

**ENDOTOKSEMİ OLUŞTURULAN KOBAYLARIN DALAK
DOKUSUNDA 3-NİTROĞİROZİN OLUŞUMU VE TAURİNİN
ANTIÖKSĐDAN ETKĐSİNİN İNCELENMESĐ**

Filiz Sezen BİRCAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2007

ANKARA

Filiz Sezen BİRCAN tarafından hazırlanan ENDOTOKSEMİ OLUŞTURULAN KOBAYLARIN DALAK DOKUSUNDA 3-NİTROTİROZİN OLUŞUMU VE TAURİNİN ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Yrd. Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
Tıbbi Biyokimya, Gazi Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Zekiye SULUDERE
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Hatice PAŞAOĞLU
Tıbbi Biyokimya, Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. Şule COŞKUN
Biyoloji, Gazi Üniversitesi

Tarih: 17/12/2007

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nermin ERTAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orjinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Filiz Sezen BİRCAN

**ENDOTOKSEMİ OLUŞTURULAN KOBAYLARIN DALAK DOKUSUNDA
3-NİTROTİROZİN OLUŞUMU VE TAURİNİN ANTİOKSİDAN ETKİSİNİN
İNCELENMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

Filiz Sezen BİRCAN

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Aralık 2007**

ÖZET

Nitrik oksit (NO/Azot monoksit) ve süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalleri biyolojik sistemlerdeki en hızlı reaksiyonlardan biriyle ($k:6,7.10^9 M^{-1}s^{-1}$) birleşerek, kendilerinden daha reaktif, daha toksik ve 1,9 saniyelik yarı ömrüyle nispeten daha uzun ömürlü bir tür olan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$)'i oluştururlar. $ONOO^{\cdot}$, proteinler, lipidler, tiyoller, sülfhidril grupları, DNA bazları ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar gibi çeşitli biyomoleküllerle reaksiyona girerek, modifikasyonlara sebep olan güçlü bir oksidan, önemli bir nitratlayıcı ajandır. $ONOO^{\cdot}$ 'nun en iyi bilinen reaksiyonlarından biri, proteine bağlı veya serbest olarak bulunan tirozin amino asitini *orto* pozisyonundan nitrolayarak 3-Nitrotirozin (3-NT)'i oluşturmasıdır. $ONOO^{\cdot}$ 'nun stabil ve spesifik bir son ürünü olan 3-NT, insan hastalıklarında ve hayvan modellerinde $ONOO^{\cdot}$ 'ya bağlı doku hasarının tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir belirteç olması açısından önemlidir. Taurin (2-aminoetansülfonik asit) ise; antioksidan, antiinflamatuvar ve detoksifiye edici özelliklere sahip, kükürt içeren serbest bir β -amino asittir. Bu çalışmada, lipopolisakkarit (LPS/endotoksin) uygulanarak deneysel endotoksemi oluşturulan kobaylarda, endotokseminin $ONOO^{\cdot}$ oluşumundaki rolünün 3-NT tespiti aracılığıyla belirlenmesi ve taurinin antioksidan aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, kobaylara intraperitoneal (ip) olarak 4 mg/kg LPS, 300 mg/kg taurin veya hem taurin hem

de LPS uygulanmış ve dalak dokularındaki 3-NT ve taurin düzeyleri HPLC'de, NO'nun stabil son ürünü olan reaktif azot oksit ürünleri (NOx) ise, spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak, LPS uygulaması dalak dokusundaki 3-NT ve NOx düzeylerini arttırırken, taurin konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır. LPS ile birlikte taurin uygulanan grupta, taurinin 3-NT ve NOx düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir. Tek başına taurin uygulanan grupta ise, taurin bilinen antioksidan etkisinin aksine 3-NT ve NOx konsantrasyonlarında belirgin bir artışa sebep olmuştur.

Bilim Kodu : 203.1.020
Anahtar Kelimeler : Taurin, 3-nitrotirozin, peroksinitrit, dalak, endotoksemi
Sayfa Adedi : 71
Tez Yöneticisi : Yrd. Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI

**ENDOTOXIN-INDUCED FORMATION OF 3-NITROTYROSINE AND
INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT EFFECT OF TAURINE IN GUINEA
PIG SPLEEN
(M.Sc.Thesis)**

Filiz Sezen BİRCAN

**GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
December 2007**

ABSTRACT

Nitric oxide (NO/Nitrogen monoxide) and superoxide ($O_2^{\cdot-}$) radicals react each other with one of the most rapid reaction in biological systems ($k:6,7.10^9 M^{-1}s^{-1}$) to form peroxynitrite ($ONOO^{\cdot-}$) that is far more toxic and reactive than its precursors, and is a relatively long-lived oxidant with a half-life of approximately 1.9 second. $ONOO^{\cdot-}$ is a potent oxidant and nitrating agent which causes modifications and reacts with numerous biomolecules including proteins, lipids, thiols, sulfhydryl groups, DNA bases and low molecular weight antioxidants. A well known reaction of $ONOO^{\cdot-}$ is forming 3-Nitrotyrosine (3-NT) by nitrating free or protein-bound tyrosine residues from *ortho* position. 3-NT, a stable and specific end product of $ONOO^{\cdot-}$, is a biomarker that is used commonly for determining $ONOO^{\cdot-}$ -mediated tissue damage in human disease and animal models. On the other hand, taurine (2-aminoethanesulfonic acid) is a free sulfur containing β -amino acid which has antioxidant, antiinflammatory and detoxificant properties. In this study, the role of endotoxemia on $ONOO^{\cdot-}$ formation via 3-NT detection, and the antioxidant effect of taurine in LPS-treated guinea pigs were aimed. In this direction, guinea pigs were injected LPS (4 mg/kg), taurine (300 mg/kg) or taurine plus LPS intraperitoneally (ip), and levels of 3-NT and taurine were measured by HPLC, reactive nitrogen oxide

species (NO_x) which are stable end products of NO[•] were measured by spectrophotometer in spleen tissues. As a result, LPS administration significantly decreased the concentration of taurine whilst increased levels of 3-NT and NO_x. It was determined that taurine decreased the levels of 3-NT and NO_x in taurine plus LPS-treated group. The group in which taurine was administered alone, contradiction to well-known antioxidant effect, taurine caused elevated concentration of 3-NT and NO_x.

Science Code : 203.1.020

Key Words : Taurine, 3-nitrotyrosine, peroxynitrite, spleen, endotoxemia

Page Number : 71

Adviser : Assist. Prof. Dr. K. Barbaros BALABANLI

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren hocam Yrd. Doç. Dr. K. Barbaros BALABANLI'ya, derin bilgi birikimi ve tecrübelerinden faydalandığım hocam Prof. Dr. Nurten TÜRÖÖZKAN'a, yardımlarını esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma ve yüksek lisans eğitimim süresince sağladığı destek için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.1.1. Reaktif oksijen türleri	4
2.1.2. Reaktif azot türleri	5
2.1.3. Serbest radikallerin kaynakları	5
2.1.4. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri.....	7
2.2. 3-Nitrotirozin Oluşumunda Rol Alan Reaktif Türler	9
2.2.1. Süperoksit.....	9
2.2.2. Nitrik oksit.....	11
2.2.3. Peroksinitrit	17
2.3. Peroksinitrit ve 3-Nitrotirozin.....	22
2.4. 3-Nitrotirozin Ölçüm Yöntemleri	24
2.4.1. İmmünokimyasal metotlar	24

Sayfa

2.4.2. Analitik metotlar.....	25
2.5. Taurin	26
2.5.1. Taurinin biyosentezi	28
2.5.2. Taurinin taşınması	30
2.5.3. Taurinin atılımı ve reabsorbsiyonu.....	31
2.5.4. Taurinin dağılımı ve turnoverı	32
2.5.5. Taurin kaynakları.....	34
2.5.6. Taurin içeren peptitler.....	35
2.5.7. Taurinin biyolojik fonksiyonları.....	35
3. MATERYAL VE METOT.....	43
3.1. Deney Hayvanları.....	43
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	43
3.3. Yöntemler	44
3.3.1. Dokuda NOx tayini.....	44
3.3.2. Dokuda 3-NT tayini	45
3.3.3. Dokuda taurin tayini	47
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	49
4. BULGULAR	50
4.1. Dalak Dokusu NOx Düzeyleri	50
4.2. Dalak Dokusu 3-NT Düzeyleri	51
4.3. Dalak Dokusu Taurin Düzeyleri	52
5. SONUÇ	54

	Sayfa
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bazı serbest radikaller ve yarılanma ömürleri	3
Çizelge 2.2. Hücre ve dokularda üretilen ROS'lar	4
Çizelge 2.3. Hücre ve dokularda üretilen RNS'ler	5
Çizelge 2.4. cNOS ve iNOS arasındaki farklılıklar	14
Çizelge 2.5. Taurinin insan vücudundaki dağılımı	33
Çizelge 2.6. Bazı gıda maddelerinin taurin içerikleri	34
Çizelge 3.1. 3-NT tayininde HPLC'ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları	46
Çizelge 3.2. Taurin tayininde HPLC'ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları	48
Çizelge 4.1. Dalak dokusunda NOx, 3-NT ve taurin düzeyleri	50

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Nitrik oksitin sentezi	12
Şekil 2.2. Peroksinitritin reaksiyonları.....	20
Şekil 2.3. Tirozinin peroksinitrit tarafından nitasyonu	22
Şekil 2.4. Tirozinin peroksinitrit aracılı nitasyon mekanizmaları	23
Şekil 2.5. Taurinin yapısı	27
Şekil 2.6. Taurinin biyosentezi.....	29
Şekil 2.7. Taurinin proksimal tübül hücrelerinden taşınması.....	32
Şekil 2.8. Solunumsal patlama	36
Şekil 2.9. TauCl'nin immünregülatör etkisi.....	39
Şekil 3.1. 3-NT standart eğrisi.....	47
Şekil 3.2. Taurinin floreskamin ile derivatizasyonu.....	47
Şekil 3.3. Taurin standart eğrisi.....	49
Şekil 4.1. Dalak dokusu NOx düzeyleri.....	51
Şekil 4.2. Dalak dokusu 3-NT düzeyleri.....	51
Şekil 4.3. 3-NT standartına ait kromatogram	52
Şekil 4.4. Numuneye ait 3-NT kromatogramı.....	52
Şekil 4.5. Dalak dokusu taurin düzeyleri	53
Şekil 4.6. Taurin standartına ait kromatogram	53
Şekil 4.7. Numuneye ait taurin kromatogramı	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
HOCl	Hipokloröz asit
kDa	Kilodalton
mmol	Milimol
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NO[•]	Nitrik oksit
O₂^{•-}	Süperoksit
ONOO⁻	Peroksinitrit anyonu
ONOOH	Peroksinitröz asit
ONOOH[*]	Uyarılmış peroksinitrit
μM	Mikromolar
μmol	Mikromol
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
Kısaltmalar	Açıklama
LPS	Lipopolisakkarit
MPO	Miyeloperoksidaz
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PMNL	Polimorfonükleer Lökositler
SOD	Süperoksit Dismutaz
TauCl	Taurin kloramin
3-NT	3-Nitrotirozin

1. GİRİŞ

Nitrik oksit (NO[•]), son yıllarda tanınan, birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. Enzimatik olarak l-arjinin amino asitinden *nitrik oksit sentaz (NOS)*'ın farklı izoformları tarafından sentezlenir. Bunlardan sırasıyla nöronlarda ve vasküler endotelyumda bulunan *nöronal NOS (nNOS/Tip I NOS)* ve *endotelyal NOS (eNOS/Tip III NOS)* birlikte *yapısal NOS (konstitütif NOS/cNOS)* olarak adlandırılırlar. Aktiviteleri Ca⁺⁺ bağımlı olan cNOS'lar, fizyolojik fonksiyonlar için gerekli olan, düşük konsantrasyonlardaki ve kısa süreli NO[•] sentezini gerçekleştirirler. Diğer izoform olan *indüklenebilir NOS (iNOS/Tip II NOS)* ise, lipopolisakkaritler (LPS) gibi gram(-) bakterilerin ürünleri ve sitokinler tarafından uyarılarak, pek çok hücre tipinde Ca⁺⁺'dan bağımsız olarak fazla miktarlarda ve kontrol edilemeyen NO[•] üretimine neden olmaktadır [1, 2].

NO[•] fizyolojik konsantrasyonlarda, vasküler tonusun ve sistemik kan basıncının düzenlenmesi, trombosit ve lökosit adezyonunun kontrolü, nörotransmisyon, yara iyileşmesinin düzenlenmesi, infeksiyonlara karşı spesifik olmayan immün yanıtın sağlanması gibi pek çok önemli fonksiyona sahiptir. Bununla birlikte, iNOS aktivasyonu ile üretilen aşırı NO[•], moleküler oksijen veya diğer serbest radikallerle olan reaksiyonları yoluyla sitotoksik etkilere de yol açmaktadır [3, 4].

Süperoksit (O₂^{-•}), aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşan bir serbest radikaldir. Başlıca hücresel kaynakları, mitokondriyal elektron transportu ile NADPH oksidaz ve ksantin oksidaz gibi sitozolik enzimlerdir. O₂^{-•}'nin kimyasal reaktivitesi diğer radikallerle kıyaslandığında sınırlıdır. Ancak, hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olması sebebiyle radikal reaksiyonlarında önemli bir rol oynamaktadır [5, 6].

Çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen NO[•] ve O₂^{-•}, hızla birleşerek güçlü bir oksitleyici ve nitratlayıcı tür olan *peroksinitrit (ONOO⁻)*'i oluştururlar. Normal hücresel koşullarda ONOO⁻ oluşumu sınırlıdır. Çünkü, fizyolojik fonksiyonlar için üretilen NO[•] çok düşük konsantrasyonlardadır ve O₂^{-•}, *süperoksit dismutaz (SOD)*

enzimi tarafından hemen ortamdan giderilir. Ancak çoğu patolojik süreçte NO^\cdot ve O_2^\cdot üretimi spontan olarak uyarılır ve ONOO^\cdot oluşumu belirgin şekilde artar. Ne NO^\cdot , ne de O_2^\cdot güçlü oksidanlar olmamalarına karşın, ONOO^\cdot güçlü ve birçok biyolojik hedefe atak yapabilen çok yönlü bir oksidandır. DNA ile reaksiyonları sonucu modifiye bazların ve DNA kırıklarının oluşumuna neden olur. Lipit peroksidasyonunu indükler. Aynı zamanda, tirozin, triptofan, fenilalanin gibi aromatik amino asitlerle reaksiyona girerek nitratlanmış türevleri oluşturur. Bunlardan *3-Nitrotirozin (3-NT)*, ONOO^\cdot 'nin serbest ya da protein yapısında bulunan tirozin amino asitini nitratlaması sonucu oluşur. ONOO^\cdot 'nin fizyolojik pH'da kısa bir yarı ömre sahip olması nedeniyle, dokulardaki ve vücut sıvılarındaki 3-NT'nin varlığı, ONOO^\cdot üretiminin spesifik bir göstergesi olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır [7-11].

Taurin (2-aminoetansülfonik asit), metiyonin ve sistein metabolizmasından türevlenen, kükürt içeren bir β -amino asittir. Memelilerin pek çok hücre tipinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Safra asitlerinin konjugasyonu, detoksifikasyon, membran stabilizasyonu, hücresel Ca^{++} seviyesinin düzenlenmesi, osmoregülasyon, MSS ve retinanın gelişimi gibi önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Özellikle son yıllarda, antioksidan aktivitesine dair çalışmalar büyük önem kazanmıştır [12-14].

Bu bilgiler ışığında, LPS uygulanarak deneysel endotoksemi oluşturulan kobayların dalak dokularında, endotokseminin ONOO^\cdot oluşumundaki rolünün 3-NT tespiti aracılığıyla belirlenmesi ve taurinin antioksidan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serbest Radikaller

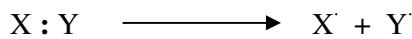
Atomlar ve kimyasal bileşikler, içerdikleri elektronları her orbitalde ikişer adet olmak üzere eşlenmiş şekilde ve zıt yönlü olarak içerirler. Orbitalerin bu şekilde zıt yönlü doyurulması, atom ve moleküllerin stabilitesini artırır, reaktivitesini azaltır. Elektron orbital teriminde, en dıştaki orbitalinde paylaşılmamış elektronu olan atom ya da molekül *serbest radikal* olarak tanımlanır. Herhangi bir atomun veya molekülün dış orbitalinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini artırır. Bu reaktivite, radikalın stabil olmayan elektronik konfigürasyonundan kaynaklanır. Serbest radikal reaktivitesinin önemi, çeşitli türlerin son derece kısa olan yarılanma ömürleriyle değerlendirilebilir (Çizelge 2.1) [15, 16].

Çizelge 2.1. Bazı serbest radikaller ve yarılanma ömürleri [16]

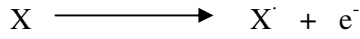
TÜRLER	SEMBOL	YARILANMA ÖMRÜ (37°C'de/sn)
Süperoksit Radikali	O ₂ ^{·-}	1.10 ⁻⁶
Hidroksil Radikali	OH [·]	1.10 ⁻⁹
Alkoksil Radikali	RO [·]	1.10 ⁻⁶
Peroksil Radikali	ROO [·]	1.10 ⁻²
Singlet Oksijen	¹ O ₂	1.10 ⁻⁶
Moleküler Oksijen	O ₂	>10 ²

Serbest radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşur. Bunlar;

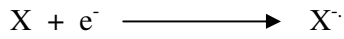
(1) Bir molekülü oluşturan kovalent bağın homolitik kırılması sonucu, bağı oluşturan iki elektronun her birinin ayrı atomlar üzerinde kalması,



(2) Radikal özelliği bulunmayan bir molekülün yapısındaki atomların birisinden elektron uzaklaştırılması,



(3) Bir molekül yapısına elektron eklenmesi sonucu reaktif özellik taşıyan yapıların oluşmasıdır [15].



2.1.1. Reaktif oksijen türleri

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir. Bunlar *Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species-ROS)* olarak adlandırılırlar. Moleküler oksijenin kendisi de, her biri farklı pi orbitaline yerleşmiş iki eşlenmemiş elektrona sahip olması sebebiyle bir *diradikal* olarak tanımlanır. ROS biyokimyasında anahtar rolü oynayan moleküller Çizelge 2.2’de verilmiştir [16].

Çizelge 2.2. Hücre ve dokularda üretilen ROS’lar [17]

REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ	
ADI	SEMBOL
Süperoksit Radikali	$O_2^{\cdot-}$
Hidroksil Radikali	OH^{\cdot}
Peroksil Radikali	ROO^{\cdot}
Alkoksil Radikali	RO^{\cdot}
Hidroperoksil Radikali	HO_2^{\cdot}
Hidrojen Peroksit	H_2O_2
Hipokloröz Asit	$HOCl$
Hipobromöz Asit	$HOBr$
Ozon	O_3
Singlet Oksijen	1O_2

2.1.2. Reaktif azot türleri

Biyolojik sistemler yapılarında +1'den +5'e kadar değişen farklı oksidasyon durumlarındaki azot atomu bulunduran çeşitli azot oksitlere sıklıkla maruz kalırlar. Oksidasyon durumları guanido azot ile nitrat arasında bir ara metabolit olan bu azot oksitlere *Reaktif Azot Türleri (Reactive Nitrogen Species-RNS)* adı verilir [18].

Çizelge 2.3. Hücre ve dokularda üretilen RNS'ler [18, 19]

REAKTİF AZOT TÜRLERİ	
ADI	SEMBOL
Nitrik Oksit (Azot Monoksit)	NO [•]
Azot Dioksit	NO ₂ [•]
Nitröz Asit/Nitrit	HNO ₂ /NO ₂ ⁻
Nitrik Asit/Nitrat	HNO ₃ /NO ₃ ⁻
Nitrozil Katyonu	NO ⁺
Nitrozil Anyonu	NO ⁻
Diazot Tetraoksit	N ₂ O ₄
Diazot Trioksit	N ₂ O ₃
Peroksinitrit	ONOO ⁻
Peroksinitröz Asit	ONOOH
Nitril (Nitronyum) Katyonu	NO ₂ ⁺
Nitril (Nitronyum) Klorür	NO ₂ Cl

2.1.3. Serbest radikallerin kaynakları

Serbest radikal kaynakları başlıca endojen ve eksojen kaynaklar olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Endojen Kaynaklar

A) Hücresel Solunum

- Mitokondriyal elektron transportu
- Heksoz monofosfat şanti

B) Normal Metabolik Olaylar

- Araşidonik asit metabolizması
- Yağ asitlerinin β -oksidasyonu
- Amino asit oksidasyonu
- Demir metabolizması
- Pürin oksidasyonu

C) Zenobiyotiklerin Biyotransformasyonu

- Mikrozomal elektron transportu (sitokrom p450)
- Peroksidatif oksidasyon

D) Doğal Stimülasyonla Fagositlerin Aktivasyonu

- Lökositler
- Doku makrofajları
- Kupffer hücreleri
- Clara hücreleri [20]

Eksojen Kaynaklar

A) Diyetel

- Doymamış yağ asitleri ve hayvansal proteinler açısından zengin, meyve-sebze bakımından fakir beslenme
- Obezite
- Aşırı demir ve bakır alımı
- Magnezyum eksikliği
- Gıdaların uygun olmayan koşullarda hazırlanması ve saklanması
- Kronik alkol tüketimi

B) Çevresel

- İyonize radyasyon
- Hava kirliliği
- Sigara dumanı

- Asbest, pestisitler
- Güneş ışığı
- Isı şoku
- Stres

C) İlaçlar

- Antineoplastik ajanlar
- Glutasyon tüketen ilaçlar
- Östrojen takviyesi [21]

2.1.4. Serbest radikallerin biyomoleküller üzerine etkileri

Serbest radikaller savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğları zaman organizmada çeşitli bozukluklara yol açarlar. Lipitler, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından farklı derecelerde etkilenirler. Serbest radikallerin bu etkileri aşağıdaki başlıklar halinde incelenebilir [6].

Lipitler

Biyomoleküller içerisinde serbest radikal ataklarına karşı en hassas olan sınıf lipitlerdir. Çünkü; özellikle membran lipitlerinin temel bileşenleri olan kolesterol ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (Poly Unsaturated Fatty Acid-PUFA) doymamış bağları serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girebilir. PUFA'nın serbest radikaller tarafından oksidatif yıkımı *Lipit Peroksidasyonu* olarak bilinir. Lipit peroksidasyonu, membran yapısında ve biyofiziksel özelliklerinde değişikliklere neden olarak direkt; reaksiyonlar sonucu biyolojik açıdan aktif çoğu metaboliti oluşturmasıyla indirek olarak hücre fonksiyonları üzerine etki etmektedir [6, 22].

Nükleik Asitler

Serbest radikaller, DNA'nın hem heterosiklik bazlarıyla hem de deoksiribozla reaksiyona girebilirler. Özellikle de sitozin ve guanin bazları, Cu^{+2} iyonlarının DNA'da G-C içeren bölgelerde daha yaygın olarak bulunması sebebiyle oksidatif hasara karşı daha hassastır. Kloroplast ve mitokondrielerde olduğu gibi potansiyel ROS/RNS üretim alanlarına yakın olan DNA'lar da oksidatif hasara sıklıkla maruz kalırlar. Serbest radikaller, DNA'da abazik alanların oluşumu, tek/çift iplikte kırıklar, iplik içi ve/veya iplikler arası ya da DNA-protein çapraz bağlarının oluşumu gibi yapısal değişikliklere sebep olurlar [23, 24].

RNA'nın oksidasyonu ve bunun biyolojik etkileri ise, DNA ile karşılaştırıldığında daha az çalışılmıştır. RNA, geniş bir sitozolik yayılıma sahip olması nedeniyle reaktif türlerin ataklarına karşı DNA'ya göre muhtemelen daha hassastır. Tek iplikli olması, nükleer DNA'da olduğu gibi koruyucu histonlarla çevrili olmayışı ve tamir mekanizmasının DNA'ya oranla daha zayıf olması da RNA'yı atakların potansiyel bir hedefi haline getirebilir. Ayrıca RNA'daki oksidatif hasarın, DNA'daki oksidatif modifikasyonlar gibi kalıtsal ve mutajenik olmaması da tespitini güçleştirmektedir. Oksitlenmiş mRNA'ların gerektiği gibi translasyon işlemini gerçekleştiremediği ve agregasyona yatkın hatalı proteinleri ürettiği belirlenmiştir [24-26].

Karbonhidratlar

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu α -oksoaldehitler (metilglioksal, glioksal) ve α -oksoasitler gibi, DNA, RNA ve proteinlerle çapraz bağlar oluşturabilme yeteneğine sahip, oldukça sitotoksik ürünler meydana gelir. Aynı zamanda glioksal ve metilglioksalin, DNA'da baz delesyonlarına ve hatalı baz çiftlerinin oluşumuna neden oldukları bilinmektedir. Karbonhidratların oksidasyon ürünleri ve bunların biyomoleküller üzerindeki etkileri konusunda pek çok çalışma mevcutken; serbest radikallerin karbonhidratlarla reaksiyonlarına ve direk karbonhidrat yapısına etkilerine ilişkin çalışmalar sınırlıdır. Lurie ve ark. (2003) serbest radikallerin, bağ

dokusunun önemli bir mukopolisakkariti olan hiyaluronik asit üzerindeki etkilerini incelemiş ve ROS'un (özellikle H₂O₂) hiyaluronik asitin depolimerizasyonunda rol oynadığını kanıtlamışlardır [27, 28].

Proteinler

Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için özellikle triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Serbest radikaller, çeşitli mekanizmalarla protein omurgasının oksidasyonuna, peptit bağlarının parçalanmasına, proteinler arası çapraz bağlı türevlerin oluşumuna, amino asitlerin klorlanması ve nitrasyonuna neden olabilirler. Serbest radikal reaksiyonları sonucunda proteinlerin üç boyutlu yapılarının bozulması sebebiyle, hücrelerde katalitik olarak daha az aktif veya inaktif enzim formları oluşur. Proteinlerde proteolitik yıkıma karşı dirençte, fragmentasyon ve agregasyonda artış meydana gelir [6, 29].

2.2. 3-Nitrotirozin Oluşumunda Rol Alan Reaktif Türler

2.2.1. Süperoksit (O₂⁻)

Moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu kararsız bir yapı olan *süperoksit radikal anyonu* meydana gelir.

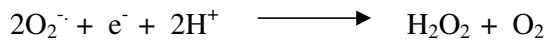


O₂⁻, yarılanma ömrü nispeten uzun bir serbest radikal olmakla birlikte, oluşuktan sonra bulunduğu yerden çevreye dağılma yeteneğinin düşük olması sebebiyle tek başına direk etkisi fazla değildir. Asıl önemi, peroksinitrit (ONOO⁻), hidroksil radikali (OH[·]), hidrojen peroksit (H₂O₂), singlet oksijen (¹O₂) ve perhidroksil

radikallerini (HO_2^\cdot) kapsayan pek çok serbest radikalın oluşumuna sebep olmasından kaynaklanır [6, 16].

$\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin en önemli hücrenel kaynakları, mitokondri, endoplazmik retikulum ve nükleusta bulunan elektron transportu ile; NADH/NADPH oksidazlar ve ksantin oksidaz gibi sitozolik oksidazlardır. $\text{O}_2^{\cdot-}$, normal koşullarda hücrelerde nanomolar konsantrasyonlardan daha az bulunurken, hipoksi, zenobiyotiklerin metabolizması, inflamasyon, iskemi-reperfüzyon gibi patolojik durumlarda üretimi artar. Nötrofil NADPH oksidazlar da enfeksiyon esnasında, spesifik olmayan konak savunmasında milimolar konsantrasyonlarda $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretebilirler [5, 19, 30].

$\text{O}_2^{\cdot-}$, düşük pH değerlerinde daha reaktif olup, protonlanarak kendisinden çok daha güçlü bir oksidatif tür olan HO_2^\cdot 'yi oluşturur. $\text{O}_2^{\cdot-}$ genellikle fagolizozomlar gibi asidik bir çevrede HO_2^\cdot formunda bulunurken, fizyolojik pH'da protonlanmış formu %1'den daha azdır. $\text{O}_2^{\cdot-}$ aynı zamanda biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin en önemli kaynağıdır. $\text{O}_2^{\cdot-}$, asidik pH'da bir elektron alıp spontan olarak H_2O_2 'yi oluşturabilir. Nötral veya daha yüksek pH'da ise, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu *süperoksit dismutaz (SOD)* enzimi tarafından katalizlenir. $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin enzimatik dismutasyonu ($k: 2.10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), spontan dismutasyondan ($k: 2.10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) 10^4 kat daha hızlı olarak gerçekleşir [6, 16, 31].



$\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonunu katalizleyen SOD'lar, aktif bölgelerinde metal iyonları içeren metaloproteinlerdir. Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD ve Ni-SOD olmak üzere 4 farklı tipi bulunur. Bunlardan Fe ve Ni-SOD'lar prokaryotlarda ve bitkilerde, Cu/Zn ve Mn-SOD'lar ise, memeli hücrelerinde tanımlanmıştır. Cu/Zn-SOD, sitoplazma, nükleus ve peroksizomlarda bulunur. Dimerik yapıya sahiptir. Cu (II), enzimin aktivitesinden sorumluyken; Zn (II), enzim konformasyonunun stabilizasyonunu sağlar. Tetramerik yapıya sahip olan Mn-SOD ise, memeli hücrelerinin mitokondrilerinde yer alır. Her iki enzim de aynı reaksiyonu katalizlemektedir. Özellikle oksijen kullanımının fazla olduğu dokularda SOD

aktivitesi fazladır. Buna karşılık, ekstraselüler sıvılarda düşüktür. Endotoksemi gibi bazı patolojik durumlar Cu/Zn-SOD ekspresyonunu hızlı bir şekilde azaltmaktadır [6, 31].

2.2.2. Nitrik oksit (NO)

Biyolojik sistemlerde oluşan reaktif azot türlerinin en önemlisi oksidasyon durumu +2 olan nitrik oksit (NO/azot monoksit)'tir. NO'nun kimyasal özelliklerine ilişkin ilk çalışmalar 1772 yılında J. Priestly tarafından yapılmıştır. 1914 yılında H. Dale ilk kez in vivo olarak NO'nun varlığını ortaya koymuştur. 1980'de Furchgott ve Zawadski, vasküler halkada asetilkoline yanıt olarak endotel hücrelerden salınarak gevşemeye sebep olan bir faktörün varlığını tanımlamışlar ve *Endotel Kaynaklı Gevşeme Faktörü (Endothelial Derived Relaxing Factor-EDRF)* olarak adlandırmışlardır. 1987'de ise, Ignarro ve Palmer, birbirinden bağımsız olarak yaptıkları çalışmalarda EDRF'nin aslında NO olduğunu ve NO üretiminin l-arjinin varlığına bağlı olduğunu göstermişlerdir. Daha sonraki yıllarda NO ile ilgili çalışmalar hızla artmış, NO'nun fizyolojik ve patolojik olaylardaki rollerinin boyutları genişlemiş ve NO organizmadaki önemi nedeniyle yılın molekülü seçilmiştir [2, 32-34].

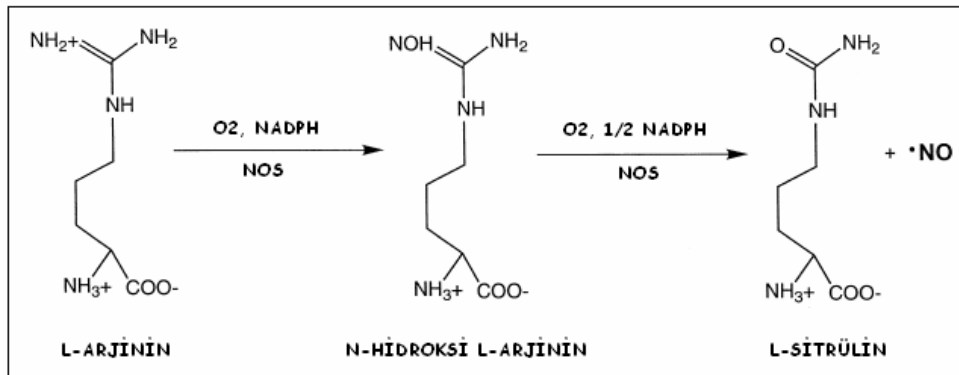
Renksiz ve son derece toksik bir gaz olan NO, 20-30 saniyelik yarı ömre sahip bir serbest radikaldir. Yüksüz ve lipofilik özellikte bir molekül olması sebebiyle membranlardan kolaylıkla geçebilir. NO, pek çok biyomolekülle zayıf reaktiviteye sahip olmasına karşın, diğer serbest radikallerle olan reaksiyonları oldukça hızlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki NO, vücutta düz kasların gevşemesinden, nöronal fonksiyonların düzenlenmesine; yara iyileşmesinden, enfeksiyonlara karşı immün yanıtın sağlanmasına kadar pek çok önemli fonksiyona sahiptir. NO'nun bu fonksiyonları fizyolojik homeostazın sürdürülmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte NO'nun yüksek konsantrasyonlardayken, çeşitli enzimlerin aktivitelerini inhibe ederek, lipid peroksidasyonunu indükleyerek, antioksidanların azalmasına veya DNA'da mutasyonlara sebep olarak aynı zamanda sitotoksik etkilere sahip olduğu da gösterilmiştir [1, 2, 30, 35].

Nitrik Oksitin Biyosentezi ve Nitrik Oksit Sentazlar

NO, esansiyel bir amino asit olan l-arjininin terminal guanido azotunun hidroksilasyonu yoluyla l-sitrüline dönüşmesi esnasında oluşan bir yan üründür. Bu reaksiyon *Nitrik Oksit Sentaz (NOS)* olarak adlandırılan bir grup enzim tarafından katalizlenir. Memeli sistemlerinde NO sentezi ilk olarak vasküler endotelyum, beyin ve makrofajlarda tanımlandığı için NOS'lar, orjin aldıkları dokuya, fonksiyonel ve yapısal özelliklerine göre 3'e ayrılırlar;

- Nöronal NOS (nNOS/ Tip I NOS)
- İndüklenebilir NOS (iNOS/ Tip II NOS)
- Endotelyal NOS (eNOS/ Tip III NOS)

Bunlardan nNOS ve eNOS birlikte *cNOS (konstitütif/yapısal NOS)* olarak adlandırılır. cNOS ve iNOS arasında pek çok yapısal ve fonksiyonel farklılık olmasına karşın, memelilerde amino asit sekansı bakımından %50 oranında homoloji gösterdikleri belirlenmiştir. NOS'un tüm izoformları substrat olarak l-arjinin ve moleküler oksijene; kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiopterin (BH4)'e gereksinim duyarlar [33, 36, 37].



Şekil 2.1. Nitrik oksitin sentezi [7]

İlk saflaştırılan ve klonlanan izoform nNOS'tur. nNOS, dimerik yapıda, 1434 amino asitlik, sitozolik bir proteindir. Nöronların yanı sıra iskelet kasında, pankreatik beta hücrelerinde, erkek eşey organlarında, hipofiz bezinde, adrenal medullada ve macula densa'da da saptanmıştır. eNOS ise, 1203 amino asitlik, dimerik yapıda bir proteindir. Membrana bağlı olarak bulunur. Genellikle vasküler endotel hücrelerde eksprese olur. Aynı zamanda, hipokampüsün piramidal nöronlarında ve trombositlerde de ekspresyonuna dair bilgiler bulunmaktadır [2, 37].

cNOS'ların aktivitesi Ca^{++} -kalmodulin bağımlıdır. Hücre içi iyonize Ca^{++} 'u arttıran her türlü etkileşimde (asetilkolin, bradikinin vb.), Ca^{++} 'un kalmodulin reseptörlerine bağlanmasıyla bir kompleks oluşur. Bu kompleks, cNOS'ları aktifleştirerek NO sentezlenmesini sağlar. Ca^{++} 'u arttıran etki ortadan kalktığında ise, hücre içi Ca^{++} azalmaya başlar ve enzim aktivitesi ortadan kalkarak NO sentezi durur. Bu nedenle cNOS'lar, normal biyolojik sistemlerde kısa süreli ve düşük konsantrasyonlardaki NO sentezinden sorumludur [2, 30, 33, 36].

NOS'un diğer bir izoformu olan iNOS ise, tetramerik yapıda, 1153 amino asitlik, sitozolik bir enzimdir. cNOS'lardan farklı olarak aktivitesi hücre içi Ca^{++} artışına bağlı değildir. iNOS, lipopolisakkarit (LPS, endotoksin) gibi bakteriyel ürünler ve sitokinler ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IFN-\gamma$) tarafından transkripsiyonel olarak indüklenir. iNOS'un indüksiyonu; başta makrofajlar, hepatositler, vasküler düz kas hücreleri ve kardiyomyositler olmak üzere pek çok hücre tipinde, hatta fizyolojik şartlarda NO üretimi olmayan hücrelerde bile uzun süreli (20 saat) ve yüksek konsantrasyonlarda (nanomolar) NO üretimiyle sonuçlanır. Bu değer, cNOS'lar tarafından üretilen NO'dan yaklaşık 1000 kat daha fazladır [3, 10, 33, 36-38].

cNOS'lar Ca^{++} artışına bağlı olarak kısa sürede aktive olup NO sentezlemeye başlarken, iNOS'un ekspresyonu için genellikle birkaç saate ihtiyaç vardır. $IFN-\gamma$ ve LPS ile uyarılmış makrofajlarda iNOS mRNA'sı 2 saat, iNOS proteini ise 4 saat sonra tespit edilmiş ve iNOS proteininin birkaç gün boyunca aktif olarak hücrede kaldığı belirlenmiştir [32, 33].

cNOS ve iNOS aktiviteleri, N-nitro-l-arjinin (L-NNA) ve NG-monometil-l-arjinin (L-NMMA) gibi l-arjinin türevleri tarafından inhibe edilebilir. Ayrıca cNOS'tan farklı olarak glukokortikoidler, IL-4, IL-10 gibi sitokinler de, iNOS mRNA'sının ekspresyonunu inhibe etmektedir. cNOS ve iNOS'lar arasındaki bazı temel farklılıklar Çizelge 2.4'te verilmiştir [32, 33].

iNOS tarafından üretilen NO, fizyolojik sınırların çok üzerinde olması nedeniyle çeşitli patolojik etkilere sahiptir. Bunlardan en önemlisi, hücrel O_2^- varlığında ileri derecede sitotoksik bir ürün olan *peroksinitrit* molekülünün oluşumunda rol oynamasıdır [1].

Çizelge 2.4. cNOS ve iNOS arasındaki farklılıklar [2, 32, 39]

ÖZELLİK	cNOS	iNOS
Ca ⁺⁺ 'a Bağlılık	Var	Yok
Düzenleme	Ca ⁺⁺ /Kalmodulin	Gen Transkripsiyonu
NO Üretimi	Düşük (pM)	Yüksek (nM)
Uyaran	Asetilkolin, Bradikinin, ADP/ATP, Stres, Serotonin, Noradrenalin	NF-(Kappa) Beta, LPS, IFN- γ
Uyarana Yanıt	Ani	Geç
NO Üretim Süresi	Kısa	Uzun
İnhibitörler		
• L-Arjinin Analogları	+	+
• Glukokortikoidler	-	+

Nitrik Oksitin Fizyolojik Etkileri

Günümüzde NO'nun en iyi bilinen fizyolojik etkisi, guanilat siklaz enzimi ile olan etkileşimidir. Bu etki cNOS'lar tarafından üretilen düşük konsantrasyonlardaki (< 1 μ M) NO'yu gerektirir. NO, sentezini takiben difüze olduğu hücrelerde, sitozolik guanilat siklazın aktif bölgesinde bulunan hem demirine geri dönüşümlü olarak bağlanır. Bu bağlanmanın etkisiyle aktifleşen guanilat siklaz, guanozin trifosfatı (GTP), guanozin 3,5-siklik monofosfat (cGMP)'a dönüştürür. Hücrelerde artan

cGMP seviyeleri de, protein kinazları ve iyon kanallarını aktif hale getirerek hücre içi Ca^{++} 'un azalmasına sebep olur. NO'nun bu mekanizma yoluyla gerçekleştirdiği bazı hücre koruyucu ve düzenleyici etkileri şöyle sıralanabilir;

- Vasküler ya da vasküler olmayan düz kasların gevşemesini sağlar. Böylece sistemik kan basıncının ve kan akışının düzenlenmesinde rol oynar [30, 37]
- Trombositlerin agregasyonunu, adezyonunu ve aktivasyonunu inhibe eder. Pıhtı oluşumunun erken fazının düzenlenmesinde görev alır [8, 32]
- Lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu ve migrasyonunu önler. Lenfosit aktivasyonunu indirgeyerek, kronik ve akut inflamatuvar reaksiyonları düzenler [1, 40]
- MSS ve ÇSS'de nörotransmitter olarak fonksiyon gösterir. Bilinen en düşük ağırlıklı organik nörotransmitterdir. MSS'de, sinaptik aktivitenin artırılmasında, koku alma, görme, ağrıyı algılama ve hafıza oluşması gibi işlevlerde rol oynar. ÇSS'de ise, solunum fonksiyonunda, gastrointestinal sistem motilitesinde ve mesane sfinkter işlevinde etkilidir [36, 41].

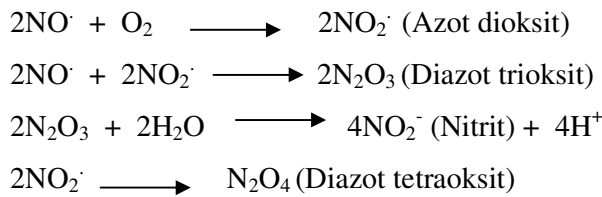
NO'nun yukarıda belirtilen etkilerinin yanı sıra cGMP'ten bağımsız biyolojik etkileri de bulunmaktadır.

- Siklooksijenazlar gibi bazı enzimlerin hem gruplarına bağlanarak aktivasyonlarını sağlar [39]
- Peroksil radikali (RO_2)'ni yakalayabilmesi nedeniyle güçlü bir lipit peroksidasyonu inhibitörüdür [35, 39]
- Beta hücrelerinden insülin üretiminin kontrolüne katkıda bulunur [33]

- Antibakteriyel, antiparazitik ve antitümöral etkiye sahiptir. Makrofajlar tarafından iNOS yoluyla sentezlenen NO \cdot , mikroorganizmalardaki veya tümör hücrelerindeki enzimlerin demir-sülfhidril gruplarına bağlanarak DNA sentezini ve solunum zincirini inhibe eder. Böylece, spesifik olmayan bağışıklıkta ve konak doku savunmasında önemli bir rol oynar. Değişik hücre tiplerinde yapılan in vitro çalışmalarda, NO \cdot 'nun; bakteri, helmint, mikobakter, protozoalar, parazitler, bazı mantar ve virüslerin replikasyonunu sınırlandırdığı ve hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu etkilerini de, enzimlerin demir-sülfhidril gruplarıyla etkileşimi yoluyla gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir [1, 2, 32, 33].

Nitrik Oksitin Sitotoksik Etkileri

NO \cdot 'nun sitotoksik etkileri, yüksek konsantrasyonlarında (>1 μ M), O $_2$ ve O $_2^{\cdot-}$ gibi diğer moleküllerle olan reaksiyonları sonucunda oluşan çok sayıdaki toksik türle ilişkilidir. Genellikle inflamatuvar şartlar gibi iNOS aktivasyonunun meydana geldiği durumlarda milimolar konsantrasyonlara ulaşabilen NO \cdot , O $_2$ varlığında stabilitesini koruyamaz ve oksitlenerek *reaktif azot oksit ürünleri (NO $_x$)*'ni oluşturur [2, 8, 30, 36].



NO \cdot ve NO \cdot 'nun oksidasyonu ile oluşan NO $_2\cdot$, N $_2$ O $_3$ ve N $_2$ O $_4$ gibi türler, nitrozilasyona sebep olan oldukça güçlü ajanlardır. Primer ve sekonder aminleri nitrozilleyerek karsinojen nitrozaminleri oluşturabilirler [2, 10].

NO \cdot 'nun diğer bir önemli reaksiyonu da O $_2^{\cdot-}$ ile birleşerek *peroksinitrit (ONOO \cdot)*'i oluşturmasıdır. ONOO \cdot , özellikle asidik pH'da OH \cdot benzeri ürünleri oluşturmak üzere parçalanan, güçlü bir oksidan ve sitotoksik bir türdür. Pek çok hücre tipi

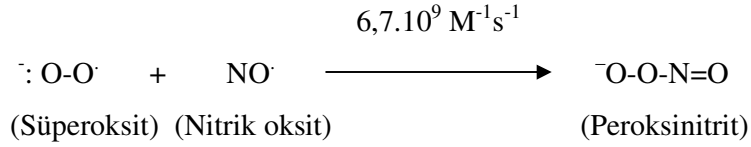
aktivasyonları esnasında hem NO^\cdot hem de $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretebildiği için bu reaksiyonun biyolojik önemi oldukça fazladır [3, 18].

NO^\cdot ve NO^\cdot 'dan türevlenen bu reaktif türlerin hücrelerdeki başlıca sitotoksik etkileri şunlardır;

- Antioksidanların azalmasına sebep olurlar [39]
- Deaminasyon, iplik kırıkları, alkilasyon ve oksidasyon yoluyla DNA'da hasar oluştururlar. Aynı zamanda, DNA tamir enzimlerini ve ribonükleotid redüktazın inhibisyonu yoluyla DNA sentezini inhibe ederler [35, 39, 41]
- Alkil transferaz, NAD dehidrojenaz, NADH-ubikion oksidoredüktaz, asotinaz, glutatyon redüktaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz ve protein kinaz c gibi anahtar enzimlerin inaktivasyonuna neden olurlar [39, 41]
- Geçiş metalleri ile olan reaksiyonları sonucu lipid peroksidasyonunu başlatabilirler [2, 39]
- Membran reseptörlerini ve iyon taşıyıcılarını inhibe ederler [39].

2.2.3. Peroksinitrit (ONOO^\cdot)

Peroksinitrit, çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen NO^\cdot ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin, memeli fizyolojisindeki en hızlı reaksiyonlardan biriyle ($k: 6,7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) birleşmeleri sonucu oluşan oldukça güçlü ve 1,9 saniyelik yarı ömrüyle nispeten daha uzun ömürlü bir oksidandır. NO^\cdot ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin eşlenmemiş elektronları birleşerek yeni ve stabil bir N-O bağı oluşturduğu için ONOO^\cdot bir serbest radikal değildir [11, 38, 42, 43].



Normal koşullarda hücrelerdeki ONOO⁻ üretimi sınırlıdır. Çünkü; fizyolojik fonksiyonlar için üretilen NO[·] miktarı yaklaşık 10-100 nM kadardır ve bu değer O₂^{-·}'yi ortamdaki uzaklaştıran hücre içi SOD konsantrasyonundan (5-10 µM) oldukça düşüktür. Ancak, endotoksemi gibi çoğu patolojik süreçte NO[·] ve O₂^{-·} üretimi spontan olarak uyarılır. Bu durumda NO[·], O₂^{-·} ile reaksiyona girmek için SOD'la yarışacak kadar yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Sonuçta, NO[·] ve O₂^{-·}, O₂^{-·}'nin SOD tarafından dismutasyon hızının (k: 2,5.10⁹ M⁻¹s⁻¹) yaklaşık 2-3 katı kadar daha hızlı bir reaksiyonla ONOO⁻'yu oluştururlar. NO[·] ve O₂^{-·} konsantrasyonlarındaki her 10 kat artış, ONOO⁻ oluşumunda 100 kat artışa sebep olduğu için, NO[·] ve O₂^{-·} üretiminin uyarıldığı şartlarda dokulardaki ONOO⁻ miktarı toksik seviyelere ulaşabilir [5, 9, 10, 30, 44].

NO[·] saniyeler süren bir yarı ömre sahiptir ve hidrofobik yapısı sayesinde membranlardan kolayca geçerek sentezlendiği alandan diğer hücrelere difüze olabilir. Buna karşılık O₂^{-·}, SOD tarafından yıkılmadan önce milisaniyeden bile daha az olan yarı ömrüyle hücre içinde çok kısa mesafelere taşınabilir ve membranlardan sadece anyon kanalları aracılığıyla geçebilir. Bu nedenle, ONOO⁻ oluşumu başlıca O₂^{-·}'nin üretim alanlarında gerçekleşir [9, 45].

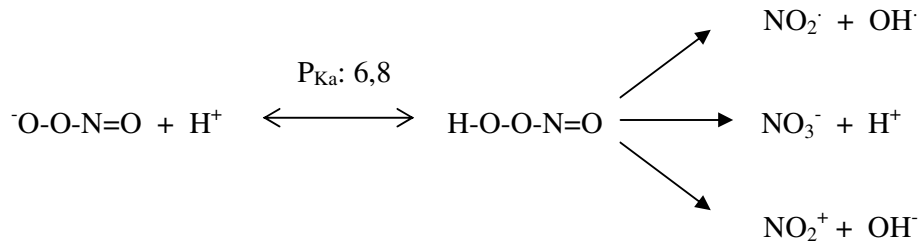
Biyolojik sistemlerde peroksinitritin başlıca 3 aktif formda bulunduğu tahmin edilmektedir. Bunlar;

- (1) ONOO⁻ (Peroksinitrit Anyonu)
- (2) ONOOH (Peroksinitröz Asit)
- (3) ONOOH* (Uyarılmış Peroksinitrit)'tir [9].

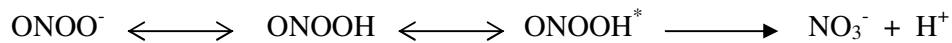
ONOO⁻, ON-OO kısmi çift bağının yapısı sebebiyle cis ve trans izomerleri şeklinde bulunur. NO[·] ve O₂^{-·} tarafından üretilen ONOO⁻ ise, cis konformasyonundadır. İki

izomer arasında yaklaşık 20 kcal/mol gibi oldukça yüksek bir enerji bariyeri bulunması nedeniyle ONOO^- , fizyolojik sıcaklık ve pH'da trans formuna izomerize olamaz. ONOO^- 'nin bu alışılmadık geometrik stabilitesi, peroksinitrit toksisitesine katkıda bulunan önemli faktörlerden biridir. Çünkü ONOO^- , stabil cis konformasyonundayken ONOOH 'a protonlanmadan önce oldukça uzak hücresel hedeflere ulaşabilir. Fizyolojik pH'da ONOO^- için membran geçirgenliği yaklaşık $8 \cdot 10^{-4}$ cm/sn olarak hesaplanmıştır ve bu değer O_2^- için hesaplanandan 400, OH^- için hesaplanandan ise 10 000 kat daha fazladır [7, 9, 19, 43].

ONOO^- fizyolojik pH'da protonlanarak konjuge asiti ONOOH 'ı oluşturur. ONOOH , stabil bir molekül değildir ve kolayca molekül içi yeniden düzenleme ile nitrat (NO_3^-)'a izomerize olur. Aynı zamanda, homolitik parçalanmayla OH^- ve NO_2^- 'yi; heterolitik parçalanmayla da NO_2^+ ve OH^- 'i oluşturabilir [9, 11, 38, 42].

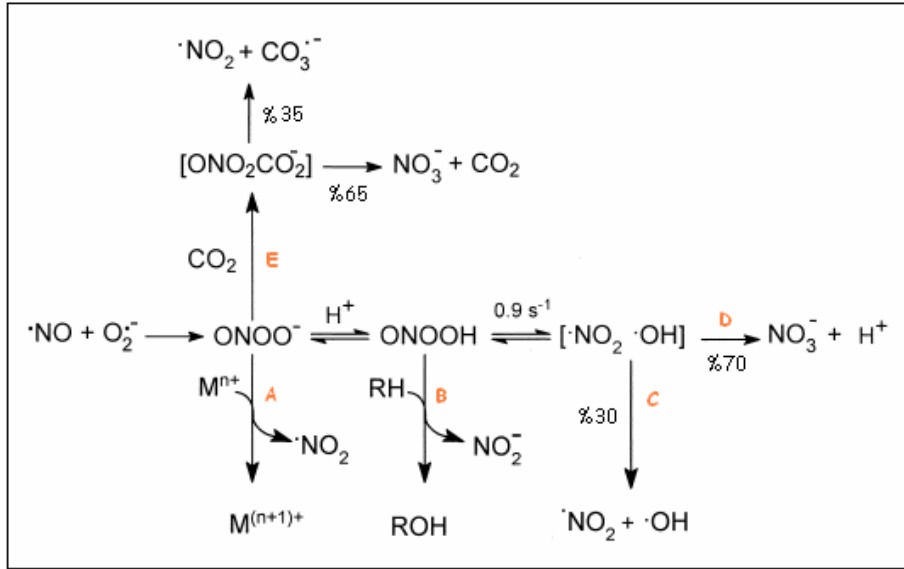


ONOOH^* ise, ONOOH 'ın NO_3^- 'e izomerizasyonu esnasında oluşan kısa ömürlü bir ara bileşiktir ve kimyasal yapısı tam olarak bilinmemektedir [9].



Peroksinitrit biyolojik etkilerini başlıca 3 farklı reaksiyon yoluyla gerçekleştirmektedir. Bunlar;

- (1) Direk redoks reaksiyonları
- (2) ONOOH aracılı reaksiyonlar
- (3) CO_2 ile reaksiyonlar'dır [45].



Şekil 2.2. Peroksinitritin reaksiyonları [45]

ONOOH'ın direk reaksiyonları, geçiş metallerinin $1 e^-$ oksidasyonu (Şekil 2.2 a) ile; tiyoller, sülfhidril grupları ve aminlerle $2 e^-$ oksidasyon reaksiyonlarını (Şekil 2.2 b) kapsamaktadır. Fizyolojik pH'da ONOO⁻'nin, H₂O₂'den yaklaşık 1000 kat daha yüksek bir oranda sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girdiği belirlenmiştir [7, 10, 45].

Peroksinitritin ONOOH aracılı etkileri, NO₂⁺, OH⁻, NO₂[·] ve NO₃⁻ gibi bir dizi sitotoksik ürünü oluşturmasıyla ilgilidir (Şekil 2.2 c,d). ONOOH'ın homolitik parçalanmasıyla oluşan OH⁻, bilinen en reaktif radikallerden biridir. NO₂⁺ ve NO₂[·] ise, oksidatif hasara sebep olma yetenekleri çok iyi tanımlanmış türlerdir. ONOO⁻, bu ürünler yoluyla tirozin, triptofan, fenilalanin gibi aromatik amino asitlerin, DNA bazlarının, düşük molekül ağırlıklı antioksidanların nitrasyonu ve oksidasyonunda rol oynar [4, 7, 42].

ONOO⁻'nin CO₂ ile olan reaksiyonu ise oldukça hızlıdır ($k: 5,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 37°C) ve birleşerek kısa ömürlü bir ara bileşik olan nitrozoperoksikarbonat (ONOOCO₂)'ı oluştururlar. ONOOCO₂ de, ya homolitik parçalanmayla NO₂[·] ve CO₃^{·-} (karbonat radikali)'ü ya da yeniden molekül içi düzenlemeyle nitrokarbonat (O₂NOCO₂)'ı oluşturur (Şekil 2.2 e). CO₂ ile olan bu reaksiyonun, ONOO⁻'nin nitratlama

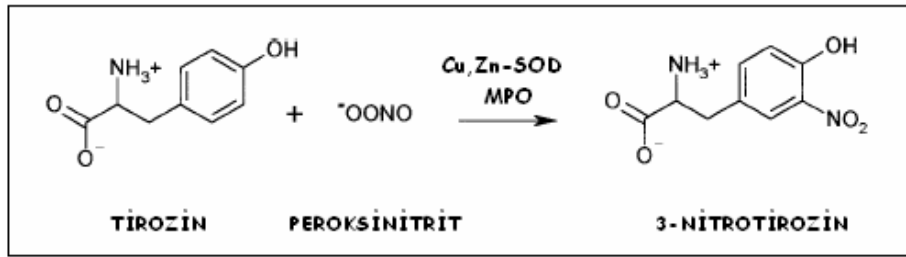
kapasitesini belirgin bir şekilde arttırırken, oksidatif kapasitesini azalttığı in vitro çalışmalarla gösterilmiştir [7, 9, 44].

Peroksinitritin bu reaksiyonları aracılığıyla gerçekleştirdiği bazı sitotoksik etkileri şöyle sıralanabilir;

- Hücre membranlarındaki çeşitli iyon pompalarını, Ca^{++} ile aktive olan potasyum kanallarını ve membran Na^+/K^+ ATPaz aktivitesini inhibe eder [33, 46]
- Lipit peroksidasyonunu başlatır [8, 10]
- NAD, BH4 gibi moleküllerin oksidasyonu yoluyla, aktivasyonları bu moleküllere bağlı enzimlerde inaktivasyona neden olur [46]
- Sülfhidril grubu ve geçiş metalleriyle olan yüksek reaktivitesi sebebiyle, çok fazla miktarda demir-kükürt içeren proteinlere sahip olan mitokondriyal solunum zincirini inhibe eder [9]
- Mitokondriyal hasar, Ca^{++} homeostazının bozulması, kaspazların aktivasyonu, hücre sinyallerinin iletiminde bozukluklar ve DNA hasarı yoluyla nekroz veya apoptozda rol oynar [46]
- Glutatyon, sistein ve askorbik asit gibi önemli antioksidanları okside eder [11, 46]
- Tirozin, metiyonin, triptofan gibi aromatik amino asitlerin nitrasyonu ve oksidasyonu, pek çok yapısal proteinin ve enzimlerin inaktivasyonuna sebep olur [8, 46].

2.3. Peroksinitrit ve 3-Nitrotirozin

Peroksinitritin proteinlerle olan reaksiyonlarından biri, proteine bağlı veya serbest olarak bulunan tirozin amino asitini çeşitli mekanizmalarla orto pozisyonundan (3. karbon atomundan) nitrolayarak, stabil bir son ürün olan *3-Nitrotirozin (3-NT)*'i oluşturmasıdır. Bu nitrasyon reaksiyonu spontan olarak ilerleyebileceği gibi, geçiş metalleri ve Cu/Zn-SOD, MPO gibi metaloproteinler tarafından da katalizlenebilir [4, 7, 8].



Şekil 2.3. Tirozinin peroksinitrit tarafından nitrasyonu [8]

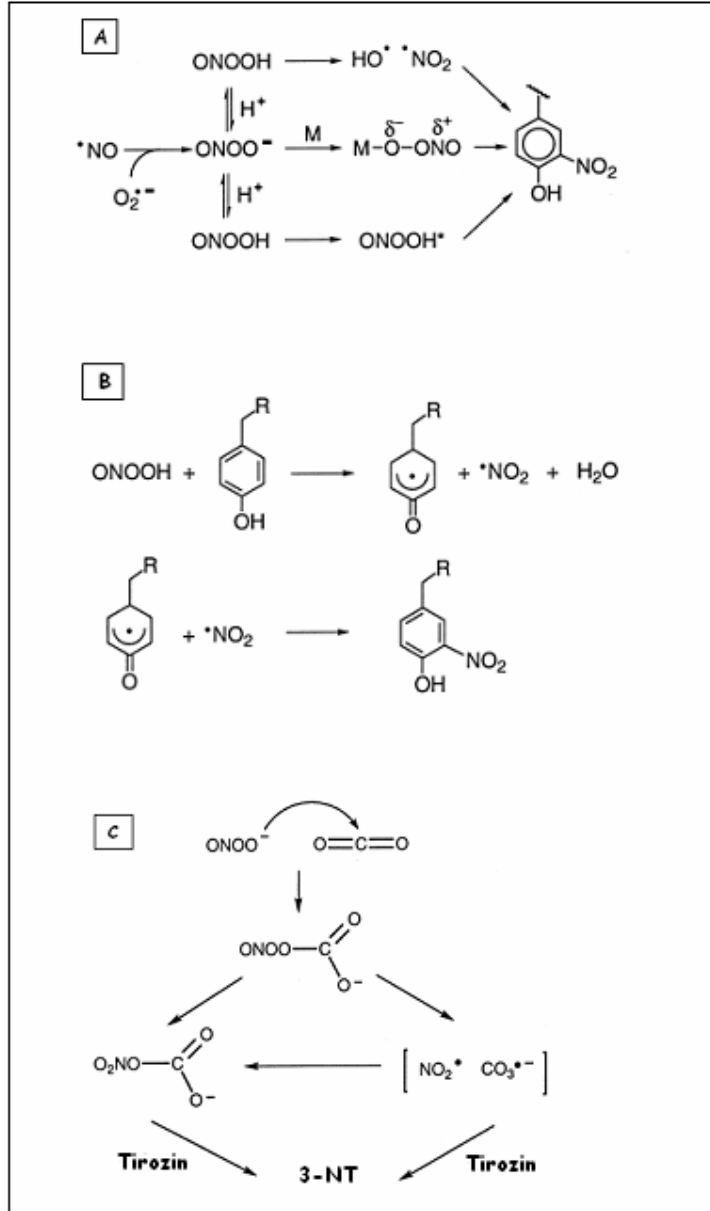
Tirozinin peroksinitrit aracılı nitrasyonunda farklı mekanizmaların rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bunlar;

A) ONOO⁻, geçiş metalleriyle (M) reaksiyonu sonucu, güçlü bir nitratlayıcı tür olan NO₂⁺’yi oluşturur ve NO₂⁺ tirozin nitrasyonuna neden olabilir. ONOOH ise, ya homolitik parçalanmayla oluşturduğu OH[·] ve NO₂[·] radikalleri aracılığıyla ya da ONOOH^{*} üzerinden tirozini nitratlayabilir (Şekil 2.4 a) [7, 18].

B) ONOOH doğrudan tirozinle etkileşerek tirozil radikalini, NO₂[·] ve H₂O’yu oluşturur. Tirozil radikali ile NO₂[·] arasındaki radikal bileşimi ise, nitrotirosin oluşumuyla sonuçlanabilir (Şekil 2.4 b) [7, 47].

C) ONOO⁻’nun fizyolojik şartlarda CO₂ ile olan reaksiyonu sonucu oluşan ONOOCO₂ de, ya homolitik parçalanarak oluşturduğu NO₂[·] yoluyla ya da molekül

içi yeniden düzenlemeyle oluşan O_2NOCO_2 aracılığıyla tirozin nitrasyonuna katılabilir (Şekil 2.4 c) [7, 29].



Şekil 2.4. Tirozinin peroksinitrit aracılı nitrasyon mekanizmaları [7]

İn vivo 3-NT oluşumunun ilk kanıtı 1990 yılında Ohshima ve arkadaşları tarafından insan idrarında serbest nitrotirozin ve onun deaminlenmiş/dekarboksillenmiş metaboliti olan 3-nitro-4-hidroksifenil asetatın tespit edilmesiyle elde edilmiştir [7].

3-NT, normal bireylerin plazma ve dokularında saptanamayacak kadar düşük seviyelerdeyken, inflamatuvar ve dejeneratif süreçler gibi artmış NO⁻ üretimi ve oksidatif stresle ilişkili durumlarda anlamlı miktarda artış gösterir. Ateroskleroz, akut ve kronik akciğer hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar (ALS, MS, Parkinson, Alzheimer), miyokardiyal inflamasyon, sepsis gibi pek çok insan hastalığında proteine bağlı veya serbest 3-NT düzeylerinin belirgin şekilde arttığı çeşitli tekniklerle gösterilmiştir [7, 47-49].

NO⁻ ve NO⁻'dan türevlenen peroksinitrit gibi moleküllerin çok kısa yarı ömre sahip olmaları nedeniyle in vivo olarak direk ölçümlerine dayalı teknik imkanlar bulunmamaktadır. Peroksinitritin stabil ve spesifik bir son ürünü olan 3-NT, insan hastalıklarında ve hayvan modellerinde, peroksinitrite bağlı protein hasarının tespit edilmesinde yaygın şekilde kullanılan bir belirteç olması açısından önemlidir [4, 7, 8, 47].

2.4. 3-Nitrotirozin Ölçüm Yöntemleri

Biyolojik numunelerden 3-NT tespiti için spesifikliği ve hassasiyeti birbirinden farklı olan çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bunlar; immünohistokimya, ELISA, western blotlama gibi immünokimyasal teknikler ile spektrofotometre, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) ve termal enerji analizörlü gaz kromatografisi (GC-TEA) gibi analitik metotları kapsamaktadır [8, 50, 51].

2.4.1. İmmünokimyasal metotlar

Proteinlerdeki 3-NT'lere karşı spesifik monoklonal ve poliklonal antikorların kullanımı bu metotlardan biridir ve bu antikorlar, jel elektroforezden sonra western blotlama tekniği ile 3-NT'leri tespit etmek için de kullanılabilir. Antikorların kullanımı nitratlanmış proteinlerin tespit edilmesinde ve 3-NT'lerin lokalizasyonlarının belirlenmesinde faydalı olmasına karşın, bu tekniğin kullanımı ile

3-NT miktar tayini yapmak zordur. Aynı zamanda, bu çalışmalar esnasında aşırı miktarlardaki 3-NT'nin antikor bağlanmasını engellediği de görülmüştür [7, 8, 18].

Khan ve ark. (1998) ise, homojenatlar ve biyolojik sıvılardaki nitratlanmış proteinleri tayin etmek için bir ELISA metodu geliştirmişlerdir. Protein nitrasyonunun hesaplanması için çeşitli oranlarda dilüe edilmiş, nitratlanmış BSA'daki immobilize antijene anti-nitrotirozin antikorlarının bağlanması tespit edilerek bir standart eğrisi elde etmişlerdir. Ancak, antikorların değişik proteinlerdeki nitrotirozinler için olan afinitesi farklı olabileceği için bu metodun semikantitatif olduğu kaydedilmiştir [52].

2.4.2. Analitik metotlar

Spektrofotometre

3-NT, stabil bir üründür ve spektrofotometrik olarak kolaylıkla ölçülebilir. Asidik solüsyonlarda (pH:5) 365 nm'de veya bazik şartlarda (pH:9,5) 430 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. Spektrofotometrik analiz, izole proteinlerde başarıyla uygulanmasına karşın, hassasiyetinin zayıf olması ve oldukça saf numunelere ihtiyaç duyulması sebebiyle kullanımı sınırlıdır. Doku proteinlerindeki 3-NT'lerin tayini daha spesifik metotları gerektirmektedir [8, 18].

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC metotları arasındaki temel farklılıklar çalışmada kullanılan dedektör çeşidine bağlıdır.

Ultraviyole Dedektör

3-NT, 365 ve 430 nm'de maksimum absorbansa sahip olması nedeniyle bu dalga boyları kullanılarak ölçüm yapılabilir. UV dedektör kullanımının avantajı 3-NT'nin yanı sıra ditirozin, orto- ve meta-tirozin gibi tirozinin diğer metabolitlerinin de tayin

edilebilmesidir. Ancak, doku ve vücut sıvılarındaki düşük seviyelerde 3-NT miktarını belirlemek için yeterince hassas bir metot değildir [8, 18, 50].

Floresan Dedektör

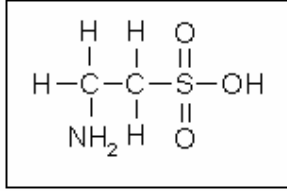
3-NT floresan olmamasına karşın güçlü floresan bileşenlerle yapısal olarak değiştirilerek floresan dedektörle analiz edilebilir. Nitrotirozinin amino grubunun 7-floro-4-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol (NBD-F) veya O-fitalaldehit (OPA) gibi uygun derivatize edici ajanlarla reaksiyonu, floresan dedektörle ölçülebilen bir ürün verir. Floresan dedektör kullanımının en önemli dezavantajı; derivatizasyon esnasında floresan bileşenlerin tam verimle oluşmamasıdır. Bu da, ilgili nitrotirozin pikinin tespitini güçleştirir. Ayrıca düşük miktarlardaki 3-NT'yi saptamak için yeterince hassas değildir [8, 50].

Elektrokimyasal Dedektör

Elektrokimyasal dedektörle ölçümün temeli, elektriksel potansiyel yüklü bir sabit ile, elektrikle ayrışım yapan bir hücreden akan analitlerin oksidasyonu veya redüksiyonuna dayanır. Aminotirozin gibi aromatik aminler kolaylıkla okside olurken, nitrotirozin gibi nitroaromatik bileşenler indirgenir. HPLC-Elektrokimyasal Dedektör kombinasyonu, hassasiyet ve spesifiklik açısından en gelişmiş metot olarak kabul edilmektedir [4, 8, 50].

2.5. Taurin

İlk kez 1827'de öküz safrasının bir bileşeni olarak keşfedilen ve *Bos Taurus* olarak adlandırılan *taurin* (2-aminoetansülfonik asit), metiyonin ve sistein metabolizmasından türetilen, 125 kDa molekül ağırlığında, kükürt içeren bir β -amino asittir. Diğer amino asitlerden farklı olarak karboksil grubu (-COOH) yerine bir sülfonik asit grubuna (-SO₃H) sahiptir. Protein sentezinde kullanılmaz, bunun yerine hücrelerde serbest olarak bulunur ya da bazı basit peptitlerin yapısına katılır [14, 53-55].



Şekil 2.5. Taurinin yapısı [14]

Taurin pek çok hayvansal dokuda ve özellikle de polimorfonükleer lökositler (PMNL) gibi proinflamatuvar hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Bilinen en eski fonksiyonu safra asitlerinin konjugasyonudur. Bunun yanı sıra memelilerde;

- Antioksidan aktivite
- MSS'nin gelişimi
- Retinal gelişim
- Membran ve protein stabilizasyonunun sağlanması
- Ca^{++} homeostazının sürdürülmesi
- Detoksifikasyon
- Üreme
- Bağışıklık
- Hücre büyüme ve farklılaşmasının kontrolü
- Apoptozun düzenlenmesi
- Glikoliz ve glikoneogenezin uyarılması gibi önemli fizyolojik olaylarda görev alır [12-14, 54, 56].

Taurinin tüm bu fonksiyonları yerine getirebilmesi hücre içi taurin konsantrasyonlarına bağlıdır. Bu da;

- 1) Diyetle direk taurin alımı
- 2) Taurinin karaciğer ve diğer alternatif dokular tarafından de-novo sentezi
- 3) Böbrekten reabsorpsiyonu ile sağlanmaktadır [56, 57].

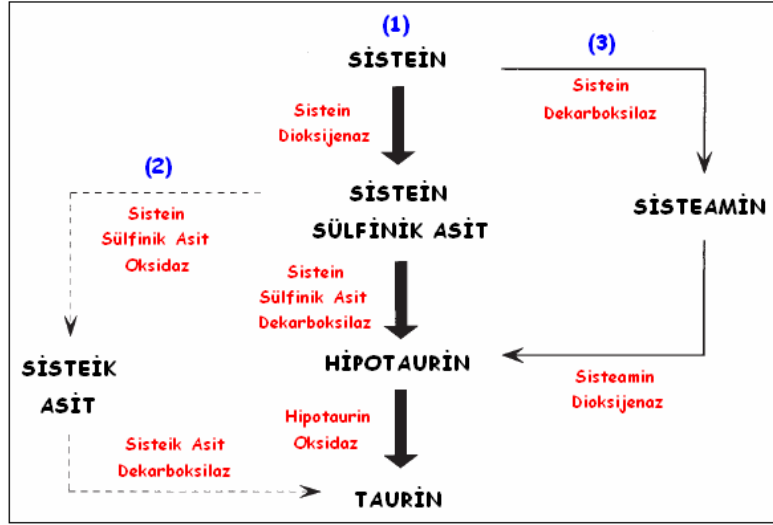
Çeşitli türlerle yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, düşük taurin düzeylerinin retinal dejenerasyon, kardiyomiyopati, büyüme ve gelişmenin gecikmesi ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Taurinin klinik olarak kardiyovasküler hastalıkların, hiperkolesteroleminin, Alzheimer hastalığının, göz ve karaciğerle ilgili hastalıkların, diyabetin ve kistik fibrozisin tedavisinde yararlı olacağı ileri sürülmektedir [14].

2.5.1. Taurinin biyosentezi

Taurinin biyosentezi temelde beyin ve karaciğerde, metiyonin ve sistein metabolizmasının bir bölümünde gerçekleşir. Taurinin doğrudan sisteinden ya da metiyoninin sisteine dönüşümü yoluyla sentezi için birkaç olası mekanizmadan söz edilebilir. Bunlar;

- (1) Sisteinin, sistein sülfirik asite oksidasyonu, oluşan sistein sülfirik asitin hipotaurine dekarboksilasyonu ve hipotaurinin oksitlenerek taurini oluşturması (Bu yol *Sistein Sülfirat Yolu* olarak adlandırılır),
- (2) Sisteinin, sistein sülfirik asite oksidasyonu, ardından sisteik asitin oluşumu ve taurine dekarboksilasyonu,
- (3) Sisteinin dekarboksilasyonu ile oluşan sisteaminin hipotaurine, hipotaurinin de taurine oksidasyonu'dur (Şekil 2.6) [13, 14, 54, 56].

Taurin sentezinde görev alan tüm enzimler bir kofaktör olarak B6 vitamininin aktif koenzim formu olan pridoksal-5-fosfat (P5P)'a gereksinim duyarlar. Bu nedenle B6 vitamini eksikliği endojen taurin düzeylerinde azalmaya sebep olur [13, 14, 54].



Şekil 2.6. Taurinin biyosentezi [58]

Taurin biyosentezinin hız kısıtlayıcı enzimleri, sistein sülfinat yolunda, sisteinin, sistein sülfirik asite oksidasyonunu sağlayan *Sistein Dioksijenaz (CDO)* ile sistein sülfirik asiti hipotaurine dönüştüren *Sistein Sülfirik Asit Dekarboksilaz (CSAD)*'dır. CDO ve CSAD, temel olarak karaciğerde lokalize olmuşlardır. Ancak böbrek, testisler, beyinde glial hücreler (özellikle astrositler) gibi alternatif taurin sentez bölgeleri olabilecek ekstrahepatik dokularda da tanımlanmışlardır. CDO cDNA'sı, rat ve insan karaciğerinden klonlanmış olup, 200 amino asitten oluşan yaklaşık 23 kDa ağırlığında bir proteini kodlamaktadır. Fare, rat ve insan CDO'larının amino asit sekansı bakımından % 92 oranında homoloji gösterdiği bulunmuştur. CSAD cDNA'sı ise, rat, insan ve fare karaciğerinden klonlanmıştır. 493 amino asitten oluşan 55,2 kDa ağırlığında bir proteini kodlar. Rat ve fare CSAD'ları % 98, insan ve rodent CSAD'ları % 90 oranında homoloji göstermektedir [12, 56, 57].

Hücre içi taurin konsantrasyonları, hız kısıtlayıcı enzimler olarak CDO ve CSAD'ın ekspresyon düzeyi ve regülasyonuna bağlıdır. Diğer memelilerle kıyaslandığında insanlarda CSAD aktivitesi oldukça düşüktür ve bu yüzden taurin sentezi muhtemelen daha düşük kapasitededir. CSAD ve CDO enzim aktiviteleri, diyetle kükürtlü amino asitlerin alınmasına bağlı olarak değişebilir. Ratlarla yapılan bir çalışmada, diyetle yüksek konsantrasyonlarda metiyonin ve sistein alınmasının

karaciğer CDO aktivitesini belirgin şekilde artırırken, CSAD aktivitesini azalttığı gözlenmiştir. Farklı bir çalışmada, astrosit kültürlerine eksojen taurin uygulamasının CDO ve CSAD mRNA düzeylerinde herhangi bir değişikliğe sebep olmadığı bulunmuştur. Bu sonuç, CDO ve CSAD gen ekspresyonlarının hücre içi taurin tarafından kontrol edilmediğini göstermektedir. Karaciğer CSAD aktivitesi aynı zamanda yaş, cinsiyet ve stres gibi faktörlerden de etkilenir. Genellikle erkekler, kadınlardan daha yüksek enzim aktivitesine sahiptir [14, 54, 56].

Taurin sentezleme yeteneği türler arasında büyük ölçüde farklılık gösterir. İnsanlar için maksimum sentez oranı bilinmemektedir ancak yetişkinlerde ortalama günlük sentez 0,4-1 mmol (50-125 mg) civarındadır [54].

Taurini oksitleyebilme yeteneğine sahip olmadıkları için, ökaryotlarda taurinin ileri metabolizması yoktur ve enerji kaynağı olarak kullanılmaz. Bakteriler ise taurini, kükürt, azot, karbon ve enerji kaynağı olarak kullanmaktadırlar [53, 59].

2.5.2. Taurinin taşınması

Taurin, hidrofilik özellikte olması sebebiyle membranlardan geçemez ve tüm dokulara taşıyıcı proteinler olan *Taurin Transporter (TauT)*'leri aracılığıyla aktif olarak taşınır. TauT'ler 70 kDa molekül ağırlığında, 620 amino asitten oluşan, Na⁺ ve Cl⁻ bağımlı taşıyıcıların yer aldığı geniş bir ailenin üyesidir. TauT'lerin taurin afiniteleri hücre tiplerine göre değişiklik gösterir. Bir taurin molekülünün hücre membranından taşınabilmesi için, en az 2 Na⁺ ve 1 Cl⁻ iyonuna gereksinim duyulur [56, 57, 60].

TauT cDNA'sı, insan tiroid hücreleri, köpek böbrek hücreleri, insan plasentası, fare retinası, sığır endotel hücreleri, rat ve fare beyni gibi çeşitli memelilerin pek çok hücre ve dokusundan izole edilmiş olup, kodladığı protein memelilerde % 90'dan daha fazla oranda homoloji gösterir. TauT geni farede 6., insanda ise 3. kromozomda yer almaktadır. Fare NIH3T3 fibroblastlarıyla yapılan bir çalışmada, TauT'lerin, hücre membranı, sitoplazma ve nükleusta lokalize olduğu gösterilmiştir. Bu durum,

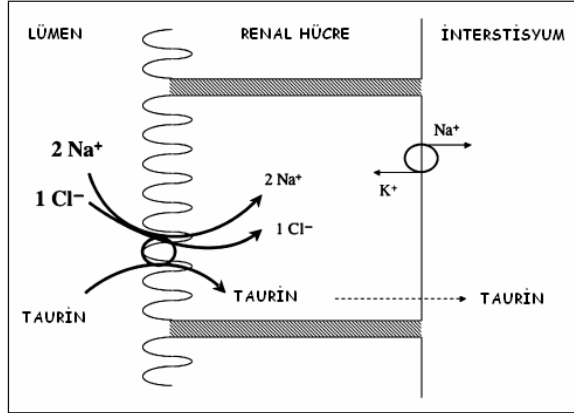
hücrelerin, spesifik bir uyararla plazma membranına taşınabilen hücre içi bir TauT havuzuna sahip olduklarının göstergesi olabilir [12, 56, 57, 59].

Çeşitli in vitro çalışmalarda, taurin, TNF- α ve NO \cdot uygulamalarının, TauT ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı kanıtlanmıştır. Renal epitelyal hücre hattı, plasental ve intestinal hücre hattı, astrosit kültürü ve beyin kapiller endotel hücrelerinde taurin uygulamasının, taurin taşınmasını ve/veya TauT mRNA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. TNF- α 'nın TauT ekspresyonundaki etkisini incelemek amacıyla beyin kapiller hücreleri ve insan intestinal hücre hattıyla yapılan çalışmalarda, TNF- α 'nın, artan TauT mRNA'ları ile ilişkili olarak taurin taşınmasını arttırdığı gözlenmiştir. Bu sonuca göre, TauT geninin ekspresyonunun TNF- α tarafından aktive edildiği söylenebilir. Bridges ve ark. (2001) ise, retinal pigment epitelyal hücre hattında NO \cdot donörlerinin taurin taşınmasını uyardığını bulmuşlardır. NO \cdot donörleri, TauT geninin transkripsiyonunu aktive ederek TauT mRNA düzeylerini arttırmıştır [56, 61].

Taurinin biyolojik etkilerinin çoğu, hücrel konsantrasyonuna bağlıdır ve bu konsantrasyonun kontrol edilmesinde, taurin biyosentezinin yanı sıra ekstraselüler ortamdan taurin taşınmasını sağlayan TauT'lerin de büyük rolü bulunmaktadır. Heller-Stilb ve ark. (2002), TauT geni çıkarılmış bir fare modeli geliştirmişler ve taurin düzeylerinin kontrol grubuna göre plazma, böbrek, karaciğer ve gözde % 74, iskelet kası ve kalpte % 95 oranında azalma kaydettiğini gözlemlemişlerdir [12, 62].

2.5.3. Taurinin atılımı ve reabsorbsiyonu

Taurinin atılımı, idrar ve safra olmak üzere başlıca iki yolla gerçekleşir. Dokulardaki uygun taurin düzeylerini sürdürmek için, taurinin atılımı ve yeniden absorpsiyonu böbrek tarafından sıkı bir şekilde denetlenmektedir. Taurin glomerulusta filtre edilir ve proksimal tübülün fırça kenar membranlarına yerleşmiş olan TauT'ler tarafından reabsorbe edilir. Organizmada pek çok amino asit % 98-99 oranında reabsorbe edilirken, bu oran taurin için % 40-99,5 arasında değişmektedir [12, 54, 59].



Şekil 2.7. Taurinin proksimal tübül hücrelerinden taşınması [59]

Günlük atılan taurin miktarı bireyden bireye, aynı şekilde bir birey için günden güne değişiklik gösterebilir. Bu miktar ortalama 0,22-1,85 mmol şeklinde belirlenmiştir. Genetik faktörler, yaş, cinsiyet, beslenme şekli, renal fonksiyon ve klinik şartlar gibi bazı faktörler bu oranı etkilemektedir [54].

Böbrekte yapılan çalışmalar, renal tübül hücrelerinin taurin taşıma kapasitesinin, diyetle alınan taurin miktarıyla ters ilişkili olduğunu göstermiştir. Diyetle sınırlı miktarda taurin alımını takiben taurin taşınmasının (reabsorbsiyonun) arttığı, aksine taurin açısından zengin diyeti takiben taşınmanın azaldığı gözlenmiştir. Bu durum, böbrekte, taurin alımındaki değişikliklere karşı duyarlı bir renal adaptif yanıtın olduğunu düşündürmektedir [56, 59].

2.5.4. Taurinin dağılımı ve turnoverı

Taurin, algler hariç bitkiler aleminde çok düşük konsantrasyonlarda (nmol/gr doku) bulunur. Protozoalarda dağılımı seyrekken, eklem bacaklılar dahil tüm hayvanlar yüksek konsantrasyonlarda taurin içerirler [53, 57].

Türler ve hücreler arasındaki farklılıklara karşın, taurin memeli hücrelerinde genellikle milimolar konsantrasyonlarda bulunur. Retina, lökositler, trombositler, beyin, kalp, iskelet kası ve karaciğer gibi aşırı miktarda serbest radikal üreten

dokularda daha yüksek konsantrasyonlarda dağılıma sahiptir. MSS'deki tüm hücreler taurin içerirler. Kalpte ise, toplam amino asit havuzunun % 60'ını oluşturur. Memelilerde plazma, BOS ve ekstraselüler sıvılarda 10-100 μM konsantrasyonlarda bulunur. Retinadaki konsantrasyonu türler arasında değişiklik göstermesine karşın, yaklaşık 29 $\mu\text{mol/gr}$ doku kadardır ve özellikle fotoreseptör tabakada yoğun olarak bulunmaktadır. Pineal bez, hipofiz bezi gibi salgı yapan dokularda 60 $\mu\text{mol/gr}$ doku kadar yüksek konsantrasyonlardadır [53, 54, 63].

Ortalama 70 kg ağırlığında bir insanda yaklaşık 70 gr (560 mmol) taurin bulunur. İnsanlarda çeşitli organ ve hücrelerdeki taurin dağılımı Çizelge 2.5'te verilmiştir. Uzun süren açlıklarda, cerrahi operasyonlarda, travma ve sepsis gibi bazı patolojik durumlarda hem plazma hem de hücre içi taurin konsantrasyonunun azaldığı bilinmektedir [13, 54].

Çizelge 2.5. Taurinin insan vücudundaki dağılımı [54]

<i>($\mu\text{mol/gr doku}$)</i>		<i>($\mu\text{mol/L}$)</i>	
Beyin	0,8-5,3	Safra	200
Kalp	6	Süt	337
Böbrek	1,4-1,8	Tükürük	16-65
Karaciğer	0,3-1,8	BOS	5-36
Akciğer	1-5	<i>($\mu\text{mol/gr doku}$)</i>	
Kas	2,2-5,4	Eritrositler	0,05-0,07
Dalak	11,4	Lökositler	20-35
Retina	30-40	Trombositler	16-24

Taurinin dokulardaki turnover hızı, hem türlere hem de hücre ve organ tipine göre farklılık göstermektedir. Ratlar, yüksek endojen taurin turnoverına sahiptirler. Huxtable (1981) ratlarla yapmış olduğu çalışmada, taurin açısından zengin diyetle yarılanma ömrünü tüm visseral organlarda $4,8 \pm 1$, beyinde $5,5 \pm 1$, tüm vücutta 11,4 gün; taurin içermeyen diyetle ise, visseral organlarda $8,7 \pm 2$, beyinde 6,7 ve tüm vücutta 15 gün olarak bulmuştur. Taurin, böbrek, dalak, karaciğer tarafından kalp ve kasa göre daha hızlı alınır. Kalp, akciğer, dalak, kas, beyin ve bağırsakta ise uzun süre kalır [55, 60, 63-65].

2.5.5. Taurin kaynakları

Sağlıklı insanlarda vücuttaki taurin havuzunun ana kaynağını diyetle taurin alımı oluşturmaktadır. Omnivor bir diyetten alınması gereken taurin miktarı 58 mg olarak belirlenmiştir. Bitkisel kaynaklı besinler genellikle düşük miktarlarda taurin içerirken, hayvansal kaynaklı besinler taurin bakımından zengindir (Çizelge 2.6). Bu nedenle vejeteryanlarda taurin alımı sınırlıdır ve sıklıkla düşük oranda kükürtlü amino asit içeren gıdalarla beslendikleri için, plazma taurin konsantrasyonları normal değerlerin çok altındadır [12, 54].

Çizelge 2.6. Bazı gıda maddelerinin taurin içerikleri [54]

ETLER	(mg/100 gr)
Sığır	43
Domuz	61
Tavuk	169
Hindi	306
Kuzu	47
Jambon	50
DENİZ ÜRÜNLERİ	
Ton Balığı (konserve)	42
Alabalık	151
Midye	655
İstiridye	70
SÜT VE SÜT ÜRÜNLERİ	
Pastörize Süt	6
Çedar Peyniri	-
Yoğurt (yağsız)	3,3
Dondurma (vanilyalı)	1,9
MEYVE, SEBZE, KURUYEMİŞ, BAKLAGİLLER VE TAHILLAR	-

Taurin biyosentezi için gerekli bir enzim olan CSAD aktivitesi, insan ve primatlarda düşük, kedilerde ise yok denebilecek kadar azdır. Bu sebeple taurin kediler için esansiyel, insanlar ve primatlar için şarta bağlı olarak esansiyeldir. Taurin yeni doğanlar için de esansiyel bir amino asittir. Çünkü; enzim sistemleri gelişmemiş olduğundan taurin sentezleme kapasiteleri sınırlıdır ve böbrekleri henüz taurini muhafaza edebilecek şekilde gelişmemiştir. Pastörize inek sütüne kıyasla yüksek

konsantrasyonlarda taurin içeren insan anne sütü, yeni doğanlar için önemli bir taurin kaynağıdır. Aynı zamanda taurin, TauT'ler aracılığıyla plasental bariyeri geçerek aktif olarak anneden fetüse taşınmaktadır [12, 13, 54].

2.5.6. Taurin içeren peptitler

Taurinden protein biyosentezi için yararlanılmamasına ve hücrelerde serbest olarak bulunmasına karşın, beyinde taurin içeren bazı düşük molekül ağırlıklı peptitlere rastlanmıştır. Bunlardan ilki ve en yaygın olanı Reichelt ve ark. (1971) tarafından beyin sinaptozomlarından izole edilen γ -glutamiltaurin (*litoralon*)'dir. Paratiroid bezi tarafından üretilir. Nörotransmitter olarak etki gösterdiği ve timus kültürlerinde hücre büyümesini uyardığı gözlenmiştir [13, 53, 54, 66].

2.5.7. Taurinin biyolojik fonksiyonları

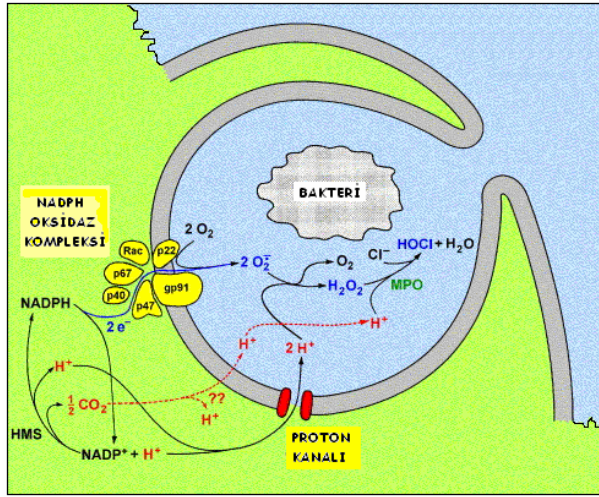
Safra Asitlerinin Konjugasyonu

Taurinin en iyi kanıtlanmış biyolojik aktivitelerinden biri safra asitlerinin konjugasyonudur. Taurinin bu özelliği ilk kez 1927'de Tiedman ve Gmelin tarafından bulunmuştur. Karaciğerde kolesterolden sentezlenen safra asitleri, lipidlerin intestinal sindirimi ve absorpsiyonu için gerekli bileşiklerdir. Taurin ve glisin, hem hepatotoksik etkisini azaltmak hem de fizyolojik pH'da çözünürlüğünü sağlamak amacıyla safra asitlerini konjuge ederek taurokolat ve glukokolatı oluşturur. Taurokolat insanlarda temel safra tuzudur. Taurin içeriğinin azalması, kolesterol atılımının azalmasına, bunu takiben birikimine ve ateroskleroz riskinin artmasına sebep olur. Özetle taurin, safra akışını hızlandırır, safra asiti üretimini artırır ve kolestazi önler [54, 57, 67].

Antioksidan ve İmmünregülatör Etkisi

Taurinin en önemli fonksiyonlarından biri hipokloröz asit (HOCl) gibi klorlanmış oksidanlara karşı dokuları korumaktır. İnflamatuar şartlarda uyarılmış olan

fagositlerde, özellikle PMNL’de, artan O_2 kullanımı ve enzim aktivasyonunu takiben O_2^- , H_2O_2 , HOCl, iNOS ekspresyonu yoluyla NO gibi oksidanların üretiminde önemli bir artış meydana gelir. *Solunumsal patlama (respiratory burst)* olarak adlandırılan bu süreçte, PMNL tarafından fagosite edilmiş olan işgalci mikroorganizmalar, üretilen bu toksik ürünlerin etkisiyle yok edilir [6, 13].



Şekil 2.8. Solunumsal patlama [68]

PMNL’nin primer lizozomal granüllerinde yer alan bir hem enzimi olan miyeloperoksidaz (MPO), solunumsal patlama zincirinin son aşamasında H_2O_2 ile Cl^- iyonu arasındaki reaksiyonu katalizleyerek HOCl’yi oluşturur. MPO- H_2O_2 - Cl^- sistemi tarafından üretilen HOCl, PMNL’nin başlıca oksidantı olup, TNF- α , IL-2, IL-6 gibi sitokinlerin ve çeşitli büyüme faktörlerinin sentez ve salınımını uyarır. Aynı zamanda, aminlerle ($-NH_2$) ve sülfhidril gruplarıyla ($-SH$) çok hızlı reaksiyona girebilme özelliği sayesinde mikroorganizma membranlarının $-NH_2$ ve $-SH$ gruplarını okside ederek, denatürasyonuna sebep olur. Bununla birlikte, HOCl’nin oluşumu dokular için hem yararlı hem de zararlı bir olaydır. Çünkü; HOCl’nin toksisitesi sadece mikroorganizma membranları ile sınırlı değildir ve konak dokuda inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunu takiben oluşan hasarda önemli bir rol oynamaktadır. HOCl, karbonhidratları, nükleik asitleri, peptit ve amino asitleri direk oksitleyebilir ve aminlerle reaksiyonu sonucu *N-kloraminler* olarak adlandırılan sekonder klorlayıcı ajanların oluşumuna sebep olur. N-kloraminler, HOCl’ye göre

daha az reaktif ve daha uzun ömürlü oksidanlardır ancak çoğu stabil değildir ve kolaylıkla deamine ve/veya dekarboksile olarak toksik aldehitleri oluşturabilirler [13, 69-71].

İnflamatuar hücrelerin sitozollerinde yüksek konsantrasyonlarda (20-50 mM) bulunan aminlerden birisi taurindir ve kolaylıkla HOCl ile reaksiyona girerek daha stabil, daha uzun ömürlü (yarı ömrü 18 saat) ve daha az toksik olan *taurin kloramin* (*TauCl/N-klorotaurin*)'i oluşturur. TauCl, β -amino asit yapısına sahip olması nedeniyle N-kloraminler içinde en stabil olanıdır ve HOCl ile reaksiyonu esnasında diğer aminlerde olduğu gibi toksik aldehitler oluşmaz [14, 69, 72].



TauCl'nin bir inflamasyon alanındaki net konsantrasyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak, nötrofillerin fagolizozomlarında MPO yoluyla üretilen HOCl'nin yaklaşık % 10-60'ının N-kloramin oluşumunda kullanıldığı ve TauCl'nin bu bileşenlerin önemli bir kısmını oluşturduğu tahmin edilmektedir. Weiss ve ark. (1982), aktive olmuş insan nötrofillerinin, 2 saatte $200 \text{ nmol}/10^6$ hücre HOCl ürettiğini ve bunun da $100 \text{ nmol}/10^6$ hücre TauCl oluşumuyla sonuçlandığını göstermişlerdir [73-75].

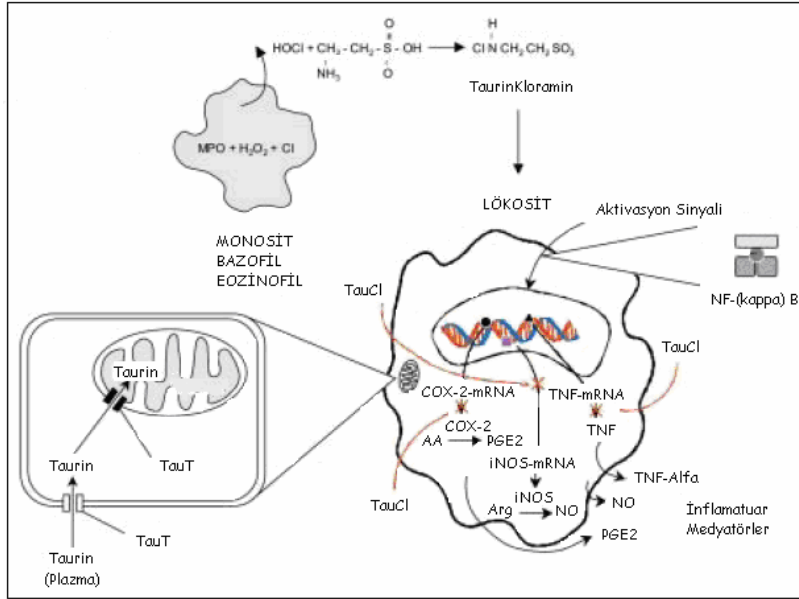
Taurinin, TauCl yoluyla PMNL tarafından üretilen HOCl'nin bir kısmını nötralize etmesi, konak savunmasında herhangi bir zayıflamaya yol açmaz. Çünkü; TauCl'nin de HOCl gibi bakterisidal (*S. aureus*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*), fungisidal (*C. albicans*), virüsidal (*Herpesvirus* tip I ve II, *Adenovirus* tip 5) ve vermisidal (*S. mansoni*) etkilerinin olduğu in vitro çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu sayede TauCl, bir taraftan nötrofillerin mikrobisidal aktivitelerini sürdürmelerine, diğer taraftan da konak doku hasarının en aza indirgenmesine yardımcı olur [76-81].

Çeşitli laboratuvarlardan elde edilen veriler, TauCl'nin aynı zamanda güçlü bir immünregülatör olduğunu da göstermektedir. Aktive olan fagositler; sitokinler (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) ve eikazonoidler (Prostaglandin E2/PGE2, Lökotrien B4/LTB4) gibi bazı proinflamatuvar medyatörleri salarak konak dokuya nötrofil göçünü başlatır. TauCl, fagositler tarafından bu proinflamatuvar medyatörlerin sentez ve salınımını, transkripsiyonel ve post-translasyonel mekanizmalarla düzenlemektedir. Güçlü bir inflamatuvar sitokin ileticisi olan nükleer faktör-(kappa) B aktivasyonunu baskılar. Aynı zamanda TauCl, fagositik hücreler tarafından NO \cdot ve O $_2^{\cdot-}$ üretimini de inhibe etmektedir (Şekil 2.9) [57, 60, 71].

Marcinkiewicz ve ark. (1995) yapmış oldukları çalışmada, fare peritoneal makrofajlarında TauCl'nin, iNOS aktivasyonu ile oluşan NO \cdot üretimini inhibe ettiğini, ayrıca PGE2, TNF- α ve IL-6 üzerinde inhibitör aktivitesinin olduğunu kanıtlamışlardır. Ayrıca, TauCl'nin makrofajlarda iNOS transkripsiyonunu, TNF- α mRNA'sının translasyonunu inhibe ettiği ve siklooksijenazların indüklenebilir formu olan cox-2'nin post-transkripsiyonel düzenlemesini etkilediği rapor edilmiştir [82-84].

Yapılan çalışmalarda, eksojen taurin uygulamasının TauCl oluşumunu güçlü bir şekilde arttırdığı, TauCl'nin PMNL'de O $_2^{\cdot-}$ üretimini; makrofajlarda PGE2, IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α ve NO \cdot 'nun üretimini inhibe etmek suretiyle inflamasyonda önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir [82, 84-86].

Chorazy ve ark. (2002), in vitro olarak LPS ile uyarılmış makrofajlarda, TauCl'nin doz bağımlı olarak TNF- α , IL-1 β ve IL-6 sentez ve salınımını düzenlediğini ve sonuç olarak TauCl'nin önemli bir immünregülatör faktör olduğunu bildirmişlerdir [87].



Şekil 2.9. TauCl'nin immünregülâtör etkisi [12]

Makrofajlar tarafından proinflamatuvar sitokinler ve reaktif türlerin TauCl'ye bağlı inhibisyon mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, TauCl oluşumu, patolojik sürecin ve zararlı etkilerin ortadan kalktığını, daha fazla NO ve sitokinlere gerek kalmadığını belirtmek için bir fizyolojik kontrol mekanizması olabilir. TauCl muhtemelen makrofajlar ve nötrofillerden, inflamatuvar medyatörlerin üretiminin düzenlenmesi için gerekli bir *nötrofil kökenli sinyal molekülü* olarak etki göstermektedir [13].

PMNL'lerdeki hücre içi taurin konsantrasyonu sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. İnsanlar ve deney hayvanları ile yapılan pek çok çalışmada, inflamatuvar şartlar altında nötrofil taurin düzeylerinin belirgin şekilde azaldığı, LPS ile aktive edilmiş makrofajlarda, taurin ve TauCl taşınmasının artış gösterdiği belirlenmiş, azalmış hücre içi taurin konsantrasyonunun, HOCl ve metabolitlerinin miktarlarının artması sebebiyle konak doku hasarını arttırabileceği belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre taurinin TauCl aracılığıyla, inflamasyonun ve zararlı sonuçlarının yönetiminde hayati bir role sahip olduğuna inanılmaktadır [13, 60, 72].

Taurin, TauCl oluşumunun yanı sıra hücrelerdeki antioksidan savunma düzeylerini arttırmak yoluyla da antioksidan etki gösteriyor olabilir. Vohra ve Hui (2001), intragastrik taurin uygulamasının beyinde SOD ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde Balkan ve ark. (2001), tiyoasetamit ile hasar oluşturulmuş rat karaciğerinde taurinin, E vitamini düzeyini ve GPx aktivitesini arttırarak antioksidan savunmayı güçlendirdiğini belirtmişlerdir [88-90].

Endokrin ve Metabolik Etkileri

Taurin, beta hücrelerinde insülin reseptörlerinin uyarılması yoluyla kan glukoz ve insülin seviyelerini etkilemektedir. Yüksek fruktoz diyeti ile beslenerek tip 2 diyabetin karakteristik insüline dirençli modeli oluşturulan ratlarda, taurinin, insülin direncini ve serum glukoz konsantrasyonunu azalttığı kanıtlanmıştır. Cherif ve ark. (1996), taurinin fötal beta hücrelerinde insülin salgılanmasını uyardığını in vitro çalışmalarla göstermişlerdir [14, 54, 57, 91].

Kardiyovasküler Etkileri

Kalpdeki serbest amino asitlerin yaklaşık %60'ını oluşturan taurinin, kalbi, nötrofillerin indüklediği reperfüzyon hasarından ve oksidatif stresten koruduğu kanıtlanmıştır. Taurin, hücre içi Ca^{++} seviyesini düzenlemek suretiyle, hücre ölümüne ve miyokardiyal hasara sebep olabilecek Ca^{++} düzensizliğine karşı kalp kasını korur. Kan basıncının düşürülmesinde etkilidir. Aynı zamanda taurinin, cNOS ekspresyonunu düzenlemesi yoluyla endotel koruyucu etki gösterdiği tespit edilmiştir [14, 59, 92].

MSS Üzerine Etkileri

Taurinin, MSS'de ve beyin gelişimi esnasında hücre göçünü etkilediği, sinirsel iletimi düzenlediği ve beyin gelişimini hızlandırdığı bildirilmiştir. Taurin eksikliğinin, epilepsi ve Alzheimer hastalıklarıyla ilişkili olabileceğine dair

çalışmalar bulunmaktadır. Alzheimer hastalarında nörotransmitter asetilkolin düzeyleri düşüktür ve BOS'taki taurin miktarı azalmıştır. Hayvan modellerinde taurin uygulamasının, beyin dokusundaki asetilkolin seviyesini arttırdığı ve bu sayede Alzheimer hastalığının tedavisinde yararlı olabileceği rapor edilmiştir. Ancak bugüne kadar taurinin Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanıldığını belirten bir literatür bulunmamaktadır [14, 54].

Taurin ve Retina

Taurin, omurgalıların retinalarında bulunan en yaygın amino asittir ve normal görüş için mutlaka gereklidir. Retinal taurin, osmotik basıncı düzenler, membran stabilizasyonunu artırır, lipid peroksidasyonunu önleyerek bir antioksidan olarak etki gösterir. Taurinin esansiyel bir amino asit olduğu kedilerde taurin eksikliği, koni reseptör hücrelerinde daimi hasara neden olur ve muhtemelen körlük sebebidir. Primatların özellikle genç bireylerinde ise, taurin eksikliğinin retinal lezyonlara ve fotoreseptörlerde dejeneratif yapısal değişikliklere sebep olduğu rapor edilmiştir [14, 54].

Detoksifikasyon

Taurin, karbon tetraklorür (CCl_4) ve paraquat gibi zenobiyotikleri konjuge ederek çözünlüklerini artırır ve idrarla atılmalarını kolaylaştırır. İn vivo çalışmalar, taurinin hepatositleri CCl_4 'ün indüklediği toksisiteye karşı koruduğunu göstermiştir [13, 14, 54].

Osmoregülasyonun Sağlanması

Taurinin, osmotik dengenin sürdürülmesini sağladığı görüşü ilk kez Krogh tarafından, yüksek konsantrasyonlarda taurin içeren ekinodermler ile yapılan çalışmalarla ileri sürülmüştür. Taurin hücreler tarafından, osmotik dengesizliğe karşı bir adaptasyon olan hücre hacminin düzenlenmesi amacıyla kullanılan, osmotik yönden aktif bir moleküldür [53, 57].

Ca⁺⁺ Homeostazının Sürdürülmesi

Taurinin Ca⁺⁺ homeostazı üzerine etkileri şöyle sıralanabilir:

- Taurin düşük Ca⁺⁺ şartlarında Ca⁺⁺ yararlanımını arttırarak veya biyoyararlanımın fazla olduğu durumlarda fazla Ca⁺⁺ yüküne karşı hücreleri koruyarak çift yönlü etki gösterir.
- Çeşitli Ca⁺⁺-bağımlı sistemlerin, Ca⁺⁺ hassasiyetini arttırır.
- Sarkoplazmik retikulum, mitokondri ve diğer organellerin Ca⁺⁺ depolama kapasitesini arttırır.
- Ca⁺⁺ ile aktive olan ATPaz pompalarının, pompalama hızını uyarır.
- Ca⁺⁺'un membranlardan pasif taşınmasını azaltır [53].

Diğer Etkileri

- Taurin farelerde *sperm motile edici faktör* olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda ise akrozomlarda bulunan temel amino asitlerden biridir. Bu doğrultuda, düşük sperm motilitesinden kaynaklanan erkek infertilitesinin önlenmesinde yararlı olabileceği düşünülmektedir [54, 57].
- Taurinin, Ca⁺⁺ homeostazını sağlaması yoluyla nötrofillerde, Fas (CD95/APO1) aracılı apoptozu inhibe ettiği kanıtlanmıştır [13].
- Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda, taurinin endotoksinlerin intestinal translokasyonlarını belirgin bir şekilde inhibe ettiği ve hayvanları endotoksemik hasardan koruduğu bulunmuştur [14].
- Taurin, yağda çözünen A, D, E, K ve F vitaminlerinin biyoyararlanımını arttırır. Taurinin bu fonksiyonunu, vitaminlerin suda çözünebilen, kolay hidroliz olan farklı tiplerini oluşturmak ve taşınmalarını kolaylaştırmak yoluyla gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir [54, 67].

3. MATERYAL VE METOT

Çalışmalar, Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyokimya-Fizyoloji Araştırma Laboratuvarı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.1. Deney Hayvanları

Deneylerde GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Deney Hayvanları kısmından sağlanan, ortalama 400 gr ağırlığında ve her iki cinsten olmak üzere toplam 40 adet kobay (guinea pig) kullanıldı.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Her grupta 10 adet olmak üzere 4 ayrı kobay grubu oluşturuldu ve gruplara aşağıdaki işlemler uygulandı;

Kontrol Grubu

Enjeksiyon uygulanması esnasında oluşan stresin bazı biyokimyasal parametrelerin değişimine neden olabileceği düşüncesiyle, kontrol grubu hayvanlara intraperitoneal (ip) steril serum fizyolojik enjekte edildi. Enjeksiyondan 6 saat sonra hayvanlar intramüsküler (im) ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında feda edildi.

Endotoksin Grubu

Bu gruptaki hayvanlara 4 mg/kg endotoksin (LPS; *Escherichia coli* 0111:B4) ip olarak verildi. Enjeksiyondan 6 saat sonra hayvanlar im ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında feda edildi.

Taurin Grubu

Taurinin tek başına kontrol hayvanları üzerindeki etkisini görmek amacıyla bu gruptaki hayvanlara ip 300 mg/kg dozda taurin enjekte edildi. Enjeksiyondan önce taurinin suda tamamen çözünmesine ve enjeksiyon esnasında 37 °C'ye getirilerek uygulanmasına dikkat edildi. Taurin enjeksiyonundan 6 saat sonra hayvanlar im ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında feda edildi.

Taurin+Endotoksin Grubu

Bu gruptaki hayvanlara önce taurin grubu ile aynı dozda (300 mg/kg, ip) taurin uygulandı ve uygulamadan hemen sonra kanda aynı anda maksimum konsantrasyona ulaşmaları beklendiği için 4 mg/kg ip endotoksin enjekte edildi. Enjeksiyondan 6 saat sonra hayvanlar im ketamin (60 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altında feda edildi.

Tüm gruplardan uygun şekilde elde edilen dalak dokuları, NO_x, 3-Nitrotirozin ve taurin tayininde kullanılmak üzere – 80 °C'de saklandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Dokuda NO_x tayini

Dokulardaki NO_x konsantrasyonu Griess yöntemi ile çalışıldı [93].

Reaktifler

- 0,1 M Sodyum Fosfat Tamponu (pH:7)
- Griess I: % 0,2'lik Naftiletilediamin Dihidroklorür (NEDD)
- Griess II: % 10'luk Fosforik asit (H₃PO₄) içinde % 2'lik Sülfanilamid
- 1 M Hidroklorik asit (HCl) içinde 400 mg Vanadyum (III) Klorür (VCl₃)

Dokuların Hazırlanması

Dokular, sodyum fosfat tamponu ile (1:9) homojenize edildikten sonra, 3500 RPM'de 15 dk santrifüj edildi. 200 µL süpernatana, ortamdaki nitrati nitrite indirmek amacıyla eşit miktarda VCl_3 eklendi ve 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra sodyum fosfat tamponu ve eşit miktarlarda karıştırılmış olan Griess I+II reaktifleri eklendi. 37 °C'de 10 dk inkübasyondan sonra numunelerin optik dansitesi spektrofotometrede, köre karşı, 540 nm'de okundu.

Standartın Hazırlanması

6,4 mM'lık stok sodyum nitrit ($NaNO_2$) standartı günlük olarak dilüe edilerek, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 µM konsantrasyonlarda standartlar elde edildi. Dokulardaki NO_x miktarı, hazırlanan standart eğriye göre hesaplandı ve µmol/gr doku olarak verildi.

3.3.2. Dokuda 3-NT tayini

Dokulardaki 3-NT konsantrasyonu, Kamisaki ve Maruyama'nın yöntemleri ile tayin edildi [49, 94].

Reaktifler

- ✓ 50 mM Potasyum Fosfat Tamponu (pH:7,2)
- ✓ % 10'luk Trikloroasetik asit (TCA)
- ✓ 6 N HCl

Dokuların Hazırlanması

Dokular, potasyum fosfat tamponu ile (1:3) homojenize edildikten sonra, 300 µL homojenata proteinleri çöktürmek amacıyla TCA eklendi. Karışım vortekslendikten sonra 3000 RPM'de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlar atılıp, çökeltiyeye

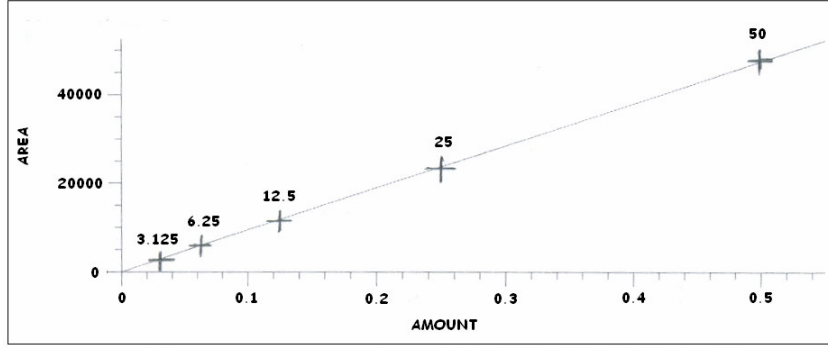
hidroliz amacıyla HCl eklendi. Her numune ortalama 1 dk kadar sonike edildikten sonra hidroliz tüplerine alındı ve 18-24 saat ısıtıcı blok'ta, 102 °C'de bekletildi. Ardından ortamdaki asit, azot gazı ile uçurularak numunelere distile su ilave edildi. Vorteksledikten sonra 0,2 µm'lik membran filtrelerden süzülerek HPLC sistemine verildi. 3-NT tayininde kullanılan HPLC'ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. 3-NT tayininde HPLC'ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları

HPLC Modeli	Thermo Finnigan
Dedektör	Elektrokimyasal
Mobil Faz	50 mM H ₃ PO ₄ , 50 mM Sitrik asit, KOH (pH:3,1), 40 mg/L EDTA, 100 mg/L Oktan Sülfonik asit, % 5'lik Metanol
Analitik Kolon	Microtech Scientific, C18, 50x1 mm, 5 µm PS
Akış Hızı	0,05 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Kolon Fırını	30 °C
E-reactor/Range	- 850 mV/ 50 nA
E-cell/Range	+600 mV/ 20 nA

Standartın Hazırlanması

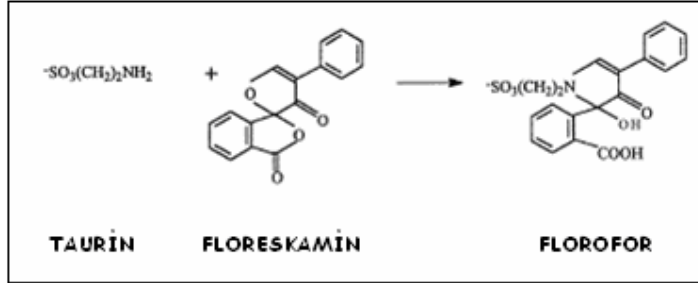
23 mg 3-Nitro-L-Tirozin'in 0,01 N HCl içinde çözülmesiyle elde edilen 100 µM'lık stok standart günlük olarak dilüe edilerek, 50, 25, 12.5, 6.25 ve 3.125 µM'lık standartlar hazırlandı. Çizilen standart eğriye göre dokulardaki 3-NT konsantrasyonu hesaplandı ve µmol/gr doku olarak verildi.



Şekil 3.1. 3-NT standart eğrisi

3.3.3. Dokuda taurin tayini

Dokulardaki taurin konsantrasyonu tayini McMahon'un yöntemine göre çalışıldı. Yöntem, taurinin floreskamin ile derivatizasyonu yoluyla floresan bir bileşik olan floroformun oluşması prensibine dayanır [95].



Şekil 3.2. Taurinin floreskamin ile derivatizasyonu [95]

Reaktifler

- 0,1 N Perklorik asit (HClO₄)
- Asetonitril içinde 5 mM Floreskamin
- Borat Tamponu: 100 mM Disodyum tetraborat (10 mM Borik asit ile pH 9,2'ye ayarlandı)

Dokuların Hazırlanması

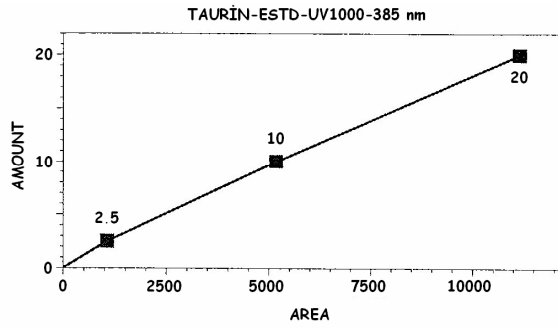
100 mg doku, perklorik asit ile (1:4) homojenize edildikten sonra, 9000 RPM'de 10 dk santrifüj edildi. Buradan alınan 100 µL süpernatana, proteinleri çöktürmek amacıyla asetoneitril eklenerek vortekslendi. Daha sonra karışım 5800 g'de 10 dk santrifüj edilip, 200 µL süpernatana alındı. Numunenin pH'sını 9'a ayarlamak için süpernatana borat tamponu ilave edildi. HPLC sistemine verilmeden hemen önce 100 µL floreskamin eklenip, 0,2 µm'lik membran filtrelerden süzüldü. Taurin tayininde kullanılan HPLC'ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Taurin tayininde HPLC'ye ait sistem parametreleri ve çalışma koşulları

HPLC Modeli	Thermo Finnigan
Dedektör	Ultraviyole
Mobil Faz	Tetrahidrofur: Asetoneitril: Fosfat Tamponu (pH:3,5) (4:24:72)
Analitik Kolon	Bondcolone, C18, 300x3,9 mm, 10 µm PS
Dalga Boyu	385 nm
Akış Hızı	1 ml/dk
Enjeksiyon Hacmi	20 µL

Standartın Hazırlanması

1 mg/ml taurin distile suda çözülerek stok standart hazırlandı. Standart eğrinin çiziminde 20, 10 ve 2,5 µg/ml konsantrasyonlardaki standartlar kullanıldı. Dokulardaki taurin miktarı standart eğri yardımıyla hesaplandı ve µg/gr doku olarak verildi.



Şekil 3.3. Taurin standart eğrisi

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Bulguların değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm değerler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak verildi ve $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Dalak dokusunda NOx, 3-NT ve taurin düzeylerine ait sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Dalak dokusunda NOx, 3-NT ve taurin düzeyleri

(n =10)	NOx ($\mu\text{mol/gr doku}$)	3-NT ($\mu\text{mol/gr doku}$)	Taurin ($\mu\text{g/gr doku}$)
Kontrol	0,613 \pm 0,054	0,326 \pm 0,053	32,966 \pm 6,997
Endotoksin	1,279 \pm 0,124 ^a	0,612 \pm 0,127 ^a	3,649 \pm 0,546 ^a
Taurin	1,432 \pm 0,110 ^{a,b}	0,513 \pm 0,102 ^a	85,920 \pm 15,627 ^{a,b}
Taurin+Endotoksin	0,848 \pm 0,116 ^{a,b,c}	0,398 \pm 0,091 ^b	141,708 \pm 9,912 ^{a,b,c}

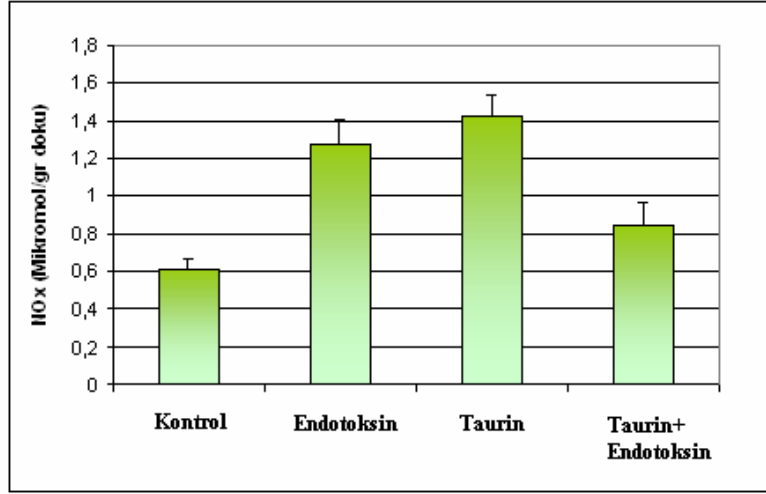
^ap< 0,05 kontrol grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^bp< 0,05 endotoksin grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

^cp< 0,05 taurin grubunun aynı değeriyle karşılaştırıldığında

4.1. Dalak Dokusu NOx Düzeyleri

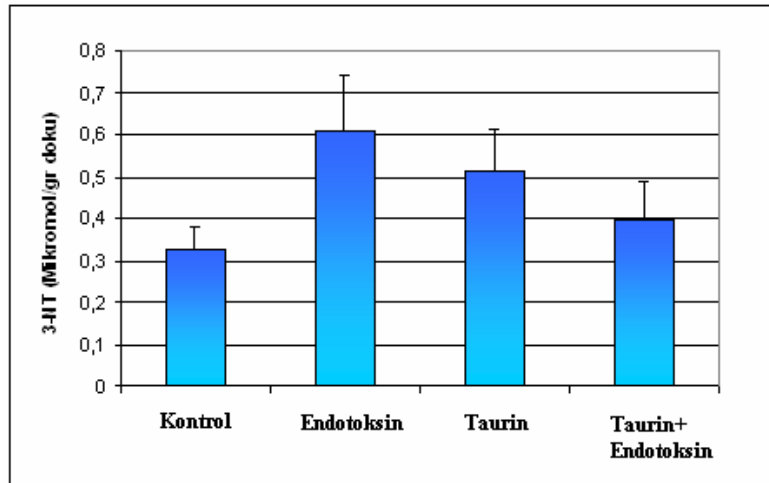
Çalışmada elde edilen verilere göre en yüksek ortalama NOx konsantrasyonu taurin grubunda tespit edilmiştir (1,432 \pm 0,110). Tek başına endotoksin ve taurin uygulamalarının, kontrol grubuyla kıyaslandığında, dalak dokusu NOx konsantrasyonunda yaklaşık 2 kat artışa sebep olduğu görülmüştür. Endotoksin ile taurin+endotoksin grupları karşılaştırıldığında, endotoksin uygulamasından önce taurin enjeksiyonunun NOx konsantrasyonunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4.1).



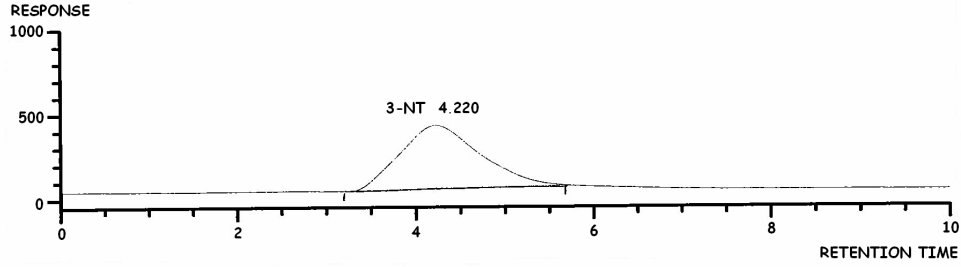
Şekil 4.1. Dalak dokusu NOx düzeyleri

4.2. Dalak Dokusu 3-NT Düzeyleri

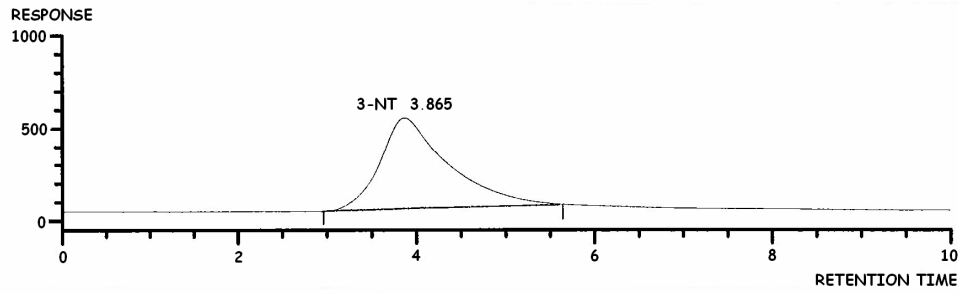
Endotoksin ve taurin gruplarında dokulardaki 3-NT konsantrasyonları, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Taurin+endotoksin grubunda ise, endotoksin grubuyla karşılaştırıldığında 3-NT konsantrasyonunun anlamlı ölçüde azaldığı ve kontrol grubu ile aynı seviyeye düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.2-4.4).



Şekil 4.2. Dalak dokusu 3-NT düzeyleri



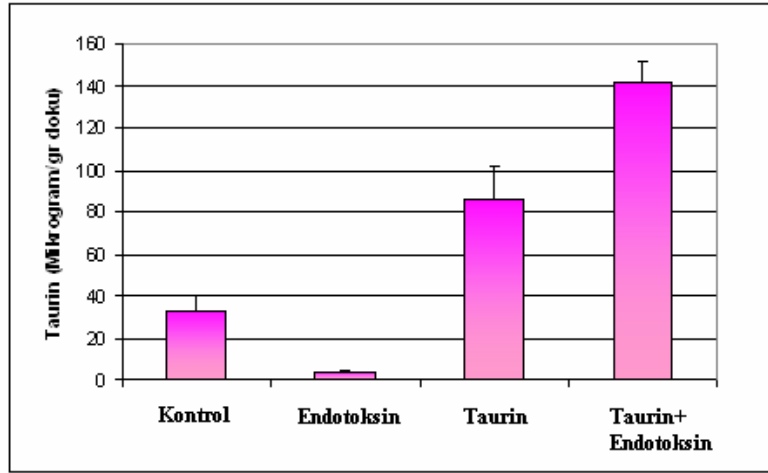
Şekil 4.3. 3-NT standartına ait kromatogram (25µmol/L)



Şekil 4.4. Numuneye ait 3-NT kromatogramı

4.3. Dalak Dokusu Taurin Düzeyleri

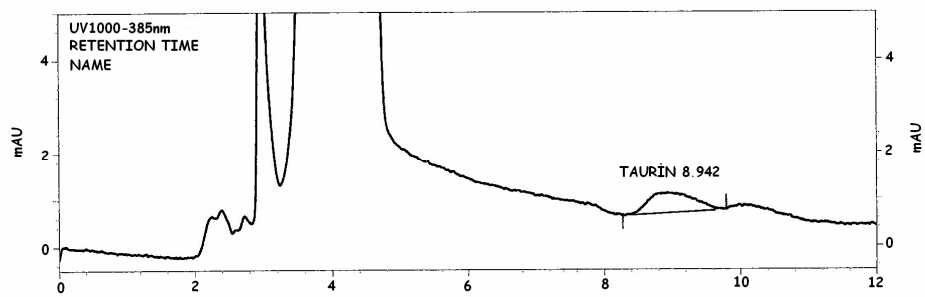
Dokulardaki taurin konsantrasyonları tüm gruplarda istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, endotoksin uygulamasının dokulardaki taurin konsantrasyonunu düşürdüğü, taurin uygulamasının ise arttırdığı gözlenmiştir. En yüksek taurin konsantrasyonu ise, taurin+endotoksin grubunda tespit edilmiştir ($141,708 \pm 9,912$, Şekil 4.5-4.7).



Şekil 4.5. Dalak dokusu taurin düzeyleri



Şekil 4.6. Taurin standartına ait kromatogram (20µg/mL)



Şekil 4.7. Numuneye ait taurin kromatogramı

5. SONUÇ

Bu çalışmada, ip olarak 4 mg/kg LPS, 300 mg/kg taurin veya taurin+LPS uygulanan kobaylar, uygulamadan 6 saat sonra feda edilmiş ve dalak dokularındaki 3-NT ve taurin konsantrasyonları HPLC’de, NO_x konsantrasyonları ise spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Çalışmamızda, LPS uygulanan grupta kontrol grubuyla karşılaştırıldığında NO_x konsantrasyonunun belirgin bir artış gösterdiği bulunmuştur.

Gram(-) bakterilerin hücre duvarının bir bileşeni olan LPS, laboratuvar hayvanlarında deneysel endotoksemi oluşturmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Organizmaya giren LPS, ilk olarak *LPS bağlayan protein (lipopolysaccharide-binding protein/LBP)*’e bağlanır. Daha sonra LPS-LBP kompleksi, hücre membranlarındaki CD14-TLR4 reseptör kompleksine bağlanarak, pek çok hücre tipinde özellikle makrofajlarda, inflamatuvar sitokinlerin, adezyon moleküllerinin, iNOS’un ve diğer genlerin ekspresyonunu artırır. Böylece, bu hücreler tarafından ROS ve RNS’nin (NO[•], O₂^{-•}, ONOO⁻, OH[•], H₂O₂) üretiminde aşırı bir artış meydana gelir [96, 97].

Çalışmamızda da LPS uygulanan grupta iNOS mRNA’sının ekspresyonundaki artışa bağlı olarak hücrelerdeki NO[•] üretimi artmış ve NO[•]’nun stabil son ürünü olan NO_x konsantrasyonu, kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur. Bu görüşümüzle uyumlu olarak, LPS uygulamasının dalakta iNOS mRNA ekspresyonu ve NO_x artışına sebep olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Liu ve ark. (1993), ratlara 15 mg/kg LPS enjeksiyonundan (ip) 4 saat sonra, çeşitli organlarda iNOS mRNA ekspresyonunu RT-PCR ile ölçmüşler ve LPS uygulamasının in vivo olarak dalak dokusunda iNOS mRNA ekspresyonunu indüklediğini kanıtlamışlardır [98].

Lin ve ark. (2006), 10 mg/kg LPS'yi intravenöz (iv) olarak uyguladıkları ratların dalak dokularında, LPS uygulamasını takiben 3 saat sonra iNOS mRNA ekspresyonunda belirgin bir artış meydana geldiğini RT-PCR tekniği ile tespit etmişlerdir [96].

Molina ve ark. (1998), 1 mg/kg intraarteriyel (ia) LPS enjeksiyonundan 90 dakika sonra feda ettikleri ratların dalaklarında, NO⁻ üretiminin bir indeksi olan NO_x konsantrasyonunu Griess yöntemi ile ölçmüşler ve sonuç olarak, LPS uygulamasının dalaktaki NO_x miktarını anlamlı bir şekilde arttırdığını bulmuşlardır [99].

Sakemi ve ark. (1998), LPS uygulamasının dalak, böbrek, beyin, karaciğer, akciğer gibi organlar ve serum NO_x düzeyine etkisini incelemişler ve dalak dokusunda, 1 mg/kg LPS uygulanmasından (ip) 18 saat sonra, kontrol grubuna göre NO_x miktarının yaklaşık 2 kat artış gösterdiğini belirtmişlerdir [100].

Çalışmamızda, yalnız taurin uygulanan grupta NO_x konsantrasyonu diğer tüm gruplara göre belirgin bir artış göstermiş, LPS ile taurinin birlikte uygulandığı grupta ise, yalnız LPS uygulanan gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma kaydedilmiştir.

Taurinin biyolojik etkilerinin çoğu hücre içi konsantrasyonuna bağlıdır [56]. Dışarıdan taurin uyguladığımız grupta, taurinin bilinen antioksidan etkisinin aksine NO_x konsantrasyonunu arttırması, yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkiye sahip olduğunun bir göstergesi olabilir. Bununla birlikte, LPS ve taurinin beraber uygulandığı grupta NO_x konsantrasyonunun azalması, taurinin hücrelerde antioksidan etkisini mevcut moleküler yapısı ile değil de, *taurin kloramin (TauCl)* aracılığıyla gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Bu görüşümüzle uyumlu olarak, yapılmış bazı in vitro çalışmalar bulunmaktadır.

Marcinkiewicz ve ark. (1998), IFN- γ + LPS ile aktive edilen ve taurin ya da TauCl ile inkübasyona bırakılan nötrofillerde, taurinin NO⁻ üretimini etkilemediğini, buna karşın TauCl'nin azalmaya neden olduğunu, NO⁻'nun stabil bir ürünü olan nitrit

(NO₂⁻) ölçümü aracılığıyla tespit etmişlerdir. Ayrıca elde ettikleri bulgulara göre, TauCl'nin bu etkisini iNOS mRNA ekspresyonunun inhibisyonu ve/veya iNOS mRNA stabilitesini azaltmak suretiyle gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir [101].

Park ve ark. (1993), LPS ile aktive olmuş makrofajlarda TauCl'nin iNOS geninin transkripsiyonunu inhibe ederek NO⁻ üretimini baskıladığını bildirmişlerdir [84].

Vücuttaki en büyük lenfoid organ olan dalak, antikor üretimi yoluyla spesifik bağışıklıkta görev almasına ek olarak, spesifik olmayan konak savunmasında da etkilidir. Yüksek miktarlardaki fagosit içeriği (tüm vücuttaki sabit makrofajların % 15'i) ve kan damarlarıyla olan direk etkileşimi nedeniyle, dolaşımdaki mikroorganizmaların temizlenmesinde önemli bir role sahiptir [102, 103].

LPS ile birlikte taurin uyguladığımız grupta NOx konsantrasyonunun azalması, dalaktaki sabit makrofajlar ve LPS uyarısıyla inflamasyon alanına gelen hareketli makrofajlar tarafından sentezlenen TauCl'nin, NO⁻ üretimini inhibe etmesi ile açıklanabilir. Proinflamatuvar hücreler tarafından üretilen TauCl, sadece üretildiği hücrede etkili değildir [101]. Aynı zamanda hücre dışına da salınarak, hem makrofaj kaynaklı hem de parankimal hücrelerden kaynaklanan NO⁻ üretimini baskılamış ve NO⁻'nun son ürünleri olan NOx konsantrasyonunu azaltmış olabilir.

Çalışmamızda, dokulardaki ONOO⁻-aracılı doku harabiyetinin önemli bir belirteci olan 3-NT konsantrasyonları ölçülmüş ve LPS uygulanan grupta, kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat artış gösterdiği saptanmıştır.

NO⁻ ve O₂⁻'nin hızlı reaksiyonundan oluşan ONOO⁻'nun, serbest ya da proteine bağlı tirozinleri nitratlayarak 3-NT oluşumuna neden olduğu bilinmektedir [104].

Çalışmamızda da, LPS uygulaması daha önce belirttiğimiz mekanizmayla dalaktaki makrofajları ve parankimal hücreleri uyararak, aşırı miktarlarda NO⁻ ve O₂⁻ üretimine neden olmuştur. Bu iki radikalın birleşmesiyle oluşan ONOO⁻'nun

tirozinlerle olan reaksiyonu sonucunda ise, 3-NT konsantrasyonunda önemli bir artış meydana gelmiştir.

Sanikidze ve ark. (2006), 0,25 mg/kg LPS uyguladıkları (ip) farelerde, 18 saat sonra dalaktaki NO^{\cdot} ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretiminin kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde artış gösterdiğini elektron paramanyetik rezonans (EPR) tekniği ile göstermişlerdir [97].

Yılmaz ve ark. (2001), ratlara 10 mg/kg LPS uygulamışlar (ip), 5 saat sonra, anestezi altındayken dalaklarına NO^{\cdot} seçici elektrotlar yerleştirerek, amperometrik metotla NO^{\cdot} üretimini ölçmüşlerdir. Sonuçta, LPS uygulanan grupta 30 dakikalık periyot içerisinde, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 kat artış meydana geldiğini tespit etmişler, yine LPS uygulanmış grupta immünohistokimyasal teknikle yoğun 3-NT boyaması saptamışlardır [105].

Bian ve ark. (2001) ise, dalak, karaciğer ve akciğer gibi tamamı makrofajlar ve endotel hücreler bakımından zengin organlarda, LPS-indüklü 3-NT oluşumunu incelemişler, 20 mg/kg LPS uyguladıkları (ip) ratların dalaklarında 3-NT yoğunluğunun arttığını hem western blotlama hem de immünohistokimya sonuçlarıyla göstermişlerdir [104].

Çalışmamızda, taurin ve LPS'nin birlikte uygulandığı grupta, yalnız LPS uygulanan gruba göre 3-NT konsantrasyonunun azaldığı, tek başına taurin uygulanmış grupta ise istatistiksel olarak anlamlı biçimde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Taurinin tek başına uygulandığı grupta 3-NT düzeyini arttırması, daha önce de belirtildiği gibi yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermesine bağlanabilir. Bununla birlikte, LPS ile beraber uygulandığında 3-NT konsantrasyonunu azaltması, taurinin mevcut moleküler yapısıyla, 3-NT oluşumunda rol alan NO^{\cdot} , $\text{O}_2^{\cdot-}$ ve ONOO^{\cdot} radikalleriyle direk reaksiyona giremediğinin, sadece TauCl aracılığıyla bu fonksiyonunu gerçekleştirebildiğinin bir göstergesi olabilir. TauCl muhtemelen ya direk hücrelerin NO^{\cdot} ve $\text{O}_2^{\cdot-}$ üretimini inhibe ederek ya da ONOO^{\cdot} yakalayıcı etki göstererek 3-NT oluşumunu engelleyebilir. Çeşitli in vitro çalışmalarda, TauCl'nin

O_2^- ve $ONOO^-$ 'nin endojen bir yakalayıcısı olduğu, buna karşın taurinin bu moleküllerle reaksiyon vermediği gösterilmiştir.

Park ve ark. (1998), aktive edilmiş insan PMNL'sinde [106], Kim ve ark. (1996), aktive edilmiş makrofajlarda TauCl'nin O_2^- üretimini inhibe ettiğini göstermişlerdir [85].

Choi ve ark. (2006), TauCl'nin, proinflamatuvar hücrelerde O_2^- üretimini sağlayan NADPH oksidaz enzim kompleksinin alt birimlerinin birleşmesini engelleyerek O_2^- oluşumunu inhibe ettiğini, ancak tek başına taurinin etkili olmadığını göstermişler ve bu doğrultuda, TauCl'nin proinflamatuvar hücreler tarafından üretilen aşırı O_2^- ve NO'nun neden olabileceği oksidatif hasara karşı dokuları koruduğunu ileri sürmüşlerdir [107].

Aruoma ve ark. (1988), taurin, hipotaurin ve metabolik öncüllerinin çeşitli radikallerle reaksiyon oranlarını araştırmışlar, taurinin O_2^- ile kolayca reaksiyon vermediğini in vitro olarak göstermişlerdir [108].

Mehta ve ark. (2001), nöron hücre kültüründe, taurinin $ONOO^-$ yakalayıcı etkisini araştırmışlar, sonuç olarak taurinin, $ONOO^-$ 'nin endojen bir yakalayıcısı olarak görünmediğini ve $ONOO^-$ 'nin sitotoksitesini azaltıcı yönde etki göstermediğini belirtmişlerdir [109].

Fontana ve ark. (2004), değişik konsantrasyonlarda (0,25-0,5-0,75-1 mM) uyguladıkları taurinin, $ONOO^-$ ile inkübe edilmiş tirozin amino asitini nitrasiona karşı korumadığını göstermişlerdir [110].

Çalışmamızda son olarak, taurin ve LPS uygulamalarının, hücrelerdeki taurin konsantrasyonları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla dokulardaki taurin miktarları ölçülmüş ve LPS uygulamasının, kontrol grubuna göre taurin düzeyini belirgin şekilde azalttığı gözlenmiştir.

Bu durum, LPS uygulayarak inflamasyon oluşturduğumuz hücrelerde, mevcut taurinin, TauCl oluşumu veya membran stabilizasyonu, Ca⁺⁺ homeostazının sağlanması gibi diğer hücre koruyucu etkilerini gerçekleştirmek amacıyla kullanılmasından ileri gelmiş olabilir.

Erdamar ve ark. (2007), bulgularımızla uyumlu olarak, 4 mg/kg LPS uygulanmış (ip) kobayların karaciğerlerinde, 6 saat sonra, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında taurin miktarının belirgin şekilde azaldığını göstermişlerdir [111].

Janssen ve ark. (1983), kobaylara iv LPS enjeksiyonunu takiben 3. saatte, kalpteki taurin düzeylerinin anlamlı bir azalma gösterdiğini bulmuşlardır [112].

Çalışmamızda, yalnız taurin uygulanan grupta, kontrol grubuna göre taurin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana gelmiş, LPS ve taurinin birlikte uygulandığı grupta ise, taurin miktarı tüm gruplar içinde en yüksek düzeye ulaşmıştır.

Taurinin tek başına uygulandığı grupta meydana gelen artış, eksojen taurin uygulamasının hücrelerdeki taurin konsantrasyonunu arttırdığını düşündürmektedir.

Kim ve ark. (1998), radyoaktif işaretli taurini iv olarak enjekte ettikleri ratlarda, enjeksiyondan 1 saat sonra taurinin biyodağılımını incelemişler ve karaciğer ile böbrekten sonra en fazla dalakta biriktiğini gözlemişlerdir [60].

Taurin ve LPS'yi beraber uyguladığımız grupta, taurin konsantrasyonunun en yüksek düzeye ulaşması, hem eksojen taurinin hücrelerdeki taurin konsantrasyonunu arttırmasına hem de LPS indüksiyonu ile oluşan NO'nun, TauT mRNA ekspresyonunu uyarmasına bağlanabilir.

Bridges ve ark. (2001), NO donörü olan SIN-1 ile muamele ettikleri hücrelerde, TauT mRNA ekspresyonundaki artışa bağlı olarak hücrelere taurin alımının (radyoaktif işaretli) yaklaşık 4 kat arttığını in vitro çalışmalarla göstermişlerdir [61].

Erdamar ve ark. (2007), sonuçlarımızla uyumlu olarak, 4 mg/kg LPS enjekte ettikleri kobayların karaciğerinde, LPS ile beraber taurin uygulanan grupta, yalnız LPS veya taurin uygulanan gruplara göre taurin miktarında belirgin bir artış tespit etmişlerdir [111].

Sonuç olarak bulgularımız, endotokseminin, iNOS'un indüksiyonu yoluyla, NO[•] üretiminin bir göstergesi olan NO_x konsantrasyonlarını ve ONOO⁻ aracılı doku hasarının bir belirteci olan 3-NT düzeylerini arttırdığını göstermektedir. Taurin ise, muhtemelen klorlanmış bileşiği olan TauCl aracılığıyla endotoksemik kobayların dalak dokularındaki NO_x ve 3-NT düzeylerini anlamlı şekilde azaltarak antioksidan etki göstermiştir. Ancak, tek başına uygulandığı gruplarda NO_x ve 3-NT konsantrasyonlarında artışa sebep olması, taurinin enfeksiyon durumlarında etkili olmasına karşın, enfekte olmamış sağlıklı deneklerde bir antioksidan olarak kullanılabilirliğinin tartışmalı olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, daha ileri çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Garcia, X., Stein, F., "Nitric oxide", *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 17 (2): 55-57 (2006).
2. Çekmen, M.B., Turgut, M., Türköz, Y., Aygün, A., Gözükara, E.M., "Nitrik oksit ve nitrik oksit sentazın fizyolojik ve patolojik özellikleri", *T. Klin. J. Pediatr.*, 10: 226-236 (2001).
3. Parratt, J.R., "Nitric oxide. A key mediator in sepsis and endotoxaemia?", *J. Physiol. Pharmacol.*, 48 (4): 493-506 (1997).
4. Yaman, H., Ünlü, A., Karabıçak, U., Çimen, B., Balabanlı, B., Erbil, M.K., Türközkan, N., "Measurement of 3-nitrotyrosine by high performance liquid chromatography", *T. Klin. J. Med. Res.*, 18: 26-30 (2000).
5. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., Freeman, B.A., "Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide", *J. Biol. Chem.*, 266 (7): 4244-4250 (1991).
6. Akkuş, İ., "Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri", *Mimoza Basımevi*, Konya, 3-41 (1995).
7. Eiserich, J.P., Patel, R.P., O'Donnell, V.B., "Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules", *Mol. Aspects Med.*, 19 (4-5): 221-357 (1998).
8. Herce-Pagliai, C., Kotecha, S., Shuker, D.E., "Analytical methods for 3-nitrotyrosine as a marker of exposure to reactive nitrogen species: a review", *Nitric Oxide*, 2 (5): 324-336 (1998).
9. Murphy, M.P., Packer, M.A., Scarlett, J.L., Martin, S.W., "Peroxynitrite: a biologically significant oxidant", *Gen. Pharmacol.*, 31 (2): 179-186 (1998).
10. Beckman, J.S., Crow, J.P., "Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation", *Biochem. Soc. Trans.*, 21 (2): 330-334 (1993).
11. Pryor, W.A., Squadrito, G.L., "The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide", *Am. J. Physiol.*, 268 (5): 699-722 (1995).
12. Schuller-Levis, G.B., Park, E., "Taurine and its chloramine: modulators of immunity", *Neurochem. Res.*, 29 (1): 117-126 (2004).

13. Redmond, H.P., Stapleton, P.P., Neary, P., Bouchier-Hayes, D., "Immunonutrition: the role of taurine", *Nutrition*, 14 (7-8): 599-604 (1998).
14. Birdsall, T.C., "Therapeutic applications of taurine", *Altern. Med. Rev.*, 3 (2): 128-136 (1998).
15. Kılınç, A., Kılınç, K., "Nitrik oksitin fonksiyonları ve toksik etkileri", *Palme Yayınevi*, Ankara, 1-56 (2003).
16. Yu, B.P., "Cellular defenses against damage from reactive oxygen species", *Physiol. Rev.*, 74 (1): 139-161 (1994).
17. Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., "Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics", *Mass Spectrom. Rev.*, 24 (1): 55-99 (2005).
18. Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Kaur, H., Cross, C.E., Halliwell, B., "Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species", *Methods Enzymol.*, 269: 175-184 (1996).
19. Turko, I.V., Murad, F., "Protein nitration in cardiovascular diseases", *Pharmacol. Rev.*, 54 (4): 619-634 (2002).
20. Williams, G.M., Jeffrey, A.M., "Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced", *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 32 (3): 283-292 (2000).
21. Özben, T., "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants: pathological and physiological significance", *Plenum Press*, New York, 300-335 (1998).
22. Eberhardt, M.K., "Reactive oxygen metabolites: chemistry and medical consequences", *CRC Press*, Boca Raton, 341-369 (2001).
23. Burçak, G., Andican, G., "Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma", *Cerrahpaşa J. Med.*, 35: 159-169 (2004).
24. Evans, M.D., Cooke, M.S., "Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids", *Bioessays*, 26 (5): 533-542 (2004).
25. Nunomura, A., Perry, G., Pappolla, M.A., Wade, R., Hirai, K., Chiba, S., Smith, M.A., "RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease", *J. Neurosci.*, 19 (6): 1959-1964 (1999).
26. Shan, X., Tashiro, H., Lin, C.I., "The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease", *J. Neurosci.*, 23 (12): 4913-4921 (2003).

27. Lurie, Z., Offer, T., Russo, A., Samuni, A., Nitzan, D., "Do stable nitroxide radicals catalyze or inhibit the degradation of hyaluronic acid?", *Free Radic. Biol. Med.*, 35 (2): 169-178 (2003).
28. Murata-Kamiya, N., Kamiya, H., Kaji, H., Kasai, H., "Mutations induced by glyoxal and methylglyoxal in mammalian cells", *Oxford University Press Nucleic Acids Symposium Series*, 44: 3-4 (2000).
29. Stadtman, E.R., Levine, R.I., "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins", *Amino Acids*, 25 (3-4): 207-218 (2003).
30. Wink, D.A., Mitchell, J.B., "Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide", *Free Radic. Biol. Med.*, 25 (4-5): 434-456 (1998).
31. Djordjevic, V.B., "Free radicals in cell biology", *Int. Rev. Cytol.*, 237: 57-89 (2004).
32. Kirkeboen, K.A., Strand, O.A., "The role of nitric oxide in sepsis-an overview", *Acta. Anaesthesiol. Scand.*, 43 (3): 275-288 (1999).
33. Davies, M.G., Fulton, G.J., Hagen, P.O., "Clinical biology of nitric oxide", *Br. J. Surg.*, 82 (12): 1598-1610 (1995).
34. Erbaş, D., "Nitrik oksit: fizyolojik önemi ve çeşitli hastalıklardaki rolü", *Klinik Gelişim*, 11: 376-380 (1998).
35. Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M., "Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies", *Free Radic. Res.*, 31 (6): 651-669 (1999).
36. Robbins, R.A., Grisham, M.B., "Molecules in focus: nitric oxide", *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 29 (6): 857-860 (1997).
37. Dixit, V.D., Parvizi, N., "Nitric oxide and the control of reproduction", *Anim. Reprod. Sci.*, 65 (1-2): 1-16 (2001).
38. Brovkovich, V., Dobrucki, L.W., Brovkovich, S., Dobrucki, I., Kalinowski, L., Kiechle, F., Malinski, T., "Nitric oxide measurements during endotoxemia", *Clin. Chem.*, 47 (6): 1068-1074 (2001).
39. Lirk, P., Hoffmann, G., Rieder, J., "Inducible nitric oxide synthase-time for reappraisal", *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 1 (1): 89-108 (2002).
40. Moncada, S., Higgs, A., "The L-arginine-nitric oxide pathway", *N. Engl. J. Med.*, 329 (27): 2002-2012 (1993).

41. Nussler, A.K., Billiar, T.R., “Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase”, *J. Leukoc. Biol.*, 54 (2): 171-178 (1993).
42. Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H., Crow, J.P., “Oxidative chemistry of peroxynitrite”, *Methods Enzymol.*, 233: 229-240 (1994).
43. Aust, A.E., Eveleigh, J.F., “Mechanisms of DNA oxidation”, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 222 (3): 246-252 (1999).
44. Dedon, P.C., Tannenbaum, S.R., “Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation”, *Arch. Biochem. Biophys.*, 423 (1): 12-22 (2004).
45. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Naviliat, M., Cayota, A., “Unraveling peroxynitrite formation in biological systems”, *Free Radic. Biol. Med.*, 30 (5): 463-488 (2001).
46. Szabo, C., “Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity”, *Toxicol. Lett.*, 140-141: 105-112 (2003).
47. Halliwell, B., “What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo?”, *FEBS Lett.*, 411 (2-3): 157-160 (1997).
48. Hensley, K., Maitt, M.L., Pye, Q.N., Stewart, C.A., Wack, M., Tabatabaie, T., Floyd, R.A., “Quantitation of protein-bound 3-nitrotyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine by high-performance liquid chromatography with electrochemical array detection”, *Anal. Biochem.*, 251 (2): 187-195 (1997).
49. Kamisaki, Y., Wada, K., Nakamoto, K., Kishimoto, Y., Kitano, M., Itoh, T., “Sensitive determination of nitrotyrosine in humans by high-performance liquid chromatography”, *J. Chromatogr. B*, 685: 343-347 (1996).
50. Duncan, M.W., “A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine”, *Amino Acids*, 25 (3-4): 351-361 (2003).
51. Greenacre, S.A., Ischiropoulos, H., “Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction”, *Free Radic. Res.*, 34 (6): 541-581 (2001).
52. Khan, J., Brennan, D.M., Bradley, N., Gao, B., Bruckdorfer, R., Jacobs, M., “3-Nitrotyrosine in the proteins of human plasma determined by an ELISA method”, *Biochem. J.*, 332: 807-808 (1998).
53. Huxtable, R.J., “Physiological actions of taurine”, *Physiol. Rev.*, 72 (1): 101-163 (1992).

54. Lourenco, R., Camilo, M.E., "Taurine: a conditionally essential amino acid in humans?", *Nutr. Hosp.*, 17 (6): 262-270 (2002).
55. Wright, C.E., Tallan, H.H., Lin, Y.Y., Gaull, G.E., "Taurine: biological update", *Annu. Rev. Biochem.*, 55: 427-453 (1986).
56. Tappaz, M.L., "Taurine biosynthetic enzymes and taurine transporter: molecular identification and regulations", *Neurochem. Res.*, 29 (1): 83-96 (2004).
57. Bouckennooghe, T., Remacle, C., Reusens, B., "Is taurine a functional nutrient?", *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 9 (6): 728-733 (2006).
58. Dominy, J., Eller, S., Dawson, R., "Building biosynthetic schools: reviewing compartmentation of CNS taurine synthesis", *Neurochem. Res.*, 29 (1): 97-103 (2004).
59. Han, X., Patters, A.B., Jones, D.P., Zelikovic, I., Chesney, R.W., "The taurine transporter: mechanisms of regulation", *Acta Physiol. (Oxf)*, 187 (1-2): 61-73 (2006).
60. Kim, C., Chung, J.K., Jeong, J.M., Chang, Y.S., Lee, Y.J., Kim, Y.J., Lee, M.C., Koh, C.S., Kim, B.K., "Uptake of taurine and taurine chloramine in murine macrophages and their distribution in mice with experimental inflammation", *Adv. Exp. Med. Biol.*, 442: 169-176 (1998).
61. Bridges, C.C., Ola, M.S., Prasad, P.D., El-Sherbeny, A., Ganapathy, V., Smith, S.B., "Regulation of taurine transporter expression by NO in cultured human retinal pigment epithelial cells", *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 281 (6): 1825-1836 (2001).
62. Heller-Stilb, B., Van Roeyen, C., Rascher, K., "Disruption of the taurine transporter gene (taut) leads to retinal degeneration in mice", *FASEB J.*, 16 (2): 231-233 (2002).
63. Pasantes-Morales, H., Quesada, O., Moran, J., "Taurine: an osmolyte in mammalian tissues", *Adv. Exp. Med. Biol.*, 442: 209-217 (1998).
64. Huxtable, R.J., "Sources and turnover rates of taurine in nursing and weaned rat pups", *J. Nutr.*, 111(7): 1275-1286 (1981).
65. Awapara, J., "Absorption of injected taurine-S³⁵ by rat organs", *J. Biol. Chem.*, 225 (2): 877-882 (1957).
66. Reichelt, K.L., Wedege, E., Kvamme, E., "Effects of amines on the level of N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in mouse brain tissue slices", *J. Neurochem.*, 18 (11): 2129-2136 (1971).

67. Petrosian, A.M., Haroutounian, J.E., "Taurine as a universal carrier of lipid soluble vitamins: a hypothesis", *Amino Acids*, 19 (2): 409-421 (2000).
68. Murphy, R., DeCoursey, T.E., "Charge compensation during the phagocyte respiratory burst", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1757 (8): 996-1011 (2006).
69. Marcinkiewicz, J., Chain, B., Nowak, B., Grabowska, A., Bryniarski, K., Baran, J., "Antimicrobial and cytotoxic activity of hypochlorous acid: interactions with taurine and nitrite", *Inflamm. Res.*, 49 (6): 280-289 (2000).
70. Mainnemaire, A., Megarbane, B., Soueidan, A., Daniel, A., Chapple, I.L., "Hypochlorous acid and taurine-N-monochloramine in periodontal diseases", *J. Dent. Res.*, 83 (11): 823-831 (2004).
71. Marcinkiewicz, J., Nowak, B., Grabowska, A., Bobek, M., Petrovska, L., Chain, B., "Regulation of murine dendritic cell functions in vitro by taurine chloramine, a major product of the neutrophil myeloperoxidase-halide system", *Immunology*, 98 (3): 371-378 (1999).
72. Stapleton, P.P., Redmond, H.P., Bouchier-Hayes, D.J., "Taurine and inflammation: a new approach to an old problem?", *J. Leukoc. Biol.*, 61 (2): 231-232 (1997).
73. Weiss, S.J., Klein, R., Slivka, A., Wei, M., "Chlorination of taurine by human neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation", *J. Clin. Invest.*, 70 (3): 598-607 (1982).
74. Weiss, S.J., "Tissue destruction by neutrophils", *N. Engl. J. Med.*, 320 (6): 365-376 (1989).
75. Nagl, M., Hess, M.W., Pfaller, K., Hengster, P., Gottardi, W., "Bactericidal activity of micromolar N-chlorotaurine: evidence for its antimicrobial function in the human defense system", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 (9): 2507-2513 (2000).
76. Nagl, M., Teuchner, B., Pöttinger, E., Ulmer, H., Gottardi, W., "Tolerance of N-chlorotaurine, a new antimicrobial agent, in infectious conjunctivitis-a phase II pilot study", *Ophthalmologica*, 214 (2): 111-114 (2000).
77. Tatsumi, T., Fliss, H., "Hypochlorous acid and chloramines increase endothelial permeability: possible involvement of cellular zinc", *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 267 (4): 1597-1607 (1994).
78. Nagl, M., Larcher, C., Gottardi, W., "Activity of N-chlorotaurine against herpes simplex and adenoviruses", *Antivir. Res.*, 38 (1): 25-30 (1998).

79. Nagl, M., Gottardi, W., "In vitro experiments on the bactericidal action N-chlorotaurine", *Hygiene und Medizin*, 21: 597-605 (1996).
80. Yazdanbakhsh, M., Eckmann, C.M., Roos, D., "Killing of schistosomula by taurine chloramine and taurine bromamine", *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 37 (1): 106-110 (1987).
81. Nagl, M., Hengster, P., Semenitz, E., Gottardi, W., "The postantibiotic effect of N-chlorotaurine on *Staphylococcus aureus*. Application in the mouse peritonitis model", *J. Antimicrob. Chemother.*, 43 (6): 805-809 (1999).
82. Marcinkiewicz, J., Grabowska, A., Bereta, J., Stelmaszynska, T., "Taurine chloramine, a product of activated neutrophils inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators", *J. Leukoc. Biol.*, 58 (6): 667-674 (1995).
83. Quinn, M.R., Park, E., Schuller-Levis, G., "Taurine chloramine inhibits prostaglandin E2 production in activated RAW 264.7 cells by post-transcriptional effects on inducible cyclooxygenase expression", *Immunol. Lett.*, 50 (3): 185-188 (1996).
84. Park, E., Quinn, M.R., Wright, C.E., Schuller-Levis, G., "Taurine chloramine inhibits the synthesis of nitric oxide and the release of tumor necrosis factor in activated RAW 264.7 cells", *J. Leukoc. Biol.*, 54 (2): 119-124 (1993).
85. Kim, C., Park, E., Quinn, M.R., Schuller-Levis, G., "The production of superoxide anion and nitric oxide by cultured murine leukocytes and the accumulation of TNF- α in the conditioned media is inhibited by taurine chloramine", *Immunopharmacology*, 34 (2-3): 89-95 (1996).
86. McLoughlin, D.M., Stapleton, P.P., Bloomfield, F.J., "Influence of taurine and a substituted taurine on the respiratory burst pathway in the inflammatory response", *Biochem. Soc. Trans.*, 19 (1): 73-78 (1991).
87. Chorazy, M., Kontny, E., Marcinkiewicz, J., Maslinski, W., "Taurine chloramine modulates cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells", *Amino Acids*, 23 (4): 407-413 (2002).
88. Vohra, B.P., Hui, X., "Taurine protects against carbon tetrachloride toxicity in the cultured neurons and in vivo", *Arch. Physiol. Biochem.*, 109 (1): 90-94 (2001).

89. Balkan, J., Doğru-Abbasoğlu, S., Kanbağlı, O., Çevikbaş, U., Aykaç-Toker, G., Uysal, M., “Taurine has a protective effect against thioacetamide-induced liver cirrhosis by decreasing oxidative stress”, *Hum. Exp. Toxicol.*, 20 (5): 251-254 (2001).
90. Roysommuti, S., Azuma, J., Takahashi, K., Schaffer, S., “Taurine cytoprotection: from cell to system”, *Thai J. Physiol. Sci.*, 16 (2): 17-27 (2003).
91. Cherif, H., Reusens, B., Dahri, S., Remacle, C., Hoet, J.J., “Stimulatory effects of taurine on insulin secretion by fetal rat islets cultured in vitro”, *J. Endocrinol.*, 151 (3): 501-506 (1996).
92. Egan, B.M., Abdih, H., Kelly, C.J., Condron, C., Bouchier-Hayes, D.J., “Effect of intravenous taurine on endotoxin-induced acute lung injury in sheep”, *Eur. J. Surg.*, 167 (8): 575-580 (2001).
93. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., “Analyses of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids”, *Anal. Biochem.*, 126: 131-138 (1982).
94. Maruyama, W., Hashizume, Y., Matsubara, K., Naoi, M., “Identification of 3-nitro-l-tyrosine, a product of nitric oxide and superoxide, as an indicator of oxidative stress in the human brain”, *J. Chromatogr. B*, 676 (1): 153-158 (1996).
95. McMahon, G.P., O’Kennedy, R., Kelly, M.T., “High-performance liquid chromatographic determination of taurine in human plasma using pre-column extraction and derivatization”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (8-10): 1287-1294 (1996).
96. Lin, N.T., Yang, F.L., Lee, R.P., Peng, T.C., Chen, H.I., “Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats”, *Life Sci.*, 78 (10): 1038-1043 (2006).
97. Sanikidze, T.V., Tkhilava, N.G., Papava, M.B., Datunashvili, I.V., Gongadze, M.T., Gamrekelashvili, D.D., Bakhutashvili, V.I., “Role of free nitrogen and oxygen radicals in the pathogenesis of lipopolysaccharide-induced endotoxemia”, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 141 (2): 211-215 (2006).
98. Liu, S., Adcock, I.M., Old, R.W., Barnes, P.J., Evans, T.W., “Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196 (3): 1208-1213 (1993).

99. Molina, P.E., Qian, L., Schuhlein, D., Naukam, R., Wang, H., Tracey, K.J., Abumrad, N.N., "CNI-1493 attenuates hemodynamic and pro-inflammatory responses to LPS", *Shock*, 10 (5): 329-334 (1998).
100. Sakemi, K., Ohno, Y., Tsuda, M., "NO₂⁻/NO₃⁻ levels in blood and principal organs in rats treated with lipopolysaccharide", *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 116: 101-106 (1998).
101. Marcinkiewicz, J., Grabowska, A., Bereta, J., Bryniarski, K., Nowak, B., "Taurine chloramine down-regulates the generation of murine neutrophil inflammatory mediators", *Immunopharmacology*, 40 (1): 27-38 (1998).
102. Romanovsky, A.A., Petersen, S.R., "The spleen: another mystery about its function", *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 284 (6): 1378-1379 (2003).
103. Feleder, C., Perlik, V., Tang, Y., Blatteis, C.M., "Putative antihyperpyretic factor induced by LPS in spleen of guinea pigs", *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 289 (3): 680-687 (2005).
104. Bian, K., Murad, F., "Diversity of endotoxin-induced nitrotyrosine formation in macrophage-endothelium-rich organs", *Free Radic. Biol. Med.*, 31 (4): 421-429 (2001).
105. Yılmaz, G., Gürsoy-Özdemir, Y., Doğan, A.İ., Gürdal, H., Gedikoğlu, G., Dalkara, T., Güç, M.O., "Spleen damage in endotoxaemic mice: the involvement of nitric oxide", *J. Physiol. Pharmacol.*, 52 (4): 729-744 (2001).
106. Park, E., Alberti, J., Quinn, M.R., Schuller-Levis, G., "Taurine chloramine inhibits the production of superoxide anion, IL-6 and IL-8 in activated human polymorphonuclear leukocytes", *Adv. Exp. Med. Biol.*, 442: 177-182 (1998).
107. Choi, H.S., Cha, Y., Kim, C., "Taurine chloramine inhibits PMA-stimulated superoxide production in human neutrophils perhaps by inhibiting phosphorylation and translocation of p47^{phox}", *Int. Immunopharmacol.*, 6 (9): 1431-1440 (2006).
108. Aruoma, O.I., Halliwell, B., Hoey, B.M., Butler, J., "The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors", *Biochem. J.*, 256 (1): 251-255 (1988).
109. Mehta, T.R., Dawson, R., "Taurine is a weak scavenger of peroxynitrite and does not attenuate sodium nitroprusside toxicity to cells in culture", *Amino Acids*, 20 (4): 419-433 (2001).

110. Fontana, M., Pecci, L., Dupre, S., Cavallini, D., “Antioxidant properties of sulfates: protective effect of hypotaurine on peroxynitrite-dependent damage”, *Neurochem. Res.*, 29 (1): 111-116 (2004).
111. Erdamar, H., Türközkan, N., Balabanlı, B., Ozan, G., Bircan, F.S., “The relationship between taurine and 3-nitrotyrosine level of hepatocytes in experimental endotoxemia”, *Neurochem. Res.*, 32 (11): 1965-1968 (2007).
112. Janssen, H.F., Lombardini, J.B., Lust, R.M., “Cardiac taurine levels during endotoxemia”, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 172 (4): 407-411 (1983).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BİRCAN, Filiz Sezen
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 18.06.1983 ANKARA
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (312) 433 74 57
e-mail : fsbircan@yahoo.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Gazi Üniversitesi/ Biyoloji Bölümü	2005
Lise	Ankara Kurtuluş Lisesi	2000

Yabancı Dil

İngilizce

Yayımlar

1. Erdamar, H., Türközkan, N., Balabanlı, B., Ozan, G., Bircan, F.S., “The relationship between taurine and 3-nitrotyrosine level of hepatocytes in experimental endotoxemia”, *Neurochem. Res.*, 24 (1):53-7 (2007).

2. Ozan, G., Bircan, F.S., Balabanlı, B., Türközkan, N., “Peroksinitrit aracılı harabiyet markırı olan 3-nitrotirozinin HPLC-UV ve HPLC-ECD ile ölçümü ve karşılaştırılması”, III. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresi, 21-23 Haziran 2007, KONYA, Bildiri Özetleri, p 64-65.

Hobiler

Seyahat etmek, fotoğraf çekmek, kitap okumak.