermektedir. Düşük konsantrasyondaki TNF'nin etkileri şöyle özetlenebilir:

- TNF damar endotelinde yeni adezyon molekülleri sentezine neden olur. Bu moleküller nötrofil, monosit ve lenfositlerin damar duvarına yapışmasını kolaylaştırır.
- TNF mononükleer fagositler ve diğer hücrelerden kemokin salınımına neden olarak lökositlerin bölgeye hareketini kolaylaştırır.
- TNF inflamatuvar lökositleri aktive ederek mikroorganizmaların öldürülmesine yardımcı olur. Özellikle nötrofiller aktive edilirken, eozinofiller ve mononükleer fagositlerin aktivasyonuna da katkıda bulunur.

- Düşük konsantrasyonlardaki TNF'nin kronik üretimi doku onarımına katkıda bulunur. TNF hem bir damar geliştirici (angiogenesis) faktör, hem de bir fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor) gibi etki eder ¹.

Yüksek konsantrasyonlardaki TNF ölümcül değişikliklere neden olur. Burada TNF'nin birçok özgül etkisi rol almaktadır ¹⁰⁸:

- TNF, miyokardın kasılma özelliğini bozarak doku perfüzyonunu azaltır. Bu etki kalp kası hücrelerinde bulunan ve arjinini → sitrulin ve NO'ye dönüştüren NOS'ın aktivitesini artırmasıyla ilgilidir.
- TNF, damar düz kas perfüzyonunu ve kan basıncını azaltır. TNF damar düz kaslarını doğrudan ya da üretimini uyardığı prostasiklin ve NO aracılığıyla etkileyebilir.
- TNF, doku perfüzyonunu bozan damar içi trombozlara neden olur.
- TNF, kan glukoz düzeyini düşürmek gibi metabolik etkilere de sahiptir.

TNF'nin enfeksiyona konak yanıtı sırasındaki sistemik etkileri şöyledir ^{1, 108}:

TNF beynin hipotalamik düzenleyici bölgelerini bir endojen pirojen (ateş yapıcı) olarak etkileyerek vücut ısısında yükselmeye neden olur. Bu etkisi IL-1'in endojen pirojen etkisine benzer. TNF'ye bağlı ateş aspirin gibi prostaglandin sentetaz inhibitörleri (engelleyici) tarafından engellenir.

- TNF, mononükleer fagositler ve damar endoteline etkileyerek dolaşımdaki IL-1 ve IL-6 miktarını artırır.
- TNF, hepatositlere etkileyerek serum amiloid A proteini gibi bazı serum proteinlerini artırır.
- TNF, pıhtılaşma sistemini etkiler ve damar endotelindeki prokoagülan ve antikoagülan aktiviteler arasındaki dengeyi değiştirir.
- TNF, kemik iliği kök hücre bölünmesini baskılar. TNF'ye kronik olarak maruz kalma lenfopeni ve immün yetmezliğe neden olabilir. TNF'nin eritropoezi baskıladığı bildirilmiştir ²⁹.
- Uzun süre TNF düzeylerinin yüksek seyretmesi kas ve yağ hücrelerindeki kayıplarla kaşeksiye neden olmaktadır. Bu zayıflama özellikle TNF'ye bağlı iştah kaybı ve lipoprotein lipaz gibi enzimlerin baskılanmasıyla ilgilidir.

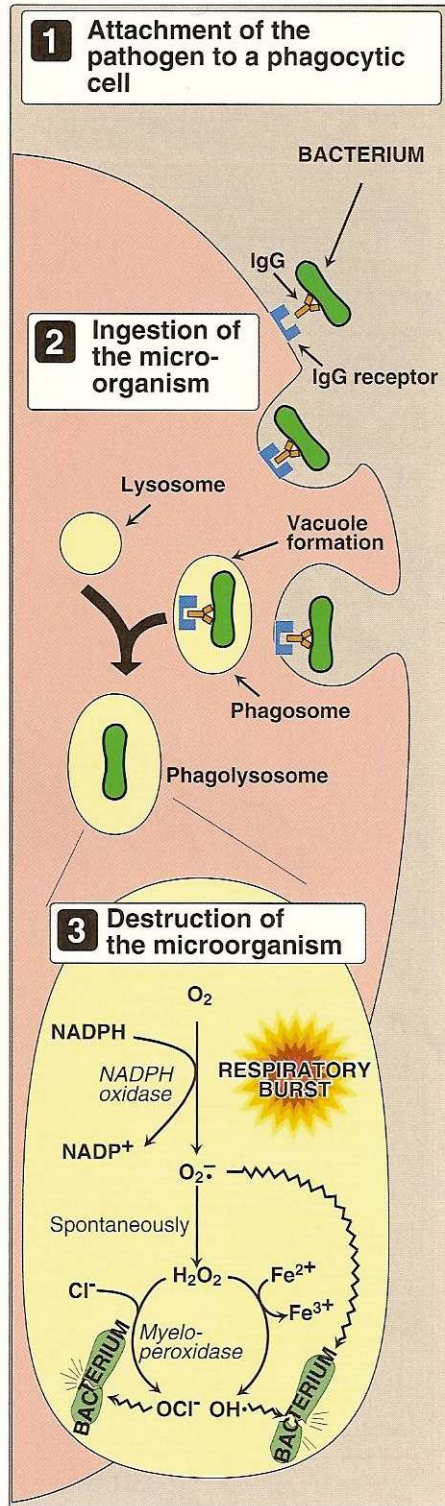
Tüm bu özellikleriyle TNF immün sisteme yardımcı olmanın ötesinde bir çok patolojinin de oluşumunda etkindir ^{75, 113}.

2. 3 RESPIRATORY BURST

PMNL'lerin vücut savunma sisteminde işgalci mikroorganizmaları yok etme konusundaki görevleri bilinmektedir. Bu savunma sisteminin güçlü bir şekli MPO-H₂O₂ ve halojen kofaktörleri içeren mekanizmadır. Granüler enzim olan MPO'nun salınımı ve yüksek reaktiviteli oksijen ürünleri olan O₂⁻ ve H₂O₂'nin jenerasyonu sadece mikroorganizmalarla değil aynı zamanda hücre birikimi, agregasyon ve kemotaktik maddelere cevap olarak da başlatılmaktadır. Potent bir mikrobisidal aktivite dışında MPO- H₂O₂-Halojen sistemi birçok memeli hücrelerine toksiktir ^{10, 37, 130}.

Fagositlerin burst aktivitesi ilk kez 1930 yılında Baldrige ve Gerard tarafından tanımlanmıştır ⁴⁵. 1961 senesinde Iyer "respiratory burst" sırasında tüketilen oksijenin, H₂O₂'ye dönüştürüldüğünü ve H₂O₂'nin bakterisidal ajan olabileceğini bildirmiştir ve böylece ilk kez respiratory burst ve fagositoz arasındaki ilişkiyi kurmuştur ^{10, 61}.

Fagositik hücrelerin bir situmulusla karşılaştıklarında, gösterdikleri bir dizi koordine metabolik olay "respiratuar burst" olarak adlandırılmaktadır. Bu olaylar fagositik hücrelerin oksijene bağımlı öldürücü fonksiyonlarını içermektedir ^{10, 45, 77}.



Şekil 4. Nötrofil Farositozu ve Bakterilerin Fagolizozomla Öldürülmesi için O_2 Bağımlı MPO Sistemi (Lipincott's Illustrated Reviews, 3rd edition, Richard A. Harvey, p148)

Respiratory burstte artmış dört aktivite bulunmaktadır. Bunlar:

1. O₂ alımı
2. H₂O₂ oluşumu
3. Hekzosmonofosfat şant aktivitesi
4. O₂⁻ üretimi ¹⁰

Bugüne kadar yapılan çalışmalar bu tür bakterisidal uyarılarda hücrenin O₂ tüketiminde artış olduğu doğrultusundadır ¹¹⁵. Fagositlerin stimülasyonu sonucu, O₂ alımlarında belirgin bir artış olmaktadır. Dinlenen fagositlerin O₂ tüketimi hücreden hücreye farklılık göstermektedir. Örneğin nötrofiller, oksijenden zengin ortamda olsalar dahi az miktarda O₂ tüketmektedirler. Alveoler makrofajlar ise enerji üretmek amacıyla fazla miktarda oksijen kullanılan mitokondrial reaksiyonlar içermektedirler. Uygun stimulusla bu hücrelerin O₂ alımları artmaktadır ¹⁰.

Respiratuar burstteki en önemli olay O₂⁻ üretimidir. Bu bileşik O₂'nin bir elektron indirgenmesiyle oluşur. Oluşan O₂⁻ anyonu, superoksit dismutaz (SOD) enzimiyle katalize olur. Önceleri bu oksijen tüketimi artışının fagositoz için gerekli enerjiyi sağlamak amacıyla olduğu düşünülmekteydi. Ancak fagositozun oksijen yanında azot ile de yapılabildiğini ve oksijen alımı artışının mitokondrial solunum inhibitörlerine karşı duyarsız olduğunu tespit eden Sbarra ve Karnovsky mekanizmanın bu amaçla kullanılmadığını bildirmişlerdir ⁹⁵.

Fagositozis için kullanılan oksidasyon ajanları MPO, O₂⁻ ve H₂O₂'dir. Bu sistem aracılığıyla bakterilerin yok edilmesi konusunda birçok mekanizma ortaya atılmıştır. Bunlardan en yoğun ilgi toplayanı bakteri hücre duvarının halojenasyonudur. I kullanılarak yapılan çalışmalarda I'un bakteri hücre duvarına bağlandığı saptanmıştır ⁶⁹. Bu bulgu daha sonra fagosit fonksiyonlarını incelemek için temel olarak kullanılmıştır. Yakın tarihlerde radyoaktif CI ile aynı tür testler yapılmış ve CI'un MPO-H₂O₂-Halojen sistemiyle bakteriye inkorpore olabileceği bildirilmiştir. Tüm bu bulgulardan sonra bakterilerin yok edilmesinin hücre duvarının halojenlenmesiyle bütünlüğünü kaybetmesi nedeniyle olduğunu göstermiştir. Ancak bu olayın tek başına etkili olmadığı ve ikinci bir mekanizmanın da bakterisidal etkiye yardımcı olduğu bulunmuştur. Bu mekanizma MPO sisteminin aminoasitleri dekarboksile ederek onları aldehit, CO₂ ve NH₃'a çevirmesidir ^{3, 159}.



Bu mekanizmada bakteri hücre duvarının aminoasit bileşenleri yıkılır ve hücre ölür ya da serbest aminoasitler dekarboksile olarak organizma bu reaksiyonda oluşan toksik aldehytler tarafından öldürülür. Yine de ilk mekanizmanın daha geçerli olduğu bilinmektedir ¹⁰.

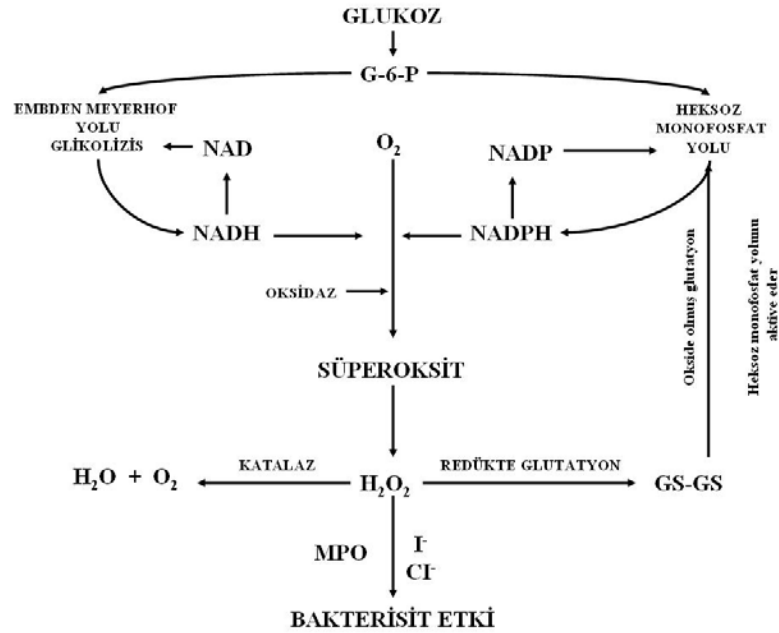
MPO sisteminin bakterisidal etkisi konusunda en son hipotez singlet oksijen (1O_2) mekanizmasıdır. Singlet oksijen teorisinde ise normal atmosferik oksijenden farklı olarak iki oksijen çekirdeği etrafındaki elektron dağılımı farklı olan bir yapı söz konusudur. Bu değişim molekülün kimyasal özelliklerinde farklılıklar katar ve değişik reaktivite gösterir. OH^- gibi ilişkide olduğu biyolojik yapılarda farklılık yapar. Bu olayın fagosit işlevi açısından açıklanması ise şöyledir: MPO reaksiyonu ile oluşan OCI^- , H_2O_2 ile birleşerek singlet oksijeni oluşturur.



Ayrıca:



reaksiyonu da singlet oksijen sağlanmaktadır. Bazı araştırmacılar da $O_2^{\cdot-}$ 'in enzim katalizi olmadan dismutaz reaksiyonu ile de singlet oksijen elde edilemediğini bildirmektedirler . Tüm bu mekanizma 1988 yılında, şöyle özetlenmiştir:



Şekil 5. PMNL'lerde $O_2^{\cdot-}$ Oluşumu

Bu şekli özetlersek: PMNL'lerde fagositozis ve degranülasyon ile birlikte glukoz kullanımı özellikle heksoz monofosfat yolu hızlanır, NADPH üretimi artar. NADPH oksidaz kataliziyle oksijenden O_2^- oluşur. Bu oksidasyonunun artması şant aktivasyonunu ifade eder.



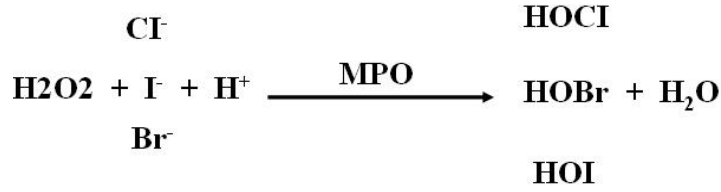
Oluşan O_2^- ile



şeklindeki reaksiyonla H_2O_2 oluşur. Oluşan H_2O_2 ve granülde var olan MPO-halojenlerin varlığında; MPO- H_2O_2 -Halid antimikrobia sistemini oluşturur.

Bu sistemin oluşumu için, H_2O_2 'nin varlığı ve bu H_2O_2 'nin granül MPO'ını serbest bıraktırdığı belirtilmiştir.

Halojenlerin, MPO ile okside edilerek;



hipobromik asit, hipoklorik asit, hipoiyodik asit oluşturduğu ve kuvvetli okside edici bileşiklerinde sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir.

MPO- H_2O_2 sistemi vaküoler sahada aktiftir. Stoplazmada glutatyon ve katalaz sistemleriyle inaktifleştirilir.



şeklindeki reaksiyonlarla glutatyon peroksidaz-glutatyon redüktaz sistemleriyle H_2O_2 'in detoksifikasyonu ve NADP üretimi olur. Oluşan bu NADP heksozmonofosfat yolunu aktive eder.

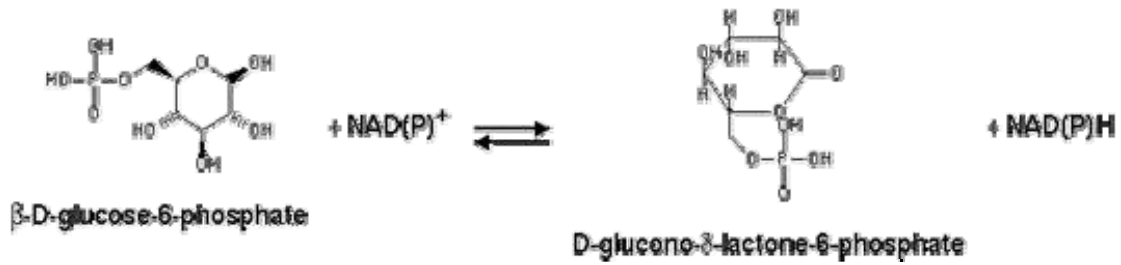
H_2O_2 , katalaz sistemleriyle de detoksifiye edilebilir ^{101, 153}.



2. 3. 1 Respirator Burst Enzimleri

2. 3. 1. 1 Glukoz-6-Posfat Dehidrogenaz (G6PD):

G6PD, pentoz fosfat yolunun anahtar enzimidir. Bu yol birçok anabolik reaksiyon için indirgeyici ajan olan stoplazmik NADPH'ın ana kaynağıdır. G6PD dokularda yaygın olarak bulunur ve fizyolojik şartlarda koenzim olarak NADP^{+} 'yi kullanır ve glukoz-6-fosfat'tan $\rightarrow$ 6-fosfoglukonatın sentezini katalizler ¹⁴.



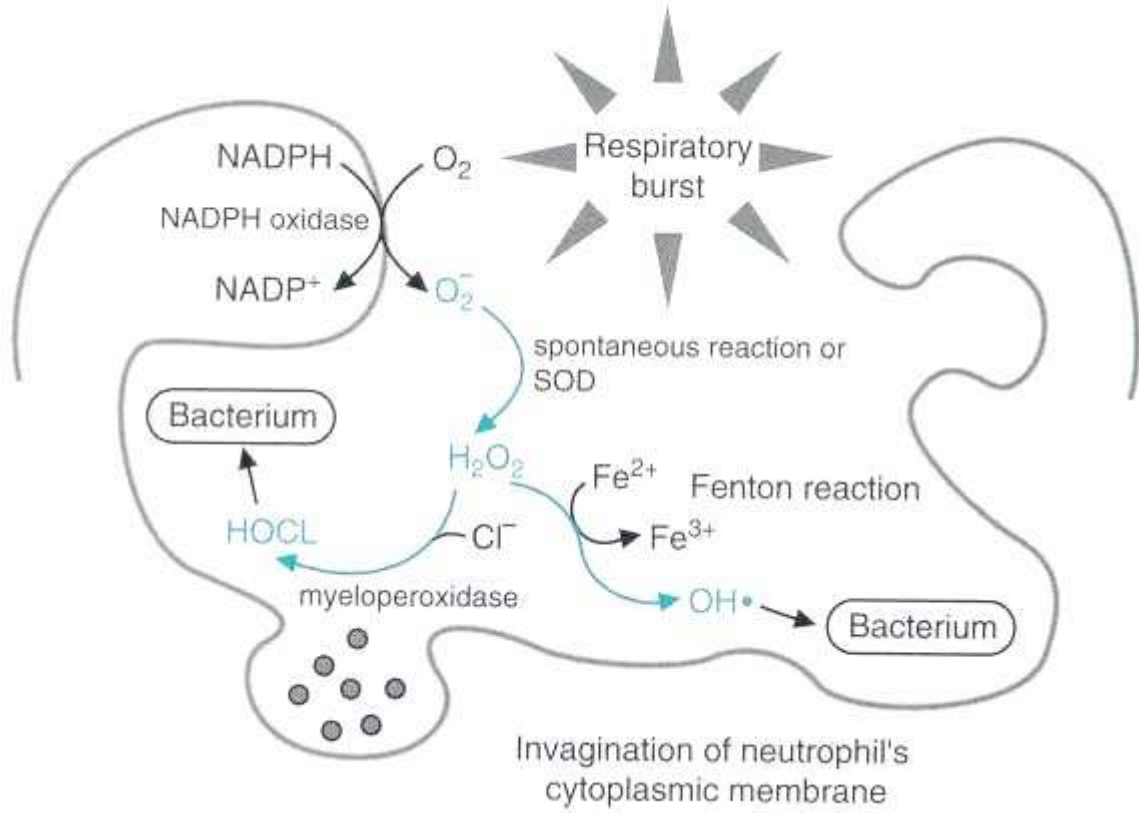
Şekil 6. Glukoz-6-fosfatın glukonolakton-6-fosfata dönüşümü

İlk olarak Karnovsky ve arkadaşları 1959 yılında PMNL'lerde fagositoz sırasında pentoz fosfat yolunun stimüle olduğunu bildirmişlerdir ¹²⁰. Daha sonra fagositoz ve respiratuar burst ile ilgili tüm araştırmalarda indirgenmiş NADPH'ların oksidasyon derecesine bağlı olarak pentoz fosfat yolu aktivitesinin de artması üzerinde durulmuştur.

G6PD'nin en büyük görevlerinden biri de reaktif oksijen türlerinin metabolik enzimleri olan glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz, SOD, NADPH oksidaz ve NOS'a direkt veya indirekt olarak NADPH sağlamasıdır ki bu NADPH, heksoz monofosfat şantında üretilir.

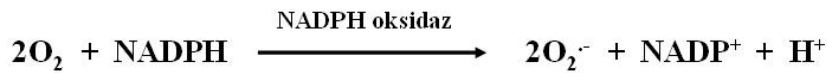
G6PD'nin kalıtsal eksikliğinin birçok tipi tariflenmiştir. Bu durum hemolizi uyarıp anemiye sebebiyet vermektedir. Enzim eksikliği olan hücreler, eritrosit membranının bütünlüğünün sağlanması için gerekli olan GSH eksikliği ile sonuçlanan düşük NADPH üretim hızına sahiptir. GSH eksikliği yaşlı hücrelerde daha fazla görülür. Bundan dolayı bu hastalarda yüksek oranda dolaşımda genç hücrelerin dolaşmasına ve eritrositlerin daha kısa ömürlü olmasına sebep olur ^{128, 137, 154}.

2. 3. 1. 2 NADPH Oksidaz:



Şekil 7. Aktive Olmuş Lökositlerde Respiratuar Burst Olayı

Nötrofillerde bulunan NADPH oksidaz, $O_2 \rightarrow O_2^-$ anyonuna redükte eden, elektron transport zinciri içeren, membrana bağlı bir enzimdir. 1964 yılında ilk defa Rossi ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir ¹¹⁵.



NADPH oksidaz en az iki subüniteden oluşmaktadır ^{18, 90, 134}:

- 1) Flavoprotein olan flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren bir prostetik grup
- 2) Flavositokrom (Sitokrom-b558 subünitesi)

Nötrofillerin aktivasyonu ile özel granüllerde bulunan sitokrom-b558, degranülasyonla plazma membranına transfer edilerek respiratuar burst aktivitesi başlatılır (Optimum pH 7.0-7.5 dur).

NADPH oksidazın 4 komponenti mevcuttur ¹³⁴:

1. gp91-phox
2. p22-phox
3. p47-phox
4. p67-phox

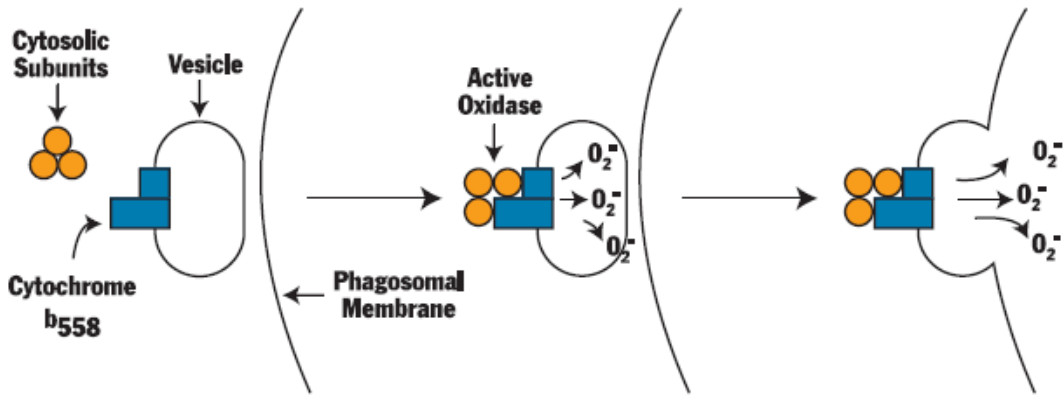
P → ortalama proteini,

gp → glikoproteini,

Numaralar → molekül ağırlıklarını,

phox → proteinin fagositik oksidazın bir komponenti olduğunu gösterir.

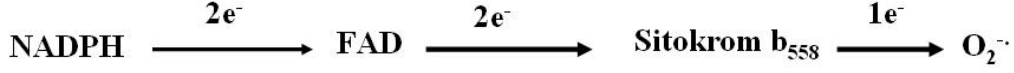
Nötrofillerin sitimülasyonu ile p47-phox sitozolden plazma membranına transloke olur ve oksidaz sisteminin bir komponenti haline gelir. İkinci sitozolik faktör p67-phox da bundan sonra sitoplazmadan membrana transloke olur ve aktif oksidaza bağlanır. Bu sitozolik faktörler, sitokrom b-558 komponentiyle ve G proteinin Rap1A komponentiyle bağlanmayı sağlar ⁶. Dinlenen hücrede alt birimler sitozol ile intraselüler veziküller ve organellerin membranları arasında dağılmış durumdadır. Fagosit aktive olduğunda sitozolik alt birimler membrana göç ederler ve membran-bağlı alt birimlere bağlanırlar böylelikle enzim aktif hale gelmiş olur ¹¹.



Şekil 8. Nötrofil NADPH Oksidaz Enziminin Aktivasyonu

NADPH oksidazın sitokrom b-558 komponentinin α ve β subüniteleri mevcuttur. Bu subüniteler hem grubu içerirler. Bu iki hem'in bir flavinle bağlanması NADPH'daki bir çift elektronun ayrılmasını sağlar. Bir sonraki basamakta da sitokrom b-558'e transfer edilerek, O_2 'in $O_2^{\cdot-}$ 'e bir elektron

redüksiyonu sağlanır. Flavin basamağı transfer olayında hız kısıtlayıcıdır. FADH radikalinin oluşumuyla açıklanan bu olay, bize elektronların hem üzerinden geçtiğini göstermektedir ^{34, 41}.



Dinlenen fagositte NADPH oksidaz aktivitesi yok denecek kadar azdır. Herhangi bir uyarı ile uyarıldığı zaman aktif hale geçer. Bu uyarı bakterilerden veya inflamatuvar proteinlerden kaynaklanabilir.

Respiratuvar burst aktivasyonunda ilk gelişen olay, normalde nötrofillerde inaktif formda bulunan NADPH oksidaz'ın aktif hale geçmesidir. Aktivasyon olayı çok basamaklı bir yolla, agonistin hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanması ve NADPH oksidaz komponentlerinin, membrana bağlı enzim kompleksi şeklinde toplanmasıyla başlatılır. Nötrofillerin bir stimulusla uyarılmasından 15-60 sn. sonra aktivasyon başlamış olur ¹⁰⁶.

Nötrofillerin aktivasyonunda çeşitli mekanizmalar ileri sürülmektedir.

- 1) cAMP konsantrasyonunda artış,
- 2) Membrandaki Ca^{++} depoları
- 3) Fosfolipid turnoveri,
- 4) Proteinlerin fosforilasyonu,

5) Membran potansiyelindeki değişiklikler: Respiratuvar burst aktivitesinin başlamasıyla -60 mV olan istirahat membran potansiyeli, depolarizasyon sonucu 0 mV'a ulaşır ³⁴. NADPH oksidaz üzerinden elektron transportu elektrojeniktir ve depolarizasyona neden olur. Membran depolarizasyonu ve sitozolik asidifikasyon, plazma membranında H^+ 'ın iletimini aktive eder. H^+ iyonunun bu akışı membran potansiyeli ve fizyolojik intraselüler pH'nın korunmasını sağlar.

Tüm bu biyokimyasal değişimler hızla geri dönebilir. Günümüze değin bu aktivasyon mekanizması tam olarak ortaya konamamıştır. Bunun en önemli iki nedeni: NADPH oksidaz'ın saflaştırılamaması ve nötrofillerin intraselüler ortamına şu andaki mevcut tekniklerle manüple edilememesidir.

Nötrofillerin uyarılması ve NADPH oksidazın aktivasyonu bir dizi metabolik olayı içermektedir ¹³⁴:

A. Kemotaktik agonistlerle nötrofillerin uyarılması: Bunlar:

1. Plazma ve inflamatuvar eksudadan kaynaklanan C5a
2. Bakteri ürünü veya hasarlı dokunun mitokondrisinden gelen N-formylmethionil oligopeptitleri

3. Aktive olmuş hücrelerden salgılanan LT-B4, platelet aktive edici faktör (PAF)

4. Stimüle olmuş hücrelerden ve fagositlerden salgılanan interlökin-8 (IL-8)

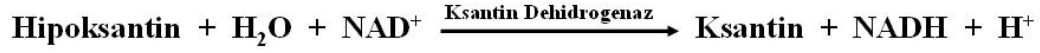
B. Guanozin 5'-trifosfat bağlayıcı proteinler

C. İkincil uyarının oluşumu

NADPH oksidatif sistemin aktivasyonu metabolik asit oluşumunda artışa neden olur. Bu asidifikasyon redoks siklusu sırasında oksidazca H^+ salınımı ve NADPH üreten heksoz monofosfat şantının H^+ üretmesi sonucudur ³⁴.

2. 3. 1. 3 Ksantin oksidaz (XO)

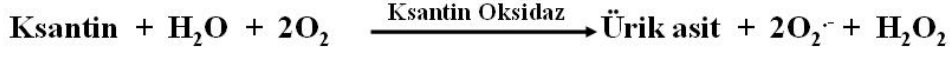
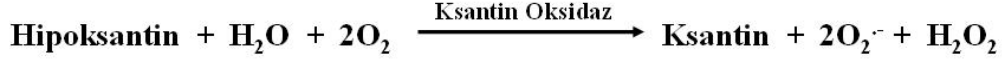
XO, in vivo ROS'un en büyük kaynaklarından biridir. Artmış oksidatif sitres için potansiyel bir kaynak olabilir. Ksantin oksidoredüktaz (XOR), ksantin dehidrogenaz (XD) ve XO gibi iki farklı şekilde bulunabilir. XD, XO'nun prekursorudur, 150 kDa ağırlığında bir proteindir ve hipoksantin → ksantine ve daha sonra da ürik aside çevrilmesini katalizler, bu olay NAD^+ 'nin $NADH$ 'a indirgenmesiyle gerçekleşir.



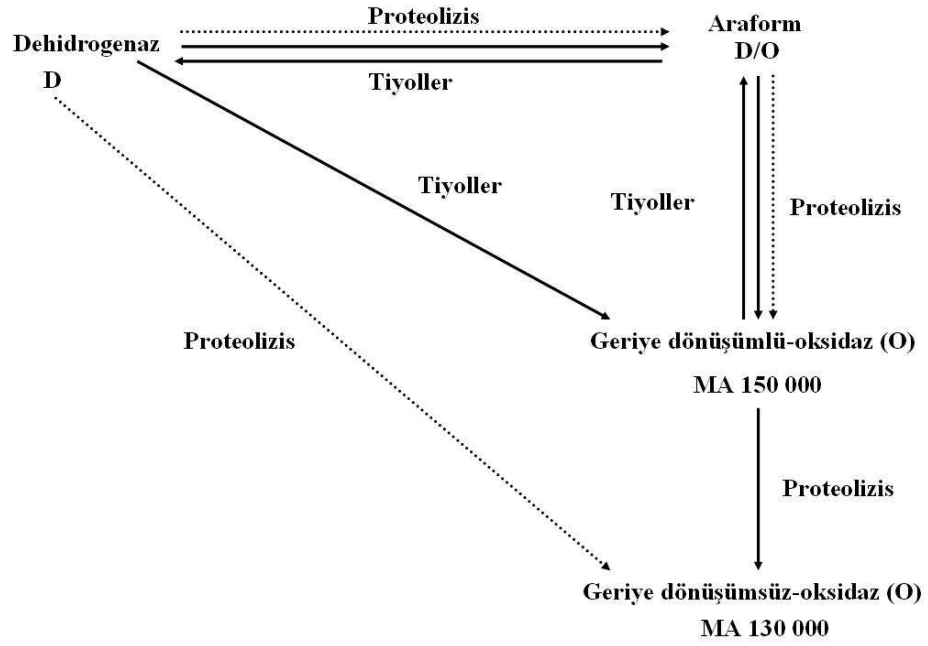
XOR sisteminin normal fizyolojik fonksiyonları şunlardır;

- Pürin metabolizması
- Oksidan ve antioksidan üretimi
- Sinyal uyumu sağlanması
- İlaç metabolizması ^{143, 158}

Patofizyoloji: İlk kez 1968'de Mc Cord ve Fridovich tarafından XO enziminin $O_2^{\cdot-}$ radikalinin biyolojik kaynağı olduğu söylenmiştir ¹⁴⁶. Araştırmalar, XOR'ın non-iskemik dokularda baskın bir şekilde XD olarak bulunduğunu ve iskemi, hipoksi, sepsis, yanık, akut viral enfeksiyon, hemorajik şok veya oksidatif stres sırasında XD'nin XO'a dönüştüğünü göstermektedir.



Bu dönüşüm esansiyel sülfür gruplarının oksidasyonu ile olursa reversible, amino terminalinin yıkımı ile gerçekleşirse irreversible olarak meydana gelir. Yükselmiş XO sirkülasyonda 120 dakikadan fazla kalır ^{143, 158}.



Şekil 9. XOR'ın XO ve XD'a Dönüşümü

XDH'ı → XO'a dönüştüren mekanizma ATP üretimi için gerekli olan O_2 'nin kan akımının azalmasıyla beraber belli bir sınırın altına düşmesiyle başlar. Enerji yükü azalan hücreler, membranlar arasındaki iyon gradientini sağlayamamaya Ca^{++} iyonlarının tetiklenmesine ve sitozolik Ca^{++} konsantrasyonunun artmasına neden olurlar. Bu artan Ca^{++} iyonları da Ca^{++} 'ye bağlı bir proteaz olan kalpain'i aktive ederek dehidrogenaz formunu → oksidaz formuna dönüştürürler. Hücrelerde ATP'nin yıkılarak azalması, AMP konsantrasyonlarının artmasına ve AMP'nin adenoze, inozin ve hipoksantine katabolize olmasına neden olur. Hipoksantin ve ksantin KO ve KD'nin okside olabilen substratları olarak rol alırlar ⁸⁹.

XO'nun patofizyolojisi aktive edilmiş nötrofiller üzerinde incelendiğinde O_2^- oluşumu üzerine büyük etkilere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Heinecke ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada ¹⁵⁸ in

vitro olarak ONOO⁻'in ve MPO'nun ksantini nitratladığını göstermişler ve oluşan majör ürünün ise 8-nitroksantin olarak tanımlamışlardır. ONOO⁻ ile ksantinin nitratlanmasının optimum olarak nötral pH'da olduğunu ve bikarbonatın fizyolojik konsantrasyonu ile önemli derecede stimüle olduğunu MPO ile ksantin nitratlanmasının ise HOCl ve NO₂⁻ gerek duyduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 8-nitroksantin, XO-ksantin sistemiyle önemli miktarda O₂⁻ üretimini artırdığı için biyolojik etkilerinin olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla oluşan fazla O₂⁻, NO[•] ile reaksiyona girecek daha fazla ONOO⁻ oluşacaktır. Sonuç olarak: ONOO⁻ ve MPO ile 8-nitroksantin üretiminin reperfüze olmuş iskemik dokularda ROS ve RNS üretimini açıklayan pozitif feedback mekanizması olabileceğini yayınlamışlardır.

8-nitroksantin XO'nun aktivitesini en az iki yolla etkiler ¹⁵⁸:

- 1) XO'nun başlangıç oranını inhibe eder
- 2) Kümülatif O₂⁻ üretimini artırır

2. 3. 1. 4 Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD'nın McCord ve Fridovich tarafından keşfi reaktif oksidan biyoloji alanındaki ilerlemenin olmasıyla birliktedir. 2 molekül O₂⁻'in, 2 molekül proton ile reaksiyonunu katalizleyerek, H₂O₂'e dönüştürür. Buna dismutasyon da denir çünkü substrat (O₂⁻) kendisi ile reaksiyona girerek bir okside ürün (O₂) ve indirgenmiş ürün (H₂O₂) oluşturur.



İki reaktif oksijen türünü, radikal olmayan moleküllere dönüştürerek, antioksidan sisteminin en önemli öğelerinden birini oluşturur. Bu reaksiyon "oksidatif strese karşı ilk savunma" olarak da adlandırılır. Çünkü, O₂⁻ zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki O₂⁻ düzeyleri kontrol altında tutulur ¹¹.

Ökaryotlarda 2 çeşit SOD vardır:

- 1) Sitosolik SOD : Kofaktörleri Cu ve Zn'dur. Aktivitesinden bakır, stabilitesinden ise çinko sorumludur. Stres durumunda artmadığı tespit edilmiştir.
- 2) Mitokondrial SOD: Kofaktörü ise Mn'dır. İndüklenebilir, konsantrasyonu TNF üretiminin artması gibi stres durumlarında artar.

Bazı bakterilerde Fe-SOD da saptanmıştır.

SOD'ların katalizlediği reaksiyonlarda oluşan H_2O_2 , katalazın etkisiyle su ve moleküler oksijene dönüştürülür.



$O_2^{\cdot -}$ spontan olarak hızlı oranda dismutate olur ve bu durumda SOD'a ne gerek var diye akla soru gelebilir. Bu sorunun cevabı $O_2^{\cdot -}$ 'in spontan dismutasyonu 2 molekül substrat gerektirir ve bu nedenle dismutasyon oranı düşük $O_2^{\cdot -}$ konsantrasyonunda çok büyük oranda azalır. Enzimin katalizlediği dismutasyon ise sadece 1 molekül $O_2^{\cdot -}$ 'e (ve bunun da konsantrasyonu karardır) gerek duyar. Bu nedenle SOD varlığı hücre içi daha az ve kararlı bir $O_2^{\cdot -}$ ile sonuçlanır ^{10, 11}.

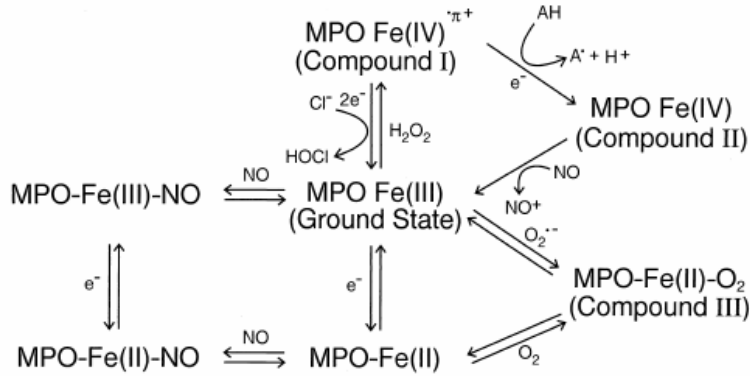
2. 3. 1. 5 Myeloperoksidaz (MPO)

2. 3. 1. 5. 1 MPO Yapısı, Mekanizması ve Regülasyonu:

MPO (verici: H_2O_2 , oksidoredüktaz, EC 1.11.1.7) tetramerik, glikozillenmiş, ~ 150 kDa ağırlığında bir hem proteindir. Hemoglobin ve diğer hem proteinlerinin aksine MPO kırmızı değil yeşil renktedir. Bu alışılmadık rengin ortaya çıkmasının sebebi hem grubunun MPO'a hem'i kubbe şekline getiren 3 kovalent bağla bağlanması sebebiyledir ⁵³.

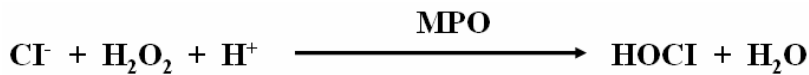
Birbirine disülfid köprüleri ile bağlanmış iki protomerden oluşur. Bunların her biri 59-64 kDa ağırlığında ağır ve 14 kDa ağırlığında hafif alt üniteleri olan protoporfirine sahiptir. Enzimin yapısında % 2.4-3 oranında karbonhidrat mevcuttur ve bunlar mannoz, glukoz, N-asetil glukozamindir. Enzimin aminoasitleri % 13-14 oranında lizin ve arginindir.

MPO nötrofil ve monositlerde bol miktarda bulunur ve bu hücrelerin kuru ağırlığının sırasıyla %5 ve %1-2 sini oluşturur. Hem proteini lökositin primer azurofilik granüllerinde depo edilir ve çeşitli agonistlerin fagositleri aktive etmesini takiben ekstraselüler sahaya ve fagolizozomal kompartmana salınır. Tipik olarak fagosit aktivasyonu ve MPO salınımı, $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 üretilen oksidatif burst ile birliktedir. MPO, H_2O_2 'nin oksitleme potansiyelini artırır ve bunu H_2O_2 'i, ROS ve klasik peroksidaz zinciri ile çeşitli radikaller üretmek için kosubstrat olarak kullanarak yapar ¹⁰⁹.



Şekil 10. MPO'nun Kinetik Modeli

MPO'nun tahmin edilen kinetik çalışma modeli şu şekildedir: MPO'nun çeşitli ara formları vardır ve hepsi de O_2^- , H_2O_2 gibi indirgenmiş oksijen türevlerinden ve NO 'ın varlığından etkilenirler. Temel formda MPO, ferrik (FeIII) şeklindedir. H_2O_2 'in eklenmesi ile MPO'nun hem grubu, 2 elektron ile okside edilir ve Compound I denen ferril (FeIV) pozisyonunda bir ara form oluşur. Cl^- , Br^- ve I^- gibi halid ve yalancı halid olan tiosiyonat (SCN^- , tükürükte bol bulunur) varlığında compound I'e kolayca indirgenir ve MPO-Fe(III) tekrar üretilir ve hipohaloz asit (HOX) oluşur. Plazma seviyeleri 100 mM Cl^- , 100 μM Br^- , 50 μM SCN^- , 100 nM I^- iken Cl^- en çok tercih edilen substrattır ve kuvvetli klorlayıcı oksidan olan HOCl oluşur. Enzimlerin bakterisidal aktiviteleri için gerekli olan Cl^- 'un fagositik vaküoldeki Cl^- konsantrasyonu tarafından karşılanabildiği bildirilmiştir. Aslında MPO aracılığı antimikrobial sistemde I^- , Cl^- 'dan daha etkindir fakat serumda I^- konsantrasyonu çok düşüktür. Compound I çeşitli organik substratları okside edebilir. Fizyolojik şartlar altında, MPO'nun klorlayıcı oksidan üretme kabiliyetinin benzeri yoktur ve memeli enzimlerin aktivitesini tanımlar. MPO'nun optimum pH'ı 6 civarındadır ^{2, 44, 147}.



"Hem", sırayla Compound II ve MPO-Fe(III) üreterek iki indirgenme tepkimesine uğradığında, Compound I çeşitli organik substratları da okside edebilir. MPO'nun aktif bölgesi, derin ve dar hidrofobik cebin tabanında yerleşmiştir ve bu yerleşim şekli substratların erişebilirliğini kısıtlar. Bu nedenle primer olarak düşük molekül ağırlıklı bileşikler hem'in oksitleme potansiyelini uzak hedeflere taşıyabilen ve diffüze olan oksidanlar ve serbest radikaller oluştururlar. MPO'nun substratı

olarak hizmet ederler. Bu şekilde halidlere ve SCN^- 'e ek olarak NO_2^- , tirozin, askorbat, ürat, katekolaminler, östrojen ve serotonin gibi doğal olarak ortaya çıkan bazı maddeler de MPO için substrat olabilir ⁹¹. İn vivo olarak, bu substratların peroksidasyonunun MPO'nın tüm aktivitelerine relatif katkıları bilinmemektedir. Bu substratlarla oluşan ürünler ve bunların başlattığı reaksiyonlar biyolojik fonksiyonlarda önemli rol oynarlar. Örneğin, oksidan türler, lipid peroksidasyonun başlamasıyla veya ksenobiyotiklerin aktivasyonu, potent sinyal moleküllerin üretimine yol açabilir. MPO-Fe(III), inaktif form olan MPO-Fe(II)'ye indirgenebilir ve MPO-Fe(II), O_2^- ve O_2 'i sırayla bağlar ve ferroz dioxy aracılığı olan Compound III (MPO-Fe(II)- O_2) oluşur. Compound III'e H_2O_2 'nin ilavesi sonuçta compound II oluşturur. Compound III indirekt yolla peroksidasyon yollarını başlatır ¹⁵¹.

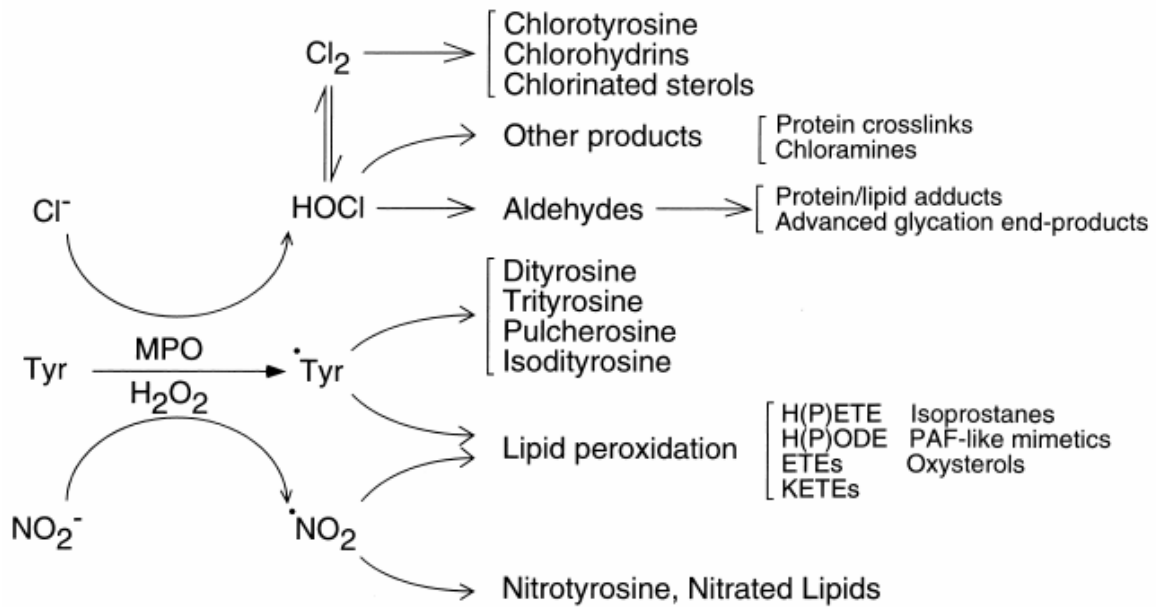
2. 3. 1. 5. 2 MPO Aktivitesinin Düzenlenmesi:

MPO aktivitesinin düzenlenmesi öncelikle O_2^- üretimine, H_2O_2 ve diğer substratların varlığına, askorbat veya methionin gibi antioksidanların miktarına bağlıdır. Bununla beraber son çalışmalar MPO'nın peroksidaz aktivitesinin düzenlenmesinde NO'nın rolünü belirlemişlerdir. NO pek çok fizyolojik süreçlerde bioregülatör olarak rol oynar ve çoğu hemoproteinlerin regülasyonunda görevlidir. MPO ve iNOS lökositin primer granüllerine birlikte yerleşmiştir. Bakteri sindirimi gibi fagosit aktivasyonu sırasında, MPO ve NOS fagolizozoma ve ekstraselüler sıvıya salınır ve bakteriyel proteinlerin nitratlanması gözlenir. Yapılan çalışmalar: düşük konsantrasyonlardaki NO, MPO ile katalizlenen substratların peroksidasyon hızını arttırdığını göstermiştir. Bu mekanizma: hız sınırlayıcı basamağın (Compound II'nin $\rightarrow$ MPO-Fe(III)'e indirgenmesi) stimüle olmasıyla. NO'nın daha yüksek konsantrasyonlarında, nitrosil komplekslerin (MPO-Fe(III)-NO) oluşmasıyla MPO'nın reversible inhibisyonu ortaya çıkar. NO de, MPO Compound I için bir substrat olabilir ve bu reaksiyon MPO Compound I'nin $\rightarrow$ Compound II'ye indirgenmesi ile sonuçlanır. Hatta, NO varlığında, peroksidaz döngüsü boyunca, MPO'nın tüm turnover oranı ~1000 kat artırılır. Net sonuç: MPO, NO için, katalitik bir taşıyıcı gibi davranabilir. Sonunda NO, MPO-Fe(II)'ye reversible olarak bağlanır ve MPO-Fe(II) ile ve MPO-Fe(III)-NO denge halinde bulunan, MPO-Fe(II)-NO ara ürününü oluşturur ². İn vivo olarak MPO regülasyonu oldukça karışıktır çünkü MPO, çok çeşitli pH'larda ve NO, H_2O_2 , O_2^- , O_2 , inorganik, organik substratlar ve indirgeyici ajanların farklı seviyelerinde fonksiyonunu yapar .

Dalen ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada ¹³⁸ NO₃⁻'i, MPO için zayıf bir substrat fakat MPO'nun klorlama aktivitesi için çok kuvvetli bir inhibitör olarak bulmuşlardır ve bunu NO₃'ün MPO'ı inaktif olan tek değerli formuna indirgeyerek yaptığını ve kendisinin de NO₂'e oksidize olduğu şeklinde açıklamışlardır.

2. 3. 1. 5. 3 Aterosiklerozda LDL Oksidasyonunun Katalizörü Olarak MPO:

MPO, H₂O₂ ile reaktif oksidanlar üretmek için çeşitli substratlar kullanabilir. Bu reaktif oksidanlarla üretilen kararlı son ürünler tanımlanmıştır ⁵⁵.



Şekil 11. MPO ile Üretilen Reaktif Oksidanlar ve Onların Ürünleri

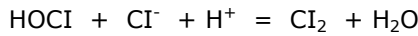
MPO ile oluşturulan ürünlerin çokluğu ve onların vasküler dokularda mass spektrofotometrik metotlarla tanımlanması, MPO'nun, in vivo olarak LDL gibi biyolojik hedeflerin oksidatif modifikasyonu için katalizör olduğunu gösteren bazı delillerdir. İnsanlarda, halojenlerin fizyolojik seviyelerinde, reaktif klorlayıcı ajanlar ürettiği bilinen tek yol MPO'dır. Bu nedenle spesifik klorlanmış kararlı oksidasyon ürünlerinin tespit edilmesi, in vivo olarak MPO'nun neden olduğu oksidatif hasarın olduğu dokuları tanımlamak için kuvvetli bir araç olarak kullanılmaktadır.

MPO'nun katalizlediği oksidasyonun bir belirtici olan 3-klorotirozin, ateroskleroz lezyonlarındaki LDL'de ve proteinlerde artar. Biyolojik hedeflere karşı, HOCl gibi klorlayıcı oksidanların reaktivitesi

epeyce açıklığa kavuşturulmuştur ve aminlerin ve doymamış yağların klorlanmasını, tiol ve tiol esterlerinin oksidasyonunu ve hem gruplarının ve demir sülfür merkezlerinin oksidatif hasarını içerir. Bunlara ek olarak, HOCl'in H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyonunun sırasıyla 1O_2 ve $OH^{\cdot}$ radikali oluşturduğu rapor edilmiştir ⁵⁵.

3-klorotirozin, tirozinin nonfizyolojik oksidasyon ürünüdür. Hem kararlı asit hem de suni mekanizmalarla kolayca yapılamaması, 3-klorotirozini, MPO'nun katalizlediği oksidasyon için spesifik moleküler marker olarak kullanılabilir hale getiren karakteristik özellikleridir. Normal damarlara göre aterosklerotik damarların proteinlerinde, 3-klorotirozin içeriğinde önemli miktarda artışlar gözlenmiştir ^{147, 152}.

Cl^- 'un MPO'nun katalizli oksidasyonu ile üretilen klorlayıcı ara ürünlerin, HOCl veya onun konjuge bazı olan hipoklorit (ClO^-) olduğuna inanılır. Yine de son çalışmalar göstermiştir ki klor gazı, oksidana benzer, HOCl/ ClO^- 'a benzemez; serbest aminoasitlerden klorotirozin oluşumunda en yakın klorlayıcı ara ürün gibi kullanılır.



HOCl, Cl^- ve H^+ gerektiren reaksiyon yolu ile Cl_2 ile denge halindedir. Cl_2 oluşumu, asidik pH ve Cl^- varlığında artar. Cl_2 , normalde HOCl/ ClO^- 'e atfedilen oksidasyon/halojenizasyon reaksiyonlarını potansiyel olarak yapabilir.

MPO'nun ürettiği klorlayıcı ajanlarla LDL'nin biyolojik aktivitesinin değiştirilmesi tam olarak bilinmemektedir. NO_2^- varlığında, LDL'nin, bolus tarzında HOCl eklenmesine maruz bırakılması, lipoprotein agregasyonunu artırır fakat sürekli sabit düşük miktarda oksidan akışı olduğunda ise bu etkiler oluşmaz ¹⁰⁴.

2. 3. 1. 5. 4 MPO'nun Aldehit Formasyonu ile Türevlendirilmiş Aminoasitler:

Nötrofillerin MPO- H_2O_2 - Cl^- sistemi ile üretilmiş tirozin oksidasyon ürünlerini inceleyen çalışmalar, nötral pH'ta çok küçük (<%1 ürün) klorotirozin oluşturulduğunu göstermiştir. Benzer reaksiyonlar (örneğin aldehit oluşumu) hemen hemen tüm diğer α -aminoasitler için sonradan gösterilmiştir ⁵⁵. Aldehit oluşumunun mekanizması ayrıntılı olarak incelenmiştir ve bu mekanizma önce labil α -monokloramin ara ürünü oluşumunu ve sonra CO_2 ve NH_4^+ birlikte kaybolduğunda bir aldehide indirgenmeyi içerir. Akrolein, treonin'in hem nötrofillerin MPO- H_2O_2 - Cl^- sisteminine hem de HOCl'e

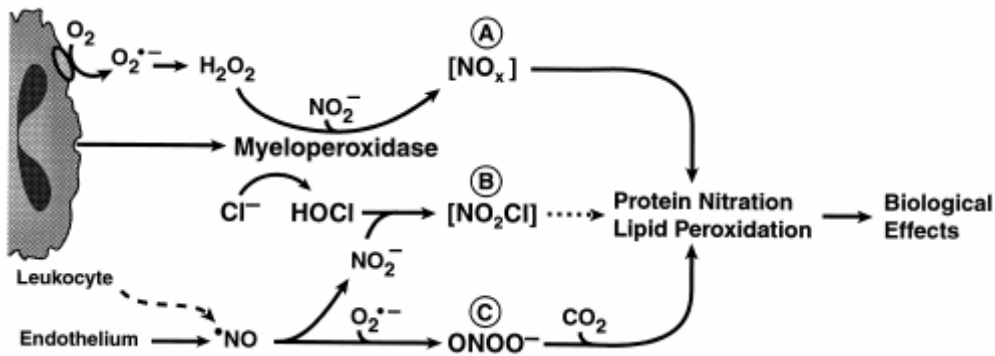
maruz kalmasıyla üretilen, bir aldehittir. Ateromlarda protein lizin rezidülerini kovalent olarak modifiye eder. Benzer şekilde glikolaldehit, serinin MPO'nun ürettiği HOCl/OCI⁻ ile oksidasyon ürünüdür, karboksimetil lizin gibi ileri glikozilasyon son ürünleri oluşumunda ara ürün olarak kullanılır. Aminoasitlerden kaynaklanan aldehitlerin MPO bağımlı üretiminin biyolojik sonucu bilinmemektedir. Diğerleri T hücrelerinin farklılaşma ve fenotiplerini değiştirme kabiliyetinden dolayı aşılama adjuvant olarak kullanılırken, aldehitlerin çoğu alternatif yollarla üretilir ve sitotoksik (örneğin: akrolein, asetaldehit gibi) olarak bilinir¹⁵.

2. 3. 1. 5. 5 MPO ile Tirozil Radikali Üretimi:

Ditirozinin iki tirozil radikali arasında, bir radikal-radikal eklenme reaksiyonu ile meydana geldiğini ayrıca hem damar lezyonundan iyileşen LDL'de hem de erken aterosklerotik lezyonun intimasında arttığını GC/MS çalışmaları göstermiştir⁷⁶. İn vitro olarak tirozil radikallerinin MPO bağımlı oluşumu elektron spin rezonans (ESR) spektroskopisi veya ditirozin ve diğer tirozin radikal eklenme ürünlerinin yapısal tanımlanması ile gösterilmiştir⁸⁶. (Lipo)proteinlerin MPO'nun ürettiği tirozil radikallerine maruz kalması protein çapraz bağlanmaları ve lipid peroksidasyonunu artırır. HDL'nin MPO'nun ürettiği tirozil radikallerine maruz kalması, ters kolesterol taşıma kapasitesini artırır¹⁴⁴.

2. 3. 1. 5. 6 MPO'nun Ürettiği Reaktif Nitrojen Türevleri:

Hem immünohistokimyasal çalışmalar hem de GC/MS çalışmaları, nitrotirozin iyileşmiş ateromlarının aterosklerotik intimasında ve LDL'lerde arttığını göstermiştir²². Daha önceleri dokularda nitrotirozin tespiti, in vivo olarak ONOO⁻ üretiminin bir kanıtı olarak kullanılmıştır⁵⁵.



Şekil 12. Lökosit Bağımlı NO'ten Türevlenen Oksidanların Oluşması

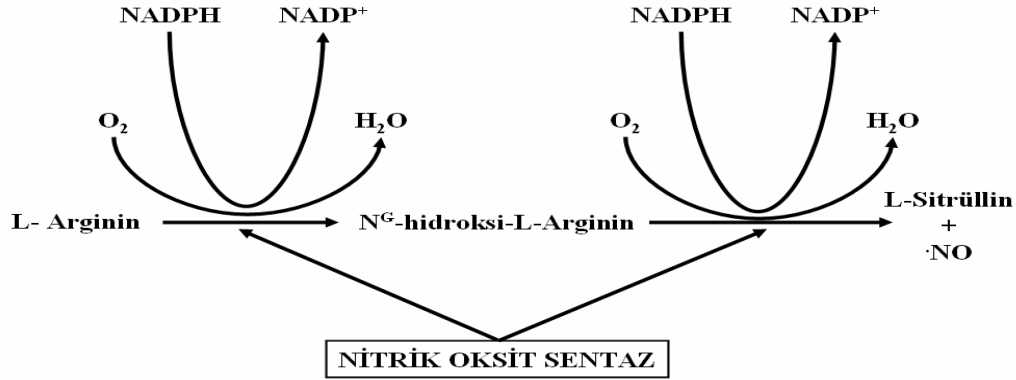
Son yıllarda yapılan çalışmalar, nitrotirozin oluşması için en az iki alternatif yolağın varlığını ve bunların her ikisinin de MPO'a bağlı üretilen RNS yoluyla olduğunu göstermişlerdir ^{16, 107}. Bunlardan ilki (Şekil 12, A) MPO bağımlı NO_2^- oksidasyonunu içerir. İkincisi (Şekil 12, B) MPO'nun ürettiği HOCl ile NO_2^- 'in sekonder oksidasyonunu kapsar. Hem izole edilmiş MPO ile hem de insan nötrofilleri ile yapılan çalışmalar serbest ve protein bağlı tirozin rezidülerinin bu iki yolak ile nitrotirozine çevrildiğini göstermiştir. Yine de nötrofil fagolizozomlarında ve monositlerdeki ileri aromatik nitratlanma reaksiyonlarında NO_2^- 'in HOCl ile sekonder oksidasyonun rolü (Şekil 12, B) sorgulanmaktadır. Çalışmalar MPO- H_2O_2 - NO_2^- yolağının, insan serumu gibi biyolojik materyallerde etkili bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlattığını göstermiştir ¹²².

MPO eksikliği genelde 500-2000'de 1 görülen kalıtsal olmayan bir durumdur ve nadiren semptomatiktir ¹⁰⁹.

2. 3. 1. 6 Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

Biyolojik sistemlerde oluşan RNS'in en önemlisi, oksidasyon durumu +2 olan nitrojen monooksittir yani $\text{NO}^\cdot$ 'dur. $\text{NO}^\cdot$, stabil olmayan bir radikal moleküldür. $\text{NO}^\cdot$: O_2 , O_2^- radikalleri veya H_2O_2 ile hızlıca reaksiyona girerek NO_2^- , ONOO^- ve NO_3^- 'a dönüşür. $\text{NO}^\cdot$ 'in oluşumu, sitokrom P_{450} -oksidoredüktaz ailesine ait bir enzim grubu olan nitrik oksit sentaz (NOS)'lar tarafından katalizlenir. C-terminal redüktaz bölgesi NADPH, FMN ve FAD için bağlanma yerleri içerip sitokrom P_{450} 'e çok benzerken, N-terminal bölgesi biopterin (BH_4), hem ve L-Arg için bağlanma yerlerine sahiptir. Hem ve BH_4 enzimin dimerizasyon ve elektron transportunun stabil hale gelebilmesi için en önemli parçalarıdır.

NOS, L-sitrulin ve radikal bir gaz olan $\text{NO}^\cdot$ üretir. Oksidatif reaksiyonda substrat olarak L- arjinin kullanır. Bu oksidatif süreçte kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotit (NAD), flavin mononükleotit (FMN) ve tetrahidrobioprotein'e (BH_4) gereksinim duyar. Ayrıca enzimin tamamen fonksiyonel olabilmesi için "hem" ve kalmoduline (CaM) de ihtiyaç vardır. NOS aynı anda 5 kofaktör/prostetik grup (FAD, FMN, Hem, BH_4 ve Ca^{++} – CaM) bağı gerektirdiği bilinen tek enzimdir



Şekil 11. NO'nun biyosentezi

NOS enziminin üç temel izoformu vardır. Bunların fonksiyonu, dağılımı ve regülasyonu farklıdır, ancak hepsi de aynı redoks reaksiyonlarını katalizlerler ve O₂⁻ üretebilirler¹³⁹:

- Nöronal NOS (nNOS = NOS 1)
- Endotelial NOS (eNOS = NOS 3)
- İndüklenebilir NOS (iNOS = NOS 2)

nNOS ve eNOS beraberce cNOS (constitutive=yapısal) olarak isimlendirilir. cNOS ve iNOS arasında pek çok önemli farklılıklar vardır^{93, 136}:

Tablo 4. cNOS ve iNOS Arasındaki Farklılıklar

cNOS	iNOS
Yapısal olarak bazal düzeyde bulunur	Yapısal olarak bulunmaz
Ca^{++} /Kalmoduline bağımlıdır	Ca^{++} /Kalmodulin'den bağımsızdır
Sentezi çok kısa sürede olur ve az miktardadır (pmol)	Sentezi için saatler gerekir ve çok miktardadır (nmol)
Fizyolojik olayların devamında görevlidir	Fizyopatolojik değişikliklere sebep olur
L-Arginin analogları ile inhibe olur	L-Arginin analogları ile inhibe olmaz
Kortikosteroidler ile inhibe olmaz	Kortikosteroidler ile inhibe olur
Sitozolda yerleşir	Sitozolda yerleşir

- cNOS hücre sinyali için yeterli olacak seviyede NO'nun çok küçük miktarlarını oluştururlar. Aksine, iNOS $TNF\alpha$ ve $IFN-\gamma$ gibi sitokinler tarafından indüklenir. iNOS, sitokinlerin yüksek miktarlarda üretildiği yerlerde açığa çıkar ve NO'nun çok büyük miktarlarını oluşturabilmektedir. iNOS'un bu aşırı aktivitesi septik şok, hemorajik şok ve hepatit gibi akut ve kronik hastalıklarda görülmektedir. iNOS tarafından NO sentezi, O_2^- gibi ROS'nin oluşumu ile eş zamanlı oluşmaktadır ^{5, 119}.
- iNOS aktivitesi özellikle L-arginin analogu L-canavanine ve aminoguanidinle inhibe olur. cNOS aktivitesi glikokortikoidlerden etkilenmezken iNOS glikokortikoidlerle inhibe edilir. Ancak iNOS aktivitesi eksprese olduğunda glikokortikoidlerden etkilenmez ¹³⁶.
- Her iki enzim de L-arginin guanidin terminalindeki modifikasyonlarla (LNMAA- N^G monometil – Larginin, LNAME - N^G nitro L-arginin metil ester, LNNA - N^G nitro L-arginin) inhibe edilir.

Tablo 5. NOS'ın İzoformlarının Aktivatörleri ⁹⁸:

İZOFORM	AKTİVATÖRÜ
nNOS	Ach Bradikinin Ca iyonoforları Histamin Lökotrienler PAF
eNOS	Seratonin Trombin
iNOS	LPS, IFN- γ TNF α , β

NOS'ın hücresel dağılımı da farklılık göstermektedir. Düz kas hücreleri, hepatositler, makrofajlar/monositleri de içine alan insan hücrelerinin geniş bir kısmında iNOS bulunur .

Tablo 6. cNOS ve iNOS'un Hücresel Dağılımı

HÜCRE	cNOS	iNOS
Trombositler	+	
Lenfositler		+
Lökositler	+	+
Makrofajlar		+
Endotel	+	+
Damar düz kas hücreleri		+
Endo-myokardium		+
Hepatositler		+
Kupfer hücreleri	+	
Pankreas β hücreleri	+	
Böbrek makula densa hücreleri	+	
Pulmoner epitelyum hücreler		+
Nöronlar	+	
Glial hücreler	+	
Nöroadrenerjik/Kolinerjik nöronlar		
Gastrointestinal	+	
Pulmoner	+	
Pankreas	+	

iNOS yapımı ile sonuçlanan hücre içi basamaklar tam olarak bilinmemektedir. Ancak tirozin kinazın ve protein kinaz C (PKC)'nin bu yolda özgül rolleri olduğu gösterilmiştir. TGF- β , IL-3, IL-4 ve IL-10 gibi çeşitli sitokinler ve glukokortikoidler iNOS'un indüklenmesini engelleyebilirler. iNOS bir kere uyarılınca, kaynak hücrenin ömrü boyunca veya NO $\cdot$ için gerekli substratlar bitinceye kadar bol ve sürekli NO $\cdot$ sentezlendiği düşünülmektedir. Ancak NO'nin kendisinin makrofajlarda NO $\cdot$ yapımını negatif feedback yoluyla engelleyebildiği gösterilmiştir ⁹.

2. 3. 1. 6. 1 NO[•] Etkileri

İnflamasyon periyodu esnasında, fagositik hücreler bol miktarda NO[•] ve diğer ROS'ni oluştururlar. NO[•]'nun diğer reaktif oksijen türleri ile etkileşimi; membrana lokalize olmuş γ -tokoferol ve protein tirozin rezidülerini de kapsayan bir çok biyomoleküllerin nitrasyonuna sebep olur.

İnflamasyonun çeşitli modellerinin patofizyolojisinde NO[•]'nun rolü olduğu için NOS inhibitörleri, NOS aktivitesini azaltmalarından dolayı inflamasyonun şiddetini azaltırlar. Sinyal iletimine yol açan, guanilat siklaz-cGMP (3',5' guanozin monofosfat) sistemiyle olan etkileşim, günümüzde NO[•]'nun en iyi bilinen fizyolojik etkisidir. Sentezini takiben diffüze olduğu hücrelerde NO[•], sitozolik guanilat siklaz'ın aktif bölgesinde bulunan hem demirine (Fe⁺⁺) reversibl olarak bağlanır. Aktif guanilat siklaz tarafından intraselüler seviyesi yükselen cGMP, kinazlar aracılığıyla, Ca⁺⁺'un ya hücre dışına çıkarılmasını ya da hücre içinde depolanmasını uyararak, intraselüler Ca⁺⁺ seviyelerini düşürür. NO[•]'nun cGMP bağımlı etkileri denilen bu mekanizma sonucu bazı biyolojik etkileri şu şekilde sıralanabilir ^{33, 93}:

- 1) Vasküler olan ya da olmayan düz kasların gevşemesi
- 2) Platelet adezyonu ve agregasyonunun inhibisyonu
- 3) Santral ve periferel sinir sistemlerinde sinyal iletiminin sürdürülmesi
- 4) Nötrofil kemotaksisinin önlenmesi

Diğer yandan mononükleer hücrelerde NO[•], cGMP den bağımsız bir yol ile G proteinlerini aktive ederek bir sinyal molekülü olarak görev yapar. NO[•]'in hem hücreler arası iletişimde rol alması hem de stotoksik bir ajan olarak görev yapması cNOS ve iNOS tarafından niceliksel olarak farklı yollarla salınması ile ilişkilidir. NO[•]'in etkileri faktörlere de bağlıdır ⁹⁹:

- 1) Üretilen NO[•] miktarına
- 2) O₂^{-•} anyonları veya hem grupları gibi reaktif gruplara bağlanmaya paralel olarak meydana gelen NO[•] inhibisyonunun oranına
- 3) NO[•] etkilerine aracılık eden guanilat siklaz gibi enzimlerin kullanılabilirliğine

Yukarda sayılan etkileri yanında NO[•]'nun, cGMP'den bağımsız biyolojik etkileri de vardır. Bunları da şu şekilde sıralamak mümkündür ³³:

- 1) Siklooksijenaz gibi bazı enzimlerin hem gruplarına bağlanarak aktive olmalarını sağlar.
- 2) NADH, süksinat oksidoredüktaz, akonitaz gibi bazı mitokondriyal demir-sülfür grubu içeren enzimleri inhibe eder.

- 3) NOS ile yapısal benzerlik gösteren sitokrom p450 sistemini inhibe eder. Endotel hücrelerinde gen transkripsiyonunu ve translasyonu doğrudan modüle ederken, nöronlarda gen ekspresyonu üzerine Ca^{++} 'un etkisini artırır.
- 4) Na-K-ATPaz ve Ca^{++} 'a bağımlı K^+ kanallarını aktive eder.
- 5) Bir çok inflamasyon durumunda yüksek düzeyde sentezlenen $\text{NO}^\cdot$; mantar, bakteri, helmint, protozoa gibi mikroorganizmalar ve tümör hücreleri için sitostatik ve sitotoksik etkiye sahiptir.
- 6) p53 (tümör baskılayıcı gen) düzeylerini artırarak, apoptoz aracılı hücre ölümüne yol açar.
- 7) Tıpkı α -tokoferol gibi $\text{LOO}^\cdot$ (lipid peroksi) radikallerini yakalayarak, zincir yayılma reaksiyonlarını ve böylece lipid peroksidasyonunu önleyerek antioksidan özellik gösterir. Her peroksi radikali başına 1 α -tokoferol, buna karşılık 2 $\text{NO}^\cdot$ tüketildiği halde; radikallerle etkileşim hızı açısından, NO 'nun çok daha iyi bir antioksidan olduğu ispatlanmıştır.

NO 'ın biyolojik etkileri hem etki bölgesindeki $\text{NO}^\cdot$ konsantrasyonuna hem de NO 'ın üretildiği spesifik bölgeye bağlıdır. NO 'ın tek başına mı yoksa $\text{O}_2^\cdot$ radikalleriyle etkileşimi sonucunda mı toksik olduğu henüz kesinleşmemiştir. Ancak uzun süre iNOS aracılığı ile salınan NO 'ın toksik olduğu açıktır. Aslında NO yalnızca yayılan mikroorganizmalar için değil aynı zamanda kendisini üreten hücreler ve komşu hücreler için de sitotoksiktir. Bununla birlikte NO 'ın O_2 kaynaklı radikallerle girdiği reaksiyon sonucunda bazen kendisinden daha toksik bileşikler meydana gelebilir. NO , Cu^{++} içeren proteinleri de etkiler. Açığa çıkan Cu^{++} da hücre hasarını artırıcı etki yapmaktadır.

Tablo 7. Nitrik Oksitin Etkileri:

Fizyolojik	Patolojik
Guanilat siklaz aktivasyonu Siklooksijenaz aktivasyonu	Mitokondrial solunum inhibisyonu Akonitaz inhibisyonu
Normal vasküler tonus Platelet agregasyonunun inhibisyonu Gıda alımı ile uyarılan mide dilatasyonu Mukoza sterilitesi	Hipertansiyon Hipoksik pulmoner vazokonstriksiyon İnfanıl hipertrofik pilor stenozu Kartagener sendromu
Platelet adezyonun inhibisyonu	İskemi-reperfüzyon hasarı
Kısa süreli vazodilatasyon	Septik şokta hipotansiyon
Penis ereksiyonu	Priapism
Sinir iletimi	Felçte nörodejenerasyon
Uzun süreli potansiyasyon-hafıza	Alzheimer hastalığı, Huntington koreası
Mukoza korunması	Ülseratif kolit
Makrofaj aracılıklı tümör hücresi öldürülmesi	Kronik inflamasyonda sitotoksiste
Gebelikte maternal immünsüpresyon	
Analjezi	

2. 3. 1. 6. 2 Lökositler ve NO[•]

Nicolini ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada ^{100, 110} lenfositler NO[•] üretmez demiş olmalarına rağmen, Reiling ve arkadaşları ¹¹⁰ hem T hem de B lenfositlerin eNOS salgıladıklarını göstermişlerdir. Lenfositler NO[•]'e cevap olarak, büyük miktarda cGMP üretebilen intakt bir guanilat siklaz sistemine sahiptirler.

Makrofajların cNOS'ları yoktur ancak IF- γ , IL-2 ve TNF α 'ya maruz kaldıklarında iNOS salgırlar. Makrofajlar tarafından NO[•] üretimi, makrofajın mikrobisidal özelliği ile ilişkilidir. Endotel hücrelerinden üretilen NO[•] genellikle inflamasyonun indüklediği hasardan sorumlu iken, inflamatuvar hücrelerin migrasyonu, inflamasyon sahasında NO[•]'in potansiyel kaynağı olabilir. İn vitro olarak nötrofiller endotel hücrelerine benzer oranda 10-100 nM/5dakika/10⁶hücre oranında NO[•] üretirler.

Bu nedenle sirkülasyondaki lökositlerin %50-60'ı olan nötrofiller, dolaşımdaki NO $\cdot$ miktarına büyük ölçüde katkıda bulunurlar. Wheeler ve arkadaşları ¹⁴⁸ üriner enfeksiyonu olan hastaların idrarından izole edilmiş lökositlerde iNOS'un primer kaynağı olarak, nötrofilleri tanımlamışlardır.

2. 3. 1. 6. 2. NO'nin PMN Lökositlerin Serbest Radikal Üretimi Üzerine Etkisi :

Çiftleşmemiş bir elektronu olan NO $\cdot$ bir elektron alabilir bu nedenle ONOO $\cdot$ üretmek için veya O $_2^{\cdot-}$ 'i temizlemek için O $_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girer. NO $\cdot$, O $_2^{\cdot-}$ üretimini NADPH oksidaz'ın membran komponentlerini direkt etkileyerek inhibe eder. İnflamasyonda NO'nin koruyucu etkisi NADPH oksidaz'ın inaktivasyonu ve bunun sonucu O $_2^{\cdot-}$ üretiminin bozulması ile olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Fujii ve arkadaşları ⁴⁶ NADPH oksidazın birleşme aşamasını inhibe ederek onu inaktive ettiğini göstermişlerdir. PMNL'lere eksojen NO $\cdot$ eklenmesi, O $_2^{\cdot-}$ üretimini inhibe ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Rubanyi ve arkadaşları ¹¹⁷ NO'nin O $_2^{\cdot-}$ 'i temizleme etkisinden dolayı NO'nin sitoprotektif etkilerinin olduğunu savunmuşlardır. Oksijen konsantrasyonunu azalmasına katkıda bulunan O $_2^{\cdot-}$ üreten sistem ile NOS aktivitesinin inhibisyonu, Rengasamy ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir ¹¹¹. Iha ve arkadaşları ⁶⁰ respiratuar burst aktivitesini NO'nin etkilediğini ONOO $\cdot$ 'nin etkilemediğini bulmuşlardır.

PMN'ler tarafından oksidan üretimi NO'ye kıyasla çok fazladır ve SOD, O $_2^{\cdot-}$ 'i NO kadar hızlı temizleyemez. Bu nedenle SOD eklenmesi, O $_2^{\cdot-}$ radikalının NO ile reaksiyona girme kabiliyetini etkileyemeyebilir. Hatta SOD, hücreye geçmez ve hücre içi olayları inhibe edemez. Carreras ve arkadaşları ²³ nötrofillerde tirozin kinaz aktivasyonunun, pozitif olarak O $_2^{\cdot-}$, ve H $_2$ O $_2$ üretimini kontrol ettiğini ve aynı zamanda düşük seviyelerde, NO üretimini düzenlediğini yayınlamışlardır. Tersine PKC aktivasyonu O $_2^{\cdot-}$ ve NO'ı pozitif olarak düzenler. Malawista ve arkadaşlar ⁸² NO'nin bakterisidal etkilerinin olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bazı araştırmacılar NO vericilerinin serbest radikal üretimine, düşük konsantrasyonlarda sitümülatör, yüksek konsantrasyonda ise inhibitör şeklinde bifazik etkilerinin olduğunu üstelik düşük konsantrasyonlardaki NO etkilerinin cGMP'den bağımsız olduğunu bulmuşlardır ¹²⁵.

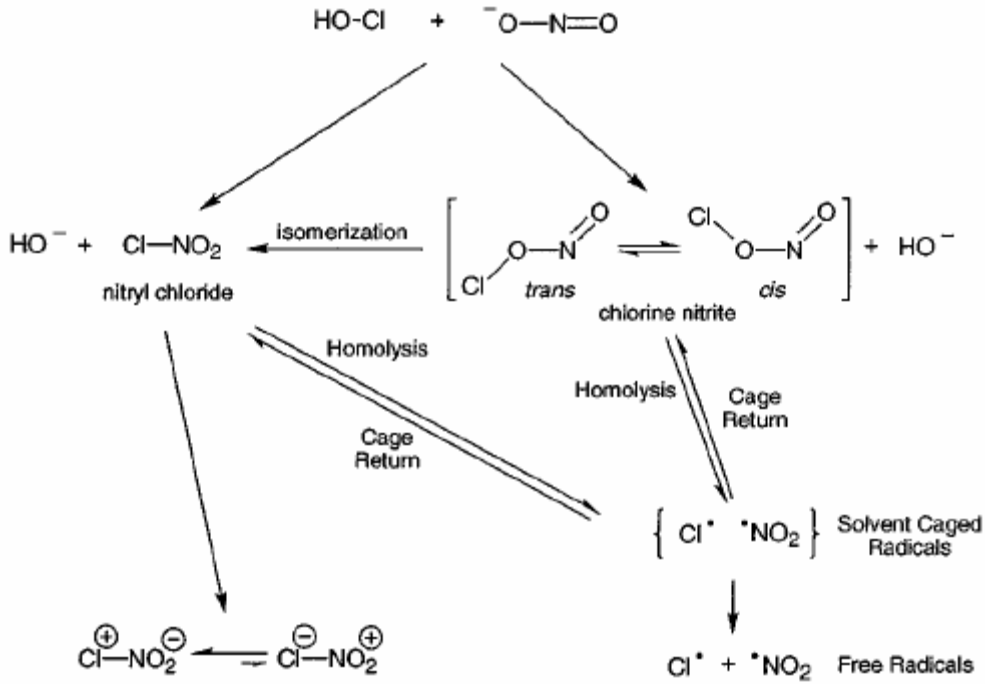
2. 3. 1. 6. 3 Nitrit (NO_2^-) ve Nitrat (NO_3^-)

- $\text{NO}^\cdot$ 'in yarılanma ömrü 6-30 saniye arasındadır. Tam kanda $\text{NO}^\cdot$ hızca NO_2^- ve NO_3^- 'a metabolize olur yani $\text{NO}^\cdot$ 'in son ürünleri NO_2^- ve NO_3^- 'tır. NO_2^- ve NO_3^- in vivo koşullardaki $\text{NO}^\cdot$ üretiminin en önemli göstergeleridir. Diğer kararlı son ürün ise "sitrülin"'dir.
- NO_3^- , $\text{NO}^\cdot$ 'nün tam kanda stabil bioreaksiyon ürünüdür.
- Doku kültürü ortamında hemoglobin yokluğunda NO_2^- ara stabil üründür. Tam kanda NO_2^- hızla NO_3^- 'a dönüşür. Bu nedenle kanda bazal NO_2^- konsantrasyonları NO_3^- 'tan daha düşüktür.
- NO_2^- ve NO_3^- 'in biyolojik aktiviteleri çok azdır. Ancak $\text{NO}^\cdot$ yapımını yansıtan iyi birer göstergelerdir.
- NO_3^- , HOCl'in antimikrobial aktivitesini, MPO aktivitesini ve MPO aracılı LDL oksidasyonunu inhibe eder.
- Tükürükte, midede ve gastrointestinal sistemde koruyucu etkiler sağlayabilecek yüksek seviyelerde NO_2^- vardır ve HOCl aracılı inflamatuvar hasarı inhibe ederler.
- NO_2^- fizyolojik konsantrasyonlarda, HOCl'in yaptığı DNA kırıklarını ve askorbat azalmasını önemli miktarda inhibe eder.
- HOCl'in α_1 -antiproteazı ve elastazın inhibitör kapasitesini inhibe etmesi, NO_2^- tarafından inhibe edilmektedir.
- İnflamasyon sahasında HOCl ve $\text{NO}^\cdot$ çok fazla üretildiğinde NO_2^- antioksidan gibi davranmaktadır ¹²⁵.

2. 3. 1. 6. 4 Nitiril Klorür (NO_2Cl):

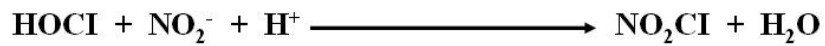
Eiserich ve arkadaşları 1996 yılında yapmış oldukları çalışmada ³⁹ NO_2^- 'in, $\text{NO}^\cdot$ metabolizmasının majör son ürünü olduğunu ve tirozin nitratlanmasını hızla ilerlettiğini ve bunu, inflamatuvar mediatörler olan HOCl veya MPO ile reaksiyonu sonucu NO_2Cl ve NO_2^- 'in oluşumuyla yaptığını açıklamışlardır. 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada da aktive olmuş nötrofillerin NO_2^- 'i NO_2Cl 'e MPO bağımlı yol ile dönüştürdüğünü yayınlamışlardır ⁴⁰.

NO_2^- fizyolojik pH'da HOCl'i daha potent klorlayıcı bir ajan olan NO_2Cl 'e dönüştürmektedir.

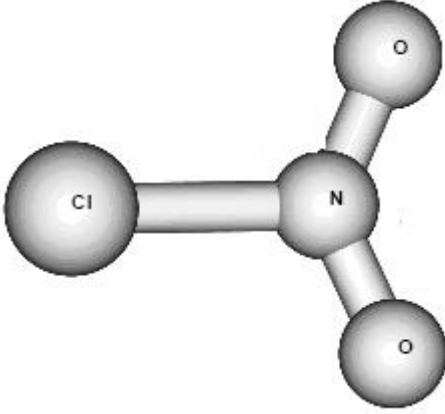


Şekil 13. NO_2^- 'in HOCl ile Reaksiyonu

NO_2Cl 'deki NO_2 grubunun kuvvetli elektron alma özelliği, HOCl'deki OH grubunun elektron verme özelliği ile karşılaştırıldığında, NO_2Cl 'in Cl^+ özelliğini artırır ve NO_2Cl 'e daha potent elektrofilik aromatik klorlama özelliğine kazandırır. Bu dönüşüm tirozin gibi aromatik substratların klorlanmasını azaltı⁴⁰.



NO_2Cl 'in nitratlama, klorlama ve tirozin gibi fenolik çiftleri dimerleştirme kabiliyeti vardır. İzole edilmiş insan LDL'sinin NO_2Cl 'e maruz bırakılması protein modifikasyonunda olduğu kadar β -karoten ve α -tokoferol miktarında da azalmayla sonuçlanır. Ayrıca in vivo ortamda $ONOO^-$ oluşumunun spesifik markeri olarak NO_2 -Tyr'in gerekli olmadığı ve NO_2Cl 'in inflamasyon sahasında daha önceden değeri anlaşılamamış oksidan olduğu da aynı çalışmada vurgulanmıştır. Johnson ve arkadaşları⁶³ ise HOCl'nin oksijen atom transferinden daha çok Cl^+ transferi yaparak NO_2^- ile NO_2Cl üretmek için reaksiyona girdiğini ve daha sonra bu ara ürünün NO_3^- 'yi hidroliz ettiğini belirtmişlerdir.



Şekil 14. NO₂CI'in Geometrik Şekli

Whiteman ve arkadaşları çalışmalarında ¹⁴⁹ hücre sistemlerine NO₂CI'in HOCl'den daha az sitotoksik olduğunu belirlemişlerdir. HOCl'in NO₂⁻ ile uzaklaştırılmasını HOCl aracılı oksidatif hasarı azaltmak için ek bir endojen savunma sistemi olarak açıklamışlardır.

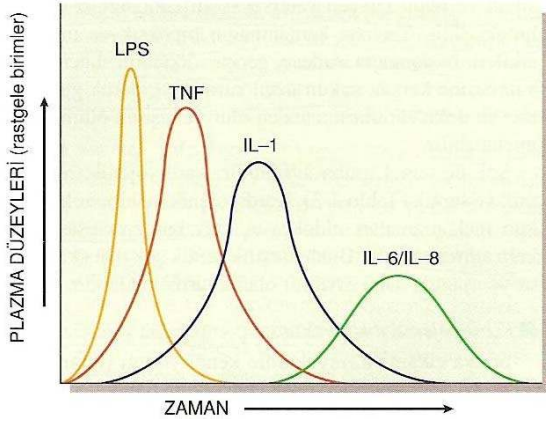
Marcinkiewicz ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada ⁸³ fizyolojik pH'da NO₂⁻'in HOCl ile reaksiyona girdiğini ama TauCI ile reaksiyona girmediğini ve bu reaksiyonun taurin varlığında durduğunu yayınlamışlar. Ayrıca NO₂⁻'in HOCl aracılığı ile olan bakteri öldürülmesini ve MPO aktivitesinin inhibisyonunu, hücresel sitotoksiteyi, TNF α üretimini önlediğini ama TauCI aktivitesini hiç etkilemediğini belirtmişler. HOCl'in NO₂ ile reaksiyon ürününün, HOCl'den daha toksik olduğu hipotezini doğrulamamışlar aksine NO₂⁻'in HOCl'in bakterisidal ve immünregülatör özelliğini azalttığını söylemişler. İn vivo ortamda NO₂⁻'in taurin ile PMN'den salınan HOCl ile reaksiyona girmek için yarıştıklarını ama yine de PMN sitozollerindeki yüksek taurin konsantrasyonundan dolayı TauCI oluşumunun MPO-halid sisteminin majör regülatör mekanizması olacağını yayınlamışlardır ²⁷. NO₂CI'in MPO'nun oksidan etkisini azaltıyor veya artırıyor gibi davranması henüz net olarak anlaşılamamıştır ve bu mekanizma patogenezi tam açıklanamamış hastalıklar, inflamasyon aracılı doku hasarı ve tam açıklanamamış savunma sistemi için çok önemli görülmektedir.

Whiteman ve arkadaşları yapmış oldukları bir başka çalışmada ¹⁵⁰ daha önceki çalışmalarda NO₂⁻'in HOCl'i NO₂CI'e çevirdiği ile ilgili bilgileri eleştirmişlerdir. Bu reaksiyonun artmış HOCl ile ilişkili olan biomoleküllerin oksidasyonunda beklenebileceğini ileri sürmüşlerdir ve şöyle açıklık getirmişlerdir: HOCl, antiproteinazları onu tek sistein rezidülerine okside etme, methionin bölgelerini aktive etme ve tirozini modifiye etmesini içeren pek çok mekanizma ile inaktive eder fakat NO₂⁻ ile HOCl aracılı inaktivasyon artışı gözlenmemiştir. Reaktif ara ürün oluşumu olmadan, HOCl ile, NO₂⁻'nin

NO_3^- 'e direk oksidasyonu da mümkündür ve bulgularımız NO_2^- 'in (NO_3^- değil) HOCl ile ilişkili olan oksidasyonu önlediği ve bir antioksidan gibi davrandığı şeklindedir. Bu nedenle araştırmacılar NO_2^- ile HOCl'in temizlenmesini, HOCl'e karşı endojen bir savunma sistemi olarak açıklamışlar ve in vivo olarak NO_2^- 'in askorbat, antiproteinaz ve DNA'yı korumak için HOCl ile yarıştığını tespit etmişlerdir. NO_2^- 'in HOCl'yi temizlemesinin en kuvvetli muhtemel mekanizmanın 1:1 molar oranında NO_3^- 'a 2 elektron oksidasyonu ile ve bu reaksiyonun insan plazmasında ve diğer vücut sıvılarında gerçekleştiği şeklinde açıklamışlardır.

2. 3. 1. 6. 5 Endotokseminin iNOS Aktivitesine Etkileri:

Endotoksinler, bakterileri hücre duvarındaki lipopolisakkaridlerdir ve hücre duvarı parçalandığında (örneğin inflamatuvar yanıtta) açığa çıkarlar; LPS toksik bir yağ asidi çekirdeği (Lipid A) ve her biri bakteri türüne özgü kompleks bir polisakkarid kılıfından (O antijenleri de içeren) oluşur. LPS, gram $\emptyset$ bakteriler tarafından oluşturulan septik şokun majör nedenlerindendi ¹¹². LPS, sitokinlerin ve NO'nun sentez ve salınımını başlatır. NO ürünlerindeki artışa major katkı sağlayan unsur, LPS tarafından sitümüle edilen iNOS'un ekspresyonudur. Dolaşımdaki LPS nötropeni, ateş, şok, plazma proteinleri modifikasyonu ve pıhtılaşma bozukluklarına neden olurken; dokuda yoğun nötrofil infiltrasyonu ile karakterize olan akut inflamatuvar cevaba yol açar. Septik şokun tüm hücresel ve hemodinamik değişiklikleri sadece LPS injeksiyonu ile aynen oluşturulabilir. Düşük dozlarda LPS, muhtemelen bunların yayılan bakterileri ortadan kaldırma yeteneklerini arttırıcı etkilerle, öncelikle monosit ve makrofajları aktive eder. LPS aynı zamanda lokal bakteri eradikasyonuna katılan komplemanı da doğrudan uyarır. Mononükleer fagositler LPS'ye TNF üreterek yanıt verirler ve bu da IL-1 sentezini uyarır. TNF ve IL-1 endotel hücrelerini etkileyerek daha fazla sitokin yapımını (IL-6, IL-8 gibi) ve adezyon moleküllerinin oluşumunu sağlarlar. Böylece başlangıçtaki LPS serbestleşmesi, kuşkusuz ki lokal akut iltihabi yanıtı arttırmayı ve infeksiyonun ortadan kaldırılmasını amaçlayan, bir sitokin yağmuru ile sonuçlanır ¹¹².



Şekil 15. Sepsiste Sitokinler Dizisi (Robbins, Temel Patoloji, 2000, sf 378)

LPS'ye cevap olarak karaciğer, akciğer ve böbrekte $O_2^{\cdot -}$ oluşumu uyarılmaktadır. LPS uygulaması dokularda 3-NT seviyesini artırmakta, GSH seviyelerini azaltarak lipid peroksidasyon ürünlerinin artışına sebep olmaktadır. LPS uygulamasını takiben altıncı saatte bu oksidan stresin işaretleri görülmektedir.

Vos ve arkadaşları ¹⁴² 5mg/kg dozda E.coli suşunu ip olarak ratlara uyguladıktan sonra, karaciğerde 6 saat sonra iNOS aktivitesinin arttığını hem poliklonal antikor hem de spektrofotometrik yöntemle NO_2^- ve NO_3^- ölçümüyle göstermişlerdir. Güçlü bir iNOS inhibitörü olan L-NAME (N-nitro-L-arjinin metil ester) kullanılmasıyla aktivitenin azaldığını bildirmişlerdir. Ancak, araştırmacılar inhibitör kullandıktan sonra $NO^{\cdot}$ üretiminin azaldığını ve açığa çıkan $NO^{\cdot}$ dışındaki diğer serbest oksijen radikallerinin karaciğer harabiyetine neden olduğunu iddia etmektedirler.

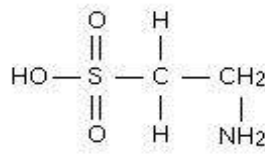
Yapılan çalışmalar endotoksemi durumunda plazma NO_2^- ve NO_3^- düzeylerinin önemli derecede arttığını göstermiştir. Endotoksomi sırasında ortaya çıkan hipotansiyon, $NO^{\cdot}$ sentez inhibitörleri ile engellenebilir. $NO^{\cdot}$ sentez inhibitörleri ile tedavi edilen hayvanlarda NO_2^- ve NO_3^- düzeyleri daha düşük bulunmuştur. İn vivo olarak $NO^{\cdot}$ sentezinin inhibisyonu, endotoksin uygulamasından birkaç saat sonra uygulansa bile hipotansiyonu, vasküler kaçağı ve hiporeaktiviteyi engellemektedir ⁶⁷.

Bakteriyal enfeksiyonlarda iNOS indüklenmektedir. Bir çalışmada endotoksemi sırasında sitokinlerin hem iNOS aktivitesi hem de akut faz reaktanların sentezini artırdığı ve iNOS aktivitesinin akut faz reaktanları tarafından paralel bir şekilde artırılarak regüle edildiğini bildirmişlerdir ⁴⁸.

2. 4. TAURİN

2. 4. 1 Genel Özellikleri:

- Taurin = 2-aminoetan sulfonik asit
- Taurin ilk defa Jacobsen ve Smith tarafından 1968 yılında tanımlanmıştır. İlk kez öküz safrasından elde edilmiştir ²⁵.
- Diğer amino asitlerden farklı olarak (-COOH) grubu yerine (-SO₃H) içerir.

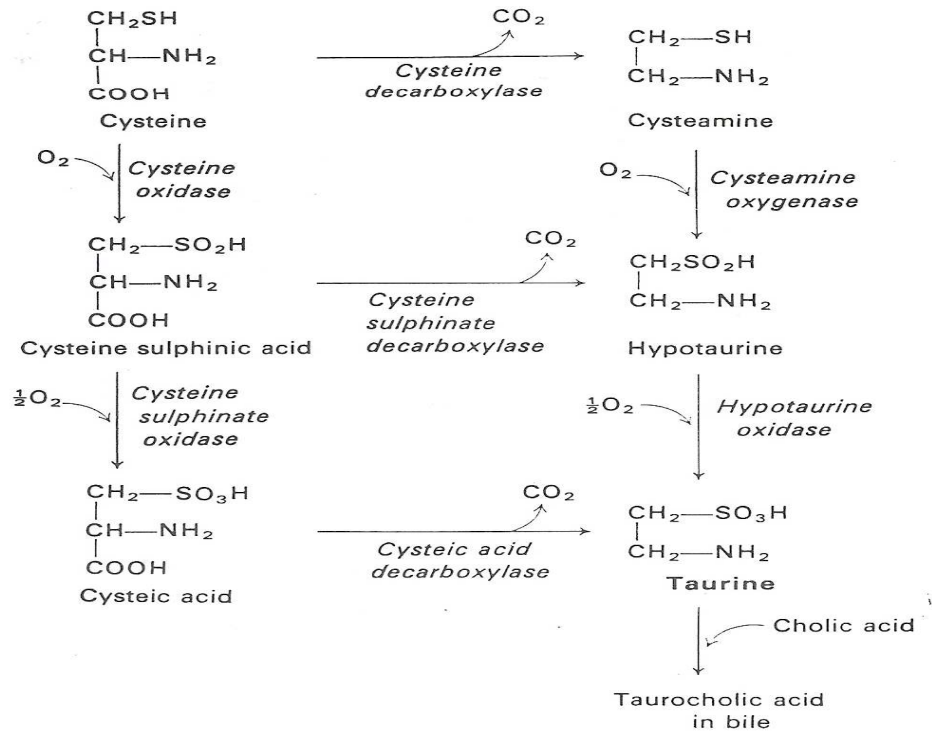


Şekil 16. Taurin

- Metionin ve sisteinden derive edilir,
- Molekül ağırlığı 125 daltondur.
- Non-esansiyel bir β amino asittir.
- Renksizdir ve suda eriyebilme özelliğine sahiptir.
- Taurinin biyolojik membranlarda permeabilitesinin olmaması, bu membranlardan geçmek için yüksek konsantrasyon gradiyenti sağlanması zorunluluğunu getirir
- Taurin, betain ve miyoinositol gibi diğer organik osmolitler ile birlikte çeşitli hücrelerin volümlerini düzenlenmesinde kullanılırlar ¹¹⁴.
- Taurinin hücreye transportu Na⁺ iyonu ile birlikte olup her taurin molekülü transport edildiğinde 1-3 Na⁺ hücre içine taşınır ve bu Na⁺, Na⁺-K⁺ ATPaz ile geri pompalanır ⁵⁹.
- İnsanlar için tek üriner aminoasittir çünkü sulfonik amino asitlerin % 99'u geri emilirken, taurinin % 90-95'i geri emilmemektedir.
- Anne sütünü de içine alan birkaç vücut sıvısında taurin önemli miktarlarda bulunmaktadır. Tersine bazı hazır besinlerde, inek sütünde çok az ya da hiç yoktur. Organizmadaki taurin havuzu diyetle alınan kükürtlü amino asitlerin endojen metabolizması ile belirlenir ²⁵.

2. 4. 2 Taurin Sentezi ve Transportu

Taurin esas olarak beyin ve karaciğerde sentez edilir ve sistein ve metionin metabolizmasının bir bölümünde gerçekleşir; bu yol sistein sülfinat yoludur ²⁵. Sistein sülfinat yolu; sisteinin, sistein dioksijenazla (CDO) sistein sülfinata dönüşmesi ve sistein sülfinatın, sistein dekarboksilazla (CSD) dekarboksilasyonu sonucu taurin oluşumunu içerir. Bu biyosentetik yolda oluşan intraselüler taurin konsantrasyonu CDO ve CSD'nin ekspresyon düzeyi ve regülasyonuna bağlıdır. Ayrıca sistein ve metiyoninin de kullanılabilirliği ile de ilişkilidir ¹³³.



Şekil 17. Taurin Sentezi

CDO (sistein dioksijenaz): CDO-cDNA; rat ve insan karaciğerinden klonlanmıştır ve yapısal organizasyonları belirlenmiştir. 200 aminoasitten oluştuğu, 23kDa ağırlığında bir protein olduğu ayrıca molekül başına bir tane Fe^{++} iyonu bağlandığı gösterilmiştir. Fare CDO'su ve rat CDO'su hemen hemen aynıken bunların insan CDO'suna benzerlikleri % 92 olarak bulunmuştur ¹³³.

CSD (sistein sülfinat dekarboksilaz): CSD-cDNA; rat, insan ve fare karaciğerinden klonlanmıştır. Çalışmalar sonucunda CSD'nin 493 amino asitten oluştuğu ve 55,2 kDa ağırlığında bir

protein olduğu belirlenmiş. Rat ve fare CSD'si arasında % 98'lik bir homoloji varken, insan CSD'si ile kemirgen CSD arasında % 90'lık bir homoloji saptanmıştır.

Yapılan çalışmalar CDO ve CSD aktivitesinin, yüksek düzeyde protein, metiyonin ve sistein alımında kendini modifiye ettiği göstermiştir. Bu koşullarda CDO aktivitesinin arttığı CSD aktivitesinin ise azaldığı gözlemlenmiştir. Proteince zengin diyetle beslenen ratlarda CDO aktivitesi ve proteini yüksek bulunmuş, CDO-mRNA'sında ise böyle bir artışa rastlanmamış. CSD aktivitesinde, proteininde ve CSD-mRNA'sında ise azalmalar görülmüştür. Benzer olarak sülfür içeren aminoasitler (metiyonin ve sistein) içeren bir diyetle beslenen ratlarda CDO aktivitesinde 100 kat, CDO proteininde 40 kat artış gözlemlenmiş, CDO-mRNA'sında ise anlamlı olmayan bir artış saptanmıştır. CSD aktivitesinde, proteininde ve CSD-mRNA'sında azalma görülmüştür. Sistein dekarboksilaz, insan ve primatlarda çok az miktarda bulunmaktadır ¹³³.

Taurinin taşınımı, taurin taransporter (TauT)'in ekspresyon düzeyi ve regülasyonu ile ilişkilidir. TauT'ları rat ve fare beyininden ve insan plasentasından klonlanmıştır. TauT'ları Na^+ ve Cl^- iyonlarına, enerji ve ısıya bağımlıdır ve molekül ağırlığı yaklaşık olarak 70 kDa'dır. Ayrıca bu taşıyıcılar ekstrasellüler bölgedeki taurin konsantrasyonundan da etkilenirler. Taurin ve Tau-Cl'in birbirinden farklı taşıma sistemleri vardır. Bunlar inflamatuvar hücrelere ve lezyonlara aktif olarak transport edilirler. Uyarılmamış durumdaki makrofajlara göre, LPS ile stimüle edilmiş makrofajlarda daha fazla taurin ve Tau-Cl transport edilir.

Romio ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada ¹¹⁴ taurin alımının, hipertonic durumlarda azaldığını; LPS veya makrofajları sitümlü eden diğer uyarılar ile arttığını; LPS+hipertonic durumda ise taurin alımında artış olup sadece hipertonic durumdan daha fazla taurin alımı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca LPS'nin taurin taşınımına etkisinin ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz sistemine bağlı olduğunu, izotonik durumlarda makrofajların uyarılmasının taurin alımını azalttığını bulmuşlardır. $\text{TNF}\alpha$ veya iNOS inhibitörlerinin, LPS'ye bağlı taurin alımını değiştirmediklerini de göstermişlerdir.

Kang ve arkadaşlar ⁶⁵ da kan-beyin bariyerinde taurin taşınmasını incelemişler ve 20 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ 'nın 1,7 kat, hipertonic durumun 3,2 kat taurin alımında artışa yol açarken; LPS'nin ise taurin alımına etki etmediğini yayınlamışlardır. Ayrıca aşırı taurin uygulamasının (50 mM) taurin alımını azalttığını da belirtmişlerdir.

2. 4. 3 Taurinin Etki Mekanizmaları ve Dokulardaki Konsantrasyonu:

Taurinin etkilerini hangi mekanizmayla yaptığı tam olarak anlaşılamamış olsa da bu fonksiyonlarını;

- Tropik etki
- İntraselüler Ca^{++} düzeyinin ve iyon kanal aktivitesinin modülasyonu
- Membran ve protein stabilizasyonu

ile gösterdiği düşünülmektedir.

Ortalama 70 kg'lık bir insanda 70gr taurin bulunur ²⁵. Ortalama günlük alınması gereken taurin miktarı 58 mg düzeyindedir ve bunun çoğunluğu deniz ürünleri ve etten alınabilir. Yarılanma ömrü visseral organlarda serbest diyetle $8,7 \pm 2$ gün, taurinden zengin diyetle 4.8 ± 2 gün, rat için 12-13 gündür ¹⁵⁵.

Taurin eksikliği immun sistemde anormalliklere yol açtığı saptanmıştır. Özellikle retinal dejenerasyon gibi, kardiyovasküler ve üreme sisteminde çeşitli patolojilere yol açmaktadır. Ayrıca taurin eksikliğinin mononükleer lökosit sayısında bir artışa sebep olduğu da bilinmektedir ¹³³.

Özellikle PMN lökositlerde olmak üzere insan lökositlerinde yüksek konsantrasyonda bulunduğu tespit edilmiştir (22-26 mM). Memelilerin taurin sentez yapma yeteneği sınırlıdır. Bu yüzden diyetle alınan taurin vücuttaki taurin havuzları için çok önemlidir. Taurin; trombositlerde, sekretuar yapılarda, özellikle uyarılabilen dokularda ve sıklıkla oksidatif hasara maruz kalan dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Ancak plazma düşük miktarda taurin içermektedir (50-100µM) ²⁵.

Tablo 8. Çeşitli dokulardaki taurin konsantrasyonu (mM/kg doku)

KALP	30	MİDE	9
Akciğer	13	Timus	11
Karaciğer	2	Serebellum	3
Böbrek	11	Pons	4
Dalak	16	Orta beyin	3
İncebarsak	15	Frontal korteks	6
Kalınbarsak	12	Spinal kord	4
Kas	15		

Taurinin turnover hızı dokuya, hücresel alıma bağlıdır, orda kalma süresi ise hücre tipi veya organlara göre değişir. Böbrek, karaciğer, dalak ve kemik iliği tarafından kalp ve kasa göre daha hızlı alınır. Akciğer, karaciğer, dalak, mide, barsak ve böbrekte uzun süre kalır.

2. 4. 4 Taurin Fonksiyonları:

Taurin ile ilgili en eski bilinen şeylerden biri karaciğerde safra asitleri ile konjugasyon yaparak yağ absorpsiyonu için gerekli safra tuzları oluşturmaktır. Ayrıca vazodilatör etkisi olduğu da gösterilmiştir.

Bunlardan başka taurinin birçok biyolojik ve fizyolojik fonksiyonlara etki ettiği gözlemlenmiştir.

Bunlardan bazıları:

- Hücre membran stabilizasyonu: Amin grubu ile zararlı ajanlarla reaksiyona girip, bunları detoksifiye ederek ve hücresel harabiyet ve ölüme neden olan iyon ve su geçirgenliğinin direkt etkilerini önleyerek gerçekleştirir.
- Antioksidan etki
- Detoksifikasyon
- Osmoregulasyon
- Nöromodülasyon
- Beyin ve retinal gelişim

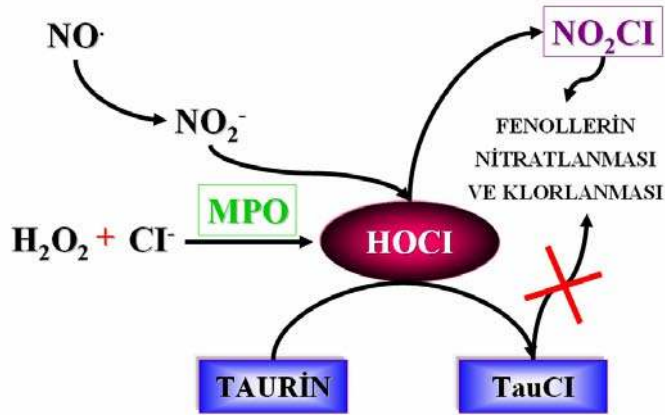
Taurin bu fonksiyonları yerine getirebilmesi intraselüler taurin konsantrasyonuna bağlıdır. Bu da hücrenin taurin sentez etme kapasitesi ve ekstraselüler bölgeden taurin transportuyla ilişkilidir ²⁵,

155.

2. 4. 5 Taurin ve Taurokloramin'in Antioksidan Özelliği:

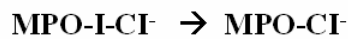
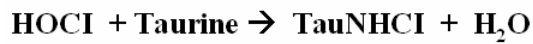
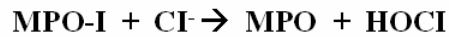
Taurinin en önemli rollerinden biri klorlanmış oksidanlara özellikle HOCl'ye karşı dokuları korumaktır. HOCl özellikle aminlerle (-NH₂) ve sülfür (R-SH) içeren moleküllerle çok hızlı reaksiyona girmektedir. HOCl'i zararlı etkisi membranın -SH veya -NH₂ gruplarına hücum etmesi ile ortaya çıkmakta, sonuçta bu olayı membran denatürasyonu izlemektedir. HOCl, primer aminlerle reaksiyona girerek kloraminleri oluşturur. Bu reaktif aminlerden biri de taurindir ve taurin, HOCl'i ondan daha stabil ve daha az toksik olan taurokloramine (Tau-Cl) çevirir ^{25, 97, 155}.

1 mol HOCl ile 1 mol taurin reaksiyona girerek, taurinin amin grubunun 1 veya 2 Cl^- iyonu kazanmasıyla, N-klorotaurini oluşturur. Bu reaksiyonu MPO katalizler. Tau-CI nötrofillerde, HOCl/OCl $^-$ gibi ara ürünler olmadan, direkt MPO ile de sentezlenebilir. Tau-CI'in yarılanma ömrü 2.5 gündür ^{59, 155}.

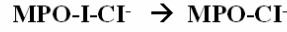
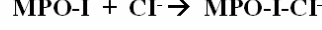


Şekil 18. HOCl ile Reaksiyona Girmek İçin Taurin ve NO_2^- 'in Yarışması

Tau-CI sentezi PMN lökositlerde, bazofillerde ve eizonofillerde olur. Marquez ve arkadaşlar yapmış oldukları çalışmada ⁸⁵ Tau-CI sentezi için büyük ihtimalle varsayılan reaksiyon zincirlerinin şu şekilde olduğunu belirtmişlerdir:



veya



şeklinde de olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca şunları da tespit etmişlerdir: Klorlama reaksiyonunda CI^- , sadece MPO için bir substrat olarak değil aynı zamanda H_2O_2 'i için kompetitif bir inhibitör olarak da davranır. CI^- , MPO'ya pH'a bağımlı olarak bağlanır. pH arttığı zaman CI^- 'un enzime afinitesi azalır. Tersine inaktif compound II ara ürününün oluşması, pH'ın yükselmesi ile artar. Bu nedenle H_2O_2 de klorlama reaksiyonunu inhibe edebilir. Klorlama reaksiyonu için en uygun pH=4.7'dir. Bunun nedenleri:

- pH>5.6 ise enzimin inaktivasyon oranı artar ve H_2O_2 inhibisyonu klorlama aktivitesinde azalmaya neden olduğunda önemli hale gelir.
- pH<4 ise CI^- ile enzimin inhibitör bağlanması daha güçlü hale gelir
- Fizyolojik pH'da fagozom içi pH 4.5-5.0'e düşer.

Ayrıca stimüle edilmiş lökositler in vitro olarak inkübe edildiğinde, kloraminler, ekstraselüler alanda akümüle olmuş olarak bulunur ⁸⁵.

Bu ekstraselüler Tau-CI akümüülasyonunu Weiss ve arkadaşları şöyle açıklamışlardır ¹⁴⁷: Tau-CI vakuoler bir alanda içinde sentezlenebilir ve daha sonra hücre dışına yayılabilir. Yine de uyarılmış nötrofiller hücre dışına H_2O_2 ve MPO salgıladıkları için Tau-CI ekstraselüler olarak da üretilebilir. Tau-CI hidrofiliktir ve bu nedenle membranlardan geçemez ama çeşitli hücrelere aktif olarak taşınabilir.

İlk kez Cunningham ve arkadaşları ³¹ memelilerde "sülfoasetaldehit"i taurin döngüsünün muhtemel yolağı olabileceğini belirtmişlerdir. 37°C'de ve pH=7.4'te Tau-CI'den spontan olarak sülfoasetaldehit oluşur. Aktive olmamış ve olmuş hücrelerde görünüşe göre sabit bir sülfoasetaldehit seviyesinin olması hücrelerde bazal seviyede taurin metabolizmasının olduğunu gösterir.

RAW 264.7 hücreleri, makrofaj benzeri hücreler olup, LPS ve IFN- γ ile aktive edildiğinde, NO $\cdot$ ve TNF α salınımı stimüle edebilir. Yapılan çalışmalarda Tau-CI'nin doza bağlı olarak RAW 264.7 hücreleri tarafından aktive edilen NO ve TNF α üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir. RAW 264.7 hücrelerine LPS, IFN- γ taurin ve Tau-CI eklendiğinde 24 saatlik bir bekleme sonrasında Tau-CI'nin NO $\cdot$ üretimini inhibe ettiği fakat taurinin ise böyle bir etki göstermediği saptanmıştır. NO $\cdot$ gibi TNF α düzeylerinde de Tau-CI verildiğinde azalmalar olduğu taurin verildiğinde ise hiçbir etkiye rastlanmadığı belirtilmiştir. Bu olayın mekanizmasını tam anlamak için iNOS proteini, TNF α ve iNOS mRNA'ları incelendiğinde LPS ve IFN- γ ile aktive edilmiş hücrede 0,8 mM Tau-CI uygulandığında iNOS proteinlerinin bulunmadığı, 0,8 mM taurin verildiğinde ise iNOS proteinlerinin ekspresyonunun etkilenmediği görülmüştür. 0,8 mM Tau-CI uygulandığında iNOS mRNA'sını inhibe ettiği, iNOS geninin transkripsiyonunu önlediği, TNF α mRNA'sının translasyonunu zayıflattığı gösterilmiştir ^{74, 105, 123}.

Marcinkiewicz ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada ⁸³ Tau-CI'in fagositik hücreler ile NO, TNF α , PGE2 gibi proinflatuar mediatörlerin üretimini azalttığını bunu İNOS'un traskripsiyonunu, TNF α mRNA'sının translasyonunu ve siklooksijenazın indüklenabilir formu olan COX-2'nin protein ekspresyonunun posttranskripsiyonel regülasyonunu etkileyerek yaptığını açıklamışlardır.

Yapılan çalışmalarda egzojen taurin eklenmesinin, kloramin oluşumunu güçlü bir şekilde artırdığı ayrıca Tau-CI makrofajlarda NO $\cdot$, TNF α , IL-1,6,8 ve PG-E₂ üretimini, PMN lökositlerde O₂ $\cdot^-$ oluşumunu inhibe ederek inflamasyonda önemli rol oynadığı belirtilmiştir ^{27, 123}.

Tau-CI bu etkilerini doza bağlı olarak yapmaktadır. Tau-CI, 0,25 mM konsantrasyonunda daha selektif etkileri vardır mesela IL-6, 12, 10, PGE₂ ve NO $\cdot$ üretimini inhibe ederken, TNF α ve ROS'lerine etki etmez.

Barua ve arkadaşları ¹³ Tau-CI'in NO $\cdot$ ve TNF- α gibi proinflatuar mediatörlerin üretimini bunların aktivasyonundan ~2 saat sonrasına kadar en güçlü bir şekilde inhibe ettiğini, 14-16 saat sonra da neredeyse etkisiz olduğunu tespit etmişlerdir.

Chorazy ve arkadaşları ise yapmış oldukları çalışmada ²⁷ şunları belirtmişlerdir: LPS ile hücreler stimile edildiğinde en fazla IL-6'da, orta derecede IL-1 β 'da ve en az da TNF α sentezinde artma olur. Taurinin LPS'in tetiklediği TNF α , IL-1 β ve IL-6 üretimine önemli bir etkisi yoktur. Tersine LPS'in indüklediği sitokin cevabını Tau-CI doza bağlı olarak inhibe eder. İlginç olarak TNF α üzerine ise çift etkisi vardır. 100-200 μ M gibi düşük dozlarda TNF α 'yı artırırken, 460-480 μ M gibi daha yüksek

konsantrasyonda ise $\text{TNF}\alpha$ sekresyonunu azaltır. Tau-CI, kendi üretimini otokrin feedback inhibisyon ile sınırlamaktadır. 0,5 mM Tau-CI, HOCl üretimin azaltarak kendi oluşumunu da azaltır ²⁷.

Tau-CI'in mikrobisidal aktivitesinden ve düşük sitotoksitesi sebebi ile, tıpta antimikrobial ajan olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre bazı bakterilere (S. Aureus, E.coli, Proteus mirabilis, P. aureginosa), Candida gibi bazı mantarlara, bazı virüslere (HSV Tip1, 2 gibi) ve Schistozoma monsoi gibi bazı şeritlere karşı mikrobisidal aktivitesi vardır ⁹⁶.

Kwasny-Krochin B ve arkadaşları ⁷⁴ kollajenin indüklediği artrit gelişmesine Tau-CI tedavisinin etkisini incelemişler ve primer immünizasyondan sonra erken Tau-CI tedavisinin ile artrit başlamasını geciktirdiğini ama artritin şiddetine etkisinin olmadığını yayınlamışlardır.

Taurin tedavisinin çeşitli hayvanlarda oluşturulmuş inflamasyon modellerinde faydalı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Taurin serbest oksijen radikallerinin yaptığı doku harabiyetini önleyerek etkili olduğu düşünülmektedir. Yine de bazı hayvan modellerinde taurin tedavisi proinflamatuvar sitokinlerin ($\text{TNF}\alpha$, IL1, 6, $\text{TGF}\beta$) sentezini inflamasyonlu dokularda azalttığı fakat serum sitokinleri ($\text{TNF}\alpha$, IL1 β) üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Önemli olarak, taurin uygulanmış hayvanlarda, lokal proinflamatuvar sitokinlerin sentezinin inhibisyonu, NF κ B aktivasyonu ile birliktedir. Bununla birlikte, rat modellerinde akciğerleri oksidan hasara karşı NO_2^- üretimini ve $\text{TNF}\alpha$ salınımını inhibe eden Tau-CI oluşturarak koruduğu varsayılır. Bu nedenle, en azından taurinin bazı antiinflamatuvar etkilerini Tau-CI aracılığı ile ve proinflamatuvar sitokinlerin sentezini düzenlemesiyle yapması çok muhtemeldir ⁵⁰.

Aynı araştırmacılar LPS'nin tetiklediği proinflamatuvar sitokinlerin ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6) sentezininin PKC'nin aktivasyonu ile olduğunu ve Tau-CI'in de PKC'nin aktivasyonunu ve PKC aracılı hücrel cevabı inhibe ederek etki ettiğini göstermişlerdir ⁷².

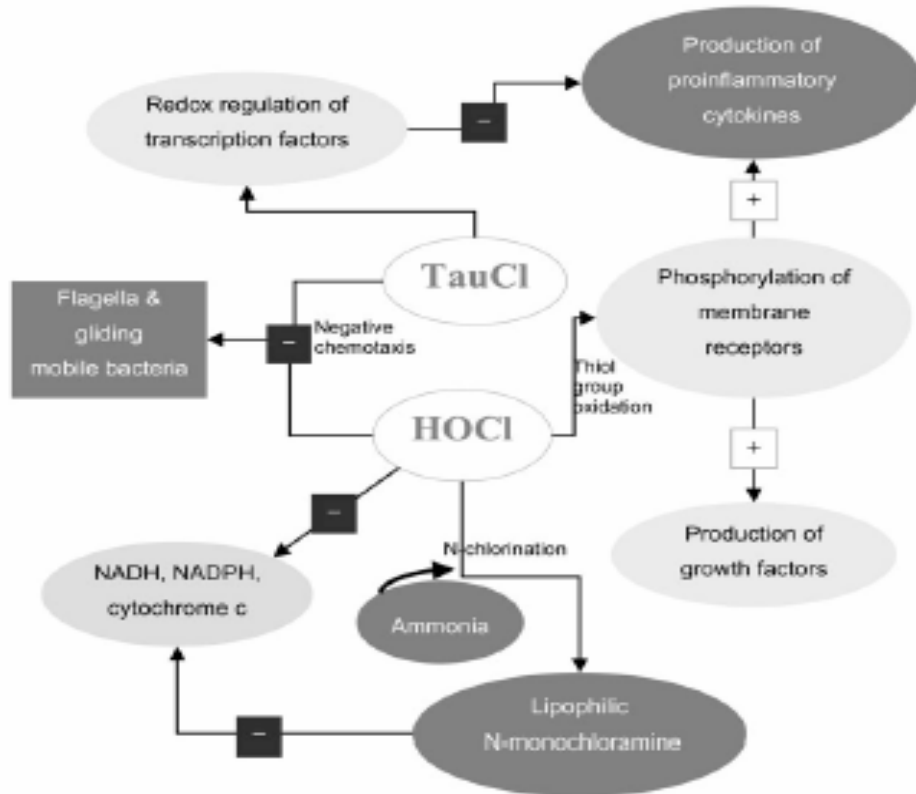
Sonuç olarak özel sitokin sentezinin başlamasıyla sonuçlanan kombinasyonlarının farklı sinyallerin Tau-CI'e sensitivesi farklı olabilir ve bu nedenle efektif sitokin inhibisyonu için farklı Tau-CI konsantrasyonlarının olması şaşırtıcı değildir.

Liu ve arkadaşları ise Tau-CI'in iNOS'u azaltmasını şöyle açıklamışlardır ⁷⁸: iNOS aktivitesi için esansiyel bir kofaktör olan tetrahidrobiopterin (BH4) gerekmektedir. Tau-CI, BH4'in sentezlenmesinde hız kısıtlayıcı enzim olan GTP siklohidrolaz I'in ekspresyonuna azaltır ve böylece iNOS ekspresyonu azalmış olur.

HOCI ve Tau-CI: HOCI ve Tau-CI nötrofillerin respiratuvar burst olayında son ürünleridir. İnflamatuar cevabı düzenlemek için sinerjik olarak hareket ederler. İnflamatuar fazın çok önemli evresini, hücre döngüsünü düzenleyen, çok ilginç ve tamamlayıcı aktiviteleri vardır. Özetle bazıları ⁸¹:

- Klorlamayı ve/veya oksitlemeyi takiben antijen ve patojenik ajanların nötralizasyonu,
- Metalloproteinlerin, IL-5 ve 6'nın direkt nötralizasyonu,
- $TNF\alpha$, IL-2 ve IL-6 gibi inflammatuar mediatörlerin α_2 -makroglobuline bağlanmasının artırılması
- Çeşitli büyüme faktörlerinin α_2 -makroglobuline bağlanmasının azaltılması

Yine de HOCI ile Tau-CI aktiviteleri arasında farklar vardır. Ekstraselüler HOCI membran reseptörlerini ve aktif kinaz kaskatını stimüle eder; ekstraselüler matriksin bileşenlerinin ve veya büyüme faktörlerini, ve proinflammatuar sitokinlerin dahil olduğu bazı sitokinlerin üretimini sağlar. Oysaki Tau-CI proinflammatuar sitokinlerin ve ROS'lerinin üretimini inhibe eder. Tau-CI ve HOCI'in intraselüler aktiviteleri aşağıdaki şekilde olduğu gibi özetlenebilir ⁸¹:



Şekil 17. HOCI ve Tau-CI'in intraselüler aktiviteleri

Taurin ve öncüllerinin özellikle oksidatif hasara maruz kalan dokularda bol bulunduğu dikkat çekicidir.

Taurin ve hipotaurin dişilerde folliküllerde ve uterusu, erkek üreme sisteminde ise spermatozoa, özellikle semen sıvısı ve prostatta yüksek konsantrasyonlarda bulunur ^{71, 141}. Memeli spermi glutatyon redüktaz ve katalazdan yoksundur. Oysa spermde taurin ve hipotaurin oldukça yüksek düzeydedir. Bilindiği gibi $O_2^{\cdot-}$ sperm için oldukça toksiktir, lipid peroksidasyonuna ve motilite azalmasına yol açar. Böylece taurin ve hipotaurin aracılığıyla sperm motilitesi korunmuş olmaktadır. Hatta taurin ve hipotaurin farelerde "sperm motilize edici faktör" olarak kabul edilmektedir. Diğer taraftan taurin insan akrozomlarında bulunan majör amino asitlerden biridir ⁵⁹.

Taurinin, hipoksi ve reoksijenasyonda serbest radikallere karşı kalp kasını ve beyni koruduğu ileri sürülmektedir ⁴. Bu etki taurinin intrasellüler rollerinden biri olarak, membran lipid peroksidasyonunu engellemesi ile ortaya çıkar ⁵⁸.

Hipoksi ve reperfüzyonda beyinde, sistein gibi tiyol içeren amino asitlerin artışı sonucu taurinin de arttığı gösterilmektedir. Reperfüzyondan sonra bu maddelerin oksijenden türeyen serbest radikallerle okside olarak taurinin oluşturduğu tespit edilmiştir. Taurin, postiskemik dokuda sadece serbest radikal düzeylerini azaltmakla kalmayıp; aynı zamanda hücreye Ca^{++} girişini engelleyerek, lipid peroksidasyon oluşumunu ve membran fonksiyonlarının bozulmasını da engellemektedir ¹²⁴.

Ayrıca taurinin yanısıra onun metabolik öncüleri olan sisteik asit, sistein sülfonik asit ve sisteaminin de in vivo antioksidan olarak rol aldığı ve oksijen radikal türlerini inaktive ettiği gösterilmiştir ⁸.

Nakamori K ve arkadaşları N-Klorotaurinin ekstrasellüler ortamdan anyon transport sistemi ile eritrosit içine transport edildiğini göstermişlerdir. N-Klorotaurin eritrosit içinde glutatyon ile indirgenir ⁹⁷.

Sonuç olarak; taurinin biyolojik sistemler üzerindeki antioksidan ve membran stabilizatör etkisi aşağıdaki gibi özetlenebilir ^{12, 59, 97}:

- 1) Taurin HOCl ile reaksiyona girerek HOCl'i temizler. Böylece membran denatürasyonunu önler.
- 2) Membran stabilize edici etkisi ile membranın permeabilite ve transport değişikliklerine karşı korur.

- 3) Direkt antioksidan etkisi ile, membran fosfolipitleri ile etkileşerek, lipit peroksidasyonunu engeller. Lipit peroksidasyonunun son ürünü ve göstergesi olan malondialdehit düzeyini azaltır.
- 4) Taurinin aynı zamanda sulfonik asit grubuyla, serbest metal iyonları ve oksidan metallerle bağlanarak indirekt bir antioksidan etki de yapabildiği bildirilmektedir.

2. 4. 6 Taurinin Ca^{++} Homeostazisi Üzerine Etkisi

Taurin, Ca^{++} hemoosatazisini düzenleyici etkisini, Ca^{++} 'a hassas olan sistemlere Ca^{++} sağlanmasındaki değişikliklerle veya Ca^{++} 'a olan hassasiyeti değiştirerek gösterir. Sinyal şiddeti değiştikçe sitozolik Ca^{++} miktarında da değişiklikler oluşur. Cevabın şiddetinin değişikliği ise Ca^{++} bağlayan troponin, kalmodulin, Ca^{++} bağlayan miyozin ATPaz ve diğer Ca^{++} bağımlı ATPaz'ların afinitesinin değişmesine neden olur. Taurin, sarkoplazmik retikulum, mitokondri ve diğer organellerin Ca^{++} depolama kapasitesini artırır ve Ca^{++} 'a bağımlı ATPaz pompalarının pompalama hızını stimule ederek Ca^{++} 'un veziküllere depolanma kapasitesini ve pompanın turnover hızını artırır ⁵⁹.

Taurinin iskelet kasında Ca^{++} akışının regülasyonunda da rol oynadığı bildirilmiştir. Bu membran stabilize edici etkisi, sarkoplazmik retikulumu denervasyona bağlı hasardan korur ve sarkoplazmik retikulumun Ca^{++} -ATPaz aktivitesini hızlandırarak, Ca^{++} transport kaybı hızını azaltır ^{25, 84}.

2. 4. 7 Taurin ve Kardiovasküler Etkileri:

Kalpte bulunan toplam aminoasitlerin % 50'sinden fazlası taurindir. Kalp dokusu üzerine (+) inotropik etkisi vardır ve bazı çalışmalar kan basıncını azalttığını göstermiştir. Taurinin kalp üzerine etkisinin; Ca^{++} iyon düzeyinin hem eksik hem de fazla olduğu durumlarda Ca^{++} 'un ters etkilerinden kalbi koruması olduğu düşünülmektedir. Ca^{++} akışının hücre içine yoğunlaşması hücre ölümüne neden olmaktadır. Taurin direkt veya indirekt olarak intraselüler Ca^{++} düzeyini voltaja bağımlı kalsiyum kanallarının aktivasyonunu değiştirerek veya Na^{+} kanalları ile düzenlediği düşünülmektedir ²⁵.

Bazı çalışmalarda taurinin nötrofil-indüklü reperfüzyon hasarı ve oksidatif strese karşı kalbi koruduğu gösterilmiştir. Nötrofillerin respirator burst aktivitesinden dolayı ortamda bulunan taurinin indirgendiği ve bunun da taurinin koruyucu etkisi olduğundan söz edilmektedir ¹¹⁶.

2. 4. 8 Taurinin Gastrointestinal Sistem Üzerine Etkileri:

Kistik fibroz hastalarının çoğu besin malabsorbsiyonuna maruz kalmaktadır. Bu malabsorbsiyon emilimin en çok olduğu ileumda meydana gelmektedir. Safra asitlerinin yaklaşık % 80'nin terminal ileumdan emilir ve bu yüzden safra asitleri de malabsorpsiyona maruz kalmış olur. Taurin tedavisi ile kistik fibroz olayları ile ilişkili steatore'de ciddi azalmalar gözlemlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada kistik fibroza bağlı steatoreli hastalara günde 30mg/kg olacak şekilde taurin verilmiş. Dört ay süren çalışmada kistik fibrözlü hastaların %92'sinde fekal yağ asidi ve sterol atımının azaldığı görülmüştür. Yüksek derecede steatore olan kistik fibroz hastalarında taurin tedavisiyle birlikte safra asit emiliminin arttığı belirtilmiştir ¹¹⁶.

2. 4. 9. Taurinin Lipit Metabolizması Üzerine Etkileri:

Taurinin önemli fizyolojik rollerinden biri fosfolipit metabolizması üzerindeki modülatör etkisidir. Sebring ve Huxtable taurinin primer etkileşiminin nötral fosfolipitlerle olduğunu bildirmişlerdir ⁵⁹, ¹²³. Taurinin, PKC aktivasyonu için gerekli diaçilgliserol miktarını etkileyerek; bu reaksiyonun diğer ürünü olan IP₃ ve intrasellüler Ca⁺⁺ salınımını kontrol edebildiği de bildirilmektedir ¹²¹.

Taurinin etkilediği diğer bir fosfolipit metabolizması ise fosfatidiletanolaminin metilasyon reaksiyonudur. Taurin kimyasal yapısı itibarıyla, fosfatidiletanolaminin yüklü baş gruplarına benzer ve bundan dolayı seçilen katabolik bölgeye bağlanabilir. Bu da metilasyon reaksiyonunu kompetitif inhibisyonla sonuçlandırır. Yani taurin sarkolemmal fosfolipit metiltransferaz aktivitesini inhibe eder. Fosfatidiletanolamini → fosfotidilkoline çeviren bu enzim Na⁺-Ca⁺⁺ alış verişi sisteminden etkilenir. Böylece taurin, bu metilasyon reaksiyonunu inhibe ederek Na⁺-Ca⁺⁺ alış verişi sisteminin aktivitesini korur ⁵². Fosfotidiletanolamin, membrana Ca⁺⁺ bağlanmasında etkili fosfolipitlerden biridir. Taurinin azalması halinde bu fosfolipitin de azalması ile nöronal membranda destabilizasyon meydana gelebileceği ileri sürülmektedir ⁷⁹.

2. 4. 10 Taurin ve Kolesterol Metabolizması:

Safra asitlerinin fizyolojik pH'da çözünür olabilmeleri için glisin veya taurinle konjuge olmaları gerekir. Bu aminoasit konjugatları safra tuzları olarak adlandırılır. Yapılan çalışmalarda taurin konjugasyonu ile kolesterol çözünürlüğünde önemli artış meydana geldiği gösterilmiştir ve bu testlerin sonucunda günde 6 g taurin verilen grupta, plasebo verilen grup karşılaştırıldığında serum total kolesterol ve LDL düzeylerinde azalmalar olduğu saptanmış ¹⁷.

2. 4. 11 Taurin ve Okuler Hastalıklar:

Retina, vücutta en yüksek taurin konsantrasyonuna sahip yerlerden biridir. Retinal rod dış segmentlerinin membranları doymamış yağ asitlerinden zengin ve peroksidatif hasara karşı korumasızdır. Taurinin, retina rod dış segmentlerini aydınlatma yolu ile oluşan oksidanlara karşı koruduğu tespit edilmiştir ⁵⁹.

Kedilerde retinanın normal taurin içeriğinin yarı yarıya azaldığında fotoreseptör hücrelerde değişimler meydana gelmekte ve eğer taurin içeriğindeki bu azalma uzun sürerse kalıcı retinal dejenerasyona sebep olduğu bildirilmiştir. İnsanlarda görülen retina dejenerasyon hastalığı olan retinitis pigmentosa'da, kedilerde taurin eksikliği ile oluşan hasarla benzer özelliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir. Hastalık ilerlemiş ise günlük 1-2 g taurin verilmesi retinitis pigmentosa hastalarında bir düzelmeye yol açmadığı gözlemlenmiştir ¹⁷. Taurinin HOCl ile oluşturulan korneal hasarın iyileştirilmesinde etkili olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler taurinin biyolojik sistemlerde HOCl temizleyicisi olduğunu desteklemektedir.

2. 4. 12 Taurin ve Detoksifikasyon:

Taurin, CCl₄ indüklü toksisiteye karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Ratlarla yapılan bir çalışmada ¹⁷ CCl₄'e maruz kalan ratların hepatik taurin içeriğinin 12-24 saatte düştüğü gözlemlenmiştir. Taurin oral olarak verildiğinde CCl₄'e maruz kalan ratlardaki hepatik taurin miktarındaki azalmanın durduğu saptanmıştır. Taurinin, CCl₄ gibi hepatotoksinlere karşı hepatositleri koruyucu bir rolü olabileceği söylenmiştir.

Taurinin, CCl₄ ile indüklenmiş karaciğer ve karaciğer mikrozomlarındaki malondialdehit yapımını azalttığı, pnömotoksik maddelere bağlı sekonder olarak akciğerde gelişen lipid peroksidasyonunu

azalttığı bildirilmiştir ⁵⁹. Ayrıca taurin, doksorubisin gibi antikanser ilaçların kalpte lipid peroksidasyonunu artırıcı etkilerini önlemektedir ⁵⁴.

2. 4. 13 Taurin ve Alzheimer:

Asetilkolin düzeylerinin Alzheimer hastalarında anormal düşük olduğu tespit edilmiş. Bunun hafıza kaybıyla ilgili olabileceği ve Alzheimer hastalığının tedavisinin bu düzeyin düzeltilmesi ile olabileceği düşünülmektedir. Deney hayvanlarıyla yapılan bir çalışmada taurin uygulandığında beyindeki asetilkolin seviyesinin yükseldiği gözlemlenmiştir. Araştırmacılar serebrospinal sıvıda bulunan taurin konsantrasyonu azaldığında Alzheimer hastalığının semptomlarının ortaya çıktığını belirtmişlerdir. Ancak bugüne kadar taurinin Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanıldığını belirten bir literatür bulunmamaktadır ¹⁷.

3. GEREÇLER ve YÖNTEM

Çalışmalar; Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3. 1 GEREÇLER

3. 1. 1 Kullanılan Deney Hayvanları

GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Deney Hayvanları kısmından sağlanan, ağırlıkları 300-500 g arasında değişen (ortalama 500g) ve her iki cinsten olmak üzere toplam 40 adet kobay (guinea pig) bu çalışmalarda kullanılmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce, hayvanları herhangi bir enfeksiyondan korumak amacıyla bir hafta boyunca ayrı bir yerde, özel bakıma alındılar. Sakrifiye edilene kadar hayvanların diyetlerine ve sularına dikkat edildi.

3. 1. 2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

- NaOH (Merck),
- Na₂HPO₄ (Merck),
- KH₂PO₄ (Merck),
- HCl (Merck),
- BSA (Bovin serum albumin) (Sigma),
- LPS (Escherichia coli LPS serotype 0111:B4) (Sigma)
- NaCl (Merck),
- Glukoz (Merck),
- KCl (Sigma)
- Dekstran (Merck),
- Taurin (Sigma)
- Floreskamin (Sigma)
- Asetonitril (Merck),

- Disodyum tetraborat (Sigma)
- Borik asit (Orkim)
- Tetrahidrofuran (Merck),
- VaCl_3 (Merck),
- Sülfanilamide (Sigma),
- NEDD (N-(1-Naphythyl) ethylenediamine dihydrochloride) (Sigma)
- H_2O_2 (Merck),
- O-dianisidin (Sigma),
- Metanol (Merck),
- HL60 MPO (Sigma),
- TNB (Sigma)

3. 1. 3 Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- HPLC Cihazı (HEWLETT PACKARD 1050)
- Santrifüj (-BHG Hermle Z 323 K ve Damon IEC, B-20 A soğutmalı)
- Spektrofotometre (-Shimadzu UV-1601 ve Shimadzu TCC-240 A)
- Sonikatör (The Virtis Company, Vir Sonic 50)
- Terazı (Shimadzu AX 200)
- Vortex (Heidolph Reax 2000)
- pH metre (Jenway 3510)
- Su banyosu (Heto maxi-shaken)
- 96 çukurlu ELİSA plağı
- ELİSA okuyucusu (Tecan Marka)
- ELİSA yıkayıcısı (Tecan Marka)
- Etüv (Ayvalı)
- Mikropipet (Eppendorf)
- Otomatik pipetler (Eppendorf)
- Küvetler (cam ve plastik)
- Eppendorf tüpleri

3. 2 YÖNTEMLER

Bu çalışmada deney hayvanları uygun şekilde hazırlandıktan sonra onların intrakardiyak olarak alınan kanlarından lökosit ve serum elde edildi. Elde edilen lökosit süspansiyonlarından: total protein tayini, NO_2^- , NO_3^- , total NO, taurin ve tauroklorin ölçümleri, MPO enzim aktivite tayini ve serumlarında $\text{TNF}\alpha$ tayini yapılmıştır.

3. 2. 1 Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Bu çalışmalarda her bir grupta 10 adet olacak şekilde 4 ayrı kobay grubu oluşturuldu. Her gruba aşağıdaki işlemler yapıldı.

Kontrol Grubu:

Enjeksiyonun uygulanması esnasında oluşan stres bazı biyokimyasal parametrelerin değişimine yol açabileceği düşüncesiyle, kontrol grubu hayvanlara da aynı stresi oluşturma amacıyla, steril serum fizyolojik intraperitoneal (ip) olarak enjekte edildi. Serum fizyolojik enjeksiyonundan 6 saat sonra hayvanlar ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) im anestezisi altında sakrifiye edilerek, intrakardiyak yolla heparinli ve antikoagülansız tüplere kanları alındı.

Taurin grubu:

Sadece taurinin kontrol hayvanları üzerindeki etkisini görmek amacıyla taurin grubu oluşturuldu. Bu gruba 300mg/kg dozda ip olarak taurin enjekte edildi ³⁸. Ancak taurinin suda eritilmesine ve enjeksiyon sırasında 37°C'ye getirilerek uygulanmasına dikkat edildi. Taurin enjeksiyonundan 6 saat sonra hayvanlar ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) im anestezisi altında sakrifiye edilerek, kanları intrakardiyak yolla heparinli ve antikoagülansız tüplere alındı.

Endotoksemi grubu:

Bu gruptaki hayvanlara 4 mg/kg (*Escherchia coli* 0111:B4) ip olarak verildi ³⁶. enjeksiyonundan 6 saat sonra hayvanlar ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) im anestezisi altında sakrifiye edilerek, intrakardiyak yolla heparinli ve antikoagülansız tüplere kanları alındı.

Taurin + Endotoksemi Grubu:

Bu gruptaki hayvanlara önce taurin, taurin grubundaki ile aynı olarak uygulandı ve bu uygulamadan hemen sonra kanda aynı anda maksimum konsantrasyona ulaşmaları beklendiği için endotoksin

verildi. 6 saat sonra aynı işlemler uygulandı. 6 saat sonra hayvanlar ketamin (60 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) im anestezisi altında sakrifiye edilerek, intrakardiyak yolla heparinli ve antikoagülansız tüplere kanları alındı.

3. 2. 2 Lökosit İzolasyonu:

Reaktifler:

- Hanks Solusyonu pH 7,4 (depo)
 - NaCl: 80g/L
 - Glukoz: 10g/L
 - KCl: 4g/L
 - KH_2PO_4 : 600mg/L
 - Na_2HPO_4 : 96mg/L
 - Kullanırken 1:10 seyreltme yapıldı
- 0,16 M KCl
- %3,5 NaCl
- %6,5 Dekstran: 512 g/mol

Deneyin Yapılışı:

Lökosit izolasyonu için santrifüj tüpüne 4 ml %6,5'luk dekstran ve 10 ml kan konuldu. $+4^\circ\text{C}$ 'de 45 dakika dik olarak bekletildi. Ayrılan plazma başka bir tüpe alınarak üzerine 15 ml Hank's solüsyonu eklendi. 2000 rpm $+4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Üste kalan sıvı uzaklaştırıldı ve altta toplanan hücreler 15 ml distile su ile 30 saniye çalkalandı. Daha sonra % 3,5'luk 5 ml NaCl ile izotonik hale getirildi. 2000 rpm'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Böylece lökositler arasında kalabilecek eritrositler parçalanması sağlanmış olur. Üstte kalan sıvı uzaklaştırıldı ve alttaki hücreler tekrar 15 ml Hank's solüsyonuyla yıkandı. 2000 rpm $+4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildi. Üstte bulunan sıvı uzaklaştırıldı. Çökelek 3 ml 0,16 M KCl ile süspansiyon haline getirildi 30 saniye süreyle 50 watt güçle sonike edildi. -80°C 'de buzdolabında saklandı ³².

3. 2. 3 Lökosit süspansiyonlarında Protein Miktarının Ölçümü:

Lökosit süspansiyonlarında protein tayini siğır serum albumini (BSA)'nın standart olarak kullanıldığı Lowry yöntemi ile yapıldı ⁸⁰.

Reaktifler:

1) Standart: 0,5 mg/ml BSA distile su içinde hazırlandı.

2) A solüsyonu: 0,1 N NaOH içinde %2'lik Na_2CO_3

B_1 solüsyonu: %2'lik Na-K tartarat

B_2 solüsyonu: %1'lik CuSO_4

C solüsyonu (Alkalın reaktifi): 1 birim B_1 + 1 birim B_2 + 33 birim A solüsyonu karıştırılır

3) Folin Ciaocalteu Solüsyonu: Distile su ile 1:1 oranında dilue edilerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı (ml)

	Kör	Std1	Std2	Numune
Distile Su	1	0,08	0,06	0,06
Lökosit süsp.	-	-	-	0,04
C solüsyonu	2	2	2	2
Standart	-	0,02	0,04	-
Tüpler karıştırılır, 15 dakika inkübasyon				
Folin	0,2	0,2	0,2	0,2
60 dakika inkübasyon				

750 nm'de optik dansite ölçümü ve protein miktar tayini

numune absorbansı x standart konsantrasyonu

$$\frac{\text{numune absorbansı} \times \text{standart konsantrasyonu}}{\text{standart absorbansı}} = \text{mg protein/ml lökosit süspansiyonu}$$

3. 2. 4 Lökositlerde NO_2^- ve NO_3^- Tayini:

Prensip: Lökositlerde nitrat ve nitrit düzeyi Griess reaksiyonu temeline dayanan diazotizasyon metodu ile ölçülür ⁹².

NO_2^- ve NO_3^- Tayininde Kullanılan Reaktifler ve Cihazlar:

- Vanadyum III Chloride (VaCl_3) : 80 mg VaCl_3 + 10 ml 1 M HCl
- Griess Solüsyonu : sülfanilamid + NEDD
- Sülfanilamid : 1 gr sülfanilamid + %5 lik 50 ml HCl de
- NEDD (N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride) : %0,1'lik olacak şekilde, 50 mg NEDD + 50 ml deiyonize suda
- Standartlar

NO_3^- Tayininde Standart Solüsyonların Hazırlanması: 85 mg NaNO_3 tartılıp üzerine 10 ml deiyonize su eklenerek 100 mM'lık stok NaNO_3 hazırlandı. 100 mM NaNO_3 standart stok solüsyondan 10 mM, 1 mM, 100 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM nitrat standartları hazırlandı.

NO_2^- Tayininde Standart Solüsyonların Hazırlanması: 69 mg NaNO_2 tartılıp üzerine 10 ml deiyonize su eklendi ve 100 mM'lık stok NaNO_2 hazırlandı. 100 mM NaNO_2 standart solüsyondan alınarak 10 mM, 1 mM, 100 μM , 50 μM , 25 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM nitrit standartları hazırlandı.

Deneyin Yapılışı : Plazma örneklerini deproteinize etmek için 1 birim plazma + 2 birim etil alkol eklenir ve +4 °C de 30 dk beklenir. Vortexlenir ve 14 000 rpm de 5 dk santrifüj edilir. Plazma örneklerinin deproteinizasyon ve çöktürme işlemlerinden sonra elde edilen üst fazlardan nitrit tayini için 100 μl alınarak her bir örnekten çift tekrar olacak biçimde 96 çukurlu ELİSA plağına yerleştirildi. Aynı hacimde nitrit standart solüsyonları da ayrı çukurlara yerleştirildi. Standart solüsyonlar ve numunelerin üzerine 100 μl Griess solüsyonu (0,5 birim sülfanilamid + 0,5 birim NEDD karışımı) konur. 37 °C etüvde 30 dk bekletilir. 540-550 nm dalga boyunda okunur.

Nitrat ölçümü için diğer bir ELISA plağına standart solüsyonları ve numuneler her birinden çift tekrar olacak biçimde 96 çukurlu ELISA plağına 100 μl konur. Üzerine VaCl_3 yine 100 μl konur. Daha sonra 100 μl Griess solüsyonu (0,5 birim sülfanilamid + 0,5birim NEDD karışımı) eklenir. 37 °C etüvde 30 dk bekletilir. 540-550 nm dalga boyunda ELİSA okuyucusunda okunur. ELİSA okuyucusu tarafından standart solüsyonlara karşılık gelen absorbansların oluşturduğu doğrusal regresyon grafiklerine göre numunelerimiz değerlendirilmektedir. Her iki değer nitrit ve nitrat için

hazırlanmış standartlara göre hesaplanır. NO_x (nitrat standartıyla okunan) değerinden nitrit değeri çıkarılarak nitrat değeri bulunur.

Elde edilen absorbans değerleri standart grafikleri yardımı ile konsantrasyonları hesaplanır ve sonuçlar 1/3 dilüsyondan ötürü 3 ile çarpılır.

Birim : µmol/lt.

3. 2. 5 Lökosit Süspansiyonlarında MPO Aktivitesi Ölçümü

Prensip:

H₂O₂'nin homogenat tarafından oksitlenerek O-dianisidinin redüklenmesi ve redükte O-dianisidinin 410 nm'de ölçülmesi esasına dayanır ⁴⁹.

Reaktifler:

- Na-K fosfat tamponu: 500mM/L, pH=7
- H₂O₂ (%30'luk): 1/10 dilüe edildi
- O-dianisidin: %1'lik metanol içinde
- HCl: 3 M/L

Deneyin yapılışı (tüm volümler ml olarak verilmiştir):

	KÖR	NUMUNE
Na-K fosfat tamponu	0,2	0,2
H ₂ O ₂	0,009	0,009
O-dianisidin	0,1	0,1
Lökosit süspansiyonu	-	0,4
Distile Su	1,6	1,2
37°C'de 30 dakika bekletilir		
HCl	0,2	0,2

Tepkime lökosit süspansiyonu eklenmesiyle başlatıldı. 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra HCl solüsyonu eklenmesiyle durduruldu. 410 nm'de optik dansite köre karşı okundu.

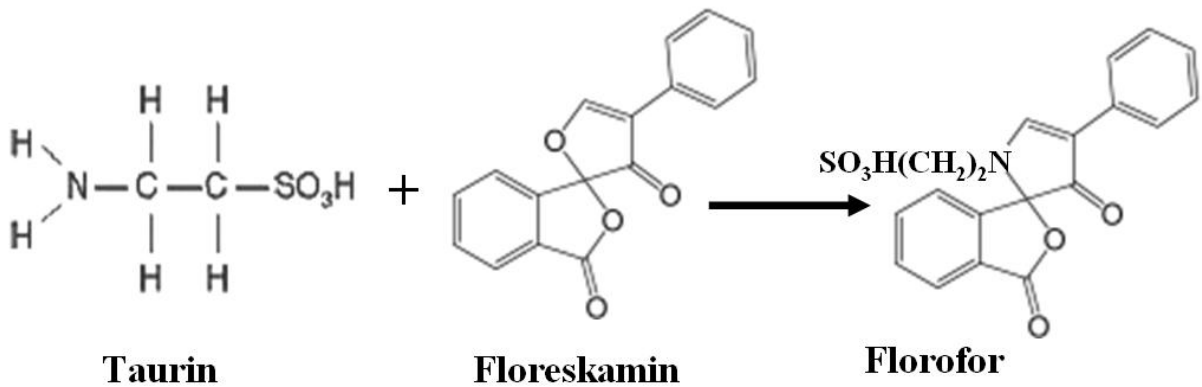
1 Ünite (Ü)= 37°C'de 1 saatte oluşan 0.001'lik optik dansite değişimi olarak kabul edildi.

Spesifik aktivite= Ü/mg protein olarak değerlendirildi.

3. 2. 6 Lökosit süspansiyonlarında Taurin Miktarının Ölçümü

3. 2. 6. 1 Reaktiflerin Hazırlanması:

- 1) Taurin standartı: 1mg/ml olacak şekilde distile su ile, haftalık stoklar şeklinde hazırlandı.
- 2) Floreskamin: 5mM olacak şekilde asetonitril ile hazırlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi ve hazırlanan bir solüsyon en fazla 12 hafta dayanıklı idi.
- 3) Borat tamponu: 100 mM disodyum tetraborat (10 mM borik asit ile pH'sı 9,2'ye ayarlandı).
- 4) Fosfat tamponu: 15 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH'sı fosforik asit ile 3,5'e ayarlandı) haftalık olarak şeklinde hazırlandı.
- 5) Mobil faz: Tetrahidrofuran-asetonitril-fosfat tamponu (pH=3,5) (4:24:72, v/v/v). Bunlar iyice karıştırıldıktan sonra pH tekrar kontrol edildi ve mobil faz 0,45 µm'lik millipore filtreden süzüldü ve 20 dakika sonike edildi.



Şekil 19. Taurinin Floreskamin İle Derivatizasyonu

3. 2. 6. 2 HPLC Sistem Parametreleri ve Çalışma Koşulları:

Ölçüme geçmeden önce HPLC cihazı taurin çalışma koşullarına ayarlandı. Bu çalışma koşulları aşağıdaki tabloda gösterildiği şekilde yapıldı. Bu çalışma koşulları saptanırken optimum mobil faz konsantrasyonu ve pH'sı, optimum akım hızı, optimum çalışma süresi dikkate alınarak ayarlanmıştır⁸⁸.

Tablo 8. Taurin çalışması için HPLC sistemine ait çalışma koşulları ve sistem parametreleri

Çalışma Koşulu	Sistem Parametreleri
HPLC Modeli	HEWLETT PACKARD 1100
Dedektör	Ultra Viole
Mobil Faz	Tetrahidrofuran-asetonitril-fosfat tamponu (pH=3,5) (4:24:72, v/v/v)
Analitik Kolon	300 mm x 3,9 mm i.d., Bondcolone C ₁₈ 10 µm stainless-steel kolon
Dalga boyu	385 nm
Akım Hızı	1.0 mL/dakika
Örnek Hacmi	20 µL
Çalışma Süresi	10 dakika
Sistem Basıncı	≈ 1100 psi=75,8 Bar

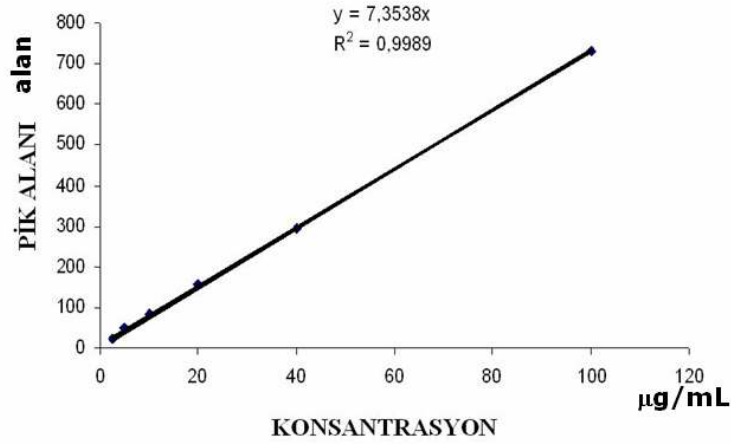
3. 2. 6. 3 Lökosit Süspansiyonlarının Taurin Ölçümüne Hazırlanması:

100 µl numune 150 µl asetonitril ile karıştırılıp vortekslendi ve karışım 10 dakika 5800 g'de santrifüj edildi. 50, 100mM, pH=9,2 olan borat tamponu süperantanın pH'sını yaklaşık olarak 9'a ayarlamak için eklendi. Daha sonra asetonitril içinde hazırlanmış olan 5 mM 50 µl floreskamin eklendi ve solüsyon hemen vortekslendi. Numuneler 6 saat içinde HPLC sistemine enjekte edildi.

3. 2. 6. 4 Taurin Standartlarının Hazırlanması:

Distile su içinde hazırlanan 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki taurin standartları HPLC sistemine verildikten sonra, pikin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı. Standart çalışmalardan elde edilen pik alanları esas alınarak, regresyon

analizi yapılarak taurin standart eğrisi çizildi. Elde edilen standart taurin değerlerine göre, numunelerin pik alanlarından taurin konsantrasyonları hesaplandı.



Şekil 20. Taurin Standart Grafiği

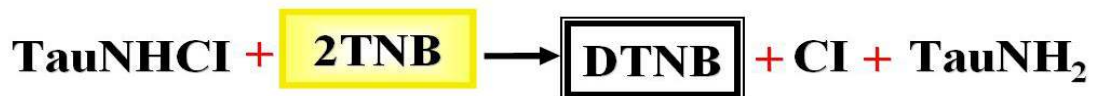
3. 2. 6. 5. Numunelerde Taurin Miktarının Hesaplanması:

HPLC de elde edilen standart değerlere göre, numunelerin pik alanlarından numune taurin değerleri µg/mL olarak elde edildi.

3. 2. 7 Lökosit süspansiyonlarında Tauroklorin Miktarının Ölçümü

3. 2. 7. 1. Prensip:

Tauroklorin ölçümü MPO tarafından oluşturulan HOCl'in taurin (TauNH₂) ile tauroklorin (TauNHCl) üretme reaksiyonuna dayanır ⁷³. Tauroklorin üretimi 5-tio-2nitrobenzoik asit (TNB) ile reaksiyona girmesiyle ölçülür ¹⁴⁷. Sarı renkli TNB ($\epsilon_{412}=14,100\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ¹⁸) renksiz 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)'e okside edilir.



3. 2. 7. 2. Reaktiflerin Hazırlanması:

Tauroklorin ölçümü 96 kuyucuklu elisa plate'leri kullanılarak elisa okuyuda yapıldı. Her kuyucuktaki toplam hacim 200 μ l idi. Ölçüm için gereken reaktifler şunlardı:

1) TNB solüsyonu: 1 mM TNB solüsyonu, 2 mM DTNB'yi 50Mm pH=7.4 fosfat tamponu içinde çözerek hazırlandı. DTNB'yi hidroliz etmek için DTNB pH=12'ye NOH ile titre edildi. 5 dakika sonra pH 7,4 e HCl ile düşürüldü. TNB ışığa duyarlı olduğu için tüm çalışma boyunca mümkün olduğunca ışıktan muhafaza edildi.

2) 50mM potasyum fosfat tamponu (pH=7,4) ile hazırlanmış olan:

- 8,25 mM taurin
- 100 mM NaCl
- 100 μ M H₂O₂
- 100 μ M 5-thio-2nitrobenzen (TNB)

3) HL60 MPO

Bu hazırlanan reaktifler aşağıdaki tabloda verilen miktarlara göre pipetlenerek ölçüm yapıldı.

(Verilen tüm miktarlar µl cinsindendir)

	Kör	Standart (2,5µg/ml)	Standart (5 µg/ml)	Standart (10 µg/ml)	Numune
Taurin	20	20	20	20	20
NaCl	20	20	20	20	20
TNB	20	20	20	20	20
Tampon	20	16,62	13,25	6,5	-
HL60 MPO	-	3,38	6,75	13,5	-
Lökosit süspansiyonu	-	-	-	-	20
H ₂ O ₂	120	120	120	120	120

Reaksiyon H₂O₂ ekleyerek başlatıldı. Plate oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 10 dakika inkübe edildi. 405 nm’de optik dansite köre karşı okundu. Hesaplamalar standartların absorbands ve konsantrasyonlarından elde edilen grafik yardımı ile yapıldı.

3. 2. 8 Serumda TNFα Düzeylerinin Ölçülmesi

Serum TNFα düzeyleri Biosource Cytoscreen (ABD) TNFα ELISA ticari kiti ile ölçülmüştür. Bu kit sandviç ELISA yöntemiyle çalışmaktadır. Çalışma ticari kitin kendi prospektüs bilgileri ışığında gerçekleştirilmiştir.

TNFα'ya karşı antikorlarla kaplanmış mikrotitrasyon plaklarının kuyucuklarına blank (kör) hariç 50’şer µl standart ve örnekler konuldu. Standartlar 0 pg/ml, 15.6 pg/ml, 31.2 pg/ml, 62.5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml ve 1000 pg/ml değerlerindeydi. Blank çukuru hariç diğerlerine 50 µl biotin bağlı anti-TNFα eklendi. Plâğin üstü kapatılarak 90 dakika oda ısısında bekletildi. Kuyucuklar 5 kez otomatik yıkayıcıda yıkandı. Blank çukuru haricindeki tüm çukunara 100 ml Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi. Plâğin üstü kapatılıp 45 dakika oda ısısında beklendi. 5 kez yıkama yapıp, tüm çukurlara stabilize renklendirici eklendi ve plak karanlıkta 30 dakika bekletildi. Tüm kuyucuklara 100 µl durdurma solusyonu eklendi. 450 nm filtre ile ELISA okuyucusunda okumalar gerçekleştirildi. Standartların ELISA okuyucusundan alınan optik dansite değerleri ve

konsantrasyonları Mikrosta (bilgisayarda istatistik için kullanılan yaygın bir program) programında girilerek oluşturulan regresyon eğrisi ile optik dansite olarak alınan değerler pg/ml'ye çevrildi.

3. 3 Sonuçların İstatistiksel Analizi

Tüm veriler ortalama±standart sapma olarak verildi. İstatistiksel hesaplamalar ve grafiklerin çiziminde, istatistik paket programı SPSS (Statistical Package for the Social Sciences Program, for windows 11.5) ile Microsoft Excel (for windows XP) programları kullanıldı. Bulguların değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi ile Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4. 1 Lökosit Süspansiyonlarında NO_2^- - NO_3^- - NO_x Ölçüm Sonuçları

NO_2^- Miktarları:

Yapılan çalışma sonucu elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek ortalama lökosit nitrit konsantrasyonu endotoksin grubunda tespit edildi ($60,11 \pm 18,96$) ve bu değer kontrol grubuna ($33,28 \pm 13,21$) göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksekti ($p=0,003$). Taurin+endotoksin grubunun lökosit nitrit konsantrasyonu ($44,07 \pm 9,37$) ise kontrol grubu lökosit nitrit konsantrasyonundan biraz yüksek ve taurin grubu lökosit nitrit konsantrasyonundan ($53,33 \pm 12,94$) biraz düşüktü. Bu farkların her ikisi de istatistiksel olarak anlamlı değildi (her ikisi için $p>0,05$).

NO_3^- Miktarları:

Yapılan çalışma sonucu elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek lökosit nitrat konsantrasyonu endotoksin grubunda tespit edildi ($466,04 \pm 384,60$) ve bu değer hem kontrol grubu nitrat konsantrasyonundan ($137,94 \pm 57,71$) hem de taurin grubu nitrat konsantrasyonundan ($140,16 \pm 51,27$) istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksekti (sırasıyla $p=0,006$ ve $p=0,004$). Taurin+endotoksin grubunun lökosit nitrat konsantrasyonu ($150,59 \pm 59,56$) ise kontrol grubu lökosit nitrit konsantrasyonundan biraz düşüktü ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Taurin grubu nitrat konsantrasyonu ile kontrol grubu nitrat konsantrasyonu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

NO_x Miktarları:

Yapılan çalışma sonucu elde ettiğimiz lökosit NO_x konsantrasyonları sonuçları hem miktar olarak hem de istatistiksel açıdan nitrat konsantrasyonları ile korele idi.

Tablo 9. Lökosit Süspansiyonlarında NO₂⁻ - NO₃⁻ - NO_x Ölçüm Sonuçları:

	NO ₂ ⁻ (μmol/l)	NO ₃ ⁻ (μmol/l)	NO _x (μmol/l)
Kontrol Grubu	33,28±13,21	137,94±57,71	171,23±60,54
Taurin Grubu	53,33±12,94 ^{a, f}	140,16±51,27 ^{b, e}	193,49±51,00 ^{b, e}
Endotoksin Grubu	60,11±18,96 ^{a, d, e}	466,04±384,60 ^{a, c, e}	526,16±394,36 ^{a, d, e}
Taurin + Endotoksin Grubu	44,07±9,37 ^{b, d}	106,51±55,09 ^{a, c}	150,59±59,59 ^{b, d}

Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

a= p<0,05, ilgili değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

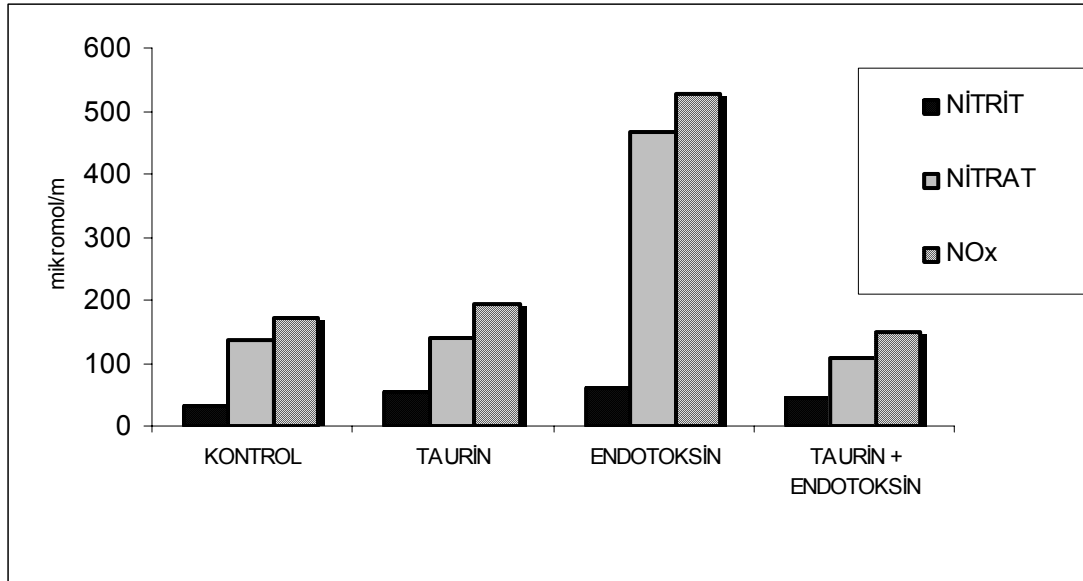
b= p>0,05, ilgili değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

c= p<0,05, ilgili değer taurin grubu ile karşılaştırıldığında

d= p>0,05, ilgili değer taurin grubu ile karşılaştırıldığında

e= p<0,05, ilgili değer taurin+endotoksin grubu ile karşılaştırıldığında

f= p>0,05, ilgili değer taurin+endotoksin grubu ile karşılaştırıldığında

**Şekil 21. Lökosit Süspansiyonlarında Nitrit-Nitrat-NO_x Konsantrasyonları:**

4. 2 Lökosit Süspansiyonlarında MPO Enzim Aktivitesi Sonuçları:

Yapılan aktivite tayini sonucu elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek ortalama lökosit MPO aktivitesi endotoksin grubunda tespit edildi ($245,40 \pm 97,17$) ve bu değer kontrol grubuna ($149,50 \pm 44,56$) göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksekti ($p=0,011$). Taurin grubunun ortalama MPO aktivitesi ($212,20 \pm 76,37$) kontrol grubundan yüksek olmasına rağmen bu fark anlamsızdı ($p>0,05$). Taurin+endotoksin grubunun ortalama MPO aktivitesi ($76,50 \pm 36,91$) kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşüktü ($p=0.001$).

Tablo 10. Lökosit Süspansiyonlarında MPO Enzim Aktiviteleri:

	MPO (Ü/mg protein)
Kontrol Grubu	$149,50 \pm 44,56$
Taurin Grubu	$212,20 \pm 76,37^{b, e}$
Endotoksin Grubu	$245,90 \pm 97,71^{a, d, e}$
Taurin + Endotoksin Grubu	$76,50 \pm 36,91^{a, c}$

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

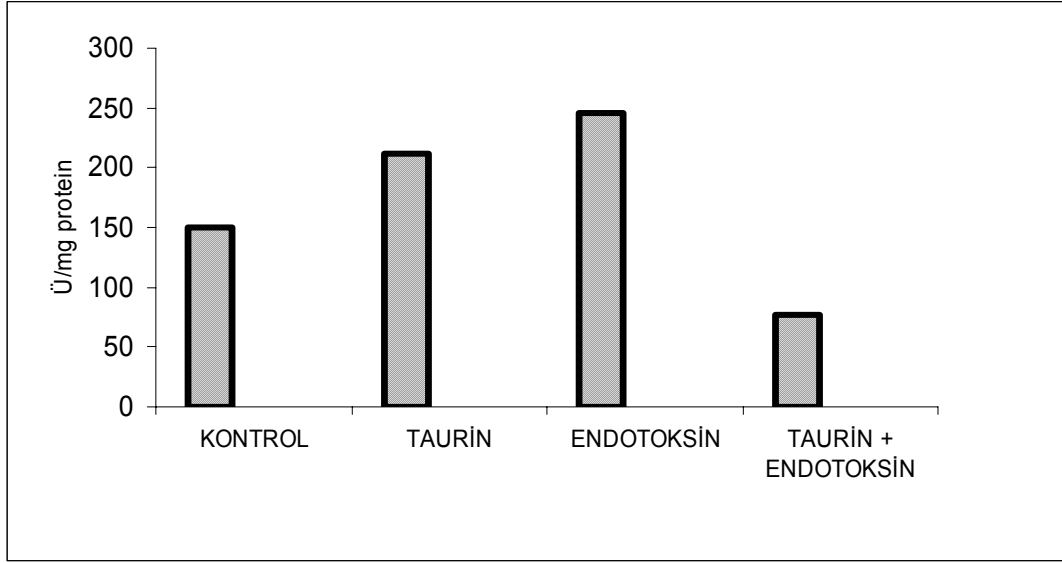
a= $p<0,05$, ilgili değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

b= $p>0,05$, ilgili değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

c= $p<0,05$, ilgili değer taurin grubu ile karşılaştırıldığında

d= $p>0,05$, ilgili değer taurin grubu ile karşılaştırıldığında

e= $p<0,05$, ilgili değer taurin+endotoksin grubu ile karşılaştırıldığında



Şekil 22. Lökosit Süspansiyonlarında MPO Enzim Aktiviteleri

4. 3 Serum TNF α Ölçüm Sonuçları

Yapılan çalışma sonucu elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek ortalama serum TNF α konsantrasyonu taurin grubunda tespit edildi ($152,05 \pm 59,70$) ve bu değer kontrol grubu ($103,18 \pm 25,33$) ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Endotoksin grubunun ortalama serum TNF α konsantrasyonu ($64,83 \pm 22,99$), taurin+endotoksin grubu ($95,87 \pm 64,07$) ile kıyaslandığında anlamsız, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p = 0,003$).

Tablo10. Serum TNF α Konsantrasyonları:

	TNF α (pg/ml)
Kontrol Grubu	103,18 $\pm$ 25,33
Taurin Grubu	152,05 $\pm$ 59,70 ^{b, e}
Endotoksin Grubu	64,83 $\pm$ 22,99 ^{a, c, f}
Taurin + Endotoksin Grubu	95,87 $\pm$ 64,07 ^{b, e}

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a= p<0,05, ilgili değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

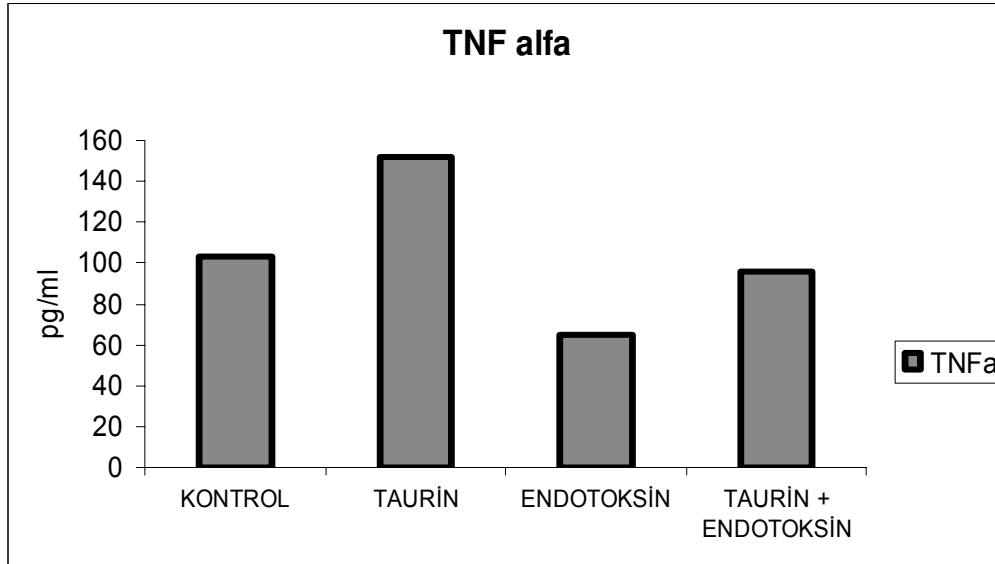
b= p>0,05, ilgili değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

c= p<0,05, ilgili değer taurin grubu ile karşılaştırıldığında

d= p>0,05, ilgili değer taurin grubu ile karşılaştırıldığında

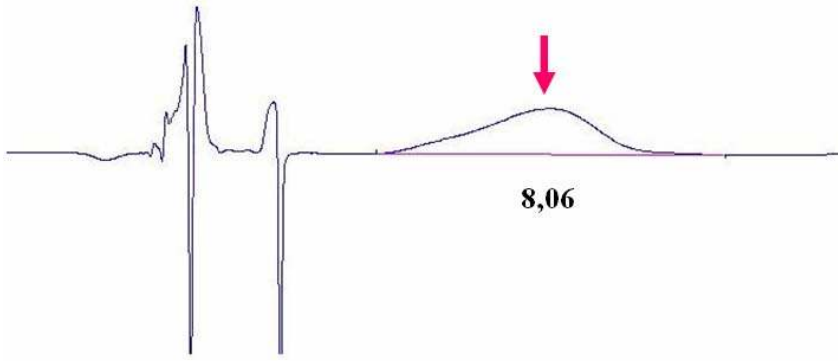
e= p<0,05, ilgili değer taurin+endotoksin grubu ile karşılaştırıldığında

f= p>0,05, ilgili değer taurin+endotoksin grubu ile karşılaştırıldığında

**Şekil 23. Serum TNF α Konsantrasyonları**

4. 4 Lökosit Süspansiyonlarında Taurin ve Tauroklorin Ölçüm Sonuçları

Taurin Miktarları:



Şekil 24. Çalışmamızdaki Bir Numuneye Ait Kromotogram ve İşaretlenmiş Taurin Piki

Yapılan çalışma sonucu elde ettiğimiz sonuçlara göre kontrol grubunda ortalama lökosit taurin konsantrasyonu $11,62 \pm 3,39$ idi ve bu değer sırasıyla taurin+endotoksin grubundan ($5,61 \pm 1,12$), endotoksin grubundan ($3,37 \pm 0,67$) ve taurin grubundan ($1,92 \pm 0,23$) yüksekti ve bu farkların hepsi de istatistiksel olarak anlamlı idi (hepsi için $p < 0,001$). Endotoksin grubunun ortalama taurin konsantrasyonu, taurin+endotoksin grubundan anlamlı olarak düşük; taurin grubunun ortalama taurin konsantrasyondan ise anlamlı olarak yüksekti (her ikisi için de $p < 0,001$).

Tauroklorin Miktarları:

Yapılan çalışma sonucu elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek ortalama lökosit tauroklorin konsantrasyonu endotoksin grubunda tespit edildi ($4,27 \pm 0,59$) ve bu değer kontrol grubuna ($3,26 \pm 0,39$) göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksekti ($p < 0,001$). Taurin+endotoksin grubunun ortalama tauroklorin konsantrasyonu ($2,19 \pm 0,63$), kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olmasına rağmen; taurin grubundan ($1,68 \pm 0,54$) istatistiksel olarak anlamsız miktarda yüksekti ($p > 0,005$).

Tablo 11. Lökosit Süspansiyonlarında Taurin ve Tauroklorin Ölçüm Sonuçları:

	Taurin ($\mu\text{g/ml}$)	Tauroklorin ($\mu\text{g/ml}$)
Kontrol Grubu	11,62 $\pm$ 3,39	3,26 $\pm$ 0,39
Taurin Grubu	1,92 $\pm$ 0,23 ^{a, e}	1,68 $\pm$ 0,54 ^{a, f}
Endotoksin Grubu	3,37 $\pm$ 1,12 ^{a, c, e}	4,27 $\pm$ 0,59 ^{a, c, e}
Taurin + Endotoksin Grubu	5,61 $\pm$ 1,12 ^{a, c}	2,19 $\pm$ 0,63 ^{a, d}

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

a= $p < 0,05$, ilgili değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

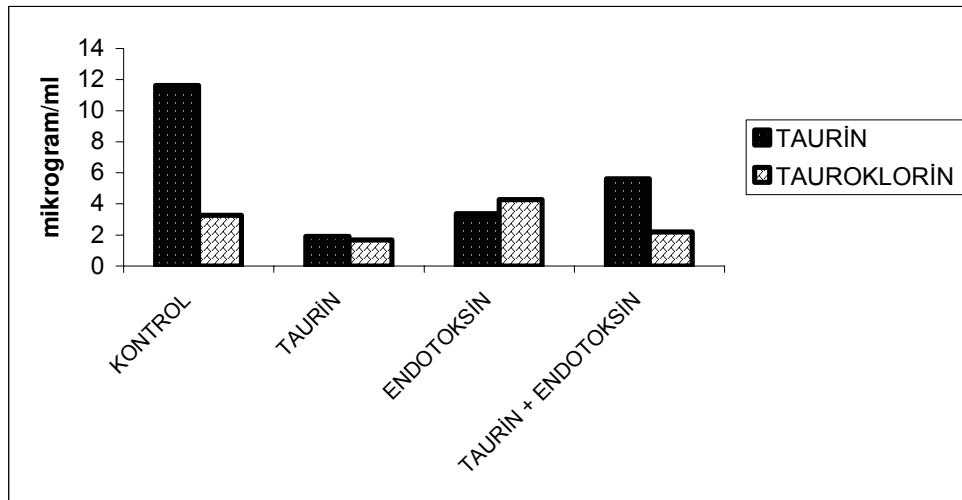
b= $p > 0,05$, ilgili değer kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

c= $p < 0,05$, ilgili değer taurin grubu ile karşılaştırıldığında

d= $p > 0,05$, ilgili değer taurin grubu ile karşılaştırıldığında

e= $p < 0,05$, ilgili değer taurin+endotoksin grubu ile karşılaştırıldığında

f= $p > 0,05$, ilgili değer taurin+endotoksin grubu ile karşılaştırıldığında

**Şekil 25. Lökosit Süspansiyonlarında Taurin ve Tauroklorin Konsantrasyonları**

5. TARTIŞMA

Aktive olan nötrofiller ROS'a ilaveten birçok sayıda proinlamatuar mediatörlerin salınmasına neden olurlar. Bu mediatörler $TNF\alpha$, IL-1, IL-6, IL-12 gibi sitokinler ve PGE2, LTB4 gibi eikasonoidleri kapsamaktadır ⁸⁴. Bu sitokinlerden $TNF\alpha$ nötrofillerde iNOS'u aktive ederek NO oluşumunu uyarır ¹²⁶.

Nötrofiller akut inflammatuar olaya aktif olarak katılırlar, değişik mikrobisidal ajanlar üreterek mikroorganizmaları öldürürler. Bu ajanlardan en önemlisi MPO'nın oluşturduğu oksidan bir madde olan HOCl'tir. Nötrofillerin ürettiği bu reaktif oksidanlar aynı zamanda çevre dokuya da zarar verirler ²⁷.

MPO nötrofillerin auzurofilik granüllerinde bulunan ve hem grubu içeren bir enzim olup, nötrofillerin hem pro-inflamatuar hem de anti-inflamatuar özellikleri ile ilişkilidir. MPO'nın ROS'e ilaveten $TNF\alpha$ 'nın salınmasını uyaran bir modülatör olduğu da bilinmektedir ¹²⁹. MPO, H_2O_2 'i kofaktör olarak kullanarak halid iyonlarının kataliz ederek hipokloröz asitleri oluşturur ve bu sistem MPO- H_2O_2 -Halid sistemi olarak tanımlanmıştır. Bu sistem infeksiyonlara karşı immün savunmayı sağlarken diğer taraftan da çevre doku harabiyetine neden olur ^{83, 129}. İnflamasyon şartları altında nötrofillerde ROS'a ilaveten iNOS aktivasyonu ile ileri derecede aktif bir radikal olan $NO\cdot$ da oluşmaktadır. $NO\cdot$ moleküler oksijen ile birleşip $NO_2\cdot$ ve $NO_3\cdot$ gibi RNS'lerini oluşturur. Bu RNS, ROS ile birleşerek çok yeni ve biyolojik olarak aktif olan türleri oluşturmaktadır. Son yıllarda $NO_2\cdot$ 'in, MPO aracılığı ile oluşan HOCl'i fizyolojik pH'ta çok daha güçlü klorlayıcı ajan olan NO_2Cl 'e dönüştürdüğü bildirilmiştir ^{83, 129}.

Diğer taraftan taurin, nötrofil sitoplazmasında en fazla bulunan serbest aminoasittir ve inflamasyon reaksiyonlarında regülatör bir molekül olarak önemli rol oynamaktadır. Taurinin inflamasyon reaksiyonlarını HOCl'i temizleyerek modüle ettiği ve bu şekilde MPO üzerinden HOCl'lerin feedback inhibisyonunu önlediği bildirilmektedir ^{83, 87}. Taurin HOCl ile reaksiyona girerek, HOCl'den çok daha az reaktif olan TauCI oluşumuna neden olmaktadır. Yapılan son yıllardaki çalışmalarda Tau-CI'in fagositik hücreler tarafından $TNF\alpha$, IL-1 gibi proinflamatuar mediatörlerin salınmasını inhibe ettiği yayınlanmıştır. Ayrıca Tau-CI, iNOS'u inhibe ederek NO oluşumunu azaltmaktadır ^{38, 42, 74, 83, 87, 123, 133}.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada kobaylara ip olarak endotoksin uyguladıktan sonra PMN lökositleri izole ederek MPO- H_2O_2 -Halid sisteminin aktivitesini, $NO_2\cdot$, $NO_3\cdot$, taurin ve TauCI miktarlarını

ölçtük. Ayrıca endotoksin ile birlikte taurin uygulayarak, taurinin endotoksemik şartlarda etkisini inceledik. Bu hayvanlara ait plazmalarını da elde ederek sitokin salınımını kontrol etmek amacı ile $\text{TNF}\alpha$ düzeylerini tayin ettik. Endotoksin uygulanmasından sonra iNOS maksimum aktivasyonunu 6. saatte gösterdiği için tüm parametreler 6. saatte alınan kan örneklerinde çalışılmıştır ^{28, 118, 157}.

Endotoksin verdikten sonraki 6. saatte plazma $\text{TNF}\alpha$ düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Ancak endotoksin ile birlikte taurin verildiğinde ise $\text{TNF}\alpha$ düzeyleri kontrol değerlerine yükseldi. Tek başına taurin uygulanması $\text{TNF}\alpha$ düzeyini kontrol grubuna göre anlamlı olmamakla birlikte artırmıştır. Çalışmamızda endotoksin verdikten 6. saatte plazma $\text{TNF}\alpha$ düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olması Tiao, Sinha, Wayte ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmaların sonuçları ile uygunluk göstermektedir. Tiao ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada ¹³⁵ endotoksemi esnasında NO^- sentezinin inhibisyonunun, mortalite oranını nasıl artırdığını incelemişler ve NO^- sentezi inhibe edildiğinde $\text{TNF}\alpha$ 'nın aşırı üretimine yol açarak ölüm oranını artırdığını bulmuşlardır. Sinha B. ve arkadaşları ¹²⁶ LPS'nin artırdığı $\text{TNF}\alpha$ üretimini, NO^- 'in inhibe ettiğini ve bunu $\text{TNF}\alpha$ mRNA'sının yarı ömrünü azaltarak yaptığını göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda endotoksin uygulamasından sonra NO_3^- miktarını kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulduk, yüksek NO_3^- miktarı ile düşük $\text{TNF}\alpha$ arasında yakın bir ilişkinin varlığı vurgulanmaktadır. Diğer taraftan endotoksemi uygulanmasından sonraki 6.saatte bulduğumuz düşük $\text{TNF}\alpha$ düzeyleri hem Xuan ¹⁵⁶ hem de Wayte ve arkadaşlarının ¹⁴⁵ yaptığı iki farklı çalışmanın bulguları ile uygunluk içindedir. Bu çalışmacılar endotoksin uyguladıktan sonra veya enfeksiyonu takiben sürenin çok önemli olduğunu belirtmişlerdir. Xuan D. ve arkadaşları ratlara lethal dozda iv olarak endotoksin verip farklı saatlerde plazma $\text{TNF}\alpha$ seviyelerini ölçmüşlerdir. Endotoksin verdikten 60 dakika sonra $\text{TNF}\alpha$ seviyelerinin hızla arttığını, 120 dakika civarında pik yaptığını ve 240 dakika civarında ise bazal seviyeye düştüğünü gözlemişlerdir. Wayte J. ve arkadaşları ise S. Piyogenes'in neden olduğu septik şokta monoklonal antikorların $\text{TNF}\alpha$ 'ya etkisini incelemişler ve serum $\text{TNF}\alpha$ konsantrasyonunun 2. saatte pik yaptığını ve 4. saatte ise bazal seviyelere indiğini gözlemişlerdir. Diğer bazı çalışmacılar da düşük $\text{TNF}\alpha$ düzeyi ile yüksek Tau-CI miktarı arasında negatif bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir ²⁷ ve bu da bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Çünkü biz de yapmış olduğumuz çalışmada endotoksin grubunda Tau-CI miktarını kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulduk.

Taurin verdiğimiz grupta $TNF\alpha$ 'nın artışı, azalmış Tau-CI miktarı ile açıklanabilir çünkü inflamasyon durumunda nötrofiller tarafından salgılanan $TNF\alpha$, IL-1,6 ve $NO\cdot$ gibi proinflamatuvar ajanların miktarı yine bu hücrelerde taurin tarafından sentez edilen Tau-CI ile regüle edilmektedir ^{27, 84, 126}. $TNF\alpha$ 'a ilaveten taurin grubunda, endotoksin grubuna kıyasla $NO\cdot$ miktarının anlamlı olarak düşük olması bu sonuçlarımızı desteklemektedir.

Endotoksin verdikten sonraki 6. saatte elde ettiğimiz PMN lökositlerdeki MPO aktivitesini, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulduk. Bu bulgularımız inflamasyon şartları altında uyarılan nötrofillerin MPO aktivitesine bağlı olarak HOCl'leri oluşturduğunu gösteren diğer çalışmacıların sonuçları ile uyum içindedir ^{11, 27}. Nötrofil aktivasyonu ile MPO salınımının respiratuvar burst ile yakından ilişkili olduğu ve MPO yetersizliğinde respiratuvar burst aktivitesinin gözlenmediği araştırmacılar tarafından yayınlanmıştır ^{11, 109}. Egan ve arkadaşları çalışmalarında ³⁸ endotoksin injeksiyonundan sonra pulmoner nötrofil MPO aktivitesinde önemli bir artış olduğunu ancak bu artışın, taurin uygulamasından sonra anlamlı olarak azaldığını gözlemişlerdir. Çalışmamızda sadece taurin uygulanmış grupta, MPO aktivitesi kontrol grubuna göre yaklaşık iki kat artmış durumda idi fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Mc Loughlin ve arkadaşları da çalışmalarında ⁸⁷ taurinin, insan nötrofillerindeki MPO aktivitesini upregüle ettiğini Stapleton ve arkadaşları ise ¹²⁹ taurinin bu özelliğini onun HOCl ile yarışarak lökosit bütünlüğünü korumasına bağlı olduğunu belirtmişler ve bunların taurinin anti-inflamatuvar özelliklerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmamızda endotoksin ile birlikte taurin uyguladığımızda ise MPO aktivitesini kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulduk.

Görüldüğü gibi sonuçlarımıza göre taurin, inflamasyon şartları altında kullanıldığında MPO aracılıklı respiratuvar burst üzerinde etkili olmakta; tek başına kullanıldığında ise endotoksin gibi davranmaktadır.

MPO bir taraftan $NO\cdot$ ile ilişki kurarken diğer taraftan nötrofil sitoplazmasında bol miktarda olan taurin ile yakın ilişki içindedir. Uyarılan nötrofiller ROS'a ilaveten, iNOS aktivasyonu aracılığı ile $NO\cdot$ oluşturmaktadırlar. İleri derecede aktif serbest bir radikal olan $NO\cdot$ çeşitli biyolojik hedeflerle reaksiyona girebilmekte örneğin $O_2^{\cdot-}$ ile $OONO^{\cdot-}$ oluşturmakta, moleküler O_2 ile ise $NO_2^{\cdot-}$ ve $NO_3^{\cdot-}$ oluşturmaktadır. Son yıllarda $NO_2^{\cdot-}$ 'in fizyolojik pH'da $NO_2^{\cdot-}$ 'i $\rightarrow$ NO_2CI 'e dönüştürdüğü yayınlanmışlardır ⁸³.

But ve arkadaşları ²¹ MPO'nın organizmanın inflamasyona olan cevabında önemli bir enzim olduğunu ve NO[•] ve MPO arasında yakın bir ilişki olduğunu ifade etmişlerdir. NO[•], MPO'nın hem grubu ile reaksiyona girmektedir. Bu araştırmacılar bizim sonuçlarımıza ters olmakla birlikte düşük NO[•] miktarının peroksidaz aktivitesini artırdığını, yüksek NO miktarının ise peroksidaz aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Ancak bizim sonuçlarımıza göre yüksek MPO aktivitesi, yüksek NO₂⁻ ve NO₃⁻ miktarları ile birliktedir.

Gaut ve arkadaşları ⁴⁷ nötrofilleri Klebsiella pnömoni ile inkübe ettikleri in vitro çalışmalarında bu hücrelerde NO₂⁻, NO₃⁻ miktarının, normale göre 20 kat yüksek seviyede ölçmüşler ve MPO aracılığı ile serbest nitrojen türevlerinin oluşması için yüksek NO₂⁻ miktarına ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar nötrofiller ile yaptıkları in vitro bir çalışmada bu hücreleri E.coli ile inkübe ettikten sonra NO₂⁻ miktarının arttığını saptamışlar in vitro olarak NO₂⁻'in HOCl ile çok daha toksik yeni biyolojik ürünleri oluşturduğunu bu durumda taurinin HOCl ile birleşmeyeceğini göstermişler ancak in vivo şartlarda NO₂⁻, HOCl ile reaksiyona girmek için taurin ile yarışmaktadır ⁸³. Chi ve arkadaşları ²⁶ makrofaj hücre kültürlerinin LPS ile uyarılmasından sonra doza bağlı bir şekilde iNOS aktivasyonu sonucu, NO[•] miktarının önemli derecede arttığını, NO₂⁻ seviyesini ölçerek göstermişlerdir. Diğer bazı araştırmacılar da endotoksemiden sonra plazmada ve diğer dokularda NO[•] artışı, NO₂⁻ ve NO₃⁻ miktarını ölçerek göstermişler ve NO[•]'nun enfeksiyonlardaki önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Son yıllarda NO[•]'in endotoksemiye hemeodinamik cevabın önemli bir mediatörü olduğunu söylemişlerdir. Septik şoklu hastalarda lökositlerde NO[•] üretiminin önemli derecede arttığı bildirilmektedir ^{19, 20, 35}.

Diğer taraftan bu çalışmamızda tüm grupların nötrofil süspansiyonlarında taurin ve Tau-CI miktarları ölçülmüştür. Endotoksin uygulamasından sonra Tau-CI miktarının arttığı, taurin ile endotoksin birlikte verilince ise azaldığı gözlenmiştir. Bu her iki fark istatistiksel olarak anlamlıdır. İn vitro olarak yapılan çalışmalarda taurin verildikten sonra Tau-CI miktarının arttığı Kim ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır ⁶⁸. Tek başına taurin uygulamasının ise Tau-CI miktarını ileri derecede azalttığı tespit edilmiştir. Ancak bu grubun nötrofil taurin miktarı, taurin uygulamasına rağmen çok düşük olarak tespit edilmiştir. Bu durumda Tau-CI'nin düşük olması çok doğal görülmektedir. Taurin uygulamasından sonra nötrofil taurin miktarının bu kadar düşük olması bazı araştırmacıların sonuçları ile çelişirken bazı araştırmacıların sonuçları ile paralellik göstermektedir. Araştırmacılar plazma ve nötrofil taurin konsantrasyonu arasında bir korelasyon olmadığını ayrıca

taurinin, özel inraselüler aminoasit transport sistemleri ile hücre içine alındığını ve düşük taurin diyetini takiben taurin transpotunun arttığını, yüksek taurin diyeti ile azaldığını belirtmişlerdir ^{42, 133}. Ayrıca bu çalışmacılar değişik hücre tipleri ile yapmış oldukları çalışmalarda taurinin, taurin transporterlerini downregüle ettiğini tespit etmişlerdir ¹³³. Engel ve arkadaşları da ⁴² sepsisli hastaların nötrofillerinde taurin miktarını kontrol gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Biz de daha önce yaptığımız henüz yayınlanmamış bir çalışmamızda taurin verdikten sonra lökosit süspansiyonlarında taurin miktarı azalırken, plazma taurin konsantrasyonun arttığını bulduk. Endotoksin uygulamasından sonra Tau-CI seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığını bulduk. Ancak endotoksin ile birlikte taurin uyguladığımızda Tau-CI miktarı yukarıda bahsettiğimiz nedenlere bağlı olarak anlamlı olarak azaldı. Araştırmacılar inflamasyon şartları altında yüksek seviyede MPO katalizi ile HOCl'lerin oluştuğunu ve yine nötrofil sitoplazmasında bol miktarda bulunan taurin ile reaksiyona girerek Tau-CI oluşturduğunu belirtmişlerdir ve yine son yıllarda Tau-CI'in nötrofil fonksiyonlarını regüle ettiğini, proinflamatuvar mediatör oluşumunu doza bağlı olarak inhibe ettiğini bildirmektedirler ^{38, 74, 84, 123}. Bu sonuçlar bizim endotoksin aracılıklı Tau-CI artışı konusundaki bulgularımızı desteklemektedir.

Bütün bu bulgularımıza dayanarak çalışmamızın sonuçlarını şu şekilde yorumlayabiliriz: in vivo şartlarda deneysel olarak 4 mg/kg dozunda endotoksin uygulamasından sonra nötrofil respiratuar burst aktivitesinin önemli bir enzimi olan MPO-H₂O₂-Halid sistem aktivitesi arttığı ve bununla ilgili olarak nötrofil taurin miktarının azalmasına bağlı olarak Tau-CI miktarının yükseldiği, NO₂⁻ ve NO₃⁻ seviyesinin aynı şekilde arttığını gözledik. Bu bulguların enfeksiyonlardan sonra nötrofil fonksiyonlarının gösterilmesinde önemli bir kriter olduğu kabul edilebilir. Bir antioksidan olarak kullanmayı düşündüğümüz taurinin etkisi karşımıza çelişkili sonuçlar şeklinde çıkmıştır ancak çalışmamızda taurinin etkisini incelerken nötrofillerde hangi konsantrasyonda etkili olabileceğine karar vermek açısından bu hücrelerde taurin miktarlarını da ölçtük. Taurin, endotoksin ile birlikte verildiğinde MPO-H₂O₂-Halid sisteminin aktivitesini kontrol grubuna göre azalttı. Buna bağlı olarak da Tau-CI miktarı da paralel olarak azaldı. Bu azalmayı Tau-CI oluşumuna bağladık. Bu konsantrasyondaki taurin, nötrofillerde NO₂⁻ ve NO₃⁻ miktarını anlamlı olarak azalttığını gördük. Ancak tek başına taurin verdiğimizde, hücrede taurin miktarı artışı beklerken taurin miktarı azaldı. Bunu taurin transporterlerinin inhibe olmasına bağladık. Buna bağlı olarak MPO-H₂O₂-Halid sistemin aktivitesi endotoksin grubunki ile aynı idi. Tek başına taurin NO₂⁻ miktarı üzerinde etkili değildi.

Sonuç olarak enfeksiyon durumunda taurin uygulamasının etkili olduğu, ancak enfekte olmamış sağlıklı deneklerde bir antioksidan olarak kullanılabilirliğinin uygun olamadığını düşünöyoruz. Ayrıca taurinin etkisinin doza bağlı olarak in vivo şartlarda in vitro şartlardan farklı olabileceğine inanıyoruz.

6. ÖZET

Reaktif oksijen türlerinin antibakterisidal etkileri ve oksidatif doku harabiyetlerine ilişkin yoğun çalışmalar yapılmasına rağmen bu çalışmaların büyük bir çoğunluğu hücre kültürü ile yapılan in vitro çalışmalardır. İn vivo şartlarda nötrofillerin uyarılmasından sonra MPO-H₂O₂-Halid sistem aktivitesinin NO₂⁻ ve taurin ile ilişkisini araştıran ve bu şekilde bu hücrelerin fonksiyonları hakkında karar veren bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu çalışmadaki amacımız in vitro olarak endotoksinin stimüle ettiği nötrofillerdeki respirator burst aktivitesini incelemek ayrıca endotoksin ile birlikte antioksidan bir aminoasit olan taurin uyguladıktan sonra taurinin nötrofillerin antibakterisidal ve antiinflamatuvar fonksiyonları üzerine etkisini incelemektir. Çalışmamızın bir diğer amacı da taurinin bu etkilerinin nötrofillerde hangi konsantrasyonlarda yaptığını belirlemektir.

Bu amaçla her bir grupta 10 adet olacak şekilde 4 ayrı kobay grubu oluşturuldu. Endotoksemi grubuna 4 mg/kg LPS, taurin grubuna 300mg/kg dozda taurin, taurin+endotoksemi grubuna ise 300mg/kg dozda taurinden hemen sonra 4 mg/kg dozda LPS, kontrol grubuna da aynı miktarda serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edildi. 6 saat sonra kobaylardan elde edilen lökosit süspansiyonlarından: total proteini tayini, NO₂⁻, NO₃⁻, total NO, taurin ve Tau-CI ölçümleri, MPO enzim aktivite tayini ve serumlarında ise TNF α tayini yapılmıştır.

Endotoksin uygulamasından sonra nötrofil MPO-H₂O₂-Halid sistem aktivitesinin arttığını ve bununla ilgili olarak nötrofil taurin miktarının azalmasına bağlı olarak Tau-CI miktarının yükseldiği, NO₂⁻ ve NO₃⁻ seviyesinin aynı şekilde arttığını gözledik. Bir antioksidan olarak kullanmayı düşündüğümüz taurinin etkisi karşımıza çelişkili sonuçlar şeklinde çıkmıştır. Taurin, endotoksin ile birlikte verildiğinde MPO-H₂O₂-Halid sisteminin aktivitesini kontrol grubuna göre azalttı. Buna bağlı olarak da Tau-CI miktarı da paralel olarak azaldı. Bu azalmayı Tau-CI oluşumuna bağladık. Bu konsantrasyondaki taurin, nötrofillerde NO₂⁻ ve NO₃⁻ miktarını anlamlı olarak azalttığını gördük. Ancak tek başına taurin verdiğimizde hücrede taurin artışı beklerken taurin transporterlerinin inhibe olmasına bağlı olarak taurin miktarı azaldı ve buna bağlı olarak MPO-H₂O₂-Halid sistemin aktivitesi endotoksin grubunkine ile aynı idi. Tek başına taurin, NO₂⁻ miktarı üzerinde etkili değildi.

Sonuç olarak taurinin enfeksiyon durumunda uygulamasının etkili olduğunu, ancak enfekte olmamış sağlıklı deneklerde bir antioksidan olarak kullanılabilirliğinin uygun olmadığını düşünüyoruz. Ayrıca taurinin etkisinin doza bağlı olarak in vivo şartlarda in vitro şartlardan farklı olabileceğine inanıyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Abbas AK, L. A., Pober SJ (1997): Cellular and Molecular Immunology. Saunders. Philadelphia.
2. Abu-Soud, H. M., and Hazen, S. L. (2000): Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 275, 5425-30.
3. Adler, J. (1976): The sensing of chemicals by bacteria. *Sci Am* 234, 40-7.
4. Airaksinen, E. M., Paljarvi, L., Partanen, J., Collan, Y., Laakso, R., and Pentikainen, T. (1990): Taurine in normal and diseased human skeletal muscle. *Acta Neurol Scand* 81, 1-7.
5. Akaike, T., and Maeda, H. (2000): Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 101, 300-8.
6. Ambruso, D. R., Bolscher, B. G., Stokman, P. M., Verhoeven, A. J., and Roos, D. (1990): Assembly and activation of the NADPH:O₂ oxidoreductase in human neutrophils after stimulation with phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 265, 924-30.
7. Arai, K. I., Lee, F., Miyajima, A., Miyatake, S., Arai, N., and Yokota, T. (1990): Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem* 59, 783-836.
8. Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., and Butler, J. (1988): The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. *Biochem J* 256, 251-5.
9. Assreuy, J., Cunha, F. Q., Liew, F. Y., and Moncada, S. (1993): Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 108, 833-7.
10. Babior, B. M. (1978): Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med* 298, 659-68.
11. Babior, B. M. (2000): Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109, 33-44.
12. Banks, M. A., Porter, D. W., Martin, W. G., and Castranova, V. (1992): Taurine protects against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes. *Adv Exp Med Biol* 315, 341-54.
13. Barua, M., Liu, Y., and Quinn, M. R. (2001): Taurine chloramine inhibits inducible nitric oxide synthase and TNF- α gene expression in activated alveolar macrophages: decreased NF- κ B activation and IkappaB kinase activity. *J Immunol* 167, 2275-81.
14. Batchelor, R. H., and Zhou, M. (2004): Use of cellular glucose-6-phosphate dehydrogenase for cell quantitation: applications in cytotoxicity and apoptosis assays. *Anal Biochem* 329, 35-42.

15. Beauchamp, R. O., Jr., Andjelkovich, D. A., Kligerman, A. D., Morgan, K. T., and Heck, H. D. (1985): A critical review of the literature on acrolein toxicity. *Crit Rev Toxicol* 14, 309-80.
16. Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., and Crow, J. P. (1994): Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol* 233, 229-40.
17. Birdsall, T. C. (1998): Therapeutic applications of taurine. *Altern Med Rev* 3, 128-36.
18. Boxer, L. A. (1990): The role of antioxidants in modulating neutrophil functional responses. *Adv Exp Med Biol* 262, 19-33.
19. Braulio, V. B., Ten Have, G. A., Vissers, Y. L., and Deutz, N. E. (2004): Time course of nitric oxide production after endotoxin challenge in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287, E912-8.
20. Burgner, D., Rockett, K., and Kwiatkowski, D. (1999): Nitric oxide and infectious diseases. *Arch Dis Child* 81, 185-8.
21. But, P. G., Murav'ev, R. A., Fomina, V. A., and Rogovin, V. V. (2004): [Oxides of nitrogen (NO* and NO₂-) as cofactors of the myeloperoxidase system]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 269-73.
22. Buttery, L. D., Springall, D. R., Chester, A. H., Evans, T. J., Standfield, E. N., Parums, D. V., Yacoub, M. H., and Polak, J. M. (1996): Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 75, 77-85.
23. Carreras, M. C., Riobo, N. A., Pargament, G. A., Boveris, A., and Poderoso, J. J. (1997): Effects of respiratory burst inhibitors on nitric oxide production by human neutrophils. *Free Radic Res* 26, 325-34.
24. Center, D. M., Kornfeld, H., and Cruikshank, W. W. (1996): Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 17, 476-81.
25. Chesney, R. W. (1985): Taurine: its biological role and clinical implications. *Adv Pediatr* 32, 1-42.
26. Chi, D. S., Qui, M., Krishnaswamy, G., Li, C., and Stone, W. (2003): Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. *Nitric Oxide* 8, 127-32.

27. Chorazy, M., Kontny, E., Marcinkiewicz, J., and Maslinski, W. (2002): Taurine chloramine modulates cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Amino Acids* 23, 407-13.
28. Cimen, B., Turkozkan, N., Seven, I., Unlu, A., and Karasu, C. (2004): Impaired Na⁺,K⁺-ATPase activity as a mechanism of reactive nitrogen species-induced cytotoxicity in guinea pig liver exposed to lipopolysaccharides. *Mol Cell Biochem* 259, 53-7.
29. Clark, I. A., and Chaudhri, G. (1988): Tumour necrosis factor may contribute to the anaemia of malaria by causing dyserythropoiesis and erythrophagocytosis. *Br J Haematol* 70, 99-103.
30. Cose, C. (1994): Glossory of cytokines.
31. Cunningham, C., Tipton, K. F., and Dixon, H. B. (1998): Conversion of taurine into N-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulhoacetaldehyde in response to oxidative stress. *Biochem J* 330 (Pt 2), 939-45.
32. Cutts, J. H. (1970): *Cell Separation Methods in Hematology*. Academic Pres. New York and London.
33. Cuzzocrea, S., Riley, D. P., Caputi, A. P., and Salvemini, D. (2001): Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53, 135-59.
34. Demaurex, N., Schrenzel, J., Jaconi, M. E., Lew, D. P., and Krause, K. H. (1993): Proton channels, plasma membrane potential, and respiratory burst in human neutrophils. *Eur J Haematol* 51, 309-12.
35. Deshmukh, D. R., Ghole, V. S., Marescau, B., and De Deyn, P. P. (1997): Effect of endotoxemia on plasma and tissue levels of nitric oxide metabolites and guanidino compounds. *Arch Physiol Biochem* 105, 32-7.
36. Duffy, A. J., Nolan, B., Sheth, K., Collette, H., De, M., and Bankey, P. E. (2000): Inhibition of alveolar neutrophil immigration in endotoxemia is macrophage inflammatory protein 2 independent. *J Surg Res* 90, 51-7.
37. Edelson, P. J., and Cohn, Z. A. (1973): Peroxidase-mediated mammalian cell cytotoxicity. *J Exp Med* 138, 318-23.

38. Egan, B. M., Abdih, H., Kelly, C. J., Condrón, C., and Bouchier-Hayes, D. J. (2001): Effect of intravenous taurine on endotoxin-induced acute lung injury in sheep. *Eur J Surg* 167, 575-80.
39. Eiserich, J. P., Cross, C. E., Jones, A. D., Halliwell, B., and van der Vliet, A. (1996): Formation of nitrating and chlorinating species by reaction of nitrite with hypochlorous acid. A novel mechanism for nitric oxide-mediated protein modification. *J Biol Chem* 271, 19199-208.
40. Eiserich, J. P., Hristova, M., Cross, C. E., Jones, A. D., Freeman, B. A., Halliwell, B., and van der Vliet, A. (1998): Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391, 393-7.
41. Ellis, J. A., Cross, A. R., and Jones, O. T. (1989): Studies on the electron-transfer mechanism of the human neutrophil NADPH oxidase. *Biochem J* 262, 575-9.
42. Engel, J. M., Muhling, J., Weiss, S., Karcher, B., Lohr, T., Menges, T., Little, S., and Hempelmann, G. (2006): Relationship of taurine and other amino acids in plasma and in neutrophils of septic trauma patients. *Amino Acids* 30, 87-94.
43. Evans, T. J., Buttery, L. D., Carpenter, A., Springall, D. R., Polak, J. M., and Cohen, J. (1996): Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9553-8.
44. Foote, C. S., Goyne, T. E., and Lehrer, R. I. (1983): Assessment of chlorination by human neutrophils. *Nature* 301, 715-6.
45. Forman, H. J., and Thomas, M. J. (1986): Oxidant production and bactericidal activity of phagocytes. *Annu Rev Physiol* 48, 669-80.
46. Fujii, H., Ichimori, K., Hoshiai, K., and Nakazawa, H. (1997): Nitric oxide inactivates NADPH oxidase in pig neutrophils by inhibiting its assembling process. *J Biol Chem* 272, 32773-8.
47. Gaut, J. P., Byun, J., Tran, H. D., Lauber, W. M., Carroll, J. A., Hotchkiss, R. S., Belaouaj, A., and Heinecke, J. W. (2002): Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. *J Clin Invest* 109, 1311-9.
48. Geller, D. A., Freeswick, P. D., Nguyen, D., Nussler, A. K., Di Silvio, M., Shapiro, R. A., Wang, S. C., Simmons, R. L., and Billiar, T. R. (1994): Differential induction of nitric oxide

- synthase in hepatocytes during endotoxemia and the acute-phase response. *Arch Surg* 129, 165-71.
49. Glowick SP, K. S. (1955): *Methods in Enzymology*. Academic Pres Inc.
 50. Gurujeyalakshmi, G., Wang, Y., and Giri, S. N. (2000): Taurine and niacin block lung injury and fibrosis by down-regulating bleomycin-induced activation of transcription nuclear factor-kappaB in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 293, 82-90.
 51. Guyton, C. G. (1971): *Textbook of Medical Physiology*. Toronto.
 52. Hamaguchi T., A. J., Schaffer S Sarcolemmal action of taurine linked to altered phospholipit N- methylation. Plenum Press. New York.
 53. Hansson, M., Olsson, I., and Nauseef, W. M. (2006): Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys* 445, 214-24.
 54. Harada, H., Cusack, B. J., Olson, R. D., Stroo, W., Azuma, J., Hamaguchi, T., and Schaffer, S. W. (1990): Taurine deficiency and doxorubicin: interaction with the cardiac sarcolemmal calcium pump. *Biochem Pharmacol* 39, 745-51.
 55. Hazen, S. L., and Heinecke, J. W. (1997): 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 99, 2075-81.
 56. Hazen, S. L., Hsu, F. F., and Heinecke, J. W. (1996): p-Hydroxyphenylacetaldehyde is the major product of L-tyrosine oxidation by activated human phagocytes. A chloride-dependent mechanism for the conversion of free amino acids into reactive aldehydes by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 271, 1861-7.
 57. Hazen, S. L., Zhang, R., Shen, Z., Wu, W., Podrez, E. A., MacPherson, J. C., Schmitt, D., Mitra, S. N., Mukhopadhyay, C., Chen, Y., Cohen, P. A., Hoff, H. F., and Abu-Soud, H. M. (1999): Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo. *Circ Res* 85, 950-8.
 58. Hochachka, P. W. (1986): Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science* 231, 234-41.
 59. Huxtable, R. J. (1992): Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72, 101-63.

60. Iha, S., Orita, K., Kanno, T., Utsumi, T., Sato, E. F., Inoue, M., and Utsumi, K. (1996): Oxygen-dependent inhibition of neutrophil respiratory burst by nitric oxide. *Free Radic Res* 25, 489-98.
61. Iyer, G. Y., Nair, M. S., and Sukumaran, M. (1961): Metabolic effects of alpha-oxobutyric acid: effect on respiration of rat-liver homogenates. *Biochem J* 78, 766-9.
62. Jandle, J. (1987): *Text Book of Haematology*. Little Brown and Company.
63. Johnson DW, M. D. (1991): *Inorg Chem* 30, 4845-4851.
64. Junqueira LC, C. J. (2003): *Basic Histology*. Nobel Tip.
65. Kang, Y. S., Ohtsuki, S., Takanaga, H., Tomi, M., Hosoya, K., and Terasaki, T. (2002): Regulation of taurine transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor-alpha, taurine and hypertonicity. *J Neurochem* 83, 1188-95.
66. Karayalçın, U. (1984): *Klinik Hematoloji*. Ankara.
67. Kilbourn, R. G., Jubran, A., Gross, S. S., Griffith, O. W., Levi, R., Adams, J., and Lodato, R. F. (1990): Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 1132-8.
68. Kim, C., Chung, J. K., Jeong, J. M., Chang, Y. S., Lee, Y. J., Kim, Y. J., Lee, M. C., Koh, C. S., and Kim, B. K. (1998): Uptake of taurine and taurine chloramine in murine macrophages and their distribution in mice with experimental inflammation. *Adv Exp Med Biol* 442, 169-76.
69. Klebanoff, S. J. (1967): Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. *J Exp Med* 126, 1063-78.
70. Knowles, R. G., Merrett, M., Salter, M., and Moncada, S. (1990): Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J* 270, 833-6.
71. Kochakian, C. D. (1973): Hypotaurine: regulation of production in seminal vesicles and prostate of guinea-pig by testosterone. *Nature* 241, 202-3.
72. Kontny, E., Ziolkowska, M., Ryzewska, A., and Maslinski, W. (1999): Protein kinase c-dependent pathway is critical for the production of pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-1beta, IL-6). *Cytokine* 11, 839-48.
73. Krinsky, P. C. A. a. N. I. *Methods in Enzymology*. 132, 132, 369.

74. Kwasny-Krochin, B., Bobek, M., Kontny, E., Gluszko, P., Biedron, R., Chain, B. M., Maslinski, W., and Marcinkiewicz, J. (2002): Effect of taurine chloramine, the product of activated neutrophils, on the development of collagen-induced arthritis in DBA 1/J mice. *Amino Acids* 23, 419-26.
75. Kwiatkowski, D., Hill, A. V., Sambou, I., Twumasi, P., Castracane, J., Manogue, K. R., Cerami, A., Brewster, D. R., and Greenwood, B. M. (1990): TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral, and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* 336, 1201-4.
76. Leeuwenburgh, C., Rasmussen, J. E., Hsu, F. F., Mueller, D. M., Pennathur, S., and Heinecke, J. W. (1997): Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem* 272, 3520-6.
77. Lilius, E. M., and Marnila, P. (1992): Photon emission of phagocytes in relation to stress and disease. *Experientia* 48, 1082-91.
78. Liu, Y., Tonna-DeMasi, M., Park, E., Schuller-Levis, G., and Quinn, M. R. (1998): Taurine chloramine inhibits production of nitric oxide and prostaglandin E2 in activated C6 glioma cells by suppressing inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression. *Brain Res Mol Brain Res* 59, 189-95.
79. Lombardini, J. B. (1992): Review: recent studies on taurine in the central nervous system. *Adv Exp Med Biol* 315, 245-51.
80. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75.
81. Mainnemare, A., Megarbane, B., Soueidan, A., Daniel, A., and Chapple, I. L. (2004): Hypochlorous acid and taurine-N-monochloramine in periodontal diseases. *J Dent Res* 83, 823-31.
82. Malawista, S. E., Montgomery, R. R., and Van Blaricom, G. (1996): Microbial killing by human neutrophil cytokineplasts: similar suppressive effects of reversible and irreversible inhibitors of nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 60, 753-7.

83. Marcinkiewicz, J., Chain, B., Nowak, B., Grabowska, A., Bryniarski, K., and Baran, J. (2000): Antimicrobial and cytotoxic activity of hypochlorous acid: interactions with taurine and nitrite. *Inflamm Res* 49, 280-9.
84. Marcinkiewicz, J., Nowak, B., Grabowska, A., Bobek, M., Petrovska, L., and Chain, B. (1999): Regulation of murine dendritic cell functions in vitro by taurine chloramine, a major product of the neutrophil myeloperoxidase-halide system. *Immunology* 98, 371-8.
85. Marquez, L. A., and Dunford, H. B. (1994): Chlorination of taurine by myeloperoxidase. Kinetic evidence for an enzyme-bound intermediate. *J Biol Chem* 269, 7950-6.
86. McCormick, M. L., Gaut, J. P., Lin, T. S., Britigan, B. E., Buettner, G. R., and Heinecke, J. W. (1998): Electron paramagnetic resonance detection of free tyrosyl radical generated by myeloperoxidase, lactoperoxidase, and horseradish peroxidase. *J Biol Chem* 273, 32030-7.
87. McLoughlin, D. M., Stapleton, P. P., and Bloomfield, F. J. (1991): Influence of taurine and a substituted taurine on the respiratory burst pathway in the inflammatory response. *Biochem Soc Trans* 19, 73-8.
88. McMahon, G. P., O'Kennedy, R., and Kelly, M. T. (1996): High-performance liquid chromatographic determination of taurine in human plasma using pre-column extraction and derivatization. *J Pharm Biomed Anal* 14, 1287-94.
89. McNally, J. S., Davis, M. E., Giddens, D. P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H., and Harrison, D. G. (2003): Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H2290-7.
90. Meier, B., Cross, A. R., Hancock, J. T., Kaup, F. J., and Jones, O. T. (1991): Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J* 275 (Pt 1), 241-5.
91. Metodiewa, D., and Dunford, H. B. (1990): The role of myeloperoxidase in the oxidation of biologically active polyhydroxyphenols (substituted catechols). *Eur J Biochem* 193, 445-8.
92. Miranda, K. M., Espey, M. G., and Wink, D. A. (2001): A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5, 62-71.
93. Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1991): Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43, 109-42.

94. Murray, R. K. (1993): Harper's Biochemistry. Appletan and Lange California.
95. Müftüoğlu, E. (1987): Klinik Hematoloji. Diyarbakır.
96. Nagl, M., Teuchner, B., Pottinger, E., Ulmer, H., and Gottardi, W. (2000): Tolerance of N-chlorotaurine, a new antimicrobial agent, in infectious conjunctivitis - a phase II pilot study. *Ophthalmologica* 214, 111-4.
97. Nakamori, K., Koyama, I., Nakamura, T., Yoshida, T., Umeda, M., and Inoue, K. (1990): Effectiveness of taurine in protecting biomembrane against oxidant. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 38, 3116-9.
98. Nathan, C. (1992): Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J* 6, 3051-64.
99. Nathan, C. (1994): Nitric oxide and biopterin: a study in Chiaroscuro. *J Clin Invest* 93, 1875-6.
100. Nicolini, F. A., and Mehta, J. L. (1990): Inhibitory effect of unstimulated neutrophils on platelet aggregation by release of a factor similar to endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Biochem Pharmacol* 40, 2265-9.
101. Noyan, A. (1988): Fizyoloji Ders Kitabı. Anadolu Üniversitesi Yayını.
102. Noyan, A. (2000): Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. Ankara.
103. Old, L. J. (1985): Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230, 630-2.
104. Panasenکو, O. M., Briviba, K., Klotz, L. O., and Sies, H. (1997): Oxidative modification and nitration of human low-density lipoproteins by the reaction of hypochlorous acid with nitrite. *Arch Biochem Biophys* 343, 254-9.
105. Park, E., Quinn, M. R., Wright, C. E., and Schuller-Levis, G. (1993): Taurine chloramine inhibits the synthesis of nitric oxide and the release of tumor necrosis factor in activated RAW 264.7 cells. *J Leukoc Biol* 54, 119-24.
106. Parkinson, J. F., and Gabig, T. G. (1988): Phagocyte NADPH-oxidase. Studies with flavin analogues as active site probes in triton X-100-solubilized preparations. *J Biol Chem* 263, 8859-63.
107. Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H., Freeman, B. A., and Darley-Usmar, V. M. (1999): Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta* 1411, 385-400.

108. Peakman M, V. D. (1997): Basic and Clinical Immunology. Churcill Livingstone. New York.
109. Podrez, E. A., Abu-Soud, H. M., and Hazen, S. L. (2000): Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 28, 1717-25.
110. Reiling, N., Kroncke, R., Ulmer, A. J., Gerdes, J., Flad, H. D., and Hauschildt, S. (1996): Nitric oxide synthase: expression of the endothelial, Ca²⁺/calmodulin-dependent isoform in human B and T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26, 511-6.
111. Rengasamy, A., and Johns, R. A. (1993): Inhibition of nitric oxide synthase by a superoxide generating system. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 1024-7.
112. Robbins, C. C. (2000): Basic Pathology. Nobel, İstanbul. Philadelphia.
113. Rockett, K. A., Awburn, M. M., Rockett, E. J., and Clark, I. A. (1994): Tumor necrosis factor and interleukin-1 synergy in the context of malaria pathology. *Am J Trop Med Hyg* 50, 735-42.
114. Romio, L., Zegarra, M., Varesio, L., and Galletta, L. J. V. (2001): Regulation of taurine transport in murine macrophages. *Amino Acids* 21, 151-60.
115. Rossi, F. (1986): The O₂⁻-forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim Biophys Acta* 853, 65-89.
116. Rowley, D. A., and Halliwell, B. (1983): Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanisms: relevance to the pathology of rheumatoid disease. *Clin Sci (Lond)* 64, 649-53.
117. Rubanyi, G. M., Ho, E. H., Cantor, E. H., Lumma, W. C., and Botelho, L. H. (1991): Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 1392-7.
118. Sade, K., Schwartz, D., Wolman, Y., Schwartz, I., Chernichovski, T., Blum, M., Brazowski, E., Keynan, S., Raz, I., Blantz, R. C., and Iaina, A. (1999): Time course of lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase mRNA expression in rat glomeruli. *J Lab Clin Med* 134, 471-7.
119. Sass, G., Koerber, K., Bang, R., Guehring, H., and Tiegs, G. (2001): Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. *J Clin Invest* 107, 439-47.

120. Sbarra, A. J., and Karnovsky, M. L. (1959): The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 234, 1355-62.
121. Schaffer S.W., A. J. (1992): Myocardial physiological effect of taurine and their significance. Plenum Press. New York.
122. Schmitt, D., Shen, Z., Zhang, R., Colles, S. M., Wu, W., Salomon, R. G., Chen, Y., Chisolm, G. M., and Hazen, S. L. (1999): Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. *Biochemistry* 38, 16904-15.
123. Schuller-Levis, G. B., and Park, E. (2004): Taurine and its chloramine: modulators of immunity. *Neurochem Res* 29, 117-26.
124. Schurr, A., Tseng, M. T., West, C. A., and Rigor, B. M. (1987): Taurine improves the recovery of neuronal function following cerebral hypoxia: an in vitro study. *Life Sci* 40, 2059-66.
125. Sethi, S., and Dikshit, M. (2000): Modulation of polymorphonuclear leukocytes function by nitric oxide. *Thromb Res* 100, 223-47.
126. Sinha, B., Eigler, A., Baumann, K. H., Greten, T. F., Moeller, J., and Endres, S. (1998): Nitric oxide downregulates tumour necrosis factor in mRNA in RAW 264.7 cells. *Res Immunol* 149, 139-50.
127. Smith, E. L., Hill, R.L., Lehman, I.R., Lefkowitz, R.J., Handler, P., White A (1985): Principles of Biochemistry Mammalian Biochemistry.
128. Spolarics, Z., Siddiqi, M., Siegel, J. H., Garcia, Z. C., Stein, D. S., Ong, H., Livingston, D. H., Denny, T., and Deitch, E. A. (2001): Increased incidence of sepsis and altered monocyte functions in severely injured type A- glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient African American trauma patients. *Crit Care Med* 29, 728-36.
129. Stapleton, P. P., Redmond, H. P., and Bouchier-Hayes, D. J. (1998): Myeloperoxidase (MPO) may mediate neutrophil adherence to the endothelium through upregulation of CD11B expression--an effect downregulated by taurine. *Adv Exp Med Biol* 442, 183-92.

130. Stendahl, O., Coble, B. I., Dahlgren, C., Hed, J., and Molin, L. (1984): Myeloperoxidase modulates the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophil leukocytes. Studies with cells from a myeloperoxidase-deficient patient. *J Clin Invest* 73, 366-73.
131. Stites DP, T. A., Parslow TG (1997): *Medical Immunology*. Appleton&Lange. Connecticut.
132. Takeda, K., Kamanaka, M., Tanaka, T., Kishimoto, T., and Akira, S. (1996): Impaired IL-13-mediated functions of macrophages in STAT6-deficient mice. *J Immunol* 157, 3220-2.
133. Tappaz, M. L. (2004): Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations. *Neurochem Res* 29, 83-96.
134. Thelen, M., Dewald, B., and Baggiolini, M. (1993): Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol Rev* 73, 797-821.
135. Tiao, G., Rafferty, J., Ogle, C., Fischer, J. E., and Hasselgren, P. O. (1994): Detrimental effect of nitric oxide synthase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of tumor necrosis factor and interleukin-6. *Surgery* 116, 332-7; discussion 337-8.
136. Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., and Moncada, S. (1992): Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339, 572-5.
137. Van Bruggen, R., Bautista, J. M., Petropoulou, T., de Boer, M., van Zwieten, R., Gomez-Gallego, F., Belohradsky, B. H., Hartwig, N. G., Stevens, D., Mason, P. J., and Roos, D. (2002): Deletion of leucine 61 in glucose-6-phosphate dehydrogenase leads to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood* 100, 1026-30.
138. Van Dalen, C. J., Winterbourn, C. C., Senthilmohan, R., and Kettle, A. J. (2000): Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. Implications for nitration and hypochlorous acid production at sites of inflammation. *J Biol Chem* 275, 11638-44.
139. Van der Vliet, A., Eiserich, J. P., Kaur, H., Cross, C. E., and Halliwell, B. (1996): Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods Enzymol* 269, 175-84.

140. Vassalli, P. (1992): The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol* 10, 411-52.
141. Velazquez, A., Delgado, N. M., and Rosado, A. (1986): Taurine content and amino acid composition of human acrosome. *Life Sci* 38, 991-5.
142. Vos, T. A., Gouw, A. S., Klok, P. A., Havinga, R., van Goor, H., Huitema, S., Roelofsen, H., Kuipers, F., Jansen, P. L., and Moshage, H. (1997): Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced liver damage in rats. *Gastroenterology* 113, 1323-33.
143. Wallwork, C. J., Parks, D. A., and Schmid-Schonbein, G. W. (2003): Xanthine oxidase activity in the dexamethasone-induced hypertensive rat. *Microvasc Res* 66, 30-7.
144. Wang, W. Q., Merriam, D. L., Moses, A. S., and Francis, G. A. (1998): Enhanced cholesterol efflux by tyrosyl radical-oxidized high density lipoprotein is mediated by apolipoprotein AI-AII heterodimers. *J Biol Chem* 273, 17391-8.
145. Wayte, J., Silva, A. T., Krausz, T., and Cohen, J. (1993): Observations on the role of tumor necrosis factor-alpha in a murine model of shock due to *Streptococcus pyogenes*. *Crit Care Med* 21, 1207-12.
146. Weiss, S. J. (1986): Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl* 548, 9-37.
147. Weiss, S. J., Klein, R., Slivka, A., and Wei, M. (1982): Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *J Clin Invest* 70, 598-607.
148. Wheeler, M. A., Yoon, J. H., Olsson, L. E., and Weiss, R. M. (2001): Cyclooxygenase-2 protein and prostaglandin E(2) production are up-regulated in a rat bladder inflammation model. *Eur J Pharmacol* 417, 239-48.
149. Whiteman, M., Hooper, D. C., Scott, G. S., Koprowski, H., and Halliwell, B. (2002): Inhibition of hypochlorous acid-induced cellular toxicity by nitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12061-6.
150. Whiteman, M., Rose, P., and Halliwell, B. (2003): Inhibition of hypochlorous acid-induced oxidative reactions by nitrite: is nitrite an antioxidant? *Biochem Biophys Res Commun* 303, 1217-24.

151. Winterbourn, C. C., Pichorner, H., and Kettle, A. J. (1997): Myeloperoxidase-dependent generation of a tyrosine peroxide by neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 338, 15-21.
152. Winterbourn, C. C., van den Berg, J. J., Roitman, E., and Kuypers, F. A. (1992): Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid. *Arch Biochem Biophys* 296, 547-55.
153. Wintrobe MM, L. G., Boggs DR, Bithell TC (1985): *Clinical Haematology*. Great of Henry Kimpton. London.
154. Wolach, B., Ashkenazi, M., Grossmann, R., Gavrieli, R., Friedman, Z., Bashan, N., and Roos, D. (2004): Diurnal fluctuation of leukocyte G6PD activity. A possible explanation for the normal neutrophil bactericidal activity and the low incidence of pyogenic infections in patients with severe G6PD deficiency in Israel. *Pediatr Res* 55, 807-13.
155. Wright, C. E., Tallan, H. H., Lin, Y. Y., and Gaull, G. E. (1986): Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem* 55, 427-53.
156. Xuan, D., Nicolau, D. P., Nightingale, C. H., and Quintiliani, R. (2001): Circulating tumor necrosis factor-alpha production during the progression of rat endotoxic sepsis. *Chemotherapy* 47, 194-202.
157. Yang, F., Comtois, A. S., Fang, L., Hartman, N. G., and Blaise, G. (2002): Nitric oxide-derived nitrate anion contributes to endotoxic shock and multiple organ injury/dysfunction. *Crit Care Med* 30, 650-7.
158. Yeh, G. C., Henderson, J. P., Byun, J., Andre d'Avignon, D., and Heinecke, J. W. (2003): 8-Nitroxanthine, a product of myeloperoxidase, peroxynitrite, and activated human neutrophils, enhances generation of superoxide by xanthine oxidase. *Arch Biochem Biophys* 418, 1-12.
159. Zgliczynski, J. M., and Stelmaszynska, T. (1975): Chlorinating ability of human phagocytosing leucocytes. *Eur J Biochem* 56, 157-62.