
Raw 264.7 Makrofaj Hücrelerinden Lipopolisakkarid Aracılığı ile Nitrik Oksid Salgılanmasına Monofosforil Lipid A'nın Etkisi

Cemalettin AYBAY, Turgut İMİR, H. Cengiz GÜLSAYIN, Başak KAYHAN

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Ankara

ÖZET

Lipopolisakkaridin (LPS veya endotoksin) toksik etkilerinden lipid A kısmı sorumludur. Lipid A'nın yapısal analogları ve öncül moleküllerinin tanımlanmasından sonra bunların LPS'nin biyolojik etkilerine karşı kompetitif antagonizma gösterdikleri anlaşılmıştır. Bu çalışmada *Salmonella minnesota* LPS'si ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinden nitrik oksid (NO) salgılanmasına *Salmonella minnesota* kaynaklı monofosforil lipid A'nın etkisi araştırıldı. Monofosforil lipid A'nın kendisi makrofajlardan doza bağımlı bir şekilde NO salgılanmasına neden olmakla birlikte, belirli konsantrasyonlardaki monofosforil lipid A, LPS aracılığı ile makrofajlardan NO salgılanmasını engellemektedir. Monofosforil lipid A'nın 0.125 µg/mL ve daha az konsantrasyonlarında, NO salgılatma kapasitesinin azaldığı ve LPS aracılığı ile RAW 264.7 makrofajlarından NO salgılanmasını baskıladığı saptandı.

Anahtar Kelimeler : Lipopolisakkarid (LPS), Monofosforil lipid A, Nitrik Oksid (NO).

SUMMARY

Effect of Monophosphoryl Lipid A on Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide

Production from Raw 264.7 Macrophages

The lipid A moiety of LPS is responsible for the toxic effects of LPS. The identification of structural analogs and precursors of lipid A have demonstrated that they are apparently competitive antagonists against the biological actions of LPS. In this study we investigated the effect of *Salmonella minnesota* monophosphoryl lipid A on nitric oxide (NO) secretion from *Salmonella minnesota* LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. Although monophosphoryl lipid A itself induced NO production from macrophages in a dose dependent manner, at a given concentration, monophosphoryl lipid A demonstrated inhibitory action on LPS-induced NO production from macrophages. At the concentrations equal to and lower than 0.125 µg/mL, NO inducing capacity of monophosphoryl lipid A significantly decreased along with reducing the LPS-induced NO production from RAW264.7 macrophages.

Key Word : Lypopolysaccharide (LPS), Monophosphoryl lipid A, Nitric Oxide (NO).

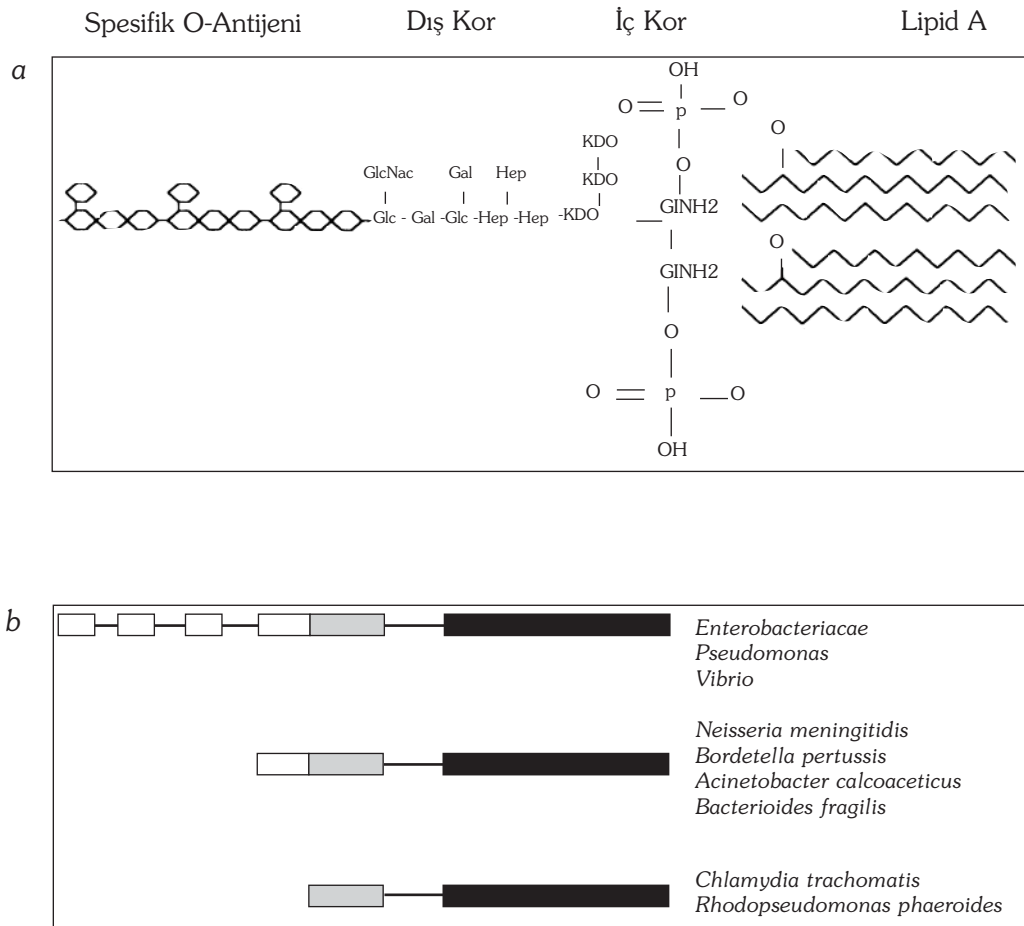
GİRİŞ

Ateş, granülositoz, trombositopeni ve kan basıncındaki düşme, gram negatif bakterilerin neden olduğu sistemik infeksiyonların genel bulgularıdır. İnfeksiyonun şiddetli olduğu hastalarda septik şok gelişerek ölümlerle sonuçlanabildiği bilinmektedir. Gram negatif bakterilerin neden olduğu sistemik infeksiyonlarda gelişen patofizyolojik değişikliklerin çoğundan bakteri hücre yapısında bulunan endotoksin sorumludur (1).

Enterik bakteri lipopolisakkaridinin (LPS, endotoksin) yapısında polisakkarid kısım (spesifik O antijeni + dış kor + iç kor) ve buna bağlı lipid A kısmı bulunur (Şekil 1a). Polisakkarid kısım yapısal olarak değişik bakteriler arasında farklılık göstermektedir

(Şekil 1b). İnsanlar için patojenik olan *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis*, *Bacteroides fragilis*, *Acinetobacter calcoaceticus* gibi bazı bakterilere ait LPS yapısında spesifik o antijeni bulunmaz (2). Lipid A kısmı da bakteriler arasında farklılık gösterebilmektedir. Örneğin *Salmonella minnesota*'nın lipid A kısmında 16 karbonlu yağ asidi zincirinin bulunması *Eschericia coli* lipid A'sından en önemli farkı oluşturur (Şekil 2) (3).

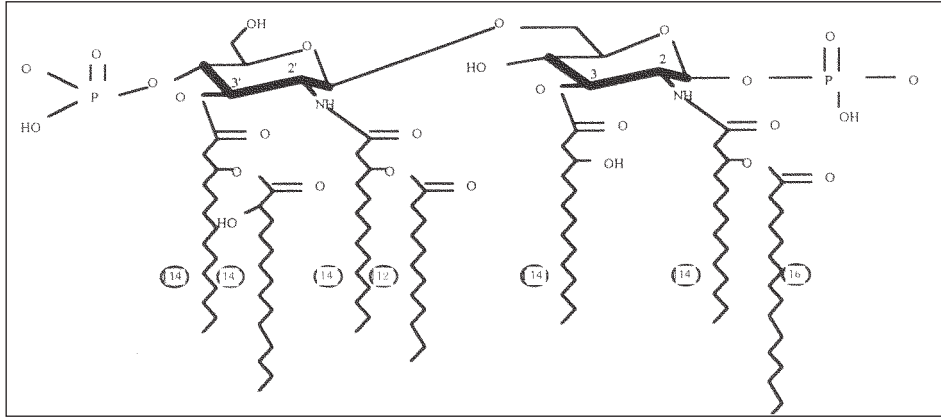
Lipopolisakkaridin lipid A kısmı letal, lökosit sayısında azalma ve ateş oluşturma etkisinden sorumludur. Aynı dozlarda kullanılan sentetik *E. coli* lipid A'sı, bakteriden elde edilen lipid A ve LPS ile benzer etkiler göstermektedir (4). *E. coli* lipid A'sı karmaşık bir yapıya sahiptir. Biyoaktif kısmın belirlene-



Şekil 1. Lipopolisakkarid yapısı

a. Enterik bakterilerdeki LPS'nin genel yapısı.

b. Değişik bakteri LPS'lerinin yapısal karşılaştırması Kaynak no: 2)



Şekil 2. *Salmonella minnesota*'nın difosforil lipid A yapısı. [Daire içindeki rakamlar yağ asidi zincirindeki karbon sayısını göstermektedir (Şekil, 3 no'lu kaynaktan uyarlandı).]

bilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda disakkarid ve difosfatlı çatıya açıl bağıyla eklenen yağ asidi zincir sayısı pirojenik kapasiteyi etkilemektedir. Hekzoaçil yapı gösteren *E. coli* lipid A'sına göre 7 veya 5 yağ asidi zinciri içeren lipid A'ların pirojenik etkilerinin azaldığı, 4 yağ asidi zinciri içerenlerde ise bu etkinin daha da azaldığı saptanmıştır. 1- veya 4'- monofosforil yapıları lipid A moleküllerinin in vivo etkileri genel olarak difosforil yapıları olanlara göre daha azdır (3,5,6). Takayama ve arkadaşları *S. minnesota* R595 suşusundan elde edilen saflaştırılmış monofosforil lipid A'nın tavşanlar üzerindeki pirojenik etkisinin (>10 µg/kg) *S. minnesota* LPS'ine göre (0.0002-0.0007µg/kg) daha düşük olduğunu saptamışlardır (7). Limulus Amebocyte Lysate (LAL) aktivitesi açısından da *S. minnesota* monofosforil lipid A'sı (1.1×10^5 EU/mg) LPS'ye göre (1.3×10^7 EU/mg) 100 kat düşüktür.

Gram negatif bakterilerin neden olduğu septisemide semptom ve bulguların çoğu immün sisteminin LPS ile aşırı uyarılmasına ikincil olarak gelişir. Özellikle tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α), interlökin (IL) 1, ve IL-6 gibi LPS aracılığı ile aşırı salgılanan sitokinler ve bazı inflamasyon yapıcı mediatörler bazı patofizyolojik değişikliklerin açığa çıkmasında önemli rol oynarlar (8,9). Bazı lipid A antagonistleri LPS'nin etkilerini in vivo ve in vitro sistemlerde baskılayabilmektedir. Lipid X (lipid A öncül molekülü), bazı deney hayvanı modellerinde LPS enjeksiyonuna veya gram negatif bakteri infeksiyonuna karşı koruyucu etki göstermektedir (10,11). Ayrıca LPS aracılığı ile sağlanan hücre uyarılmasını baskılamaktadır (12,13). *E. coli* lipid A'sının biyosentetik öncül molekülü olan lipid IVa (14), LPS ile uyarılan insan mononükleer hücrelerinden in vitro şartlarda TNF-α,

IL-1, IL-6 ve prostaglandin E2 salgılanmasını baskılamaktadır (15,16). Gustafson ve Rhodes, monofosforil lipid A'nın makrofajları uyararak salgılattığı interferon gamma (IFN) ve nitrik oksid (NO) aracılığı ile sitotoksik etkinliği sistemik olarak arttırdığını, deney hayvanlarında sepsis ve septik şoka karşı profilaktik amaçla kullanılabileceğini bildirmişlerdir (17).

Lipopolisakkarid ve bazı sitokinler makrofaj ve damar düz kas hücrelerinde NO sentezleyen enzimi (nitrik oksid sentaz-NOS) uyarılmaktadır (18,19). Enzimin uyarılması ve aşırı miktarda NO salgılanmasının özellikle hipotansiyonda vazokonstriktör ajanlara karşı zayıf yanıt (hyporesponsiveness) verme durumuyla ilişkili olduğu ve endotoksemi veya sepsiste patofizyolojik değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir (20-22).

Bu çalışmada *S. minnesota* LPS'si ile uyarılan RAW 264.7 makrofaj hücrelerinden nitrik oksid salgılanması üzerine *S. minnesota* monofosforil lipid A'sının etkisi araştırıldı.

MATERYAL ve METOD

Makrofaj: RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri (ATCC kaynaklı) % 10 inaktif fetal calf serum (FCS, Seromed) içeren RPMI-1640 besiyerinde (Sigma) üretili. Kültür flakslarından hücre kazıyıcısı ile toplanan hücreler Neubauer lamında sayıldı ve tripan mavisi ile canlılıkları değerlendirildikten sonra konsantrasyonu 2×10^6 hücre/mL'ye ayarlandı.

Kimyasal maddeler: *Salmonella minnesota* LPS ve lipid A'sı, N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME), N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED), Sulfanilamide Sigma firmasından alındı. FCS, 56 °C'deki su banyosunda 30 dakika bekletilerek inaktif hale getirildi.

Makrofajların uyarılması: Nitrik oksid salgılama potansiyeli olan RAW 264.7 hücreleri düz tabanlı plakların (Falcon, 24 çukurlu) her bir çukurunda 5×10^5 hücre/250 μ L (%20 FCS'li RPMI-1640 içerisinde) olacak şekilde dağıtıldı (23). Lipopolisakkarid, lipid A ve L-NAME, RPMI-1640 içerisinde sırasıyla 4 μ g/mL, 8 μ g/mL ve 20 mM konsantrasyonlarda hazırlandı. Lipid A'nın 8 μ g/mL'den itibaren 1/2 oranında azalan 6 değişik konsantrasyonu hazırlandı. LPS ve lipid A çukurlara dağıtılmadan önce 3 dakika sonikatörde (Transsonic 660/H, Elma, Germany) tutuldu. Lipid A'nın doza bağımlı etkisini gözlemek için değişik konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerden RAW 264.7 hücrelerinin bulunduğu çukurlara 250 μ L eklendi. Üzerlerine 500 μ L RPMI-1640 eklenerek final konsantrasyonların 2 μ g/mL'den 0.06 μ g/mL'ye kadar 1/2 oranında azalması sağlandı. LPS ile olan etkileşimin gözlenmesi için aynı şekilde değişik konsantrasyonlarda lipid A içeren örneklerden 250 μ L eklenen RAW hücrelerinin üzerine 250 μ L RPMI-1640 ve 4 μ g/mL konsantrasyondaki LPS den 250 μ L (final LPS konsantrasyonu 1 μ g/mL) eklendi. Sadece LPS ile uyarılan RAW hücrelerine ise 500 μ L RPMI-1640 ve 250 μ L LPS (final 1 μ g/mL) eklendi. L-NAME etkisinin ölçülmesi amacıyla hazırlanan RAW hücrelerinin bulunduğu çukurlara 250 μ L RPMI-1640 besiyeri ve 250 μ L L-NAME çözeltisi (20 mM) varlığında 250 μ L LPS (4 μ g/mL) veya 250 μ L lipid A (4g/mL) örnekleri eklendi. Hazırlanan makrofaj plağı 37°C'De, %5 CO₂'li etüvde 24 saat bekletildi.

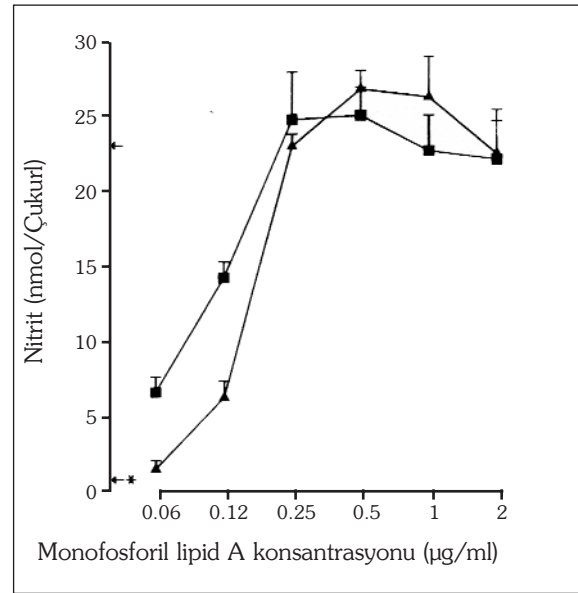
Nitrit ölçümü: Makrofajlardan salgılanan nitrik oksid miktarı süpernatandaki nitrit (NO₂⁻) düzeyi ölçülerek belirlendi (23). Kısaca, 100 μ L makrofaj kültür süpernatanı ile 100 μ L Griess solüsyonu (1:1 oranındaki (vol/vol) %0.1'lik NED (H₂O'da) ile %1'lik sulfanilamid (%5 H₂PO₄'de) karışımı] düz tabanlı, 96 çukurlu plakta (Corning) karıştırılarak 550 nm dalga boyundaki ELISA okuyucusunda (LP-400 Diagnostics Pasteur) optik dansite (OD) değerleri ölçüldü. Kültür süpernatandaki nitrit miktarı NaNO₂ (Sigma) ile oluşturulan standard OD eğrisi kullanılarak hesaplandı.

İstatistik: Kontrole göre olan farkın ve değişik dozlar arasındaki farkın anlamlılığı Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Süpernatandaki nitrit miktarı NaNO₂ ile oluşturulan satandard eğri kullanılarak korelasyon-regresyon analizi ile belirlendi.

BULGULAR

Salmonella minnesota LPS'i yalnız başına

RAW 264.7 makrofaj hücrelerinden anlamlı düzeyde ($p < 0.001$) NO salgılanmasına neden olmaktadır (Şekil 3). 1 μ g/mL konsantrasyonda LPS bulunan makrofaj çukurlarında ortalama olarak 24 nmol nitrit oluşmaktadır. Lipopolisakkarid eklenmemiş makrofaj kültür süpernatantlarında (kontrol) ve sadece çalışmada kullanılan ajanları içeren besiyerindeki nitrit miktarının 2 nmol'den daha az olduğu saptandı. 1 μ g/mL konsantrasyonda *S. minnesota* LPS'i veya monofosforil lipid A'sı ile uyarılan makrofaj hücrelerine L-NAME (çukurdaki final konsantrasyon 5 milimolar) eklendiğinde nitrit oluşumunu azalarak ve bazal düzeye (<2 nmol) düşüğü saptandı. Monofosforil lipid A'nın kendisi de makrofaj hücrelerinden NO salgılanmasına neden olmaktadır. Ancak bu etki, 0.125 μ g/mL ve daha az konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde ($p < 0.001$) azalmaktadır. Makrofajlara sabit miktarda (1 μ g/mL) LPS ile birlikte değişen dozlarda monofosforil lipid A eklendiğinde, 0.25 μ g/mL'den daha düşük dozlarda monofosforil lipid A içeren çukurlarda nitrit salgılanmasının baskılandığı gözlemlendi.



Şekil 3. RAW 264.7 makrofaj hücrelerinin *S. minnesota* LPS ve monofosforil lipid A'sına karşı nitrik oksid salgılama yanıtı. 1 μ g/mL konsantrasyondaki LPS (←) veya monofosforil lipid A ile uyarılan makrofajlardan sırasıyla 24 ve 27 nmol nitrit salgılanmaktadır. L-NAME'in 5mM konsantrasyonu, LPS veya monofosforil lipid A aracılığı ile salgılanan NO'yi baskılamaktadır (←*).

Monofosforil lipid A aracılığı ile salgılanan NO, doza bağımlı olarak (<0.5 μ g/mL konsantrasyonlarda) azalmaktadır (▲). Belirli dozlardaki (<0.25 μ g/mL) monofosforil lipid A, 1 μ g/mL LPS aracılığı ile sağlanan NO salgılanmasını baskılamaktadır (■). Veriler beş ayrı deneyin ortalama \pm standard sapma değerleridir.

TARTIŞMA

L-Arjininin guanidino azotu oksidasyona uğrayarak "N-hydroxyl- L-arginine" ara ürünü oluşur. Ara ürünün oluşması için NADPH iki elektron verir. NADPH'dan bir elektron daha alınmasıyla devam eden oksidasyon sonunda L-sitrülin ve nitrik oksid radikali ($\cdot\text{N}=\text{O}$) oluşur. Her iki basamak FAD ve FMN içeren enzimler ve nitrik oksid sentaz aracılığı ile gerçekleştirilir. Reaksiyona giren oksijen molekülünün biri L-sitrülinin üreido grubuna diğeri ise NO yapısına katılır. Reaksiyonun oluşabilmesi için tetrahidrobiyopiterine de ihtiyaç vardır (24). Oluşan ($\cdot\text{N}=\text{O}$), hızla nitrit (NO_2^-) ve nitrate (NO_3^-) dönüşür (18). "L-NG-monomethyl arginine" (L-NMMA) veya L-NAME gibi L-arjinin analogu olan maddeler bu yolağı özgül olarak baskırlar. Nitrik oksid sentez yolağında etkin olan enzim (nitrik oksid sentaz, NOS) rat, domuz, sığır ve insan beyincüğünden, rat ve fare makrofajlarından, rat nötrofillerinden ve sığır endotel hücreleri gibi değişik kaynaklardan saflaştırılabilmektedir. Nitrik oksid sentaz, genel olarak eksojen Ca_2^+ ve kalmodüline bağımlı olan cNOS (constitutive NOS) ve bağımsız olan İNOS (inducible NOS) şeklinde ikiye ayrılır. cNOS benzeri enzim aktivitesinin hücresele dağılımı daha çok endotel hücreleri, bazı santral ve periferik nöronlar, kan nötrofili, mast hücresi, trombosit, adrenal medulla hücreleri, astrositler, pankreas hücrelerinde, İNOS benzeri enzim aktivitesi ise makrofaj, hepatosit, fibroblast, damar düz kasları, mesengial hücreler, endotel hücreleri, inflamatuvar nötrofillerde tanımlanmaktadır (24,25).

Makrofaj hücreleri mikrobik ajanların öldürülmesinde önemli rol oynar. Patojenik mikroorganizmaların öldürülmesinde makrofajlardan salgılanan reaktif oksijen radikallerinin yanı sıra, reaktif nitrojen radikallerinin de önemli rolü vardır. Özellikle *Cryptococcus neoformans*, *Schistosoma mansoni*, *Leishmania major*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium leprae* gibi patojenik mikroorganizmaların makrofajlar aracılığı ile öldürülmesinde reaktif nitrojen radikalleri önemli rol oynar (26).

Endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF, endothelium-derived relaxing factor) labil bir maddedir. Guanilat siklazı uyararak damar düz kaslarının gevşemesine ve trombosit agregasyonunun engellenmesine neden olur. EDRF'nin kimyasal yapısı NO'dur ve makrofaj kaynaklı NO'nun farmakolojik özellikleri ile aynıdır. L-Arjininden oluşan NO'nun, kan basıncının kontrolünde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. NO sentezinin engellenmesiyle açığa çı-

kan kan basıncındaki yükselme bu düşüncüyü desteklemektedir. Bu nedenle NO'nun endojen vazodilatör olarak rol oynadığı ve NO sentezindeki azalmanın hipertansiyon oluşumunda rolü olabileceği düşünülmektedir (26,27).

Lipopolisakkaridin biyolojik olarak aktif olan lipid A kısmı gram negatif sepsiste ve endotoksik şokta patojenik rol oynar. Lipopolisakkarid aracılığı ile aşırı salgılanan TNF, değişik dokulara etki göstererek patofizyolojik değişikliklerin açığa çıkmasına katkıda bulunur (8). Lipopolisakkarid yalnız başına İNOS'ı aktive edebilen bir ajandır. İFN- γ ile sinerjistik etki göstererek daha fazla NO salgılanmasına neden olur (23-24). Endotoksemi durumunda gelişen patofizyolojik değişikliklerden TNF'nin yanı sıra nitrik oksid sentaz aktivitesindeki artış sonucu salgılanan NO'da sorumlu tutulmaya başlanmıştır (20-22).

Endotoksinin toksik etkilerini engellemeye yönelik son yıllarda yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir (17, 28-30). Toksik etkilerden yoksun (veya daha az) bazı sentetik veya doğal lipid A ve lipid X analogu olan maddeler LPS'in etkilerini baskılamak amacıyla kullanılmaktadır. *Rhodobacter sphaeroides* difosforil lipid A'sı in vivo ve in vitro ortamlarda LPS aracılığı ile salgılanan TNF'nin baskılanması amacıyla kullanılmıştır (15, 31-33). Araştırmalardan elde edilen veriler Lipid A kökenli maddelerin gram negatif bakteriyel sepsiste potansiyel terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Yukarıda bahsedilen verilere dayanarak LPS aracılığı ile hücrelerden salgılanan NO'nun bazı doku zedelenmelerinde önemli rolü olduğu anlaşılmaktadır. Toksik potansiyeli olmayan veya LPS'ye göre toksik potansiyeli düşük olan bazı ajanların NO salgılanmasını baskılayabileceği düşünüldü. Birinci basamak çalışmamızda monofosforil lipid A'nın LPS aracılığı ile makrofaj hücrelerinin NO salgılanması üzerine potansiyel etkisi araştırıldı. Şekil 3'de görüldüğü gibi 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyondaki LPS'nin kendisi makrofaj hücrelerinden anlamlı düzeyde ($p < 0.001$) NO salgılanmasına neden olmaktadır. Kültür süpernatantında ölçülen nitritin L-NAME ile engellenebilmesi NO kökenli olduğunu göstermektedir. Aynı dozdaki monofosforil lipid A da, LPS gibi belirgin NO salgılanmasına neden olmaktadır. Monofosforil lipid A aracılığı ile salgılanan NO ile L-NAME ile baskılanmaktadır. Ancak monofosforil lipid A'nın etkisi 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve daha düşük konsantrasyonlarda doza bağımlı bir şekilde azalmaktadır. 0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyondaki monofosforil lipid A ile uyarılan makrofajlardan salgılanan nitrit miktarı L-NAME ile

baskılamaya yapılan çukurlardaki veya kontrol çukurlarındaki nitrit miktarlarına yaklaşık olarak eşittir. Monofosforil lipid A, 0.125 µg/mL ve daha düşük konsantrasyonlarda LPS aracılığı ile salgılanan NO'ya anlamlı düzeyde ($p < 0.001$) baskılamaktadır. Düşük dozlardaki monofosforil lipid A hem kendisinin neden olduğu, hem LPS aracılığı ile sağlanan NO salgılanmasında azalmaya neden olmaktadır. Bu nedenle genel olarak değişik ajanlar ile yapılan çalışmalarda gözlenen inhibitör etkileşimlerden farklı bir sonuç açığa çıkmaktadır. Ancak monofosforil lipid A'nın düşük dozlarda gözlenen bu etkisini bir avantaj olarak yorumlamaktayız. Dozun azalmasına paralel olarak LPS aracılığı ile salgılanan NO düzeyi azalmaktadır. Sonuçlar, LPS'nin NO açısından neden olduğu olumsuz etkilerini baskılama amacıyla düşük dozlardaki monofosforil lipid A'nın kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Zhang ve Morrison, fare periton makrofajlarını LPS ile uyarmadan önce düşük dozlardaki (<1 ng/mL) LPS ile bekletip yıkadıklarında kontrole göre (direkt 100 ng/mL LPS ile uyarılan hücreler) nitrit ve TNF- α salgılama yanıtında azalma olduğunu saptamışlardır (34). Düşük dozdaki monofosforil lipid A'nın makrofaj membranında reseptörlere LPS'den daha önce bağlanarak (daha küçük bir molekül olması nedeniyle difüzyon oranının daha yüksek olması veya LPS yapısında olan ancak lipid A yapısında bulunmayan kısımların olası engelleyici etkileri ortadan kalktığı için afinitedeki artış buna neden olabilir) hücrelerin NO salgılanması açısından LPS'ye karşı duyarlılığında azalmaya neden olabileceğini düşünmekteyiz.

Monofosforil lipid A'nın baskılayıcı veya arttırıcı etkisi doza bağımlı olduğu için iki yönlü bir modülatör gibi davranmaktadır. Yüksek dozlarda (0.5 ve 1 µg/mL) az da olsa LPS aracılığı ile salgılanan NO düzeyini arttırmaktadır. Sonuç olarak, belirli dozlarda kullanılan monofosforil lipid A, LPS aracılığı ile RAW 264.7 makrofaj hücrelerinden nitrik oksid salgılanmasını baskılamaktadır. Monofosforil lipid A'nın düşük dozları olası toksik etkilerinin azalması yanında baskılayıcı etkisini de arttıracığından, in vivo sistemlerde incelemeye değer alternatif bir ajan olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 1991;338:732-6.
2. Cavaillon JM, Cavaillon NH. Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocyte/macrophages. *Cytokine* 1990;2:313-29.
3. Kotani S, Takada H. Structural requirements of lipid A for endotoxicity and other biological activities-an overview. *Adv Exp Med Biol* 1990;256:13-43.
4. Galanos C, Lüderitz O, Rietschel Eth, et al. Synthetic and natural *Escherichia coli* free lipid A express identical endotoxic activities. *Eur J Biochem* 1985;148:1-5.
5. Homma JY, Matsuura M, Kumazawa Y. Structure-activity relationship of chemically synthesized nonreducing parts of lipid A analogs. *Adv Exp Med Biol* 1990;256:101-9.
6. Rietschel Eth, Brade L, Schade U, et al. Bacterial lipopolysaccharides: Relationship of structure and conformation to endotoxic activity, serological specificity and biological function. *Adv Exp Med Biol* 1990;256:81-99.
7. Takayama K, Qureshi N, Raetz CRH, et al. Influence of fine structure of lipid A on limulus Amebocyte lysate clotting and toxic activities. *Infect Immun* 1984;45:350-5.
8. Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Ann Rev Immunol* 1989;7:625-55.
9. Waage A, Steinshamn S. Cytokine mediators of septic infections in the normal and granulocytopenic host. *Eur J Haematol* 1993;50:243-9.
10. Proctor RA, Will JA, Burhop KE, Raetz CR. Protection of mice against lethal endotoxemia by a lipid A precursor. *Infect Immun* 1986;52:905-7.
11. Golenbock DT, Leggett JE, Rasmussen P, Craig WA, Raetz CR, Proctor RA. Lipid X protects mice against fetal *E. coli* infection. *Infect Immun* 1988;56:779-84.
12. Sibley CH, Terry a, Raetz CR. Induction of kappa light chain synthesis in 70Z/3 B lymphoma cells by chemically defined lipid A precursors. *J Biol Chem* 1988;263:5098-103.
13. Danner RL, Joiner KA, Parrillo JE. Inhibition of endotoxin-induced priming of human neutrophils by lipid X and 3-aza-lipid X. *J Clin Invest* 1987;80:605-12.
14. Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 1990;59:129-70.
15. Golenbock DT, Hampton RY, Qureshi N, Takayama K, Raetz CRH. Lipid A-likemolecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes. *J Biol Chem* 1991;266:19490-8.
16. Loppnow H, Brade H, Durrbaum I, et al. IL-1 induction capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. *J Immunol* 1989;142:3229-3238.
17. Gustafson GL, Rhodes MJ. A rationale for the prophylactic use of monophosphoryl lipid A in sepsis and septic shock. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:269-75.
18. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988;27:8706-11.
19. Busse R, Mülsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1990;275:87-90.
20. Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Staclet JC. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol* 1990;259:1038-43.

21. Thiermermann C, Vane JR. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur J Pharmacol* 1990;182:591-5.
22. Hollenberg SM, Cunnion RE, Zimmerberg J. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats. *Am J Physiol* 1993;264:660-3.
23. Iyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: Precursors and role of the respiratory burst. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6369-73.
24. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;6:3051-64.
25. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
26. Nathan CF, Hibbs Jr JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991;3:65-70.
27. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* 1988;12:365-72.
28. Chia JKS, Pollack M, Guelde G, Koles NL, Miller M, Evans ME. Lipopolysaccharide (LPS)-reactive monoclonal antibodies fail to inhibit LPS-induced tumor necrosis factor secretion by mouse-derived macrophages. *J Infect Dis* 1989;159:872-80.
29. Park E, Quinn MR, Wright CE, Schuller-Levis G. Taurine chloramine inhibits the synthesis of nitric oxide and the release of tumor necrosis factor in activated RAW 264.7 cells. *Journal of Leukocyte Biology* 1993;54:119-24.
30. Lynn WA, Golenbock DT. Lipopolysaccharide antigens. *Immunol Today* 1992;13:271-6.
31. Qureshi N, Takayama K, Kurtz R. Diphosphoryl lipid A obtained from the nontoxic lipopolysaccharide of *Rhodopseudomonas sphaeroides* in an endotoxin antagonist in mice. *Infect Immun* 1991;441-4.
32. Takayama K, Qureshi N, Beutler B, Kirkland TN. Diphosphoryl lipid A from *Rhodopseudomonas sphaeroides* ATCC 17023 blocks induction of cachectin in macrophages by lipopolysaccharide. *Infect Immun* 1989;57:1336-8.
33. Henricson BE, Perera PY, Qureshi N, Takayama K, Vogel SN. *Rhodopseudomonas sphaeroides* lipid A derivatives block in vitro induction of tumor necrosis factor and endotoxin tolerance by smooth lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A. *Infect Immun* 1992;60:4285-90.
34. Zhang X, Morrison DC. Lipopolysaccharide-induced selective priming effects on tumor necrosis factor and nitric oxide production in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1993;177:511-6.

Yazışma Adresi:

Dr. Cemalettin AYBAY

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Mikrobiyoloji ABD İmmünoloji Laboratuvarı

06500 Beşevler-ANKARA

Makalenin Geliş tarihi: 10.09.1996, Kabul Tarihi: 20.10.1996.

flora

İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi'ne
ABONE OLMAK İSTEYENLERE DUYURU

Abone Bedeli:1.500.000 TL

Dergimize yeni abone olacakların abone bedelini Bilimsel Tıp Yayınevi'nin 106310 nolu posta çeki hesabına yatırmaları ve abone olmak istediklerini Flora Dergisi P.K. 99 Cebeci-ANKARA adresine bildirmeleri yeterlidir.