



VI. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ 19-21 NİSAN 2019 – GAZİANTEP NOVOTEL

İN-VİTRO AKTİVASYONUN LÖKOSİTLERDEN SENTEZLENEN NO DÜZEYİNE MUHTEMEL ETKİSİ

Yazarlar : Yrd.Doç.Dr Faruk Metin Çomu

Kurum : Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD

GİRİŞ - AMAÇ

Nitrik oksit (NO), başta vazodilatatör ve özellikle immün sistem olmak üzere vücutta birçok işlevi vardır. NO, lökositler tarafından salınarak fagozite edilemeyecek boyuttaki mikroorganizmaları yok etmek amacıyla kullandığı maddelerden birisidir. Sodyumnitroprussid (SNP) güçlü bir NO sağlayıcısı olan ve hipertansiyon krizlerinde kullanılabilen ajanlardandır. Amacımız, in-vitro ortamda gerçekleştirilen aktivasyonun lökositlerden salınan NO düzeyine olan muhtemel etkisini incelemektir.

METOD

Çalışmamızda sağlıklı erkeklerden alınan heparinize taze tam kan örneklerinden kütleli yoğunluk ayırım tekniği kullanılarak lökositler izole edildi. Bunlardan 1×10^6 hücre/ml lökosit süspansiyonları hazırlandı. Lökosit süspansiyonu onarlı sekiz gruba ayrıldı. İlk dört grup izole edildiği şekilde bırakılarak, ikinci dördü grup ise 10^{-7} M FMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) ile aktive edildi. Lökosit aktivasyonunu belirlemek için NBT (Nitroblue Tetrazolium) redüksiyonuna dayalı yöntem kullanıldı. Hücre içerisine (diffüzyon ve/veya fagositozla) giren NBT partikülleri, lökositler tarafından redüksiyona uğratılıp mavi-mor renge dönüşür ve bu renkteki lökositler mikroskopik olarak sayıldı, % 85 NBT pozitif hücre görülmesi, aktivasyonun göstergesi olarak kabul edildi.

Nitrik oksit ölçümünde; kontrol grupları olarak, SNP eklenmemiş normal ve aktive lökositler kullanıldı. Kalan aktive olan ve olmayan üçerli gruplara sırasıyla 0.1mM, 1mM ve 5mM SNP ilave edilerek, 37 C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Aynı gruplar lökositleri resüspande ettiğimiz PBS tamponları içinde oluşturuldu. Deney ortamında oluşan nitrik oksidin göstergesi olan nitrit miktarının tayini için Griess yöntemi modifiye edilerek kullanıldı.

Lökositler tarafından üretilen NO seviyesi (endojen nitrik NO), lökosit gruplarındaki nitrit miktarından, aynı grubun tampon çözeltisinde ölçülen nitrit miktarı çıkartılarak hesaplandı (LökositNO - TamponNO = EndojenNO).



VI. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ 19-21 NİSAN 2019 – GAZİANTEP NOVOTEL

BULGULAR

Çalışmamız sonucunda, normal lökositlerde bazal seviyede NO salgılandığı görüldü. Aktive edildiğinde ölçülen bazal NO'da azalma gözlemlendi.

(O₂- + NO -OONO).

Farklı konsantrasyonda inkübe edilen SNP'nin, lökositler tarafından üretilen nitrik oksit (endojen NO) üzerinde, aktive edilen ve edilmeyen lökosit gruplarında değişik etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Aktive edilmeyen lökositlerde; SNP'nin eklenmesi bazal seviyede üretilen nitrik oksit miktarında azalmaya neden olmuştur. Bu azalış, SNP'nin konsantrasyonunun artışı ile daha da derinleşmektedir. Aktive edilen lökositler ekzojen nitrik oksit (SNP), doz artışına paralel olarak endojen NO seviyesinde de artış meydana gelmişti (p<0,05).

SONUC

Çalışmamız aktive olmayan lökositlerde ekzojen NO, konsantrasyonuna paralel olarak sentezlenen endojen NO'da azalmaya neden olduğu izlenmiştir. Böylece inflamatuvar cevapta inhibisyon oluşturacağı düşünülmektedir.

Aktivasyonun ise ortamdaki NO dozuyla uyumlu şekilde endojen NO'da artışa neden olduğu görülmektedir. Lökositlerin aktivasyon kazandıktan sonra, ortamda NO bulunmasının, lökositleri daha da fazla NO üretmeye yönelttiği söylenebilir ki bu septik şok tablosuna benzemektedir. Septik şokta, dolaşımdaki hemen tüm lökositler aktive olup patojeni yok etmeye çalışmakta ardından son evrede aşırı hipotansiyon ve ölüm gerçekleşmektedir. Bu konudaki çalışmalar, hipotansiyondan aşırı ve kontrolsüz nitrik oksit salınımının da sorumlu olduğunu göstermektedir. Hipotansiyonu önlemek için NOS inhibitörleri ile çalışmalar yapılmakta ve olumlu sonuçları olduğu belirtilmektedir.

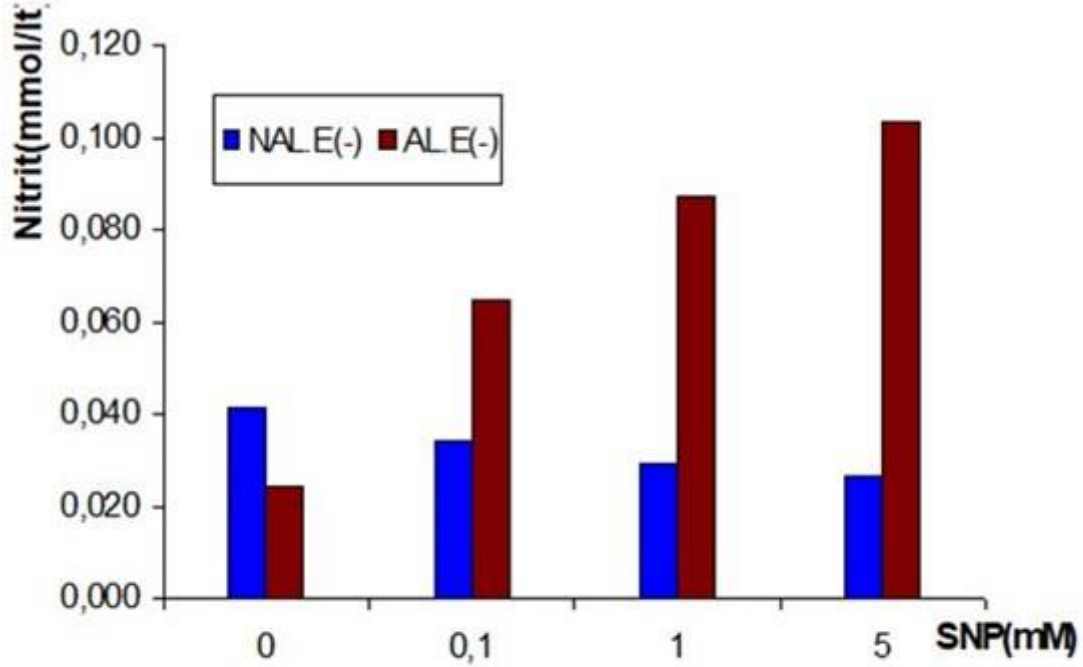
Bilindiği gibi (SNP) NO donörleri özellikle kalp hastalarında vazgeçilmez ilaç gruplarındandır. Yüksek düzeyde NO'nun bulunması; lökositlerin patojenlerle savaşımında etkinliğini azaltmakta yada aktive lökositlerde olduğu gibi aşırı miktarda NO sentezine neden olarak vucutta birçok olumsuzlukların gelişebileceğini düşündürmektedir.

ANAHTAR KELİMELE

Lökosit, in-vitro aktivasyon, NO



VI. ULUSLARARASI KATILIMLI DENEYSEL HEMATOLOJİ KONGRESİ 19-21 NİSAN 2019 – GAZİANTEP NOVOTEL



Şekil: Aktif ve Aktif Olmayan Lökositlerde, Hücrel Nitrik Oksit Miktarları
NAL: Aktive Edilmeyen Lökosit, AL: Aktive Edilen Lökosit