

71365

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
CERRAHİ ONKOLOJİ BİLİMDALI

**KARACİĞER İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA
PEROKSİNİTRİTİN ROLÜ**



UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali Ekrem Ünal

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. HİKMET AKGÜL

ANKARA-1998

İÇİNDEKİLER**SAYFA NO**

I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
II. GENEL BİLGİLER.....	3
II. 1. Serbest Radikaller.....	3
II. 1. 1. Serbest Radikal Nedir?.....	3
II. 1. 2. Serbest Radikal Kaynakları.....	3
II. 1. 3. Serbest Radikal Hasarının Biyokimyası.....	8
II. 1. 4. Antioksidanlar.....	9
II.1 . 5. Serbest Radikallerin Ölçülmesi.....	11
II.1. 6. Serbest Radikallerin Rol Oynadığı Patofizyolojik Olaylar.....	12
II. 2. Peroksinitrit.....	13
II. 2. 1. Biyolojik Sistemlerde Peroksinitrit Oluşumu.....	13
II. 2. 2. Peroksinitritin Biyokimyasal Reaksiyonları.....	18
II. 2. 2. 1. Peroksinitritin Oksidasyon Reaksiyonları.....	18
II. 2. 2. 2. Lipid Oksidasyonu.....	18
II. 2. 2. 3. Protein Oksidasyonu.....	19

II. 2. 2. 4. Sülfidril Oksidasyonu.....	20
II. 2. 2. 5. Askorbat ve Metiyonin Oksidasyonu.....	20
II. 2. 2. 6. Tiyol Oksidasyonu.....	20
II. 2. 2. 7. D, L-Selenometiyonin Oksidasyonu.....	21
II. 2. 3. Peroksinitritin Patofizyolojik Olaylardaki Rolü.....	21
II. 2. 3. 1. Hücre Hasarı ve Peroksinitrit.....	21
II. 2. 3. 2. DNA ve Peroksinitrit.....	23
II. 2. 3. 3. Vasküler Yapılar ve Peroksinitrit.....	24
II. 2. 3. 4. Trombosit, Eritrosit, Lökosit ve Peroksinitrit	25
II. 2. 3. 5. İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Peroksinitrit.....	27
II. 2. 3. 6. Solunum Sistemi ve Peroksinitrit.....	28
III. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
III. 1. ARAÇ VE GEREÇLER.....	30
III. 1. 1. Kullanılan Deney Hayvanları.....	30
III. 1. 2. Kullanılan Malzemeler.....	30
III. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
III. 2. YÖNTEM.....	32
III. 2. 1. Sham grubu.....	32

III. 2. 2. İskemi reperfüzyon Grubu.....	33
III. 2. 3. İskemi reperfüzyon +SOD+Katalaz uygulanan grup.....	33
III. 2. 4. İskemi reperfüzyon+ L-NAME uygulanan grup.....	33
III. 2. 5. İskemi reperfüzyon + Ürat uygulanan grup.....	34
IV. 2. 6. Sıçandan Alınan Tam Kan Örneklerinde Luminol Kemiluminesansı Protokolü	35
III. 3. İstatistiksel Analiz.....	36
IV. BULGULAR.....	37
IV. 1.LDH Düzeyleri.....	37
IV. 2. Kemiluminometre sinyalleri.....	38
V. Tartışma.....	43
IV. Kaynaklar.....	50

1. GİRİŞ ve AMAÇ:

Karaciğer cerrahisi günümüzde cerrahi onkoloji klinikleri, travmatoloji, transpalntasyon ve genel cerrahi hastalıkların tedavisinde önemli yer tutmaktadır. Teknolojik ilerlemeler, yoğun bakım hizmetlerinin çok daha etkin olması, cerrahi ve anesteziideki ilerlemelere rağmen hala karaciğer cerrahisi morbidite ve mortalitesi büyük ölçüde uygulayıcının deneyimine bağlı olan bir girişimdir.

İlk karaciğer rezeksiyonu 1716 yılında psikotik bir hastanın kendini vurması nedeniyle uygulanmış ve hasta postoperatif dönemde kaybedilmiştir. Bundan yaklaşık 150 yıl sonra kurşun yaralanması sonucu karaciğer rezeksiyonu yapılan hasta yaşatılabilmiş, 1886 yılında ilk elektif karaciğer rezeksiyonu yapılmış ancak hasta kaybedilmiş, 1888 yılında ise yine solid karaciğer tümörü nedeniyle yapılan rezeksiyon sonrası hasta yaşatılabilmiştir¹.

1908 yılında Pringle tarafından tariflenen menvra ile portal triad klepmlenerek karaciğer kan akımı azaltılarak kanama miktarı ciddi şekilde azaltılmış ve karaciğer cerrahisinde yeni bir dönem başlamıştır¹.

Bu sırada tıp dünyasının başka bir cephesinde 1940-50'lerde tanımlanan serbest oksijen radikallerinin 1970'lerde hücresel düzeydeki olası toksik etkileri tanımlanmaya başlamış serbest oksijen radikallerinin etkileri incekenmeye başlanmıştır. 1981'de Granger kedi barsağında oluşturduğu iskemi ve reperfüzyon modeli ile önce mezenter iskemi reperfüzyon modeli ile ikemi reperfüzyonda süperoksit radikalının rolünü tanımlamış³, daha sonra böbrek, myokard , serebral ve karaciğer iskemi reperfüzyon modelleri oluşturulmuş ve günümüzde serbest

oksijen radikallerininde iskemi reperfüzyon hasarındaki rolü giderek daha anlamlı hale dönüşünce farmakolog ve cerrahların büyük çoğunluğunun ilgi alanı haline gelmiştir. Pringle manevrasında bir iskemi reperfüzyon modeli olup süresi ve karaciğer fonksiyonlarına etkisi tartışılmış ve araştırılmıştır.

İskemi ve reperfüzyon hasarı sonucu iskemik alanda özellikle lökositlerden salınan lizozomal enzimler ve reperfüzyon ile gelen oksijen nedeniyle nitrik oksit ve süperoksit radikallerinin oluştuğu bilinmektedir. Bu iki radikal hızla reaksiyona girerek peroksinitrit anyonunu oluştururlar. Peroksinitrit kendisi bir radikal değildir, ancak oldukça toksik bir üründür ve yıkılması ile toksik etkili hidroksil ve nitrojendioksit radikalleri oluşmaktadır. Günümüzde nitrik okside atfedilen bir çok metabolik olayın aslında perokisnitirite bağlı reaksiyonlar olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle peroksinitritin diğer iskemi modellerinde olduğu gibi karaciğer iskemi reperfüzyonunda da oluştuğunu ve reperfüzyon hasarında önemli rol oynadığı varsayılmaktadır⁵.

Bu çalışmada sıçan karaciğerinde oluşturulan iskemi ve reperfüzyon modelinde radikal oluşumunun kemiluminometrik olarak ölçülmesi ve reperfüzyon sırasında değişik radikal uzaklaştırıcılar kullanılarak peroksinitrit oluşumunu araştırmak amaçlanmıştır..

II. GENEL BİLGİLER

II. 1. Serbest Radikaller

II. 1. 1. Serbest Radikal Nedir?

Dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektron bulunan moleküllere SR denir. Eşlenmemiş elektronlar molekülleri kararsız hale getirdiğinden stabil moleküller değildir. Bir başka moleküle etkileşerek, bu elektronu eşlemek ve böylece kararlı hale gelmek eğilimindedirler. Bu yüzden son derece reaktif moleküllerdir ve yarı ömürleri çok kısadır.

Kırk-elli yıl önce serbest radikaller (SR) selektivitesi olmayan, çok reaktif maddeler olarak görüldüğünden, bunların normal biyolojik reaksiyonlara katılmadıkları kanısı yaygındı.

Bu düşünceler, 1968'de süperoksid dismutazın (SOD) keşfiyle tamamen değişmiş¹, aerobik metabolizmaya sahip hücrelerin süperoksid ürettiği gösterilmiştir⁶. Bugün artık, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) ve bundan türeyen aktif oksijen ürünlerinin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü daha iyi anlaşılmıştır.

Biyolojik sistemlerde oluşan SR'ler ve toksik oksijen metabolitleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

II. 1. 2. Serbest Radikal Kaynakları

Fizyolojik ve patofizyolojik açıdan son derece önemli etkileri olan SR'ler ekzojen ya da endojen kaynaklı olabilir⁷.

Çeşitli ekzojen maddeler ve çevresel faktörler biyolojik sistemlerde

SR oluşumuna neden olmaktadır⁸. Tütün ürünlerinin kullanımı, sigara dumanı, fotokimyasal maddelere maruziyet gibi sık rastlanan çevresel faktörler biyolojik sistemlerin normalden fazla SR oluşturmaya neden olmaktadır.

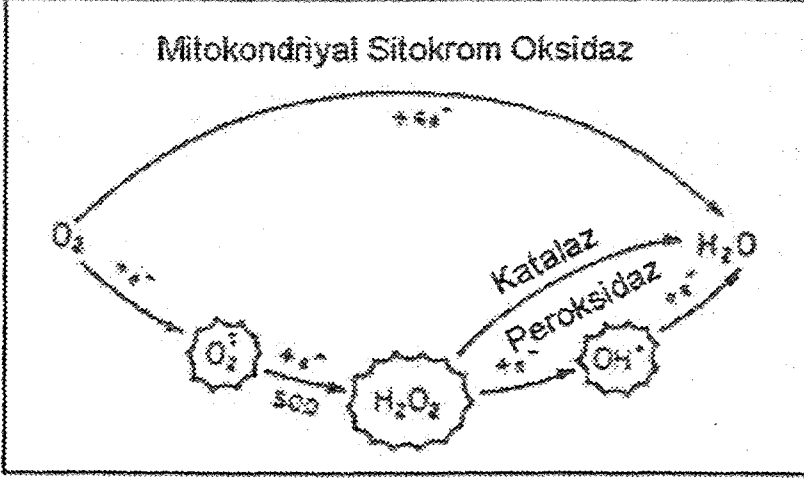
Benzer şekilde, organik çözücüler ve aromatik hidrokarbonlarla temasın da fazla miktarda SR oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Akut pulmoner toksisite ve buna bağlı hiperoksi, potent kemoterapötiklere bağlı kardiyomiyopati gibi, ksenobiyotik flavoproteinlerinin katalize ettiği redoks siklusları da radikal oluşumunun artması ile sonuçlanır.

Normal hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak oluşan SR'ler ise; endojen kaynakları oluşturmaktadır⁷. Bazı patolojik olaylarda bu radikallerin oluşumu artmaktadır. Son derece oksidan olan bu maddelerin oluşumu, endojen antioksidan sistemlerin kapasitesini aşınca SR'lerin toksik etkileri ve doku hasarı ortaya çıkmaktadır.

Oksidatif fosforilasyon sırasında; moleküler oksijen mitokondriyal sitokrom oksidaz enzimi aracılığıyla tetravalan olarak 4 elektron alarak suya indirgenir. Fakat bu sistemden % 1-5 kadar oksijen kaçağı olur. Sitokrom oksidaz reaksiyonundan sızan bu oksijen; enzimatik olmayan ve her basamağında tek elektronun indirgendiği başka bir reaksiyona girer. Bu basamaklı indirgenme ile sırasıyla O_2^- , H_2O_2 ve $^{\bullet}OH$ gibi son derece toksik radikal ve/veya ara ürünler oluşur(Şekil 1).

Tablo 1. Biyolojik sistemlerde rol oynayan SR'ler ve toksik metabolitler⁸:

<i>Oksijen Merkezli Radikaller</i>	
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot -}$
Hidroksil radikali	$\cdot OH$
Alkoksi radikali	$RO\cdot$
Peroksi radikali	$ROO\cdot$
<i>Oksijen Merkezli Olmayan Radikaller</i>	
Azot merkezli	$\cdot NO$
Karbon merkezli	
Lipit radikaller	$L\cdot$
Alkoksi radikaller	$R\cdot$
Kükürt merkezli	
Tiyil	$RS\cdot$
Hidrojen merkezli	
Hidrojen atomu	$H\cdot$
Demir merkezli	
Perferil radikali	$Fe^{+3}-O_2-Fe^{+2}$
<i>Radikal Olmayan Toksik Metabolitler</i>	
Ozon	O_3
Hidroperoksitler	
Hidrojenperoksit	H_2O_2
Hipoklöröz asit	$HOCl$
Kloraminler	$R'RNCl$
Moleküler oksijen	
Triplet durumda	3O_2
Singlet durumda	1O_2
Peroksinitrit	$ONOO\cdot$

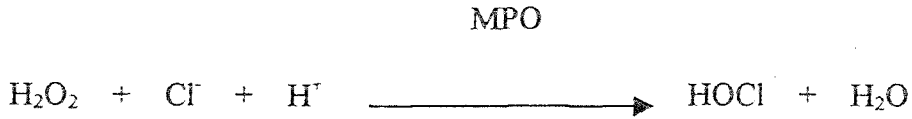


Şekil 1. Moleküler oksijenin tetravalan veya univalan olarak suya indirgenmesi.

Hücre membranı da SR oluşumu için potansiyel bir kaynaktır. Arakidonik asidin siklooksijenazlar ile prostaglandinlere; lipoksijenazlar ile lökotrienlere metabolize olması sırasında, yan ürün olarak peroksi ve hidroksi radikalleri oluşur. Özellikle fagositik aktivitenin arttığı patolojik durumlarda, bu yolla SR oluşumu önemli rol oynar.

Yine nötrofil membranının dış yüzeyinde bulunan ve normal durumda aktif olmayan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)-bağımlı oksidaz enzim sistemi $O_2^{\cdot-}$ 'nin salınımında önemli rol oynar. Bu enzimin aktivitesi bakteriler, mitojenler, sitokinler, forbol esterleri, opsonize zimosan, tümör nekrozis faktör ve kompleman gibi partiküler ve çözünür faktörler ile indüklenir⁹. Aktive olan enzim; oksijenin $O_2^{\cdot-}$ 'ye ve H_2O_2 indirgenmesini katalize ederken, stimüle edilmiş nötrofillerin oksijen tüketimini % 90 artırır. Bu olay "solunum patlaması"

(respiratory burst) olarak tanımlanır. Yine nötrofil membranında bol miktarda bulunan miyeloperoksidaz (MPO) enzimi H_2O_2 'in klorür iyonu (Cl^-) ile reaksiyonunu katalizler, reaksiyon ürünü olarak hipokloröz asit (HOCl) oluşur:



HOCl'nin endojen aminlerle reaksiyon ürünü olarak kloraminler oluşur. Gerek kloraminler, gerekse solunum patlaması sırasında oluşan süperoksitin dönüştüğü H_2O_2 , antimikrobiyal aktivite gösterir^{6,9}.

Myeloperoksidaz reaksiyonu ile oluşan hipokloröz asit, hidrojen peroksitle reaksiyona girerek singlet oksijeni (1O_2) oluşturur¹⁰. Kendisi bir radikal olmadığı halde O_2 'nin elektronlarından birinin enerji alarak yörüngede ters yerleşmesiyle oluşan 1O_2 , çok reaktif bir oksijen metabolitidir.

Bir çok enzimin katalitik siklusu sırasında yine SR'ler oluşmaktadır. Bu enzimlerden bazıları şunlardır: ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, dihidroorotik dehidrogenaz, flavin dehidrogenaz, triptofan dioksijenaz, çeşitli peroksidazlar, lipoksijenazlar ve proteazlar. Askorbik asit, tiyoller (glutasyon, sistein vb), katekolaminler, flavin koenzimleri ve hidrokinonlar gibi bazı biyomoleküllerin otooksidasyonu sırasında da yine SR'ler oluşmaktadır.

Eşlenmemiş elektron içermesinden dolayı nitrik oksit (NO) de bir SR'dir; L-arginin ve moleküler oksijenin nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından oksidasyonu ile sentezlenir¹¹.

Bu endojen ve ekzojen kaynaklar ile oluşan SR'ler dışında; yine SR'ler kadar büyük önem taşıyan, toksik oksijen metabolitlerinin de biyolojik sistemler içinde oksidasyon siklusunda rolü büyüktür.

II. 1. 3. Serbest Radikal Hasarının Biyokimyası

SR'ler eşlenmemiş elektronlarından dolayı çok reaktif moleküller olduğundan; hücresel lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzimler ile çok kolay reaksiyona girerler¹²

Membran lipidleri; SR hasarına en hassas biyomoleküllerdir. Özellikle kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, SR'ler ile geri dönüşümsüz olarak peroksidasyona uğrar. Lipid peroksidasyonu son ürünlerinin (aldehitler, MDA vb) de doku hasarını potansiyalize edici etkisi vardır. SR'ler ile lipid peroksidasyonu, hücre membran potansiyelinin değişimi, iyon kanallarının bütünlüğünün bozulması, hücre lizisine kadar giden olayları tetikler.

Proteinler SR hasarına lipidler kadar hasas değildir. SR hasarından etkilenmeleri içerdikleri amino asit kompozisyonuna bağlıdır: Radikallerin tirozin, triptofan, metiyonin ve sistein amino asitlerine afiniteleri fazladır. SR'lerin direkt olarak membran reseptörlerinin protein komponentlerini okside etmeleri, hücre sinyal iletiminde önemli sonuçlar doğurur. SR'lerin immünglobin G ve albuminin yapısında fazla sayıda olan disülfit bağlarına da afiniteleri fazladır. SR'lerin Hem proteinleri ile reaksiyona girmeleri ise methemoglobinemi ile sonuçlanır.

Nükleik asitler ve DNA da SR hasarına açık biyomoleküllerdir. Özellikle OH ve H₂O₂; nükleik asitlerde baz modifikasyonuna, buna bağlı olarak da

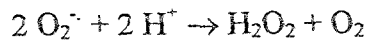
kromozom değişikliğine ve hücre disfonksiyonuna neden olur. Ayrıca supressör T hücrelerinin SR'lerden çok kolay etkilenmelerinin patolojik bir çok olayda rolü olduğu ileri sürölmüştür.

Monosakkaritlerin SR' ler ile oksidasyonu ise diyabet, kanser, yaşlanma, katarakt, eklem hastalıkları gibi birçok olayın patogeneğinde rol oynar.

II. 1. 4. Antioksidanlar

Organizmada sürekli oluşan SR'lerin zararlı etkilerine karşı koruyucu antioksidan savunma sistemleri bulunur. SR'lerin ve antioksidanların düzeyleri arasında hassas bir denge vardır. Bu dengenin korunması, organizmanın canlılığını sürdürmesi açısından son derece önemlidir. Antioksidan miktarının SR hasarını kompanse edememesi halinde bu denge bozulur ve hücre hasarına kadar giden bir çok patolojik değişiklik ortaya çıkar. Antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen ya da geciktiren maddeler olarak tanımlanmaktadır^{12,7,8}. Endojen antioksidanların yetersiz kalması halinde diyetle alınan antioksidanların desteğine ihtiyaç duyulur. Bu bakımdan endojen antioksidan kapasitenin belirlenmesi klinik önem taşır.

Antioksidanların etki mekanizmaları farklıdır. Oluşmuş reaktif oksijen türlerinin enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla temizlenmesi örneklerden biridir. SOD enzimi aşağıdaki reaksiyonu katalize ederek hücre içi $O_2^{\cdot-}$ 'nin düzeyini düşürür¹².



Katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz enzimleri ise H_2O_2 'yi ve peroksitleri benzer şekilde temizlerler. Bir başka antioksidan etki mekanizması,

oluşmuş reaktif oksijen türlerinin doğrudan temizlenmesidir. Mannitol ve DMSO bunların örneklerindendir¹².

SR'lerin oluşumunun baskılanması da antioksidan etki doğurur: ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi radikal kaynağı enzimlerin inhibitörleri örneklerinde olduğu gibi. SR oluşumunu hızlandıran metal iyonlarının ferritin, transferin, albumin, seruloplazmin gibi proteinler ile bağlanması, radikal oluşumunu engelleyerek antioksidan aktivite gösterir.

SR'lerin oluşturduğu hasarın onarımı ya da temizlenmesi de antioksidan bir etkidir. Fosfolipazlar aracılığıyla peroksidasyona uğrayan lipidlerin membrandan uzaklaştırılması; glukozidaz, endonükleaz ve ligazlar aracılığıyla DNA'da oluşan hasarın onarımı bu antioksidan etki mekanizmasının örneklerindendir^{13,14}.

Antioksidanların önemli bir kısmı enzim yapısında (SOD, KAT, glutatyon peroksidaz gibi) olmakla birlikte, enzim olmayan (askorbik asit, glutatyon, E vitamini, karotenoidler, retinoidler, ubikinonlar, flavonoidler, melatonin, ürik asit, albumin gibi) antioksidanlar da vardır. Glutatyon, vitamin C, ürik asit, sistein gibi antioksidanlar suda çözünebilirken; vitamin E, β -karoten, bilirubin ve flavonoidler yağda çözünen antioksidanlardandır.

Çok sayıda endojen molekülün de antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir: sistein, histidin amino asitleri, safra asitleri, bilirubin, sitokinler buna

örnektir¹².

II. 1. 5. Serbest Radikallerin Ölçülmesi:

Bir çok patofizyolojik olayda SR'lerin rolünün gösterilmesi SR'lerin miktarının ölçülmesi için yeni teknikler geliştirilmesine neden olmuştur. Son derece reaktif olan ve bu nedenle yarı ömrü çok kısa olan SR'lerin, miktarı doğrudan yöntemler yanında dolaylı olarak da ölçülebilir. SR'lerin lipid, protein, ve DNA ile reaksiyonunun son ürünlerinin ölçülmesi sık kullanılan bir yöntemdir¹⁵. Lipid peroksidasyon ürünleri bu amaçla en sık kullanılanlardır. Bu amaçla lipid hidroperoksidlerin, konjuge dienlerin, aldehitlerin ve uçucu hidrokarbonların ölçümü, yaygın kullanılan duyarlı bir yöntemdir. SR aktivitesi için tiyobarbitürik asit (TBA) ile lipid peroksidasyonunun ölçülmesi çok kolaydır ve sık kullanılır. HPLC, malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin ölçümünde kullanılan, kolay adapte edilebilen analitik bir yöntem olmasına rağmen oldukça zor bir teknik gerektirir, ayrıca her radikal için aynı derecede duyarlı değildir ve *in vivo* olarak uygulanması zordur¹⁶.

Benzer şekilde SR'lerin neden olduğu protein hasarı için amino asit rezidülerdeki modifikasyonlar tespit edilir¹⁵. Protein çapraz bağlarının SR'ler ile kopması konformasyon değişikliğine neden olur. Buna bağlı olarak gelişen işlev kaybının tespiti de SR miktarını yansıtır.

Hidroksil radikalının, DNA baz yapısında neden olduğu geri dönüşümsüz modifikasyonlar, SR miktarının ölçümünde dolaylı bir yöntem olarak kullanılmaktadır. DNA yapısında meydana gelen SR hasarı, bazı onarım

enzimlerinin aktivasyonuna neden olur ki bunun ölçülmesi de dolaylı bir yöntemdir^{13,14}.

Biyolojik sistemlerde meydana gelen oksidan hasara karşı koruyucu antioksidanların miktarının ölçümü, bir başka dolaylı yöntem olarak SR miktarının ölçümünde sık kullanılmaktadır. Bu amaçla biyolojik örneklerde özellikle askorbik asit, urat, α -tokoferol ve protein sülfidrillerin ölçümüne başvurulur.

Elektron spin rezonans (ESR) spektrofotometresi SR'lerin tayininde uygulanan doğrudan bir ölçüm yöntemidir. Çeşitli "*spin trapping*" ajanların (Fe+2-N-metil-D-glukamin-ditiokarbomat ya da 5,5-dimetil-pirolin-N-oksit gibi) SR'ı tutması ve bu kimyasal reaksiyonların son ürünlerinin ölçülmesi esasına dayanır. ESR spektrofotometresi sık kullanılmasına rağmen duyarlılığının düşük olması, *in vivo* uygulananın zor olması ve pahalı bir yöntem olması gibi olumsuzlukları vardır¹⁷.

Kemiluminesans yönteminde ise; SR'lerin luminol, lusigenin gibi bazı kimyasal problemler ile reaksiyonunun oluşturduğu ışık ölçülür. Bu ışık miktarını artırmak için kimyasal maddelerden (PMA, FMLP gibi) faydalanılır. Farklı SR süpürücü ajanların varlığında bu sinyallerin nasıl değiştiği, SR'lerin miktarının ölçümünde sıklıkla baş vurulan duyarlı bir uygulamadır. Bu yöntemin *in vitro* ve *in vivo* uyumlu tiplerinin bulunması avantajları arasındadır¹⁸.

II. 1. 6. Serbest Radikallerin Rol Oynadığı Patofizyolojik Olaylar

SR'lerin miktarının artması ya da antioksidanların miktarının azalması pek çok hastalığın patogeneğinde rol oynar. SR reaksiyonlarının artması

doku hasarına kadar giden bir çok olayı tetikler.

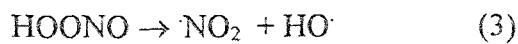
SR'ler hücrelerin lipid, protein, nükleik asit, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli yapılarını okside ederler⁶. Özellikle lipidler, proteinler ve nükleik asitler önemli hedeflerdir. Reaktif oksijen türlerinin ilişkili olduğu düşünülen hastalıklardan bazıları Tablo 2'de özetlenmiştir.

II. 2. Peroksinitrit

Bazı hücrelerin yalnız bir değil, birden fazla radikali (O_2^- ve NO gibi) aynı anda üretebileceği gösterilmiştir. 1990'da Beckman ve arkadaşları^{19,20,21} O_2^- ve NO 'nun peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturmak üzere birleşebildiğini ve peroksinitröz asitin ($ONOOH$), biyolojik olarak aktif hidroksil radikalinin ($HO^\bullet$) kaynağı olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra forbol esteri ile aktive edilmiş alveolar makrofajlarda $ONOO^-$ oluşumu gösterilmiştir²². Bu bulgulardan sonra $ONOO^-$ ile ilgili araştırmalar hız kazanmıştır.

II. 2. 1. Biyolojik Sistemlerde Peroksinitrit Oluşumu

O_2^- ve NO , $ONOO^-$ oluşturmak üzere difüzyon kontrollü limite yakın sabit bir hızla reaksiyona girerler (1). $ONOO^-$; $HOONO$ ile denge halindedir (2).



Tablo 2. Serbest radikaller ve diğer toksik oksidanların rol oynadığı fizyolojik ve patofizyolojik olaylar⁸:

Fizyolojik

Hidrokarbonlardan enerji (ATP) üretiminde oksidan olarak
Mikroorganizmaların fagositik olarak öldürülmesi
Ksenobiyotiklerin enzimatik detoksifikasyonu
Ovulasyon

Patofizyolojik

Ekzojen toksik ajanların neden olduğu toksik hasar

Kimyasal ve çevresel toksinler

Parakuat ile indüklenen pulmoner toksisite

Karbonditetraklorür ile indüklenen hepatotoksisite

Sigara içiminin neden olduğu solunum yolu hasarı

Alkol ile indüklenen hepatotoksisite

İlaç ile indüklenen katarakt oluşumu

Kimyasal ve çevresel karsinojenler

Kemoteropötik ajanlar

Doksorubisin kardiyomiyopatisi

Bleomisin pulmoner fibrozisi

Hiperoksijenasyon sendromları

Pulmoner oksijen toksisitesi

Retrolental fibroplazi

İskemi-reperfüzyon sendromları

Splanknik

İntestinal iskemi

Neonatal nekrotizan enterokolit

Nonsplanknik

Miyokardiyal iskemi

Santral sinir sistemi

Akut renal yetmezlik

Cilt iskemisi (flep transferi vs)

Organ transplantasyonları

İnflamatuvar durumlar

ARDS

Artrit

Bağ dokusu hastalıkları

İmmün yetmezlik sendromu

Sekonder mediyatörlerin rol oynadığı toksik doku hasarı

Aspirasyon pnömonisi

Özofajit

Noniskemik akut pankreatit

Çoklu organ yetmezliği

Genel durumlar

Yaşlanma

Ateroskleroz

Dolaşım şoku

Diyabet

Reaksiyonların hız sabitleri karşılaştırıldığında (Tablo 3), $O_2^{\cdot -}$ ve $NO^{\cdot}$ 'nin $ONOO^{\cdot}$ oluşturma hız sabiti süperoksitin SOD ile, nitrik oksidin de hem bileşikleri ile olan reaksiyonlarının hız sabitinden çok daha büyüktür⁶. Buradan $O_2^{\cdot -}$ ve $NO^{\cdot}$ 'nin reaksiyona girerek $ONOO^{\cdot}$ oluşturmalarının, süperoksitin SOD ile, $NO^{\cdot}$ 'nin hem bileşikleri ile reaksiyonundan daha dominant bir reaksiyon olduğu sonucuna varılmıştır (Tablo 3). NO ve $O_2^{\cdot -}$, $ONOO^{\cdot}$ oluşturmak üzere reaksiyona girdikleri için birbirlerinin etkilerini modüle ederler. Dolayısıyla NO ve SOD, $O_2^{\cdot -}$ için birbirleriyle yarışır. NO 'nun, $O_2^{\cdot -}$ 'i bu mekanizma ile temizleyebildiği bir çok çalışma ile gösterilmiştir^{23,24}.

Tablo 3. Nitrik oksit ve süperoksitin birbirleriyle ve diğer biyolojik maddeler ile olan reaksiyonlarının hız sabitlerinin karşılaştırılması:

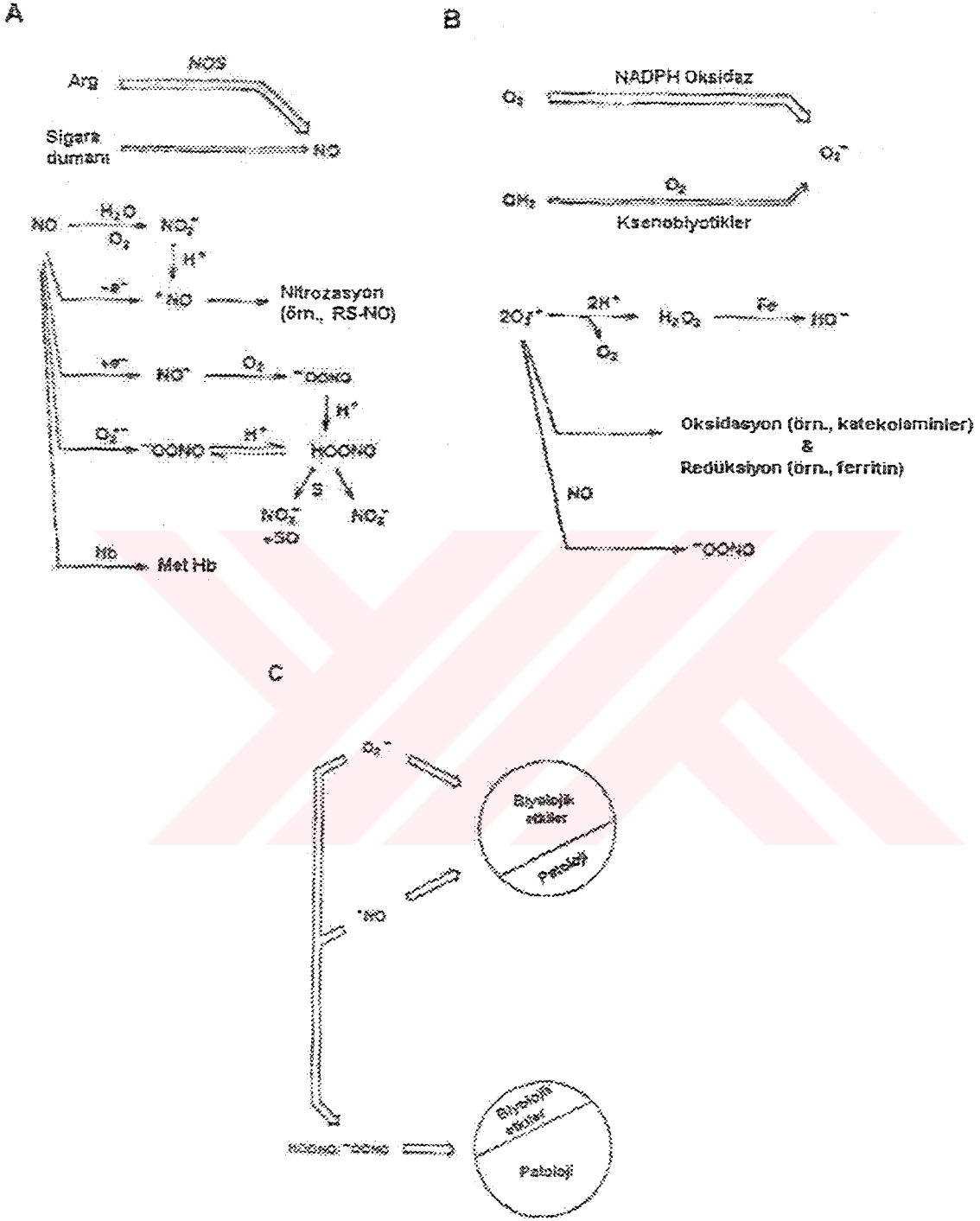
REAKSİYON	HIZ SABİTİ ($M^{-1}s^{-1}$)
$O_2^{\cdot -} + NO \rightarrow \bar{OO}-N=O$	7×10^9
$O_2^{\cdot -} + SOD \rightarrow O_2 + H_2O_2$	2×10^9
$NO + Fe(II)\text{-hem} \rightarrow$	$\sim 10^7$
$NO + Fe(III)\text{-hem} \rightarrow$	$10^2 - 10^7$

Bazal şartlarda O_2^- ve NO 'nun, dolayısıyla da bunların reaksiyon ürünü olan $ONOO^-$ 'nin konsantrasyonu çok düşüktür. Bazı patolojik olayların neden olduğu stimülasyon O_2^- ve NO miktarlarını arttırdığından, bu durumlarda $ONOO^-$ oluşumu da artar. Örneğin, O_2^- ya da NO 'dan birinin konsantrasyonunda 10 katlık bir artış $ONOO^-$ konsantrasyonunda 100 katlık bir artış ile sonuçlanır.

In vivo koşullarda O_2^- ve NO 'nun reaksiyona girerek $ONOO^-$ oluşturduğunu gösteren bir çok çalışma vardır^{5,24}. Süperoksidin nitrik oksiti $ONOO^-$ 'ya dönüştürerek, NO 'nun etkilerini azaltması da bunu desteklemektedir. Tiyoller ve SOD gibi süperoksit süpürücüleri, NO 'nun biyolojik aktivitesini artırır¹¹. Aynı mekanizma ile NO de süperoksidi bağlayarak, onun etkilerini değiştirir; antioksidan etki gösterir. NO varlığının süperoksid ve süperoksid türevi oksijen ürünlerine karşı koruyucu rolünü gösteren birçok çalışma vardır²³. Nunoshiba ve arkadaşlarının *in vivo* olarak yaptıkları bir çalışma NO ve O_2^- 'nin *E. coli*'yi aynı transkripsiyon faktörü için uyardıklarını göstermiştir²⁵. NO indüksiyonu ile uyarılan genler *E. coli*'yi oksidatif hasardan korurlar.

Sigara dumanı yüksek konsantrasyonlarda NO içerir, dumandaki NO , nitrojen dioksit radikaline (NO_2) okside olur. Sigara dumanı lipid peroksidasyonuna da neden olur. Bu durum, lipidperoksit radikallerinin oluşmasına yol açar. Sigara dumanında lipidperoksit radikalleri, NO 'yla ya da NO_2 ile reaksiyona girerek, lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Bu reaksiyonların son ürünü $ONOO^-$ ya da peroksinitrat esterleridir.

NO ve O_2^- 'nin *in vivo* potansiyel kaynakları ve reaksiyonları Şekil 2A ve 2B'de gösterilmiştir. Her iki radikal için birçok reaksiyon olasılığı vardır.



Şekil 2. Nitrik oksit, peroksit ve süperoksinitritin *in vivo* kaynakları ve reaksiyonları. A; NO kaynakları, B; enzimatik ya da ksenobiyotik yollarla oluşabilen O₂⁻'nin reaksiyonları, C; NO, O₂⁻ ve OONO'nun normal biyolojik fonksiyonları ve patofizyolojik rolü.

Endotel hücreleri^{19,20,21}, lökositler⁷, nötrofiller, sinir hücreleri, beyin hücreleri⁹ gibi bir çok hücre NO ve O₂⁻'yu beraber üretebilmektedir. Tüm bu hücrelerde, iki radikalın ONOO⁻ oluşturmak üzere birleştiği de gösterilmiştir. Şekil 2C, NO ve O₂⁻'nin ayrı ayrı biyolojik etkilerinin yanı sıra, patolojik etkilerinin de olduğunu göstermektedir. NO ve O₂⁻'nin reaksiyon ürünü olan ONOO⁻'nin, normal hücre fonksiyonları üzerinde de rolü vardır, fakat bunun ayrıntıları henüz tam olarak bilinmemektedir.

II. 2. 2. Peroksinitritin Biyokimyasal Reaksiyonları

II. 2. 2. 1. Peroksinitritin Oksidasyon Reaksiyonları

ONOO⁻'nin bir çok biyolojik maddenin oksidasyonunda rol oynaması, patolojik olaylara neden olabilme olasılığını doğurur. ONOO⁻'nin oksidasyonunda rol oynadığı biyomoleküllerden bazıları şunlardır: sülfidler, metiyoninler, tiyoller, deoksiriboz, lipidler, α -1-proteinaz inhibitörü ve askorbik asit.

II. 2. 2. 2. Lipid Oksidasyonu:

Lipid peroksidasyonunda rol alması, ONOO⁻'nin önemini artırmaktadır⁴¹. Çünkü substrat olarak kullandığı çoklu doymamış yağ asitleri (düşük ağırlıklı lipoprotein gibi) oksidasyon ürünleri, ateroskleroz gibi patolojik olaylarda rol oynarlar. Birçok enzim de lipid peroksidasyonundan etkilenir^{26,23}. Örneğin steroid hidroksilaz aktivitesinden sorumlu olan P 450 izoenzimleri lipid

peroksidasyonu ile yıkılır. Bu da steroid hormon sentezinin aksamasına neden olur²⁷.

α -tokoferol (α TF) biyolojik sistemler için majör antioksidandır. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan lipid peroksil radikalının ($\text{LOO}^\cdot$) temizlenmesine neden olur²⁸.

Sıçan karaciğerinde yapılan çalışmalarda α TF'nin, $\text{ONOO}^\cdot$ ile α -tokoferilkinona (α TK) dönüştüğü gösterilmiştir^{28,29}. Adrenal korteksin çoklu doymamış yağ asidi ve lipid peroksidaz konsantrasyonları çok yüksektir. Buna rağmen, önemli bir antioksidan aktivitesi vardır²⁷. Çünkü adrenal korteksde α TF ve askorbik asit gibi anti-oksidanlar da fazla miktardadır. İlginç olan, adrenal korteksin iç tabakasında (zona retikularis) lipid peroksidazın fazla, α TF'nin düşük konsantrasyonda bulunmuş olmasıdır. Buna karşılık, dış tabakada (zona glomeruloza) lipid peroksidaz düşük, α TF'nin yüksek konsantrasyonda bulunur.

II. 2. 2. 3. Protein Oksidasyonu:

$\text{ONOO}^\cdot$ proteinlerin oksidasyonunda rol oynarken, nükleik asitlerin oksidasyonunda rol oynamaz^{23,31,32}. Peroksinitrit proteinleri kovalent olarak modifiye ettiğinden, nitrozin türevleri üreten bir hücre içi sinyal ileticisi olarak düşünülebilir. Protein oksidasyonunu özellikle sistein, tirozin ve triptofan üzerinde yapar. $\text{ONOO}^\cdot$ tirozin oksidasyonunu, tirozin radikali ya da nitrojen dioksit radikali ($\text{NO}_2^\cdot$) oluşturarak yapar³³. Nitrojen dioksit, NO'nun otooksidasyon ürünüdür. NO otooksidasyonu nitrit (NO_2) formasyonu ile sonuçlanırken, ara ürün olarak NO_2

ve dinitrojen trioksit ($N_2 O_3$) oluşturur.

II. 2. 2. 4. Sülfidril Oksidasyonu:

Protein ve non-protein sülfidril gruplarının $ONOO^-$ ile oksidasyonunun da biyolojik önemi vardır^{30,31}. Sülfidril grupları için $ONOO^-$ hidrojen peroksitten daha reaktiftir. $ONOO^-$ aracılıklı sülfidril oksidasyonu ciddi sitotoksik sonuçlar doğurur. İlk olarak; düşük moleküler ağırlıklı sülfidriller (örneğin sistein ve glutatyon), intra ve ekstraselüler koruyucu mekanizmanın en önemli süpürücü ajanlarının azalmasına yol açar. Bu da DNA, enzimler, yapısal proteinler, yapısal polisakkaritler, membran fosfolipitleri gibi kritik önemi olan makromoleküllerde hasar olasılığını artırır. İkinci olarak; protein sülfidrilleri ve tiyol içeren kofaktörlerin (koenzim A, lipoik asit, tioredoksin, fosfopantein gibi) oksidasyonu metabolizma ve biyosentez basamaklarının çeşitli kademelerde bozulmasına neden olur.

II. 2. 2. 5. Askorbat ve Metiyonin Oksidasyonu:

Askorbat ve metiyonin hem tek hem çift elektron oksidasyon yolağıyla oksidasyona uğrar. Askorbat için tek elektron yolağı dominanttır³⁴

II. 2. 2. 6. Tiyol Oksidasyonu:

Sıçan karaciğer mitokondrileriyle yapılan bir çalışma ile $ONOO^-$ 'nin primidin nükleotid bağımlı Ca^{++} salınımını stimüle ettiği gösterilmiştir. Bu olayın etki mekanizması araştırıldığında; mitokondriyal kritik tiyollerin $ONOO^-$

oksidasyonunun karaciğer hücrelerinden Ca^{++} salınımını stimüle ettiği görülmüştür.

II. 2. 2. 7. D, L-Selenometiyonin Oksidasyonu:

Hücre içinde oksidan strese neden olan lipidlerin selenyumla oksidasyonu lipidlerin ortamdan uzaklaştırılmasına neden olur. Bu nedenle selenyumun hücre içi endojen bir SR süpürücü gibi davranır. Selenosistein ve selenometiyonin (MetSe) biyolojik sistemler için katabolik antioksidandır. Bunlar özellikle radyasyon ile indüklenmiş hasara karşı koruyucudur.

II. 2. 3. Peroksinitritin Patofizyolojik Olaylardaki Rolü

Son zamanlarda felç¹⁹, miyokardiyal I/R¹⁹, immünokompleks aracılıklı pulmoner ödem³⁵, pulmoner amfizem³⁶, ateroskleroz^{37,38}, kronik börek yetmezliği³⁷, hücre aracılıklı inflamatuvar olay^{40,41}, sepsis⁴⁰ gibi patolojik durumlarda hasardan sorumlu ajan olarak ONOO⁻'nin rolü tartışılmaya başlanmıştır.

II. 2. 3. 1. Hücre Hasarı ve Peroksinitrit:

Mitokondri, hücre içi oksijen radikallerinin önemli bir kaynağıdır⁴². Aynı zamanda, radikallerin hücre içi hedef yapılarındandır. Tüm serbest oksijen radikalleri mitokondriye saldırdığında; mitokondride şişme, solunum inhibisyonu, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal antioksidanların tüketilmesi ve Ca^{++} dengesinin bozulması gibi zincirleme olaylar gözlenir. NO'nun neden olduğu sitotoksik etkinin de mitokondriler üzerinden olduğu sanılmaktadır⁸. NO'nun Fe/S içeren enzimleri inaktive ederek, DNA sentezini ve mitokondriyal elektron transportunu inhibe edip

hücre hasarına neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca mitokondriyal sitokrom oksidaz da yine 'NO'nun hedefleri arasındadır⁴⁴.

ONOO⁻'nun mitokondri elektron transportunda oluşturduğu değişiklikler peroksinitritin sitotoksik etkisinin de aslını oluşturur^{46,45,43}. Sıçan kalbi homojenatlarından elde edilen mitokondri süspansiyonlarında yapılan bir çalışmaya göre; elektron transport zinciri içinde ONOO⁻ başlıca süksinat dehidrogenaz ve ATPaz, daha az olmak üzere NADH dehidrogenaz inhibisyonu yapar⁴⁰. Sitokrom C oksidaz ise çok daha az etkilenir. Ayrıca ONOO⁻'nun mitokondriyal kompleks I ve III'ün inhibisyonunda rol oynaması ve mitokondriden siklosporin duyarlı Ca⁺⁺ çıkışını indüklemesi de yine ONOO⁻ aracılıklı hücre hasarda rol oynamaktadır^{47,48}.

ONOO⁻ ve 'NO ile oluşan hücre hasarının karşılaştırıldığı çalışmalarda; endotel ve epitel hücrelerin ONOO⁻'nun neden olduğu hücre hasardan korunamadığı, epitel hücrelerinin 8 saat içinde, endotel hücrelerinin ise 18 saatten sonra öldüğü görülmüştür. Aynı şartlarda uygulanan 'NO'nun ise endotel hücrelerinde hasar oluşturmadığı, epitel hücrelerinde ise hücre ölümü ile sonuçlandığı görülmüştür. Yani endotel hücrelerini 'NO'nun oksidan hasarından koruyan sistem ONOO⁻ hasarına karşı etkisiz kalmaktadır.

Radi ve arkadaşları 1993 yılında yaptıkları çalışmada ise o zamana kadar olanlardan daha farklı bir yöntemle çalışmıştır⁴⁹: Araştırmacılar ONOO⁻'nin parazitik aktivitesini *Trypanosoma cruzi* üzerinde incelemişler ve sitotoksik etkisinden faydalananarak ONOO⁻'nin *in vivo* olarak *T. cruzi*'yi öldürdüğünü göstermişlerdir. Hücre membranlarından rahatlıkla difüze olabilen ONOO⁻'nin *T.*

cruzi hücrelerinin replikasyonunu azaltıcı etkisinin konsantrasyonu ile orantılı olduğunu görmüşlerdir. Bunun yanında ONOO^- , hücre hareketliliğini önleyici ve hücre şişmesi ile sonuçlanan etkilere de neden olur. Araştırmacılar bu çalışmada, hidroksil radikali süpürücülerini ve metal şelatörlerini kullanmışlar ve ONOO^- 'nin dekompozisyon ürünlerinden bağımsız kendi sitotoksik etkisini göstermişlerdir. ONOO^- 'nin sülfidril gibi biyomoleküler hedef hücreler ile direkt reaksiyonunun, hidroksil radikali oluşturan dekompozisyon reaksiyonundan çok daha hızlı olması da bu sonuçlarını desteklemektedir.

HL-60 hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada ONOO^- 'nin konsantrasyon ve zaman bağımlı bir şekilde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir^{125,175}. ONOO^- kendisi apoptozisi indüklediği gibi, formasyonuna neden olduğu reaktif oksijen bileşikleri de bu olayın devamlılığında rol oynar.

II. 2. 3. 2. DNA ve Peroksinitrit:

Çok çeşitli çevresel stimulusların yanı sıra serbest radikal ya da oksidanların da DNA'da tek zincir kırıkları oluşturabildikleri bilinmektedir⁵⁰. Organizmada oksidan bir stres yaratan H_2O_2 , $\text{OH}^\cdot$, NO , HONOO ve ONOO^- , DNA kırıklarına yol açan reaktiflerin başında gelirler^{14,51,52}. DNA kırıkları; poli (ADP-riboz) sentetaz (PARS) denilen onarıcı bir enzimin aktive olmasını tetikler. Bu enzim aynı zamanda poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) ya da poli (ADP-riboz) transferaz (pADPRT) olarak da bilinir. PARS hücre çekirdeğinde bol miktarda bulunan ve adenosin difosfat riboz ünitelerinin homopolimerizasyonunu sağlayan bir enzimdir. PARS hücre içi NAD^+ 'yi substrat olarak kullandığı için glikolizin ve

elektron transportunun yavaşlamasına dolayısıyla ATP oluşumunun azalmasına neden olur. Bu olaylar zincirinin neden olduğu enerji açığına bağlı olarak, ONOO⁻ gibi aşırı oksidan stres yaratan durumlar hücrenin disfonksiyonu ve ölümü ile sonuçlanır. Sıçan vasküler düz kas hücreleri ve makrofajlarında yapılan çalışmalar ONOO⁻'nin potent bir PARS aktivatörü olduğunu göstermiştir^{50,53}. Endotoksik şok^{54,53}, iskemi-reperüzyon⁵⁰, inflamasyon^{57,56}, diyabet⁵⁵ gibi bir çok patolojik olayda PARS inhibitörlerinin koruyucu olduğu gösterilmiştir. Ancak ONOO⁻'nin rol oynadığı bu patofizyolojik olaylarda PARS'ın rolü hala tartışmalıdır. Yapılan çalışmalar sıçanda miyokardiyal iskemi-reperüzyon hasarında koruyucu olduğu gösterilen PARS inhibitörlerinin, direkt bir ONOO⁻ süpürücüsü ya da NOS inhibitörü olmadığını göstermiştir⁵⁰. Oksidan strese bağlı DNA kırıklarının oluşması ardından PARS enziminin aktive olması belli bir süre gerektirdiğinden; ONOO⁻'nin rol oynadığı ve ani başlayan olaylarda PARS'ın rolü zaman yönünden de tartışmalıdır⁵⁰.

II. 2. 3. 3. Vasküler Yapılar ve Peroksinitrit:

Yarı ömrü çok kısa (yaklaşık 0,6 sn) olan ONOO⁻'nin *in vitro* ve *in vivo* olarak vazodilatör olduğunu gösteren bir çok çalışma vardır^{10,58,59,60}. *In vitro* çalışmalarda ONOO⁻'nin vazodilatör etkisinin endotelden bağımsız olduğu gösterilmiştir^{5,58}.

ONOO⁻'nin vazodilatör etkisi bir çok soruyu da beraberinde getirmiştir. Bu etkinin ONOO⁻'nin kendi etkisi mi, yoksa dekompozisyon ürünlerinin, ya da dönüştüğü daha potent bir ara maddenin etkisi mi olduğunun

anlaşılması gerekmektedir. Bilindiği gibi ONOO^- fizyolojik tamponlarda S-nitrozotiyoller (S-nitrozosistein, S-nitrozoglutatyon gibi)^{5,61}, S-nitrozoalbumin ve nitrozoglukoz gibi ara ürünler oluşturabilmektedir ki, bu maddelerin de vazodilatör etkisi vardır⁶². Ayrıca *in vivo* şartlarda ONOO^- 'nin stabil dekompozisyon ürünü olan nitrat ve nitrit de vazodilatasyon yapar.

In vitro olarak uygulanan ONOO^- 'nin oluşturduğu vazodilatasyonun hemoglobin ile inhibe olduğu görülmüştür^{10,58}. Buradan ONOO^- aracılıklı vazodilatasyonda NO ya da NO donörü gibi davranan nitrozil ürünlerinin rolü olabileceği düşünülmüştür.

Daha sonra ONOO^- aracılıklı vazodilatasyonun mekanizmasını aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar ile olayda ATP duyarlı potasyum kanallarının rolü olabileceği gösterilmiştir⁷². ONOO^- 'nin ATP duyarlı potasyum kanalları ile olan bu olası etkileşimi için iki farklı mekanizma öne sürülmüştür: 1) ONOO^- ATP kullanımını arttırarak serum ATP konsantrasyonunun düşmesine neden olur ki, bu ATP duyarlı potasyum kanallarının açılmasına neden olur. Açılan kanalın neden olduğu hiperpolarizasyon vasküler düz kas hücrelerinde gevşeme ile sonuçlanır. 2) ONOO^- 'nin ATP duyarlı potasyum kanallarının fonksiyonel, duyarlı bölgelerini okside ederek kanalın açılmasına neden olabilir.

II. 2. 3. 4. Trombosit, Eritrosit, Lökositler ve Peroksinitrit:

Trombosit fonksiyonlarını ONOO^- 'nin nasıl etkilediğini incelemek için, *in vitro* olarak insan trombositleri üzerinde yapılan bir çalışmada, bu etkinin kullanılan trombositin hazırlanış yöntemine göre değiştiği görülmüştür⁵. ONOO^-

yıkanmış trombositlerin (trombositten fakir plazma ile yapılan çalışmalarda) agregasyonuna neden olurken, trombositlen zengin plazmada agregasyonun inhibisyonuna neden olur. Yıkanmış trombositlerin ONOO^- ile agregasyonu; KAT, SOD, mannitol, desferrioksamin, DTPA (dietilenetriaminpentaasetik asit) ile değişmediğinden, bunun ONOO^- 'nin doğrudan kendi etkisi olduğu; hidrojen peroksit, süperoksit ya da hidroksil radikalının oluşumunun sorumlu olmadığını ortaya koymuştur. Buradan ONOO^- 'nin trombosit fonksiyonları üzerindeki etkisinin, antioksidan sistemin de dahil olduğu biyolojik çevre şartları ile yakından ilgili olduğu sonucuna varılmıştır⁶⁴.

İnsan izole eritrositlerinde Kondo ve arkadaşlarının yaptığı çalışma; ONOO^- donörü olan 3-morfolinizitnonimin (SIN-1)'in doz bağımlı hemolitik etkisini göstermiştir⁶⁵. Mekanizması tam aydınlatılmamış olmasına rağmen, ONOO^- 'nin muhtemelen lipid membran lizisine bağlı hemolitik etkisinden bahsetmek mümkündür.

NO ile yapılan çalışmalarda; NO 'nun nanomolar konsantrasyonlarda sitoprotektif etkileri olmasına rağmen, mikromolar konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermesi, ONOO^- 'nin sitotoksik etkisinin gözlemlendiği çalışmalara yeni bir bakış açısı getirmiştir. Lefer ve arkadaşları polimorfonükleer lökositler (PMNL) ile endotel hücre ilişkisinde ONOO^- 'nin doz bağımlı etkilerini incelemişlerdir⁶⁶. Sıçan mezenterik arter preparatlarında ONOO^- nanomolar konsantrasyonlarda (100-1.000 nM) lökosit-endotel hücre ilişkisini inhibe ederek sitoprotektif etki göstermiştir. Bu çalışmanın *in vitro* bölümünden sonra, sıçan mezenter postkapiller venülüne yerleştirilen bir video aracılığıyla

yapılan *in vivo* kısmında, ONOO⁻'nin 0,8 µM konsantrasyonlarda lökosit-endotel hücre ilişkisini inhibe ettiği gösterilmiştir. ONOO⁻'nin yalnız nanomolar konsantrasyonlardaki lökosit-endotel ilişkisinin inhibisyonuna bağlı sitoprotektif etkisinin, I/R gibi endotel hasarıyla giden durumlarda rolünün olup olamayacağı tartışma konusudur.

II. 2. 3. 5. İskemi / Reperfüzyon Hasarı ve Peroksinitrit:

Bir çok doku modelinde yapılan çalışmalarda SOD'un, I/R gibi oksidan stres yaratan durumlarda, oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarını sınırladığı gösterilmiştir^{7,8}. Buradan, süperoksitin doku hasarından doğrudan ya da dolaylı olarak sorumlu olduğu sonucu çıkar. SOD'un koruyucu etkisinin, O₂⁻'nin temizlenmesiyle NO'nun dekompozisyonunun önlenmesine bağlı olarak, normal vazodilatasyonun ve trombosit fonksiyonlarının sağlanmasına bağlı olduğu öne sürülmüştür¹⁹. *In vivo* olarak SOD'un ONOO⁻ oluşumunu dolaylı yoldan önlemesi ve ONOO⁻'nin, sitotoksik etkisi en potent radikallerden olan [•]OH'ye dekompoze olmasının önlenmesi de koruyucudur.

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, *E. coli* lipopolisakkaritleri ile indüklenmiş NO üretiminin karaciğer iskemi reperfüzyon hasarındaki rolü incelenmiştir⁶⁷. Indüklenmiş NO üretiminin reperfüzyon sırasında karaciğer hasarını arttırdığı görülmüştür. Bu sırada süperoksit miktarındaki artış kemilüminesansta "patlama" ile sonuçlanır. Fakat perfüzata SOD ilavesinin karaciğer hasarını azaltması beklenirken, yeterince başarılı olmadığı görülmüştür. Bu durum, NO ile O₂⁻ reaksiyonunun daha çok hücre içinde meydana gelmesi, SOD'un ise hücre içine

az miktarda geçmesi ile açıklanmıştır. NO ve $O_2^{\cdot-}$ 'in neden olduğu doku hasarına ek olarak, ONOO⁻'nin kendisinin de hasara doğrudan katkısı vardır.

II. 2. 3. 6. Solunum Sistemi ve Peroksinitrit:

Aktive olmuş alveoler makrofajlar ve tip II epitelial hücreler hem NO[•], hem $O_2^{\cdot-}$ 'yi beraber salıverilerek ONOO⁻'yu oluşturmurlar³⁶. İnflamatuar mediyatörlerin neden olduğu hücrel NO ve $O_2^{\cdot-}$ oluşumu, akut akciğer hasarı durumunda da ONOO⁻ oluşumu ile sonuçlanır²². Diffüz alveoler hasarı olan insanlardan alınan akciğer doku örnekleri ile yapılan bu araştırmada, tirozin proteini ile bağlantılı olarak yoğun nitrat formasyonu görülmüştür. Bronkoalveoler lavaj sıvısında yapılan bir başka çalışmanın sonuçlarına göre ise ONOO⁻ kendisi (dekompozisyon ürünleri değil), nitrotirozin oluşumuna neden olarak, sürfaktan protein-A'nın lipidlere agregasyonunu azaltır³⁰. ONOO⁻'nin pulmoner sürfaktan proteinlerde meydana getirdiği hasarın mekanizmasına yönelik bir çalışma, yeni öldürülmüş köpeklerin bronkoalveolar lavaj sıvısından izole edilen sürfaktan ile yapılmıştır⁶⁸. Doğal akciğer sürfaktanlarının ONOO⁻ ile inaktive olmadığı, buna karşılık sürfaktan A'nın (SF-A) ONOO⁻ ile yapısal ve fonksiyonel hasarının söz konusu olduğu görülmüştür. Bu hasar SF-A'nın yapısındaki proteinlerin ve lipidlerin peroksidasyonundandır. Haddad ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışma da bu bulguları desteklemektedir⁶⁸.

Kobaylarda *in vivo* bir çalışmayla ise; ONOO⁻'nin epitel hasarı ve inflamasyon mediyatörlerinin salınımına neden olarak, solunum yolunda duyarlılığın artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Yani NO ve $O_2^{\cdot-}$ 'nin reaksiyona girerek

yararlı etkilerinin yok olmasının yanında; ONOO^- kendisi de neden olduğu epitel hasarı ile solunum yollarının koruyucu bariyerini ortadan kaldırarak, allerjenlerle döz kasın doğrudan temasına yol açar.



III. MATERYAL VE YÖNTEM

III. 1. ARAÇ VE GEREÇLER

III. 1. 1. Kullanılan Deney Hayvanları

Deneylerde 250-350g ağırlığında albino erkek sıçanlar kullanılmıştır.

III. 1. 2. Kullanılan Malzemeler

Rektal termometre (MAY 9404-A)

İpek atravmatik cerrahi ip (Mersilk 6/0 10mm)

Polietilen kanüller ve kataterler

Cerrahi malzeme (makas, pens, v.b.)

Kemiluminometre (BioOrbit, 1250 Luminometre, Turku, Finlandiya)

Bilgisayar kontrollü kaydedici sistem (A/D bilgisayar kartı ve luminometre 1250 programı, sürüm 1.12, Finlandiya)

pH metre (ETD Instruments, GP 353)

Su banyosu (Nüve, BM-402, Ankara)

Santrifüj (Nüve, NF-815, Ankara)

Otomatik pipetler (Socorex, İsviçre)

Hamilton enjektörü

III. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Luminol Sodyum (5-Amino-2,3-dihidro-1,4-fitalazindion)

FMLP (Formil-L-Metionil-L-lösil-L-fenilalanin)

Süperoksit Dismutaz (SOD)

Katalaz (KAT)

Nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME)

Ürat

Yukarıdaki kimyasal maddeler Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)'dan sağlanmıştır.

Sodyum tiyopental (Pental sodyum®, I. E. Ulagay)

Heparin (Liquemine®, Abbot)

Sodyum Sitrat (Merck)

Fosfat tamponlu serum fizyolojik solüsyonu (Phospate buffered saline, PBS), laboratuvarında hazırlanmıştır.

Deneyde kullanılan çözeltiler ve dilüsyonlar ise aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

PBS: 10 mM KH_2PO_4 ve 150 mM NaCl distile suda çözülmüştür. 2 M NaOH ile pH 7.4'e ayarlanmıştır.

Luminol sodyum: Siçandan alınan tam kan örneklerinde KL sinyalinin incelenmesi

için ise luminol 2 M NaOH ile çözülmüş ve PBS ilave ederek 2.5×10^{-1} M'lık çözeltisi kullanılmıştır.

FMLP: Absolü etanolde çözülen FMLP'den 10^{-2} M'lık stok çözelti hazırlanmıştır.

Deneyde bu stok solüsyondan PBS ile dilüsyonlar yapılmıştır.

Sodyum Sitrat: %3,8'lik sodyum sitrat çözeltisi serum fizyolojikte çözülmüştür.

Süperoksit dismutaz katalaz, ve L-NAME: PBS'de çözülmüştür.

Ürat: Distile suda çözüldükten sonra PBS'de dilüsyonları yapılmıştır.

III. 2. YÖNTEM

Çalışmada 250-300 gr. ağırlığında albino erkek sıçanlar kullanılmıştır. Beş grup oluşturulmuştur. Tüm hayvanlar 60 mg/kg tiyopental sodyum i.p. verilerek anesteziye edilmiştir. Vücut sıcaklığını 37°C 'de sabit tutmak için rektal termometre bağlantılı ısıtıcı lamba kullanılmıştır. Polietilen kateterlerle sağ internal juguler ven kateterize edilmiştir. Tüm hayvanlara median laparotomi uygulanmıştır.

III. 2. 1 Sham Grubu:

Grup I: Sham grubu: Laparotomi işlem yapılmadan kapatılmıştır. (n=6)

III. 2. 2 İskemi reperfüzyon grubu:

Grup II: Karaciğer iskemi reperfüzyonu uygulanması: Karaciğer yapışıklıkları ayrıldıktan sonra porta hepatitis disseke edilerek kleplenenmiş ve 20 dakika klepli kaldıktan sonra açılarak reperfüzyon uygulanmıştır. Ardından işlem sonlandırmıştır.(n=10)

III. 2. 3 İskemi reperfüzyon SOD+Katalaz uygulanan grup:

Grup III: Süperoksit dismutaz ve katalaz infüzyonu ile beraber karaciğer iskemi reperfüzyonu uygulanması: Yukarıda tanımlanan biçimde hazırlandıktan sonra iskemi öncesinde SOD (15.000 U/kg)+KAT (50.000 U/kg) 30 dakikalık infüzyon halinde uygulanmıştır. Ardından yukarıda tanımlandığı biçimde iskemi reperfüzyon modeli uygulanmıştır.(n=7)

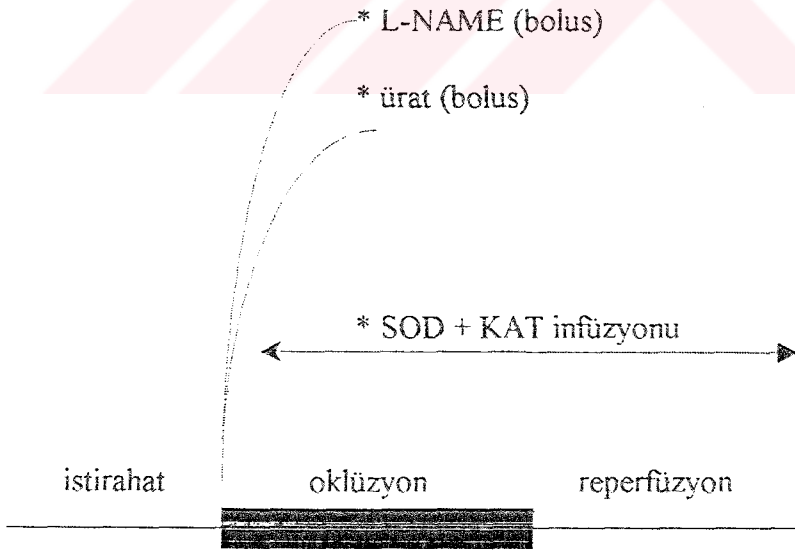
III. 2. 4 İskemi reperfüzyon +L-NAME uygulanan grup:

Grup IV: Yukarıda tanımlanan şekilde hayvanlar hazırlandıktan sonra portal klemp uygulanmadan 2 dakika önce L-NAME (10 mg/kg) i.v. bolus verildikten sonra iskemi ve reperfüzyon protokolü yukarıda tariflendiği şekilde uygulanmıştır.(n=7)

III. 2. 5 İskemi reperfüzyon + Ürat uygulanan grup:

Grup V: Yukarıda tanımlanan şekilde hayvanlar hazırlandıktan sonra portal klemp uygulanmada 2 dakika öncesinde ürat (5 mg/kg) i.v. bolus verildikten sonra iskemi reperfüzyon modeli uygulanmıştır.(N=10)

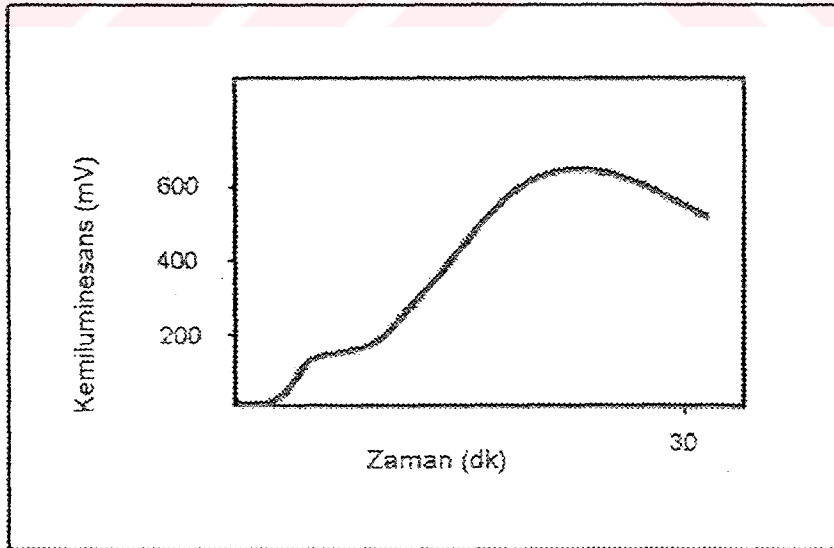
Tüm gruplarda sham grubu hariç laparotomi yapıp porta hepatis oklüzyon için hazırlandığında 5 dakikalık stabilizasyon (anestezi ve laparotomi sonrası ölüm riski nedeni ile) süresi verilip beklenmiş bu sırada kemiluminometrik çalışma için kan alınmış, yine sham grubu hariç tüm gruplarda 20 dakika iskemi sonrası reperfüzyonun 1'inci dakikasında kemiluminometrik çalışma için ve 10'uncu dakikasında LDH tayini için kan alınmıştır. Sham grubunda ise laparotomi yapıp kan alındıktan sonra 20 dakika bekleyip tekrar kan alınarak işlem sonlandırılmıştır.



Şekil 3: İskemi-reperfüzyon uygulanan anesteziye sıçanlarda radikal uzaklaştırıcı ve enzim inhibitörünün uygulanması.

III. 2. 6. Sıçandan Alınan Tam Kan Örneklerinde Luminol Kemiluminesansı Protokolü

Gerek istirahat dönemi gerekse reperfüzyonun ilk dakikası içinde sitratlı enjektör ile sıçandan alınan kandan mikropipet ile 5 μL 'si, KL ölçümlerinin yapılacağı 1000 μL 'lik küvete boşaltılmıştır. Stok luminolden 100 μL (final konsantrasyonu 250 μM) ilave edilmiştir. Stimulan olarak kullanılan FMLP'den 10 μL (final konsantrasyonu 10^{-5} M) ilave edilmiş, küvet 885 μL PBS ilavesi ile 1000 μL 'ye tamamlanmış ve kemiluminometrik ölçüm hemen yapılmıştır. Tam kanda kemiluminometrik ölçüm yapmak için uygulanan bu protokol, Slavikova ve arkadaşlarının çalışmalarında uyguladıkları protokolden modifiye edilmiştir⁷⁶. Şekil 4'de alınan tam kan örneklerinde yapılan luminol KL ölçümüne ait orjinal trase görülmektedir.



Şekil 4: Tam kan örneklerinde yapılan luminol KL ölçümüne ait orjinal trase

III. 3. İstatiksel Analiz

Kemiluminometrik ölçümler, % inhibisyon ya da ortalama $\pm$ standart hata şeklinde gösterilmiştir. % inhibisyonlarda gruplar arasındaki farklılık Fisher'in kesin ki kare testi ile, ortalama $\pm$ standart hata şeklindeki veriler varyans analizi ile incelenmiştir.

LDH düzeyleri ortalama $\pm$ standart hata şeklindeki veriler varyans analizi ile incelenmiştir, Post-hoc test olarak Student-Newman-Keuls kullanılmıştır. $p < 0,05$ düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

IV.1. LDH düzeyleri:

Sham grubunda serum LDH düzeyleri laparotomi öncesi ortalama 354 ± 48 IU/L iken laparotomi sonrası ortalama 553 ± 52 IU/L olarak ölçülmüştür. Aradaki fark anlamlı bulunmamıştır.

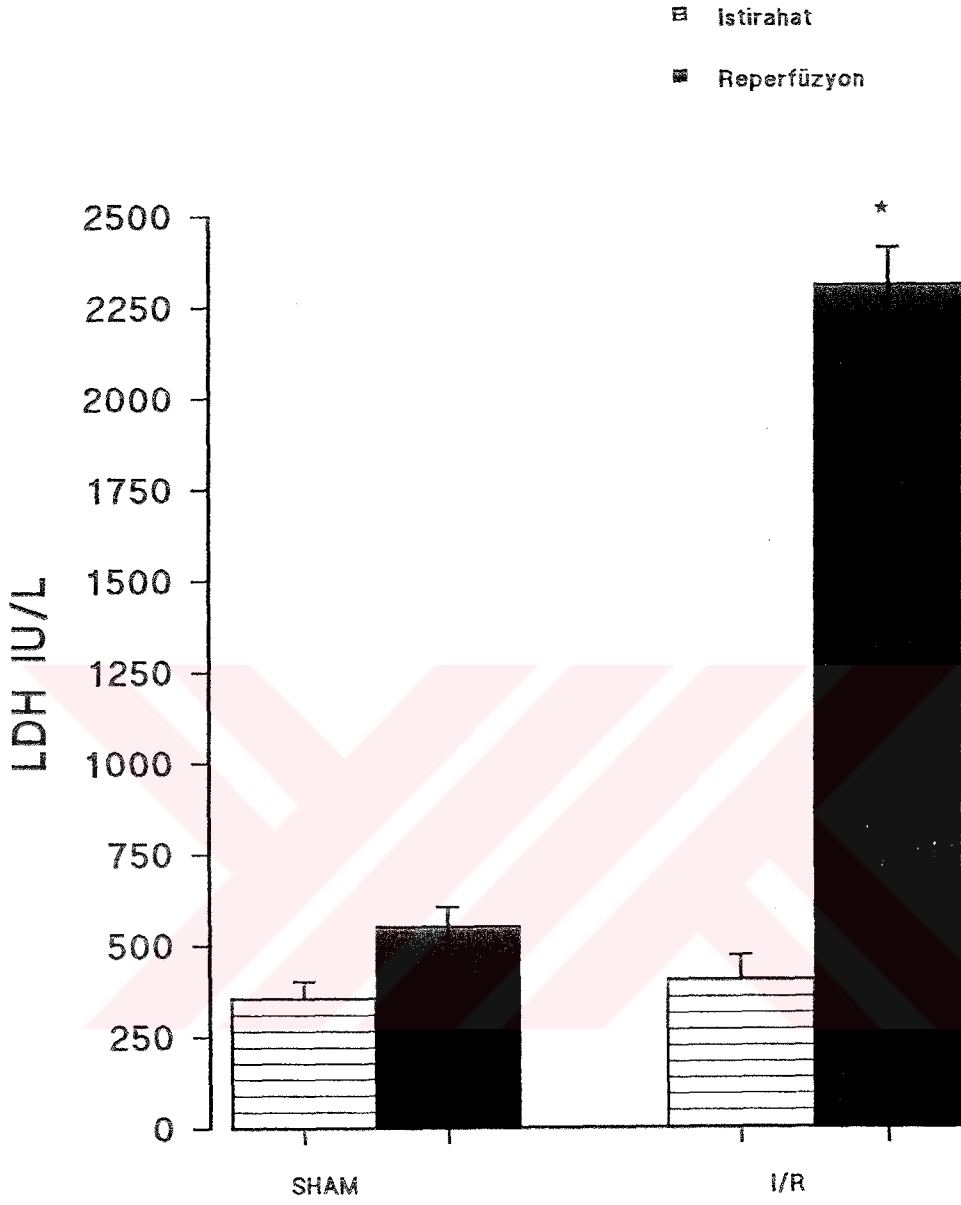
İskemi reperfüzyon grubunda istirahat döneminde alınan kan örneklerinden yapılan LDH ölçümleri ortalama 405 ± 67 IU/L, reperfüzyonun 20'inci dakikasında ortalama 2310 ± 97 IU/L bulunmuştur. Reperfüzyon ile görülen bu artış istatistiki olarak anlamlıdır ($p < 0.05$).

LDH düzeyleri; İ/R +SOD+KAT grubunda 363 ± 35 IU/L 'den 1650 ± 52 IU/L'ye; İ/R + L-NAME grubunda 510 ± 65 IU/L 'den 1828 ± 89 IU/L'ye; İ/R + Ürat grubunda 440 ± 53 IU/L 'den 902 ± 54 IU/L'ye yükselmiştir. Reperfüzyon ile oluşan bu artışlar, tüm gruplarda kendi içlerinde anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p < 0,001$). Reperfüzyon ile oluşan LDH yükselmeleri L-NAME ve SO+KAT uygulanan grupları arasında anlamlı olarak farklı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Oysaki ürat uygulanan grupta LDH düzeyi diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük bulunmuştur($p < 0,05$).

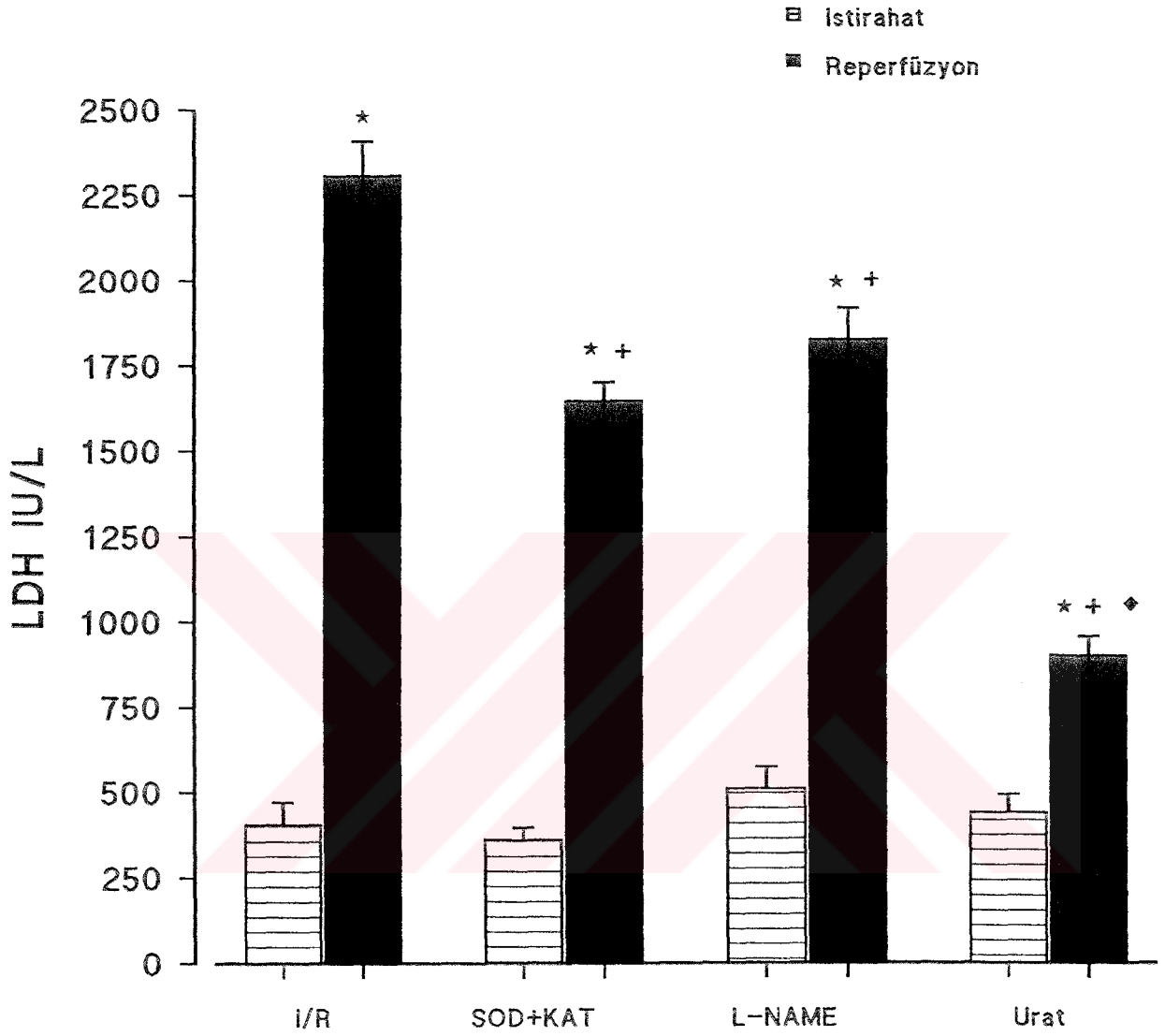
IV. 2. Kemiluminometre sinyalleri:

Sham grubunda laparotomi işleminin hemen ardından alınan tam kan örneklerinde yapılan KL ölçümlerinde ortalama 136 ± 34 mV'luk bir sinyal elde edilmiştir. İskemi reperfüzyon grubunda reperfüzyonun ilk dakikası içinde alınan tam kan örneklerinde ortalama 434 ± 57 mV sinyal ölçülmüştür. Rperfüzyonun neden olduğu KL sinyali artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

İ/R + SOD+KAT grubunda reperfüzyonun ilk dakikası içinde alınan tam kan örneklerinde yapılan KL ölçümlerinin kontrole göre %71 inhibe olduğu görülmüştür. İ/R + L-NAME grubunda bu sinyal %64, İ/R + Ürat grubunda ise %94 oranında inhibe olmuştur. Bu sonuçların analizinde ürat uygulanması KL sinyallerini diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde farklı inhibe etmiştir.



Şekil 5: Sham grubu ve I/R protokolu uygulanan hayvanlarda istirahat ve reperfüzyon sırasında alınan kan örneklerinde yapılan LDH ölçümleri.
 ★; diğer gruplarla karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

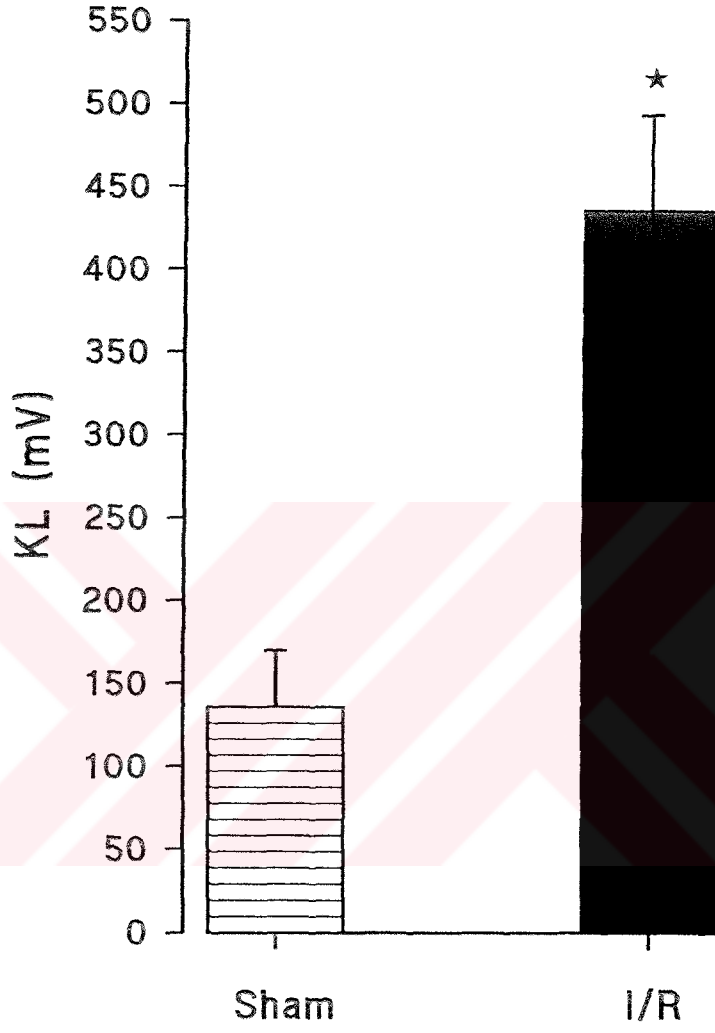


Şekil 6: SOD+KAT, L-NAME ve urat varlığında İ/R protokolü uygulanan hayvanlarda istirahat ve reperfüzyon sırasında alınan kan örneklerinde yapılan LDH ölçümleri.

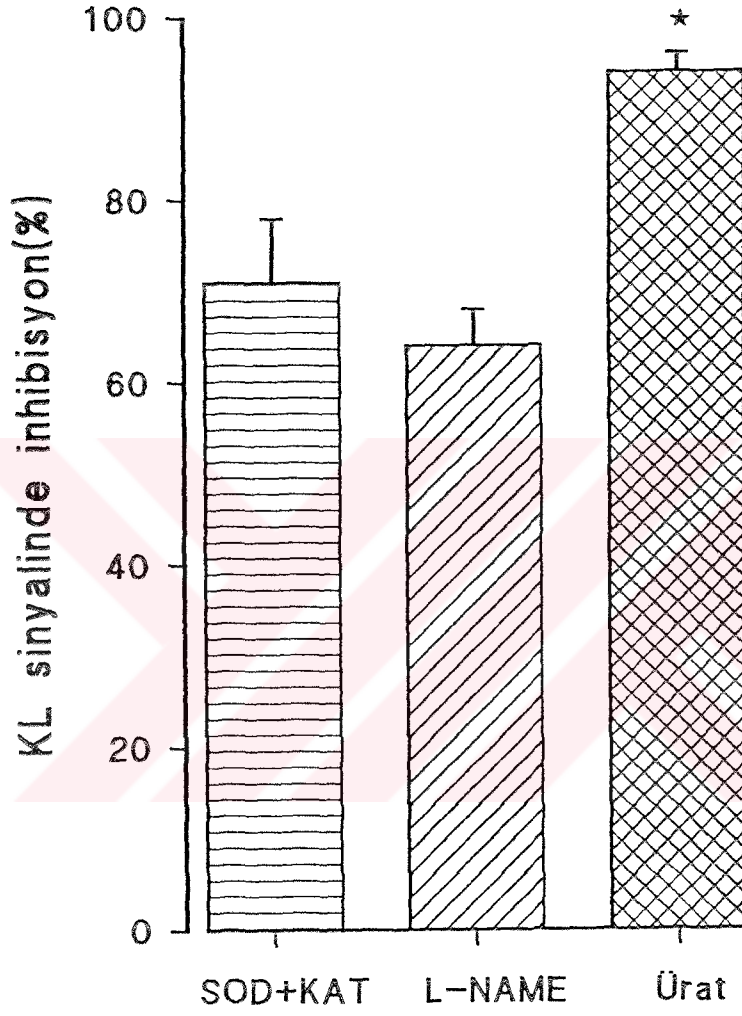
★; kendi istirahat değerleri ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

+; İ/R grubunun reperfüzyon değerleri ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).

♦; SOD+KAT ve L-NAME grupları reperfüzyon değerleri ile karşılaştırıldığında ($p < 0.05$).



Şekil 7: Sham grubu ve I/R protokolü uygulanan hayvanlarda reperfüzyon sırasında alınan tam kan örneklerinde yapılan KL ölçümleri
★;Sham grubu ile karşılaştırıldığında ($p<0.05$).



Şekil 8: İ/R protokolü uygulanan hayvanlarda SOD+KAT, L-NAME ve ürat varlığında reperfüzyon sırasında alınan tam kan örneklerinde KL sinyallerinin inhibisyonu.

★; diğer gruplarla karşılaştırıldığında ($p<0.05$).

TARTIŞMA

İskemik dokunun reperfüzyonu, doku canlılığının devamı için gereklidir. Fakat iskeminin neden olduğu doku hasarından farklı olarak, reperfüzyonun kendisi de zararlı değişikliklere neden olabilmektedir. İskemi yüksek enerjili fosfatların yıkımı, ksantin oksidazın aktivite olması gibi metabolik değişikliklere neden olurken, reperfüzyon ile dokunun yeniden oksijenlenmesi SR oluşturan önemli bir tetikleyici mekanizmadır. Reperfüzyon ile nötrofil akümüasyonu; $O_2^{\cdot-}$ 'nin yanısıra proteazlar gibi radikal olmayan toksik metabolitlerin de birikmesine neden olarak doku hasarına yol açar. Bu yüzden iskemi-reperfüzyonun neden olduğu endotel hasarı, olayı tetiklerken, endotel-nötrofil ilişkisi bu hasarın sürdürülmesinde rol oynar^{24,26,46,45,40}.

NO ve süperoksit radikalının reaksiyonu sonucu oluşan peroksinitrit daha önce bahsedildiği gibi oldukça toksik bir üründür. Peroksinitrit de hidroksil radikali ve nitrojendioksida yığılır. Biyolojik sistemde peroksinitritin gösterilmesi oldukça zordur. Peroksinitritin stabil metaboliti nitrotirozinin ölçümü ile peroksinitritin varlığı ve bulunduğu yapılar ortaya konmuştur. Beckman koroner arterlerdeki aterom plaklarında , Ischiropoulos sıçan akciğeri makrofajlarında ve Ma ve arkadaşları karaciğerde reperfüzyon sonrası peroksinitritin varlığını gösterilmiştir^{31,10}.

NO özellikle inflamatuvar olaylarda, karaciğer kan akımının azaldığı durumlarda, parankim hasarında süratle salınmaktadır. Koruyucu etkileri dışında peroksinitrit oluşumunda önemli bir kaynaktır. İskemik süreçte endotel ve nötrofil

reaksiyonu sonucu kan akımını arttırmak amacıyla salınan NO aynı zamanda iskemik alandaki süperoksit radikali ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuna neden olmaktadır. NO sentezini inhibe ederek karaciğer hasarını önlemeye çalışan Shu ve arkadaşları hipotansiyon ve multiple organ yetmezliği bulguları ile karşılaşmışlar ve bu arada peroksinitrit düzeylerini hala yüksek bulmuşlardır^{69,70}. Bu da peroksinitritin ayrıca ortamdaki oksijen radikallerinin hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek oluştuğunu göstermektedir. Günümüzde iskemi reperfüzyon hasarında kilit ürününü peroksinitrit olduğu kabul edilmektedir.

Karaciğer iskemi ve reperfüzyon hasarında radikallerin oluşturduğu biyolojik hasarlar süratle morfolojik değişimlere neden olur. Bu portal triad klempisi ilede oluşan global iskemi ve ardından reperfüzyonda bozulan mikrosirkülasyon sonucu hasar iki farklı yönde gelişir. *No-flow fenomeni*: besleyici kapillerde geri dönülmez hasar düzelmeyen iskemi ve infarkt olur. *Reflow paradox*: mikrosirkülasyonun tam bozulmaması sonucu iskemi ortadan kalkınca hasarlı endotel ile lökositler arasındaki reaksiyon ile süratle serbest radikallerin ortaya çıkması ile hasarın daha büyümesi^{71,72}. Karaciğerdeki reperfüzyon hasarı bu mekanizma ile açıklanmaktadır. Diğer dokulardan farklı bir reperfüzyon hasarı gözlenmesinin nedeni sinüzoidal yapının farklılığına bağlıdır. Sinüzoidlerde endotel çevresinde düz kas yapısı bulunmamakta bunun yerine hepatositlerle endotel arasında geçirgen bir yapı görevi gören (*ITO hücreleri*) perisitlerin özellikle NO karşı çok duyarlı olarak sinüzoidlerin çapını değiştirebildikleri gözlenmiştir. Bunun yanında parankim hasarının süratle ve belirgin biçimde olması sinüzoid yapısının bozularak kanda yıkım ürünlerinin kolaylıkla tespit edilmesini sağlar⁷². Müller

iskemik hasarın sadece parankim hücrelerini değil aynı zamanda Kupffer hücrelerininide etkilediği ortaya atmıştır, kupffer hücrelerini izole ederek yaptığı bir çalışmada bunu göstermiş ve ksantin oksidaz düzeylerinin iskemide parankim hücreleri dışında nonparankimal hücrelerden de salındığını yani bu hücrelerde de hasar meydana geldiğini ve iyileşme mekanizmalarının gecikmesini bunun etkilediğini vurgulamıştır⁷¹.

Portal klemp sırasında karaciğerde mikrovasküler yatakta lökosit infiltrasyonu ve tıkaçların engellenmesinde Müller ve arkadaşları allopürinol ve süperoksit dismutaz kullanarak antioksidan tedavi uygulamışlar ve reperfüzyon sırasında oluşan lökosit infiltrasyonunun ve LDH düzeylerini kontrol grubuna göre daha düşük bulmalarına rağmen aradaki fark anlamlı olmaması peroksinitritin reperfüzyon hasarında daha önemli rol oynadığını göstermiştir. Ozaki sıçanlarda karaciğer iskemi reperfüzyon modeli oluşturarak antioksidan tedavide etkili olan C vitaminini kullanmış ve oldukça iyi sonuçlar almıştır. C vitamininin iskemik ortamda ortaya çıkan Fe iyonunu bağlayarak oksijen radikallerinin oluşmasında reaksiyon için gerekli enzimatik işlemi inhibe eder⁷⁵. Ozaki bunun sadece bu mekanizma ile olmadığını C vitamininin aynı zamanda karaciğer hücresi içinde peroksidatif reaksiyonların inhibisyonunu sağlayarak antioksidan etkinliğini sağladığını vurgulamıştır. Bu çalışma hem mekanizma hem de tedavi aşamasında peroksinitritin önemini göstermektedir⁷³.

Kemiluminesans yöntemi ise; SR'lerin ölçülmesinde direkt bir yöntemdir ve oldukça hassastır¹⁸. Biz çalışmamızda farklı SR süpürücü ajanların varlığında bu sinyallerin nasıl değiştiğini inceleyerek, oluşan SR miktarı ve radikal

cinsini tayin ettik. Çalışmamızda süperoksit radikali SOD+KAT temizlenirken, NO oluşumu L-NAME ile enzimatik olarak engellenmiştir. Bu iki radikalin reaksiyon ürünü olan peroksinitrit ise ürat ile temizlenmiştir. Ürat peroksinitrite özgün olmamakla birlikte peroksinitritin neden olduğu luminol sinyallerini hemen hemen tamamen inhibe ettiğinden, peroksitin temizlenmesinde oldukça etkindir.

LDH yüksekliği organizmada doku yıkımının varlığını gösteren önemli bir ölçüttür. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında da SGOT ve SGPT'ye göre daha yüksek düzeyde artma gösterdiğinden, deneysel çalışmalarda doku yıkımının önemli bir göstergesi olarak kullanılmaktadır⁷⁴. Bu çalışmada sham grubunda laparatominin LDH düzeylerinde anlamlı bir fark yaratmadığı bulunmuştur. Oysaki reperfüzyon sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin sitotoksik etkisine bağlı olarak LDH düzeylerinde anlamlı bir yükselme gözlenmiştir. Reperfüzyonun neden olduğu doku yıkımı serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılmasıyla anlamlı olarak azalmıştır. Bu azalma en etkin olarak peroksinitritin ürat ile temizlenmesi ile elde edilmiştir. Bu bulgu ile peroksinitritin karaciğer reperfüzyon hasarında en önemli rolü oynadığı ileri sürülebilir. NO ve süperoksit radikali iskemi ve reperfüzyon hasarında uzun zamandan beri suçlanan en önemli ürünlerdir, ancak her iki maddeninde inhibisyonu LDH düzeylerinin istenen seviyelere indirmemiştir. Bu hem peroksinitritin başka kaynaklarını olduğunu (diğer radikaller ve hidrojen peroksit reaksiyonu) hemde antioksidan tedavi uygulamalarında asıl hedefin peroksinitriti yoketmek veya oluşumunu ek başka maddelerle engellemenin gerektiğini göstermektedir. Ürat ile antioksidan tedavinin reperfüzyon hasarına karşı koruyuculuğu tedavide önemli yer tutabilir.

Reperfüzyonun neden olduğu serbest radikal patlaması eşzamanlı olarak yapılan kemiluminometrik ölçümlerle de teyid edilmiştir. Kemiluminesans (KL) sinyallerinde reperfüzyon ile %220 oranında artış saptanmıştır. Reperfüzyon ile oluşan süperoksit radikali SOD+KAT ile temizlendiğinde KL sinyallerinde %89'luk bir inhibisyon oluşmuştur. Reperfüzyon ile NO oluşması spesifik indüklenebilir NOS inhibitörü olan L-NAME ile engellendiğinde ise KL sinyallerinde %78'lik bir inhibisyon olmuştur. Süperoksit ve NO'nun reaksiyon ürünü olan ve reperfüzyon sırasında oluştuğu bilinen peroksinitritin ürat ile temizlenmesi ise KL sinyallerinin hemen hemen tamamen yakını inhiye etmiştir (%94). Bu bulgulara dayanarak reperfüzyon ile oluşan serbest radikal miktarının sırasıyla peroksinitrit> süperoksit radikali> NO şeklinde olduğunu söylemek mümkündür. Peroksinitrit özellikle mitokondride elektron transport sistemini bozmaktadır. Mitokondri fonksiyonunu yitirince hücrenin enerji metabolizması durur ve hücre anaerobik siklus girer ve yeni radikaller oluşmasının ardında hücre ölümü gerçekleşir. Bu mekanizmada peroksinitritin süksinat dehidrogenaz ve ATPaz'ı inhiye ederek yaptığı gösterilmiştir. Karaciğer özellikle Fe ve birçok elementten zengin birr organdır. Fe'n katalizörlüğünde peroksinitrit NO ve süperoksit radikali dışında diğerr radikallerden de oluşmaktadır. Bu karaciğerde oldukça fazla miktarda olamktadır, bizim sonuçlarımızda bunu göstermektedir.

SONUÇ:

Karaciğer cerrahisinde portal klempli girişimin kalitesi ve komplikasyonların önlenmesi açısından vazgeçilemez bir uygulamadır. Gerçek anlamda bir iskemi ve reperfüzyon modeli olan bu uygulama sonucunda tam mekanizmasının ortaya konulamadığı bir doku hasarı ve buna bağlı bir çok metabolik değişimler gözlenmektedir. Karaciğer iskemisi sonucu oluşan doku yıkımı, lökosit infiltrasyonu, endotel hasarı, kan akımının azalmasına bağlı artan NO düzeyi ile bir oksidatif stress oluşmakta ve serbest oksijen radikalleri ortaya çıkmaktadır. Serbest radikallerde en çok suçlanan NO ve süperoksit radikali karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında suçlanmaktadır. Ancak peroksinitritin varlığı ile bu hasar daha sorunlu hale gelmektedir. Bu çalışmada süperoksit radikali SOD ve katalaz ile, NO L-NAME ile inhibe edilmesine rağmen karaciğer hasarı önlenememiştir. LDH düzeyleri istenilen düzeylere inmemiş ve yeni bir sorun meydana gelmiştir. Bu iki radikal inhibe edilmesine rağmen hasar devam etmekte ve peroksinitrit düzeyleri yüksek bulunmaktadır. Peroksinitrit NO ve süperoksit radikali dışında başka radikallerde oluşmakta ve hücre içinde sentezlendiğinden hücre içine giremeyen SOD ve katalaz ile inhibe edilememektedir. Peroksinitritin ürik asit ile inhibe edilmesi sonucu karaciğer hasarından korunabilmesi ve LDH düzeylerinin anlamlı biçimde düşmesi peroksinitritin NO ve süperoksit radikalinden daha önemli bir rol üstlendiğini göstermektedir. Peroksinitrit bir çok toksik reaksiyona neden olmaktadır. Karaciğer parankim ve Kupffer hücreleride bundan etkilenerek hem fonksiyonlarını hem de rejenerasyon yeteneklerini yitirmektedirler. Sirotik karaciğerlerde peroksinitrit düzeylerinin yüksek bulunması, viral hepatit oluşturulan

deney hayvanlarında peroksinitritin yüksek düzeylerde bulunması özellikle sirotik karaciğerlerde iskeminin ne kadar ciddi sorunlara neden olduğunu açıklamaktadır. Portal klemp uygulaması özellikle sirotik karaciğerlerde daha çok ihtiyaç duyulan bir uygulamadır. Sirotik karaciğerler başta olmak üzere özellikle portal klemp süresinin ve rezeksiyon boyutunun artması karaciğer yetmezliğine ve birçok metabolik soruna (aritmî, hepatorenal sendrom) neden olmaktadır. Bu çalışmada karaciğer iskemi reperfüzyon hasarında oluşan radikallerde peroksinitritin en önemli rolü üstlendiği görüşüne vardık . Özellikle klinik çalışmalarda anrioksidan tedavi uygulamalarında ve deneysel çalışmalarda etki mekanizmalarının sorgulanmasında peroksinitrit üzerinde durulması ileride riskli hastalarda çok daha rahat karaciğer cerrahisi uygulamamıza yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR:

- 1- MacIntosh, EL, Minuk, GY. Hepatic resection in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Surgery, Gyn and Obstet* 174:245-54,1992.
- 2- Müller, MJ, Vollmar, B, Friedl, H, Menger, MD. Xantine oxidase and superoxide radicals in portal triad crossclamping-induced microvascular reperfusion injury of liver. *Free Rad. Biol. Med.* 21: 189-197, 1996.
- 3- Granger DN, Rutilli G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 81:22,1981.
- 4- McCord, J.M., I. Fridovich. Superoxide dismutase, an enzymic function for erythrocyte peroxidase. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-55, 1969.
- 5- Moro, M.A., Darley-Usmar, V.M., Goodwin, D.A., Read, N.G., Zamoro-Pino, R., Feelisch, M., Moncada, S. Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 6702-6, 1994.
- 6- McCord, J.M., I. Fridovich. Utility of superoxid dismutase in studying free radical reactions. *J. Biol. Chem.* 244: 6056-63, 1969.
- 7- Gutteridge, J.M.C.. Biological origin of free radicals and mechanisms of antioxidant protection. *Chem.-Biol. Interact.* 91:133-40,1994.
- 8- Reilly, P. M., Schiller, H. J., Bulkley, G. B.. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radical and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* 161:488-503,1991.
- 9- Ischiropoulos, H., Al-Mehdi, A.B., Fisher, A.B.. Reactive species in ischemic rat lung injury: contribution of peroxynitrite. *Am. J. Physiol.* 269(Lung Cell Mol. Physiol. 13):L158-64,1995.
- 10- Villa, L.M., Salas, E., Darley-Usmar, V.M., Radomski, M.W., Moncada, S. Peroxynitrite induces both vasodilation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 12383-7, 1994.
- 11- Deby, C., Goutier, R. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and efficiency of superoxide dismutases. *Biochem. Pharmacol.* 39: 399-405, 1990.
- 12- Maxwell S. R. J.. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49(3):346-61,1995.
- 13- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., O'Connor, M., Salzman, A. L., Caputi, A. P., Szabo, C.. Role

- of peroxynitrite and activation of poly (ADP-ribose) synthetase in the vascular failure induced by zymosan-activated plasma. *Br. J. Pharmacol.* 122: 493-503; 1997.
- 14- Szabo, C., Saunders, C., O'Connor, M., Salzman, A. L.. Peroxynitrite causes energy depletion and increases permeability via activation of poly (ADP-ribose) synthetase in pulmonary epithelial cells. *J. Respir. cell Mol. Biol.* 16: 105-9; 1997.
 - 15- Holley, A. E., Cheeseman, K. H.. Measuring free radical in vivo. *Br. Med. Bull.* 49:494-505,1993.
 - 16- Tosaki, A., Bagchi, D., Pali, T., Cordis, G.A., Das, D.K.. Comparisons of ESR and HPLC methods for the detection of $\text{OH}^\bullet$ radicals in ischemic/reperfused hearts. *Biochem. Pharm.* 45: 961-9,1993.
 - 17- Konorev, E.A., Joseph, J., Kalyanaraman, B.. S-Nitrosoglutathione formation of nitrosylmyoglobin in isolated hearts during cardioplegic ischemia-an electron spin resonance study. *FEBS Letters* 378:111-4,1996.
 - 18- Henry, T.D., Archer, S. L., Nelson, D., Weir, E. K., From A.H.L.. Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion. *Circ. Res.* 67:1453-61,1990.
 - 19- Beckman, J.S., Beckman, T.W., J. Chen, P.A. Marshall, B.A. Freeman. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1620-4, 1990
 - 20- Kooy, N.W., Royall, J.A.. Agonist-induced peroxynitrite production from endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophysics* 310(2): 352-9, 1994.
 - 21- Kooy, N. W., Royall, J. A.. Agonist-induced peroxynitrite production from endothelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 310(2): 352-9; 1994.
 - 22- Ischiropoulos, H., Zhu, L., Beckman, J.S. Peroxynitrite formation from macrophage- derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 446-51, 1992.
 - 23- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., Freeman, B.A.. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J. Biological Chem.* 269(42): 26066-75, 1994.
 - 24- Beckman, J.S., Crow, J.P.. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem. Soc. Transact.* 21: 330-4, 1993.
 - 25- Nunoshiba, T., de Rojas-Walker, T., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R., Demple B.. Activaton by nitric oxide of oxidative-stress reponse that defends Echerichia Coli against activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9993-7; 1993.
 - 26- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K., Freeman, B.A. Peroxynitrite-induced lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and niric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 481-7, 1991.

- 27- Colby, H.D., Larson, I.W., Kowalski, C., Levitt, M. Zonal differences in adrenocortical lipid peroxidation: role of α tocopherol. *Free Rad. Biol. Med.* 2: 373-6, 1995.
- 28- Hogg, N., Darley-USmar, V., Wilson, M. T., Moncada, S.. The oxidation of α -tocopherol in human low-density lipoprotein by the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *FEBS Letters* 326: 199-203; 1993.
- 29- Groot, H., Hegi, U., Sies, H.. Loss of α -tocopherol upon exposure to nitric oxide or the synonymine SIN-1. *FEBS Letters* 315 (2): 139-42; 1993.
- 30- Haddad, I.Y., Crow, J.P., Ye, H.Y., Beckman, J.S., Malaton, S. Concurrent generation of nitric oxide and superoxide damages surfactant protein A. *Am. J. Physiol.* 267: L242-9, 1994.
- 31- Watts, B.P., Jr., Barnard, M., Turrens, J.F.. Peroxynitrite-dependent chemiluminescence of amino acids, proteins, and intact cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 317(2): 324-30, 1995.
- 32- Graham, A., Hogg, N., Kalyanaraman, B., O'Leary, V., Darley-USmar, V.. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Letters* 330 (2): 181-5; 1993.
- 33- Van der Vliet, A., Eiserich, J. P., O'Neill, C.A., Halliwell, B., Cross, C.E. Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch. Biochem. Biophys.* 317: 341-9, 1995.
- 34- Bartlett, D., Church, D.F., Bounds, P.L., Koppenol, W.H. The kinetics of the oxidation of L-ascorbic acid by peroxynitrite. *Free Radical Biol. Med.* 18: 85-92, 1995.
- 35- Haddad, I.Y., Pataki, G., Hu, P., Galliani, C., Beckman, J.S., Malaton, S. Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J.Clin. Invest.* 94: 2407-13, 1994.
- 36- Kooy, N.W., Royall, J.A., Ye, Y.Z., Kelly, D.R., Beckman, J.S. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151: 1250-4, 1995.
- 37- Fukuyama, N., Takebayashi, Y., Ishida, H., Ichimori, K., Nakazawa, H.. Clinical evidence of peroxynitrite formation in chronic renal failure patients with septic shock. *Free Rad. Biol. Med.* 22(5): 771-4; 1997.
- 38- White, C.R., Brock, T.A., Chang, L., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., Bradley, W.A., Gianturco, S.H., Gore, J., Freeman, B.A. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 1044-8, 1994.
- 39- Swain, J.A., Darley-USmar, V., Gutteridge, M.C.. Peroxynitrite releases copper from caeruloplasmin: implications for atherosclerosis. *FEBS Letters* 342: 49-52; 1994.
- 40- Radi, R., Rodriguez, M., Castro, L., Telleri, R. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 89-95, 1994.

- 41- Boota A., Zar H., Kim Y-M., Johnson B., Pitt B., Davies P.. IL-1 β stimulates superoxide and delayed peroxynitrite production b pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 271(Lung Cell. Mol. Physiol. 15):L932-8,1996.
- 42- Pryor, W.A., Squadrito, G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 268: L699-722, 1995
- 43- Lizosoain, I., Moro, M. A., Knowles, R. G., Darley-USmar, V., Moncada, S.. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem. J.* 314: 877-80; 1996.
- 44- Thomson, L., Trujillo, M., Telleri, R., Radi, Rafael.. Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: Implication for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 319(2): 491-7, 1995.
- 45- Packer, M. A., Porteus, C. M., Murphy, M. P.. Superoxide production by mitochondria in the presence of nitric oxide forms peroxynitrite. *Biochem. Molecular Biology International.* 40(3): 527-34; 1996.
- 46- Sies, H., de Groot, H.. Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol. Letters* 64/65: 547-51; 1992.
- 47- Packer M.A., Murphy, M.P.. Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. *FEBS Letters* 345: 237-40; 1994.
- 48- Richter, C..Reactive oxygen and nitrogen species regulate mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and respiration. *Bioscience Reports* 17(1): 53-66; 1997.
- 49- Denicola, A., Rubbo, H., Rodriguez, D., Radi, R. Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Arch. Biochem. Biophys.* 304: 279-86,1993.
- 50- Zingarelli, B., Cuzzocrea, S., Zsengeller, Z., Salzman, A. L., Szabo, C.. Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase. *Cardiovasc. Res.* 36: 205-15; 1997.
- 51- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Caputi, A. P.. Peroxynitrite-mediated DNA strand breakage activates poly(ADP-ribose) synthetase and causes cellular energy depletion in a nonseptic model induced by zymosan in the rat. *Shock* 9(5): 336-40; 1998.
- 52- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Costantino, G., Szabo, A., Caputi A. P., Szabo, C.. Benefical effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *Br. J. Pharmacol.* 121: 1065-74; 1997.
- 53- Cuzzocrea, S., Costantino, G., Caputi A.P.. Protective effects of melatonin on cellular energy depletion mediated by peroxynitrite and poly (ADP-ribose) synthetase activation in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. *J. Pineal Res.* 24: - ; 1998.
- 54- Szabo, C., Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., O'connor, M., Salzman, A. L.. Endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock.Importance of the activation of poly (ADP-

- ribose) synthetase by peroxynitrite. *J. Clin. Invest.* 100(3): 723-35; 1997.
- 55- Uchigata, Y., Yamamoto, H., Nagai, H., Okamoto, H.. Effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. *Diabetes* 32(4): 316-8; 1983.
 - 56- Miesel, R., Sanocka, D., Kurpisz, M., Kröger, H.. Antiinflammatory effects of NADPH oxidase inhibitors. *Inflammation* 19(3): 347-62; 1995.
 - 57- Kröger H; Miesel R; Dietrich A; Ohde M; Rajnavölgyi E; Ockenfels H Synergistic effects of thalidomide and poly (ADP-ribose) polymerase inhibition on type II collagen-induced arthritis in mice. *Inflammation* 20(2): 203-15; 1996.
 - 58- Liu, S., Beckman, J.S., Ku, D. Peroxynitrite, a product of superoxide and nitric oxide, produces coronary vasorelaxation in dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268: 1114-21, 1993.
 - 59- Kooy, N. W., Royall, J. A., Lewis, S. J.. Peroxynitrite is a vasorelaxant which attenuates catecholamine hemodynamic responses *in vivo*. *Biology of nitric oxide.*, Part 5, eds. J. Stamler, S. Gross, S. Moncada and A. E. Higgs (Portland press, London) p.208
 - 60- Wu, M., Pritchard, K.A., Kaminski, P.M., Fayngersh R.P., Hintze, T.H., Wolin, M.S.. Involment of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am.J. Physiol.* 266: H2108-13, 1994.
 - 61- Wu, M., Pritchard, K. A., Kaminski, JR P. M., Fayngersh, R. A., Hintze, T. H., Wolin, M. S.. Involvement of nitric oxide and nitrosothiols in relaxation of pulmonary arteries to peroxynitrite. *Am. J. Physiol.* 266(35): H2108-13; 1994.
 - 62- Moro, M.A., Darley-Usmar, V.M., Lizasoain, I., Su, Y., Knowles, R.G., Radomski, M.W., Moncada, S.. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *Br. J. Pharmacol.* 116: 1999-2004, 1995.
 - 63- Wei, E.P., Kontos, H.A., Beckman J.S.. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Am J. Physiol.* 271 (Heart Circ. Physiol. 40):H1262-66, 1996.
 - 64- Mondoro, T. H., Shafer, B. C., Vostal, J. G.. Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets. *Free Rad. Biol. Med.* 22(6): 1055-63; 1997.
 - 65- Kondo, H., Takahashi, M., Niki, E.. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. *FEBS Letters* 413: 236-8; 1997.
 - 66- Lefer, D. J., Scalla, R., Champbeli, B., Nossuli, T., Hayward, R., Salamon, M., Grayson, J., Lefer, A. M.. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Clin. Invest.* 99(4): 684-91; 1997.
 - 67- Ma, T.T., Ischropoulos, H., Brass, C.A. Endotoxin-stimulated nitric oxide production increases injury and reduces rat liver chemiluminescence during reperfusion. *Gastroent.* 108: 463-9, 1995.

- against ischemia-reperfusion injury in rats. *J. Clin. Invest.* 99(4): 684-91; 1997.
- 67- Ma, T.T., Ischiropoulos, H., Brass, C.A. Endotoxin-stimulated nitric oxide production increases injury and reduces rat liver chemiluminescence during reperfusion. *Gastroent.* 108: 463-9, 1995.
- 68- Haddad, I.Y., Ischiropoulos, H., Holm, B.A., Beckman, J.S., Baker, J.R., Malaton, S. Mechanisms of peroxynitrite-induced injury to pulmonary surfactants. *Am J. Physiol.* 265: L 555-64, 1993
- 69- Shu, Z, Jung, M, Beger, H, Marzing, M, Han, F, Butzer, U, Bruckner, U, Nussler, AK. PH-dependent changes of nitric oxide, peroxynitrite and reactive oxygen species in hepatocellular damage. *Am J Physiol.* 273 (Gastrointest. Liver Physiol. 36):G1118-1126, 1997.
- 70- Ruiz, F, Corrales, FJ, Miqueo, C, Mato, JM. Nitric oxide inactivates rat hepatic methionine adenosyltransferase in vivo by S-Nitrosylation. *Hepatology* 28.(4):1051-1057, 1998.
- 71- Müller, MJ, Vollmar, B, Friedl HP, Menger MD. Xanthine oxidase and superoxide radicals in portal triad crossclamping-induced microvascular reperfusion injury of the liver. *Free Rad. Biol. Med.* 21(2):189-197, 1996.
- 72- Dhar, KD, Yamanoi A, Ohnori H, Nakashima Y, Yamamoto A, Osama NE, Kubota H, Nagasue N. Modulation of endothelin and nitric oxide : A rational approach to improve canine hepatic microcirculation. *Hepatology* 28(3):782-788, 1998.
- 73- Ozaki M, Fuchinoue S, Teraoka S, Ota K. The in vivo cytoprotection of ascorbic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Arch. Bioch. Biophys.* 318(2):439-445, 1995.
- 74- Zar HA, Tanigawa K, Kim MY, Lancaster JR. Rat liver lipid peroxydation and vasoconstriction depend on ischemia time. *Free Rad. Biol. Med.* 25(3): 255-264, 1998.
- 75- Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br. Med. Bull.* 49(3):700-718, 1993.
- 76- Slavikova, H., Lojek, A., Hamar, J., Duskova, M., Kubala, L., Vondracck, J., Ciz, M.. Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. *Free Rad. Biol. Med.* 25(1): 9-18; 1998.
- 77- Cuzzocrea, S., Zingarelli, B., Villari, D., Caputi, A. P., Longo, G.: Evidence for in vivo peroxynitrite production in human chronic hepatitis. *Life Sci.* 63 (2): 25-30; 1998.