

Hidroksiürenin Lökositlerin Mikrobisid Fonksiyonlarına Etkileri

[The Effect of Hydroxyurea on the Microbicidal Functions of Leukocytes]

Ayça Doğan⁽¹⁾
A. Lale Doğan⁽²⁾
Hande Canpınar⁽²⁾
Ediz Demirpençe⁽¹⁾

(1) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
(2) Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Prof.Dr. Ediz Demirpençe
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
06100, Ankara

Kayıt tarihi 12.4.2004; kabul tarihi 30.5.2004
[Received 12.4.2004; accepted 30.5.2004]

ÖZET

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların yaygın yan etkilerinden biri kemik iliği baskılanmasıdır. Özellikle hematolojik malignitelerin tedavisi sırasında oluşan lökopeni, hastaların yaşam kalitesini çok düşüren ve tedavi planını aksatan bir durumdur. Kemoterapötik ilaçların lökosit sayısını azaltmalarının yanında, mikrobisid fonksiyonları da bozabildiği gösterilmiştir.

Özellikle kronik myelositik lösemi olmak üzere bir çok hematolojik hastalığın tedavisinde etkin olarak kullanılan bir ilaç olan hidroksiürenin esas hedefi lökositlerdir. Hidroksiüre ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe ederek DNA sentezini bozar. Bu çalışmanın amacı hidroksiürenin lökositlerin mikrobisid fonksiyonlarını nasıl etkilediğini göstermektir. Bu amaçla, kültüre konmuş insan lökositleri hidroksiüre ile inkübe edildikten sonra, hücrelerin degranülasyon kapasiteleri, myeloperoksidaz aktiviteleri ve ürettikleri hipokloröz asit düzeyleri değerlendirildi. Lökositlerin degranülasyon kapasitesi akım sitometrik yöntemle, myeloperoksidaz aktivitesi ve hipokloröz asit üretimi spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. İlaçsız koşullarda inkübe edilen hücreler kontrol olarak kullanıldı.

Hidroksiüre ile inkübe edilen lökositlerin ilaçsız inkübe edilenlere kıyasla sayılarının azaldığı gözlemlendi (sitotoksik etki). Hidroksiüre ile inkübe edilen lökositlerde kontrol lökositlerine göre degranülasyon fonksiyonu, myeloperoksidaz aktivitesi ve hipokloröz asit üretiminin anlamlı biçimde yüksek olduğu saptandı. Hidroksiürenin sitotoksik etkili bir ilaç olmasına karşın, lökositlerin mikrobisid fonksiyonlarına olumsuz bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kemoterapi, hidroksiüre, degranülasyon, myeloperoksidaz, hipokloröz asit.

ABSTRACT

One of the most common side effects of the chemotherapeutic agents used in cancer treatment is myelosuppression. Particularly in hematological malignancies, leukopenia as a result of myelosuppression impedes chemotherapy and decreases the survival quality. It has been shown that anticancer drugs can also impair leukocytes' microbicidal functions in addition to leukopenia.

Hydroxyurea, an effective drug used in the treatment of hematologic malignancies such as chronic myelocytic leukemia, mainly targets leukocytes. It inhibits DNA synthesis through the inhibition of ribonucleotide reductase. The purpose of this study is to investigate the effect of hydroxyurea on the microbicidal functions of leukocytes. Cultured human leukocytes were incubated with hydroxyurea and their degranulation capacity, myeloperoxidase activity and hypochlorous acid production were evaluated. Degranulation capacity was measured using a flow cytometric method, while myeloperoxidase activity and hypochlorous acid production were measured spectrophotometrically. Cells incubated in the absence of hydroxyurea were used as control.

The amount of leukocytes incubated with hydroxyurea was low when compared to untreated cells (cytotoxic effect). Degranulation function, myeloperoxidase activity and hypochlorous acid production were significantly increased in the hydroxyurea-treated cells when compared to the control group. We concluded that despite being a cytotoxic agent, hydroxyurea had no negative effect on the microbicidal functions of leukocytes.

Key Words: Chemotherapy, hydroxyurea, degranulation, myeloperoxidase, hypochlorous acid.

GİRİŞ

Lökositler mikrobisid fonksiyonlarını, mikroorganizmanın hücre içine alınıp sindirildiği fagositoz olayı ile gerçekleştirirler. Fagositoz, serbest radikal oluşumunun sorumlu olduğu oksidatif mekanizmalar ve çoğu lökosit granüllerinden salınan bakterisid etkili sitokinlerin rol aldığı oksidatif olmayan mekanizmaların birlikte çalıştığı bir biyokimyasal süreçtir. Lökosit aktivasyonu, çeşitli hücre dışı uyaranlar aracılığıyla meydana gelir. Sonuçta fagozom membranında lokalize olan NADPH oksidaz aracılığıyla solunum patlaması (respiratory burst) adı verilen, oksijen tüketiminin hızla arttığı ve süperoksit radikalinin oluştuğu bir süreç gerçekleşir (1).

Solunum patlaması sırasında oluşan süperoksit moleküllerinden, spontan dismutasyon reaksiyonu sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur (2). Nötrofil lökositlerin primer granüllerinden degranülasyon ile fagozom içine bırakılan myeloperoksidaz (MPO) enzimi, H_2O_2 ve Cl^- kullanarak hipokloröz asit (HOCl) oluşturur. (3). HOCl, lökositlerde üretilen ve mikrobisid etkiye sahip en önemli oksidandır (4). HOCl, nötrofil sitoplazmasında en çok bulunan serbest amino asit olan taurinle reaksiyona girerek HOCl'den daha az reaktif ve daha az toksik olan uzun ömürlü bir bileşik olan taurin monokloramini oluşturur (5,6). Taurin monokloramin nötrofillerde üretilen çok sayıda proinflatuar bileşiğin miktarını azaltır (7).

Bir üre analogu olan hidroksiüre ($H_2NCONHOH$), myeloproliferatif hastalıklar denilen esansiyel trombositemi, polisitemia vera ve kronik myelositer lösemi gibi hematolojik hastalıklarla, orak hücreli anemi ve HIV enfeksiyonunda etkin olarak kullanılan bir ilaçtır. Etkisini, ribonükleotidleri deoksiribonükleotidlere (dNTP) çeviren ribonükleotid redüktaz enzimini inhibe edip, DNA sentez ve tamirini bozarak gösterir (8). Hücre içi dNTP havuzunu azaltarak DNA sentezini inhibe eder. Hücre döngüsünün S fazına spesifik bir antikanser ilaç olan hidroksiürenin DNA üzerine olan etkisi, RNA ve protein sentezine olan etkisinden daha fazladır (8). Ayrıca TNF α , IL-6, IL-10 gibi sitokinlerin ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir (9). Başlıca yan etkileri, kemik iliği depresyonu, bulantı, kusma ve cilt döküntüleridir (10).

Bu çalışmada hidroksiürenin, lökositlerin mikrobisid aktiviterinde rolü olan bazı fonksiyonlarına etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, kültür ortamında hidroksiüre ile inkübe edilen lökositlerin degranülasyon kapasitelerinde, MPO aktiviterinde ve HOCl üretimlerinde meydana gelen değişiklikler değerlendirilmiştir.

ARAÇ, GEREÇ ve YÖNTEM

Kimyasal Bileşikler

Hidroksiüre, RPMI-1640 besiyeri, fetal dana serumu (FCS), L-glutamin, penisilin-streptomisin, 3-4,5-dime-

til-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT), N-N-Dimetil formamid (DMF), sodyum dodesil sülfat (SDS), 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), zimosan A, katalaz (EC 1.11.1.6), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), heksadesiltrimetilamonyum bromür (HETAB), sıgır serum albumini (BSA), Histopaque1077, n-formilmetiyonin lösin fenilalanin (f-MLP), sitokalsin B ve taurin Sigma Chemical Company'den (ABD), insan MPO-FITC monoklonal antikor (Immunotech, katalog no: 1874) ve izotipik kontrol olarak fare IgG-FITC (Immunotech, katalog no: 0639) Beckman Coulter'dan (İngiltere) alındı.

Çalışma Materyali ve Hücre Kültürü

Çalışmada sağlıklı bir gönüllüden alınan kan örnekleri kullanıldı. Heparinli tüpe alınan 10 ml venöz kan örneği 5 ml Histopaque1077 çözeltisi üzerinde tabakalandırıldı ve 500g'de 20 dakika santrifüj edilerek lökositler ayrıldı. Steril koşullarda toplanan lökositler %10 FCS, 2 mM L-glutamin, 100 IU/ml penisilin ve 100 μ g/ml streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde 37°C'de %5 CO_2 'li etüvde inkübe edildi.

Sitotoksosite Deneyi (MTT Testi)

MTT testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir (12). Hidroksiüre, RPMI-1640 besiyerinde çözülerek 50 mg/ml olacak şekilde stok çözeltisi hazırlandı ve -20°C'de saklandı. Deney günü, sıvı besiyeri ile gerekli test konsantrasyonları hazırlandı. MTT, PBS içinde 5 mg/ml olacak şekilde çözülerek süzüldü. Ekstraksiyon tamponu olarak, %45'lik DMF içinde çözülmüş %23 SDS çözeltisi (pH 4.7) hazırlandı.

MTT testi için, 96 kuyulu plaklara 50 μ l besiyeri içinde 16×10^4 lökosit/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı. Hücrelerin üzerine 50 μ l ilaç (son konsantrasyonlar: 0.5-800 μ g/ml) eklenerek 48 saat inkübasyona bırakıldı. Örnekler her ilaç konsantrasyonunda 4 kuyu olarak çalışıldı. Aynı şartlarda ilaçsız inkübe edilen hücreler kontrol olarak kullanıldı. Hidroksiürenin MTT ile etkileşimini değerlendirmek için hazırlanan kontrol kuyularına ise, hücresiz koşullarda aynı dozlarda ilaç ekildi. 48 saat sonra hücrelerin üzerine 25 μ l MTT eklenerek 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyulara 80 μ l %45'lik DMF içinde çözülmüş %23 SDS çözeltisi (pH 4.7) konuldu ve plaklar bir gece etüvde bırakıldı. 12-15 saat, sonra spektrofotometrik olarak 540 nm'de ekstraksiyon tamponuna karşı absorbans değerleri okundu. Sitotoksositeyi değerlendirmeden önce, hücresiz kuyulardaki OD değerleri (Hidroksiüre + MTT) ilaçlı kuyu değerlerinden çıkarıldı.

Hücre ölümünü değerlendirmek amacıyla, $[1 - (\text{Ortalama OD ilaçlı kuyu} / \text{Ortalama OD kontrol kuyu}) \times 100 = \% \text{ hücre ölümü}]$ formülü kullanıldı. % 50'nin üzerinde

inhibisyon görülmesi ilaca duyarlı cevap olarak değerlendirildi.

Degranülasyon Testi

Degranülasyon akım sitometrik yöntemle, FITC işaretli MPO antikorunu kullanılarak ölçüldü (13). Lökositler, 1×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekildi ve $500 \mu\text{g/ml}$ Hidroksiüre ile 48 saat inkübe edildi. Aynı koşullarda ilaçsız olarak inkübe edilen örnekler kontrol olarak kullanıldı. Daha sonra hücreler $5 \mu\text{g/ml}$ sitokalazin B ile inkübe edilerek fagozom oluşumu engellendi ve 10^{-7} M fMLP ile inkübasyonla hücre dışına degranülasyon uyarıldı. İntrasitoplazmik MPO tayini için, 5×10^5 hücre/ml örnek alındı. Hücreler, $200 \mu\text{l}$ 1:4 oranında sulandırılmış paraformaldehit ile inkübe edildikten sonra $700 \mu\text{l}$ metanol eklendi ve -20°C 'de 10 dakika bekletildi. Daha sonra, hücreler PBS ile santrifüj işlemiyle yıkandı. İzotipik kontrol ve MPO için spesifik monoklonal antikorlardan $20 \mu\text{l}$ ilave edildi ve 30 dakika $+4^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. Hücrelerin üzerine PBS eklenerek santrifüj işlemiyle yıkandı. Daha sonra akım sitometri cihazında (Beckman Coulter EPICS XL MCL, İngiltere) 10000 hücre sayıldı. Sitoplazmik MPO taşıyan hücreler, spesifik olmayan bağlanmayı ifade eden izotipik kontrol değerleri çıkarıldıktan sonra yüzde olarak değerlendirildi.

MPO Aktivitesinin Ölçümü

Lökositlerdeki MPO aktivitesi sentetik bir substrat olan TMB'in MPO tarafından oksitlenmesine dayanan spektrofotometrik bir yöntemle ölçüldü (14).

Lökositler, 2×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekildi ve $500 \mu\text{g/ml}$ Hidroksiüre ile 48 saat inkübe edildi. Daha sonra, hücreler PBS ile yıkandı ve MPO'yu solübilize etmek amacıyla deterjanlı tamponda (50 mM potasyum fosfat pH 6, %0.5 HETAB, 10 mM EDTA) homojenize edildi. Standart reaksiyon için ortama $500 \mu\text{l}$ deterjanlı tampon (160 mM potasyum fosfat pH 5.4, %1 HETAB), $150 \mu\text{l}$ su, $100 \mu\text{l}$ TMB (16 mM), $200 \mu\text{l}$ örnek konduktan sonra, $50 \mu\text{l}$ %0.03'lük H_2O_2 eklenerek 37°C 'de reaksiyon başlatıldı. Reaksiyonun hızı 655 nm 'de izlendi. Bu koşullarda dakikada bir absorbans değişimi veren enzim miktarı bir ünite (U) olarak alındı. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

HOCl Miktarının Ölçümü

Lökositlerde HOCl üretimi taurin kloramin ölçümü ile gösterildi. Taurin kloramin ölçümünün esası, HOCl ile taurin (TauNH_2) arasındaki reaksiyona dayanır. Oluşan taurin kloramin (TauNHCl), sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asiti (TNB) oksitleyerek renksiz DTNB meydana getirir. Renk açılması spektrofotometrik olarak 412 nm 'de tayin edilir (15).

Lökositler, 3.5×10^6 hücre/petri olacak şekilde ekildi ve $500 \mu\text{g/ml}$ Hidroksiüre ile 48 saat inkübe edildi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 20 mM taurin

içeren $500 \mu\text{l}$ Hank's çözeltisi (5.4 mM KCl, 0.3 mM Na_2HPO_4 , 0.4 mM KH_2PO_4 , 4.2 mM Na HCO_3 , 1.3 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2 , 0.6 mM MgSO_4 , 137 mM NaCl, 5.6 mM D-glukoz, pH 7.4) içinde homojenize edilip 37°C 'de 10 dakika bekletildi. Daha sonra hücrelere 1 mg opsonize zimozan eklenip 37°C 'de her 5 dakikada bir karıştırılarak 30 dakika inkübe edildi. Tüpler 0°C 'ye alınarak reaksiyon durduruldu ve 4°C 'de, 14000 g 'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatana 8:1 oranında TNB eklenerek 412 nm 'de okundu. Kör olarak TNB: Hank's çözeltisi (8:1) kullanıldı. Oluşan DTNB üzerinden HOCl miktarı hesaplanarak mmol/mg protein olarak ifade edildi.

Protein Tayini

Örneklerdeki protein miktarı Bradford yöntemi ile tayin edildi (16). Standart olarak sığır serum albumini kullanıldı.

İstatistik

Tamamı *in vitro* olarak gerçekleştirilen çalışmalarda kontrol olarak ilaçlarla inkübe edilmemiş hücreler kullanıldı. Her koşul en az üç kez çalışıldıktan sonra sonuçların ortalama ve standart sapmaları hesaplandı ve farklı gruplardaki sonuçların birbirlerine göre anlamlı olup olmadığı iki yönlü *t* testi ile değerlendirildi. $P < 0.01$ anlamlı kabul edildi.

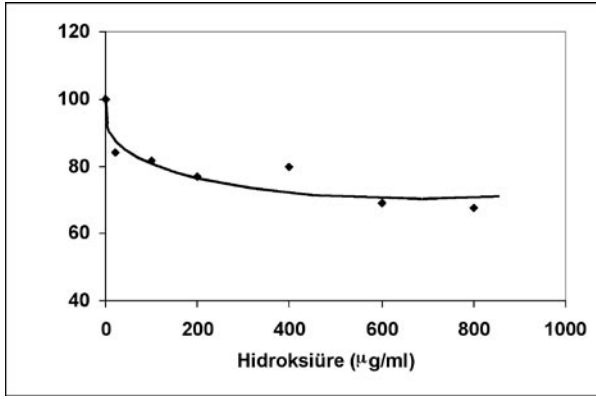
BULGULAR

Hidroksiürenin doz-bağımlı sitotoksik etkisi

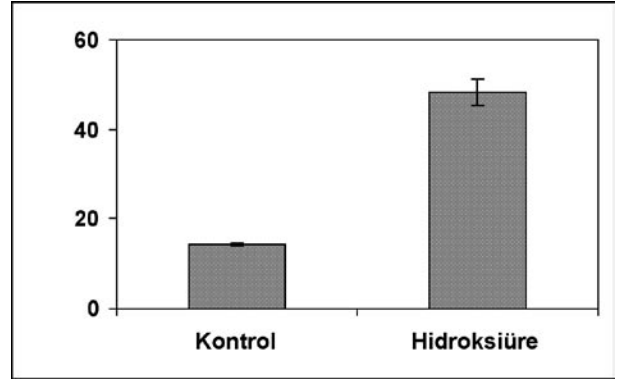
Hidroksiürenin lökositlerde doz-bağımlı sitotoksik etkisi Şekil 1'de görülmektedir. MTT testinde sitotoksosite arttıkça formazan oluşumu azalmakta, yani renk açılmaktadır. Hidroksiüre ile yapılan deneylerde ise, ilaç ile MTT reaktifi arasındaki etkileşim nedeniyle, ilacın dozu arttıkça formazan oluşumunun da arttığı görülmektedir (17). Bu nedenle, hidroksiüre ile gerçekleştirilen sitotoksosite deneylerinde, her doz için ilaç ve MTT etkileşiminden elde edilen değerler sitotoksosite değerlerinden çıkarıldı. En yüksek ilaç dozunda bile ($800 \mu\text{g/ml}$) LD_{50} 'ye ulaşılmadı. Literatüre dayanılarak çalışmanın ileri aşamalarında kullanılacak Hidroksiüre konsantrasyonu $500 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi.

Hidroksiürenin lökositlerin degranülasyonuna etkisi

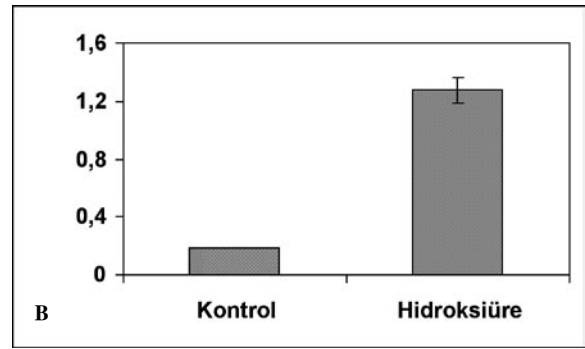
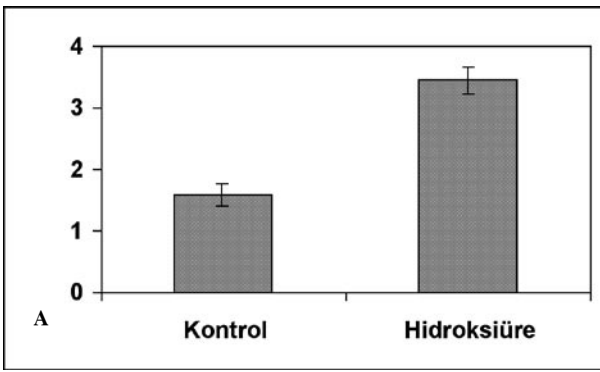
Bu deneyde, lökositlerde f-MLP ile degranülasyon uyarıldıktan sonra akım sitometrik yöntemle hücre içinde kalan MPO ölçülmektedir. Dolayısıyla, cihazdan elde edilen verilerde degranüle olmamış hücrelerin % olarak oranı bulunmaktadır. Şekil 2'de gerekli hesaplama yapılarak degranüle olmuş hücrelerin oranı verilmiştir. Hidroksiüre ile inkübe edilen lökositlerde degranülasyonun anlamlı şekilde arttığı izlenmektedir (Kontrol % 14.43 ± 0.71 ve Hidroksiüre % 51.97 ± 2.82 ; $P = 0.004$).



Şekil 1. Hidroksiürenin doz-bağımlı sitotoksik etkisi



Şekil 2. Hidroksiürenin lökositlerin degranülasyonuna etkisi



Şekil 3. Hidroksiürenin lökosit MPO aktivitesine (3A) ve HOCl üretimine (3B) etkisi

Hidroksiürenin lökosit MPO aktivitesine ve HOCl üretimine etkisi etkisi

Hidroksiüre ile inkübe edilen hücrelerde MPO aktivitesi, ilaçsız inkübe edilmiş lökositlerdekine kıyasla anlamlı derecede artmış olarak bulunmuştur (Şekil 3A, Kontrol $1,58 \pm 0,18$ ve hidroksiüre $3,45 \pm 0,22$ U/mg prot.; $P=0,01$). Buna paralel olarak, MPO aktivitesinin doğal ürünü olan HOCl üretiminde de anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 3B, Kontrol $0,19 \pm 0,00$ ve HOCl $1,28 \pm 0,02$ mmol/mg prot.; $P=0,0001$)

TARTIŞMA

Kemoterapi, hematolojik malignitelerde en sık kullanılan ve en etkili olan tedavi şeklidir. Ancak özellikle lösemilerde kullanılan ilaçların etki mekanizmalarına bağlı olarak görülen kemik iliği baskılanması, tedavi programını aksatır ve hastanın yaşam kalitesini düşürür. Bu nedenle lösemi tedavisinde kullanılan ajanların geliştirilmesi ve hücre düzeyindeki etkilerinin tanımlanması yönündeki araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, özellikle kronik myelositik lösemi olmak üzere bir çok hematolojik malignitenin tedavisinde kullanılan hidroksiürenin, lökositlerin mikrobisid fonksiyonlarına etkisi incelenmiştir. Hidroksiürenin sık görülen ve tedaviye ara vermeyi gerektiren bir yan etkisi olan kemik iliği

baskılanmasına bağlı olarak sayıları azalan lökositlerde, ayrıca mikrobisid fonksiyonların da bozulması tedaviyi olumsuz etkileyecektir.

Çalışmanın başlangıcında, fagositoz yapan başlıca hücreler olmaları nedeniyle sadece nötrofillerle çalışılması planlanmış (18), ancak nötrofil izolasyonu işlemi sonucunda yeterli sayıda ve kalitede hücre sağlanamamıştır. O nedenle çalışmalara izolasyonu daha kolay ve verimli olan lökositlerle devam edilmiştir. Hidroksiürenin lökositler üzerindeki LD₅₀ dozunu belirlemek üzere yapılan MTT testinde, yüksek dozlarda bile %50 sitotoksik etkiye ulaşılamadığı görülmüştür. Hidroksiürenin hücre döngüsünün S fazına etkili olduğu düşünüldüğünde bu bulgu, S fazında bulunmayan matür lökositlerin ilacın sitotoksik etkisinden daha az etkilendiği bilgisini destekler niteliktedir (19).

Literatürde hidroksiürenin lökositlerin mikrobisid fonksiyonlarına etkilerinin kapsamlı olarak araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. PMN lökositlerin etkilerine yönelik bazı çalışmalarda ise hidroksiüre genellikle lökositlerin sayılarını azaltmak amacı ile kullanılmıştır (20). Fötal hemoglobin (HbF) sentezini uyarıcı etkisi nedeniyle HbS polimerizasyonunu inhibe edici etkisi olan hidroksiüre, orak hücreli anemi ile ilgili araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (21). Böyle bir çalışmada,

hidroksiüenin PMN lökositlerin adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve solunum patlaması gibi çeşitli fonksiyonlarını etkilediği, dolayısıyla da bu hücrelerin ilacın primer hedeflerinden biri olduğu gösterilmiştir (22).

Çalışmamızda hidroksiüenin lökositlerin degranülasyon fonksiyonu ve MPO aktivitesine etkileri değerlendirilmiştir. MPO degranülasyon ile fagozom içine bırakılan bir enzim olduğu için, bu parametreler birbirini tamamlar niteliktedir. MPO aktivitesi hem sentetik bir substrat olan TMB'in oksidasyonu, hem de MPO'nun katalizlediği reaksiyonun doğal ürünü olan HOCl üretimi üzerinden ölçülmüştür. Sonuç olarak, hidroksiüenin lökositlerde degranülasyon fonksiyonunu, MPO aktivitesini ve HOCl üretimini anlamlı derecede artırıcı etkisi

olduğu görülmüştür. Bu bulgular hidroksiüenin PMN lökositlerin fagositozla bağlantılı mikrobisid fonksiyonlarına olumsuz bir etkisi olmadığını göstermektedir ve hidroksiüre ile tedavi edilen hastalardaki sekonder enfeksiyon riskinin azalması açısından olumlu niteliktedir. Ancak, tek başına PMN lökositlerin mikrobisid fonksiyonlarının bozulmamış olmasının bağışıklık sisteminin bütünüyle iyi çalıştığı anlamına gelmeyeceği unutulmamalıdır. Antikanser kemoterapi alan bir kişide immün fonksiyonların genel anlamda iyileşmesi beklenen bir durum değildir (23). Ancak, özellikle de mantar enfeksiyonlarına karşı etkili bir sistem olan MPO-HOCl sisteminin (24) hidroksiüre tedavisi ile baskılanmaması sevindiricidir.

Kaynaklar

1. Babior B.M. (1999) NADPH Oxidase: An update. *Blood* 93: 1464-1476
2. Babior B.M. (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109: 33-44
3. Thomas EL, Bozeman PM, Jefferson MM. (1995) Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines. *J Biol Chem* 270: 2906-2913
4. Barrette WC, Hannum DM, Wheeler WD, Hurst JK. (1989) General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: Abolition of ATP production *Biochemistry* 28: 9172-9178
5. Wright CE, Tallan HH, Lin YY (1986) Taurine biological update. *Ann Rev Biochem* 55: 427-453
6. Marquez IA, Dunford HB. (1994) Chlorination of taurine by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 269: 7950-7956
7. Marcinkiewicz J, Chain B, Nowak B, Grabowska A, Bryniarski K, Baran J (2000) Antimicrobial and cytotoxic activity of hypochlorous acid: interactions with taurine and nitrite. *Inflamm Res* 49: 280-289
8. Krakoff IH, Brown NC, Reichard P. (1968) Inhibition of ribonucleotide diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res* 28: 1559-1565
9. Navarra P, Grohman U, Nocentini G, Pucetti I, Riccardi C, Preziosi P. (1997) Hydroxyurea induces the gene expression and synthesis of proinflammatory cytokines in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 477-82
10. Navarra P, Preziosi P. (1999) Hydroxyurea: new insights on an old drug. *Crit Rev Oncol Haematol*. 29: 249-255
11. Sterkers Y, Preudhomme C, Lai JL, Dernory JL, Caulier MT, Wattel E, Bordessoule D, Bauters F, Fenaux P. (1998) Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: high proportion of cases with 17p deletion. *Blood* 91: 616-622
12. Mossman T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Method* 65: 55-63
13. Gerber CE, Kuçi S, Zipfel M, Niethammer D, Bruchelt G. (1996) Phagocytic activity and oxidative burst of granulocytes in persons with myeloperoxidase deficiency. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34: 901-908
14. Andrews PC, Krinski NI. (1982) Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate. *Anal Biochem* 127: 346-350
15. Kettle AJ, Winterbourn CC. (1994) Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase *Methods Enzymol* 233: 502-512
16. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
17. Kano Y, Akutsu M, Tsunado S, Mano H, Honma Y, Furukawa Y (2001) In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor ST1571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood* 97: 1999-2007
18. Tizard IR. (1984) *Immunology: An Introduction* NY pp: 42-63
19. Uggla B, Tidefelt U, Vikerfors T, Fredlund H. (2002) Activation of granulocytes in patients treated with chemotherapy. *Clin Lab Haem* 24: 29-31
20. Hill LL, Chen DL, Kozlowski J, Schuster DP. (2004) Neutrophils and neutrophil products do not mediate pulmonary hemodynamic effects of endotoxin on oleic acid-induced lung injury. *Anesth Analg* 98:452-457
21. Borba R, Lima CS, Grotto HZ. (2003) Reticulocyte parameters and hemoglobin F production in sickle cell disease patients undergoing hydroxyurea therapy. *J Clin Lab Anal* 17:66-72
22. Benkerrou M, Delarche C, Brahimi L, Fay M, Vilmer E, Elion J, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C. (2002) Hydroxyurea corrects the dysregulated L-selectin expression and increased H₂O₂ production of polymorphonuclear neutrophils from patients with sickle cell anemia. *Blood* 99: 2297-2303
23. Zagodzón R, Golab J. (2001) Immunomodulation by anticancer chemotherapy: more is not always better. *Int J Oncol* 18:417-424
24. Winterbourn CC, Vissers MCM, Kettle AJ. (2000) Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 7:53-58.