

44191

T. C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİR İNTRASELLÜLER MİKROORGANİZMANIN,  
FARE PERİTONEAL MAKROFAJLARINDA OLUŞTURDUĞU  
NİTRİK OKSİD VE  
"RESPIRATORY BURST" (SOLUNUM PATLAMASI)  
YANITLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

**A. Hüseyin BASKIN**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**İZMİR**

**1995**

T. C  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİR İNTRASELLÜLER MİKROORGANİZMANIN,  
FARE PERİTONEAL MAKROFAJLARINDA OLUŞTURDUĞU  
NİTRİK OKSİD VE  
"RESPIRATORY BURST" (SOLUNUM PATLAMASI)  
YANITLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

A. Hüseyin BASKIN

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ


DANIŞMAN: Prof. Dr. Nedim ÇAKIR


İZMİR


1995


T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ


"Bir intrasellüler mikroorganizmanın, fare peritoneal makrofajlarında oluşturduğu nitrik oksit ve solunum patlaması yanıtlarının değerlendirilmesi" isimli bu tez, 13. 10. 1995 tarihinde tarafımızdan başarılı bulunmuştur.

  
Jüri Başkanı  
Prof. Dr. Nuran YULUĞ

  
Jüri Üyesi  
Prof. Dr. Altınay BİLGİÇ

  
Jüri Üyesi  
Prof. Dr. Nedim ÇAKIR

  
Jüri Üyesi  
Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR

  
Jüri Üyesi  
Prof. Dr. Vedat ORHAN

## İÇİNDEKİLER:

	SAYFA
<b>1. ÖZETLER</b>	
1.1 Türkçe Özet	1
1.2 İngilizce Özet	2
<b>2. GİRİŞ ve AMAÇ</b>	
2.1 Giriş	3
2.1.1 Oksijenden Bağımsız Sistem	4
2.1.2 Oksijene Bağımlı Sistem	4
2.2 Amaç	5
<b>3. GENEL BİLGİLER</b>	
3.1 Nitrik Oksit (NO)	6
3.2 NO ve Bağışıklık Sistemi ile İlişkisi	11
3.3 Solunum Patlaması (SP)	12
3.4 SP ve Bağışıklık Sistemi ile İlişkisi	13
3.5 Deneysel Sistemlerde İntrasellüler Patojen Olarak Kullanılan <i>Salmonella typhimurium</i> ' un Tanıtılması	14
<b>4. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	
4.1 Deneylerde Kullanılan Gereçler, Kimyasal Maddeler ve Bakteri Kökeni	16
4.1.2 Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler	16
4.1.3 Deneylerde kullanılan bakteri kökeni	17
4.2 Deneylerde Kullanılan Fareler	17
4.3 Fare Peritoneal Makrofajlarının Elde Edilmesi	18
4.4 Makrofajların Kültüre Alınması	18

4.5	Makrofajların İntrasahülller Patojen ile İnfekte Edilmesi	20
4.5.1	Kontrol grubu	20
4.5.2	"Canlı" <i>S.typhimurium</i> grubu	20
4.5.3	"Canlı" bakteri + L-NAME grubu	20
4.5.4	"Canlı" bakteri + L-NAME + L-arjinin grubu	20
4.5.5	"Ölü" <i>S.typhimurium</i> grubu	21
4.5.6	"Ölü" bakteri + L-NAME grubu	21
4.5.7	"Ölü" bakteri + L-NAME + L-arjinin grubu	21
4.5.8	L-NAME kontrol grubu	21
4.5.9	L-arjinin kontrol grubu	21
4.5.10	L-NAME + L-arjinin grubu	22
4.6	Kültür Ortamında Biriken Nitritlerin Ölçülmesi	22
4.7	SP Göstergesi NBT Testinin Uygulanması	23
4.8	L-NAME ve L-arjinin uygulanması	23
4.9	Bulguların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	24

## 5. BULGULAR

5.1	"Canlı" <i>S. typhimurium</i> ile infekte edilen makrofajlarda oluşan NO yanıtları	25
5.2	"Ölü" <i>S. typhimurium</i> ile infekte inkübe edilen makrofajlarda oluşan NO yanıtları	27
5.3	"Canlı" <i>S. typhimurium</i> ile infekte edilen makrofajlarda oluşan SP yanıtları	29
5.4	"Ölü" <i>S. typhimurium</i> ile infekte edilen makrofajlarda oluşan SP yanıtları	30
5.5	L-NAME ve/veya L-arginine preparasyonlarının spontan NO ve/veya SP yanıtları	31

## 6. TARTIŞMA

6.1	Tartışma	33
-----	----------	----

## 7. SONUÇ ve ÖNERİLER

7.1	Sonuç ve Öneriler	39
-----	-------------------	----

## 8. KAYNAKÇA

8.1	Referans Yayınlar	40
-----	-------------------	----

<b>Tablo Listesi</b>	<b>Sayfa No</b>
Tablo 1	25
Tablo 2	27
Tablo 3	29
Tablo 4	30
Tablo 5	31
Tablo 6	31
<b>Şekil Listesi</b>	<b>Sayfa No</b>
Şekil 1	26
Şekil 2	28
Şekil 3	32
<b>Fotoğraf Listesi</b>	<b>Sayfa No</b>
Fotoğraf 1	19

### **Kısaltmalar**

NO - Nitrik Oksit
SP - Solunum Patlaması
NADPH - Nikotin Adenin Dinükleotid Fosfat
EDRF - Endothelium Derived Relaxation Factor
FAD - Flavo Adenin Dinükleotid
FMN - Flavo Mono Nükleotid
NOS - Nitrik Oksit Sentaz
cNOS - Constitutive Nitric Oxide Synthase
iNOS - Inducible Nitric Oxide Synthase
IFN-gamma - Interferon-gamma
TNF-alfa - Tumor Necrosis Factor-alfa
IL - Interleukin
SNAP - S-nitroso-N-acetyl-penicillamine
NBT - Nitro Blue Tetrazolium
LPS - Lipopolysaccharide
RES - Retikuloendotelyal sistem
RPMI - Rosewell Park Memorial Institution
FCS - Foetal Calf Serum
L-NAME - N-nitro-L-arginine methyl ester
TSI - Triple Sugar Iron
PBS - Phosphate Buffered Saline

## 1. ÖZETLER

### 1.1 ÖZET

**Anahtar Kelimeler: Makrofaj yanıtı; Nitrik oksit; Solunum patlaması; *Salmonella typhimurium***

**Başlık: Bir intrasellüler mikroorganizmanın, fare peritoneal makrofajlarında oluşturduğu nitrik oksit ve solunum patlaması yanıtlarının değerlendirilmesi**

Organizmaya giren patojeni ilk olarak karşılayan genellikle doğal bağışıklık sistemi, ilk hücreler de makrofajlar olmaktadır. Makrofajlar, Oksijene Bağımlı/Bağımsız Sistemleri ile patojenleri ortadan kaldırmaya çalışırlar. Yapılan bu çalışmada, intrasellüler, fırsatçı bir patojen olarak *Salmonella typhimurium* kullanılmış, canlı ve ölü olarak hazırlanan bakteriler ile makrofaj kültürleri infekte edilmiş, 24 saat sonunda nitrik oksit (NO) ve solunum patlaması (SP) yanıtları değerlendirilmiştir. Değerlendirmenin amacı, Oksijene Bağımlı Sistemlerde yer alan NO ve SP yanıtlarının biribiri ile bağıntısı olup olmadığını araştırmak, ayrıca oluşan yanıtın intrasellüler patojenin invazyonuna mı, yoksa lipopolisakkarid içeriğinin varlığına mı bağlı olduğunu araştırmaktır. Yapılan deneyler sonunda, canlı bakterilere karşı oluşan yanıtlarda ölü bakterilere kıyasla anlamlı bir farklılık gözlemlendi. Ayrıca, NO yanıtı baskılandığında SP yanıtının etkilenmediği sonucuna varıldı. Sonuç olarak, NO ve SP yanıtlarının intrasellüler patojenin makrofaj içine yerleştikten sonra güçlü bir şekilde ortaya çıktığı ve her iki sistem de oksijeni kullandığı halde, SP yanıtının NO yanıtının oluşum mekanizmasından ayrı bir mekanizmayla oluştuğu sonucuna varıldı.

## 1. 2 SUMMARY

**Key Words: Macrophage response; nitric oxide; respiratory burst; *Salmonella typhimurium***

**Title: Determination of nitric oxide and respiratory burst response of mice peritoneal macrophages after an intracellular pathogen infection.**

Generally, the first defence system which responds to an entering pathogen is natural immune system, the first cells are macrophages in human. Macrophages have basically two systems in defence system: Oxygen Dependent/Independent systems. In this study, *Salmonella typhimurium* has been used as an intracellular pathogen, macrophage cultures have been infected by live and dead bacteria and after 24 hours nitric oxide (NO) and respiratory burst (RB) responses have been determined. The main target of this study is, the determination of the possibility of a relationship between these two systems, and determination of the trigger mechanism of these systems. After related experiments, a significant difference has been found between live and dead bacteria in NO and RB responses and RB response has not been effected when NO response has been inhibited. As a result, we suggest that when an intracellular pathogen enters a macrophage, a powerful NO and RB response occurs, and NO response inhibition has no effect on RB response.

## 2. GİRİŞ ve AMAÇ

### 2.1 Giriş

İnfeksiyonlara karşı gelişen bağışıklıkta, doğal bağışıklık sisteminin davranışları her zaman ilgi çekmiştir. Organizmaya giren patojeni ilk olarak karşılayan genellikle doğal bağışıklık sistemi, ilk hücreler de makrofajlar olmaktadır. Makrofajlar, patojenin ortadan kaldırılmasında doğal bağışıklık sistemi ile özgün bağışıklık sistemi arasında adeta bir köprü işlevi görür (1,2).

Makrofajlar, kemik iliği promonositlerinden, kan monositlerine başkalaştıktan sonra dokularda olgun makrofajlara dönüşürler, böylece mononükleer fagosit sistemini oluştururlar. Daha çok pirojenik bakterilere karşı savunmayı oluşturan polimorfların tersine, makrofajların konakçının hücrelerinde yaşayabilen bakteri, virus ve protoozonlara karşı savunmayı oluşturduğu söylenebilir.

Fagositozun başlamasından önce, mikroorganizmanın öncelikle makrofajın yüzeyine yapışması gerekmektedir. Bu olgu, primitif bir tanıma mekanizmasıyla karbonhidratlara karşı olur. Yapışmadan sonra, karbonhidratın doğasına uygun olarak pseudopodların çıkmasını sağlayan bir aktin-miyozin kontraktıl sistemi uyarılır.

Pseudopodların mikroorganizmayı sarmasından sonra da, uygun reseptörler mikroorganizmaya yapışır, plazma membranı bu partikülü sarar ve bir fermuar gibi kapanarak mikroorganizmayı bir vakuol içine alarak kapatır. Bu aşamadan sonra, makrofajın içindeki Oksijene Bağımlı ve/veya Bağımsız Sistemler devreye girerek mikroorganizmayı öldürmeye çalışır (3).

**2. 1. 1 Oksijenden Bağımsız Sistem:** Bu sistem kapsamında, katepsin G, lizozim, laktoferrin, proteolitik enzimler bulunmaktadır.

Katepsin G; Yüksek moleküler ağırlıktaki katyonik proteinlerdir, lipit tabakalarında iyon geçirgen kanallar oluştururlar ve fagolizozomların oluşumundan sonra devreye girerler. Antikora-benzer özellik gösterirler,

Lizozim: Bakteri duvarındaki mukopeptidleri yıkarlar,

Laktoferrin: Demire bağlanabilirler ve bakteriler tarafından kullanımını engellerler,

Proteolitik enzimler: Öldürülen organizmaların sindirilmesini sağlarlar.

**2. 1. 2 Oksijene Bağımlı Sistem:** Reaktif Oksijen Ara Maddeleri ve Reaktif Nitrojen Ara Maddeleri olarak iki bölümden oluşur;

**2. 1. 2a) Reaktif Oksijen Ara Maddeleri;** NADPH (Nikotin adenin dinükleotid fosfat) oluşturmak üzere, heksoz monofosfat şant aktivitesi belirgin biçimde artar. NADPH, moleküler oksijen bağına plazma membran sitokromu (sitokrom b-245) üzerinden solunum patlamasına (SP) götürür. Sonuçta oksijen, çok güçlü mikrobisidal etkileri olan süperoksid anyonu, hidrojen peroksit, singlet oksijen (aktiflenmiş oksijen) ve hidroksil radikallerine dönüşür **(3)**..

**2. 1. 2b) Reaktif Nitrojen Ara Maddeleri;** Nitrojen Ara Maddeleri, normal amino asit ve üre siklusu yani normal nitrojen metabolizması sırasında ortaya çıkarlar. Makrofaj içindeki reseptörler devreye girdikten sonra, L-arjinin' nin terminal guanidino nitrojen atomlarından birinin oksidasyonu sonucunda ara ürün olarak nitrik oksit (NO) oluşur **(4)**. NO' in sitotoksik etkisi, bu molekülün mitokondriyal elektron transport zincirinde yer alan nikotin adenin dinükleotid ubikinon oksiredüktaz ve süksinat ubikinon oksiredüktaz **(5)**, sitrik asit siklusunda yer alan akonitaz **(6)** ve sitozolik ribonükleotid redüktaz **(7)** enzimlerinin selektif inhibisyonuna bağlıdır. Ayrıca NO, oksijenle birleşir ve

nitritler oluşur. Nitritlere hidrojen eklenmesiyle nitroz asit (fizyolojik pH' da stabil değildir), ondan da nitrat ve hidroksi radikali oluşur (8).

## 2.2 AMAÇ

Yapılan bu çalışmada amaç, özgül olmayan bağışıklık sisteminde yer alan makrofajların intrasellüller mikroorganizmalara karşı geliştirdikleri, Oksijene Bağımlı Savunma Sistemleri' nde yer alan NO ve SP yanıtlarının, intrasellüler fakültatif bir patojen olan *Salmonella typhimurium*' un intrasellüler varlığına (invazyonuna) bağlı oluşup oluşmadıklarının ve eğer oluşuyorlarsa bu iki savunma sisteminin birbiriyle bağıntısı olup olmadığı araştırılmasıdır.

Bu amaçla, *Salmonella typhimurium*' un mutant olmayan kökeni (aynı yoğunluklarda olmak üzere, hem canlı hem ölü şekilde) ile, gerek NO inhibitörü kullanılarak gerekse inhibitör kullanılmadan hazırlanan BALB/c farelerin peritoneal makrofaj kültürleri, aynı yoğunlukta ayrı ayrı infekte edilmiş ve 24 saat sonunda oluşan NO ve SP yanıtları değerlendirilmiştir. Aynı çalışmada, kültürlerle dışarıdan eklenen L-arjinin' nin NO yanıtını etkileyip etkilemediği, dolayısıyla oluşan NO yanıtının L-arjinin metabolizması ürünü olup olmadığı da araştırılmıştır.

### 3. GENEL BİLGİLER

#### 3.1 Nitrik Oksit (NO)

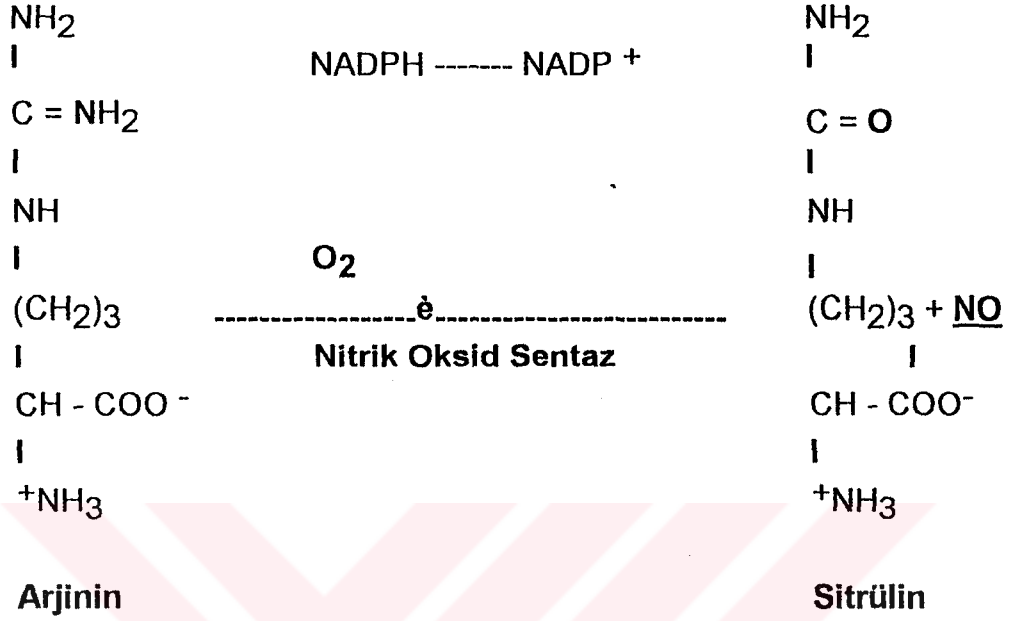
Nitrojenin reaktif oksidleri, 1980' li yılların sonuna kadar *Achromobacter cycloclastes*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus halodenitrificans* (9,10,11)...gibi doğada yaygın olan bakteri türleri tarafından üretilen ve sadece akciğer hastalıklarını alevlendiren veya yiyeceklerin korunmasında kullanılan maddeler olarak bilinirdi (12). Bu yıllarda elde edilen sonuçlar NO' in disiplinlerarası araştırmalarını tetikledi. Bu sonuçlara göre NO memeli hücrelerinin bilinen biyoaktif salgı ürünleri içinde en düşük moleküler ağırlığı taşıymaktaydı. Yüksek kimyasal etkinliğinin anlamı ise, yarı-ömrünün kısalığı ve ilişkilerindeki özgüllüğünün minimal olmasıydı (12). İlginç olan başka bir araştırma sonucu bu çok basit, hızla kaybolup giden karışık reaktanın nöroiletim ve damarsal tonüs mekanizmalarını kontrol edebilecek yeterli bilgiyi taşıyabildiğini gösterdi (13). Yine çok ilginç bir başka sonuç da, bu maddenin mikropları ve tümör hücrelerini yok edebilmesiydi (14,15). Bu aşamadan sonra bilim adamları kendilerine, memeli hücrelerinin NO' i nasıl ürettiğini ve bu kadar çok ve karışık fizyolojik mekanizmayı nasıl harekete geçirebildiğini sormaya başladılar. 1981-1986 yılları arasında 10 bilimsel yayın bu konuya kaynak olurken, 1987-1992 arasında bu sayı 500' ü buldu .

Araştırmaların başlangıç yıllarına gidersek, 1980' li yıllarda karsinogenezin analizi çalışmalarında, memeli hücrelerinin nitrojenden inorganik oksidler oluşturduğu bulundu. Daha düşük nitratlı diyetle beslenen insanlarda, endojen bir nitrat sentezi olduğu bulundu (16). Normal koşullar altında, insanlarda yaklaşık 1 mmol / gün nitrat sentezi olduğu bilinmekteydi (17). Bu nitrat sentezinin ilk anda barsakların mikrobiyal metabolizması sonucu ortaya çıktığı düşünülüyse de, daha sonra "germ-free" hayvanlarda memeli orijinli olduğu gösterildi (18). Yine insan deneklerde (16) yineleyen infeksiyonlarda idrarla atılan nitratın keskin bir biçimde arttığı, sıçanlar (17) ve farelerde de bu artışın (18) inflammatuar, infeksiyöz maddeler injekte edildiğinde taklit edildiği görüldü.

İlerleyen araştırmaların bir başka kolunda da, aktive olmuş fare makrofajlarının solunumu baskılayıcı ve sitostatik etkisinin biyokimyasal nedenleri araştırılırken, makrofajların demir eksikliği ve demir-sülfür enzimlerinin baskılanmasıyla ilerleyen, tümör hücreleri ve funguslarda oksidatif bir hasar oluşturduğu kanıtlandı (8,19). Hücre dışı ortamda bulunan L-arjinin ise bu tür bir sitotoksik etkide gerekli ve yeterli olan bir metabolitti (20,21,22). Bu sitotoksik etki ile ilgili çalışmalara kısa sürede helmintler, protozoonlar ve mikobakterlerle ilgili çalışmalar da eklendi (19). Çok önemli bir başka araştırma sonucunda ise, nitrojenin reaktif oksitlerinin üretiminin nitrojene bağlı L-arjinin analoglarıyla baskılandığı bulundu. Bu tür analogların kullanılması NO araştırmalarında tam anlamıyla bir köşe taşıını oluşturdu (23,24,25,26). Vazodilatasyon ile ilgili araştırmalarda NO' in trombosit agregasyonunu baskıladığı (27) ve damar genişlemesine neden olduğu (28) saptandı. Bunun üzerine endotelyumdan salınan labil, damar gevşetici maddeye Endotelyumdan Kaynaklanan Gevşetici Etken (Endotelium-Derived Relaxing Factor=EDRF) adı verildi. İki farmakoloji grubu bu konuda yaptıkları çalışmalar sonucunda bu iki maddenin aslında, NO adı altında birleşebileceğini gösterdi çünkü her iki madde de aynı özellikleri taşıyordu (29,30). Aktive makrofajların son derecede reaktif bir ürünü olan NO, gaz formunda bir düzenleyicidir, anstabil ve etkisi kısadır. Oluşumundan 5-10 saniye sonra, su ve oksijen ile, nitrit ve nitratlara okside olur (31). L-arjinin' nin bir guanidino nitrojeni, beş elektronluk bir oksidasyona gider ve bir N-hidroksil-L-arjinin ara ürünü yolu ile gaz formunda bir radikal olan NO' i verir.

NADPH, bu ara ürünüün oluşumu için iki elektron ve ileri oksidasyon için de bir elektron verir. Her iki basamak da, flavo adenin dinükleotid (FAD) ve flavo mono nükleotid (FMN) içeren bir enzim olan Nitrik Oksid Sentaz enzimi (NOS) ile katalizlenir. Özet olarak; L-arjinin, oksijen ve NADPH yardımcı substratlar ; FMN, FAD, hem ve tetrahidrobiyopiterin yardımcı faktörler ; ve NO ile L-sitrülin de bir dioksigenaz olan NOS ile katalizlenen bir reaksiyonun yan ürünleridir (32).

NO' in oluşumu, aşağıdaki formülde açıklandığı şekilde gerçekleşir:



Biyolojik sistemlerdeki kısa yarı-ömrü, direkt olarak tanınmasında problem oluşturur. NO biyosentezi, yaklaşık olarak 12 saatlik bir indüksiyon zamanına gereksinim duyan ve en az 3 gün devam eden stabil bir son ürün olan nitritin birikimi ile tesbit edilir.

NO gazının, oluşumundan birkaç saniye sonra nitrit ve nitratlara dönüştüğünü bilinmektedir. Bu kimyasal olaya dayanarak yapılan deneylerde nitrit birikimi değerlendirilerek, NO yanıtı üzerine yorum yapmak mümkündür. Nitrit, bu çalışmada da olduğu gibi, son ürün olarak bir kromoforun oluştuğu ve klasik olarak "Griess Reaksiyonu" olarak bilinen bir reaksiyon sonucu tesbit edilebilir (33).

"Griess Reaksiyonu" nun oluşma prensibi şu şekilde özetlenebilir: Ortamda biriken nitritin ölümü kirmızı bir azo bileşiğinin oluşumuna dayanmaktadır. Bunun gerçekleşebilmesi için önce, sulfanilamide veya sulfanilik asit gibi primer aminlerin asidik solüsyonu, nitritler ile bir diazonyum tuzu oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu bileşim bir sonraki aşamada aromatik aminle birleşerek kirmızı bir azo boyası verir. Bu boyanın yoğunluğu da spektrofotometrede llebilir.

İki tip NOS vardır; "esas" (constitutive) tip (cNOS) ve lipopolisakkaridler (LPS) ve sitokinlerin inflammatuar lökositleri uyarmasıyla üretilen "indüklenebilen" (inducible) (iNOS) tip.

cNOS, sitozoliktir, Ca/kalmoduline bağımlıdır, glukokortikoidlerden etkilenmez ve reseptör veya fizyolojik uyarımlar sonucunda kısa süreli NO üretir, hüresel kaynakları endotelial hücreler ve bazı merkezi nöronlar, pankreas adacıklarındaki beta hücreleri ile renal makula densa hücreleridir.

iNOS, sitozoliktir, Ca' dan bağımsızdır, diğer yardımcı faktörler gibi tetrabiyopiterine gereksinim duyar, üretimi glukokortikoidlerle baskılanır, hüresel kaynakları makrofajlar, karsinoma hücreleri, inflammatuar nötrofiller ve astrositlerdir (12).

Nitrik Oksid Sentaz' ların ayırımı, şu şekilde özetlenebilir:

**cNOS**

**iNOS**

**Hüresel Kaynaklar**

Endotelyal hücreler

Bazı merkezi nöronlar

Pankreas adacıkları beta h.

Renal makula densa h.

Makrofajlar

Karsinoma hücreleri

İnflammatuar nötrofiller

Astrostitler

**Hızlı etkiyen aktivatörler**

Yanıt veren h.'ye bağlı olarak:

Kalsiyum iyonoforları

Elektriksel uyarı

Asetilkolin, bradikinin

Trombin

Tanımlanan yok.

**Derece derece etkiyen indüktörler**

Tanımlanan yok.

IFN + LPS

IFN + TNF

IFN + IL-1

İki NOS arasındaki benzerlik ve farklılıklar şu şekilde özetlenebilir:

**cNOS**

**iNOS**

Sitozolik

NADPH' a bağımlı

Dioksigenaz

L-arginine analoglarıyla inhibe

Ca<sup>2+</sup> / kalmodulin' e bağımlı

Pikomol NO salınımı

Kısa süreli salınım

Glukokortikoidlerden etkilenmez

Sitozolik

NADPH' a bağımlı

Dioksigenaz

L-arginine analoglarıyla inhibe

Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin'den bağımsız

Nanomol NO salınımı

Uzun süreli salınım

Glukokortikoidlerle baskılanır

### 3. 2 NO ve Bağışıklık Sistemi ile İlişkisi

Aktive olan makrofajlar, bakteri ve protozoon gibi mikroorganizmalara karşı özgül olmayan sitotoksik bir aktivite gösterirler (34). Benzer biçimde, mikroorganizmalar ve LPS uygulaması da makrofajların, neoplastik hücrelere karşı sitotoksikite gösterecekleri şekilde davranışlarını değiştirir (35).

Makrofajlar, NO salınımında işlevleri bilinen ve geniş araştırma konusu olmaya devam eden sitokinlerin etkileri altında davranırlar. Bilinen ilk mekanizma, IFN-gamma ile Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF-alfa) nın sinerjistik olarak NO üretimini arttırdığıdır (36). Deneysel uygulamalarda, anti TNF-alfa' nın NO üretimini yarıya yakın azalttığı görülmüştür. Ayrıca İnterlökin-1 (IL-1), IL-4, IL-10, IL-12 üretime destek olurken (37), IL-13 ise NO üretimini baskılamaktadır (38).

Endojen NO' in kedi mezenterik venlerindeki endotelyuma, lökositlerin adezyonuna tonik bir baskılayıcı etki yaptığı görülmüştür. NOS inhibitörlerinin uygulanması nötrofillerdeki CD11/CD18 adezyon moleküllerinin sayısını arttırmış, aynı zamanda nötrofillerin damar duvarına tutunmalarını ve damar dışı dokuya göçlerini arttırmıştır (39). Bir başka deneysel çalışmada, LPS' e bağlı hepatotoksiste, barsak doku hasarı ve damar geçirgenliği NO inhibitörlerince baskılanmış ve NO donörü S-nitroso-N-acetyl-penicillamine (SNAP) ile patolojik hasar geri döndürülmüştür (40). Makrofajdan kaynaklanan NO, yalnızca intrasellüler parazitleri (41) ve neoplastik hücreleri (12) öldürmekle kalmaz, aynı zamanda özgül lenfosit yanıtlarının gelişimini de sağlar (12). Aktive olan makrofajlar, NO ve sitokinlerin salınımı yolu ile bağışık yanıtları artırır veya baskırlar. NO' in makrofajlardan kendiliğinden salınımı ile lökositler, makrofajlardan kaynaklanan sitokinlere karşı duyarsızlaşabilirler (12). Bu ilişkilerin bilinmesi kuşkusuz ileri çalışmalarda sitokinlerin, NO baskılayıcılarının ve NO donörlerinin NO üretimindeki etkilerinin ve etkileşimlerinin, bağışık sistem davranışları ve olguların sağaltımındaki rollerini gündeme getirmektedir. Günümüzde deneysel amaçlarla, NO' nun gaz formunda ve eriyik infüzyonu şeklinde sağaltımda kullanımı söz konusudur, ancak şüphesiz bu konularda daha fazla bilgiye gereksinim vardır (12).

### 3.3 Solunum Patlaması (SP)

Polimorfonükleer lökositler (PMN), inflamasyon bölgesinde LPS, mikroorganizmalar veya bağışık komplekslerin uyarısıyla bir Solunum Patlaması'na (SP) giderler. "Solunum Patlaması" adını almasının nedeni, PMN'lerin keskin bir artışla oksijen kullanmaya başlamalarıdır. Bu keskin oksijen kullanım artışı, mikrobiyal patojenlerin öldürülmesinde yer alan oksidan türlerin, iki farklı enzimle oluşturulması fenomeninden sorumludur. Enzimlerden birincisi, sitokrom b-245 taşıyan, plazma membranına bağlı NADPH oksidaz sistemidir. Bu sistem, süperoksidaz anyon radikali oluşturmak üzere moleküler oksijenin univalan olarak indirgenmesini katalizler. İkinci enzim, myeloperoksidazdır. Bu enzim nötrofillerin azurofilik granüllerinde yerleşen bir hemoproteindir ve myeloperoksidaz oksidan hipokloroz asidin (hypochlorous acid) üretimini katalizler (42). SP'nin gerçekleşmesi için lizozom füzyonu gerekli değildir, reaksiyon fagozomun içeri alınmasıyla spontan olarak gerçekleşir. Eğer lizozom füzyonu gerçekleşirse, myeloperoksidaz fagozoma girebilir peroksidlere etki eder ve toksik oksidanlar oluşur (43). Reaktif Oksijen Ara Maddeleri oluşumu, aşağıdaki kimyasal reaksiyonlarda özetlendiği gibi gerçekleşir:

1. Glukoz + NADP<sup>+</sup> (heksoz monofosfat yolu) pentozmonofosfat + NADPH  
(Heksoz monofosfat üzerinden, NADPH ortaya çıkar)
2. NADPH<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> (sitokrom b-245) NADP<sup>+</sup> + 2O<sub>2</sub><sup>-</sup>  
(İlk enzim olan sitokrom enzimi devreye girer ve süperoksid anyonu oluşur)
3. 2O<sub>2</sub><sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup> (Spontan dismutasyon) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + <sup>1</sup>O<sub>2</sub>  
(Bu basamakta spontan dismutasyon yoluyla, hidrojen peroksid ve singlet oksijen ortaya çıkar)
4. O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ----- .OH + OH<sup>-</sup> + <sup>1</sup>O<sub>2</sub>  
(Bu basamakta da yine spontan dismutasyonla hidroksil radikalleri ve singlet oksijen oluşur)
5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Cl<sup>-</sup> (Myeloperoksidaz) OCl<sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O  
(Bu basamakta ikinci enzim olan myeloperoksidaz enzimi devreye girer, klorürün varlığında, myeloperoksidaz enzimi hidrojen peroksidi parçalar ve bir sonraki basamakta mikrobisidal singlet oksijen oluşur).
6. OCl<sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O ----- <sup>1</sup>O<sub>2</sub> + Cl<sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O =

Oksijene Bağımlı Savunma Sistemlerinden birinin de, oksijen radikallerinin üretimi olduğu bilinmektedir. Yukarıda da açıklandığı üzere, içine bir bakteriyi alan fagositik hücrede oksijen kullanımında büyük bir artış ortaya çıkar. Oksijenin fagositik hücreler tarafından alınımının açıklanması da, direkt olarak bir oksijen elektrodunun kullanımı ile olur. Redoks bir boya olan Nitro Blue Tetrazolium (NBT)' un indirgenmesi testi ile radikallerin ortamdaki varlığı saptanabilir (43).

NBT' nin çalışma prensibi şu şekilde açıklanabilir; içlerine bir patojen alan makrofajlar sarı renkteki çözünebilir NBT boyasını, fagositik vakuoller içinde çözünmez - koyu mavi renkteki formazan çökeleklere çevirirler. Ortaya çıkan kimyasal olay, hücrenin içindeki nükleotid oksidazın varlığına bağlıdır, bu da bize süperoksidin varlığını, dolayısıyla SP' yi gösterir.

### 3.4 SP ve Bağışıklık Sistemi ile İlişkisi

Tümörün veya inflamasyonun geliştiği bölgelerde, makrofaj ve nötrofiller gibi inflamasyon hücrelerinin aktive olmasıyla ortaya çıkan SP, inflamasyon hücreleri dışında fagositik olmayan hücreler tarafından da oluşturulabilir. Örneğin, Epstein-Barr virus tarafından transforme olan insan B-lenfositleri, nötrofillerin NADPH-oksidad sistemine benzer biçimde süperoksid yapabilirler. Süperoksid, lökositler dışındaki hücreler tarafından da üretilir. İnsan fibroblastları; IL-1 veya TNF-alfa gibi sitokinlerin uyarısıyla süperoksid salgırlar. Onkojen ile transforme olan fibroblastlar da anlamlı ve sabit oranlarda süperoksid salgırlar. Hidojen peroksid ise, melanoma - kolon karsinomu - pankreatik karsinoma - nöroblastoma - over ve göğüs karsinomu gibi insan tümör hücreleri tarafından da salgılanır (44).

Oksijen radikalleri, romatoid artrit-ateroskleroz-pulmoner amfizem-kanser-inflamatuar barsak hastalığı ve periodontal hastalık gibi inflamatuvar hastalıklarda gösterilmiştir. Radikaller aynı zamanda yaşlanmanın normal gelişiminde de ortaya çıkar (45).

Radikallerin azlığı ya da aşırılığı bazı hastalıkların nedeni olabilir; Genetik bir sendrom olan Kronik Granümatöz Hastalıkta sitokrom b-245 yoktur ve SP gerçekleşemez. Bu olgularda, dirençli bakteriyel infeksiyonlar görülür. NADPH oksidaz ise bakteriyel invazyona karşı kontrollü akut inflamatuvar yanıtta yer alır, ancak bu enzimin aşırı varlığı da doku hasarına neden olur (45). SP sırasında ortaya çıkan süperoksid anyonuna ve hidrojen peroksida karşı süperoksid dismütaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimleri devreye girer. Bu enzimler, radikallerin oluşumunu baskırlar ve denge görevini üstlenirler. Ancak SP sırasında oluşan hidroksi radikallerine karşı bir savunma-dengeleme sistemi yoktur, vücut için savunma işlevini yerine getiren hidroksi radikali daha sonra da vücut için zararlı olmaya başlar (yaşlanma,... gibi ). Yani vücut yaşamak için oksijeni kullanır ama, oksijen aynı zamanda onu ölüme götürür (45).

### 3.5 Deneysel Sistemlerde İntrasellüler Patojen Olarak Kullanılan *Salmonella typhimurium*' un Tanıtılması

*Salmonella typhimurium*, retiküloendotelyal sistemin fagositik hücrelerinde yaşayabilen, fareler için fakültatif intrasellüler bir patojendir ve bağışık direnci düşük insanlardaki gastroenteritin başlıca etkenlerindedir.

Genetik ve fizyolojik olarak *S. typhimurium* iyi tanımlanmış olmasına karşın, makrofaj içinde canlı kalabilme mekanizmaları ile ilgili bilgiler sınırlıdır. *S. typhimurium*, fagolizozom içinde yaşayabilir ve çoğalabilir. Bakterinin yüzeyindeki lipopolisakkarit (LPS, O antijeni veya endotoksin), iyi tanımlanmış bir virulans etkendir (46).

O antijeninde yer alan lipopolisakkaritler, bir bazal kor polisakkaridine tutunan yineleyen oligosakkarit üniteleri içerir. Bu bazal kor polisakkaridi, lipid A kompleksine tutunur.

Yineleyen oligosakkarit üniteleri, dış membran yüzeyinden çok ince, çok küçük lifler gibi çıkarlar. Hücrenin dış yüzeyine sunulduklarında, spesifik

karbonhidrat yapılarından oluştuklarından, bu lifler yoğun olarak immunojeniktirler. O antijeni tanıyı bu lifleri tanımlar.

Bakteriler henüz açıklanamayan bir şekilde, evrim süreci içinde bu antijenik yapılarını genetik olarak çok hızlı şekilde değiştirerek vücudun savunma sistemlerinden kaçarlar (47).

*Salmonella typhimurium*\* un başarılı infeksiyonu, birçok koşulun koordineli olarak bir araya gelmesiyle ortaya çıkar. Hücre zarındaki LPS ve diğer bileşimler, mikroorganizmanın konakçının içinde yaşayabilmesini ve bakteri yüzeyinde kompleman birikmesini önleyerek fagositoz ve makrofaj tarafından yok edilmesinden korunmasını da sağlarlar. Ayrıca motilite de bakterinin uygun invazyon yapabileceği bölgelere ulaşabilmesini sağlar (46).

Retiküloendotelyal sistemde (RES) *S. typhimurium*' un intrasellüler patojenitesinin araştırıldığı deneysel çalışmalarda, gentamisin kullanılmış, bu yolla ekstrasellüler mikroorganizmalar elimine edilerek, intrasellüler mikroorganizmaların etkileri ortaya konmaya çalışılmıştır (48).

#### 4. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

##### 4.1 DeneYlerde Kullanılan Gereçler, Kimyasal Maddeler ve Bakteri Kökeni

###### 4.1.1 DeneYlerde kullanılan gereçler:

96 gözlü steril, kültür plate' i (NUNC, Cat.No: F 16 70 08),  
96 gözlü Immunoplate (NUNC, Maxisorp Cat.No: 43 94 54),  
Lamine Air Flow Cabinet ,  
Karbondioksitli Etüv ,  
Spektrofotometre ,  
Uygun pipetler ve steril pipet uçları.

###### 4.1.2 DeneYlerde kullanılan kimyasal maddeler:

RPMI-1640 medium (SIGMA, Cat.No: R 87 58, Liquid Medium-with L-  
glutamine, sodium bicarbonate and phenol red-Endotoxin Tested),  
Foetal Calf Serum (FCS) (SEROMED-Biochrom KG, Cat.No: SO113-  
Tested for Mycoplasma-Low Endotoxin Level),  
Penicillin + Streptomycin Solüsyonu (SIGMA, Cat.No: P 07 81-steril-  
Endotoxin and Cell Culture Tested; 10. 000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml  
Streptomycin),  
N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (SIGMA, Cat.No: N-57 51),  
Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (SIGMA, Cat.No: N 68 76),  
N-(1-Napthyl) ethyl-enediamine (SIGMA, Cat.No: N-91 25),  
Sulfanilamide (p-Aminobenzenesulfonamide) (SIGMA, Cat.No: S-92 51),  
Genta ampul (Ibrahim Etem, 20mg/ml),  
L-arginine (SIGMA, Cat.No: A-37 84),  
Sodyum Nitrite (NaNO<sub>2</sub>) (SIGMA, Cat.No: S-22 52),

#### 4.1.3 Deneylerde kullanılan bakteri kökeni:

Diyabetes mellitus' lu - insan bir olgudan izole - 37°C' a duyarlı olmayan - mutant olmayan *Salmonella typhimurium* kökeni (K 1961)

Yurtdışıdaki bir merkezden armağan olarak gelen kökenden, saf kültür olup olmadığını kontrol etmek amacıyla, uygun agar plaklarına ekim yapıldı. 37 derecede üretilen kolonilerden iğne öze ile üreaz sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 2 saat, 37 derecede inkübe edildi. Üreaz olumsuz oldukları görüldü. Aynı kolonilerdeki bakterilerden bir örnek bir damla steril tuzlu suda ezilerek, üzerine bir damla polivalan Salmonella bağışık serumu damlatılıp aglütinasyon olduğu görüldü.

Yine saf kültürden gram boyası ve hareket incelendi. Gram olumsuz ve hareketli oldukları görüldü. Saf kültürden alınan örnekten, Triple Sugar Iron (TSI)' ye ekim yapıldı. İnkübasyon sonunda yatık kısmın alkali, dip kısmın asidik olduğu, gaz ve hidrojen sülfürün oluştuğu görüldü. Bu aşamalardan sonra, tuzlu suda hazırlanan bakteri süspansiyonu sıra ile OA, OB, OC, OD ve OE polivalan grup aglütinan serumlarıyla karşılaştırıldı. OB ile aglütinasyon verdiği görüldü ve 1,4,5,12 O antijenlerine karşı hazırlanmış monovalan serum ile spesifik i H antijenine karşı hazırlanmış monovalan serum ile bakteri karşılaştırıldı, pozitif bulundu. Bu testlerle kökenin *Salmonella typhimurium* olduğu kanıtlandı.

#### 4.2 Deneylerde Kullanılan Fareler

Yapılan deneylerde, *S. typhimurium* ' a duyarlı olduğu bilinen BALB/c genetik kökenli farelerin peritoneal makrofajları kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan fareler, Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarları' nda yetiştirilen, 8-12 haftalık, sağlıklı dişi farelerden seçilmiştir. Farelerin bakımı ve izlenmesi araştırmacı tarafından yapılmıştır.

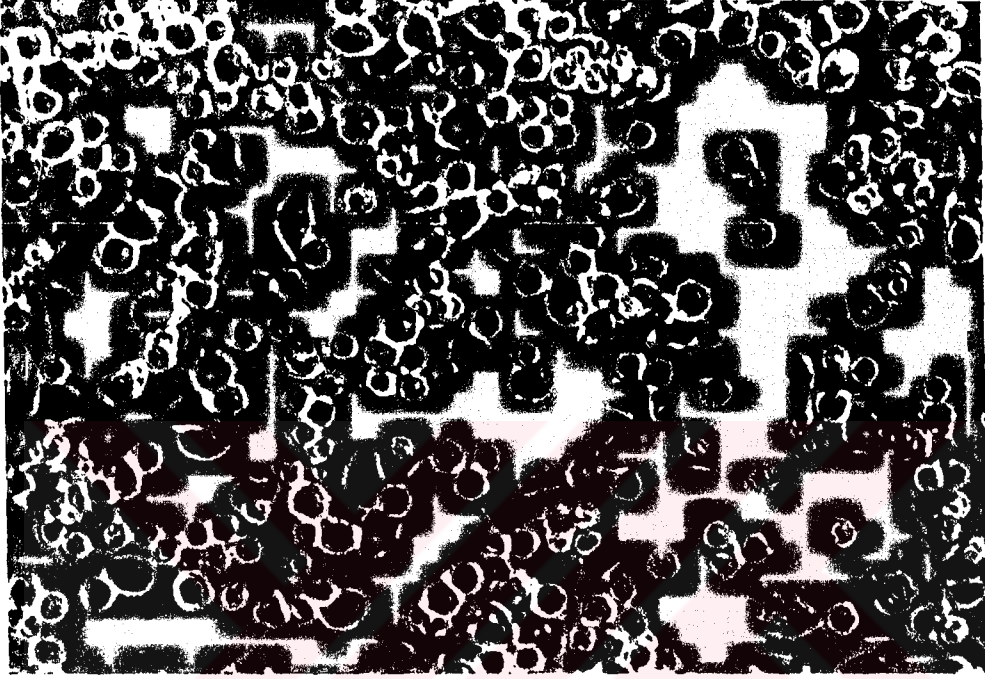
### 4.3 Fare Peritoneal Makrofajlarının Elde Edilmesi

Fare peritoneal makrofajlarının elde edilmesi için bilinen, klasik bir yöntem kullanılmıştır (49). Yöntem şöyle tanımlanabilir: Fareler önce usulüne uygun olarak servikal dislokasyonla öldürülmüştür. Daha sonra sırt üstü yatırılarak, ekstremitelerinden iğnelenmiş, karın derisi %70' lik alkolle silinmiş ve steril makas yardımıyla karın boşluğu açılmıştır. Bu işlemden sonra periton boşluğu %5 fetal calf serum (FCS)' luk , heparinli (0,4 ml/100 ml), steril phosphate buffered saline (PBS) solüsyonu ile yıkanmış ve peritoneal makrofajlar alınmıştır. Makrofajlar, steril tüpler içinde, buz üzerinde laboratuara taşınmıştır.

### 4.4 Makrofajların Kültüre Alınması

Laboratuara getirilen makrofajlar steril koşullarda ("lamine air flow" altında), %5' lik FCS' lu RPMI-1640 (10. 000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin) ile yıkanmış, uygun miktarda metilviyole ile Burger-Türk kamerada sayımı yapılmış, hücre yoğunlukları hesaplanmış ve hücreler  $2 \times 10^6$ /ml olacak şekilde plate çukurlarına dağıtımı yapılmıştır.

Bundan sonraki aşamada makrofajlar 37°C' da, %5 CO<sub>2</sub> altında, RPMI-1640 ile bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Bir gece inkübasyonun amacı, makrofajların tam olarak plate tabanına yapışmasını sağlamaktır. Hazırlanan makrofaj kültürlerinden örnek bir görüntü Fotoğraf 1.' de sunulmuştur.



**Fotoğraf 1: Kùltùre alınmış fare peritoneal makrofajlarının gùrùnùmù.** Plate tabanına tam olarak yapışmış olan makrofajlar daha koyu renkte gùrùnmektedir. İzleneren diğer hùcreler lenfositlerdir ( X400 bùyùtme, faz kontrast mikroskobik gùrùntù) ( Makrofaj fotoğraflarının çekiminde yardımcı olan, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' ndan Kemal KORKMAZ' a teřekkùr ederiz).

## 4.5 Makrofajların İntrasellüler Patojen ile İnfekte Edilmesi

Deney sisteminde denenecek kriterler şu şekilde gruplandırılmıştır:

**4.5.1 Kontrol grubu:** Bu grup, kültüre alınmış makrofajların spontan olarak NO ve / veya SP yanıtı oluşturup oluşturmadıklarını, dolayısıyla farelerin herhangi bir infeksiyonları olup olmadığını sınamak için seçilmiştir. Bu grup üç çukurun yalnızca makrofajlara bırakılması, hiçbir kimyasal maddenin bu çukurlara eklenmemesi yoluyla hazırlanmıştır, bu gruptaki hücrelerin ortamı deneyin başından sonuna kadar değiştirilmemiştir,

**4.5.2 "Canlı" *S. typhimurium* grubu:** Bu grup, canlı bakteriyle infekte edilen makrofajlardan elde edilecek yanıtlar için hazırlanmıştır. Bu grupta üç çukur insandan izole, ısıya duyarlı olmayan, 37°C' da canlı kalabilen, mutant olmayan, patojen *S. typhimurium* suşu ile McFarland skalasına göre 1 düzeyinde ( $3 \times 10^8$ /ml) bakteri ile, 30 dakika 37°C' da, %5 CO<sub>2</sub>' li ortamda infekte edilmiş, bu sürenin sonunda ekstrasellüler bakterilerin öldürülmesi için hazırlanan 200 µg/ml gentamisinli RPMI-1640 ile çukurlar 3 kez yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra makrofajlar 100 µg/ml gentamisin yoğunluğunda hazırlanan RPMI-1640 ile 24 saat, 37°C' da- %5 CO<sub>2</sub>' li ortamda inkübe edilmiştir,

**4.5.3 "Canlı" bakteri + L-NAME grubu:** Bu grup, canlı bakterilerle oluşacak NO ve SP yanıtlarının, NO inhibitörü olan L-NAME ile etkilenip etkilenmediğini test etmek için hazırlanmıştır. Bu grupta canlı bakterilere son inkübasyon aşamasında final konsantrasyonda 1mM/ml L-NAME eklenmiştir. L-NAME, RPMI-1640 ile dilue edilmiş, 0.22 µm' lik filtreden süzölmüş ve 3 çukura eklenmiştir,

**4.5.4 "Canlı" bakteri + L-NAME + L-arjinin grubu:** Bu grup, oluşan NO yanıtının, L-NAME ile baskılandıktan sonra, L-arjinin metabolizmasına uygun olarak, eklenen L-arjinin ile artıp artmayacağını sınamak için hazırlanmıştır. Bu grupta da son inkübasyon aşamasında final konsantrasyonda 0.4 mM/ml L-arjinin ve 1mM/ml L-NAME eklenmiştir. L-arjinin de RPMI-1640 ile dilue edilmiş, 0.22 µm' lik filtreden süzölmüş ve 3 çukura eklenmiştir,

"Ölü" bakterilerin uygulandığı deney gruplarında da, "canlı" bakterilerle hazırlanan deney gruplarındaki amaçlar esas alınmıştır.

**4.5.5 "Ölü" *S. typhimurium* grubu:** Bu grup, ölü bakterilerle inkübe edilen makrofajların yanıtlarını değerlendirmek için hazırlanmıştır. Bu grupta yine üç çukur kullanılmıştır. Canlı grupta uygulanan yoğunluktaki bakteriler, 56°C' da 30 dakika su banyosunda öldürmüştür daha sonra canlı grupta uygulandığı gibi makrofajlar "infekte" edilmiş ve aynı prosedürle inkübasyon yapılmıştır,

**4.5.6 "Ölü" bakteri + L-NAME grubu;** Bu grupta ölü bakterilere son inkübasyon aşamasında 1mM/ml L-NAME eklenmiştir. L-NAME, RPMI-1640 ile dilue edilmiş, 0.22 µm' lik filtreden süzölmüş ve 3 çukur eklenmiştir,

**4.5.7 "Ölü" bakteri + L-NAME + L-arjinin grubu;** Bu grupta da son inkübasyon aşamasında 0.4 mM/ml L-arjinin ve 1mM/ml L-NAME eklenmiştir. L-arjinin de RPMI-1640 ile dilue edilmiş, 0.22 µm' lik filtreden süzölmüş ve 3 çukura eklenmiştir,

Aşağıda 4.5.8, 4.5.9, 4.5.10 başlıklarında açıklamaları yapılan deneylerimizde L-NAME ve L-arjinin eriyiklerinin makrofaj kültürlerinde, birlikte ve / veya ayrı ayrı, spontan NO ve / veya SP yanıtı oluşturup oluşturmadıklarının sınanması amaçlandı.

**4.5.8 L-NAME kontrol grubu;** Bu grupta L-NAME' in uyarıcı etkisinin olup olmadığının test edilmesi için 1mM/ml L-NAME, başka kimyasal madde eklenmeden, 3 çukura makrofaj kültürüne uygulanmıştır,

**4.5.9 L-arjinin kontrol grubu;** Bu grupta L-arjinin' nin uyarıcı etkisini olup olmadığının anlaşılabilmesi için 0,4 mM/ml L-arjinin, başka kimyasal madde eklenmeden, 3 çukur makrofaj kültürüne uygulanmıştır,

**4.5.10 L-NAME + L-arginin kontrol grubu;** Bu grupta da L-arginin+L-NAME bileşiminin uyarıcı etkisinin olup olmadığının araştırılması için, 0,4 mM/ml L-arginin + 1mM/ml L-NAME, başka kimyasal madde eklenmeden, 3 çukur makrofaj kültürüne uygulanmıştır.

Deneylerimizde her test için 3 çukur kullanılmış ve 3 ayrı zamanda yinelenmiştir. Tüm deneylerimizde 5 dişi farenin peritoneal makrofajları kullanılmıştır.

#### **4.6 Kültür Ortamlarında Biriken Nitritlerin Ölçülmesi**

Kültür ortamlarında gerçekleşen NO yanıtının değerlendirilmesinde, ortamda biriken nitritlerin düzeyi değerlendirildi. Oluşan nitritlerin değerlendirilmesinde ise, % 0.1naphylethylene diamine ve % 2.5' lik fosforik asitteki % 1 sulfanilamide karışımı olan ve "Griess Reagent" olarak bilinen karışımdan yararlanıldı. Yöntem olarak da Archer tarafından modifiye edilen yöntem uygulandı (50).

#### **Yöntem:**

Deneylerde makrofaj kültür ortamına biriken nitritler değerlendirildi. Her çukurdan 400 µl ortam değerlendirilmeye alındı. Her deney örneği, 96 çukurlu okuma plağında (Maxisorp) % 0.1naphylethylene diamine ve % 2.5' lik fosforik asitteki % 1 sulfanilamide ile eşit volümlerde karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyon sonunda 550 nm filtrede, 620 nm' lik filtre de referans alınarak, ölçümler yapıldı. Optik yoğunluk ölçümlerinden sonra nitritlerin yoğunluk değerlendirmeleri de, 0-100 mM arasında hazırlanan sodyum nitrit standard eğrisine göre yapıldı.

Her deney grubunun değerlendirilmesi 3 ayrı platede, 3 çukur sonucunun aritmetik ortalaması alınarak yapıldı.

#### 4.7 SP Göstergesi NBT Testinin Uygulanması

SP patlamasının varlığını kanıtlamak için, NBT testi kullanıldı. Testin uygulanmasında, Weir (51) ve Rose - Friedman - Fahey' in (52) yöntemleri modifiye edildi.

##### Yöntem:

10 ml steril PBS içinde çözdürülen 10 mg NBT, 0.22 µm filtreden süzöldükten sonra oda sıcaklığında kullanıldı. Nitrit ölçümü bittikten sonra çukurlardaki sıvılar tamamen alındı ve çukurlara 100 µl PBS-NBT karışımı eklendi, 30 dakika 37°C' da inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda karışım çukurların dışına alındı ve içinde mavi çökelek görünen hücrelerin sayımı yapıldı. Mavi çökelekli hücrelerin diğer hücrelere oranı ile reaksiyonun varlığına karar verildi. Spontan oluşum yüzdesi her zaman % 50 sınırında tutulmalıdır, yani bir çukurdaki hücrelerin ( + ) kabul edilebilmesi için % 50' nin üzerindeki hücrenin mavi çökelek vermesi gerekir. Sonuçlar ( + ) ya da ( - ) olarak değerlendirildi. İstenirse ek boyama May-Grünwald ve Giemsa yapılarak değerlendirmeler yapılabilir.

#### 4.8 L-NAME ve L-arjinin Uygulanması

Deneylerde elde edilen NO yanıtlarının, nitrojen metabolizması sonucunda oluştuğunun kanıtlanabilmesi için (12) hem NO yolunun özgün baskılayıcısı (specific inhibitor) L-NAME hem de metabolizmanın yardımcı faktörlerinden L-arjinin kullanılmıştır.

L-NAME, kontrol grupları ve *S. typhimurium* ("ölü" ya da "canlı") un tek uygulandığı gruplar dışında, 1 mM/ ml oranında (21), gerek tek olarak gerekse L-arjinin ile birlikte uygulanmıştır. Tek uygulanmasının nedeni L-NAME' in spontan NO yanıtı oluşturup oluşturmadığının anlaşılması içindir. L-arjinin ile birlikte uygulanmasının nedeni ise, NO yanıtının baskılanmasından sonra eklenen L-arjinin' in NO yanıtına katkıda bulunup bulunmadığının anlaşılmasıdır.

L-arjinin için ise uygulanan yöntem aynıdır, L-arjinin 0.4 mM/ml olarak uygulanmıştır (22).

Her iki uygulama biçiminde de kimyasal maddeler RPMI-1640 ile gerekli oranlarda dilue edilmiş ve uygulamadan önce 0.22 µm fitreden süzölmüş, süzöntü makrofaj költürü çukurlarına inkübasyonların başından itibaren eklenmiştir.

#### 4.9 Bulguların İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

"Canlı" *Salmonella typhimurium* grubunda elde edilen NO sonuçlarıyla, "Ölü" *Salmonella typhimurium* grubunda elde edilen NO sonuçları arasında anlamlı bir fark olup olmadığını anlamak için, "paired t-test" uygulanmıştır.

Bu testte, "Canlı" grupta elde edilen NO değerleri 3 kez yinelenen ideal deneylerin aritmetik ortalamaları değerlendirmeye alınmıştır, aynı işlem "Ölü" grup için de geçerlidir.

## 5. BULGULAR

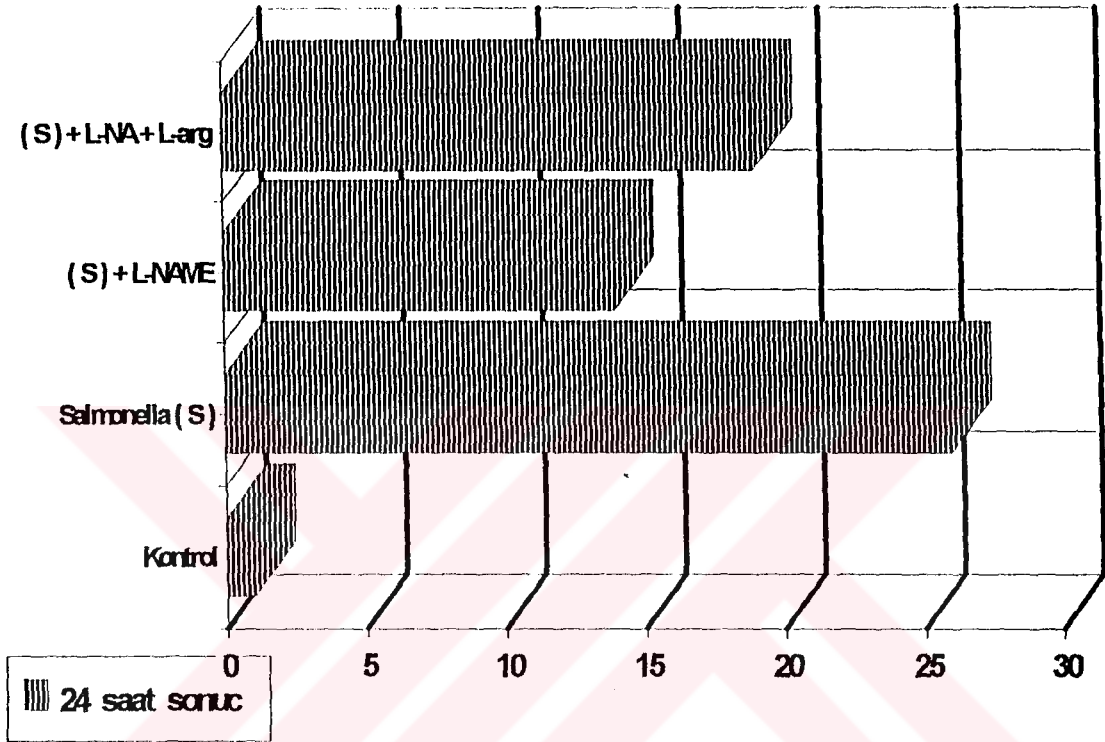
### 5.1 "CANLI" *S. typhimurium* İLE İNFEKTE EDİLEN MAKROFAJLARDA OLUŞAN NO YANITLARI

"Canlı" *S. typhimurium* grubunda elde edilen sonuçlar Tablo 1. ve Şekil 1' de sunulmuştur. Ekstrasellüler *S. typhimurium*' ların eliminasyonu sonrasında çukurlarda yalnızca intrasellüler bakteriler kalmış ve bu bakterilerin oluşturduğu NO yanıtları değerlendirmeye alınmıştır. Intrasellüler bakterilerin bulunduğu grupta ayrıca, NO baskılayıcısı L-NAME ve nitrojen yolunun yardımcı faktörü L-arjinin de kullanılmıştır. Burada amaç, oluşan NO yanıtının nitrojen metabolizmasının özgün ürünü olduğunu kanıtlamaktır.

**TABLO .1: "Canlı" bakterilerle elde edilen NO değerleri (mmol)**

	Kontrol	<i>Salmonella. typhimurim.</i>	S. + L-NAME	S + L-NAME + L-arjinin
1. Deney	1 ± 0.3	25 ± 1.4	13 ± 1.0	18 ± 0.6
2. Deney	1 ± 0.1	27 ± 1.0	13 ± 0.5	19 ± 0.2
3. Deney	1 ± 0.2	26 ± 1.2	16 ± 0.0	20 ± 0.4
Ortalama	1 ± 0.2	26 ± 1.2	14 ± 0.5	19 ± 0.4

"Canlı" bakterilerle oluşan NO yanıtı



**Şekil 1:** . "Canlı" *Salmonella typhimurium* ile makrofajların infekte edilmesinden 24 saat sonra elde edilen NO / mmol değerleri. 1 mM uygulanan L-NAME, *S. typhimurium'* un NO yanıtını baskılamış ve L- NAME ile birlikte 0.4 mM uygulanan L-arginine ise L-NAME' in baskılayıcı etkisini azaltmıştır. Elde edilen NO değerleri, 3 ayrı deneyin ortalamasından elde edilen değerlerdir. Her deneyde, her grup için 3 ayrı çukur kullanılmıştır.

## 5.2 "ÖLÜ" *S. typhimurium* İLE İNFEKTE EDİLEN MAKROFAJLARDA OLUŞAN NO YANITLARI

"Ölü" *S. typhimurium* grubunda ele edilen sonuçlar Tablo.2 ve Şekil 2' de sunulmuştur.

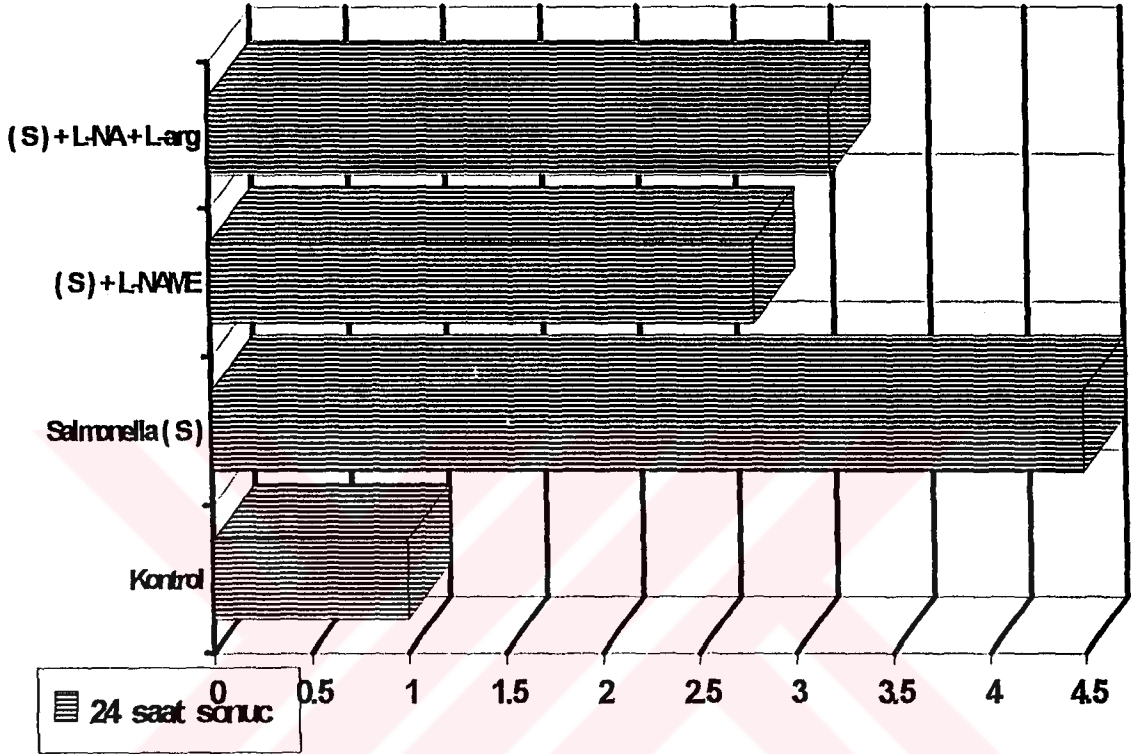
Ölü bakterilerle inkübe edilen makrofajların oluşturduğu NO yanıtları 24 saat sonra değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 3 ayrı deneyde kullanılan 3 ayrı çukurda oluşan NO yanıtlarının ortalamasıdır.

"Ölü" bakterilerin bulunduğu bu grupta ayrıca, NO baskılayıcısı L-NAME ve nitrojen yolunun yardımcı faktörü L-arjinin de kullanılmıştır. Burada amaç, oluşan NO yanıtının nitrojen metabolizmasının özgün ürünü olduğunu kanıtlamaktır.

**TABLO 2: "Ölü" bakterilerle elde edilen NO değerleri (mmol)**

	Kontrol	<i>Salmonella. typhimurim.</i>	S. + L-NAME	S + L-NAME + L-arjinin
1. Deney	1 ± 0.3	4.5 ± 0.2	2.8 ± 0.1	3.4 ± 0.1
2. Deney	1 ± 0.1	4.7 ± 0.2	2.7 ± 0.1	3.2 ± 0.1
3. Deney	1 ± 0.2	4.6 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1
Ortalama	1 ± 0.2	4.5 ± 0.2	2.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1

"Ölü" bakterilerle oluşan NO yanıtı



**Şekil 2:** "Ölü" *Salmonella typhimurium* ile makrofajların "infekte" edilmesinden 24 saat sonra elde edilen NO / mmoldeğerleri. 1 mM/ml uygulanan L-NAME, oluşan NO yanıtını baskılamış ve L-NAME ile birlikte 0.4 mM/ml uygulanan L-arjinin ise L-NAME' in baskılayıcı etkisini azaltmıştır. Elde edilen NO değerleri, 3 ayrı deneyin ortalamasından elde edilen değerlerdir. Her deneyde, her grup için 3 ayrı çukur kullanılmıştır.

### 5.3 "CANLI" *S. typhimurium* İLE İNFEKTE EDİLEN MAKROFAJLARDA OLUŞAN SP YANITLARI

Canlı *S. typhimurium* grubunda insandan izole, ısıya duyarlı olmayan 37°C' da canlı kalabilen, mutant olmayan, patojen *S. typhimurium* suşu ile McFarland skalasına göre 1 düzeyinde ( $3 \times 10^8/\text{ml}$ ) infekte edilen makrofajların oluşturduğu Solunum Patlaması yanıtları 24 saat sonra değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, 3 ayrı deneyde kullanılan 3 ayrı çukurda oluşan Solunum Patlaması yanıtlarının değerlendirilmesidir.

Elde edilen sonuçlar Tablo 3' de sunulmuştur.

**TABLO 3: "Canlı" bakterilerle oluşan SP' nin değerlendirilmesi**

	Kontrol	<i>S.typhimuri</i>	S + L-NAME	S+L-N+L-arji
1. Deney	-	+	+	+
2. Deney	-	+	+	+
3. Deney	-	+	+	+
Sonuç	-	+	+	+

#### 5.4 "ÖLÜ" *S. typhimurium* İLE İNFEKTE EDİLEN MAKROFAJLARDA OLUŞAN SP YANITLARI

"Ölü" *S. typhimurium* grubunda, patojen - insandan izole - ısıya duyarlı olmayan (37°C' da canlı kalabilen) - mutant olmayan *S. typhimurium* kökeni McFarland skalasına göre 1 düzeyinde ( $3 \times 10^8$ /ml) hazırlanmış, daha sonra bakteriler 56°C' da 30 dakika ısıtılarak öldürülmüş ve bu bakteriler ile makrofajlar "infekte" edilmiştir. İnfekte edilen makrofajların oluşturduğu Solunum Patlaması yanıtları 24 saat sonra değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, 3 ayrı deneyde kullanılan 3 ayrı çukürda oluşan Solunum Patlaması yanıtlarının değerlendirilmesidir.

Elde edilen sonuçlar Tablo 4' de sunulmuştur.

**TABLO 4: "Ölü" bakterilerle oluşan SP' nin değerlendirilmesi**

	Kontrol	<i>S.typhimuri</i>	S + L-NAME	S+L-N+L-arji
1. Deney	-	-	-	-
2. Deney	-	-	-	-
3. Deney	-	-	-	-
Sonuç	-	-	-	-

### 5.5 L-NAME ve / veya L-arjinin preparasyonlarının spontan NO ve / veya SP yanıtları

Hazırlanan preparasyonların yanıtların değerlendirilmesini etkileyip etkilemediğini görmek amacıyla, kültürler yalnızca L-NAME ve/veya L-arjinin preparasyonlarıyla inkübe edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. 24 saat sonunda anlamlı bir yanıt izlenmemiştir. Bu sonuç da, elde ettiğimiz sonuçların preparasyonların kendileriyle etkilenmediklerini göstermektedir.

Sonuçlar Tablo.5 ve 6 ile Şekil 3 ' de sunulmuştur.

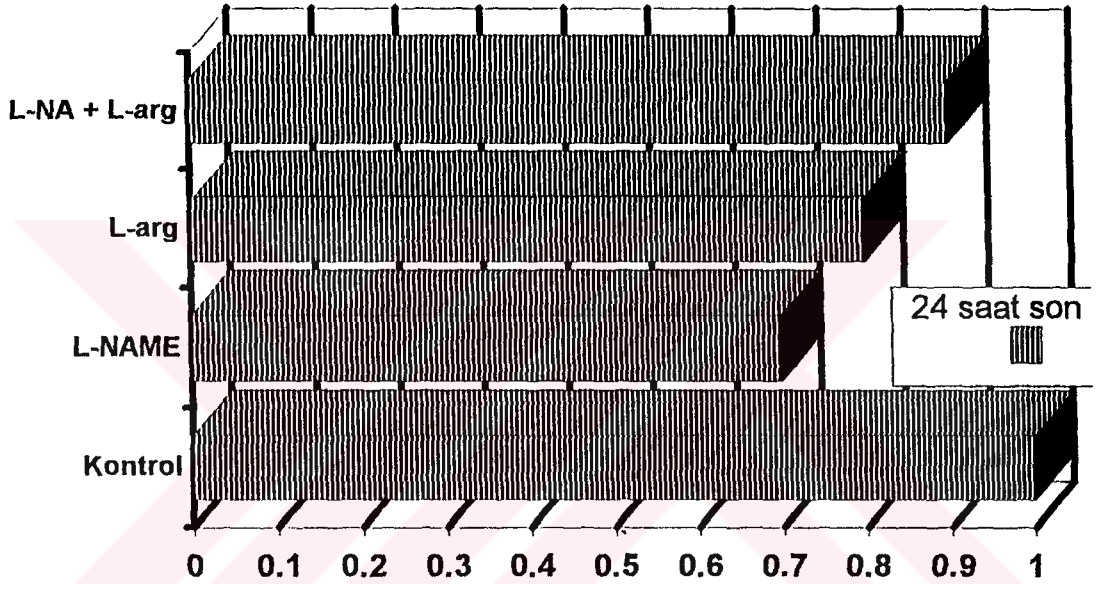
**TABLO 5: Makrofaj kültürlerinde L-NAME ve/veya L-arjinin' e karşı NO yanıtları (mmol)**

	Kontrol	L - NAME	L - arjinin	L-NAME + L-arjinin
1. Deney	1 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.1
2. Deney	1 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1
3. Deney	1 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Ortalama	1 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1

**TABLO 6: Makrofaj kültürlerinde L-NAME ve/veya L-arjinin' e karşı SP yanıtları**

	Kontrol	L - NAME	L - arjinin	L-N+L-arjini
1. Deney	-	-	-	-
2. Deney	-	-	-	-
3. Deney	-	-	-	-
Sonuç	-	-	-	-

### Kültürlerde L-NAME ve / veya L-arginine karşı NO yanıtı



**Şekil 3:** Makrofaj kültürlerinde L-NAME ve / veya L-arginin' in NO oluşturacak bir etki yaratıp yaratmadığının araştırılması. Kültürler yalnızca L-NAME ve / veya L-arginin karışımlarıyla inkübe edilmiş ve 24 saat sonunda oluşan NO yanıtı değerlendirilmiştir.

## 6. TARTIŞMA

Kan hücreleri kemik iliğinde üretilir ve granulositler, eritrositler, trombositler, lenfositler ve monositler olarak dolaşıma salınırlar. Bütün morfolojik hücre tipleri kemik iliğinde olmasına karşın, monositler kan dolaşımına salınırlar ve bu yolla bütün dokulara yayılırlar.

Dokulara girdikten sonra monositler makrofajlara değışirler. Makrofajlar ise doku sürekliliğini sağlamak ve fagositoz, mikrobisidal - tümörosidal etkinlik, antijen sunumu gibi düzenleyici işlevleri yerine getirmek ve enzimler, kompleman birimleri, doku pıhtılaşma faktörleri, büyüme faktör ve baskılayıcıları ile bağışıklığı düzenleyici maddeleri salgılamak gibi görevleri üstlenirler (53).

İnfeksiyona karşı konakçı direncinde makrofajların merkezi rolü konusunda Metchnikov' un (54) öncü çalışmalarından bu yana, diğer hücreler (T hücreleri ve alt grupları, B hücreleri, NK hücreleri) de bağışıklık sisteminin önemli elemanları olarak makrofajların yanında yer almaya başlamışlardır. Ancak makrofajlar bütün bağışıklık yanıtlarının gelişmesinde merkezi rolünü korumaktadır.

1960' lı yıllarda Mackaness (55), "Makrofaj Aktivasyonu" kavramını, hücresel temelini ve kazanılmış dirençle (acquired immunity) gecikmiş aşırı duyarlılık (delayed hypersensitivity) arasındaki ilişkiyi ortaya koyarak geliştirdi. Bu tür aktive makrofajlar, *Listeria monocytogenes* gibi intrasellüler bakterilerle oluşan infeksiyonlara karşı güçlenmiş ancak antijenik olarak özgün olmayan dirençte yer alırlar (56). İnfekte olmuş hayvandaki güçlenmiş, özgün olmayan direnç, kültürlerde infeksiyöz patojene karşı oluşan makrofajla-yönlendirilen öldürülmeyeyle direkt olarak bağıntılıdır. Bu tür antimikrobisidal, özgün olmayan sitotoksik aktivite de "Makrofaj Aktivasyonu" kavramını açıklamaktadır.

Fakültatif ve zorunlu hücre-içi parazitlere karşı kazanılmış direncin Mackaness tarafından analizi, değişik tipteki bağışıklık hücreleri arasındaki ilişkileri gündeme getirmiştir. Hücreler arası iletişim, hücreden-hücreye temasla mı olmaktadır? yoksa salgılanan maddeler yolu ile mi iletişim sağlanmaktadır? Bu kavramlar da günümüzde makrofajlarla ilgili çalışmaların bir yönünü oluşturur.

Aktive olmuş makrofajlarla ilgili çalışmaların-soru işaretlerinin bir yönünü de, LPS ile makrofajların ilişkisini sorgulayan "Septik Şok" konusu oluşturur. Ekzotoksin salgılayan organizmaların oluşturduğu patogenezin aksine, gram-negatif sepsislerde görülen fizyopatoloji, LPS ve bağıntılı proteinler adını alan endotoksinlerle sıkı sıkıya bağıntılıdır (57). Yapılan araştırmalarda, deneysel modellerde uygulanan LPS' in, gram-negatif sepsis sırasında ortaya çıkan ateş, kardiyovasküler şok, hasar verici inflamatuvar eksudanın akciğer - barsak ve diğer organların mikro damarlarında birikmesi, bir çok organın aynı anda çökmesi ve ölüm gibi semptomları ortaya çıkarabildiği gösterilmiştir (58,59,60). Aktive olmuş makrofajlarla ilgili çalışmaların bir yönünü de, intrasellüler bir patojen ile aktive olduktan sonra makrofajların devreye soktukları "Oksijene Bağımlı / Bağımsız Savunma Sistemleri", bu sistemlerin biribiri ile iletişimi, bu sistemlerin intrasellüller patojen infeksiyonlarının fizyopatolojisindeki rolleri ve patolojilerinin tedavisindeki yerleri oluşturur.

Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller,... gibi bazı lökosit tipleri fagositoz sırasında veya bir çok etken tarafından uyarıldıklarında, yoğun ve çok miktarda süperoksit ( $O_2^-$ ) ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) üretirler. Bu yanıt oksijen kullanımında büyük bir artışa neden olur ve bu yüzden de "Solunum Patlaması" adını alır (61). Bu fenomenen sorumlu enzim sistemi olan NADPH oksidazdır. Hidrojen peroksit,  $O_2^-$  nin dismutasyonu sonucunda üretilir. Gerek  $O_2^-$ , gerekse  $H_2O_2$ , u hücrelerin oksijene bağımlı antimikrobiyal ve sitosidal özelliklerinin önemli parçalarıdır (62,63). Bu bileşiklerin sitotoksik özellikleri çok daha reaktif hidroksil radikal ( $OH^{\cdot}$ ) ve singlet oksijen ( $^1O_2$ ) oluşturabilme yetenekleridir (64).

Hidroksil radikalleri ve  $^1O_2$ , metalle katalizlenen Haber-Weiss Reaksiyonu sonucunda *in vitro* olarak  $O_2^-$  ve  $H_2O_2$ ' den oluşur (65):

Fagositik lökositler, hipokloröz asit ya da nitrik oksidin  $O_2^-$  ile reaksiyonu sonucunda,  $OH^\cdot$  üretebilirler (66,67):

Makrofajların SP yanıtı üzerine yapılan çalışmalarda, NO üretiminde rol alan IL-1 (hücreyi hazırlayıcı interlökin) ve TNF' in, makrofajlar tarafından üretilen reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunda da yer aldığı (68), yine TNF' in, NO oluşumunda olduğu gibi, reaktif oksijen radikallerinin üretiminde de interferon-gamma ile sinerjistik etki oluşturduğu gösterildi (69,70)

1987 yılına dek, aktive olmuş makrofajların sitotoksitesini açıklayabilen tek indüklenebilen biyokimyasal mekanizma, reaktif oksijen ara maddelerinin NADPH oksidaz ile sentezi idi, ancak birçok deneysel sistemde antioksidan moleküllerin varlığı aktive olmuş makrofajların sitotoksitesini ortadan kaldıramıyordu, elde edilen bu sonuçlar da sitotoksitenin bir başka sistemle daha ilişkisi olduğunu gösteriyordu (71). Ayrıca insanlarda kronik granulomatöz hastalığın temelini de oluşturan, NADPH' a bağlı solunum patlamasının genetik bozukluğunda memeli makrofajlarının hala tümörlere ve *Leishmania* ile *Toxoplasma* gibi intrasellüler mikroorganizmalara karşı sitotoksik kalabildiği kanıtlandı (72,73). 1987' de aktive olmuş makrofajlardaki sitokinle indüklenebilen sitotoksitenin L-arjinin' e bağımlı olduğu açıklandı (59,74). L-arjinin, iNOS enziminin substratıdır ve iNOS inorganik nitrojen oksitleri ve L-sitrülin i sentezler. NO, kısa bir yarı-ömrü olan paramagnetik bir gazdır ve L-arjinin' e bağımlı sitotoksitenin inorganik nitrojen oksidi olduğu bulunmuştur (67,75,76). Bugün NO' in: *Mycobacterium tuberculosis* (77,78), *M. avium* (79), plasmodia (80,81), *Leishmania* (82-86), *Cryptococcus neoformans* (87), *Toxoplasma gondii* (88), *M. leprae* (89), *Schistosoma mansoni* (90), ve *Chlamydia trachomatis* (91) gibi bazı fakültatif ve zorunlu intrasellüler patojenlere belirgin sitotoksik etkiler gösterdiği bulunmuştur.

Intrasellüler bir patojen olan *Salmonella typhimurium* , fare tifoidinin temel etkenlerinden biridir, vücut direnci düşmemiş ise insanda invaziv hastalıklara neden olmaz. Salmonellalar vücuda girdikten sonra, kısa sürede lenf ve kan dolaşımına girer, kandan temizlenirlerken yalnızca karaciğer ve dalakta tutunabilenler canlı kalırlar. Karaciğer ve dalakta tutunabilenler de, makrofajların içinde yerleşmişlerdir (92,93). *S. typhimurium* ile yapılan deneysel çalışmalarda, intrasellüler ve ekstrasellüler bakterilerin ayırd edilebilmesi için gentamisin kullanılmıştır. Gentamisin, hücrelerin dışındaki salmonellaları hemen öldürürken, hücre içindekileri öldürmekte yetersiz kalmaktadır (94). Yaptığımız deneylerde de gentamisinin bu özelliği kullanılarak, intrasellüler salmonellalara karşı oluşan NO ve SP yanıtları araştırılmıştır.

Aktive makrofajların oluşturduğu NO ve SP yanıtlarının değerlendirilmesi çalışmalarında, uygulanan deney sisteminin, yani seçilen hücre tipinin - kültürlerde kullanılan hücre sayısının, sağlıklı seçimi gerekir. *In vitro* deneyler söz konusu olduğunda için, hem her deneyde aynı sonuçlar elde edilebilmeli (yinelenebilirlik) hem de elde edilecek sonuçların gerçek sonuçları yansıtabilecek güvenilirlikte (güvenebilirlik) olması gerekir. Bu amaçla, deneylerde hücre tipi olarak, doğal sonuçları daha yansıtacağı düşünülen "uyarılmamış, doğal makrofajlar" seçildi. Deney sistemi, farklı yoğunluklarda hazırlanan (1x10<sup>6</sup> - 2x10<sup>6</sup> - 3x10<sup>6</sup> - 4x10<sup>6</sup> - 5x10<sup>6</sup> / ml) makrofaj kültürlerinin sıranmasından sonra oluşturuldu. Bu yoğunluklar içinde en uygununu (en iyi yanıt - en düşük background) 2x10<sup>6</sup> / ml / makrofaj olarak saptadık.

Çalışmamızda canlı salmonella - ölü salmonella arasında anlamlı bir NO yanıt farkı olduğunu gördük. Bu farklılık salmonellaya karşı oluşan NO yanıtında, yanıtın yalnızca *S. typhimurium*' un LPS tabakasına karşı olmadığını düşündürdü. Çünkü eğer yanıtı yalnızca LPS' e karşı olsaydı, ölü bakterilerle yaptığımız deneyde de, makrofajlar yanıt oluşacak kadar yeterli sürede bakterilerle inkübe oldukları için ölü bakterilere karşı oluşan NO yanıtıyla, canlı bakterilere karşı oluşan NO yanıtı arasında anlamlı bir fark olmaması gerekirdi. Bu nedenle makrofajların NO yanıtının, öncelikle *S. typhimurium*' un intrasellüler yerleşimine karşı oluştuğunu düşünüyoruz. Ancak oluşan NO yanıtının salmonellaların yaşam koşullarını ne kadar etkilediğinin, yani bakteri

sayısında bir farklılığın olup olmadığının, araştırılması için farklı laboratuvar koşullarına gerek olduğunu düşünüyoruz. Çünkü intrasellüler bakterilerin, kimyasal olmayan bir yöntemle (sözgelimi sonikasyon yöntemi), hücreler parçalandıktan sonra, kültürlerinin yapılması gerekmektedir. Bu da, ileri çalışmalar için önerebileceğimiz bir araştırmadır.

Araştırmamızda, NBT ile yaptığımız SP değerlendirmelerinde canlı bakterilere karşı oluşan SP yanıtının, ölü bakterilere karşı oluşan SP yanıtına göre anlamlı şekilde farklı olduğunu gördük. Salmonellaların süperoksid dismutaz ve katalaz enzimleri salgılayarak kendilerini SP' den korudukları bilinen bir gerçektir (95). Salmonellalar bu enzim aktivitelerini, girdikleri hücre içinde canlı kalabilmek için gösterirler. Yarattıkları infeksiyonun ileri saatlerinde bu aktivite nedeniyle, SP yanıtında bir azalma beklenebilir. Bu hipotezin de bir başka araştırma konusu olabileceğini düşünüyoruz. Gerçekleştirdiğimiz araştırmada, oluşan SP yanıtının canlı bakterilere karşı oluştuğunu düşünmekteyiz. Oluşan SP yanıtı, tıpkı NO yanıtı gibi, temelde LPS' e karşı değil bakterilerin hücre içine girmeleri sonucunda büyük bir ivme kazanmaktadır.

Yaptığımız araştırmaların bir başka sonucu da, SP yanıtının NO yanıtından farklı bir mekanizmayla oluştuğunu düşündürmektedir, ya da bir başka deyişle iki sistem aynı nedenlerle harekete geçse de, ayrı ayrı yollarla oluşmaktadırlar. NO yanıtının baskılandığı koşullarda, SP yanıtı bundan etkilenmemektedir. Bu sonuç da daha önce yapılan bir çalışmayla uyumludur (44). Szatrowski ve Nathan' ın (44) bu çalışmasında dikkat çekici bir başka nokta da, katalaz enziminin eklenmesiyle NO yanıtının azalmasıdır. Kurulan hipotezde, SP ara maddelerinin NO yanıtı için gerekli maddeler olduğu ileri sürülmektedir ki, bizim yaptığımız araştırmalar sonucunda da bu ilişkinin, ileri araştırmalar için önemli bir veri olduğunu düşünüyoruz.

İnsan savunma sistemlerinde köprü rolü oynayan makrofajların, intrasellüler patojenlere karşı oluşturdukları yanıtlar, hem insan sistemlerine yakın olduğu bilinen farelerin hem de insan hücrelerinin *in vitro* laboratuvar ortamlarında araştırılmaktadır. Oksijene bağımlı sistemlerde yer alan NO

yanıtına temel oluşturan NO gazının, sağaltım amacıyla kullanılmasına başlanmıştır.

Henüz direkt olarak infeksiyon hastalıklarında kullanıma girmese de, NO gazı veya infüzyon şeklinde uygulanması, penil erektil disfonksiyon (96), miyokardiyal iskemi reperfüzyon hasarı (97), erişkin solunum distressi sendromu (98) gibi olgularda kullanıma girmişken, genetik olarak anormal (99), veya aktive olamayan makrofajlar (100,101) gibi hasarlı ya da baskılanmış hücrelerde NOS aktivitesinin yeniden oluşturulması çalışmaları sürmektedir. Bu alışmalar da, hipertansiyon, damar daralmasına bağlı hastalıklar veya intrasellüler paraziterlik olgularının sağaltımında şüphesiz yeni ufuklar açacaktır.

Temel olarak hastalıkların sağaltımına yönelik bütün bu araştırmalar, öncelikle hastalıkların fizyopatolojisinin anlaşılması kadar, vücudun savunma sistemlerinin hangi patojene, nerede, ne zaman ve nasıl yanıt verdiğinin anlaşılmasını gerektirmektedir. Bu nedenle yaptığımız araştırmaların, gelecekle ilgili umut verici sonuçlar taşıdığını ve yeni soru işaretleri yaratabildiğini düşünmekteyiz.

## 7. SONUÇ ve ÖNERİLER

"Canlı" *Salmonella typhimurium* ' ların NO ve SP yanıtlarının bulunması, buna karşılık aynı yanıtların "Ölü" *Salmonella typhimurium* ' larda bulunmaması bu bakterinin patogenezi açıklayabilecek niteliktedir.

Organizma, fırsatçı patojen olarak değerlendirilebilecek bu mikroorganizmayı fagosite ettiği zaman, NO ve SP yanıtlarıyla mikroorganizmaya karşı mücadele vermekte, ancak ölü olması durumunda bu mikroorganizmaya aynı güçte saldırmayı düşünmemektedir.

Makrofajların aktivasyonunun bağışık sistemin doğrudan kontrolü altında olduğu düşünülürse, yitirilmiş makrofaj aktivasyonunun, *S. typhimurium* infeksiyonlarını engelleyemeyeceği ve infeksiyonu başlatacağı deney sonuçlarımıza göre iddia edilebilir.

Deney gruplarımız, fırsatçı patojen ve intrasellüler karakterdeki patojenlerin, infeksiyon mekanizmasını ortaya koymuştur. Bu mekanizma, üzerinde yapılan her deneyin yeni bir soru işareti ürettiği, ileri çalışmalara zemin hazırlayan bir yapıdadır.

**8 KAYNAKÇA**

- 1 Mogensen.,S.C: Role of macrophages in natural resistance to virus infections. *Microbiol Review* **43, No.1**: 1-26, March 1979
- 2 Mogensen.,S.C: Macrophages and natural resistance to virus Infections. *The Reticuloendothelial System: a comprehensive treatise* **10**: 207-223, 1980
- 3 Roitt.,M.I. Ed. Innate Immunity, **Chap.1**: The Basis of Immunology, *Essential Immunology* , 6. Edition Blackwell Scientific Publications : 4-7,1988
- 4 Hibbs, J. B. Jr., Read, R.,Taintor Zdenek-Vavrin. Macrophage cytotoxicity: Role for L-Arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**: 473-476, 1987
- 5 Bredt, D. S., and Snyder, S. H. Nitric Oxide: A Physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* **63**: 175-195, 1994
- 6 Drapier, J-C., and Hibbs, J. B. Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-Arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* **140**: 2829-2838, 1988
- 7 Hibbs, J. B. Jr., Vavrin, Z. and Taintor, R. R. L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* **138**: 550-565, 1987

- 8 Hibbs, B. J. Jr., Taintor, R. R., Vavrin, Zdenek., Granger, L. D., Drapier, J-C., Amber, J. I., and Lancaster, R. J. Jr. Synthesis of NO from a terminal guanidino nitrogen atom of L-Arginine: A molecular mechanism regulating cellular proliferation that targets intracellular iron. *NO from L-Arginine: a bioregulatory system* Ed. S. Moncada and E.A. Higgs, **Chap.22**: 189-224, 1990
- 9 Viereck, R. A., Murad, E., Green, B. D., Joshi, P., Pike, C. P., Hieb, R., and Harbaugh, G. Origin of the shuttle glow. *Nature* **354**: 48-50, 1990
- 10 Johnson, C., Henshaw, J., and McInnes, G. Ompact of aircraft and surface emissions of nitrogen oxides on tropospheric ozone and global warming. *Nature* **355**: 69-72, 1992
- 11 Goden, J. W., Turley, S., Teller, D. C., Adman, E. T., Liu, M. Y., Payne, W. J., and LeGall, J. The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclases*. *Science* **253**: 438-442, 1991
- 12 Nathan, C. NO as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* **6**: 3051-3064, 1992
- 13 Ignarro, J. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived NO. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**: 535-560, 1990
- 14 Miwa, M., Stuehr, D. D., Marlette, M. A., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. Nitrosation of amines by stimulated macrophages. *Carcinogenesis* **8**: 955-958, 1987
- 15 Stuehr, D. J., and Nathan, C. F. NO: A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* **169**: 1543-1545, 1989

- 16 Green, L. C., Wagner, D. A., Ruiz de Luzuriaga, K., Istfan, N., Young, V. R., Tannenbaum, S. R. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 7764-7768, 1981
- 17 Wagner, D. A., Schultz, D. S., Deen, W. M., Young, V. R., and Tannenbaum, S. R.: Metabolic fate of an oral dose of <sup>15</sup>N-labelled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res* **43**: 1921-1925, 1983
- 18 Green, L. C., Tannenbaum, S. R., and Goldman, R.: Nitrate synthesis in the germ-free and conventional rat. *Science* **212**: 56-58, 1981
- 19 Nathan, C., and Hibbs, J. B. Jr. Role of NO synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* **3**: 65-70, 1991
- 20 Tayeh, M. A., and Marletta, M. A. Macrophage oxidation to NO, nitrite, and nitrate. *J Biol Chem* **264**: 19654-19658, 1989
- 21 Kwo, N. S., Nathan, C. F., Gilker, C., Griffith, O., Feldman, P., and Wiseman, J. L-citrulline production from L-arginine by macrophage NOS: The ureido oxygen derives from dioxygen. *J Biol Chem* **265**: 13442-13445, 1990
- 22 Stuehr, D., Kwon, N. S., Nathan, C., Griffith, O., Feldman, P., and Wiseman, J. N-hydroxyl-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of NO from L-arginine. *J Biol Chem* **266**: 6259-6263, 1991
- 23 Gross, S. S., Stuehr, D. J., Aisaka, K., Jaffe, E. A., Levi, R., and Griffith, O. W. Macrophage and endothelial cell NOS: cell type selective inhibition by N-aminoarginine, N-nitroarginine, and N-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 96-103, 1990

- 24 Aisaka, K., Gross, S. S., Griffith, O. W., and Levi, R. N. N-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived NOS; is a potent pressor agent in the guinea pig: Does NO regulate blood pressure in vivo?. *Biochem Biophys Res Commun* **160**: 881-886, 1989
- 25 Kilbourn, R. G., Gross, S. S., Jubran, A., Adams, J., Griffith, O. W., Levi, R., and Lodato, R. N-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of NO. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3629-3632, 1990
- 26 Kilbourn, R. G., Jubran, A., Gross, S. S., Griffith, O. W., Levi, R., Adams, J., and Lodato, R. Reversal of endotoxin-mediated shock by N-methyl-L-arginine, and inhibitor of NOS. *Biochem Biophys Res Commun* **172**: 1132-1138, 1991
- 27 Mellion, B. T., Ignarro, L. J., Ohlstein, E. H., Pontecorvo, E. G., Hyman, A. L., and Kadowitz, P. J. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3',5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of NO and related vasodilators. *Blood* **57**: 946-955, 1981
- 28 Gruetter, C. A., Barry, B. K., McNamara, D. B., Gruetter, D. Y., Kadowitz, P.-J., and Ignarro, L. J. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by NO, nitroprusside and a carcinogenic nitrosamine. *J Cyclic Nucleotide Res* **5**: 211-224, 1979
- 29 Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., and Moncada, S. NO release accounts for the biological activity of EDRF. *Nature* **327**: 524-526, 1987
- 30 Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. and Chaudhuri, G. EDRF produced and released from artery and vein is NO. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 9265-9269, 1987

- 31 Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, D. J. NO gas signals by binding directly to an enzyme inside the target cell. *The Cell* Garland Publishing, New York, **Chap. 15**: 728-729, 1994
- 32 Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Higgs, E. A. NO: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Reviews* **43 No. 2**: 109-134, 1991
- 33 Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**: 131-138, 1982
- 34 Remington, J. S., and Merigan, T. C. Resistance to virus challenge in mice infected with protozoa or bacteria. *Proc SocExp Biol Med* **131**: 1184-1188, 1969
- 35 Old, L. J., Clarke, D. A., and Benaceraff, B. Effect of BCG infection on transplanted tumors in the mouse. *Nature* **184**: 291-293, 1959
- 36 Abbas, K. A., Lichtman, H. A., Pober, S. J. Eds. In Cellular and Molecular Immunology. **Chap. 13**. p. 270, 1994
- 37 Minty, A. et al. Stimulator cytokines for NO. *Nature* **362**: 248-250, 1993
- 38 Colotta, F. et al. Inhibition of IL-1 by IL-13. *Science* **261**: 472-480, 1993
- 39 Kubes, P., Suzuki, M., and Granger, D. N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4651-4655, 1991

- 40 Billiar, T. R., Curran, R. D., Harbrecht, B. G., Stuehr, D. J., Dmetris, A. J., and Simmons, R. L. Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: N-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukocyte Biol* **48**: 565-569, 1990
- 41 Sadick, M. D. Nitric oxide. *The Macrophage* **3**: 265-284, 1992
- 42 Winyard, G. P., Morris, J. C., Winrow, R. V., Zaidi, M., and Blake, R. D. Free radicals in the inflammatory response. *Free radical damage and its control*. **15**: 361-383, 1994
- 43 Forman, H. J., and Thomas, M. J. Respiratory burst response in macrophages. *Annu Rev Physiol* **48**: 668-690, 1986
- 44 Szatrowski, T. P., and Nathan, C. T. Free oxygen radicals in tumour cells. *Cancer Res* **51**: 794-798, 1991
- 45 Burdon, H. R. Free radicals and cell proliferation. *Free radical damage and its control* **6**: 155-185, 1994
- 46 Dunlap, N. E., Benjamin, H. W. Jr., and Briles E. D. The intracellular nature of salmonella infection during the early stages of mouse typhoid. *Macrophage* **18**: 303-312, 1994
- 47 Mathews, K. c., van Holde, E. K. (Eds.) Microbial cell wall polysaccharides: O-antigens. *Biochemistry* **16**: 568-569, 1990
- 48 Fields, I. P., Swanson, V. R., Haidaris, G. C., and Heffron, F. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 5189-5193, 1986

- 49 Ellerman-Eriksen, S., Liberto, C. M., Ianello, D., Mogensen, S. C. X-linkage of the early in vitro gamma/beta interferon response of mouse peritoneal macrophages to HSV type 2. *J gen Virol* **67**: 1025-1033, 1986
- 50 Archer, S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB* **7**: 349-360, 1993
- 51 Weir, M. D. (Ed.) Tests of immune function. In *Handbook of experimental immunology* 6. Edition, Blackwell Scientific Publications **Vol.4 126**: 126.21, 1986
- 52 Rose, R. N., Friedman, H., Fahey, L. J. (Eds.) Phagocytosis. In *Manual of clinical laboratory immunology* **47**: 326-331, 1986
- 53 Stewart, C. C., Riedy, C. M., and Stewart, J. S. Introduction: The proliferation and differentiation of macrophages. *Macrophage Chap. 1*: 3-27, 1994
- 54 Metchnikoff, E. Immunity in the infectious diseases. New York: Macmillan, 1905. In Stewart, C. C., Riedy, C. M., and Stewart, J. S. Introduction: The proliferation and differentiation of macrophages. *Macrophage Chap. 1*: 3-27, 1994
- 55 Mackaness, G. B. Cellular resistance to infection. *J Exp Med* **116**: 381-406, 1962. In Stewart, C. C., Riedy, C. M., and Stewart, J. S. Introduction: The proliferation and differentiation of macrophages. *Macrophage Chap. 1*: 3-27, 1994
- 56 Mackaness, G. B. The immunological basis of acquired cellular resistance. *J Exp Med* **120**: 105-120, 1964

- 57 Rokke, O., Revhaug, A., Osterud, B., Giercksky, K. E. Increased plasma levels of endotoxin and corresponding changes in circulatory performance in a porcine sepsis model: the effect of antibiotic administration. In: Lein J, Büller HR, ten Cate JW, van Deventer SJH, Sturk A, eds. *Bacterial endotoxins: pathophysiological effects, clinical significance, and pharmacological control*. New York: Alan R. Liss: 247-262, 1988
- 58 Vogel, S. N. The *Lps* gene: insights into the genetic and molecular basis of LPS responsiveness and macrophage differentiation. In: Beutler B, ed. *Tumor necrosis factors: the molecules and their emerging role in medicine* : 485-523, 1992
- 59 Manthey, C. L., Vogel, S. N. The role of cytokines in host responses to endotoxin. *Revs Med Microbiol* 3: 72-79, 1992
- 60 Vogel, S. N., Hogan, M. M. Role of cytokines in endotoxin-mediated host responses. In: Oppenheim JJ, Shevach ER, eds. *Immunophysiology* New York: Oxford University Press: 238-258, 1990
- 61 Bradwey, J. A., Karnovsky, M. L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu Rev Biochem* 49: 695-726, 1980
- 62 Badwey, J. A., Karnovsky, M. L. Active oxygen species and the functions of phagocytic leucocytes. *Annu Rev Biòchem* 49: 695-726, 1980
- 63 Smith, R. M., Curnutte, J. T. Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* 77: 673-686, 1991

- 64 Badwey, J. A., Robinson, J. M., Karnovsky, M. J., Karnovsky M. L. Reduction and excitation of oxygen by phagocytic leukocytes: biochemical and cytochemical techniques. In: Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C, Herzenberg LA, eds. *Handbook of experimental immunology* : 50.1-50.16, 1986
- 65 Beauchamp, C., Fridovich, I. A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J Biol Chem* **245**: 4641-6, 1970
- 66 Ramos, C. L., Pou, S., Britigan, B. E., Cohen, M. S., Rosen, G. M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. *J Biol Chem* **267**: 8307-12, 1992
- 67 Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. S. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 1620-4, 1990
- 68 Hoffman, M., Weinberg, J. B. Tumor necrosis factor induces increased hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not increased Ia antigen expression by peritoneal macrophages. *J Leucocyte Biol* **42**: 704-7, 1987
- 69 Ding, A. H., Nathan, C. F., Stuehr, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* **141**: 2407-12, 1988

- 70 Bogdan, C., Moll, H., Solbach, W., Rölinghoff, M. Tumor necrosis factor in combination with interferon-gamma, but not with interleukin-4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur J Immunol* **20**: 1131-5, 1990
- 71 Weinberg, J. B., Chapman, H. A. Jr., Hibbs, J. B. Jr. Characterization of the effects of endotoxin on macrophage tumor cell killing. *J Immunol* **121**: 72-80, 1978
- 72 Pearson, R. D., Wheeler, D. A., Harrison, L. H., Kay, H. D. The immunobiology of leishmaniasis. *Rev Infect Dis* **5**: 907-27, 1983
- 73 Sibley, L. D., Krahenbuhl, J. L., Weidner, E. Lymphokine activation of J774.G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* **49**: 760-4, 1985
- 74 Hibbs, J. B. Jr., Taintor, R. R., Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**: 473-6, 1987
- 75 Hibbs, J. B. Jr., Taintor, R. R., Vavrin, Z., Rachlin, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* **157**: 87-94, 1988
- 76 Marletta, M. A., Yoon, P. S., Iyengar, R., Leaf, C. D., Wishnock J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* **27**: 8706-11, 1988
- 77 Denis, M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell Immunol* **132**: 150-7, 1977

- 78 Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. S., Bloom, B. R. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* **175**: 1111-22, 1992
- 79 Denis, M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and kill virulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *Leukocyte Biol* **49**: 380-7, 1991
- 80 Nussler, A., Drapier, J-C., Renia, L., Pied, S., Miltgen, F., Gentilini, M., Maxier, D. L-arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *Eur J Immunol* **21**: 227-30, 1991
- 81 Mellouk, S., Green, S. J., Nacy, C. A., Hoffman, S. L. IFN-gamma inhibits development of *Plasmodium berghei* exoerythrocytic stages in hepatocytes by an L-arginine-dependent effector mechanism. *J Immunol* **146**: 3971-6, 1991
- 82 Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M. J., Moncada, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* **144**: 4794-7, 1990
- 83 Mael, J., Ransijn, A., Buchmuller-Rouiller, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Leukocyte Biol* **49**: 73-82, 1991
- 84 Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs, J. B. Jr., Nacy, C. A. Activated macrophage destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J Immunol* **144**: 278-83, 1990

- 85 Green, S. J., Crawford, R. M., Hockmeyer, J. T., Meltzer, M. S., Nacy, C. A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor. *J Immunol* **145**: 4290-7, 1990
- 86 Liew, F. Y., Li, Y., Severn, A., Millott, S., Schmidt, J., Salter, M., Moncada, S. A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 cells of Th1 cell activity via modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol* **21**: 2489-94, 1991
- 87 Granger, D., Hibbs, J. B. Jr., Perfect, J. R., Durack, D. T. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest* **85**: 264-73, 1990
- 88 Adams, L. B., Hibbs, J. B. Jr., Taintor, R. R., Krahenbuhl, J. L. Microbistatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **144**: 2725-9, 1990
- 89 Adams, L. A., Franzblau, A. G., Vavrin, Z., Hibbs, J. B. Jr., Krahenbuhl, J. L. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol* **147**: 1642-6, 1991
- 90 James, S. L., Glaven, J. Macrophage cytotoxicity against shistosomula of *Schistosoma mansoni* involved arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol* **143**: 4208-12, 1989
- 91 Mayer, J., Woods, M. L., Vavrin, Z., Hibbs, J. B. Jr. Gamma interferon-induced nitric oxide production reduces *Chlamydia trachomatis* infectivity in McCoy cells. *Infect Immun* **61**: 491-7, 1993

- 92 Carter, P. B., Collins, F. M. The route of enteric infection in mice. *J Exp Med* **139**: 1189-1203, 1974
- 93 Fallon, M. T., Benjamin, W. H., Schoeb, T. R., Briles, D. E. Mouse hepatitis virus strain UAB infection enhances resistance to *Salmonella typhimurium* by inducing suppression of bacterial growth. *Infect Immun* **59**: 852-6, 1991
- 94 Friovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* **201**: 875-880, 1975
- 95 Lin, Y. J., and Chadee, K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* **148**: 3999-4005, 1992
- 96 Rajfer, J., Aronson, W. J., Buh, P. A., Dorey, F. J., and Ignarro, L. J. Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med* **326**: 90-94, 1992
- 97 Matheis, G., Sherman, M. P., Buckberg, G. D., Haybron, D. M., Young, H., H., and Ignarro, L. J. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am J Physiol* **262**: H616-H620, 1992
- 98 Roussaint, R., Falke, K. J., Lopez, F., Slama, K., Pison, U., and Zapol, W. M. Inhaled nitric oxide in adult respiratory distress syndrome. *N Eng J Med* In press, 1992
- 99 Chen, P. Y., and Sanders, P. W. L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J Clin Invest* **88**: 1559-1567, 1992,

- 100 Ding, A., Nathan, C. F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D. J., and Srima, S. Macrophage deactivation factor and transforming factors-beta-1, -2, -3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by interferon-gamma. *J Immunol* **145**: 940-944, 1990
- 101 Silva, J. S., Twardzik, D. R., and Reed, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta. *J Exp Med* **174**: 539-545, 1991

