

TÜBİTAK

2008-275



TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
Health Sciences Research Group

9/ 95426

**Orak Hücre Anemisinde Nötrofil Oksidazlar ve Nitrik Oksit
Sinyal İletisinin Modilasyonu**

Proje No: SBAG-2797 (104S314)

**Doç.Dr. Mutay ASLAN
Prof.Dr. Duran CANATAN**

**TEMMUZ 2008
ANTALYA**

ÖNSÖZ

Tamamlanan projemizde nitrik oksit sinyal iletimini modüle eden nötrofil oksidaz enzimlerindeki artışın, orak hücre anemisinde görülen vasküler inflamasyonun patogenezinde etkili olabileceği hipotezi incelenmiştir. Yapılan çalışmanın kapsamında orak hücre anemisinde nötrofil NADPH oksidaz, myeloperoksidaz ve siklooksijenaz enzim düzeyleri ölçülerek, nötrofillerdeki nitrik oksit tüketimi ve metabolizması belirlenmiştir. Projemiz TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
ÖNSÖZ	2
TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ	4
ÖZET	5
ABSTRACT	6
GİRİŞ	7
GENEL BİLGİLER	8
GEREÇ ve YÖNTEM	9-12
Hasta Grupları ve Nötrofil İzolasyonu	9
NADPH Oksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi	9
Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi	9
Siklooksijenaz Aktivitesinin Ölçülmesi	10
COX-1 ve COX-2 Enzimlerinin Protein Miktarının Belirlenmesi	10
NOS-2 Enzim Miktarının Tayini	10
Nitrogen Metabolitlerinin Miktarının Belirlenmesi	11
Nitrik Oksit Tüketiminin Elektrokimyasal Olarak Ölçülmesi	11
GSH Seviyelerinin Ölçümü	12
BULGULAR	13-21
Nötrofil İzolasyonu	13
NADPH Oksidaz ve Myeloperoksidaz Aktiviteleri	13
Siklooksijenaz Aktivitesi	14-15
COX-1 ve COX-2 Enzimlerinin Protein Miktarı	16
NOS-2 Enzim Miktarı	16-17
Nitrogen Metabolitlerinin Miktarı	17
Nötrofil Nitrik Oksit Tüketimi	18-20
GSH Seviyeleri	20-21
TARTIŞMA/SONUÇ	22-24
REFERANSLAR	25-29
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	30

ÖZET TABLO VE ŞEKİL LİSTELERİ

	Sayfa No:
Tablo 1	13
Tablo 2	22
Şekil 1	13
Şekil 2	14
Şekil 3	14
Şekil 4	15
Şekil 5	16
Şekil 6	16
Şekil 7	17
Şekil 8	17
Şekil 9	17
Şekil 10	18
Şekil 11	18
Şekil 12	18
Şekil 13	19
Şekil 14	19
Şekil 15	20
Şekil 16	21
Şekil 17	21
Şekil 18	24

ÖZET

Nitrik oksit'in (NO) enzim kaynaklı reaktif oksijen metabolitleriyle reaksiyona girmesi, inflamatuvar sinyal iletilisinde modülatuar olarak etkin olmasını sağlar. Bu sebepten dolayı orak hücre hastalarından ve kontrol grubundan alınan tam kandan nötrofil izolasyonu yapılarak, NADPH oksidaz, myeloperoksidaz (MPO), siklooksijenaz (COX) aktivitesi ve NO metabolizması çalışılmıştır. Intraselüler redoks dengesini ve NO oluşumunu değerlendirmek için de glutatyon (GSH) seviyeleri ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (NOS-2) ekspresyonu analiz edilmiştir. Nötrofil NADPH oksidaz aktivitesi hem bazal hem de fMLP uyarısından sonra, süperoksit anyon salınım hızına bakılarak belirlenmiş, kontrol grubu ve orak hücre hastalarında benzer düzeylerde bulunmuştur. Myeloperoksidaz aktivitesi, spektrofotometrik olarak ölçülmüş, orak hücre ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Total COX aktivitesi, ticari olarak sağlanan kit ile ölçülmüş, kontrol grubuna göre orak hücre hastalarının nötrofillerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde artış bulunmuştur. Orak hücre hastalarında gözlenen total COX artışı, COX-2 formunun aktivitesindeki artışa bağımlıdır. COX-2 aktivitesinin hesap edilmesinde, COX-1'e spesifik inhibitör SC-560 kullanılmıştır. Control ve orak hücre hastalarının nötrofil lisatlarında yapılan COX-2 proteininin western blot analizi, hasta grubunda artmış COX-2 aktivitesini doğrulamıştır. NOS-2 western blot analizi, orak hücre hastalarının nötrofillerinde artmış NOS-2 proteininin varlığını göstermiştir. Kontrol grubuna göre orak hücre hastalarının nötrofillerinde azalmış GSH ve artmış nitrat/nitrit seviyelerinin olduğu, yapılan spektrofotometrik ölçümlerle ortaya konmuştur. Nötrofil NO tüketimi hem bazal hem de fMLP uyarısından sonra, elektrokimyasal ölçümlerle belirlenmiş, kontrol grubuna göre orak hücre hastalarında istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde azalma göstermiştir. Sonuç olarak orak hücre hastalarının nötrofillerinde görülen GSH düzeylerindeki azalma artmış oksidatif metabolizmayı yansıtmaktadır. Orak hücre nötrofillerinde görülen intraselüler redoks dengesindeki bozulma NO tüketiminde normale göre bir sapma yaratarak hastalıkta görülen artmış inflamatuvar yanıtı katkı sağlayabilir.

Anahtar kelimeler: NADPH oksidaz, siklooksijenaz, glutatyon, orak hücre hastalığı, nötrofil.

ABSTRACT

Objective: Interaction of nitric oxide (NO) with enzymatic sources of reactive species exerts modulatory actions on inflammatory signaling mechanisms. Methods: NADPH oxidase, total peroxidase, cyclooxygenase (COX) activity and NO consumption were measured in neutrophils isolated from sickle cell disease (SCD) patients and healthy controls. Glutathione (GSH) levels and expression of inducible nitric oxide synthase (NOS-2) were also analyzed to assess intracellular redox state and NO production, respectively. Results: Functional assay of NADPH oxidase was performed by measuring superoxide release which was similar in control and SCD, both at basal conditions and in response to fMLP stimulation. Peroxidase activity, assessed spectrophotometrically, was not significantly different in SCD neutrophils compared to controls. Total COX activity, measured via an assay kit, was significantly increased in SCD neutrophils. The increase in total COX activity observed in SCD was due to enhanced activity of COX-2, differentiated by using the isoform-specific inhibitors DuP-697 and SC-560. Western blot analysis of COX-2 protein in SCD and control neutrophils confirmed increased enzyme activity in the diseased group. Western blot analysis of neutrophil lysates from SCD patients showed significantly increased NOS-2 protein content, compared to controls. Spectrophotometric measurement of GSH and nitrate/nitrite levels showed a decrease in GSH and an increase in nitrate/nitrite content in SCD neutrophils. Electrochemical measurement of NO consumption both under basal conditions and after fMLP stimulation, revealed a significant decrease in SCD neutrophils compared to controls. Conclusions: Depletion of GSH in SCD neutrophils may impact on rates of NO consumption and reflects increased oxidative stress associated with neutrophil activation.

Key words: NADPH oxidase, cyclooxygenase, glutathione, sickle cell disease, neutrophil.

GİRİŞ

Orak hücre anemisi (orak hücre hastalığı) yaygın olarak görülen herediter bir kan hastalığıdır. En yüksek insidansa sahip olduğu yerler Güney Türkiye, Güney İtalya, Kuzey Yunanistan, Ortadoğu, Suudi Arabistan ve Orta Hindistan'dır. Orak hücre anemisinde görülen nokta mutasyon sonucunda, hemoglobin B-globin zincirinin 6.cı amino asidi valin ile yer değiştirmiştir. Oluşan bu nokta mutasyon sonucunda hemoglobin deoksijene olduğu zaman polimerize olur ve kırmızı kan hücreleri orak hücre şeklini alır. Orak hücre anemisinde kırmızı kan hücrelerinin oluşturduğu vasküler oklüzyon, başlıca morbidite ve mortalite nedenini oluşturur. Orak hücre anemisinde görülen vasküler inflamasyonun patogenezi tam olarak aydınlatılmış değildir. Orak hücre anemili hastalarda görülen vasküler tromboz ve artmış nötrofil-endoel adezyonu vasküler disfonksiyonun mevcudiyetini düşündürür. Vasküler fonksiyonun lokal kontrolünde nitrik oksit (NO) önemli bir modülatördür. Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentez edilir. Nitrik oksit, hücreseel düzeyde etkisini intraselüler cGMP düzeylerini arttırarak gösterir. Nitrik oksite bağılı oluşan hücreseel cGMP düzeylerindeki artış düz kas hücrelerinde vazorölaksasyona, trombositlerde aggregasyonun inhibe olmasına ve nötrofil-endoel adezyonunda azalmaya neden olur. Nitrik oksitin fizyolojik etkisinde, hücrenin redoks durumu ve antioksidan seviyesi önemlidir. İnflamatuvar durumlarda oluşan oksidaz enzimlerindeki artış, reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olarak hücreseel redoks dengesini bozar ve nitrik oksit sinyal iletiminde harabiyet meydana getirir. Nitrik oksit sinyal iletimini modüle eden nötrofil oksidazları arasında NADPH oksidaz, myeloperoksidaz ve siklooksijenaz enzimleri yer alır. Bu çalışmanın hipotezi: nitrik oksit sinyal iletimini modüle eden nötrofil oksidaz enzimlerindeki artışın, orak hücre anemisinde görülen vasküler inflamasyonun patogenezinde etkili olabileceğidir. Bu hipotezin araştırılmasında üç temel hedef belirlenmiştir. 1.Orak hücre anemisinde nötrofil NADPH oksidaz ve myeloperoksidaz aktivitesini belirlemek. 2.Orak hücre anemisinde nötrofil siklooksijenaz enzim aktivitesini ve miktarını belirlemek. 3.Orak hücre anemisinde nötrofillerdeki nitrik oksit tüketimini ve metabolizmasını belirlemek.

GENEL BİLGİLER

Orak hücre anemisinde görülen vasküler bozuklukların kompleks patofizyolojisini tek bir mekanizma ile açıklamak mümkün değildir, ancak hücre içi oksidasyonunun bu mekanizmalar içerisinde önemli bir yere sahip olduğu çeşitli çalışmalar ile rapor edilmiştir (1-4). Orak hücre anemisinde oluşan hemoglobin yapısının (HbS) 2 kat daha fazla oksidasyona maruz kaldığı ortaya konmuştur (5). Tüm bu bulgulara ilave olarak, herediter kan hastalıklarında hemoglobinde oluşan kalıtsal instabiliteye bağlı olarak hem grubunun salındığı ve hem grubunda mevcut demirin oksidasyon-redüksiyon siklusu içerisinde oksidatif hücre harabiyetine sebebiyet verdiği ortaya konmuştur (6-8). Orak hücre anemisinde görülen vasküler inflamasyonun patogenezi tam olarak aydınlatılmış değildir. Orak Hücre anemili hastalarda görülen vasküler trombozis ve artmış nötrofil-endotel adezyonu vasküler disfonksiyonun mevcudiyetini düşündürür (9-17). Vasküler fonksiyonun lokal kontrolünde nitrik oksit (NO) önemli bir modülatördür. Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından sentez edilir (18). Nitrik oksit, hücresele düzeyde etkisini intraselüler cGMP düzeylerini arttırarak gösterir. Nitrik oksite bağlı oluşan hücresele cGMP düzeylerindeki artış düz kas hücrelerinde vazorölaksasyona, trombositlerde aggregasyonun inhibe olmasına ve nötrofil-endotel adezyonunda azalmaya neden olur (19, 20). Nitrik oksitin fizyolojik etkisinde, hücrenin redoks durumu ve antioksidan seviyesi önemlidir (21-27). İnflamatuar durumlarda oluşan oksidaz enzimlerindeki artış, reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olarak hücresele redoks dengesini bozar ve nitrik oksit sinyal iletiminde harabiyet meydana getirir (28, 30). Nitrik oksit sinyal iletimini modüle eden nötrofil oksidaz enzimleri arasında NADPH oksidaz, myeloperoksidaz ve siklooksijenaz enzimleri yer alır (28).

Çukurova bölgesini kapsayan bir çalışma, kaba doğum hızına göre 1 yılda doğacak hasta bebek sayısını orak hücre anemisi için 18.7, β -talasemi için ise 4.4 olarak belirlemiştir (31). Bir hastanın maliyetinin, aile için ayda yaklaşık 500 ABD doları yük getirebileceği hesaplanabilirse, bu kan hastalığının devlet için maddi yükünü değerlendirmek mümkün olabilecektir. Bu alanda yapılacak bilimsel çalışmalardan elde edilen bilimsel verilerden yola çıkılarak daha iyi tedavi protokolleri geliştirilecek, hastalığın komplikasyonları azaltılıp hasta yaşam süresi ve kalitesinde iyileşme sağlanabilecektir. Bu durum hastanın hastanede kalma süresini ve tedavi masraflarını da azaltacaktır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hasta Grupları ve Nötrofil İzolasyonu

Yaşları 3-28 arasında değişen homozigot HbS hemoglobinopatisi olan 14 hastadan (10 erkek/4 kadın) ve aynı yaş grubundan 10 sağlıklı bireyden (HbA) antikuagülanlı tüplere kan örnekleri alındı. Hasta gruplarından alınan tam kandan nötrofil izolasyonu dansite gradienti ile gerçekleştirildi. Histopaque 1077 ve 1119 ile oluşturulan ficoll-hypaque gradienti üzerine aplike edilen tam kandan santrifügasyon yoluyla nötrofil eldesi sağlandı. Elde edilen nötrofil süspansiyonu içerisinde bulunan hücre sayısı Akdeniz Üniversitesi Merkez laboratuvarındaki tam kan sayım cihazı (Beckman Coulter LH 750 Analyzer) ile belirlendi.

NADPH Oksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Nötrofillerde NADPH oksidaz aktivitesi, süperoksit anyon salınım hızına bakılarak belirlenmiştir. Süperoksit anyon salınımı, CuZn SOD ile inhibe edilebilen sitokrom c redüksiyonu ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. Salınan süperoksit anyon miktarı redükte sitokrom c'nin 550 nm'deki molar absorplama katsayısı ($2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesap edildi. Deney gruplarında nötrofillerden salınan süperoksit anyon miktarı hem bazal hem de 10 uM FMLP (Sigma Aldrich, Steinheim, Switzerland) uyarısından sonra ölçüldü. Sonuçlar (ortalama \pm SEM) mg protein başına nmol cinsinden rapor edildi. Örneklerdeki protein miktarı modifiye Bradford yöntemiyle ölçüldü. Bu ölçümde bovine serum albumini de standard olarak kullanıldı.

Myeloperoksidaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Nötrofillerde MPO aktivitesi 43 mM NaH_2PO_4 (pH 5.4), 1.2 mM tetrametilbenzidin (TMB), ve 100 μM H_2O_2 varlığında 650 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Myeloperoksidaz enzim aktivitesinin hesaplanması, TMB'nin 650 nm'deki molar absorplama katsayısı ($3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) değerinden yapıldı. Bir ünite (U) MPO aktivitesi, 1 dakikada oluşan μmol TMB oksidasyonu olarak hesap edildi. Sonuçlar (ortalama \pm SEM) mg protein başına, mU olarak rapor edildi.

Siklooksijenaz Aktivitesinin Ölçülmesi

Nötrofil siklooksijenaz (COX) aktivitesi enzimin peroksidaz komponenti aracılığı ile kit kullanılarak ölçüldü (Cayman Chemical, Ann Arbor MI). Okside N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiaminin (TMPD) kolorometrik olarak varlığına bakılarak enzim aktivite tayini yapıldı. Total COX enzim aktivitesinin hesaplanması, TMPD'nin 590 nm'deki molar absorplama katsayısı ($8.26 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) değerinden yapıldı. COX aktivitesi mg protein başına, 1 dakikada oluşan nmol TMPD oksidasyonu olarak verildi. Sonuçlar (ortalama \pm SEM) olarak rapor edildi. COX-2 aktivitesinin hesap edilmesinde, COX-1'e spesifik inhibitör SC-560 (Cayman Chemical, Ann Arbor MI) kullanıldı.

COX-1 ve COX-2 Enzimlerinin Protein Miktarının Belirlenmesi

Nötrofil COX-1 ve COX-2 enzimlerinin protein miktarı poliakrelamid gel elektroforezini (PAGE) takiben western blot analizi ile belirlendi. Elde edilen nötrofil protein homojenatları Laemli tamponu ile 1:2 oranında karıştırılarak, %15'lik poliakrelamid jele tatbik edilerek elektroforetik ayırım sağlandı. Jelde ayrılan proteinler, selüloz asetata transfer edilerek western blot analizi gerçekleştirildi. Ayrılan hücre proteinleri ayrı olarak poliklonal anti-COX1 ve poliklonal anti-COX-2 antikorları (Cayman Chemical, Ann Arbor MI) içerisinde (1:1000 dilüsyonda) 1 saat 25°C'da bekletildikten sonra HRP-bağlı sekonder antikor (ZYMED, San Fransisco, California) (1:10000 dilüsyonda) ile muamele edildi. Reaktif doku proteinleri kemilüminesans yöntemiyle belirlendi. COX1 ve COX-2 enzimlerinin 70 kDa'luk monomerik bantları görüntülendi. Görüntülenen protein bantlarının NIH image 1,61 software programı kullanılarak dansitometrik analizi yapıldı.

NOS-2 Enzim Miktarının Tayini

NOS-2 enzim miktarının tayini PAGE-western blot yöntemiyle yapıldı. Elde edilen nötrofil homojenatları Laemli tamponu ile 1:2 oranında karıştırılarak, %9'luk poliakrelamid jele tatbik edildi. Jelde ayrılan proteinler, selüloz asetata transfer edilerek western blot analizi gerçekleştirildi. Ayrılan doku proteinleri primer anti NOS-2 antikorları içerisinde (BD Transduction Laboratories, 1:800 dilution) bir gece bekletildikten sonra HRP-bağlı sekonder antikor (1:10000 dilüsyonda) ile muamele edildi. Reaktif doku proteinleri kemilüminesans yöntemiyle belirlendi. Görüntülenen protein bantlarının NIH image 1,61

software programı kullanılarak dansitometrik analizi yapıldı. SDS-PAGE ile ayrılan doku proteinleri Electro-Blue solüsyonu (Qbiogene, Heidelberg, Germany) ile de boyanarak doku proteinlerinin dağılımı ve jele aplikasyon miktarlarındaki eşitlik belirlendi.

Nitrogen Metabolitlerinin Miktarının Belirlenmesi

Invivo olarak nitrik oksidin son metabolik ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-)'dır ve biyolojik sistemlerde genellikle bu şekilde tanımlanır. Nitrik oksid metabolitlerinin ölçülmesinde sistemde var olan tüm nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite dönüştürülür. Total nitrit miktarı ise Griess reaktifi ile spektrofotometrik olarak ölçülür. Ölçümün prensibi asidik solüsyonlar içerisinde nitritin nitroz aside (HNO_2) dönüşmesi ve bunun da sulfanilamidler ile birleşerek sulfanilamid-diazonium tuzu oluşturmasıdır. Oluşan sulfanilamid-diazonium tuzu N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin ile reaksiyona sokularak 540 nm'de ölçülebilen bir kromofor oluşturur. Oluşturulan deney sisteminde nötrofil homojenatlarında nitrat/nitrit tayini yapıldı. Nötrofil nitrat/nitrit seviyeleri μM düzeyde belirlendi ve ortalama \pm SEM olarak verildi. Sadece bazal şartlarda değil hem 10 μM FMLP (Sigma Aldrich, Steinheim, Switzerland) uyarısından sonra hem de 1 mM nitrik oksit sentaz inhibitörü olan L-NAME (Sigma Aldrich, Steinheim, Switzerland) varlığında nötrofillerde nitrik oksidin son metabolik ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) ölçümleri yapıldı.

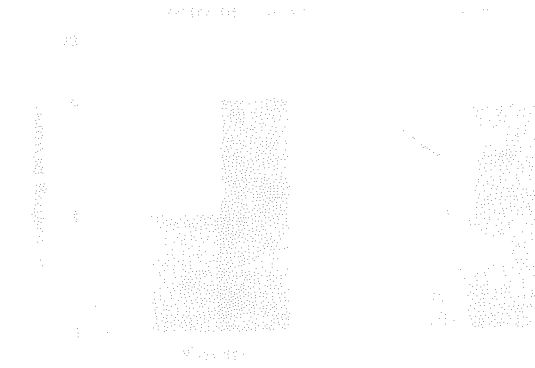
Nitrik Oksit Tüketiminin Elektrokimyasal Olarak Ölçülmesi

Kontrol ve Orak Hücre hastalığı olan gruplardan elde edilen nötrofillerde nitrik oksit tüketimi 2mm'lik ISO-NOP elektrodu ve bağlı bulunduğu Apollo 4000 sistemi (WPI, Florida, USA) ile belirlendi. Elektrodun kalibrasyonu distile suda hazırlanan 0.1 M bakır sülfat solüsyonuna (pH4) 22 nmol ile 113 nmol arasında değişen konsantrasyonlarda SNAP (WPI, Florida, USA) injekte edilerek yapıldı. SNAP solüsyonundan salınan nitrik oksit miktarı pikoamper olarak hesaplanarak standard eğri elde edildi. Kontrol (HbA) ve orak hücre (HbSS) gruplarında nötrofil nitrik oksit tüketiminin kaynağını tespit edebilmek için 20 μM diphenyleneiodonium (DPI) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) ve 1 mM L-NAME hydrochloride (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) varlığında 10 μM FMLP ile uyarılmış nötrofillerde NO tüketimi ölçüldü. DPI, NADPH oksidaz enzimini ve L-NAME de nitrik oksit sentaz enzimini inhibe etmeye yönelik kullanıldı. Nitrik oksit elektrodunun kalibrasyonu yapıldıktan sonra her kan örneğinden elde edilen 1ml'lik nötrofil

süspansiyonuna 10 µM nitrik oksit donörü olan PAPA NONOate (Cayman Chemical, Ann Arbor MI) ilave edilerek nötrofil nitrik oksit tüketimi ölçüldü.

GSH Seviyelerinin Ölçümü

Kontrol ve Orak Hücre hastalarının nötrofillerinde total GSH seviyeleri GSH analiz kiti ile ölçüldü. (Cat. #703002. Cayman Chemical Ann Arbor, MI). Ayrılan hücre peletleri soğuk fosfat tamponu içerisinde sonikasyona maruz bırakıldı. (50 mM K₂HPO₄, ve 1 mM EDTA, pH 7). Homojenatlar 10,000 g'de 15 dk, 4° C'da santrifüj edildi ve supernatantlar 10% metafosforik asit (Sigma Aldrich, Steinheim, Almanya) ile deproteinize edildi. Örneklerdeki GSSG GSH redüktaz tarafından GSH'ya indirildi. Analiz sıvısında GSH redüktaz, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB; Ellman's reagent), glucose-6-fosfat dehidrogenaz, NADP⁺ ve glucose-6-fosfat mevcuttu. GSH'da bulunan sulfidril grubu DTNB ile reaksiyona girerek sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) oluşturdu. Bu kromojenin abzorbanısı 405 nm ölçüldü. Doku GSSG düzeyleri ise GSH'yı 2-vinilpiridin (Sigma Aldrich, Steinheim, Almanya) ile derivatize ettikten sonra belirlendi. Örneklerdeki GSSG ve total GSH miktarı kit ile verilen standartlardan elde edilen standard eğrilerinden hesap edildi. Her örnekteki redükte GSH düzeyleri, GSSG miktarından GSH'nın çıkarılmasıyla hesap edildi.



Grupların GSH Seviyeleri
Statistiksel Analizler
GSH Seviyeleri (µM)

BULGULAR

Nötrofil İzolasyonu

Hasta gruplarından elde edilen PMN sayıları (ortalama) aşağıdaki tabloda (tablo 1) verilmiştir.

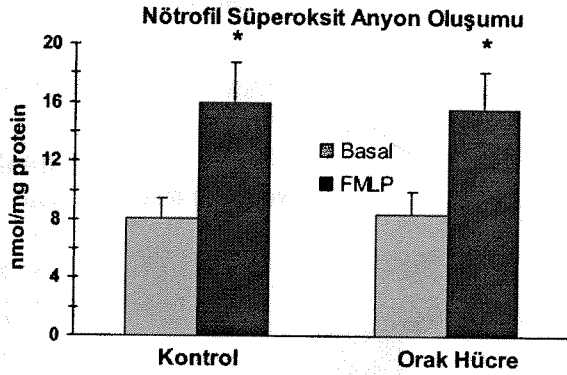
Tablo 1

Grup	PMN sayısı
Kontrol (HbA)	$6,42 \times 10^6/\text{ml}$
Orak Hücre (HbSS)	$7,21 \times 10^6/\text{ml}$

NADPH Oksidaz ve Myeloperoksidaz Aktiviteleri

Nötrofillerde NADPH oksidaz aktivitesi, süperoksit anyon salınım hızına bakılarak belirlenmiştir. Sonuçlar (ortalama \pm SEM) mg protein başına nmol cinsinden rapor edildi (Şekil 1).

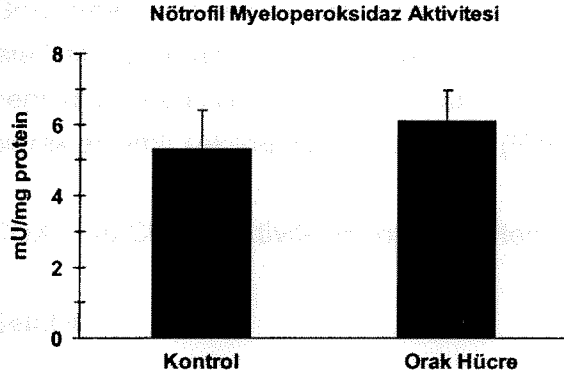
Şekil 1



Gruplardan elde edilen süperoksit anyon salınım verilerinin istatistiksel analizi Sigma Stat 2,03 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Yapılan İki Yönlü Varyans Analizini takiben gruplar arasındaki farklılık Tukey yöntemiyle belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı p değeri (*) <0,001 olarak kabul edildi. Süperoksit anyon salınımı kontrol (HbA) ve orak hücre (HbSS) grupları arasında bir farklılık göstermedi. FMLP uyarısı her iki grupta nötrofil süperoksit anyon salınımını belirgin bir ölçüde arttırdı.

Nötrofil myeloperoksidaz aktivitesi (ortalama \pm SEM) mg protein başına, mU olarak rapor edildi (şekil 2).

Şekil 2

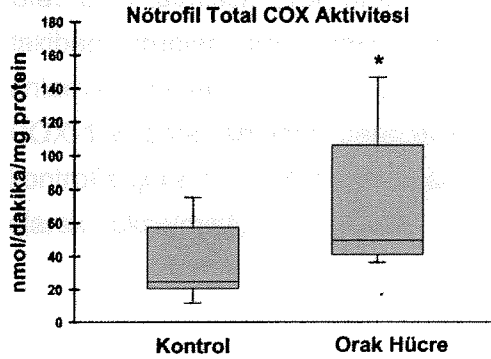


Gruplardan elde edilen verilerin istatistiksel analizi Sigma Stat 2,03 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Yapılan student-t testi sonucunda myeloperoksidaz enzim aktivitesi kontrol (HbA) ve orak hücre (HbSS) grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık göstermedi.

Siklooksijenaz Aktivitesi

Nötrofil siklooksijenaz (COX) aktivitesi ortalama \pm SEM olarak rapor edildi (Şekil 3).

Şekil 3

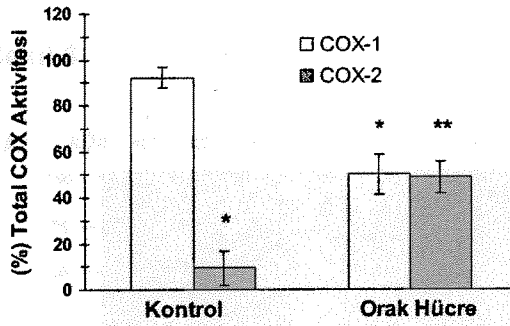


Şekil 3'de verilen grafik "box plot" olarak adlandırılır. Bu grafikler elde edilen verileri bir kutu içinde gösterir. Kutunun sıfır değerine en yakın kısmı 25.ci persentili, kutu içindeki çizgi orta değeri ve kutunun sıfır değerine en uzak kısmı 75.ci persentili gösterir. Kutu dışındaki uzantılar ise 10.cu ve 90.cı persentilleri belirtir.

Gruplardan elde edilen total enzim aktivite verilerinin istatistiksel analizi Sigma Stat 2,03 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Yapılan student-t testi sonucunda HbS hemoglobinopatisinde nötrofil total COX aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu (P=0,029) (şekil 3).

COX-1 ve COX-2 aktiviteleri total aktivitenin % değeri olarak gösterildi (Şekil 4).

Şekil 4

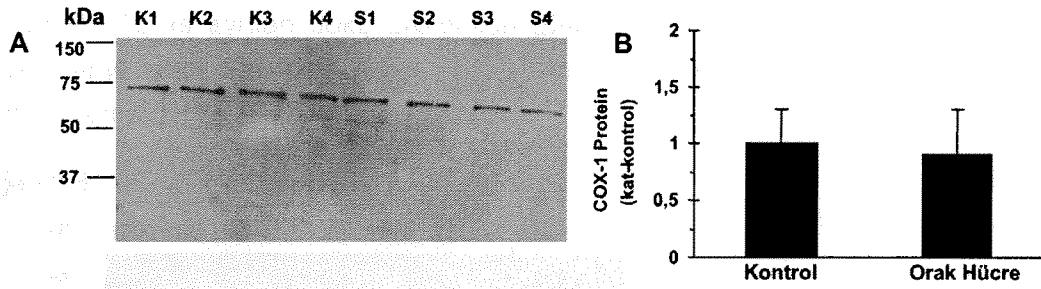


Gruplardan elde edilen % COX-1 ve COX-2 aktivite verilerinin istatistiksel analizi Sigma Stat 2,03 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Yapılan İki Yönlü Varyans Analizini takiben gruplar arasındaki farklılık Tukey yöntemiyle belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı p değeri (*) <0,001 olarak kabul edildi. Kontrol (HbA) grubunda COX-2 aktivitesi COX-1'e göre anlamlı derecede düşük bulundu. Orak hücre (HbSS) hastalığında kontrol'e göre % COX-1 aktivitesi anlamlı olarak düşmüş, % COX-2 aktivitesi ise anlamlı olarak yükselmişti.

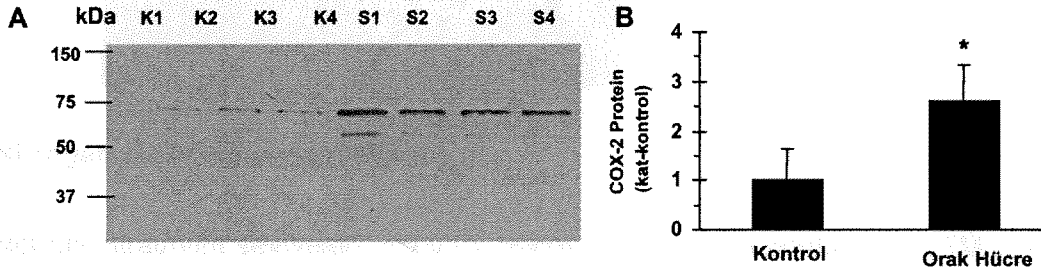
COX-1 ve COX-2 Enzimlerinin Protein Miktarı

COX1 ve COX-2 enzimlerinin 70 kDa'luk monomerik bantları görüntüldü (şekil 5A ve 6A). Görüntülenen protein bantlarının NIH image 1,61 software programı kullanılarak dansitometrik analizi yapıldı (Şekil 5B ve 6B).

Şekil 5



Şekil 6

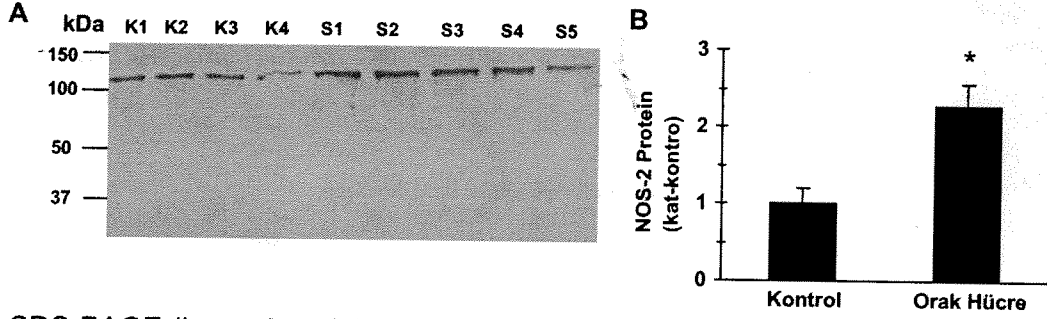


Şekil 5'de görüldüğü gibi nötrofil COX-1 protein miktarı hem kontrol hem de Orak hücre hastalığı olanlarda aynı düzeylerdeydi. Şekil 6'da görüldüğü gibi nötrofil COX-2 protein miktarı Orak hücre hastalığı olanlarda kontrole göre anlamlı olarak artmıştı ($p < 0,05$).

NOS-2 Enzim Miktarı

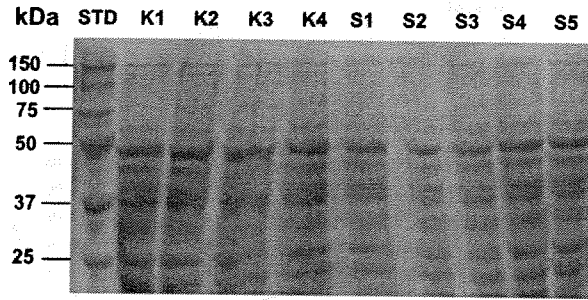
Şekil 7'de görüldüğü gibi. Nötrofil NOS-2 protein miktarı orak hücre hastalığı olanlarda kontrole göre anlamlı şekilde yükseldi ($p < 0,05$).

Şekil 7



SDS-PAGE ile ayrılan doku proteinleri Electro-Blue solüsyonu (Qbiogene, Heidelberg, Germany) ile de boyanarak doku proteinlerinin dağılımı ve jele aplikasyon miktarlarındaki eşitlik belirlendi (şekil 8).

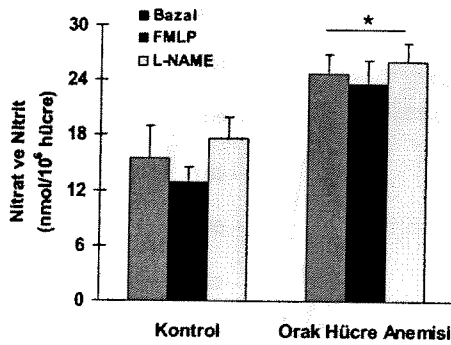
Şekil 8



Nitrogen Metabolitlerinin Miktarı

Nötrofil nitrat/nitrit seviyeleri $\text{nmol}/10^6$ hücre üzerinden ve ortalama \pm SEM olarak verildi (şekil 9).

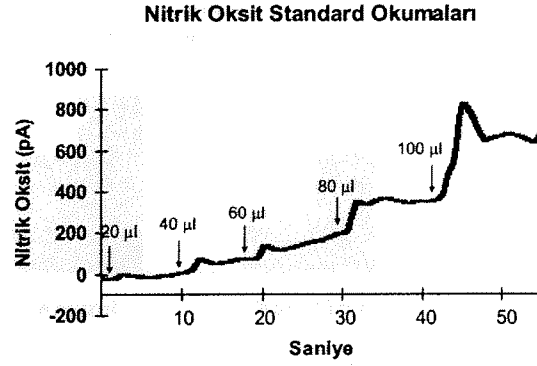
Şekil 9



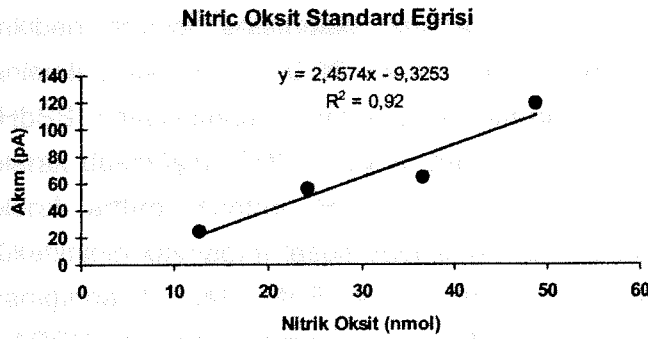
Nötrofil Nitrik Oksit Tüketimi

SNAP solüsyonundan salınan nitrik oksit miktarı pikoamper olarak hesaplanarak standard eğri elde edildi (Şekil 10 ve 11).

Şekil 10

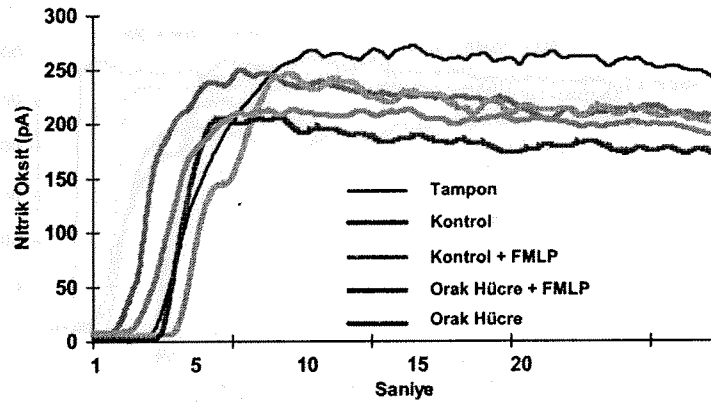


Şekil 11



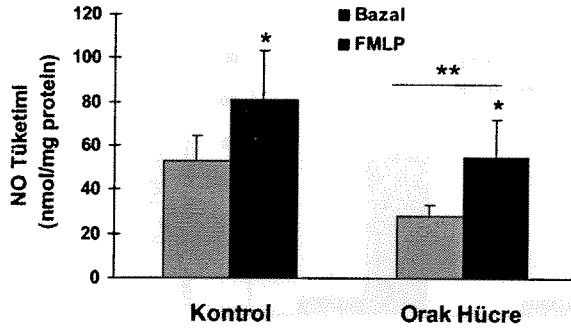
Nötrofil nitrik oksit tüketimi hem bazal hem de 10 µM FMLP uyarısından sonra yapılmıştır. Yapılan ölçümlerden bir örnek şekil 12'de sunulmuştur.

Şekil 12



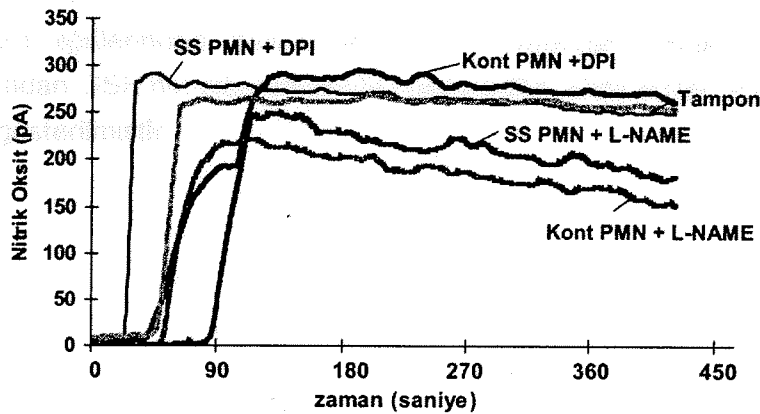
Deney gruplarında nötrofil nitrik oksit tüketimi şekil 13'de gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm SD olarak hesap edilmiş ve mg protein başına nmol olarak verilmiştir.

Şekil 13



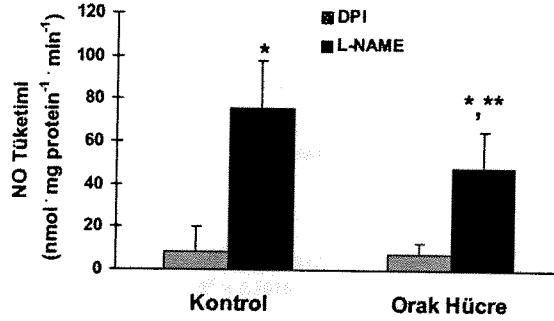
Deney gruplarından elde edilen nitrik oksit tüketimi verilerinin istatistiksel analizi Sigma Stat 2,03 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Yapılan İki Yönlü Varyans Analizini takiben gruplar arasındaki farklılık Tukey yöntemiyle belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı p değeri (*) $<0,05$ olarak kabul edildi. Nötrofil nitrik oksit tüketimi Orak hücre (HbSS) hastalığında kontrol'e göre hem bazal hem de FMLP uyarısından sonra anlamlı olarak düşmüştü. FMLP uyarısı her iki grupta da nötrofil nitrik oksit tüketimini anlamlı olarak arttırdı Kontrol (HbA) ve orak hücre (HbSS) gruplarında nötrofil nitrik oksit tüketiminin kaynağını tespit edebilmek için $20 \mu\text{M}$ DPI ve 1 mM L-NAME hydrochloride varlığında $10 \mu\text{M}$ FMLP ile uyarılmış nötrofillerde nitrik oksit tüketimi ölçüldü. DPI, NADPH oksidaz enzimini ve L-NAME de nitrik oksit sentaz enzimini inhibe etmeye yönelik kullanıldı. Yapılan ölçümlerden bir örnek şekil 14'de sunulmuştur.

Şekil 14



Deney gruplarında nötrofil nitrik oksit tüketimi şekil 15'de gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm SD olarak hesap edilmiş ve mg protein başına nmol olarak verilmiştir.

Şekil 15

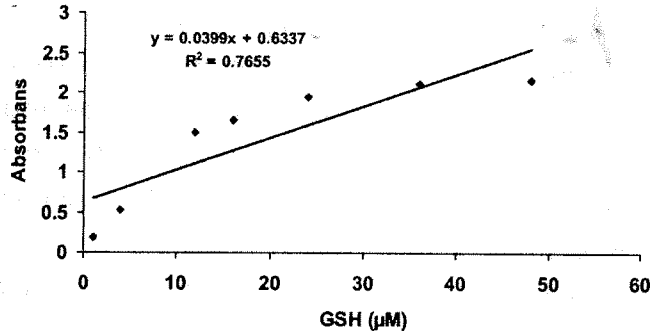


Deney gruplarından elde edilen nitrik oksit tüketimi verilerinin istatistiksel analizi Sigma Stat 2,03 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Yapılan İki Yönlü Varyans Analizini takiben gruplar arasındaki farklılık Tukey yöntemiyle belirlendi. İstatistiksel olarak anlamlı p değeri (*) <0,05 olarak kabul edildi. 1 mM L-NAME ile muamele edilen nötrofillerde nitrik oksit tüketimi Orak hücre (HbSS) hastalığında kontrol'e göre anlamlı olarak düşmüştü. DPI ile muamele edilen nötrofillerde nitrik oksit tüketimi her iki grupta da L-NAME verilen hücrelere göre anlamlı olarak düştü. DPI varlığında her iki grupta nitrik oksit tüketimi belirgin olarak azaldı.

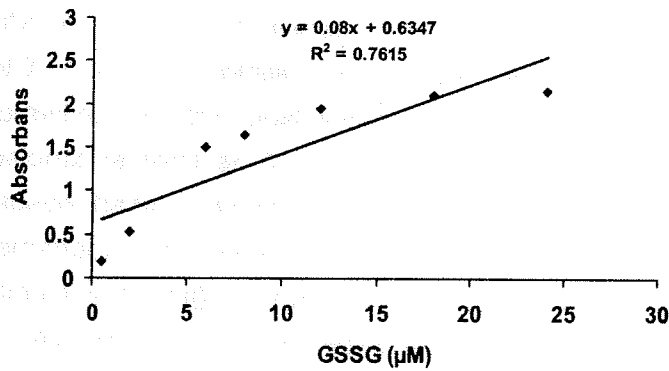
GSH Seviyeleri

Örneklere GSSG ve total GSH miktarı kit ile verilen standartlardan elde edilen standard eğrilerinden hesap edildi. Her örnekteki redükte GSH düzeyleri, GSSG miktarından GSH'nın çıkarılmasıyla hesap edildi. Elde edilen standard eğriler şekil 16 ve 17 de gösterilmiştir.

Şekil 16



Şekil 17



Yukarıdaki verilerden elde edilen denklemlere göre kontrol ve hasta gruplarında nötrofil redükte GSH düzeyleri hesap edildi. Bu veriler Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2.

Ölçüm	Kontrol	Orak Hücre Hastalığı
GSH miktarı (nmol/10 ⁶ cell)	4.73 ± 0.8 (10)	2.26 ± 0.18** (14)

Değerler ortalama ± SEM. **, $p < 0.01$ kontrol ile karşılaştırıldığında. Her deney için n sayısı parantez içinde verilmiştir.

Elde edilen datanın istatistiksel analizi student-t testi ile Sigma Stat istatistik programı ile yapılmıştır.

TARTIŞMA/SONUÇ

Yapılan çalışmanın hipotezi, nitrik oksit sinyal iletilisini modüle eden nötrofil oksidaz enzimlerindeki aktivite ve/veya miktar değişimlerinin nötrofil nitrik oksit tüketiminde etkili olabileceği yönündeydi. Elde edilen veriler orak hücre hastalığında nötrofillerde NOS-2 enzim miktarındaki artışı ve buna paralel olarak nötrofil nitrik oksit tüketiminin azaldığını göstermiştir. Orak hücre hastalığında görülen nötrofil COX-2 ve NOS-2 enzim aktivite artışları bu hastalıkta oluşan kronik inflamasyon zemininde gelişebilir. Orak hücre hastalığında görülen nötrofil nitrik oksit tüketiminin azalması vasküler nitrik oksit düzeylerini etkileyerek hastalığın patogenezinde rol alabilir.

Bilindiği gibi, *invivo* olarak nitrik oksidin son metabolik ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-)'dır ve biyolojik sistemlerde genellikle bu şekilde tanımlanır. Ancak, insan nötrofillerinin nitrik oksit sentezleme yetileri ile ilgili var olan bilimsel veriler çelişkilidir (bakınız referanslar 31-39). İnsan nötrofillerinde hücre aktivasyonuna yanıtız olarak sadece bazal seviyede nitrik oksit oluşumunun olduğu (31), bazal şartlarda veya herhangi bir stimülasyon varlığında nitrik oksit oluşumunun olmadığı (35) veya sadece stimülasyona bağlı olarak nitrik oksit oluşumunun olduğu rapor edilmiştir (30). Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimine bağımlı nitrik oksit (NO) sentezinin çok kompleks ve sıkı bir regülasyon (40) altında olduğu düşünöldüğü zaman, nötrofillerde var olan NOS-2 enziminin, aktif olarak NO yapıp yapamadığı merak edilen bir ikinci husustur. Elde edilen veriler her iki grupta da 10 μM FMLP ve 1 mM L-NAME'in nötrofillerde nitrat/nitrit seviyelerini değiştirmedini ve periferel nötrofillerde mevcut olan bir nitrat/nitrit havuzunun varlığını gösterdi. Yaptığımız ölçüm sonuçları, 2ci ara dönem raporunda da belirtildiği şekilde, orak hücre hastalarında nitrik oksit metabolitlerinin daha yüksek düzeylerde olduğunu göstermektedir. Sunulan data insan nötrofillerinde hücre aktivasyonuna yanıtız olarak sadece bazal seviyede nitrik oksit metabolitlerinin varlığını desteklemektedir. Nötrofil nitrat/nitrit düzeylerinin NOS enzim inhibisyonuna yanıtız olması, hücreseel düzeyde enzimin inaktif olduğunu göstermekte ve daha evvel rapor edilen çalışmalarla da örtüşmektedir (40-41).

2. gelişme raporunda sunulduğu gibi izole ettiğimiz nötrofillerde nitrik oksit tüketimi Orak hücre (HbSS) hastalığında kontrol'e göre hem bazal hem de FMLP uyarısından sonra anlamlı olarak düşmüştü. FMLP uyarısı her iki grupta da nötrofil nitrik oksit tüketimini anlamlı olarak arttırmıştı. Bu beklenmedik bir sonucu çünkü 1- 2. gelişme raporunda

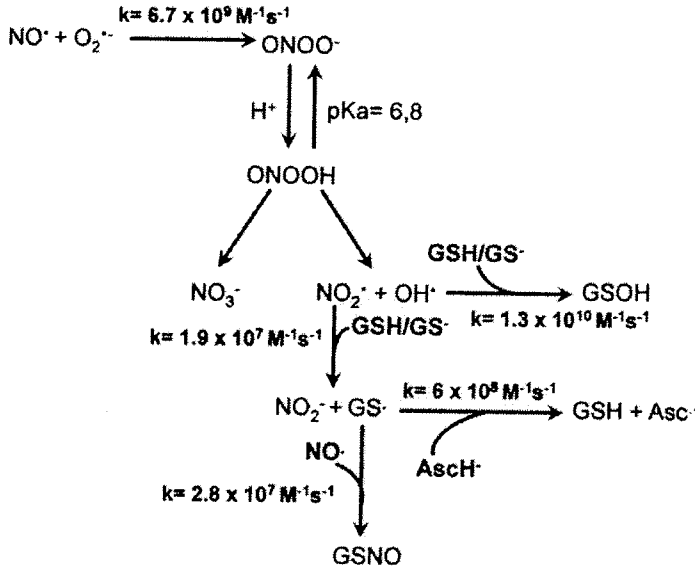
sunulduğu gibi süperoksit anyon salınımı kontrol (HbA) ve orak hücre (HbSS) grupları arasında bir farklılık göstermedi. Bilindiği gibi nitrik oksitin fizyolojik etkisinde, hücrenin redoks durumu ve antioksidan seviyesi önemlidir. Reaktif oksijen türlerindeki artış hücrel redoks dengesini bozar ve nitrik oksit tüketimini artırır. 2- 3. gelişme raporunda sunulduğu gibi kontrol (HbA) ve orak hücre (HbSS) gruplarında nötrofil nitrat/nitrit düzeyleri NOS enzim inhibisyonuna yanıtız bulunmuştur. Bu data hücrel düzeyde NOS enziminin inaktif olduğunu ve her iki grupta da sadece bazal seviyede nitrik oksit üretiminin olduğunu göstermiştir. Kontrol (HbA) ve orak hücre (HbSS) gruplarında nötrofil nitrik oksit tüketiminin kaynağını tespit edebilmek için 20 µM diphenyleneiodonium (DPI) ve 1 mM L-NAME hydrochloride varlığında 10 µM FMLP ile uyarılmış nötrofillerde nitrik oksit tüketimi ölçüldü. DPI, NADPH oksidaz enzimini ve L-NAME de nitrik oksit sentaz enzimini inhibe etmeye yönelik kullanıldı. Elde edilen bu sonuçlar bize nötrofillerde nitrik oksit tüketiminin büyük ölçüde NADPH enzim aktivitesine bağılı olduğunu gösterdi. NOS enzim aktivitesi nötrofil nitrik oksit tüketimine belirgin ölçüde etki etmedi.

Bilindiği gibi NADPH enzimi aktif halde iken süperoksit anyon salınımına neden olmakta ve bu da nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek, NO tüketilmesine neden olmaktadır. Bu projeden elde ettiğimiz data nötrofil süperoksit anyon üretimi ile nitrik oksit tüketiminin 1:1 oranda olmadığını gösterdi. Bu bulgu sağlıklı nötrofillerde daha evvel rapor edilen sonuçlarla örtüşmektedir (42). NADPH enzim aktivitesine bağımlı gelişen nitrik oksit tüketimi orak hücre hastalarının nötrofillerinde daha az olmaktadır. Bu durum, oluşan reaktif metabolitlerin sağlıklı nötrofillerde GSH yardımıyla redoks döngüsüne girerek daha fazla NO tüketimine sebebiyet verebileceği görüşünü bizlere kazandırdı. Bu sebepten dolayı bu proje döneminde hem kontrol hem de orak hücre nötrofillerinde GSH düzeylerini ölçtük.

Tablo 2'de gösterildiği gibi, nötrofil GSH düzeyleri orak hücre hastalarında kontrol grubuna göre belirgin olarak azalmıştı. Bu bulgu daha evvel rapor edilen başka bir çalışma ile uyumludur (43) ve orak hücre hastalığında görülen nötrofil aktivasyonunu destekler. Hücre içi GSH seviyeleri hücreyi patolojik ve fizyolojik yollarla gelişebilen oksidatif strese karşı korur (44). Endojen olarak oluşan hidrojen peroksit GSH yardımıyla indirgenir ve bu esnada GSH, GSSG'ye dönüşür.

Nötrofillerde azalan GSH düzeyleri nitrik oksit tüketimini şekil 18'de gösterildiği şekilde etkileyebilir.

Şekil 18



GSH, hücre sitoplazmasında en çok bulunan sülfidril (-SH) içerikli protein-olmayan bileşiktir. GSH'nın sitoplazmik konsantrasyonu 5-10 mM arasındadır (45). pH 7.4'de GSH'nın %3'deki SH grubu ayrılarak GS⁻'yi oluşturur. Oluşan GS⁻ çok daha hızlı bir şekilde okside olur (46,47). Bizim deney sistemimizde nitrik oksit süperoksit anyon radikali (O₂⁻) ile reaksiyona girerek peroksinitriti (ONOO⁻) ve onun konjuge asidi olan peroksinitröz asidi (ONOOH, pKa = 6.8) oluşturacaktır. Bu reaksiyonun hız sabiti 6.7 × 10⁹ M⁻¹ sec⁻¹'dir. Bu hız sabiti SOD ile katalizlenen enzimatik dismutasyondan daha çabuktur (25). Peroksinitrit potent bir oksidan olup yarılanma ömrü nötral pH'da 1.6 saniyedir (25). Peroksinitröz asit iki yol ile reaksiyonuna devam eder. İlk yolda NO₃⁻ oluşturur. İkinci yolda ise hidroksil radikalini (OH[·]) ve nitrojen dioksit (NO₂[·]), radikalini oluşturur. Her iki radikal de GSH ile reaksiyona girer. Bu radikallerin GSH ile reaksiyon hızları sırasıyla, 1.3 × 10¹⁰ ve 1.9 × 10⁷ M⁻¹ sec⁻¹'dir (48, 49). Bu bilgiler ışığında görülmektedir ki GSH, oksidatif stres zemininde hücre içinde nitrik oksit tüketimi için bir katalizördür. Orak hücre hastalarının nötrofillerindeki düşük GSH seviyeleri bu sebepten dolayı nitrik oksit tüketimini yavaşlatabilirler.

REFERANSLAR

1. HEBBEL RP., Eaton JW., Balasingam M., Steinberg, MH. Spontaneous oxygen radical generation by sickle erythrocytes. *J. Clin. Invest*, 70, 1253-1259, (1982).
2. KUROSS SA, Rank BH, Hebbel RP., Excess heme in sickle erythrocyte inside-out membranes: possible role in thiol oxidation. *Blood*, 71, 876-82, (1988).
3. KUROSS SA, Hebbel RP. Nonheme iron in sickle erythrocyte membranes: association with phospholipids and potential role in lipid peroxidation. *Blood*, 72, 1278-85, (1988).
4. HEBBEL RP., Morgan WT., Eaton JW., Hedlund EB., Accelerated autoxidation and heme loss due to instability of sickle hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83; 237-241, (1988).
5. HEBBEL RP. The sickle erythrocyte in double jeopardy: autoxidation and iron
6. decompartmentalization. *Semin Hematol*, 27, 51-69, (1990).
7. JAIN SK, Ross JD, Duett J, Herbst JJ. Low plasma prealbumin and carotenoid levels in sickle cell disease patients. *Am J Med Sci*, 299, 13-15, (1990).
8. TATUM VL, Chow CK. Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. *Free Radic Res*, 25, 133-139. (1996).
9. NATTA CL, Tatum VL, Chow CK. Antioxidant status and free radical-induced oxidative damage of sickle erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 669, 365-367, (1992).
10. ASLAN M, Thornley-Brown D, Freeman BA. Reactive species in sickle cell disease. *Ann N Y Acad Sci*, 899, 375-391, (2000).
11. ASLAN M, Ryan TM., Adler B., Townes TM., Parks A., Thompson, JA., Tousson A., Gladwin MT., Patel RP., Tarpey MM., Batinic-Haberle I., White CR., and Freeman, BA. Oxygen radical inhibition of nitric oxide-dependent vascular function in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 15215-15220, (2001).
12. ASLAN M, Ryan TM., Townes TM., Coward L., Kirk MC., Barnes S., Alexander, CB., Rosenfeld SS., Freeman, BA., Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem*, 278, 4194-4204, (2003).
13. ASLAN M, Freeman BA. Oxidant-mediated impairment of nitric oxide signaling in sickle cell disease--mechanisms and consequences. *Cell Mol Biol*, (Noisy-le-grand). 50, 95-105, (2004).
14. BELHASSEN L., Pelle, G., and Sediame, S., Endothelial dysfunction in patients with sickle cell disease is related to selective impairment of shear stress mediated vasodilation. *Blood*, 97, 1584-1589, (2001).

15. GLADWIN MT., Schechter AN., Ognibene FP., Coles WA, Reiter CD., Schenke, WH., Csako G., Waclawiw MA., Panza JA., Cannon R.O 3rd., Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease. *Circulation*, 107, 271-278, (2003).
16. HEBBEL RP., Yamada, O., Moldow, C.F., Jacob, H.S., White, J.G., and Eaton, J.W., Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease. *J Clin Invest*, 65, 154-160, (1980).
17. KAUL DK., Fabry ME., Costantini F., Rubin EM., Nagel RL. In vivo demonstration of red cell endothelial interaction, sickling and altered microvascular response to oxygen in the sickle transgenic mouse. *J Clin Invest*, 96, 2845-2853, (1995).
18. KAUL DK., Hebbel RP., Hypoxia/reoxygenation causes inflammatory response in transgenic sickle mice but not in normal mice. *J Clin Invest*, 106, 411-420, (2000).
19. STAMLER JS., Singel DJ, Loscalzo J: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258, 1898-1902, (1992).
20. PALMER RM., Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from Larginine. *Nature*, 333, 664-6, (1988).
21. MONCADA S., Higgs EA., Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*, 21, 361-374, (1991).
22. RADÍ R., Beckman JS, Bush KM, Freeman BA: Peroxynitrite-induced membrane lipid
23. peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 288, 481-487, (1991).
24. LANCASTER JR Jr., A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*, 1, 18-30, (1997).
25. O'DONNELL VB., Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-Usmar VM, Freeman BA: Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alphanatocopherol. *Biochemistry*, 36, 15216-15223, (1997).
26. O'DONNELL VB., Eiserich JP, Chumley PH, Jablonsky MJ, Krishna NR, Kirk M, Barnes S, Darley-Usmar VM, Freeman BA: Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem Res Toxicol*, 12, 83-92, (1999).
27. BECKMAN JS., Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury

- from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87,1620-1624, (1990).
28. RUBBO H., Radi R., Trujillo M., Telleri R., Kalyanaraman B., Barnes S., Kirk M, Freeman BA., Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269, 26066-26075, (1994).
29. CAI H., Harrison DG., Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87, 840-4, (2000).
30. ASLAN M., Freeman BA. Oxidases and oxygenases in regulation of vascular nitric oxide signaling and inflammatory responses. *Immunol Res*, 26, 107-18. (2002).
31. HOUSTON M., Estevez A., Chumley P., Aslan M., Marklund S., Parks DA., Freeman BA., Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J Biol Chem*, 274, 4985-94 (1999).
32. BALDUS S., Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White CR., Bullard DC, Brennan ML, Lusis AJ, Moore KP, Freeman BA: Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest*, 108,1759-1770, (2001).
33. KILINÇ M., Koçak F, Yüreğir G, Aksoy K. İçel İlinde Orak Hücre Anemisi ve β -Talasemi Taşıyıcılık Sıklığı. *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 64, 62-65, (1999).
34. WRIGHT CD., Mulsch, A., Busse, R., Osswald, H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 160, 813-819, (1989).
35. SCHMIDT HHHW., Seifert R., Bohme E., Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet activating factor and leukotriene B4. *FEBS Lett*, 244, 357-360, (1989).
36. SALVEMINI D., DeNucci G., Gryglewski RJ., Vane J.R. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6328-6332, (1989).
37. BRYANT JL., Mehta P., Von der Porten A., Mehta JL. Co-purification of 130 KD nitric oxide synthase and a 22 KD link protein from human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 189, 558-564, (1992).

38. CANTEEN-NATO A., Mascara MN., Grimace AS., Churner-Sump, MMD., DeNucci, G. Neutrophils and mononuclear cells from patients with chronic granulomatous disease release nitric oxide. *Br. J. Clin. Pharmacol*, 35,485-490, (1993).
39. CAREERS MC., Pargament GA., Catz SD., Poderoso Jj., Boveris A., Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Lett*, 341, 65-68 (1994).
40. KELLER R., Keist R., Erb P., Aebischer T., De Libero G., Balzer M., Groscurth P., Keller HU., Expression of cellular effector functions and production of reactive nitrogen intermediates: a comparative study including T lymphocytes, T-Like cells, neutrophil granulocytes and mononuclear phagocytes. *Cell. Immunol*, 131, 398-403, (1990).
41. KLEBANOFF SJ., Nathan CF., Nitrite production by stimulated human polymorphonuclear leukocytes supplemented with azide and catalase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 197, 192-196, (1993).
42. VAN DERVORT AL., Yan, L., Madara, PJ., Cobb, J.P., Wesley, R.A., Comveau, CC., Tropea, M.M., Danner, R.L. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNG- α 3 production by human neutrophils. *J. Immunol*, 152, 4102-4109, (1994).
43. MILES AM, Owens MW, Milligan S, Johnson GG, Fields JZ, Ing TS, Kottapalli V, Keshavarzian A, Grisham MB. Nitric oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol*, 58, 612-22, (1995).
44. YAN LY, Vandivier W, Suffredini AF, Danner RL. Human polymorphonuclear leukocytes lack detectable nitric oxide nitric oxide consumption pathways by normal, chronic granulomatous disease and synthase activity. *J Immunol*, 153, 1825-34, (1994).
45. CLARK SR., Coffey MJ., Maclean RM., Collins PW., Lewis MJ, Cross, A. R, O'Donnell, V. B. Characterization of myeloperoxidase-deficient human neutrophils. *J Immunol*, 169, 5889-5896, (2002).
46. AMER J., Ghoti H., Rachmilewitz E., Koren A., Levin C., Fibach, E. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol*, 132, 108-113, (2006).
47. SHEPPARD FR., Kelher, M. R, Moore, E. E, McLaughlin, N. J., Banerjee, A., Silliman, C. C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase:

- phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol*, 78, 1025-1042, (2005).
48. WARDMAN P., Dennis MF., Stratford MR., White J., Extracellular: intracellular and subcellular concentration gradients of thiols. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 22, 751-754, (1992)
49. MADEJ E., Wardman, P. The oxidizing power of the glutathione thiyl radical as measured by its electrode potential at physiological pH. *Arch Biochem Biophys*, 462, 94-102, (2007).
50. QUINTILIANI M., Badiello, R., Tamba, M., Esfandi, A., Gorin, G. Radiolysis of glutathione in oxygen-containing solutions of pH7. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 32, 195-202, (1977).
51. FORD E., Hughes MN., Wardman P., Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. *Free Radic Biol Med*, 32, 1314-1323, (2002).

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: SBAG-2797 (104S314)
Proje Başlığı: Orak Hücre Anemisinde Nötrofil Oksidazlar ve Nitrik Oksit Sinyal İletisinin Modülasyonu
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Doç.Dr. Mutay ASLAN Prof.Dr. Duran CANATAN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Arapsuyu 07070, Antalya
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMA GRUBU Atatürk Bulvarı No: 221 06100 Kavaklıdere ANKARA
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Başlama Tarihi: 01/05/2005 Bitiş Tarihi: 01/05/2008
Öz (en çok 70 kelime) Projemizde nitrik oksit sinyal iletisini modüle eden nötrofil oksidaz enzimlerindeki artışın, orak hücre anemisinde görülen vasküler inflamasyonun patogeneğinde etkili olabileceği hipotezi incelenmiştir. Yapılan çalışmanın kapsamında orak hücre anemisinde nötrofil NADPH oksidaz, myeloperoksidaz ve siklooksijenaz (COX) enzim düzeyleri ölçülerek, nötrofillerdeki nitrik oksit (NO) tüketimi ve metabolizması belirlenmiştir. Elde edilen veriler nötrofil intraselüler redoks dengesindeki bozulmanın artmış inflamatuvar yanıtı katkı sağlayabileceğini göstermektedir.
Anahtar Kelimeler: NADPH oksidaz, siklooksijenaz, glutasyon, orak hücre hastalığı, nötrofil.
Projeden Yapılan Yayınlar: 1- Aslan M and Canatan D. Nitric Oxide Consumption by Circulating Neutrophils in Sickle Cell Disease The FEBS Journal Volume 274 Supplement 1 July 2007. 2- Aslan M, Canatan D. Nitric Oxide Consumption by Circulating Neutrophils in Sickle Cell Disease. REGULATION OF TRANSPORT PHENOMENA IN BIOLOGICAL SYSTEMS With Emphasis on the Cardiac System. 5th Larry & Horti Fairberg Workshop September 16-20, 2007. Falez Hotel, Antalya, Turkey. Sözlü Sunu 3- Aslan M et al., Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. Free Radical Bio Med. 43: 1469-1483, 2007.