

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) İLE
PLAZMA KSANTİN OKSİDAZ AKTİVİTESİ ÖLÇÜMÜ VE
HİPOGONADİZMLİ HASTALARDA KSANTİN OKSİDAZ
DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BOKÜMANTASYON MERKEZİ

137970

UZMANLIK TEZİ

137970

Gürkan METİNYURT
Tbp.Kd.Ütğm.

ANKARA-2003

ÖNSÖZ

Bu tez konusu, Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 08 EYLÜL 2003 gün ve 0530-58-03/551 sayılı yazısı ile verilmiştir.

Bu çalışmada, kliniğimiz HPLC laboratuvarlarında rutin olarak çalışılabilecek bir plazma ksantin oksidaz ölçüm metodu kurularak yaşa ve cinsiyete göre ksantin oksidaz aktivitesindeki değişimler ve normal değerler belirlendi; hipogonadotropik hipogonadizimli erkek hastalarla sağlıklı erkekler karşılaştırılarak testosteron hormonunun plazma ksantin oksidaz aktivitesi üzerine etkisi değerlendirildi ve elde edilen tüm veriler doğrultusunda cinsiyet farklılıkları irdelendi.

Tez danışmanım olan ve yardımını hiç eksik etmeyerek beni yönlendiren ve destek olan Doç. Ecz. Kd. Alb. Şerif AKMAN'a, uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük katkıları bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Dz. Ecz. Kd. Alb. Türker KUTLUAY'a, Prof. Dr. Ecz. Kd. Alb. M. Kemal ERBİL'e, Prof. Ecz. Kd. Alb. İsmail KURT'a, Prof. Dr. Ecz. Kd. Alb. Turan KARAYILANOĞLU'na, Prof. Dr. Ecz. Kd. Alb. Cumhur BİLGİ'ye, Doç. Ecz. Kd. Alb. Namık Kemal BİNGÖL'e, Doç. Dz. Tbp. Kd. Bnb. Muhittin A. SERDAR'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Tbp. Yb. Adnan HAŞİMİ'ye, Yrd. Doç. Tbp. Yb. Serhat TOKGÖZ'e, Yrd. Doç. Tbp. Kd. Bnb. Taner ÖZGÜRTAŞ'a , Yrd. Doç. Dr. Tbp. Bnb. Levent KENAR'a, Yrd. Doç. Tbp. Bnb. Abdullah OLGUN'a, Uzm. J. Tbp. Yzb. Serkan TAPAN'a, çalışma arkadaşlarım Uzm. Tbp. Yzb. Nurbahar YILMAZ'a, Tbp. Yzb. Şuayp TEZCAN'a, Tbp. Kd. Ütğm. Atakan YUMBUL'a, Dz. Tbp. Kd. Ütğm. E. Özgür AKGÜL'e, Tbp. Kd. Ütğm. E. Banu AKAY'a, Hv. Tbp. Kd. Ütğm. Ömer KAYA'ya, Tbp. Kd. Ütğm. Tuncer ÇAYCI'ya, Tbp Bnb. Muhammed YUSİFOV'a, Dr. Bio. Bilge ÖZÇELİK'e, Uzm. Ecz. Filiz OZAN'a, Bio. Benen GENİŞ'e, uzmanlık eğitimim boyunca göstermiş olduğu sabır, anlayış ve desteklerinden dolayı sevgili eşim Hatice Aydan IŞIK METİNYURT'a, Biyokimya ve Klinik Biyokimya A.D. Başkanlığında birlikte görev yaptığım tüm bölüm personeline desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Dr. Gürkan METİNYURT
ANKARA-2003

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
I- GİRİŞ	1
II- GENEL BİLGİLER	2
A. KSANTİN OKSİDOREDÜKTAZ (XOR) ENZİMİNİN YAPISI	2
B. XOR ENZİMİNİN BİYOLOJİK ÖNEMİ, ORGANİZMADAKİ İŞLEVLERİ	6
C. XOR ENZİMİNİN İNDİRGEYİCİ SUBSTRATLARI	9
D. XOR ENZİMİNİN YÜKSELTGEYİCİ SUBSTRATLARI	10
E. XOR ENZİMİNİN DOKU DAĞILIMI	11
F. XOR ENZİM AKTİVİTESİ AÇISINDAN CİNSİYET FARKLILIKLARI	11
G. XOR ENZİMİNİN GEN YAPISI VE REGÜLASYONU	12
H. XOR İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR VE DOLAŞIMDAKİ XOR ENZİMİNİN ÖNEMİ	17
I. XOR ÖLÇÜM METOTLARI	24
J. ERKEK HİPOGONADİZMİ	26
K. ÇALIŞMANIN AMACI	30
III- GEREÇ VE YÖNTEM	32
IV- BULGULAR	38
V- TARTIŞMA VE SONUÇ	43
VI- ÖZET	48
VII- SUMMARY	49
VIII- KAYNAKLAR	50

I. GİRİŞ

Ksantin oksidoredüktaz (XOR) bir asırdan beri bilinen ve 1939'dan sonra pür olarak elde edilip üzerinde çalışılan bir enzimdir (58). Molibden hidroksilaz flavoprotein ailesinin üyesi olan XOR enziminin aynı gen tarafından kodlanan ksantin oksidaz (XO, EC 1.2.3.2) ve ksantin dehidrojenaz (XDH, EC 1.1.1.204) şeklinde iki farklı formu mevcuttur. Bu enzim pürin katabolizmasının son iki basamağını katalizlerken serbest radikallerin oluşumuna da aracılık eder. XOR'ın diğer birçok farklı fizyolojik bileşiği de metabolize ettiği bilinmektedir (121).

XOR enzimi başta karaciğer ve ince bağırsak olmak üzere birçok dokuda hücre sitoplazmasında ve daha düşük konsantrasyonlarda plazmada saptanabilir. Plazmada bulunan XOR enzimi XO formundadır (79,104).

XOR enzimi birçok hastalık ile ilişkilidir. Son 20 yıl içinde enzimin iskemi-reperfüzyon (IR) injürisindeki rolü oldukça dikkat çekmiştir (47,92). Ayrıca, karaciğer hastalıkları (12,44,123), inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar (96,131), ateroskleroz (100), hipertansiyon (109), alkolizm (160), adult respiratuvar distress sendromu (ARDS) (51), akciğer kanseri (3), tip II diyabetik hastalarda (30) plazma XOR aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir.

Plazmada bulunan ksantin oksidaz enzimini ölçebilmek için oluşturulan duyarlı metodların başlıcaları radyoizotopik yöntemler (5), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (89,110,139,158), kemilüminesans yöntemler (9,96), ELISA (11)'dir.

Bu çalışmada; kliniğimiz HPLC laboratuvarında rutin olarak çalışılabilecek bir plazma ksantin oksidaz ölçüm metodu kurulması, normal değerlerin belirlenmesi, cinsiyet farklılıklarının ortaya konulması ve yaşa göre aktivitelerin ne şekilde değiştiğinin belirlenmesi, hipogonadotropik hipogonadizmlili erkek hastalarda testosteronun plazma ksantin oksidaz aktivitesi üzerine etkilerinin saptanması ve elde edilen verilerin cinsiyet farklılıklarının açıklanmasına katkısının irdelenmesi amaçlanmıştır.

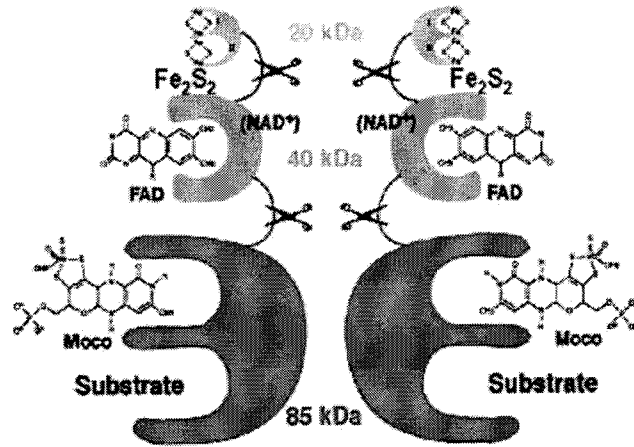
II. GENEL BİLGİLER

II.A. KSANTİN OKSİDOREDÜKTAZ (XOR) ENZİMİNİN YAPISI:

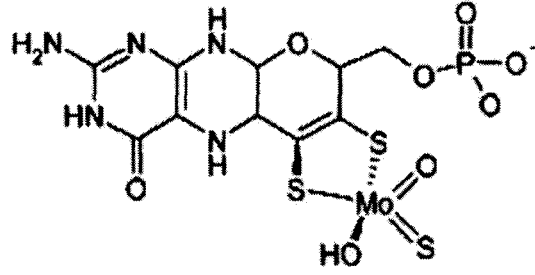
Ksantin oksidaz (XO, EC 1.2.3.2) ve ksantin dehidrojenaz (XDH, EC 1.1.1.204) aynı gen tarafından kodlanan bir enzimin farklı formları olup molibden hidroksilaz flavoprotein ailesinin üyeleridir. Bu iki enzim formu ve bunların katalizlediği reaksiyonlar ksantin oksidoredüktaz (XOR) aktivitesi olarak tanımlanır (121). XOR, fizyolojik olarak, pürin katabolizmasının hız sınırlayıcı enzimidir. Bu sitoplazmik enzim endojen pürinlerin, tiopürinlerin ve metilksantinlerin oksidasyonunu katalizler.

20. yüzyılın başından beri varlığı bilinen enzim 1939 yılında pürifiye edilen ilk flavoproteinlerden birisidir. Aynı zamanda, molibden içerdiği bulunan ilk memeli enzimidir.

XOR 300 kDa ağırlığında homodimer olarak sentezlenir. Birbiri ile idantik olan ve aralarında etkileşim bulunmayan 150 kDa'luk her bir subünit 1333-1358 amino asitten oluşur ve dört redoks aktif bölge içerir; bir molibden kofaktör (Mo-co), bir flavin adenin dinükleotid (FAD), iki Fe_2S_2 bölgesi (63) (Şekil 1). Mo-co, halkalı bir dithiolene yan zincir içeren bir pterin türevi ile buna bağlı molibden atomundan oluşur. Molibden, ikisi pterinin dithiolene halkasına ait olmak üzere üç kükürt atomu ve iki oksijen atomu ile bağ yaparak beşli bir yapı meydana getirir. Bu yapı enzimin aktif veya inaktif formlarının ortaya çıkışında önem arz etmektedir (Şekil 2).



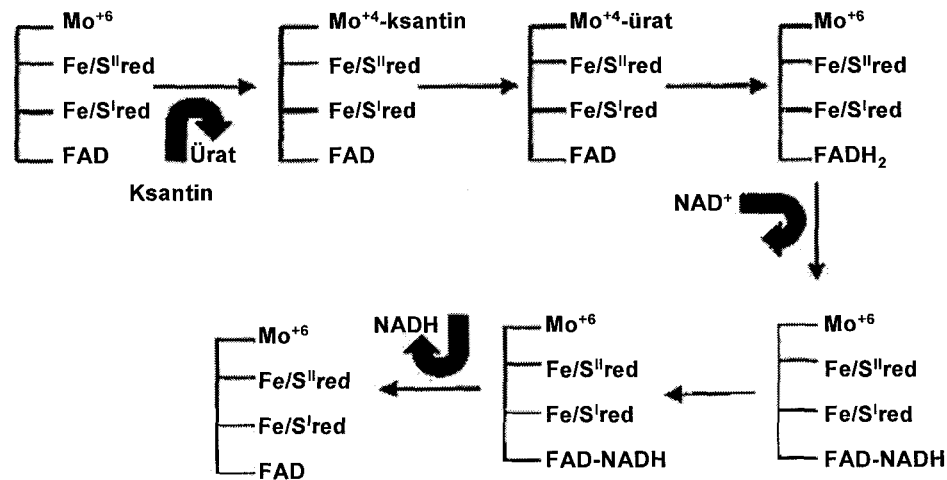
Şekil 1 XOR enziminin yapısı



Şekil 2 Molibden-kofaktörün yapısı

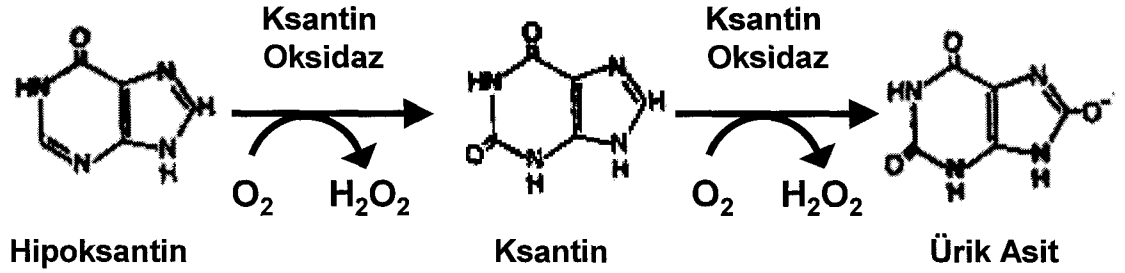
Yukarıda da ifade edildiği gibi, XOR'ın birbirine dönüşebilen iki formu bulunmaktadır:

(1) Ksantin dehidrojenaz : Memeli dokularında baskın olan formdur (95,134). Enzimin fizyolojik rolü pürin metabolizması ile ilişkilidir. Ksantinin ürik asite oksidasyonunu katalizlerken nikotinamid adenin dinükleotidin (NAD^+) eş zamanlı redüksiyonuna da neden olmaktadır. Reaksiyon sırasında, önce ksantin enzimin Mo-co bölgesine bağlanır. Ksantin hızla ürata okside olurken aynı zamanda Mo^{+6} Mo^{+4} 'e indirgenir. Molibdenden bir elektronun transferi ile ilgili reaksiyonlar sonrası Mo^{+6} değerlikli duruma geçerken FAD iki elektron alarak indirgenir ve FADH_2 oluşur. Bunu takiben, NAD^+ FADH_2 'e bağlanır ve iki elektron alarak indirgenir. Redükte olan NADH serbestleşir ve böylece iki elektron indirgenmiş olan enzim rejenere olarak eski haline dönüşür (121) (Şekil 3). Buradan anlaşılacağı üzere, XOR enziminin katalizlediği reaksiyonun indirgeyici yarı-reaksiyonu Mo-co bölgesinde, oksidatif yarı-reaksiyonu ise FAD bölgesinde gerçekleşmektedir (61).



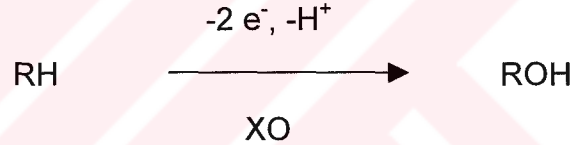
Şekil 3 XDH'ın ksantini ürik asite okside etme mekanizması

(2) Ksantin oksidaz: Pürin katabolizmasının son iki basamağını katalizlerken, XDH'dan farklı olarak elektron alıcısı olarak NAD^+ yerine moleküler oksijeni kullanır (33,62) (Şekil 4).



Şekil 4 XO'nun hipoksantin ve ksantini okside etme mekanizması

Bu reaksiyonlar sonucu reaktif oksijen türevleri oluşurması (süperoksit, hidrojen peroksit) nedeniyle XO klinik çalışmalarda büyük ilgi görmektedir. XO'nun katalizlediği reaksiyon basit olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir:



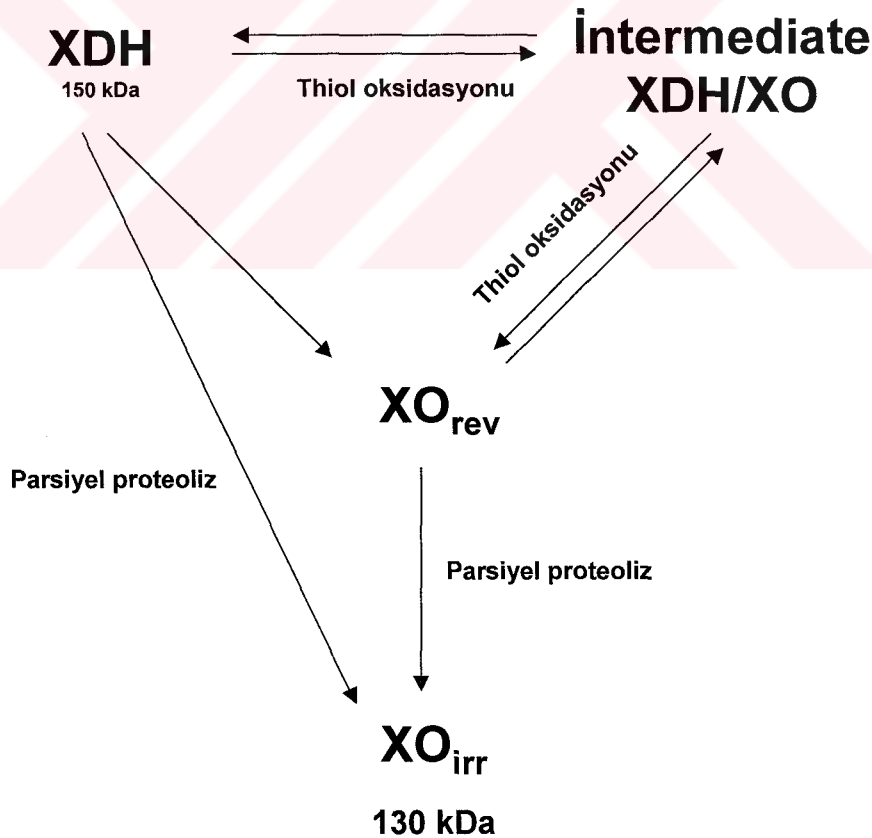
Bu reaksiyon denkleminde RH hipoksantin, ksantin ya da enzimin başka bir substratıdır ve "indirgeyici substrat" olarak tanımlanır. İndirgeyici substratın yapısına giren oksijen sıvı ortamdaki su moleküllerinden kaynaklanmaktadır. Reaksiyon sırasında indirgeyici substrattan enzim tarafından alınan elektronlar "okside edici substratlar" olarak ifade edilen çeşitli elektron alıcılarına aktarılır ve enzim yeniden okside olur.

XDH ve XO formları belli koşullarda birbirlerine dönüşebilirler. Bu dönüşüm iki şekilde olabilmektedir (33,115,134,150) (Şekil 5):

1. Reversibl dönüşüm: Isıtma veya subünit içinde disülfid bağları oluşturacak şekilde sistein tiol gruplarının oksidasyonu ile ortaya çıkar. -20°C 'de saklama da bu dönüşüme yol açar (129,134). Sülfidril ($\text{SH}-$) gruplarının oksidasyonu ilerleyip disülfid bağları oluşunca dehidrojenaz aktivitesi ortadan kalkar ve reversibl XO formu meydana gelir. XDH'nın XO formuna oksidatif dönüşümünün belli sistein kalıntılarının oksidasyonu (150), NAD^+ bağlama afinitesinin kaybı (62), redoks ve kinetik özelliklerinde değişiklikler (69) ve FAD bağlanma bölgesinde konformasyonel değişimler (127) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Buna karşın, bu dönüşümün altındaki

moleküler temel halen çok açık değildir. Yeni bir çalışmada, XDH'nın XO'a dönüşümünün XOR'ın hidrodinamik büyüklüğünün azalmasıyla birlikte bütünüyle bir konformasyonel değişim olduğu, bu değişimin Phe⁵⁶⁰ amino asitini içeren bölgeden kaynaklandığı ve bunun da dönüşüm süreci için gerekli bir basamak olduğu gösterilmiştir (93).

2. İrreversibl dönüşüm: XDH XO'a parsiyel proteoliz ile de dönüşebilir. Reversibl XO'dan doğrudan veya XDH'dan 20 kDa büyüklüğünde bir polipeptidin uzaklaştırılması ile irreversibl XO oluşur. Saksela ve ark. (128) çalışmalarında mitokondrial intermembran alanda lokalize bir proteazın bu dönüşüme aracılık ettiğini ve konvansiyonel anti-proteazlardan etkilenmediğini göstermişlerdir. Bu proteazın aktivitesi intrasellüler kalsiyum düzeyi tarafından dolaylı olarak düzenlenmektedir. İntrasellüler kalsiyum akışı ve kalsiyumun mitokondride birikmesi sonucunda mitokondri membranının permeabilitesi artmakta ve sitozole geçen proteaz irreversibl XDH/XO dönüşümüne neden olmaktadır.



Şekil 5 XDH ve XO'ın birbirlerine dönüşüm mekanizmaları

XOR'ın proteolitik yıkımı Fe_2S_2 , FAD ve Mo-co bölgeleri ile ilişkili 20, 40 ve 85 kDa'luk üç major parçanın ortaya çıkmasına neden olur (62) (Şekil 1).

Pürifiye edilen XOR enziminin % 60 kadarı ksantin gibi indirgeyici substratlar üzerine etkisiz ve inaktiftir (58). "İnaktif" enzim iki formda bulunur:

1. Demolibdo-XOR: Total enzimin % 40'ını oluşturur. Molibden (olasılıkla molibdopteri de) içermez.

2. Desulfo-XOR: Molibden içeren enzim miktarının % 30-40 kadarını teşkil eder. Mo-co'de $\text{Mo}=\text{S}$ grubunun yerini $\text{Mo}=\text{O}$ grubu almıştır. Sülfürasyon-desülfürasyon reaksiyonları ile aktif-inaktif formların birbirine dönüşümü sağlanır.

II.B. XOR ENZİMİNİN BİYOLOJİK ÖNEMİ, ORGANİZMADAKİ İŞLEVLERİ:

XOR enziminin organizmadaki başlıca işlevleri şunlardır:

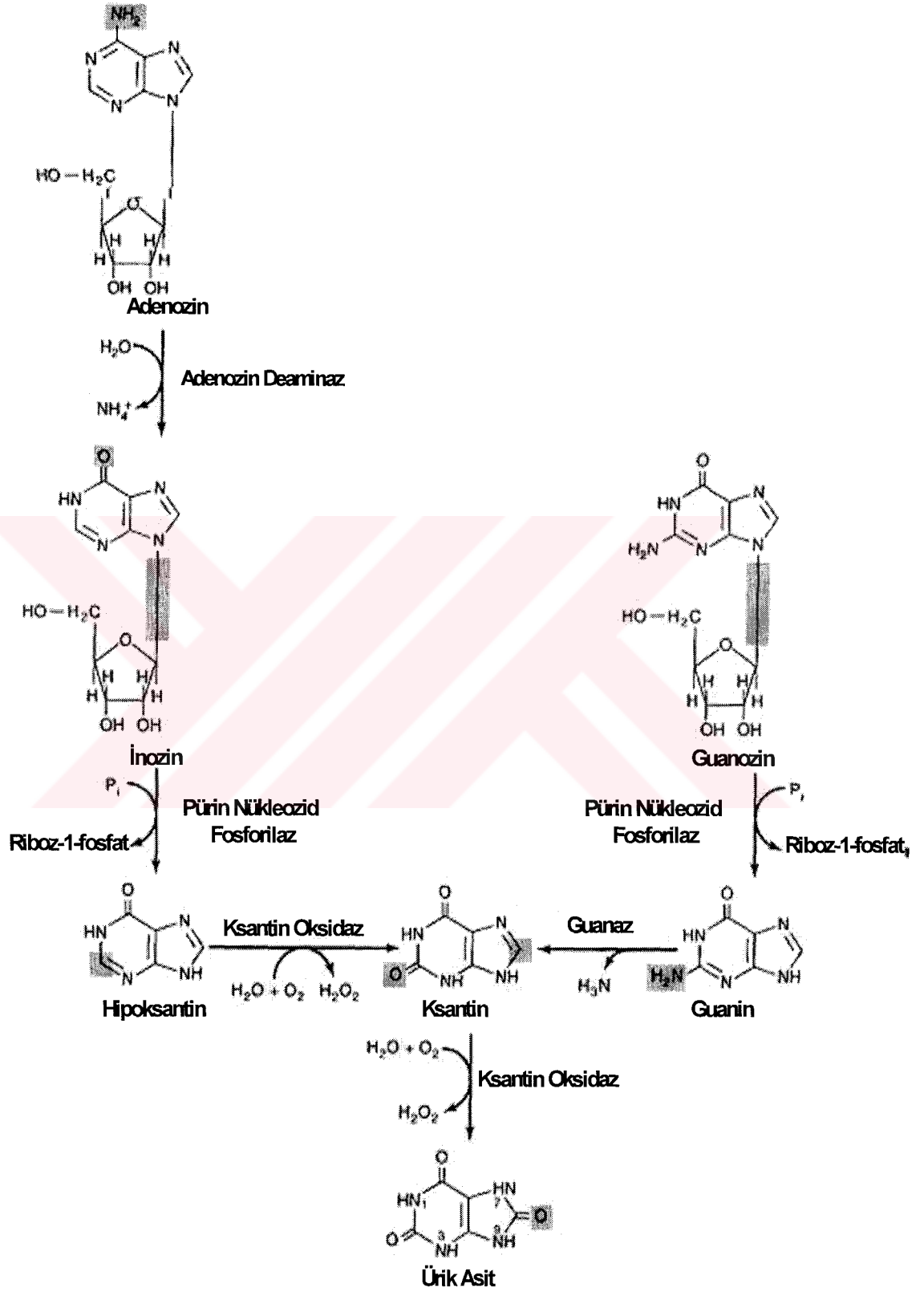
1. Pürin metabolizması: Enzimin major fonksiyonu pürin yıkımının son iki basamağını katalizlemesidir. Pürin katabolizmasının hız kısıtlayıcı enzimidir. Hipoksantin ksantine, ksantin ürik aside dönüşümünü katalizlerken serbest radikallerin oluşumuna neden olur. İnsanlarda ürat oksidaz enzimi bulunmadığı için ürik asit pürin yıkımının son ürünüdür (115) (Şekil 6).

2. NADH oksidaz aktivitesi: İndirgeyici substratların çoğu Mo-co bölgesi ile etkileşirken, NADH elektronlarını FAD bölgesine aktarır. Redoks merkezlerindeki hızlı dengelenmeyi takiben elektronlar genelde FAD bölgesinde NAD^+ veya moleküler oksijene geçer (18,121) (Şekil 7).

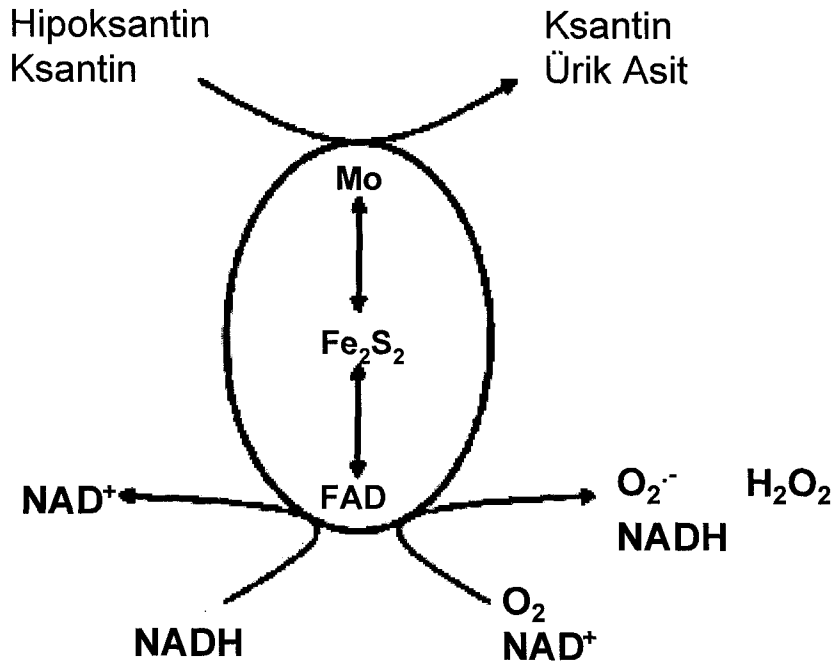
3. Demir absorpsiyonu ve mobilizasyonu: İn vivo ve in vitro çalışmalar XOR'ın ince bağırsakta demir absorpsiyonu ve karaciğerde demir mobilizasyonu üzerinde önemli rol oynadığını göstermektedir (144,145). Diyetle alınan demir ferröz (Fe^{+2}) durumda emilir ve mukozal hücrelerde XO tarafından ferrik demire (Fe^{+3}) okside edilir. Böylece XO demirin transferrine bağlanarak mukozal hücrelerinden transsellüler transportunu düzenler. XO'nun ferrooksidaz aktivitesi seruloplazminden 1000 kat daha fazladır (143). Karaciğerde, XDH ferritin demirinin indirgeyici salınımını uyarak demir metabolizmasını etkiler.

4. XOR çok sayıda N-heterosiklik ve aldehit substratların, piridinlerin, pteridinlerin hidroksilasyonunu da katalizler (80).

5. Yeni olarak, XOR'ın nitratların nitritlere ve nitrik oksite (NO) indirgenmesini katalizlediği gösterilmiştir (46).



Şekil 6 Pürin metabolizması



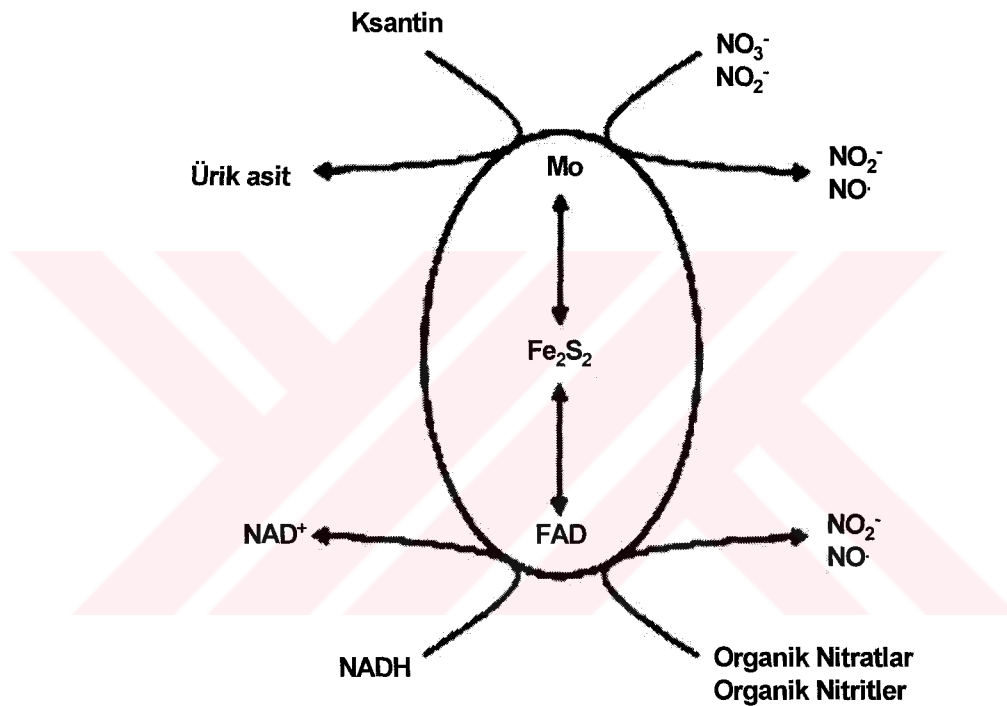
Şekil 7 XOR'ın NADH oksidaz aktivitesi

6. XOR, glutatyonda olduğu gibi sülfidril gruplarının oksidasyonunu katalizler. Enzimin inorganik iyodid ile proteinlerin iyodinasyonunu katalizlediği de saptanmıştır (40).

7. XOR'ın mikrobisidal rolü: XOR'ın hipoksantin varlığında bakterisidal etkinlik gösterdiği (49) ve in vivo olarak bakteriyel enfeksiyonlara cevapta aktive olduğu (146) uzun zamandan beri bilinmektedir. Enzimin bu işlevine serbest radikal oluşturabilme kapasitesi aracılık etmektedir. Bu etki yalnızca süperoksit için söz konusu değildir. Nitrit varlığında XOR tarafından oluşturulabilen peroksinitrit güçlü bir bakterisidal ajandır (20). XOR'ın NO oluşturabilme yeteneği de göz önünde bulundurulursa peroksinitrit daha da önem kazanmaktadır. Enzimin bakterisidal rolü, anne sütünde bulunmasına da bir açıklama getirmektedir. Bakterisidal etkinliği ile XOR enzimi yenidoğanın steril sindirim sistemini patojen bakterilerden koruyucu etkinliğe sahiptir (77). Anne sütündeki bu etkinlik sindirim sistemi epitelinde bulunan XOR enzim aktivitesi ile de özdeş ve birbirini tamamlayıcı olabilir.

8. İlaç metabolizması: 150 yıldan fazla bir süredir vazodilatör etkinlikleri bilinen organik nitratlar (nitrovazodilatörler) anjina pectoris, akut konjestif kalp yetmezliği ve hipertansif acil vakalarda yaygın klinik kullanıma sahiptir. Bu ilaçların vazodilatör etkilerini NO'e dönüştükten sonra guanilat siklazı stimüle edip cGMP düzeylerini

artırarak gösterdikleri görüşü yaygındır. Organik nitratların NO'e hangi mekanizmalarla dönüştüğü ise tam olarak açıklanmış değildir (42,55). XOR'ın hipoksik koşullar altında NADH varlığında gliseril trinitratın NO'e indirgenmesini katalizlediğinin gösterilmesinin ardından (97), Doel ve ark. (35) anaerobik koşullarda XOR varlığında gliseril trinitrat, isosorbit dinitrat ve isosorbit mononitratın inorganik nitrite indirgendiğini bildirmişlerdir. Bu indirgenme NADH yerine ksantin varlığında daha hızlı gerçekleşmektedir. İnorganik nitrat ve nitritin tersine, organik nitratlar enzimin FAD bölgesinde indirgenirler (Şekil 8).



Şekil 8 XOR'ın organik nitrat ve nitritler üzerine etki mekanizması

XOR enzimi kafein metabolizmasında da etkinlik gösterir. Kafeinin sekonder bir metaboliti olan 1-metilksantin 1-metilürük asite dönüşümünü katalizler (98).

II.C. XOR ENZİMİNİN İNDİRGEYİCİ SUBSTRATLARI:

XOR çok sayıda substratın oksidasyonunu katalizler. Bunlardan bazıları Tablo-1'de verilmiştir. Bu substratlara karşı enzimin spesifitesini belirlemek değişik çalışmalarda farklı okside edici substratların kullanılması ve farklı pH'larda ölçümler yapılmış olması nedeniyle zordur (18).

Tablo-I: XOR enziminin bazı indirgeyici substratları.

SUBSTRAT	RELATİF HIZI (*)	K _m
Asetaldehit	43	2x10 ⁻⁵
Pürin	100	<10 ⁻⁵
Hipoksantin	130	<10 ⁻⁵
Ksantin	170	
1-metilksantin	170	
NADH	15	
Allopurinol	79	
Pteridin	56	2x10 ⁻⁵
6-thioksantin	42	
2-hidroksipirimidin	28	

(*) Pürin oksidasyonu rastgele 100 olarak kabul edilmiş ve diğer değerler buna göre relatif olarak sunulmuştur.

II.D. XOR ENZİMİNİN YÜKSELTGEYİCİ SUBSTRATLARI:

Oksijen, metilen mavisi ve 2,6-diklorofenol-indofenol gibi kimyasal boyalar (149), ferrisiyanid, NAD⁺, kinonlar ve çok sayıda diğer bileşik (özellikle azot içerenler) indirgenmiş XOR'dan elektron alabilme özelliğine sahiptirler. Bu elektronları alıp kendileri indirgenirken XOR enzimi ise okside olur. Sitokrom c de, moleküler oksijen varlığında, enzimden elektron alır (91). Menadion, 2,4-dinitrofenol, trinitrotoluen, nitrofuranlar, niridazol, nikotinamid-N-oksit, pürin-N-oksit gibi birçok indirgenebilen madde de XOR'a elektron alıcısı olarak hizmet edebilir (102). XOR'ın elektron alıcılarına karşı spesifitesi türden türe değişim gösterir. Memelilerde ferrisiyanid en

etkili elektron alıcısıdır. Bunu sırasıyla O_2 ve NAD^+ takip eder (Ferrisiyanid $> O_2 > NAD^+$). Memeliler arasında O_2 ve NAD^+ 'nin elektron alıcısı olarak relatif etkinlikleri yalnızca türden türe değil, dokudan dokuya da değişim göstermektedir (80).

II.E. XOR ENZİMİNİN DOKU DAĞILIMI:

XOR aktivitesi, bakteriler dahil olmak üzere incelenen tüm türlerde saptanmıştır (80,115). Memeli dokularında aktivite geniş bir dağılım göstermektedir. En yüksek aktivite karaciğer ve ince bağırsakta gösterilmiştir (115). Ancak, doku dağılımı açısından türler arasında belirgin bir farklılık bulunmaktadır. Bunun en güzel örneği kanda (115) ve kalpte (31,129,152) çok farklı düzeyde XOR enzim varlığının saptanmış olmasıdır. Al-Khalidi ve Chaglassion (4) insan, koyun, domuz, kedi ve keçi serumlarında düşük XOR aktiviteleri saptamıştır. Buna karşılık sığır, köpek, at, tavşan, rat, fare serumlarında relatif olarak daha yüksek enzim aktiviteleri bulunmuştur.

İnsan dokularında yapılan immuno-histokimyasal çalışmalarda, sitozolik bir enzim olan XOR'ın karaciğerde periportal hepatositler ve endotel hücrelerinde, proksimal ince bağırsağın epitel hücreleri ve goblet hücrelerinde, süt salgılayan meme bezlerinin asiner hücrelerinde, kalp, böbrek, beyin, aorta, akciğer, iskelet kası, meme bezi ve bağırsakların küçük damarlarının endotel hücrelerinde, anne sütünde bulunduğu tespit edilmiştir (86,103). Esas olarak sitoplazmik yerleşim gösteren enzimin peroksizomlarda da bulunduğu bildirilmiştir (7).

II.F. XOR ENZİM AKTİVİTESİ YÖNÜNDEN CİNSİYET FARKLILIKLARI:

XOR aktivitesi yönünden cinsiyet farklılıklarını değerlendirmeye yönelik çalışmalar farklı sonuçlar sunmaktadır. Newaz ve ark. (108), istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, erkeklerin plazmalarında kadınlara göre daha yüksek XOR enzim aktiviteleri saptamışlardır. Deneklere oral yoldan kafein verildikten sonra idrarda kafein metabolitlerinin düzeylerini ölçerek XOR aktivitelerinin değerlendirildiği çalışmalarda, Relling ve ark. (125) erkeklerde bayanlara göre daha düşük aktiviteler bulmuşlar, Chung ve ark. ise (28) enzim aktiviteleri açısından anlamlı bir farklılık saptamamışlardır.

Levinson ve Chalker (84), rat karaciğerinde XOR aktivitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, immatür hayvanlarda dişi ve erkek cinsiyetler arasında enzim aktivitesi açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığını, matür hayvanlarda ise erkeklerde karaciğer enzim aktivitesinin dişi ratlara göre % 59 daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, matürasyonla enzim aktivitelerinin erkeklerde iki katına çıktığı ve bunun prepubertal kastrasyonla önlendiği ortaya konulmuştur. Dişi ratlarda ise prepubertal ooferektomi enzim aktivitesini iki katına çıkarmakta, postpubertal kastrasyon ve testosteron tedavisi enzim aktivitesini artırmaktadır. Erkeklerde ise estradiol-17- β tedavisi ve orşiektomi enzim aktivitesi üzerine etki göstermemektedir. Yine benzer bir çalışmada, Decker ve Levinson (32) hepatik XOR aktivitelerinin erkek ratlarda dişilerden belirgin olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İnsan karaciğerinde yapılan çalışmalarda da erkek dokularında enzim aktivitelerinin dişilerden % 20 daha yüksek olduğu belirtilmiştir (52). Huh ve ark. (68) 10^{-6} M konsantrasyonda estradiol uygulaması ile hepatik XOR aktivitelerinin % 15 oranında azaldığını göstermişlerdir.

Bu yapılan çalışmalar göstermektedir ki; plazma ve diğer dokularda XOR aktivitelerinin cinsiyet farklılıklarından nasıl etkilendiğinin hassas ve spesifik metotlar ile ortaya konulması literatürdeki farklı görüşleri ortadan kaldıracak net bilgiler ortaya koyacaktır. Hipogonadizm gibi hastalıklar bu çalışmalar için uygun modeller teşkil edebilir.

II.G. XOR ENZİMİNİN GEN YAPISI VE REGÜLASYONU:

İnsan XOR geni kromozom 2p22 bölgesinde bulunmaktadır (156) ve tüm intron-ekson yapısal haritası çıkarılmıştır (154). XOR geni 60000 DNA bp'den uzundur ve 36 relatif olarak küçük eksona bölünebilir. Ekson 36, 700 bp uzunluktadır. Geri kalan 35 eksonun her biri 50-280 bp uzunluğa sahiptir. "5'-flanking" bölgesi transkripsiyonel düzeyde çeşitli uyarılara cevabın düzenlenmesiyle ve enzimin doku-spesifik ekspresyonu ile ilişkilidir (142).

Esasen, XOR enzim aktivitesi birden fazla düzeyde kontrol edilmektedir. Diğer memeliler ile karşılaştırıldığında, insan dokularındaki XOR aktiviteleri genelde düşüktür. Xu ve ark. (155), diğer canlı türlerine göre insan XOR geninin promotor aktivitesi ve transkripsiyon hızlarının baskılanmış olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni açık olmamakla birlikte, XOR enzimi indüklenebilen bir enzimdir ve belli

koşullarda çeşitli şekillerde aktive olduğu bilinmektedir. Enzimin ekspresyonunu ve aktivitesini etkileyen bileşikler ve koşullar şu şekilde sıralanabilir:

1. Akut faz cevabı ve sitokinlerin salınımı,
2. Hormonlar (seks hormonları, prolaktin, kortizol),
3. Oksijen basıncı (hipoksi ve hiperoksi),
4. Enzimi kodlayan gendeki mutasyonlar,
5. Enzimin kendi substratları,
6. Enzimin oluşturduğu ürünler ve serbest radikaller,
7. Lipid peroksidasyon ürünleri,
8. Enzimin inhibitörü olan diğer maddeler.

Akut faz cevabı ve sitokinlerin salınımı: Akut faz cevabı ile uyumlu olarak, sitokinlerin hücre kültürlerinde XOR aktivitesini uyardıkları gösterilmiştir (36,38,117). $TNF-\alpha$, $IF-\gamma$, $IL-1\beta$ ve $IL-6$ enzim aktivitesini çeşitli hayvan dokularında ve meme bezi epitel hücre kültüründe uyarmaktadır (114,117). Bu sitokinler içinde $IF-\gamma$ önde gelmektedir. Sitokinlerin XOR aktivitesini bu uyarımları esas olarak transkripsiyonel seviyededir, XOR gen ekspresyonunun indüksiyonudur ve de novo protein sentezine dayanır. İnsan XOR geninin "5'-flanking" bölgesinde $IL-6$, $TNF-\alpha$, $IF-\gamma$ ve $IL-1$ için uyarım bölgelerinin bulunması bu görüşü desteklemektedir (154). Ancak, post-translasyonel enzim aktivasyonunun da buna katkısı vardır. Primer veya sekonder sitokinlerin XOR ekspresyonunu indüklemesi, enzimin inflamatuvar olaylarda immünomodülatör ve anti-viral etkilere aracılık edebileceği düşüncesini doğurmuştur.

Hormonlar: Hormonlar da XOR aktivitesi üzerine etkilidir. Doğum yapan annelerin sütleri postpartum bir ay süre ile XOR protein düzeyleri ve aktiviteleri bakımından seri ölçümler ile değerlendirildiğinde enzim aktivitelerinin ilk 15 günde pik yaptığı, bundan sonra düştüğü ve bazal seviyede seyrettiği gösterilmiştir. Buna karşılık, XOR protein düzeyleri bu süreçte minimal değişmiştir. Bu durum post-translasyonel düzenlemenin bir sonucudur (19). Fare meme bezlerinde ise enzim aktiviteleri ve enzim protein düzeyleri paralellik göstermektedir (95). Kültür ortamındaki HC11 fare meme bezi epitel hücreleri prolaktin ve kortizole birlikte maruz bırakıldıklarında XOR enzim aktiviteleri 4-5 kat artış göstermiştir (94). Bu durum artmış de novo sentez ve azalmış XOR protein yıkımı ile ilişkilendirilmiştir. Artmış de novo sentez XOR mRNA düzeylerinin artışı ile kendisini belli eder. Tirozin kinaz ve

MAP kinaz bağımlı yolların rolüne ilişkin deliller de mevcuttur. XOR aktivitesindeki cinsiyet farklılıkları da seks hormonlarının enzim aktivitesini düzenleyebileceğini düşündürmektedir.

Oksijen basıncı: Oksijen basıncı XOR'ın aktivitesinde bir başka kritik belirleyicidir. Genel olarak hipoksi XOR ekspresyonunu artırır ve XDH'ın XO'a hızlı dönüşümüne neden olurken, hiperoksi XOR enzim aktivitesinde baskılanmaya yol açar (59,119,140,141). Hipoksi ve hiperoksinin neden olduğu bu aktivite değişimlerinin post-transkripsiyonal veya post-translasyonal seviyede oluşuna ilişkin farklı görüşler mevcuttur. Terada ve ark.nın çalışmaları (140), kültür ortamındaki 3T3 fare fibroblast hücreleri üzerine hipoksi ve hiperoksinin etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmadan çıkan sonuç şudur; ilk 24 saatte hipoksiye bağlı enzim aktivitesindeki artış ve hiperoksiye bağlı aktivite azalması post-translasyonal düzeydeki mekanizmalarla, 24-48 saatteki değişimler ise XOR mRNA düzeylerinde ve protein sentezindeki değişimle olmaktadır.

Aynı etken duruma cevapta bile XOR aktivitesinin kontrolü farklı mekanizmalarla olmaktadır. Bu mekanizmalar doku ve/veya hücre-spesifik farklılıkları açıkça gösterse de, farklılıkların nedeni tam olarak açıklanabilmiş değildir (119). XOR aktivitesinin post-translasyonal kontrolüne ilişkin bulgular bu açıdan dikkat çekicidir. Sulfo- ve desulfo-XOR formlarının birbirlerine dönüşümleri bununla ilişkili olası bir mekanizmadır. İndirgenmiş desulfo-XOR, sülfid iyonu ile in vitro inkübasyonla aktif sulfo-XOR formuna dönüştürülebilir (147). Ayrıca, ratlarda artmış protein diyetine cevap olarak desulfo-XOR'ın sulfo-XOR'a dönüştüğü bildirilmiştir (43). *Drosophila melanogaster*'de maroon-like locus (ma-l) genindeki mutasyonların desulfo-XOR oluşumu ile sonuçlandığı bilinmektedir (148). Bu genin, desulfo-Mo-co'ü sülfürleyerek desulfo-/sulfo-XOR dönüşümünü katalizleyen bir enzimi kodladığı bildirilmiştir (6). Bu genin homolog genleri, insan dahil, diğer türlerde de tanımlanmıştır. İnsan molibden kofaktör sülfüraz geninin (HMCS, insan ma-l homolog geni) mutasyonları klasik ksantinüri tip II'de tanımlanmıştır (71). Ksantinüri tip I ise XOR geninin kendisindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (157).

Kayyali ve ark. (76) hipoksiye cevap olarak XOR'ın post-translasyonal aktivasyonunda protein fosforilasyonunun rolü olduğunu da bildirmişlerdir.

XOR aktivitesinin en son molibden bağlanması basamağı ile düzenlenmesi teorik olarak mümkün olduğu halde halihazırda bütünüyle spekülatiftir.

Enzimin substratları: Ortamda çok yüksek konsantrasyonlarda ksantin varlığı XOR enzim aktivitesini inhibe etmektedir (60,65,89). Enzimin substrat olarak kullandığı çok sayıda pürin, primidin ve diğer heterosiklik bileşikler de enzim aktivitesini baskılayabilmektedir (10).

Enzimin ürünleri ve serbest radikaller: XOR enzimi kendi ürünleri (ürik asit, süperoksit ve hidrojen peroksit) tarafından da inhibe edilebilir (89,122,141). Ürik asit yüksek konsantrasyonlarda inhibitör etkinlik gösterir. Ksantin/XOR reaksiyon karışımına süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (C) ilavesi ile serbest radikallerin ortamdaki uzaklaştırılmasıyla daha yüksek enzim aktivitelerinin elde edilmesi serbest radikallerin inhibitör özelliğini gösteren bir bulgudur (89). Anaerobik koşullarda, NO XOR'ın indirgenmiş molibden merkezi ile reaksiyona girerek desulfo- tip inaktif enzim oluşumuna neden olabilir (73). Biyolojik sistemlerde iskemi-reperfüzyon hasarının erken evresinde NO ve süperoksitten ($O_2^{\cdot-}$) oluşan peroksinitrit de XOR enzim aktivitesini inhibe eder (83).

Lipid peroksidasyon ürünleri: Oksidatif strese maruz kalmanın sonucu olarak serbest radikaller ile lipidlerin peroksidasyonu neticesinde oluşan malondialdehit (MDA) ve (E)-4-hidroksinon-2-enal (HNE) XOR'ı inaktive edebilir. MDA yalnızca XO formunun aktivitesini azaltır. Bunu yaparken MDA'nın karbonil grubu enzimin $-NH_2$ grupları ile reaksiyona girip schiff baz oluşturur ve bu şekilde "uncompetitive" inhibisyona (hem K_m hem de V_{max} değerlerinin azalması söz konusudur) yol açar. HNE ise enzimin hem XO hem de XDH formları üzerine etkilidir. HNE bir yandan XDH'nin FAD bölgesindeki sülfidril ($-SH$) grupları ile reaksiyona girip Michael ürünleri oluşumuna ve XDH'nin irreversibl XO formuna dönüşümüne neden olur, diğer yandan MDA gibi enzim ile schiff bazlar oluşturur. HNE'in oluşturduğu inhibisyon "noncompetitive" (yalnızca V_{max} azalır) tiptedir (29).

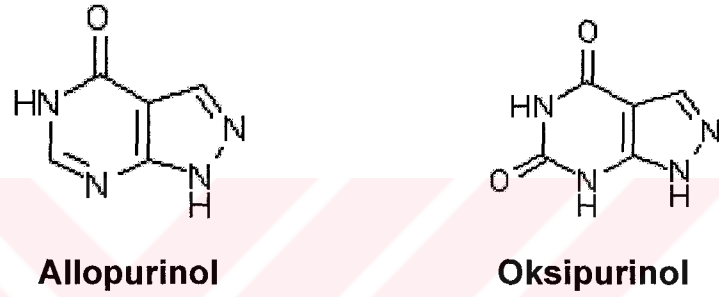
XOR enzim inhibitörü olan diğer maddeler: XOR inhibitörleri iki ana kategoriye ayrılabilir:

1. Enzimin pürin substratının yapısal analogları,
2. Enzimin fizyolojik substratlarından yapısal olarak farklı moleküller (115).

Pürin substratlara yapısal olarak benzeyen moleküller allopurinol, oksipurinol, bazı primidinler, çok sayıda pteridinler ve belli aromatik heterosiklik bileşiklerdir. Tersine, siyanid, arsenit, metanol ve formaldehit gibi moleküller ise substratlardan yapısal olarak farklı enzim inhibitörleridir.

Her iki grup inhibitörler de XOR enziminin Mo-co bölgesi ile etkileşerek etki gösterirler (61).

Başlangıçta potansiyel bir anti-kanser ajan olarak sentezlenen allopurinol ve bunun metaboliti olan oksipurinol (pirazolo-(3,4-d)-primidinler) XOR enziminin in vivo ve in vitro en yaygın ve etkili inhibitörleridir (37) (Şekil 9). Bu moleküller XOR enziminin indirgenmiş molibden bölgesi ile etkileşerek inhibisyona neden olurlar (90,132). Oksipurinol indirgenmiş XOR'a son derece yüksek afinite gösterir; 0,5 mM konsantrasyonda uygulanması enzim aktivitesini % 50 oranında azaltır (132). Allopurinol ve oksipurinolün serbest radikal temizleyici aktiviteleri de vardır (101).



Şekil 9 XOR inhibitörü olan allopurinol ve oksipurinolün yapıları

Folik asit ve türevi moleküller de enzimin substratının yapısal analogu olan inhibitör moleküllerdir (85). Bu yönü ile, folik asitin hiperürisemi tedavisinde faydalı olduğu bildirilmiştir (113).

XOR enziminin substratlarından yapısal olarak farklı bir inhibitör olan metanol formaldehite dönüştükten sonra formaldehit molibdene bir proton aktarır ve enzimi inaktive eder (64).

Arsenit ve siyanid XOR enzimi ile çok yavaş reaksiyona girer, enzimin thiol grupları ile kompleksler oluşturur ve indirgeyici substratları ile reaksiyona girmesine engel olurlar (64).

Relatif olarak düşük konsantrasyonlardaki üre ve guanidinium tuzları XOR enziminin substrat bağlama bölgesine reversibl olarak bağlanır ve enzimin kompetitif inhibitörleri olarak işlev görürler (39).

Pteridinler (111), flavonoidler (106), fenolik bileşikler (27) ve benzothiazinon analogları (130) da XOR enziminin inhibisyonuna neden olurlar.

II.H. XOR İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR VE DOLAŞIMDAKİ XOR ENZİMİNİN ÖNEMİ:

XOR'ın biyolojik işlevlerini etkileyen başlıca patolojiler şunlardır:

1. Herediter ksantinüri
 - a. Klasik ksantinüri tip I
 - b. Klasik ksantinüri tip II
 - c. Molibden-kofaktör eksikliği
2. Hiperürisemi-gut
3. İskemi-reperfüzyon injürisi.

Herediter ksantinüri: XOR, aldehit oksidaz (AO) ve sülfat oksidaz molibden kofaktör içeren enzimlerdir. Herediter ksantinüri bu enzimlerin yetersizlikleri ile kendisini gösteren ve otozomal resesif geçişli konjenital bir bozukluktur. Üç tipi vardır:

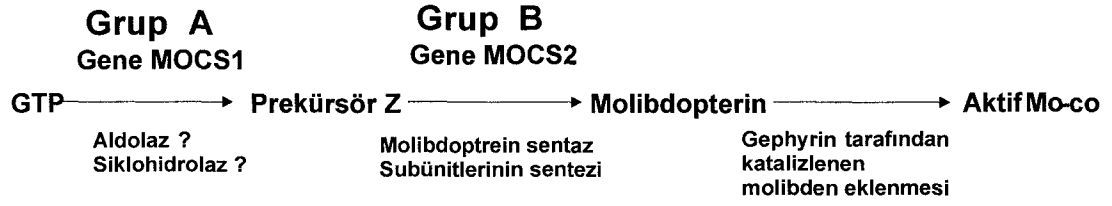
1) Klasik ksantinüri tip I: XOR genindeki mutasyonlar ile ortaya çıkar. XOR aktivitesi yoktur.

2) Klasik ksantinüri tip II: İnsan molibden kofaktör sülfür az genindeki mutasyonlar sonucunda ortaya çıkar. Hem XOR hem de AO aktiviteleri yetersizdir.

Klasik ksantinüri 1/60000 sıklıkta görülür. Plazma ürat seviyesi azalmıştır. Hastaların çoğu semptom vermez. Ancak, bazı hastalarda üriner sistemde ksantin taşları, akut renal yetmezlik, ksantin dokularda birikimine bağlı miyopati ve rekürren poliarterit saptanabilir. Allopurinol yükleme testi tip I ksantinüri'nin diğer tiplerden ayrılmasında yardımcı olur. Allopurinol hem XOR hem de AO tarafından oksipurinole çevirilebildiği için alımını takiben tip I hastaların serum ve idrarlarında oksipurinol saptanabilir. Ancak diğer tiplerde bulunmaz (70,71).

3) Molibden kofaktör eksikliği: Mo-co sentezini düzenleyen genler olan MOCS1 ve MOCS2'nin defektleri ile ortaya çıkar. Mo-co sentezi iki ana basamaktan oluşmaktadır. İlk aşama prekürsör bir maddenin oluşumu, ikinci aşama ise bu prekürsörün molibdopterin sentaz tarafından Mo-co'nun organik kısmı olan molibdoptere dönüştürülmesidir (Şekil 10). MOCS1 ilk aşamada işlev gören iki enzimi kodlar ve buradaki defekt prekürsör oluşumunu engeller. Hastaların büyük kısmında bu tip defekt söz konusudur (Grup A hastalar). MOCS2 ise molibdopterin sentazın büyük ve küçük subünitlerini kodlamaktadır. Bu genin lezyonları daha az sıklıkta görülmektedir (Grup B hastalar). Mo-co'nun sentezlenememesi XOR, AO ve sülfat oksidazın kombine yetersizliklerine neden olur (124). Molibden kofaktör eksikliği

klasik ksantinüriden kolayca ayrılabilir; çünkü sülfat oksidaz yetersizliği nedeniyle ciddi nörolojik bozukluklar görülür (71).



Şekil 10 Molibden-kofaktör sentez aşamaları

Hiperürisemi-gut: XOR inhibisyonu hiperürisemili hastaların tedavisinde önemli bir bölümü teşkil etmektedir.

Hiperürisemi serum ürik asit seviyesinin erkeklerde 7 mg/dL, kadınlarda 6 mg/dL üzerinde bulunması olarak tanımlanabilir. Hiperürisemi insanlarda yaygın olarak görülür ve görülme sıklığı ilerleyen yaşla birlikte artar. Hiperürisemili hastaların çoğunluğu asemptomatiktir ve asla gut gelişmez. Hiperürisemi ürik asitin aşırı üretiminden, atılımının azalmasından dolayı ya da her iki nedenden ortaya çıkabilir. Genel popülasyonda, gut hastalarının % 80-90'ı ürik asit atılımının azalması nedeniyle bu hastalığı taşırlar.

Ürik asit düzeyleri arttıkça gut gelişme riski artar. 10 mg/dL'den yüksek ürik asit düzeyleri olan hastalarda 5 yılda gut gelişim prevalansı % 30 iken, 7 mg/dL altında bu oran yalnızca % 0,6'dır. Cinsiyet de gut insidansı üzerine etkilidir. Erkekler için gut prevalansı 6/1000, kadınlar için ise 1/1000'dir. İnsidans, özellikle kadınlarda, yaşla birlikte artar. Ailesel yatkınlık da hiperürisemi ve gut gelişiminde önem arz eder. Gutlu hastaların akrabalarında gut prevalansı daha yüksektir. Ürik asit esas olarak böbreklerle atıldığı için renal yetmezlik hiperürisemiye neden olabilir. Belli ilaçlar (tiazid diüretikleri, loop diüretikleri, düşük doz salisilatlar, siklosporin, niasin, etambutol, pirazinamid, vb.) ürik asit atılımının azalmasına yol açarak hiperürisemi oluşturabilir. Alkol tüketimi de ürik asit düzeylerini artırır. Obesite ve aşırı beslenme de ürik asit üretiminde artışa yol açabilir.

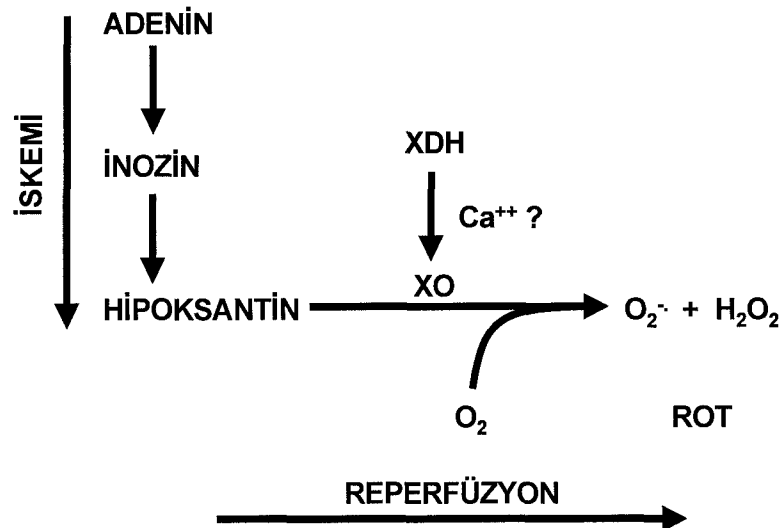
Herhangi bir yaşta ortaya çıkabilen gut, kendini sınırlayan ve genelde alt ekstremitelerde ortaya çıkan akut monoartrit ile karakterizedir. Sıklıkla ilk tutulan eklem birinci metatarsofalangeal eklem veya diz eklemidir. Etkilenen eklem sıcak, eritemli, terli ve hassastır. Bu hali ile sellülit veya enfeksiyon ile karışabilir. Akut ataklar

başlangıçta seyrek olarak tekrarlar, zamanla alevlenme sıklığı artar. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde deri ve cilt altı dokularda monosodyum ürat (MSÜ) kristalleri birikerek gut tofuslerini oluşturur. Bu tofuslar eller, bilekler, dirsekler ve dizlerde daha sık görülür. Hastalık yaşlı hastalarda atipik olarak da ortaya çıkabilir.

Hastalığın kesin tanısı tofuslerde ve sinovyal sıvıda MSÜ kristallerinin gösterilmesi ile konulur. İnflamatuvar monoartrit, artmış serum ürik asit düzeyleri ve kolşisine cevap diğer destekleyici bulgulardır. Radyografi de tanıyı destekleyici olarak kullanılabilir.

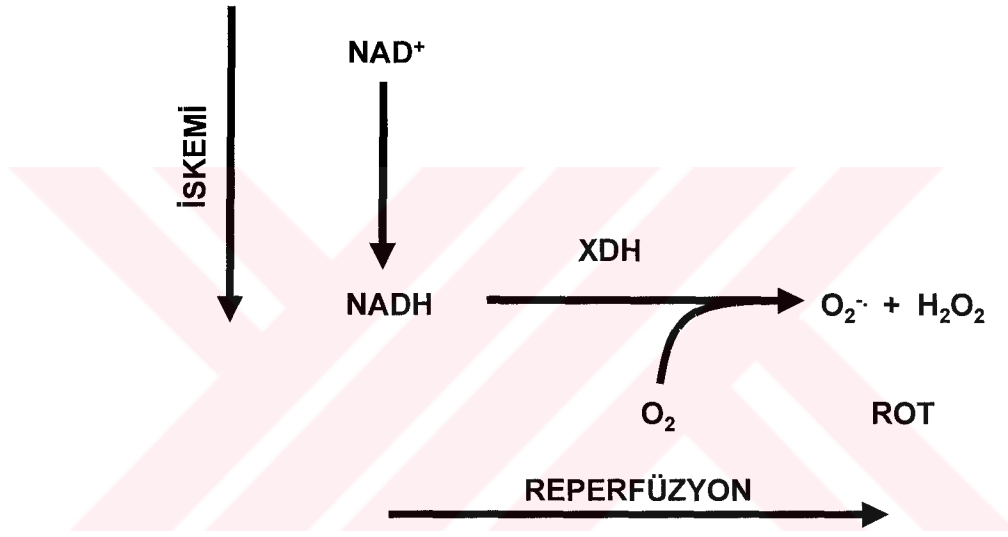
Tedavide nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID), kortikosteroidler, kolşisin ve ürikozürik ilaçların yanı sıra özellikle ürat nefropatisi olanlarda XOR inhibitörü olan allopurinol tercih edilir (126).

İskemi-reperfüzyon injürisi: Granger ve ark. (47,92), XOR'ın iskemi-reperfüzyon (IR) injürisinde anahtar bir role sahip olduğunu öne sürerek dikkatleri bu enzim üzerine çekmişlerdir. Hipotezin mekanizması Şekil 11'de gösterilmiştir. Bu patofizyolojik mekanizmanın merkezinde enzimin reaktif oksijen türevleri (ROT) oluşturma özelliği yatar. Buna göre, iskemi oluşan dokuda ATP yıkımına bağlı hücrel enerji yük azalması sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır. İntrasellüler Ca^{+2} artışı Ca^{+2} - veya Ca^{+2} -kalmodulin bağımlı proteazları aktive eder. Bu proteazlar, parsiyel proteoliz ile, fizyolojik koşullarda dokularda bulunan esas XOR formu olan XDH'nin XO'ya dönüşümüne neden olur. Aynı zamanda ATP yıkımını takiben hücrelerde hipoksantin birikir. Reperfüzyon fazında, dokularda artmış olan hipoksantin, O_2 ve XO birlikte bol miktarda ROT (süperoksit ve hidrojen peroksit) oluşturur. Bu oluşan serbest radikaller de doku hasarına yol açar (92).



Şekil 11 XDH-XO dönüşümünün IR injürisindeki rolüne ilişkin olası mekanizma

Ancak, bu konuda en tartışmalı olay iskemik dokularda XDH'ın XO'a dönüşüm hızı ve yaygınlığıdır. Ortak görüşe göre, bu dönüşüm yavaş olmakta ve IR'un uyardığı doku hasarında major bir rol oynamasına engel teşkil etmektedir (78,159). Aslında, XOR'ın IR'daki rolü için XDH'ın XO'a dönüşümünün zorunlu olmadığı da tartışılabilir. İskemi sırasında dokuda biriken NADH reperfüzyon fazında artan O₂ ile birlikte XDH tarafından okside edilirken ROT oluşturabilir (57) (Şekil 12). Sonuç olarak da, her iki mekanizma ile iskemi ve/veya substrat düzey değişikliklerini takiben XOR aktivitesinin bütünüyle (XDH+XO olarak) up-regülasyonu ROT üretiminde artışa neden olabilir.



Şekil 12 XDH formunun IR injürisindeki rolüne ilişkin olası mekanizma

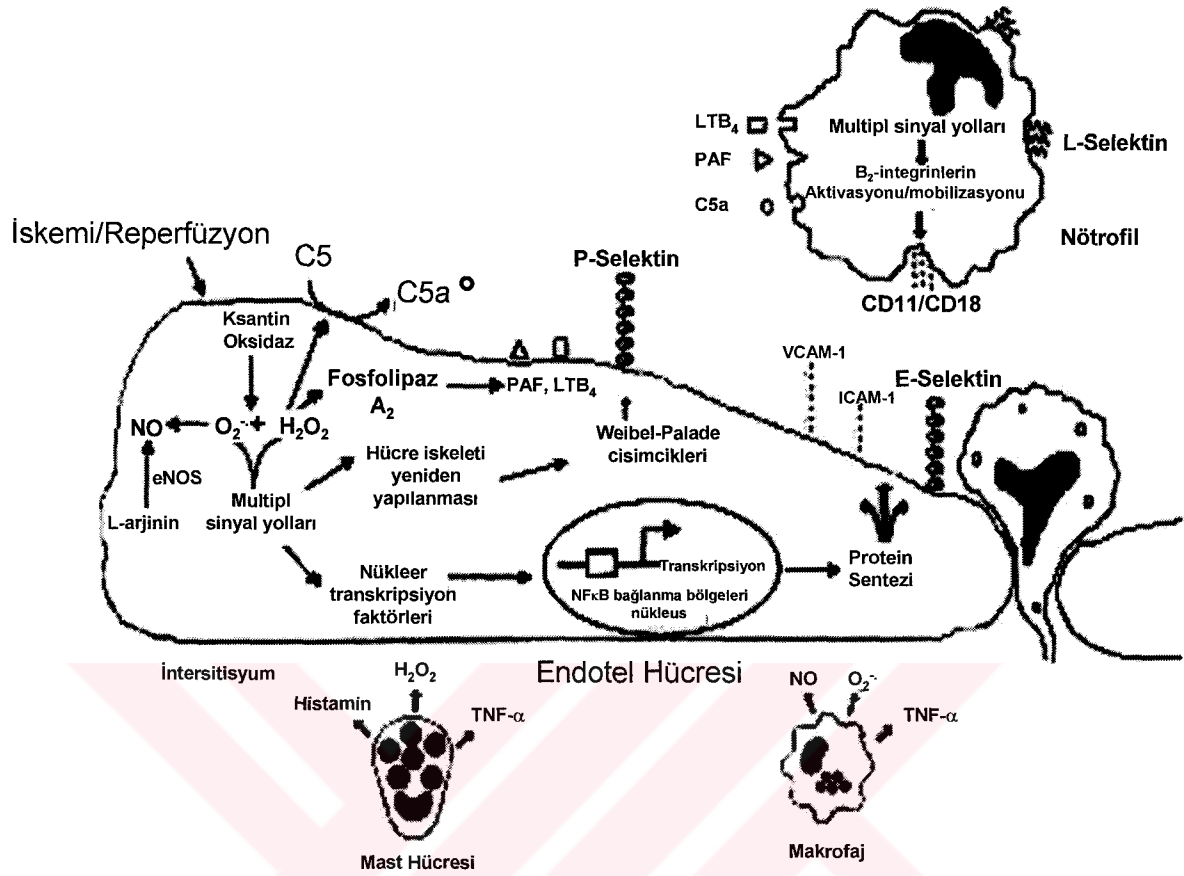
IR injürisine yönelik yeni çalışmalar vasküler yapılar üzerine, özellikle de lökosit-endotel hücre etkileşimlerine odaklanmıştır (48,81).

XOR sitozolik bir enzim olmasına karşın, in vivo olarak plazmada ve vasküler endotel hücrelerinin yüzeylerinde, ayrıca in vitro olarak yine primer kültürlerde vasküler endotel hücre yüzeylerinde de saptanır (1,58). Enzim vasküler endotel hücrelerinin yüzeyinde heparan sülfat proteoglikanlar ile elektrostatik reaksiyona girerek tutunur. Plazmada ölçülebilen enzim aktivitesi, özellikle karaciğer ve intestinal mukoza gibi yüksek enzim aktivitelerinin gösterildiği dokular ile kıyaslandığında, oldukça düşüktür. Gerek plazmada gerekse endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan XOR enzimi XO formundadır. Bu, enzimin serum proteazlarına maruz kalmasının ve okside edici bir ortamda bulunan hücrelerden orijin almasının bir sonucudur (79,104).

Sitozolik XOR'ın artışına neden olan olaylar ya da sirkülasyondaki XOR'ın çok yüksek düzeylere ulaşmasına yol açan belli patolojik hadiseler endotel hücrelerinin yüzeylerindeki XOR'ı da artırabilir (58,153). Herhangi bir dokudaki IR'un dolaşıma XOR salınımına neden olabileceği görüşü çok sayıda grup tarafından araştırılmıştır. Ekstremitte turnike uygulaması (41), aortik cross-clamp prosedürleri (137) veya karaciğer transplantasyonu (116) gibi IR modellerinde hastaların plazma XOR düzeyleri artmaktadır. Rat karaciğerinin IR'unda karaciğer perfüzyonlarının XOR düzeylerinin artması ve yine aynı modelde akciğerde allopurinol ile inhibe edilebilen mikrovasküler ve alveoler permeabilite artışının gösterilmesi dolaşıma XOR salınarak, ROT oluşturma özelliği ile, endotelial ve epitelyal hasara yol açabileceği düşüncesini desteklemektedir (151,159). Benzer biçimde, iskemik ince bağırsaktan XOR salınımını takiben bozulmuş akciğer fonksiyonu da gösterilmiştir (138).

Bir kez dolaşıma geçtiğinde XOR vasküler endotel hücrelerinin yüzeyindeki glikozaminoglikanlara bağlanarak, yalnızca orijinal hasar bölgesinde değil, aynı zamanda düşük seviyede XOR içeriğine sahip olan uzak organlarda da oksidatif hasar oluşturabilir (67,159). Başlangıçta iskemik hasarda yer almayan organlarda hasar ortaya çıkması "Multipl Organ Disfonksiyonu Sendromu" (MODS) olarak adlandırılır; bağırsak, iskelet kası ve kalp gibi organlardaki IR'u takiben kritik hastalarda ölümün major sebebidir (25). MODS herhangi bir organı etkileyebilirse de akciğer en çok tutulan organdır ve bu konuda sık olarak çalışılmıştır (25,51,105).

XOR damar yatağındaki tek ROT oluşum kaynağı değildir. Nötrofillerin içerdiği NAD(P)H oksidaz enzimi hem süperoksitin hem de hipoklöröz asitin (HOCl) zengin bir kaynağını teşkil eder (74,82). Nötrofillerin vasküler endotel ile etkileşimi nötrofillerin "rolling"i (yuvarlanma), adezyonu (yapışma), transendotelial migrasyonu (göçü) biçiminde kompleks bir seri olayı içerir. Bu olay bir grup hücre adezyon molekülleri (CAM) aracılığıyla düzenlenir (50,81). IR hasarında nötrofillerin belirgin yıkıcı potansiyeli göz önünde bulundurulursa, XOR enziminin oluşturduğu ROT'leri primer doku hasarı etkeni olmaktan çok nötrofil adezyonunun düzenleyicisi olarak görülmeye başlanmıştır (21,82). XOR'ın oluşturduğu ROT'nin ve diğer proinflamatuvar maddelerin, özellikle nötrofil adezyonunun erken evrelerinde, hücresel adezyon moleküllerinin up-regülasyonunda rolü vardır (25,72,82). Bundan sonra da nötrofil adezyonunu takip eden bir seri kompleks zincir reaksiyonları meydana gelir (Şekil 13).



Şekil 13 XO'nun lökosit-endothel hücre etkileşimindeki olası etki mekanizması

(NFκB: Nükleer faktör kappa B, VCAM-1: Vasküler hücre adezyon molekülü-1, ICAM-1: İntersellüler adezyon molekülü-1, LTB₄: Lökotrien B₄, PAF: Platelet aktive edici faktör, TNF-α: Tümör nekroze edici faktör-α, NO: Nitrik oksit, eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz)

Mikrovasküler disfonksiyonda ROT'nin rolüne ilişkin başka bir mekanizma süperoksit ile hızlı reaksiyona giren NO'nin inaktive olması ve vazodilatör etkinliğini kaybetmesidir (16,25,50). Bu süreçte diğer vasküler kaynaklı NAD(P)H oksidazların oluşturduğu ROT'leri kadar nötrofillerden kaynaklanan ROT de önemlidir (2,135). NAD(P)H oksidaz'a yönelmiş olan ilgiye karşın, NO aktivitesinin kaybında XOR'ın rolüne ilişkin birçok örnek de bulunmaktadır. Spontan hipertansif olan ratlarda XOR inhibitörlerine ve SOD'a cevap olarak kan basınçlarının düştüğü gösterilmiştir (99,107). Bu hayvanlarda yapılan XOR inhibisyonu mikrosirkülasyonda artmış olan ROT üretimini de azaltır (136). Hiperkolesterolemik tavşanlarda XOR inhibitörlerinin kullanılması vasküler yapılarda artmış olan süperoksit üretimini normale döndürür ve bozulmuş olan asetilkolin-bağımlı damar gevşemesini kısmen düzeltir (112,153).

XOR enziminin spesifik inhibitörleri aynı zamanda bu enzimin insan damar yatağında süperoksit üretiminde önemli bir kaynak olduğunu göstermek (17), hiperkolesterolemik bireylerde bozulmuş olan vazodilatasyonu düzeltmek (26) ve idiyopatik dilate kardiyomiyopatide miyokard fonksiyonunu iyileştirmek amacıyla (24) da kullanılmıştır. Ancak burada unutulmaması gereken bir konu vardır; bu çalışmalarda kullanılan enzim inhibitörlerinin hepsi Mo-co bölgesine spesifiktir. XOR enzimi NAD(P)H oksidaz aktivitesini ise FAD bölgesinden göstermektedir ve bu bölgeye spesifik inhibitörleri bulunmamaktadır. Bu nedenle, endotelial disfonksiyonda XOR'ın rolünü tam olarak anlamak mümkün olmayabilir.

XOR enziminin kendisinin de NO üretebildiğinin gösterilmesi bu enzimin vasküler fonksiyonuna ilişkin değerlendirmelere yeni bir bakış açısı getirmiştir. XOR, NO sentaz enziminin aksine, anoksik koşullarda NO üretebilir (46) ve yine benzer koşullarda NO tarafından inaktive edilebilir (73). Buna göre, iskemide NO sentaz aktivitesi çok düşük iken XOR NO'nun uyardığı vazodilatasyonu düzenleyebilir.

NO ve süperoksitin hızlı etkileşimi sonucu ortaya çıkan ve güçlü ve yıkıcı bir oksidan olan peroksinitrit XOR (45) veya endotelial NO sentaz tarafından (23) üretilir. Bu serbest radikaller artrit, asthma, sepsis, ateroskleroz ve özellikle amiyotrofik lateral skleroz (ALS), Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve multipl skleroz (MS) gibi nörolojik hastalıklar başta olmak üzere birçok patoloji ile ilişkilendirilmiştir (66,133). Ancak dikkat çekici bir konu şudur; genel bir antioksidan olan ürik asit peroksinitritin etkileyici bir temizleyicisidir (133) ve insan ve diğer yüksek primatların plazmalarında relatif olarak yüksek konsantrasyonlarda bulunur (13). Ürik asit merkezi sinir sisteminde, özellikle antioksidan ve anti-radikal özellikleri nedeniyle, yaşlanma, kanser ve oksidatif strese karşı koruyucu olarak düşünülmüştür (13,66).

Dolaşımdaki XOR düzeylerini değerlendiren çalışmalarda, bazı hastalık durumlarında plazmada enzim aktivitelerinin önemli düzeyde arttığına dair genel bir görüş birliği vardır. Bu bağlamda;

1. Karaciğer hastalıkları (Viral hepatitler, erken akut evrede olmak üzere, en fazla artışa neden olan patolojilerdir. Bunun dışında obstrüktif tipte sarılık, kronik hepatit ve sirozda da daha düşük düzeyde olmakla birlikte artışlar bildirilmiştir.) (12,44,123),

2. İnflamatuvar ve otoimmün hastalıklar (romatoid artrit, mikst konnektif doku hastalığı, skleroderma, Behçet hastalığı) (96,131),

3. Ateroskleroz (100),

4. Hipertansiyon (109),
5. Alkolizm (160),
6. Adult respiratuvar distress sendromu (ARDS) (51),
7. Akciğer kanseri (3),
8. Tip II diyabetik hastalarda (30) plazma XOR aktivitelerinin arttığı ve allopurinol uygulamasının diyabetik hastalarda endotelial disfonksiyonu düzelttiği (22) gösterilmiştir.

Sağlıklı bir insan dolaşımında yalnızca XOR enzimi değil, anti-XOR antikorlar da mevcuttur. Öyle ki, anti-XOR IgM antikorları total IgM antikorlarının % 3'ünü oluşturmaktadır. Antikor düzeyleri hem yaşa hem de cinsiyete bağlıdır ve özellikle koroner arter hastalığı olan bireylerde belirgin olarak yüksek saptanmıştır. Bu antikorların aşırı XOR enzimi düzeylerine karşı vücudun doğal bir savunma mekanizması olduğu öne sürülmektedir (15,56).

Elimizdeki tüm bilgiler doğrultusunda şunu söyleyebiliriz: önceleri damar duvarı için potansiyel bir yıkıcı ajan olarak görülen XOR enzimi ilişkili olduğu diğer kompleks metabolik olaylar ve mekanizmalar nedeniyle daha fazla araştırılmayı hak etmektedir.

II.I. XOR ÖLÇÜM METODLARI:

Başta karaciğer ve ince bağırsaklar olmak üzere birçok dokuda bulunan XOR enzimi daha düşük düzeylerde plazmada da saptanır. XOR formlarını ölçmek için birçok metod geliştirilmiştir. Bunlar arasında en sık kullanılanı XOR enziminin ksantin veya hipoksantin ile inkübasyonu sonucu oluşan ürik asit düzeyinin spektrofotometrede 295 nm dalga boyunda (UV bölge) değerlendirilmesine dayanan metodlardır (33,75,120). Enzim düzeylerinin düşük olduğu plazma gibi örneklerde ölçüm yapabilmek için ise daha duyarlı metodlar oluşturulmuştur. Bunların başlıcaları:

1. Radyoizotopik yöntemler (5),
2. Fluorometrik yöntemler (14,53),
3. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (89,110,139,158),
4. Kemilüminesans yöntemler (9,96),
5. ELISA (11)'dir.

Bunların dışında enzimatik kolorimetrik ölçüm metodları da bildirilmiştir (87,88). Bu yöntemlerin çoğunluğu enzim aktivitesini değerlendirirken, enzim immünoassay metodu hem aktif hem de inaktif XOR proteinini ölçer.

Radyoizotopik yöntemlerde substrat olarak [14-C]-ksantin kullanılıp oluşan [14-C]-ürük asit separe edilerek sintilasyon sayıcı ile ölçülür. Standart XOR solüsyonları ile çizilen kalibrasyon eğrileri ya da [14-C]-ürük asit standart kalibrasyon eğrileri ile enzim aktivitesi hesaplanabilir.

Fluorometrik yöntemler substrat olarak kullanılan “pterin”in (2-amino-4-hidroksipteridin) okside olarak floresans veren bir ürün olan isoksantopterin dönüşmesine dayanır. İsoksantopterin standartları ile çizilen kalibrasyon eğrisine göre enzim aktivitesi hesaplanır. Bu metod ürat oluşumunun ölçüldüğü UV-spektrofotometrik metodlardan 100-500 kat daha hassastır.

HPLC tekniğine dayanan metodlarda ise;

1) Substrat olarak ksantin veya hipoksantin kullanılarak enzimin katalizlediği reaksiyonla ürik asit oluşturulur. Reaksiyon karışımı kolonda separe edildikten sonra ürik asit düzeyleri “UV-visible” detektörler kullanılarak 295 nm’de ölçülür. Hazırlanmış olan ürik asit standartlarından elde edilen kalibrasyon grafiğine göre enzim aktivitesi belirlenir.

2) Pterin substrat olarak kullanılıp enzimin katalizlediği reaksiyonla okside edilip isoksantopterin oluşturulur. Reaksiyon karışımının kromatografik ayırımından sonra floresans detektör ile oluşan isoksantopterin düzeyi ölçülür (eksitasyon dalga boyu: 345 nm, emisyon dalga boyu: 410 nm). İsoksantopterin standartları ile çizilen kalibrasyon eğrisine göre enzim aktivitesi hesaplanır.

3) Oral kafein alımı sonrası idrarda kafein metabolitlerinden, 1-metilksantinden XOR aracılığıyla oluşmuş olan, 1-metil ürik asit (1-U) düzeyi reverse-faz HPLC ile ölçülür. 1-U standart kalibrasyon grafiğinden oluşan ürün miktarı belirlenerek XOR aktivitesi saptanır. İndirekt bir yöntemdir.

Kemilüminesans yöntemlerinde, ksantin veya hipoksantin XOR ile okside edildiği reaksiyon sırasında ortaya çıkan süperoksit radikali luminol veya lusigenin gibi maddelerle reaksiyona sokularak luminesans oluşturulur ve kemilüminometre ile bu ölçülür. Pürifiye XOR ile hazırlanan kalibrasyon grafiklerine göre enzim aktivitesi hesaplanabilir.

XOR ölçümü için kullanılan ELISA yöntemi ise kompetitif (yarışmalı) bir ELISA metodudur. Reaksiyon oluşturacak enzim olarak alkalen fosfataz, antikor olarak pürifiye tavşan anti-XOR antikorları kullanılır. Reaksiyon sonucu oluşan renk değişimi 405 nm’de “micro-plate reader”de okunur. Değişik miktarlarda pürifiye XOR enzimi ve pürifiye tavşan anti-XOR serumu kullanılarak hazırlanan standart “competition (yarışma)” eğrisine göre XOR enzim miktarları hesaplanır.

XOR aktivitesini ölçen metodların kullanılması ile sağlıklı insanların plazmalarında saptanan değerler 0-4200 mU/L arasında değişmektedir (1mU= dakikada ksantin substratından 1nmol ürat oluşturan ya da pterin substratından 1 nmol isoksantopterin oluşturan enzim aktivitesi). Çalışmalar arasında saptanan dikkat çekici aktivite farklılıkları reaksiyon koşulları ve inkübasyon periyotları arası farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir.

II.J. ERKEK HİPOGONADİZMİ:

Hipogonadizm, gonadal fonksiyonların yetersizliği olarak tanımlanır. Gametogeneziste, gonadal hormonların sekresyonunda veya bunların her ikisinde eksiklik sonucu ortaya çıkabilir. En yaygın testiküler fonksiyon bozukluğudur.

Hipogonadizm hipotalamik ya da hipofizer düzeyde bir bozukluk sonucu ortaya çıkarsa hipogonadotropik hipogonadizm (sekonder hipogonadizm), testiküler

fonksiyon bozukluğu sonucu oluşursa hipergonadotropik hipogonadizm (primer hipogonadizm) olarak isimlendirilir. Erkek hipogonadizmi aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir (118):

A. Primer Hipogonadizm

- * Klinefelter sendromu
- * XX erkek
- * XY/XO mikst gonadal disgenezi
- * XYY sendromu
- * Ulrich-Noonan sendromu
- * Miyotonik distrofi
- * Sertoli cell only sendromu
- * Fonksiyonel prepubertal kastrasyon sendromu
- * Testosteron biyosentezini içeren enzimatik defektler
- * 5- α redüktaz eksikliği
- * LH/gonadotropin rezistans testis
- * Persistan mullerian kanal sendromu
- * Androjen reseptör defektlerini içeren erkek pseudohermafroditizmi
- * Testiküler feminizasyon
- * Orşit
- * Kriptorşidizm
- * Lepra
- * Testiküler travma, irradiasyon
- * Otoimmün testiküler yanıtsızlık
- * Kemoterapi

B. Sekonder Hipogonadizm

- ✧ Hipogonadotropik hipogonadizm
- ✧ İzole LH veya FSH eksikliği
- ✧ Edinsel gonadotropin yetersizliği
- ✧ Prolaktin sekrete eden tümörler
- ✧ Ciddi sistemik hastalıklar
- ✧ Üremi
- ✧ Hemokromatozis

C. Kombine Primer ve Sekonder Nedenler:

- ✧ Yaşlılık
- ✧ Karaciğer sirozu
- ✧ Orak hücreli anemi

Hipogonadizm testosteron eksikliği ve infertilite ile karakterizedir. Semptomları hastalığın çıkış zamanına bağlıdır. Puberteden önce gelişirse testis, fallus ve prostat küçüklüğü, pubik ve aksiller kıllanmanın olmaması, orantısız uzun kol ve bacaklar, erkek adele yapısının gelişmemesi, jinekomasti, yüksek perdeli ses, libido azalması, kemik yapısının geri kalması, skrotal pigmentasyon ve kırışıklığın olmaması, başlıca kalça, yüz ve göğüs üzerinde lokalize yağ dağılımı izlenir. Postpubertal olarak oluşursa normal iskelet oranları, libido kaybı, impotans, kas kütlesi ve gücünde progresif azalma, aksiller ve pubik kılların azalması, normal ses, agresivitede azalma, normal boyda penis, testislerde yumuşama ve volümünün azalması, oligospermi-azospermi gibi bulgular gözlenir.

Anamnezde libido kaybı, impotans, ejakülat volümü düşüklüğü, ailede benzer vakaların varlığı, hiposmi, anosmi, orta hat deformiteleri, kriptorşidizm, testis travması, radyasyon, kemoterapi ve toksinlere maruz kalma, enfeksiyonlar (orşit vb.) sorgulanır.

Fizik muayenede iskelet yapı oranları, kas kütlesi ve gücü, testis, prostat ve penis ölçüleri, jinekomasti, galaktore, kıllanma değerlendirmesi yapılmalıdır.

Laboratuvar değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Yapılması gereken başlıca laboratuvar testleri şunlardır:

1. Testosteron ölçümü: Eşik, kritik testtir. Diürinal salınım ritmi nedeniyle pik yaptığı sabahın erken saatlerinde örnek alınmalıdır. Testosteronun % 2'si serbest, % 30'u seks hormonu bağlayıcı globuline (SHBG), % 65-70'i de gevşek olarak albümine bağlı bulunur. Hipertiroidi, karaciğer hastalığı, östrojen fazlalığı ve yaşlılık gibi SHBG'i artıran durumlarda total testosteron normal veya sınırda düşük ise birlikte serbest testosteron ve SHBG bakılmalıdır. Zira total testosteron normal iken serbest testosteron düşük olabilir. Hipotiroidi, obezite, akromegali gibi durumlarda ise tersi söz konusudur. SHBG düzeyleri bu hastalıklarda azaldığı için serbest testosteron normal iken total testosteron düşük bulunabilir (34). Bu nedenle yanılgıdan kurtulmak için "Serbest Testosteron İndeksi (Total testosteron (nM)/SHBG (nM))" kullanılabilir (54).

2. Gonadotropinler: Hipogonadizm vakalarının primer veya sekonder olarak ayırımını yapmak için ölçülür.

Primer hipogonadizmde testosteron düşük, gonadotropinler artmıştır. Sekonder hipogonadizmde ise hem testosteron hem de gonadotropinler düşüktür.

3. Dinamik testler: Primer veya sekonder hipogonadizm ayırımının net yapılamadığı durumlarda uygulanırlar. Başlıcaları GnRH ve hCG stimülasyon testleridir.

a) GnRH stimülasyon testi: Hipotalamik veya hipofizer hastalığın ayırımında kullanılır. 100 µg IV GnRH yapılarak uygulanır. Test sonrası 30-45 dakikada LH'da

3-6 kat, FSH'da ise % 20-50'lik bir artış olması beklenir. Hipofizer patolojilerde beklenen artış olmaz.

b) hCG stimölasyon testi: Primer veya sekonder hipogonadizm ayırımında faydalıdır. Değişik protokoller ile yapılabilir. Genelde 2000 U hCG dört gün IM yapılır. Normal yanıt bazal testosteron değerinin üzerinde en az 200 ng/dL ya da iki katı bir testosteron artışı olmasıdır. Primer hipogonadizmde yanıt yoktur (8).

4. Prolaktin düzeyi: Prolaktinoma tanısı için kullanılır.

5. Semen analizi: Fertilite potansiyelini ortaya koyar.

6. Kemik dansitometresi: Osteopeni veya osteoporozu ortaya çıkarmak, tedavinin etkinliğini değerlendirmek için yapılır.

7. Hipofiz MR: Hipotalamo-hipofizer bölgedeki lezyonları saptamak için kullanılır.

8. Genetik çalışmalar: Genetik bir hastalık düşünülen hipogonadizmli erkeklerde karyotip çalışması yapılmalıdır.

9. Testis biyopsisi ve skrotal eksplorasyon.

10. Testis USG: Testis volümünün hassas takibine olanak sağlar. Testiküler veya skrotal kitlelerin varlığını saptamaya yardımcı olur.

Tedavide hedef seksüel fonksiyon, libido, sağlık durumu ve davranışların iyileştirilmesi, virilizasyon sağlanması ve sürdürülmesi, kemik dansitesini artırmak ve osteoporozu önlemek, gelecekteki kardiyovasküler hastalık riskini azaltmak ve fertilitiyi sağlamaktır. Bu amaçla testosteron, GnRH veya gonadotropinlerle tedavi protokolleri oluşturulmuştur. Ayrıca, altta yatan spesifik patolojilere yönelik tedaviler de yapılır.

II.K. ÇALIŞMANIN AMACI:

Bu çalışmanın amacı;

1. Pürin metabolizmasındaki bazı defektlerle ve birçok patofizyolojik süreçle doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olan XOR enziminin XO formunu plazmada veya diğer örneklerde hassas ve doğru biçimde ölçebilecek bir metodu optimize ederek kliniğimizde rutin çalışılır hale getirmek, normal değerleri belirlemek, yaşa ve cinsiyete göre değişimleri saptamak,

2. İnsan erkek hipogonadizm hastalık modelini kullanarak testosteronun plazma XOR enzim aktivitesi üzerine etkisini saptamak ve bu enzimin aktivitesi açısından seks farklılıklarına açıklık getirmektir.



III. GEREÇ VE YÖNTEM

III.A.ÇALIŞMA GRUBU

III.A.1.GRUPLARIN SEÇİLMESİ: Hasta grubu olarak 2003 yılında GATA Endokrinoloji kliniğinde yatmakta olan 18-24 yaş arası, henüz herhangi bir tıbbi müdahale almamış 24 erkek hipogonadotropik hipogonad hasta kullanıldı. Kontrol grubu olarak belirli bir rahatsızlığı olmayan ve check-up amacı ile polikliniklere başvuran ya da GATA'da çalışmakta olan 15-75 yaş arası 108 (67 erkek, 41 kadın) kişi çalışmaya alındı. Tüm denekler gönüllülük esasına göre çalışmaya dahil edildi. Çalışma öncesi ve sırasında diyabet, hipertansiyon, iskemik kalp hastalığı, karaciğer hastalığı, hiperlipidemi, intestinal patolojisi olduğu saptanan veya düşünülen hastalar çalışma harici tutuldu.

III.A.2.UYGULANAN İŞLEMLER: Deneklerden ilk değerlendirmede anamnez alındı. Ad-soyad, cinsiyet, yaş, öz geçmişi, aile hikayesi, mevcut hastalıkları, kullandığı ilaçlar, adres ve telefon bilgileri soruldu. Tansiyon arteriyel ölçüldü. En az 8 saatlik açlık kriterlerine uymak kaydıyla EDTA içeren mor kapaklı tüpe ksantin oksidaz ve tam kan ölçümü için, sitratlı siyah kapaklı sedimentasyon tüplerine eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ölçümü için ve kırmızı kapaklı düz tüpe ise rutin biyokimya testleri ve testosteron ölçümü için kan alındı. Ksantin oksidaz için alınan EDTA'lı kan derhal + 4 °C'de 1700 g'de 10 dakika santrifüje edildi, alikotlara ayrılıp plastik tüpler içinde derin dondurucuda - 80 °C'de ölçüm zamanına kadar saklandı. Kırmızı kapaklı tüplere alınan kan örnekleri de bekletilmeden 5000 rpm'de 5 dakika çevrilerek serumları ayrıldı. Serumlar alikotlara ayrılıp rutin biyokimya analizleri ve total testosteron testleri için ilgili birimlere iletildi. Tüm deneklerin tam kan sayımı, ESR ve rutin biyokimya analizleri ile 24 hipogonad ve bunların kontrolü olarak kullanılan aynı yaş grubundan 25 sağlıklı erkeğin total testosteron testleri ilgili birimlerde aynı gün çalışıldı.

III.B.TESTLER VE LABORATUVAR MALZEMELERİ

Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

* Glukoz ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, Wendenstraße, Hamburg, Almanya)

- * Üre ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Kreatinin ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Kolesterol ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Trigliserit ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * HDL-Kolesterol ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Ürik asit ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * AST ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * ALT ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * ALP ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * CK ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * LDH ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Total protein ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Albümin ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Total bilirübin ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Direk bilirübin ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Sodyum-potasyum ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Amilaz ölçüm kiti (Olympus Diagnostica GmbH, WendenstraBe, Hamburg, Almanya)
- * Pterin (Fluka Biochemika, İsviçre)
- * İsoksantopterin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Almanya)
- * Tris (Merck, Darmstadt, Almanya)
- * Potasyum dihidrojenfosfat (Merck, Darmstadt, Almanya)
- * Dipotasyum hidrojenfosfat (Merck, Darmstadt, Almanya)
- * Perklorik asit (HClO₄) (Merck, Darmstadt, Almanya)
- * Ortofosforik asit (Merck, Darmstadt, Almanya)

- * Hidroklorik asit (HCl) (Merck, Darmstadt, Almanya)
- * Potasyum karbonat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Almanya)
- * Millex GV filtre (0,2 µm sellüloz filtre, Hewlett Packard, Almanya)
- * Eppendorf tüpleri (0,5 mL ve 1,5 mL)
- * HPLC kolonu (Phenomenex 5 C18 Hypersil 150x4,6 mm, CA, ABD)
- * HPLC guard kolonu (Phenomenex Security guard guard cartridge kit, CA, ABD)

Kullanılan Cihazlar

- * Olympus AU 600 analizör (Olympus Optical Co. Ltd., Shizuoka-ken, Japonya)
- * HPLC (HP 1050 Serisi HPLC cihazı , Agilent 1100 serisi floresans detektörü, ABD)
- * Su banyosu (Nüve BM 402, Türkiye)
- * Soğutmalı santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5403, Eppendorf -Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Almanya)
- * Elektrikli hassas terazi (H-20, Metler, İsviçre)
- * Elektronik terazi (Mark 420, EiB, İtalya)
- * Derin dondurucu -80 °C (UF 401, Electrolux Medical Refrigerator, Lüksemburg)
- * Derin dondurucu -20 °C (Uğur, Türkiye)
- * pH-metre (MP 220 pH Meter, Mettler-Toledo GmbH, İsviçre)
- * Ultrapür su distilasyon cihazı (Elgastat UHQ MKII, Elga, İngiltere)
- * Ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Almanya)
- * Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- * Manyetik karıştırıcı (Tulova 7, Thermolyne, Iowa, ABD)
- * ACS: Centaur Otomatize Kemilüminesans Sistemi (Chiron Diagnostics, ABD)
- * Advia 60 CS tam kan sayım cihazı (Bayer, Fransa)
- * Santrifüj (Labofuge 200, Heraeus Instruments, Osterode, Almanya)

III.B.1. PLAZMA KSANTİN OKSİDAZ AKTİVİTESİ: Yamamoto ve ark.'nın (158) floresans dedektörlü HPLC metodu kullanılarak çalışılmıştır.

Reaktiflerin Hazırlanması:

1. Pterin reaktif solüsyonu: 0.2 M pH: 9.0 Tris-HCl tampon içerisinde 3.69 mg pterin çözülerek 113 µM pterin reaktif solüsyonu hazırlanmıştır. Solüsyonun uzun süre beklemesi durumunda pterin isoksantopterine spontan okside olduğundan taze hazırlanıp koyu renkli cam şişeye konularak en kısa zamanda kullanılacak şekilde buzdolabında muhafaza edilmiştir.

2. Perklorik asit solüsyonu (% 4'lük): % 70'lik hazır perklorik asitten 4 mL alınıp bidistile su ile 70 mL'ye tamamlanarak hazırlanan solüsyon cam şişede muhafaza edilmiştir.

3. Potasyum karbonat solüsyonu (K_2CO_3 , 5 M): 3.46 g potasyum karbonat 5 mL bidistile suda çözülmüştür. Tamamen çözünme olmadığı için solüsyon daha sonra 0.2 µm'lik filtreden geçirilip plastik tüpte saklanmıştır.

4. Mobil faz: 20 mM potasyum fosfat tampon (pH: 2.2) hazırlamak için 2.45 g potasyum dihidrojen fosfat ve 0.35 g dipotasyum hidrojen fosfat 950 mL bidistile suda çözüldükten sonra orto-fosforik asit ile pH 2.2'ye ayarlanıp volüm bidistile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Mobil faz 0.45 µm'lik filtreden geçirilip ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir.

5. Standartların hazırlanması: Liyofilize haldeki isoksantopterinden 2 mg alınıp 1 L bidistile suda çözülerek 11167 nM'lık stok standart hazırlanmıştır. Daha sonra 10.167 mL bidistile suya stok standarttan 1 mL eklenerek 1000 nM'lık ilk standart elde edilmiştir. 1000 nM'lık standartın seri dilüsyonları ile sırasıyla 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM, 31.25 nM, 15.6 nM, 7.8 nM, 3.9 nM, 1.95 nM ve 0.975 nM'lık standartlar oluşturulmuştur. Bu standartlar her çalışma için stok standarttan yeniden hazırlanmıştır.

Örnek Hazırlanması ve Enzim Reaksiyonu:

Deneklerden alındıktan sonra hızla + 4 °C'de 1700 g'de 10 dakika çevrilerek ayrılıp - 80 °C'de saklanan EDTA'lı plazmalar çalışma günü sabah derin dondurucudan çıkarılıp erimeye bırakılmış, erime tamamlandıktan sonra vortekslenerek homojen hale getirilmiştir. 1.5 mL'lik eppendorf tüplerine pterin reaktif solüsyonundan 200 µL eklenip 5 dakika 37 °C'de preinkübasyon yapıldıktan sonra tüplere 50'şer µL hasta plazmaları pipetlenmiştir. Tüpler vortekslenerek karışım homojen hale getirilmiş ve 37 °C'de 240 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra bu tüplere 250 µL perklorik asit solüsyonundan eklenip vortekslenmiştir. Karışıma son olarak 20 µL potasyum karbonat solüsyonundan eklenmiş ve nötralize edilen örnekler 15000 rpm'de 5 dakika çevirilerek süpernatantlardan 100'er µL 0.5 mL'lik eppendorf tüplerine ölçüm için alınmıştır. HPLC cihazının otomatik örnekleyicisi 34 vial aldığı için kalan örnekler ölçüm zamanına kadar - 20 °C'de saklanmış ve cihaza yüklenmeden 15 dakika önce çözülüp vortekslenildikten sonra ölçüm için yerleştirilmiştir.

HPLC koşulları aşağıdaki gibidir:

1. Mobil faz 20 mM potasyum fosfat tampon, pH: 2.2,
2. Akım hızı 1 mL/dakika,
3. Örnek miktarı 20 µL,
4. Eksitasyon dalga boyu 345 nm, emisyon dalga boyu 410 nm,
5. Kolon Phenomenex 5 C18 Hypersil kolon (150x4.6 mm), pre-kolon Phenomenex guard cartridge kit.

Çalışma sırasında örneklerde ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyon sonucu pterinin oksidasyonu ile oluşan isoksantopterin konsantrasyonları bu ürünün pik alanlarının isoksantopterin standartlarının alan-konsantrasyon kalibrasyon eğrisinden elde edilen formüle yerleştirilmesiyle hesaplanmıştır. 1 L'de 1mU enzim aktivitesi 37 °C'de 1 dakikada 1 nM isoksantopterin oluşturan enzim aktivitesi olarak tanımlanmış ve buna göre enzim aktiviteleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Örnekteki Enzim Aktivitesi (mU/L)} = (\text{İsoksantopterin Konsantrasyonu} \times 10) / 240$$

10: Örneğin dilüsyon katsayısı

240: Örnek inkübasyon süresi (dakika olarak)

Deneklerin plazma örnekleri çalışılmadan önce metodun performansını değerlendirmek için lineerite, gün-içi ve günler arası tekrarlanabilirlik ve verim çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca plazma ksantin oksidaz aktivitesi yüksek beklenen hasta plazmaları (diyabet, hiperlipidemi-karaciğer hastalığı mevcut hasta örnekleri) da çalışılarak metodun işlerliği net olarak ortaya konulmuştur.

Lineerite değerlendirmesi isoksantopterin standartları çalışılıp kalibrasyon grafiği çizilerek yapılmıştır. Bu çalışma sırasında saptanan "signal noise" değerlerine göre saptanabilen en düşük isoksantopterin konsantrasyonu (lower detection limit) ve doğru hesaplanabilen en düşük isoksantopterin konsantrasyonu (lower quantification limit) belirlenmiştir.

Gün-içi ve günler-arası tekrarlanabilirliği değerlendirmek için bir plazma havuzu oluşturulup örnek hazırlandıktan sonra 0.5 mL'lik eppendorf tüplerine alikotlar

halinde ayrılmış ve ilk gün dört tekrar çalışma yapılmıştır. Daha sonra takip eden her gün birer örnek verilerek dört gün çalışma tekrarlanmıştır. Her çalışma gününde standartlar da tekrar çalışılmıştır. En son olarak enzim aktiviteleri hesaplanmış ve CV değerleri belirlenmiştir.

Verim çalışması için yine bir plazma havuzu oluşturularak bundan örnek hazırlanmıştır. Alınan örnek porsiyonlarına, daha önce hazırlanmış isoksantopterin standartlarından, sırasıyla 15.6 nM, 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM final konsantrasyonunda olacak şekilde isoksantopterin ve bir porsiyona da bunlarla aynı volümde bidistile su eklenmiştir. Elde edilen son karışımlardaki isoksantopterin piklerinin net alanları, isoksantopterin standart kalibrasyon eğrisi oluşturmak için çalışılan standartların pik alanları ile karşılaştırılmış ve verimler hesaplanmıştır.

En son olarak, sağlıklı kontroller ve hipogonadizm hastalarının plazmalarından örnekler hazırlanıp standartlarla birlikte çalışılmış ve enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Bu çalışmalar ile 108 sağlıklı birey kullanılarak plazma ksantin oksidaz aktivitesinin normal değerleri saptanmıştır.

III.B.2. RUTİN BİYOKİMYA ANALİZLERİ: Olympus AU 600 otoanalizörde aynı firmanın kitleri ile çalışılmıştır.

III.B.3. TAM KAN SAYIMI: Advia 60 CS tam kan sayım cihazında aynı firmanın kitleri ile ölçülmüştür.

III.B.4. TOTAL TESTOSTERON: ACS: Centaur cihazında kemilüminesans ölçüm metodu ile ölçülmüştür. Erkekler için referans aralık 241-827 ng/dL'dir.

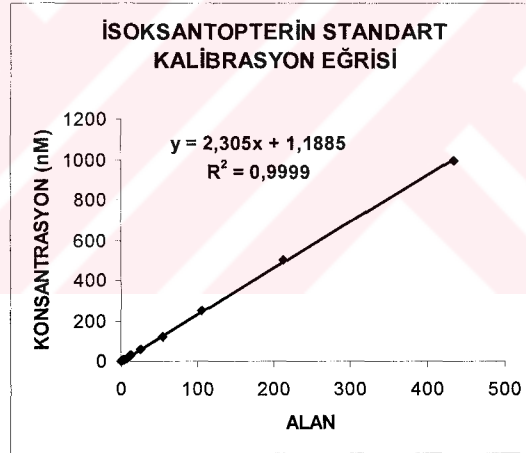
III.C. İSTATİSTİKSEL ANALİZ:

İstatistiksel çalışmalar SPSS 10.0 for Windows programı ile yapılmıştır. Yaş dekatları arası XO enzim aktivitesi açısından farklılık olup olmadığı One-way ANOVA testi ile, yaş- XO arasındaki ilişki (her iki cinsiyet için) korelasyon analizi ile, erkek ve kadın cinsiyetleri arasındaki XO aktivitesi farklılığı olup olmadığı “independent samples t-testi” ile, hipogonadizm ve kontrol gruplarının total testosteron, ürik asit ve XO aktiviteleri yönünden karşılaştırması t-testi ile değerlendirilmiştir.

IV. BULGULAR

Plazma ksantin oksidaz aktivitesini ölçmek için HPLC metodu kurulduktan sonra performans çalışmaları yapıldı. Pterin için retansiyon zamanı 6.6 dakika, isoksantopterin için ise 8.4 dakika idi.

Lineerite çalışması isoksantopterin standartları kullanılarak yapıldı ve isoksantopterin pik alanları ile konsantrasyonları arasındaki korelasyonu gösteren kalibrasyon grafiği çizildiğinde metodun 1000 nM'a kadar lineer olduğu belirlendi (Şekil 14). Regresyon eğrisinin formülü $y=2,305x+1,1885$ ve korelasyon katsayısı $r=0,9999$ idi. (x isoksantopterin pik alanı, y isoksantopterin konsantrasyonudur.) HPLC sistemimizde belirlediğimiz "signal noise" değerleri hesaplandığında saptanabilir en düşük isoksantopterin konsantrasyonu (lower detection limit) signal noise=3 olan 0,79 nM, doğru hesaplanabilir en düşük konsantrasyon (lower quantification limit) ise signal noise=10 olan 2,64 nM isoksantopterin idi.



Şekil 14 İsoksantopterin standartlarının pik alanı-konsantrasyon kalibrasyon eğrisi

Bir plazma örneği ile yapılan gün-içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında CV değerleri sırasıyla % 0,99 ve % 2,95 olarak belirlendi (Tablo-II).

Tablo II: Tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları

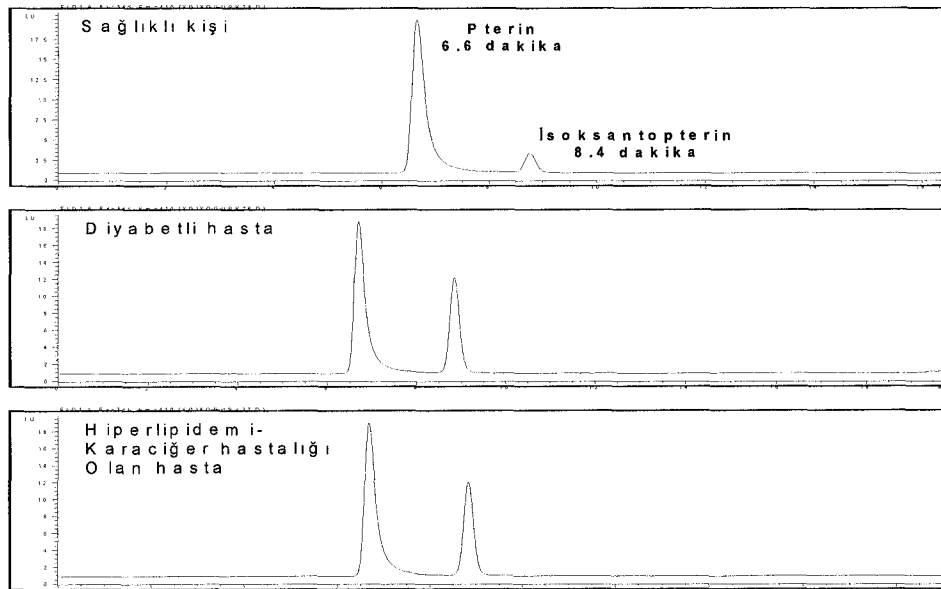
	I. ÖLÇÜM (mU/L)	II. ÖLÇÜM (mU/L)	III. ÖLÇÜM (mU/L)	IV. ÖLÇÜM (mU/L)	%CV
GÜN İÇİ	2,00	2,05	2,02	2,03	0,99
GÜNLER ARASI	2,00	1,98	2,00	1,88	2,95

Bir plazma havuzundan hazırlanmış örneğin porsiyonlarına sırasıyla 15.6 nM, 31.25 nM, 62.5 nM, 125 nM final konsantrasyonunda olacak şekilde isoksantopterin ve bir porsiyona da bidistile su eklenmesiyle elde edilen karışımlardaki isoksantopterin piklerinin alanları, isoksantopterin standart kalibrasyon eğrisi oluşturmak için çalışılan standartların pik alanları ile karşılaştırılıp verimler hesaplandı; ortalama verim % 103 olarak saptandı (Tablo III).

Tablo-III: Verim çalışması sonuçları

ÖRNEK	VERİM (%)
PLAZMA+0	*
PLAZMA+15,6	100,6
PLAZMA+31,25	105,9
PLAZMA+62,5	104,7
PLAZMA+125	100,6
ORTALAMA VERİM	103,0

Metodun hem örnek hazırlanması aşamasının hem de HPLC ölçüm basamağının işlerliğini kesin olarak göstermek amacıyla sağlıklı bir bireyden, tip II diyabet ve hiperlipidemi-karaciğer hastalığı olan iki hastadan tam kan örnekleri alındı. Elde edilen EDTA'lı plazma örneklerinde ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyonla isoksantopterin oluşumu belirlendi. Hastalarda isoksantopterin konsantrasyonlarının, dolayısıyla ksantin oksidaz aktivitesinin sağlıklı bireyden belirgin olarak yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 15).



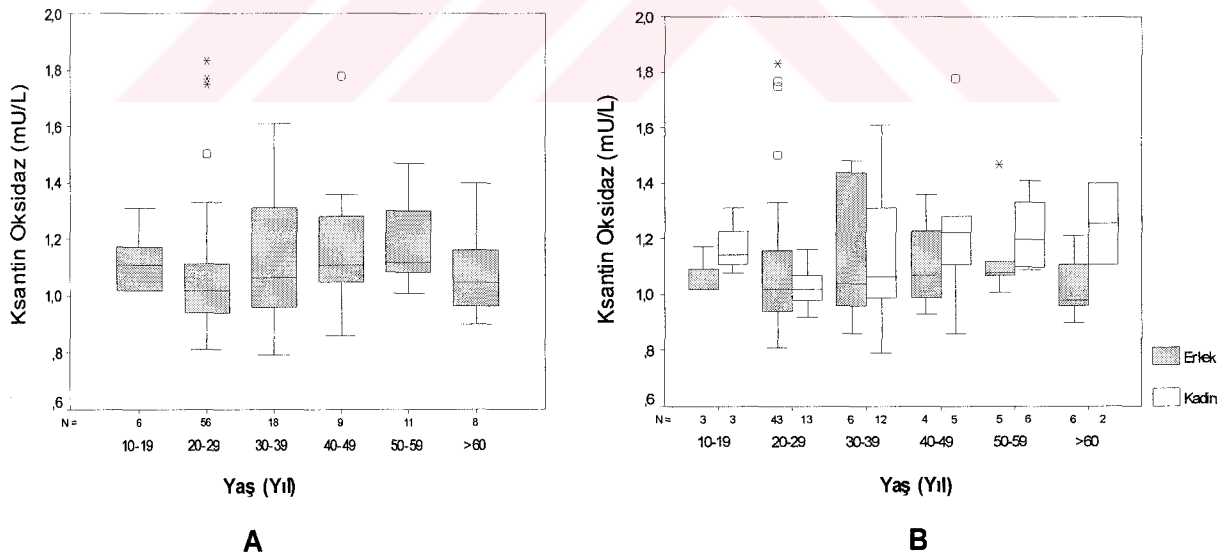
Şekil 15 Normal ve anormal plazma örneklerinin piklerinin karşılaştırması

Performans çalışmalarını takiben öncelikle sağlıklı bireylerden alınan plazma örnekleri çalışıldı ve plazma ksantin oksidaz aktivitesinin normal değerleri saptandı. Sağlıklı bireylerin bütünü için, erkekler ve kadınlar için ayrı ayrı ortalamalar ve % 95 CI değerleri belirlendi (Tablo-IV). Plazma ksantin oksidaz aktivitesi açısından erkek ve kadınlar arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=0,496$).

Tablo-IV: Plazma XO aktivitesi için normal değerler

	Denek Sayısı (n)	Ortalama $\pm$ SD (mU/L)	% 95 CI (mU/L)	p
Erkek	67	1,11 $\pm$ 0,25	1,05-1,17	0,496
Kadın	41	1,14 $\pm$ 0,20	1,07-1,20	
Toplam	108	1,12 $\pm$ 0,23	1,07-1,16	

Sağlıklı bireyler bütün olarak ele alındığında, yaş ile plazma XO aktivitesi arasında bir korelasyon görülmedi ($r=0,075$, $p=0,438$). Bireyler yaşlarına göre dekatlara ayrılarak incelendiği zaman dekatlar arası enzim aktivitesi açısından anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,721$) (Şekil 16-A).



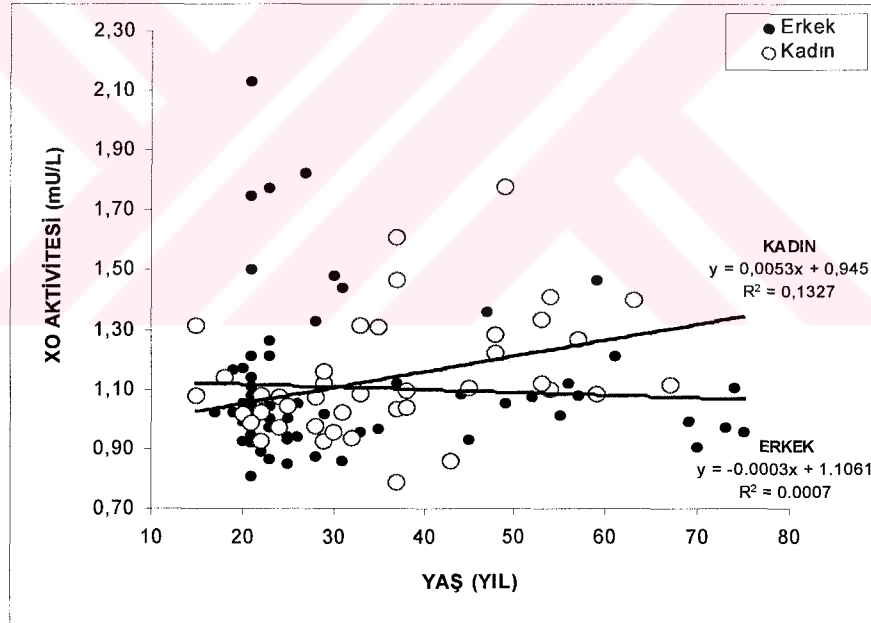
Şekil 16 Dekatlara göre plazma XO aktivitesi değişimi (A. Bütün denekler, B. Cinsiyete göre değişim)

Dekatlara göre plazma ksantin oksidaz aktivitesinin ortalama, minimum, maksimum, % 5-95 aralık değerleri Tablo-V'de verildi.

Tablo-V: Dekatlara göre plazma XO aktivitesi değerleri

DEKATLAR (YIL)	DENEK SAYISI (N)	ORTALAMA $\pm$ SD (mU/L)	MİNİMUM DEĞER (mU/L)	MAKSİMUM DEĞER (mU/L)	% 5 - 95 ARALIĞI DEĞERLERİ (mU/L)
10-19	6	1,12 $\pm$ 0,11	1,02	1,31	1,02-1,31
20-29	56	1,09 $\pm$ 0,25	0,81	2,13	0,86-1,78
30-39	18	1,14 $\pm$ 0,24	0,79	1,61	0,79-1,61
40-49	9	1,19 $\pm$ 0,27	0,86	1,78	0,86-1,78
50-59	11	1,19 $\pm$ 0,16	1,01	1,47	1,01-1,47
> 60	8	1,08 $\pm$ 0,16	0,90	1,40	0,90-1,40

Erkek ve kadın denekler ayrı ayrı ele alındığında ise, erkeklerde yaş ile enzim aktivitelerinde anlamlı bir değişim görülmez iken ($r=-0,058$, $p=0,641$) kadınlarda artan yaş ile birlikte plazma XO aktivitesinin anlamlı olarak arttığı görüldü ($r=0,368$, $p=0,018$) (Şekil 16-B, Şekil 17).



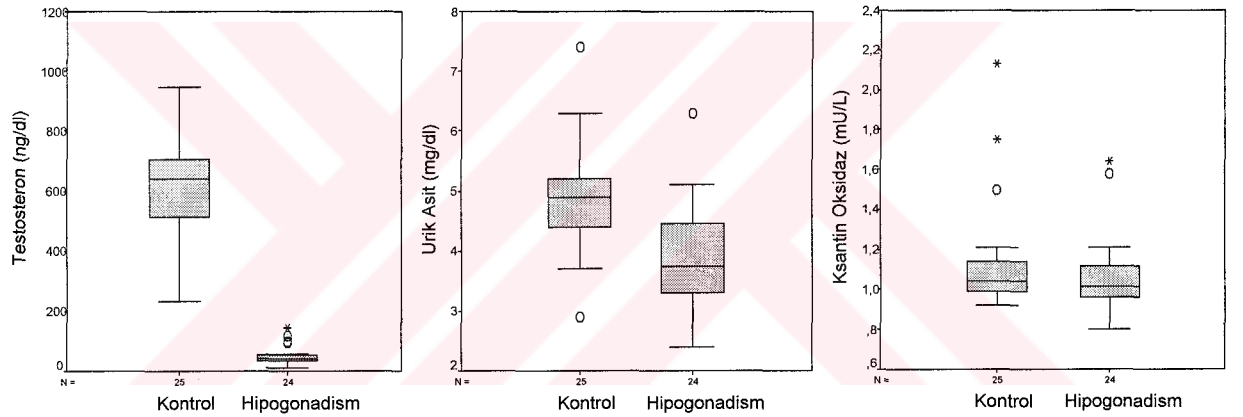
Şekil 17 Erkek ve kadınlar için yaş ile XO aktivitesinin değişim grafiği

Son olarak, benzer yaş ortalamalarına sahip hipogonadotropik hipogonadizimli 24 erkek hasta ve 25 sağlıklı erkek kontrol deneğinin plazma XO aktiviteleri, serum ürik asit düzeyleri ve total testosteron seviyeleri değerlendirildi (Tablo-VI, Şekil 18). Hipogonadizimli hastaların total testosteron düzeyleri ve ürik asit seviyeleri kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,001$) iken plazma

ksantin oksidaz aktiviteleri açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0,398$).

Tablo-VI: Hipogonadizm hastaları ve sağlıklı kontrol grubu total testosteron, serum ürik asit ve plazma XO değerlerinin karşılaştırması

	KONTROL GRUBU (n=25)	HİPOGONADİZMLİ HASTALAR (n=24)	p
Yaş (yıl)	21,8 ± 1,6	20,8 ± 1,3	0,054
Total Testosteron (ng/dL)	600,9 ± 178,5	50,67 ± 32,6	< 0,001
Ürik Asit (mg/dL)	4,88 ± 0,89	3,96 ± 0,85	0,001
Plazma XO Aktivitesi (mU/L)	1,13 ± 0,28	1,07 ± 0,19	0,398



Şekil 18 Hipogonadizm ve kontrol gruplarının serum total testosteron, ürik asit düzeyleri ve plazma XO aktivitelerinin karşılaştırma grafiği

V. TARTIŞMA VE SONUÇ

XOR enzimi pürifiye edilen ilk flavoproteinlerden birisidir; aynı zamanda, molibden içerdiği bulunan ilk memeli enzimidir. Bu enzimin organizmadaki başlıca işlevleri pürin yıkımının son iki basamağında hipoksantinine ksantine, ksantinine ürik asite dönüşümünün katalizlenmesi, NADH oksidaz aktivitesi göstermesi (121), ince bağırsakta demir absorpsiyonunun ve karaciğerde demir mobilizasyonunun düzenlenmesi (144,145), çok sayıda N-heterosiklik ve aldehit substratların, piridinlerin, pteridinlerin hidroksilasyonunun katalizlenmesi (80), nitratların nitritlere ve nitrik okside (NO) indirgenmesinin katalizlenmesi (46), sülfidril gruplarının oksidasyonunun katalizlenmesi, iyodid ile proteinlerin iyodinasyonunun katalizlenmesi (40), mikrobisidal aktivite göstermesi (49,146), ilaç metabolizması (organik nitratların inorganik nitrite ve nitrik okside indirgenmesi, kafeinin metabolize edilmesi) (35,98) olarak sıralanabilir.

XOR, hereditör ksantinüri, hiperürisemi-gut, iskemi-reperfüzyon injürisi ile ilişkilidir. Ayrıca plazma XOR aktivitesinin karaciğer hastalıkları (12,44,123), inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar (96,131), ateroskleroz (100), hipertansiyon (109), alkolizm (160), adult respiratuvar distress sendromu (ARDS) (51), akciğer kanseri (3), tip II diyabetik hastalarda (30) arttığı da gösterilmiştir.

Böylesine önemli bir enzimin ölçümü için birçok metod geliştirilmiştir. Dokulara göre relatif düşük plazma aktivitelerinin ölçümü için kullanılan başlıca yöntemler radyoizotopik yöntemler (5), fluorometrik yöntemler (14,53), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (89,110,139,158), kemilüminesans yöntemler (9,96) ve ELISA (11) olmuştur. Bunların yanında UV-spektrofotometrik (75,120) veya kolorimetrik metodlar (87,88) da bulunmasına karşın bu yöntemler daha çok yüksek aktivite içeren örneklerin ölçümüne olanak sağlamaktadır.

Yukarıda bahsi geçen metodların büyük kısmı performans değerlendirmelerine (lineerite, tekrarlanabilirlik, verim gibi) yönelik ayrıntılı ve iyi sonuçlar vermemektedir; önemli bir kısmı doku çalışmalarından oluşmaktadır. Oysa, plazmadaki düşük değerleri ölçmek için daha duyarlı ve yüksek performanslı yöntemlere ihtiyaç olduğu aşikardır. Özellikle, bunlardan ELISA ve radyoizotopik yöntemler cihaz veya malzeme temini açısından rutin çalışmalara uygulanabilir değildir. Floresans ve UV-spektrofotometrik yöntemler HPLC ile birleştirilerek diğer metodlara göre daha duyarlı ve nispeten rutin uygulanabilir yöntemler oluşturulmuştur. Ancak, UV-detektörlü

HPLC metodu örnek körü çalışması gerektirmektedir ve iki kat fazla örnek hazırlanması gerektiği için iş yükünü ve maliyeti artırmaktadır. Ayrıca bu yöntemin floresans detektörlü HPLC metodundan daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir (158). Bu çalışmada, hem düşük düzeydeki plazma XOR aktivitelerini hem de daha yüksek aktivite içeren örnekleri kolayca ölçebilecek kadar duyarlı, örnek körü çalışmamızı gerektirmediği için iş gücü kaybını azaltan, maliyeti düşük, reaktifleri kolaylıkla hazırlanabilen, diğer metodlara göre nisbeten daha iyi irdelenerek plazma XO aktivitesini ölçmek için dizayn edilmiş floresans detektörlü HPLC sistemine dayanan Yamamoto ve ark.'nın metodu (158) tercih edilmiştir.

Yamamoto ve arkadaşlarının çalışmasında, bu metodun 250 nM isoksantopterin konsantrasyonuna kadar lineer olduğu, isoksantopterin için alt deteksiyon limitinin 0,01 pmol/L olarak saptandığı, 1-250 nM arası konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar için CV değerinin % 1.7 altında bulunduğu, standartların pik alanı-konsantrasyon regresyon eğrisinin denkleminin $y=(3,515 \times 10^{-6}) \cdot x$ (x pik alanı, y μ M konsantrasyonda isoksantopterin) ve korelasyon katsayısının 0,99 olduğu, verimin ise % 97 düzeyinde saptandığı bildirilmiştir. Pterin için retansiyon zamanı 6.2 dakika, isoksantopterin için ise 8.3 dakika olarak bulunmuştur. Biz, çalışmamızda metodun 1000 nM konsantrasyona kadar lineer olduğunu ortaya koyduk. Standartların pik alanı-konsantrasyon regresyon eğrisinin denklemi $y=2,305 \cdot x+1,1885$ ve korelasyon katsayısı 0,9999 idi. CV değeri gün-içi tekrarlanabilirlik için % 0.99, günler-arası tekrarlanabilirlik için ise % 2.95 olarak hesaplandı. Ortalama verim % 103 olarak saptandı. Çalışmamızda pterin için retansiyon zamanı 6.6 dakika, isoksantopterin için ise 8.4 dakika idi. Yamamoto ve ark.'dan farklı olarak, bizim çalışmamızda alt saptanabilir limit 0,79 nM ve doğru hesaplanabilir alt limit 2,64 nM olarak belirlendi. Belirlemiş olduğumuz alt limitler plazma XO aktivitesi ölçümü sırasında saptanan isoksantopterin konsantrasyonlarına göre son derece düşük olduğu için bir önem arz etmemekle birlikte, Yamamoto ve ark. alt saptanabilir limiti hangi kritere göre belirlediklerini belirtmedikleri için bu farklılığın nedenini tam olarak açıklayamadık. Elde edilen lineerite, tekrarlanabilirlik, verim ve alt deteksiyon limiti çalışmaları sonuçları göstermektedir ki; metodumuz klinik laboratuvarında rutin ölçümler için kullanılabilir bir analitik yöntemdir.

Yamamoto ve ark.'nın çalışmasında 16 sağlıklı denek kullanılarak belirlenen ortalama normal plazma XO aktivitesi 2,13 mU/L ($12,8 \pm 5,7$ pmol/mL/saat)'dir. Bir

saat ve daha uzun inkübasyon süresi ile plazma XO aktivitesinin ölçüldüğü diğer end-point metodlarda saptanan plazma XO aktivitesi düzeylerinin 0-17 mU/L arasında olduğu bildirilmiştir (89). Bizim çalışmamızda 108 sağlıklı denek kullanarak, daha geniş bir popülasyonda plazma XO aktivitesinin normal değerleri $1,12 \pm 0,23$ mU/L (% 95 CI: 1,07-1,16 mU/L) olarak belirlendi. Normal değerler kadın ve erkekler için ayrı olarak da saptandı. Erkekler için normal değerler $1,11 \pm 0,25$ mU/L (% 95 CI: 1,05-1,17 mU/L), kadınlar için ise $1,14 \pm 0,20$ mU/L (% 95 CI: 1,07-1,20 mU/L) idi. Kadın ve erkekler arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunamadı. Bu sonuç Newaz ve ark.'nın (108) spektrofotometrik ölçüm ile elde ettikleri sonuçlardan farklıdır. Bu araştırmacılar istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmamakla birlikte erkeklerde daha yüksek plazma XO aktivitesi bildirmişlerdir. Literatürdeki diğer çalışmalar ise çoğunlukla karaciğer dokusunda cinsiyete göre aktivite değişimlerini ele almışlardır (32,52,68,84). Bu bulgular doğrultusunda, çalışmamız hem rutin klinik kullanım için uygun bir alt yapı oluşturmuş hem de diğer çalışmalara referans teşkil edecek veriler sağlamıştır.

Çalışmamızda, normal değer çalışması ile birlikte yaş ve cinsiyet ile plazma XO aktivitesi arasındaki ilişki ve dekatlara göre XO aktivite değerleri de irdelendi. Yaş ile plazma XO aktivitesi arasında bir korelasyon saptanmadı. Ayrıca, dekatlar arası enzim aktivitesi açısından anlamlı bir farklılık bulunmadı. Erkek ve kadın denekler ayrı ayrı gruplar olarak ele alındığında, Newaz ve ark.'nın her iki cinsiyette artan yaşla enzim aktivitesinin arttığını bildirdikleri çalışmalarından (108) farklı olarak, erkeklerde yaş ile enzim aktivitelerinde anlamlı bir değişim görülmez iken, kadınlarda artan yaş ile birlikte plazma XO aktivitesinin anlamlı olarak arttığı görüldü. Bunda çalışılan örnek sayılarının farklılığı biretken olabilir. İlaveten, kadınlarda artan yaşla ortaya çıkan değişimin azalan estradiole bağlı olabileceği düşünülmeye karşın konu ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yaş ile plazma XO aktivitesinin değişimi konusunda literatürde yeterli veri bulunmaması ve kadınlarda artan yaşla enzim aktivitesinin arttığının gösterilmesi nedeniyle çalışmamız önem arz etmektedir.

Çalışmamızda, testosteron hormonunun plazma XO aktivitesi üzerine etkisini değerlendirmek için seçilmiş olan hipogonadotropik hipogonadizmli erkek hastalar ve aynı yaş grubundan sağlıklı erkek deneklerin serum total testosteron ve ürik asit düzeyleri ile plazma XO aktiviteleri karşılaştırıldı. Hipogonadizmli hastalarda serum total testosteron ve ürik asit düzeyleri sağlıklı kontrollerden belirgin olarak düşük iken,

plazma XO aktiviteleri açısından anlamlı farklılık bulunmadı. Bu sonuçlar bize plazma XO aktivitesi üzerine testosteron hormonunun belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir. Cinsiyetler arasında XO aktivitesi açısından bir farklılık bulunmaması da bu bulguyu desteklemektedir. Ayrıca, hipogonadizmlili hastalarda plazma XO aktiviteleri normal iken serum ürik asit düzeylerinin düşük olması karaciğerde pürin katabolizmasının düşük düzeyde olduğu, dolayısıyla karaciğer XO aktivitelerinin bu hasta grubunda düşük olabileceği fikrini oluşturdu. Bu durumda, serum total testosteron düzeyleri plazma XO aktivitesini etkilemez iken, karaciğerde bu enzimin aktivitesini artırıyor olabilir. Bu fikir önceki diğer çalışmalar ile uyumlu görünmektedir. Nitekim, Levinson ve Chalker (84), rat karaciğerinde XOR aktivitesini değerlendirdikleri çalışmalarında, immatür hayvanlarda dişi ve erkek cinsiyetler arasında enzim aktivitesi açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığını, matür hayvanlarda ise erkeklerde karaciğer enzim aktivitesinin dişi ratlara göre % 59 daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, matürasyonla enzim aktivitelerinin erkeklerde iki katına çıktığı ve bunun prepubertal kastrasyonla önleendiği ortaya konulmuştur. Yine benzer bir çalışmada, Decker ve Levinson (32) hepatik XOR aktivitelerinin erkek ratlarda dişilerden belirgin olarak yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İnsan karaciğerinde yapılan çalışmalarda da erkek dokularında enzim aktivitelerinin dişilerden % 20 daha yüksek olduğu belirtilmiştir (52).

Sonuç olarak, çalışmamızla kliniğimiz HPLC laboratuvarlarında çok önemli bir enzimin plazmada ve diğer birçok örnekte ölçümüne olanak sağlayacak performansa sahip bir floresans deteksiyonlu HPLC yöntemi kurulmuş ve 108 sağlıklı bireyden oluşan, HPLC metodları için geniş sayılabilecek bir popülasyonda normal değerler cinsiyete ve yaş dekatlarına göre belirlenmiştir. İlaveten, plazma XO aktiviteleri açısından erkek ve dişi cinsiyetler arasında farklılık bulunmadığı gösterilmiştir. Artan yaşla birlikte erkeklerde plazma XO aktiviteleri değişmezken kadınlarda anlamlı bir artış olduğu da ilk kez ortaya konulmuştur. Ayrıca, hipogonadizm hastalarının plazma XO aktiviteleri ölçülüp serum ürik asit düzeyleri ve total testosteron düzeyleri ile karşılaştırılarak testosteron hormonunun plazma ve olasılıkla karaciğer XO aktivitesi üzerine etkileri irdelenmiştir. Uyguladığımız yöntemde inkübasyon süresini ya da örneğin kolondan retansiyon zamanını kısaltacak başka modifikasyonlar yapılması rutin uygulama etkinliğini artırabilir. Bundan başka, çok daha geniş popülasyonlarla ve benzer hastalık modelleri kullanılarak plazma XO aktivitesinin irdelenmesi heyecan verici başka sonuçların elde edilmesine olanak sağlayabilecek ve bu

enzimin ilişkili olabileceği iskemi-reperfüzyon, inflamasyon, endotelyal disfonksiyon, ateroskleroz, diyabet, hipertansiyon gibi birçok hastalığın daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayacaktır.



VI. ÖZET

Molibden hidroksilaz flavoprotein ailesinin üyesi olan XOR enziminin ksantin oksidaz (XO) ve ksantin dehidrojenaz (XDH) şeklinde iki farklı formu mevcuttur. Plazmada bulunan enzim esas olarak XO formundadır. İskemi-reperfüzyon injürisi, karaciğer hastalıkları, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar, ateroskleroz, hipertansiyon ve tip II diyabette plazma XOR aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir.

Rutin çalışma ve araştırmalar için daha sensitif ve spesifik olan HPLC ile XO ölçümünün optimizasyonu için yaptığımız çalışmalarda yöntem 1000 nM isoksantopterin konsantrasyonlarına kadar lineerdi ($r=0,9999$). Deteksiyon limiti 0,79 nM, CV değeri gün-içi tekrarlanabilirlik için % 0.99 ve günler-arası tekrarlanabilirlik için % 2.95, ortalama verim % 103 olarak bulundu. Bu hali ile metod hem düşük düzeydeki plazma XOR aktivitelerini hem de daha yüksek aktivite içeren örnekleri kolayca ölçebilecek kadar duyarlı, örnek körü çalışması gerektirmediği için iş gücü kaybını azaltan, maliyeti düşük, reaktifleri kolaylıkla hazırlanabilen, diğer metodlara göre nisbeten daha iyi irdelenerek plazma XO aktivitesini ölçmek için dizayn edilmiş, kliniğimizde diğer çalışmalar için rutin uygulanabilir bir yöntem olarak kabul edildi.

Yaşa ve cinsiyete bağlı normal değerlerin belirlenmesi için çalışmada 108 sağlıklı denek (67 erkek, 41 kadın) kullanıldı ve plazma XO aktivitesinin normal değerleri $1,12 \pm 0,23$ mU/L olarak belirlendi. Erkekler için normal değerler $1,11 \pm 0,25$ mU/L, kadınlar için ise $1,14 \pm 0,20$ mU/L idi. Plazma XO aktivitesi açısından erkek ve kadınlar arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,496$). Sağlıklı bireyler bütün olarak ele alındığında, yaş ile plazma XO aktivitesi arasında bir korelasyon görülmedi ($r=0,075$, $p=0,438$). Bireyler yaşlarına göre dekatlara ayrılarak incelendiği zaman dekatlar arası enzim aktivitesi açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0,721$). Erkeklerde yaş ile enzim aktivitelerinde anlamlı bir değişim görülmez iken ($r=-0,058$, $p=0,641$) kadınlarda artan yaş ile birlikte plazma XO aktivitesinin anlamlı olarak arttığı görüldü ($r=0,368$, $p=0,018$). Hipogonadotropik hipogonadizmlili 24 erkek hasta, 25 sağlıklı erkek kontrol deneği ile karşılaştırıldığında; hipogonadizmlili hastaların total testosteron düzeyleri ve ürik asit seviyeleri kontrol grubuna göre belirgin olarak düşük (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,001$) iken plazma ksantin oksidaz aktiviteleri açısından iki grup arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p=0,398$).

Sonuç olarak, çalışmamızda XO enziminin plazmada ve diğer birçok örnekte ölçümüne olanak sağlayacak performansa sahip bir floresans deteksiyonlu HPLC yöntemi kurulmuş, normal değerler cinsiyete ve yaş dekatlarına göre belirlenmiştir. Plazma XO aktiviteleri açısından erkek ve dişi cinsiyetler arasında farklılık bulunmadığı gösterilmiştir. Artan yaşla birlikte erkeklerde plazma XO aktiviteleri değişmezken kadınlarda anlamlı bir artış olduğu da ilk kez ortaya konulmuştur. Ayrıca, testosteron hormonunun plazma XO aktivitesi üzerine etkisi olmadığı ve olasılıkla karaciğer XO aktivitesi üzerine artırıcı bir etkinlik gösterebileceğine de dikkat çekilmiştir. Uyguladığımız yöntemde yapılacak başka modifikasyonlar rutin uygulama etkinliğini artırarak bu enzimin ilişkili olduğu klinik durumların ayrıntılı olarak araştırılmasına olanak sağlayacaktır.

VII. SUMMARY

Xanthine oxidoreductase (XOR), one of the enzymes in the molybdenum hydroxylase flavoprotein family, has two different forms: xanthine oxidase (XO) and xanthine dehydrogenase (XDH). XO is the essential form found in plasma. It was shown that XOR activity in plasma was increased in patients with diabetes mellitus type II, atherosclerosis, hypertension, inflammatory and autoimmune rheumatic diseases, liver diseases, ischemia-reperfusion injury.

A linearity up to 1000 nM isoxanthopterin concentration was obtained in the method used in our study aimed the optimization of XO determination by HPLC which is more specific and sensitive for routine and research purposes ($r=0,9999$). In addition, detection limit was 0.79 nM, intra-day precision and between-day precision were 0,99 % and 2,95 %, respectively. Mean recovery was found 103 %. According to these data, this mentioned method was accepted as practicable method due to its high sensitivity that can measure both low and high activity of plasma XOR. Since this method minimizes the work load by not using the sample blank and uses the easily prepared reagents and is cost-effective, it is supposed that this method could be used for other research purposes in our department.

In this study, 108 healthy subjects (67 male, 41 female) were included and normal value of plasma XO activity was found $1,12 \pm 0,23$ mU/L ($1,11 \pm 0,25$ mU/L for male, $1,14 \pm 0,20$ mU/L for female). No statistically significiancy was found between the values of plasma XO activity in both genders ($p=0,496$). No correlation was also observed between age and plasma XO activity ($r=0,075$, $p=0,438$). In terms of age groups in decade, enzyme activity showed no difference in different age groups ($p=0,721$). In male subjects, there was no significant change in enzyme activity with age ($r=-0,058$, $p=0,641$). However, female subjects were shown to have increased plasma XO activity correlated with age increase ($r=0,368$, $p=0,018$). When 24 male patients with hypogonadotropic hypogonadism were compared with 25 healthy male individuals, plasma XO activity levels showed no statistically difference ($p=0,398$), while total testosterone levels and uric acid levels were found significantly decreased when compared with those of controls ($p<0,001$ and $p=0,001$, respectively).

As a consequence, in our study, a method providing the measurement of XO enzyme in plasma and other biological samples by using HPLC with fluorescence detection was set up and normal values were determined with respect to genders and age groups. Plasma XO activities in female subjects were firstly reported to be increased by the increase at age in female subjects. In addition, it was pointed out that testosterone had no effect on plasma XO activity, but could have an increasin effect on hepatic XO activity. So, further researchs to developpe this method can lead highlighting of other clinical conditions associated with this enzyme in routine applications.

VIII. KAYNAKLAR

1. Adachi, T., Fukushima, T., Usami, Y., Hirano, K.: Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial cell surface. *Biochemistry*, 289: 523-527, 1993.
2. Akgur, F.M., Brown, M.F., Zibari, G.B., McDonald, J.C., Epstein, C.J., Ross, C.R., Granger, D.N.: Role of superoxide in hemorrhagic shock-induced P-selectin expression. *Am. J. Physiol.*, 279: H791-H797, 2000.
3. Akyol, O., Gokbulut, I., Koksali, N., Akin, H., Ozyurt, H., Yildirim, Z.: The activities of purine catabolizing enzymes in plasma and bronchial washing fluid in patients with lung cancer and pneumonia. *Clin. Biochem.*, 34(3): 251-254, 2001.
4. Al-Khalidi, U.A.S., Chaglassion, T.H.: Species distribution of xanthine oxidase. *Biochem. J.*, 97: 318-320, 1965.
5. Al-Khalidi, U.A.S., Nasrallah, S., Khachadurian, A.K., : A sensitive method for the determination of xanthine oxidase activity. *Clin. Chim. Acta*, 11: 72-77, 1965.
6. Amrani, L., Primus, J., Glatigny, A., Arcangeli, L., Scazzocchio, C., Finnerty, V.: Comparison of the sequences of the *Aspergillus nidulans* hxB and *Drosophila melanogaster* ma-I genes with nifS from *Azotobacter vinelandii* suggests a mechanism for the insertion of the terminal sulphur atom in the molybdopterin cofactor. *Mol. Microbiol.*, 38: 114-125, 2000.
7. Angermuller, S., Bruder, G., Volkl, A., Wesch, H., Fahimi, H.D.: Localization of xanthine oxidase in crystalline cores of peroxisomes. A cytochemical and biochemical study. *Eur. J. Cell Biol.*, 45: 137-144, 1987.
8. Aron, D.C., Findling, J.W., Tyrrell, J.B.: Endocrinologic evaluation of the hypothalamic-pituitary axis. In: *Basic and Clinical Endocrinology*, Eds: Greenspan, F.S., Gardner, D.G., New York, Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2001: 119-126.
9. Bailey, I.A., Blackwell, C.P., Woodward, B.: Chemiluminescence measurement of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity in four types of cardiovascular cell. *Basic Res. Cardiol.*, 83: 392-400, 1988.
10. Barman, T.E.: *Enzyme Handbook*. 2nd ed., Vol: 1, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, Springer-Verlag, 1985: 147-148.
11. Battelli, M.G., Abbondanza, A., Musiani, S., Buonamici, L., Strocchi, P., Tazzari, P.L., Gramantieri, L., Stirpe, F.: Determination of xanthine oxidase in human serum by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chim. Acta*, 281: 147-158, 1999.
12. Battelli, M.G., Musiani, S., Valgimigli, M., Gramantieri, L., Tomassoni, F., Bolondi, L., Stirpe, F.: Serum xanthine oxidase in human liver disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 96(4):1194-1199, 2001.
13. Becker, B.F.: Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 14: 615-631, 1993.
14. Beckman, J.S., Parks, D.A., Pearson, J.D., Marshall, P.A., Freeman, B.A.: A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic. Biol. Med.*, 6: 607-615, 1989.
15. Benboubetra, M., Gleeson, A., Harris, C.P., Khan, J., Arrar, L., Brennand, D., Reid, J., Reckless, J.D., Harrison, R.: Circulating anti-(xanthine oxidoreductase) antibodies in healthy human adults. *Eur. J. Clin. Invest.*, 27(7): 611-619, 1997.
16. Berry, C., Brosnan, M.J., Fennell, J., Hamilton, C.A., Dominiczak, A.F.: Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 10: 247-255, 2001.
17. Berry, C., Hamilton, C.A., Brosnan, M.J., Magill, F.G., Berg, G.A., McMurray, J.J., Dominiczak, A.F.: Investigation into the sources of superoxide in human blood vessels: angiotensin II increases superoxide production in human internal mammary arteries. *Circulation*, 101: 2206-2212, 2000.
18. Bray, R.C.: "Molybdenum iron-sulphur flavin hydroxylases and related enzymes." In *The Enzymes*, Ed.: P.D. Boyer, Vol: 12, pp: 299-417, New York, Academic Press,

- 1975.
19. Brown, A.M., Benboubetra, M., Ellison, M., Powell, D., Reckles, J.D., Harrison, R.: Molecular activation-deactivation of xanthine oxidase in human milk. *Biochim. Biophys. Acta*, 1245: 248-254, 1995.
 20. Brunelli, L., Crow, J.P., Beckman, J.S.: The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 316:327-334, 1995.
 21. Bulkley, G.B.: Physiology of reactive oxidant-mediated signal transduction: an overview. *Biochem. Soc. Trans.*, 25: 804-812, 1997.
 22. Butler, R., Morris, A.D., Belch, J.J., Hill, A., Struthers, A.D.: Allopurinol normalizes endothelial dysfunction in type 2 diabetics with mild hypertension. *Hypertension*, 35(3): 746-751, 2000.
 23. Cai, H., Harrison, D.G.: Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. *Circ. Res.*, 87: 840-844, 2000.
 24. Cappola, T.P., Kass, D.A., Nelson, G.S., Berger, R.D., Rosas, G.O., Kobeissi, Z.A., Marban, E., Hare, J.M.: Allopurinol improves myocardial efficiency in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 104: 2407-2411, 2001.
 25. Carden, D.L., Granger, D.N.: Pathology of ischemia reperfusion injury. *J. Pathol.*, 190: 255-266, 2000.
 26. Cardillo, C., Kilcoyne, C.M., Cannon, R.O., Quyyumi, A.A., Panza, J.A.: Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not hypertensive patients. *Hypertension*, 30: 57-63, 1997.
 27. Chang, W.S., Chang, Y.H., Lu, F.J., Chiang, H.C.: Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Res.*, 14(2A): 501-506, 1994.
 28. Chung, W.G., Kang, J.H., Park, C.S., Cho, M.H., Cha, Y.N.: Effect of age and smoking on in vivo CYP1A2, flavin-containing monooxygenase, and xanthine oxidase activities in Koreans: determination by caffeine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 67(3): 258-266, 2000.
 29. Cighetti, G., Bortone, L., Sala, S., Allevi, P.: Mechanism of action of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal on xanthine oxidoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 389(2): 195-200, 2001.
 30. Cosic, C., Antic, S., Pesic, M., Jovanovic, O., Kundalic, S., Djordjevic, V.B.: Monotherapy with metformin: does it improve hypoxia in type 2 diabetic patients? *Clin. Chem. Lab. Med.*, 39(9): 818-821, 2001.
 31. De Jong, J.W., Van der Meer, P., Nieukoop, A.S., Huzier, T., Stroeve, R.J., Bos, E.: Xanthine oxidoreductase activity in perfused heart of various species, including humans. *Circ. Res.*, 67: 770-773, 1990.
 32. Decker, D.E., Levinson, D.J.: Quantitation of rat liver xanthine oxidase by radioimmunoassay. A mechanism for sex-specific differences. *Arthritis Rheum.*, 25(3): 326-332, 1982.
 33. Della Corte, E., Stirpe, F.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.*, 126: 739-745, 1972.
 34. Demisch, K., Nickelson, T.: Distribution of testosterone in plasma proteins during replacement therapy with testosterone enanthate in patients suffering from hypogonadism. *Andrologia*, 15: 536-541, 1983.
 35. Doel, J.J., Godber, B.L.J., Eisenthal, R., Harrison, R.: Reduction of organic nitrates catalysed by xanthine oxidoreductase under anaerobic conditions. *Biochem. Biophys. Acta*, 1527: 81-87, 2001.
 36. Dupont, G.P., Huecksteadt, T.P., Marshall, B.C., Ryan, U.S., Michael, J.R., Hoidal, J.R.: Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 89: 197-202, 1992.
 37. Elion, G.B., Kovensky, A., Hitchings, G.H., Metz, E., Rundless, R.W.: Metabolic studies of allopurinol an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 15:

- 863-880, 1966.
38. Falciani, F., Ghezzi, P., Terao, M., Cazzaniga, G., Garattini, E.: Interference induce xanthine dehydrogenase gene expression in 929 cells. *Biochem. J.*, 285: 1001-1008, 1992.
 39. Fridovich, I.: Competitive inhibition of xanthine oxidase by urea and guanidinium ion. *J. Biol. Chem.*, 239: 3519-3521, 1964.
 40. Fried, R., Fried, L.V., Babin, D.R.: Biologic role of xanthine oxidase and tetrazolium reductase inhibitor. *Eur. J. Biochem.*, 33: 439-445, 1973.
 41. Friedl, H.P., Smith, D.J., Till, G.O., Thomson, P.D., Louis, D.S., Ward, P.A.: Ischemia-reperfusion in humans. Appearance of xanthine oxidase activity. *Am. J. Pathol.*, 136(3):491-5, 1990.
 42. Fung, H.L., Chung, S.J., Bauer, J.A., Chong, S., Kowaluk, E.A.: Biochemical mechanism of organic nitrate action. *Am. J. Cardiol.*, 70:4B-10B, 1992.
 43. Furth-Walker, D., Amy, N.K.: Regulation of xanthine oxidase activity and immunologically detectable protein in rats in response to dietary protein and iron. *J. Nutr.*, 117:1697-1703, 1987.
 44. Giler, S., Sperling, G., Brosh, S., Urca, I., De Vries, A.: Serum xanthine oxidase in jaundice. *Clin. Chim. Acta*, 63: 37-40, 1975.
 45. Godber, B.L.J., Doel, J.J., Durgan, J., Eisenthal, R., Harrison, R.A.: A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Lett.*, 475: 93-96, 2000.
 46. Godber, B.L.J., Doel, J.J., Sapkota, G.P., Blake, D.R., Stevens, C.R., Eisenthal, R., Harrison, R.: Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, 275(11): 7757-7763, 2000.
 47. Granger, D.R., Hollwarth, M.E., Parks, D.A.: Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol. Scand.*, 548(suppl): 47-63, 1986.
 48. Granger, D.N., Stokes, K.Y., Shigematsu, W.H., Cerwinka, W.H., Tailor, A., Kriegelstein, C.F.: Splanchnic ischemia-reperfusion injury: mechanistic insights provided by mutant mice. *Acta Physiol. Scand.*, 173: 83-91, 2001.
 49. Green, D.R., Pauli, R.: The antibacterial action of the xanthine oxidase system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 54: 148-150, 1943.
 50. Grisham, M.B., Granger, D.N., Lefer, D.J.: Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free. Radic. Biol. Med.*, 25(4-5):404-433, 1998.
 51. Grum, C.M., Ragsdale, R.A., Ketai, L.H., Simon, R.H.: Plasma xanthine oxidase activity in patients with adult respiratory distress syndrome. *J. Crit. Care*, 2: 22-26, 1987.
 52. Guercioli, R., Szumlanski, C., Weinshilboum, R.M.: Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clin Pharmacol. Ther.*, 50: 663-672, 1991.
 53. Haining, J.L., Legan, J.S.: Fluorometric assay for xanthine oxidase. *Anal. Biochem.*, 21: 337-343, 1967.
 54. Harman, S.M., Metter, E.J., Tobin, J.D., Pearson, J., Blackman, M.R.: Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men: Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 86: 724-731, 2001.
 55. Harrison, D.G., Bates, J.N.: The nitrovasodilators: new ideas about old drugs. *Circulation*, 87: 1461-1467, 1993.
 56. Harrison, R., Benboubetra, M., Bryson, S., Thomas, R.D., Elwood, P.C.: Antibodies to xanthine oxidase: elevated levels in patients with acute myocardial infarction. *Cardioscience.*, 1(3):183-189, 1990.
 57. Harrison, R.: Human xanthine oxidoreductase: in search of a function. *Biochem. Soc. Trans.*, 25: 786-791, 1997.
 58. Harrison, R.: Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic. Biol. Med.*, 33(6): 774-797, 2002.
 59. Hassoun, P.M., Yu, F.S., Shedd, A.L., Zulueta, J.J., Thannickal, V.J., Lanzillo, J.J., Fanburg, B.L.: Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase xanthine

- oxidase gene expression by oxygen tension. *Am. J. Physiol.*, 266: L163-L171, 1994.
60. Hausladen, A., Fridovich, I.: Excess substrate inhibition of xanthine oxidase: a reexamination. *Arch. Biochem. Biophys.*, 306: 415-419, 1993.
61. Hille, R., Massey, V.: Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 256: 9090-9095, 1981.
62. Hille, R., Nishino, T.: Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J.*, Aug;9(11):995-1003, 1995.
63. Hille, R.: The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.*, 96: 2757-2816, 1996.
64. Hille, R., Massey, V.: Tight-binding inhibitors of xanthine oxidase. *Pharmacol. Ther.*, 14:249-263, 1981.
65. Hofstee, B.H.J.: On the mechanism of inhibition of xanthine oxidase by the substrate xanthine. *J. Biol. Chem.*, 216: 235-244, 1955.
66. Hooper, D.C., Scott, G.S., Zborek, A., Mikheeva, T., Kean, R.B., Koprowski, H., Spitsin, S.V.: Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes, and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J.*, 14(5):691-698, 2000.
67. Houston, M., Estavez, A., Chumley, P., Aslan, M., Marklund, S., Parks, D.A., Freeman, B.A.: Binding of xanthine oxidase to vascular endothelium. Kinetic characterization and oxidative impairment of nitric oxide-dependent signaling. *J. Biol. Chem.*, 274: 4985-4994, 1999.
68. Huh, K., Shin, U.S., Choi, J.W., Lee, S.I.: Effect of sex hormones on lipid peroxidation in rat liver. *Arch. Pharm. Res.*, 17(2): 109-114, 1994.
69. Hunt, J., Massey, V.: Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, 267: 21479-21485, 1992.
70. Ichida, K., Amaya, Y., Kamatani, N., Nishino, T., Hosoya, T., Sakai, O.: Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria. *J. Clin. Invest.*, 99: 2391-2397, 1997.
71. Ichida, K., Matsumura, T., Sakuma, R., Hosoya, T., Nishino, T.: Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 282: 1194-1200, 2001.
72. Ichikawa, H., Flores, S., Kvietys, P.R., Wolf, R.E., Yoshikawa, T., Granger, D.N., Aw, T.Y.: Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ. Res.*, 81(6): 922-31, 1997.
73. Ichimori, K., Fukahori, M., Nakazawa, H., Okamoto, K., Nishino, T.: Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 274(12): 7763-7768, 1999.
74. Jones, O.T.G., Hancock, J.T.: "The NADPH Oxidase of neutrophils and other cells." In *Free Radicals and Inflammation*, Eds: Winyard, P.G., Blake, D.R., Evans, C.H., Basel, Birkhauser Verlag, 2000: 21-46.
75. Kalckar, H.M.: Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. I. Determination of hydroxypurine compounds. *J. Biol. Chem.*, 167: 429-443, 1947.
76. Kayyali, U.S., Donaldson, C., Huang, H., Abdelnour, R., Hassoun, P.M.: Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. *J. Biol. Chem.*, 276: 14359-14365, 2001.
77. Keenan, T.W., Patton, S.: The structure of milk: implications for sampling and storage. A. The milk lipid globule membrane. In *Handbook of Milk Composition*, Ed.: Jensen, R.G., New York, Academic Press, 1995: 5-50.
78. Kooij, A., Fredericks, W.M., Van Noorden, C.J.F.: Xanthine oxidase and reperfusion injury: major player or minor irritant? *Reply Hepatology*, 21: 1758-1760, 1995.
79. Kooij, A., Schiller, H.J., Schijns, M., Van Noorden, C.J.F., Fredericks, W.M.: Conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase in rat liver and plasma at the onset of reperfusion after ischemia. *Hepatology*, 19(6):1488-1495,

- 1994.
80. Krenitsky, T.A., Tuttle, J.V., Cattau, E.C., Wang, P.: A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 49B:687-703, 1974.
81. Krieglstein, C.F., Granger, D.N.: Adhesion molecules and their role in vascular disease. *Am. J. Hypertens.*, 14: 44S-54S, 2001.
82. Kurose, I., Granger, D.N.: Evidence implicating xanthine oxidase and neutrophils in reperfusion-induced microvascular dysfunction. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 723: 158-179, 1994.
83. Lee, C., Liu, X., Zweier, J.L.: Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. *J. Biol Chem.*, 275(13): 9369-9376, 2000.
84. Levinson, D.J., Chalker, D.: Rat hepatic xanthine oxidase activity: age and sex specific differences. *Arthritis Rheum.*, 23(1): 77-82, 1980.
85. Lewis, A.S., Murphy, L., McCalla, C., Fleary, M., Purcell, S.: Inhibition of mammalian xanthine oxidase by folate compounds and amethopterin. *J. Biol Chem.*, 259: 12-15, 1984.
86. Linder, N., Rapola, J., Raivio, K.O.: Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Lab. Invest.*, 79: 967-974, 1999.
87. Litwack, G., Bothwell, J.W., Williams, J.N., Elvehjem, C.A.: A colorimetric assay for xanthine oxidase in rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.*, 200: 303-310, 1953.
88. Majkic-Singh, N., Bogavac, L., Kalimanovska, V., Jelic, Z., Spasic, S.: Spectrophotometric assay of xanthine oxidase with 2,2'-azino(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) (ABTS) as chromogen. *Clin. Chim. Acta*, 162(1): 29-36, 1987.
89. Marti, R., Varela, E., Pascual C., Segura, R.M.: Determination of xanthine oxidoreductase forms: influence of reaction conditions. *Clin. Chim. Acta*, 303: 117-125, 2001.
90. Massey, V., Komai, H., Palmer, G.: On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by allopurinol and other pyrazolo [3,4-d] pyrimidines. *J. Biol. Chem.*, 245: 2837-2844, 1970.
91. McCord, J.M., Fridovich, I.: The reduction of cytochrome by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 243: 5753-5760, 1968.
92. McCord, J.M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.*, 312: 159-163, 1985.
93. McManaman, J.L., Bain, D.L.: Structural and conformational analysis of the oxidase to dehydrogenase conversion of xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, 277(24): 21261-21268, 2002.
94. McManaman, J.L., Hanson, L., Neville, M.C., Wright, R.M.: Lactogenic hormones regulate xanthine oxidoreductase and β -casein levels in mammary epithelial cells by distinct mechanism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 373: 318-327, 2000.
95. McManaman, J.L., Neville, M.C., Wright, R.M.: Mouse mammary gland xanthine oxidoreductase: purification, characterization, and regulation. *Arch Biochem Biophys.*, Nov 15;371(2):308-316, 1999.
96. Miesel, R., Zuber, M.: Elevated levels of xanthine oxidoreductase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation*, 17(5): 551-561, 1993.
97. Miller, T.M., Stevens, C.R., Benjamin, N., Eisenthal, R., Harrison, R. Blake, D.R.: Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.*, 427: 225-228, 1998.
98. Miners, J.O., Birkett, D.J.: The use of caffeine as a metabolic probe for human drug metabolizing enzymes. *Gen Pharmacol.*, 27(2): 245-249, 1996.
99. Miyamoto, Y., Akaike, T., Yoshida, M., Goto, S., Horie, H., Maeda, H.: Potentiation of nitric oxide-mediated vasorelaxation by xanthine oxidase inhibitors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 211: 366-373, 1996.
100. Mohacsi, A., Kozlovsky, B., Kiss, I., Seres, I., Fulop, T.: Neutrophils obtained from

- obliterative atherosclerotic patients exhibit enhanced resting respiratory burst and increased degranulation in response to various stimuli. *Biochim. Biophys. Acta*, 1316(3): 210-216, 1996.
101. Moorhouse, P.C., Grootveld, M., Halliwell, B., Quinlan, J.G., Gutteridge, J.M.C.: Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.*, 213: 23-28, 1987.
 102. Morita, M., Feller, D.R., Gillette, J.R.: Reduction of niridazole by rat liver xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 20: 217-226, 1971.
 103. Moriwaki Y., Yamamoto, T., Suda, M., Nasako, Y., Takahashi, S., Agbedana, O.E., Hada, T., Higashino, K.: Purification and immunohistochemical tissue localization of human xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1164: 327-330, 1993.
 104. Muranjan, M., Wang, Q., Li, Y.L., Hamilton, E., Otieno-Omondi, F.P., Wang, J., Van Praagh, A., Grootenhuys, J.G., Black, S.J.: The trypanocidal Cape buffalo serum protein is xanthine oxidase. *Infect. Immun.*, 65: 3806-3814, 1997.
 105. Murray, J.F., Matthay, M.A., Luce, J.M., Fick, M.R.: An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 138: 720-723, 1988.
 106. Nagao, A., Seki, M., Kobayashi, H.: Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63(10): 1787-1790, 1999.
 107. Nakazono, K., Watanabe, N., Matsuno, K., Sasaki, J., Sato, T., Inoue, M.: Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 10045-10048, 1991.
 108. Newaz, M.A., Adeeb, N.N.: Detection of xanthine oxidase in human plasma. *Med. J. Malaysia*, 53(1): 70-75, 1998.
 109. Newaz, M.A., Adeeb, N.N.N., Muslim, N., Razak, T.A., Htut, N.N.: Uric acid, xanthine oxidase and other risk factors of hypertension in normotensive subjects. *Clin. Exp. Hypertens.*, 18: 1035-1050, 1996.
 110. Nyeki, A., Biollaz, J., Kesselring, U.W., Decosterd, L.A.: Extractionless method for the simultaneous high performance liquid chromatographic determination of urinary caffeine metabolites for N-acetyltransferase 2, cytochrome P450 1A2 and xanthine oxidase activity assessment. *J. Chromatography B.*, 755: 73-84, 2001.
 111. Oetli, K., Reibnegger, G.: Pteridines as inhibitors of xanthine oxidase: structural requirements. *Biochim. Biophys. Acta*, 1430(2): 387-395, 1999.
 112. Ohara, Y., Peterson, T.E., Harrison, D.G.: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.*, 91: 2546-2551, 1993.
 113. Oster, K.A.: Folic acid and xanthine oxidase. *Ann. Intern. Med.*, 85: 333-335, 1977.
 114. Page, S., Powell, D., Benboubetra, M., Stevens, C.R., Blake, D.R., Selase, F., Wolstenholme, A., Harrison, R.: Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines. *Biochim. Biophys. Acta*, 1381: 191-202, 1998.
 115. Parks, D.A., Granger, D.N.: Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.*, 548 (Suppl): 87-99, 1986.
 116. Pesonen, E.J., Linder, N., Raivio, K.O., Sarnesto, A., Lapatto, R., Hockerstedt, K., Makisalo, H., Anderson, S.: Circulating xanthine oxidase and neutrophil activation during human liver transplantation. *Gastroenterology*, 114: 1009-1015, 1998.
 117. Pfeffer, K.D., Huecksteadt, T.P., Hoidal, J.R.: Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. *J. Immunol.*, 153: 1789-1797, 1994.
 118. Plymate, S.R.: Male hypogonadism. In: *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*, Ed: Becker, K.L., Lippincott Williams and Wilkins, 2001: 1125-1150.
 119. Poss, W.B., Huecksteadt, T.P., Panus, P.C., Freeman, B.A., Hoidal, J.R.: Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia. *Am. J. Physiol.*, 270: L941-L964, 1996.
 120. Prajda, N., Weber, G.: Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett.*, 59(2): 245-249, 1975.

121. Pritsos, CA.: Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system. *Chemico-Biological Interactions*, 129: 195-208, 2000.
122. Radi, R., Tan, S., Prodanov, E., Evans, R.A., Parks, D.A.: Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical. *Biochem. Biophys. Acta*, 1112: 178-182, 1992.
123. Ramboer, C., Piessens, F., De Groote, J.: Serum xanthine oxidase and liver disease. *Digestion*, 7: 183-195, 1972.
124. Reiss, J.: Genetics of molybdenum cofactor deficiency. *Hum. Genet.*, 106: 157-163, 2000.
125. Relling, M.V., Lin, J.S., Ayers, G.D., Evans, W.E.: Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 52(6): 643-658, 1992.
126. Rott, K.T., Agudelo, C.A.: Gout. *JAMA*, 289(21): 2857-2860, 2003.
127. Saito, T.O., Nishino, T., Massey, V.: Differences in environment of FAD between NAD-dependent and O₂- dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase shown by active site probe study. *J. Biol. Chem.*, 264:15930-15935, 1989.
128. Saksela, M., Lapatto, R., Raivio, K.O.: Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease. *FEBS Lett.*, 443: 117-120, 1999.
129. Schoutsen, B., De Jong, J.W., Harmsen, E., De Tombe, P.P., Achterberg, P.W.: Myocardial xanthine oxidase/dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 762: 519-524, 1983.
130. Sheu, S.Y., Lin, C.Y., Wu, J.D., Chiang, H.C.: Inhibition of xanthine oxidase by benzothiazinone analogues. *Anticancer Res.*, 19(1A): 119-123, 1999.
131. Sogut, S., Aydin, E., Elyas, H., Aksoy, N., Ozyurt, H., Totan, Y., Akyol, O.: The activities of serum adenosine deaminase and xanthine oxidase enzymes in Behcet's disease. *Clin. Chim. Acta*, 325(1-2):133-138, 2002.
132. Spector, T.: Inhibition of urate production by allopurinol. *Biochem. Pharmacol.*, 26: 355-358, 1977.
133. Squadrito, G.L., Cueto, R., Splenser, A.E., Valavanidis, A., Zhang, H., Uppu, R.M., Pryor, W.A.: Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 376(2):333-337, 2000.
134. Stirpe, F., Della Corte, E.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J. Biol. Chem.*, 244: 3855-3863, 1969.
135. Stokes, K.Y., Clanton, E.C., Russell, J.M., Ross, C.R., Granger, D.N.: NAD(P)H oxidase derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial cell adhesion. *Circ. Res.*, 88: 499-505, 2001.
136. Susuki, H., Sweil, A., Zweifach B.W., Schmid-Schonbein, G.W.: In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats: hydroethidine microfluorography. *Hypertension*, 25: 1083-1089, 1995.
137. Tan, S., Gelman, S., Wheat, J.K., Parks, D.A.: Circulating xanthine oxidase in human ischemia-reperfusion. *South. Med. J.*, 88: 479-482, 1995.
138. Terada, L.S., Dormish, J.J., Shanley, P.F., Leff, J.A., Anderson, B.O., Repine, J.E.: Circulating xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.*, 263: L394-L401, 1992.
139. Terada, L.S., Leff, J.A., Repine, J.E.: Measurement of xanthine oxidase in biologic tissues. In: *Methods in Enzymology*, Vol: 186, New York, Academic Press, 1989: 651-656.
140. Terada, L.S., Piermattei, D., Shibao, G.N., McManaman, J.L., Wright, R.M.: Hypoxia regulates xanthine dehydrogenase activity at pre- and posttranslational levels. *Arch. Biochem. Biophys.*, 348(1): 163-168, 1997.

141. Terada, L.S., Beehler, C.J., Banerjee, A., Brown, J.M., Grosso, M.A., Harken, A.H., McCord, J.M., Repine, J.E.: Hyperoxia and self- or neutrophil-generated O₂ metabolites inactivate xanthine oxidase. *J. Appl. Physiol.*, 65(5): 2349-2358, 1988.
142. Terao, M., Cazzaniga, G., Ghezzi, P., Bianchi, M., Falciani, F., Perani, P., Garattini, E.: Molecular cloning of a cDNA coding for mouse liver xanthine dehydrogenase. *Biochem. J.*, 283: 863-870, 1992.
143. Topham, R.W., Jackson, M.R., Joslin, S.A., Walker, M.C.: Studies of the ferroxidase activity of native and chemically modified xanthine oxidoreductase. *Biochem. J.*, 235(1): 39-44, 1986.
144. Topham, R.W., Walker, M.C., Calisch, M.P., Williams, R.W.: Evidence for the participation of intestinal xanthine oxidase in the mucosal processing of iron. *Biochemistry*, 21: 4529-4535, 1982.
145. Topham, R.W., Walker, M.C., Calisch, M.P.: Liver xanthine dehydrogenase and iron mobilization. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 109(4): 1240-1246, 1982.
146. Tubaro, E., Lotti, B., Santiangelli, C., Cavallo, G.: Xanthine oxidase increase in polymorphonuclear leucocytes and macrophages in mice in three pathological situations. *Biochem Pharmacol.*, 29: 1945-1948, 1980.
147. Wahl, R.C., Rajagopalan, K.V.: Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases. *J. Biol. Chem.*, 257: 1354-1359, 1982.
148. Wahl, R.C., Warner, C.K., Finnerty, V., Rajagopalan, K.V.: *Drosophila melanogaster* ma-1 mutants are defective in the sulfuration of desulfo Mo-hydroxylases. *J. Biol. Chem.*, 257: 3958-3962, 1982.
149. Waud, W.R., Rajagopalan, K.V.: Purification and properties of the NAD⁺ dependent (Type D) and O₂ dependent (Type O) forms of rat liver xanthine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 172: 354-364, 1976.
150. Waud, W.R., Rajagopalan, K.V.: The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent form (type D) to an O₂-dependent form (type O). *Arch. Biochem. Biophys.*, Feb; 172(2): 365-79, 1976.
151. Weinbroum, A., Nielsen, V.G., Tan, S., Gelman, S., Matalon, S., Skinner, K.A., Bradley, E., Parks, D.A.: Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine oxidase. *Am. J. Physiol.*, 268(6 Pt 1): F988-F996, 1995.
152. Werns, S.W., Lucchesi, B.R.: Free radical and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11: 161-166, 1990.
153. White, C.R., Darley-Usmar, V., Berrington, W.R., McAdams, M., Gore, J.Z., Thompson, J.A., Parks, D.A., Tarpey, M.M., Freeman, B.A.: Circulating xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 8745-8749, 1996.
154. Xu, P., Huecksteadt, T.P., Hoidal, J.R.: Molecular cloning and characterization of the human xanthine dehydrogenase. *Genomics*, 34: 173-180, 1996.
155. Xu, P., La Vallee, P., Hoidal, J.R.: Repressed expression of the human xanthine oxidoreductase gene E-box and TATA-like elements restrict ground state transcriptional activity. *J. Biol. Chem.*, 275: 5918-5926, 2000.
156. Xu, P., Zhu, X.L., Huecksteadt, T.P., Brothman, A.R., Hoidal, J.R.: Assignment of human xanthine dehydrogenase gene to chromosome 2p22. *Genomics*, 23: 289-291, 1994.
157. Yamamoto, T., Moriwaki, Y., Shibutani, Y., Matsui, K., Ueo, T., Takahashi, S., Tsutsumi, Z., Hada, T.: Human xanthine dehydrogenase cDNA sequence and protein in an atypical case of type 1 xanthinuria in comparison with normal subjects. *Clin. Chim. Acta*, 304: 153-158, 2001.
158. Yamamoto, T., Moriwaki, Y., Takahashi, S., Tsutsumi, Z., Yamakita, J., Nasako, Y., Hiroishi, K., Higashino, K.: Determination of human plasma xanthine oxidase activity by high performance liquid chromatography. *J. Chromatography B.*, 681: 395-400, 1996.

159. Yokoyama, Y., Beckman, J.S., Beckman, T.K., Wheat, J.K., Cash, T.G., Freeman, B.A., Parks, D.A.: Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am. J. Physiol.*, 258: G565-G570, 1990.
160. Zima, T., Novak, L., Stipek, S.: Plasma xanthine oxidase level and alcohol administration. *Alcohol. Alcohol.*, 28: 693-694, 1993.

