T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

LİPOPOLİSAKKARİT İLE UYARILMIŞ DENEYSEL SEPSİS MODELİNDE RATLARA UYGULANAN LİPOİK ASİDİN; ESER ELEMENT, SİTOKİN VE NİTROTİROZİN PROFİLLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI.

Proje No: TSA-08-590
Proje Türü: Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Yrd.Doç.Dr. Behzat Çimen
Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Araştırmacılar:
Doç.Dr.Esma Kaya
Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Prof.Dr.Hatice Özbilge
Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğr.Gör.Dr.Recep Saraymen
Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Prof.Dr.İlhan Demirhan
Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
Prof.Dr.İbrahim Narin
Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı

Temmuz 2013
KAYSERİ

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi BAP koordinasyon birimi tarafından TSA-08-590 nolu araştırma projesi olarak desteklenmiştir

TEŞEKKÜR

Bu projenin gerçekleştirilmesinde maddi yardımları sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine, çalışmanın sitokin kısmında yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Esma Kaya ve Prof.Dr.Hatice Özbilgeye, projenin eser element kısmının çalışıldığı Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma Merkezine, çalışmanın eser element kısmında yardımcı olan Dr. Fatma Kılıç Dokan ve Dr. Recep Saraymen'e, çalışmanın HPLC aşamasında yardımcı olan öğrencilerim Esra Çeviker, Leyla Çimen ve Edanaz Kökçöl'e, istatistik aşamasında yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.Ferhan Elmalı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yrd.Doç.Dr.Behzat Çimen

Proje yürütücüsü

İÇİNDEKİLER:

ÖZET……... 5

ABSTRACT…… 6

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM…….. 7

GENEL BİLGİLER……... 8

GEREÇ VE YÖNTEM…….. 14

BULGULAR……... 20

TARTIŞME VE SONUÇ……... 28

KAYNAKLAR……... 32

ÖZET:

Bu çalışmada LPS enfeksiyonlarıyla oluşan kan dokusu hasarı üzerinde peroksinitritin olası rolünü inceledik ve lipoik asidin bu hasar üzerine etkilerini araştırdık. Bu amaçla ratlara 20mg / kg dozda ip olarak LPS enjekte edildi ve enjeksiyondan 6 saat sonra kan serumları alınarak analitik çalışmalar için – saklandı.

Peroksinitrit aracılıklı doku hasarının bir göstergesi olan serum 3-NT seviyeleri HPLC yöntemiyle tayin edildi. Sitokinler (TNF-α, IL-1β) ELISA da ölçüldü. Ayrıca bu parametreler üzerine lipoik asidin koruyucu etkisi araştırıldı. Serum eser elementleri (Mg, Fe, Cu, Zn, Mn) ise ICP-MS de ölçüldü.

LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra kontrollere göre sitokinlerin önemli derecede arttığı gözlendi. Lipoik asit uygulaması LPS enjekte edilen ratlarda sitokinleri önemli derecede azalttı. Sitokin oluşumu sadece LPS grubu hayvanlarda gözlendi.

Kontrol grubu hayvanların serumunda 3-NT gözlenemedi fakat LPS'ye maruz bırakılan hayvanlarda bu seviye önemli derecede arttı. Lipoik asit verilmesinden sonra 3-NT seviyesi yine gözlenemedi.

Ayrıca bu çalışmada, serum eser element düzeyleri ve gruplar arasında anlamlı bir fark tesbit edemedik.

LPS aracılıklı enfeksiyonların, iNOS aracılıklı 3-NT üretimi ve sitokin düzeyindeki artmaya neden olduğunu bulgularımız göstermektedir. Bu değişiklikler bir peroksinitrit aracılıklı hasarı göstermektedir. Sonuçlarımız, peroksinitrit aracıkılı doku hasarını lipoik asidin etkili bir şekilde önlediğini göstermektedir.

ABSTRACT:

In this study, we investigated the possible role of peroxynitrite on the blood damage induced LPS infection and evaluated the effects of lipoic acid on this damage. For this purpose, LPS at a dosage 20 mg/kg was injected to rats intraperitoneally, and 6 hous after injection blood-serum were isolated and stored at – for analytic studies.

Serum levels of 3-nitrotyrosine (3-NT), which is a marker of peroxynitrite-induced tissue injury, were measured by a spesific HPLC method. Cytokines (TNF-α, IL-1β) were also measured by ELISA. In addition, the effects of lipoic acid as protective on these parameters were investigated. Trace elements of serum (Mg, Fe, Cu, Zn, Mn) were measured by ICP-MS.

6 hours after LPS injection increased cytokines has been observed compared to controls. Treatment with lipoic acid significantly prevented the increase cytokines in LPS injected rats. Cytokine production only was observed in the LPS group of animals.

3-NT was not detectable in serum of control animals, but markedly increased in LPS exposed animals. After the administraton of lipoic acid, 3-NT level was not detectable.

However in this study, we could not detect a significant difference between the groups and the serum levels of trace elements.

Our results demonstrated that LPS-induced infections resulted in increased iNOS-mediated 3-NT production and cytokin levels. These alterations may suggest that peroxynitrite-mediated injury is effectively prevented by lipoic acid.

GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Bu çalışma, lipopolisakkarit ile uyarılan deneysel sepsis modelinde; serum eser element düzeyleri, sitokin düzeyleri ile nitrotirozin oluşumu arasındaki ilişkiyi araştırmak ve lipoik asit uygulamasının etkilerini incelemek için tasarlanmıştır. Bu modelde eser element, sitokin ve nitrotirozin düzeyleri üzerine etkilerini aydınlatmak ve lipoik asidin, enfeksiyon seyrini hangi yönde etkilediği ve ölçülen parametrelerde ne tür değişiklik yaptığı araştırmamız içinde yer almıştır. Bu amaçla, deneysel olarak LPS-indüksiyonu bir grup ratlarda oluşturuldu. Yine bir grup ratlarada da bir seri lipoik asit uygulaması sonrası LPS indüksiyonu yapıldı. Çalışmada; LPS-indüklü streslerde oluşan serbest oksijen radikalleri ve özellikle de $ONOO^-$ oluşumu ile ratlarda oluşan oksidatif hasarda, disfonksiyonların patogenezinde altta yatan hücresel mekanizmaları daha iyi anlayabilmeyi ve oluşan değişiklikleri lipoik asidin hangi oranda düzeltip düzeltmediğini aydınlatmayı amaçladık.

İnflamasyon periyodu esnasında, serbest radikal aracılıklı bir çok değişiklikler meydana gelmektedir. Bu değişikliklerden genel bilgiler kısmında anlatıldığı üzere bir çok önemli fonksiyonlara sahip olan eser elementlerin nasıl etkileneceği de araştırmamız konusu içinde yer almıştır.

Bakteriyal enfeksiyonlara ve serbest radikal oluşumuna bağlı bir çok hastalıklar bulunmaktadır. Örneğin güçlü bir oksidan olan peroksinitritin sorumlu tutulduğu bazı hastalıklar şunlardır: Ateroskleroz, Sporadik inclusion-body miyoziti, Romatoid artrit, İnflammatuar barsak hastalığı, Nörodejeneratif hastalıklar, Akut inflamasyon, Karbon monoksit zehirlenmesi, Erişkin resperatuar distres sendromu, Deri inflamasyonu, Gastrit (H Pylori), Kistik fibrozis, Endotoksik şok, Yaşlanma, Viral enfeksiyon, DM, Alzheimer, AIDS, Periodontal hastalıklar.

Bizim yaptığımız LPS ile uyarılan deneysel sepsis modelinde de peroksinitrit oluşmaktadır. Nitrotirozin oluşumu da peroksinitrit oluşumunun bir markırıdır. Serbest radikal aracılıklı da olan bu kadar çok hastalığın bulunması ve bunların etki mekanizmalarının aydınlatılması ve tedavi yöntemlerinin araştırılması önem arz etmektedir. Bu nedenle tüm bu etkilerin yaptığı bazı değişiklikleri inceleyerek (eser element, sitokin, nitrotirozin) ve lipoik asidin düzeltici etkisinin olup olmadığını araştırarak literatüre katkıda bulunmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

LPS, septisemi esnasında gram-negatif bakteriyel hücre duvarından salgılanan bir bileşimdir ve insanlarda septik şokun majör bir sebebidir. LPS, sitokinlerin ve $NO^{\cdot}$ nun sentez ve salınımını başlatır. $NO^{\cdot}$ ürünlerindeki artışa major katkı sağlayan unsur, LPS tarafından sitümüle edilen iNOS'un ekspresyonudur (1).

Gram negatif bakteri duvar ürünü olan LPS, bakterilerle enfeksiyon esnasında konakçıda görülen patolojik olaylardan sorumludur. Dolaşımdaki LPS nötropeni, ateş, şok, plazma proteinleri modifikasyonu ve pıhtılaşma bozukluklarına sebep olurken; dokuda yoğun nötrofil infltrasyonu ile karakterize edilen akut yangısal cevaba yol açar. LPS; IL-1, TNF-α, IFN-α, β ve ϒ gibi sitokin sentezinin indüklenmesine sebep olur. IL-1, LPS'ye biyolojik cevapların; örneğin ateş ve akut faz reaksiyonlarının mediatörüdür. Nötrofil göçü de IL-1 aracılığı ile uyarılmaktadır. Schwartzman olayının (dokularda lokal pıhtılaşmalar ve kanama ile karakterize bir olaydır) anti TNF-α ve anti IFN-ϒ antikorları ile önlenebilmesi, bu olaydaki LPS mediatörlerinin bu sitokinler olduğunu göstermektedir (2).

LPS, renal kan akım hızı ya da sistemik kan basıncının düşmesiyle birlikte organ hasarına sebep olmaktadır. Ayrıca akciğer, karaciğer ve böbrekte $O_2^{-\cdot}$ gibi reaktif oksijen türlerinin sentezine de neden olmaktadır. LPS'ye cevap olarak karaciger, akciger ve böbrekte $O_2^{-\cdot}$ oluşumu uyarılmaktadır (1).

LPS uygulaması dokularda 3-NT seviyesini artırmakta, GSH seviyelerini azaltarak lipid peroksidasyon ürünlerinin artışına sebep olmaktadır. LPS uygulamasını takiben altıncı saatte bu oksidan stresin işaretleri görülmektedir (1).

Sepsis; yüksek reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerinin artması ile beraber TNF-α, IL-1β ve IFN-ϒ gibi inflammatuar sitokinlerin üretimi ile karakterize edilmiş olan infeksiyona bir cevaptır. LPS ya da bakteriyal infeksiyon oluşturulan sepsisde, hepatik hücreler tarafından TNF-α, IFN-ϒ, iNOS ve ICAM-1'i de kapsayan birçok önemli inflammatuar mediatörler ekspre edilirler (3).

IFN-ϒ gen ekspresyonuna sebep olan LPS'nin sıçan hepatik iNOS mRNA'sının da indüksiyonuna sebep olduğu ve ayrıca *E.coli* bakterisine maruz kalmış sıçanlarda IFN-ϒ'nın öldürücü derecede arttığı bildirilmektedir (3).

İmmunohistokimyasal ve biyokimyasal çalışmalardan elde edilen sonuçlar; inflamasyon ve şokta reaktif oksijen türlerinin oluşumunu göstermektedir. Reaktif oksijen türleri, toksik oksidatif reaksiyonların geniş bir aralığını başlatabilirler. Bunlar; lipid

peroksidasyonunun başlamasını, mitokondrial solunum zincirinin direkt inhibisyonunu, gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenazın inaktivasyonunu, membran Na-K ATPaz aktivitesinin inhibisyonu ile membran sodyum kanallarının inaktivasyonu ve proteinlerin diğer oksidatif modifikasyonlarını içine alır. Bütün bu toksisitelerin; inflamasyon ve şokun patofizyolojisinde rol oynadığı muhtemeldir (4).

İnflamasyon periyodu esnasında, fagositik hücreler bol miktarda $NO^{\cdot}$ ve diğer reaktif oksijen türleri oluştururlar (5).

$NO^{\cdot}$ ve $O_2^{\cdot -}$ gibi oksijen radikallerinin çeşitli enfeksiyon hastalıklarının patogenezinde anahtar molekül olduğunu birçok çalışmalar göstermektedir. Örneğin; $NO^{\cdot}$ biyosentezi, özelliklle iNOS'un ekspresyonu ile mikrobial enfeksiyonların birçok çeşidinde meydana gelir. iNOS uzun mikrobial enfeksiyon periyodunda $NO^{\cdot}$ nun aşırı miktarını üretebilir ve bu da $O_2^{\cdot -}$ ile $NO^{\cdot}$'nun radikal birleşme reasiyonu ile $ONOO^-$ ve yüksek derecede reaktif nitrojen oksit türlerinin oluşumunu sağlar (6).

İnflamasyon esnasında $NO^{\cdot}$ oluşumu ile $ONOO^-$ oluşturulmaktadır. İnflamasyon şartlarında $ONOO^-$'in rolü ve oluşumu direkt ölçümler tarafından güçlü bir şekilde desteklenmektedir. Örneğin artritlerde plazma ve sinovial sıvıda nitrotirozin seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. İleitis ve endotoksin indüklü intestinal inflamasyonda $ONOO^-$ ürününün artmasından kaynaklanan artmış nitrotirozin immünoreaktivitesi mevcuttur. Kolitler'de de $ONOO^-$'in üretimi olduğu söylenebilir (4).

$ONOO^-$ ve reaktif türler; DNA hasarı, protein denatürasyonu ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu kapsayan etkiler yoluyla nekrozis ve hücresel hasar oluştururlar (4).

Diabetlerde plazma antioksidan güç azalmakta ve $O_2^{\cdot -}$ ile $NO^{\cdot}$ artmasına bağlı olarak $ONOO^-$ artmaktadır. Diabetik hastalarda yüksek plazma glukoz konsantrasyonu $ONOO^-$ aşırı üretimine sebep olmaktadır (7). Farklı mekanizmalarda da olsa, enfeksiyonlarda oluşan radikallerin diabette de oluştuğunu gösteren ilginç bir çalışmadır.

iNOS, TNF-α ve IFN-Υ gibi sitokinler tarafından indüklenir ve $NO^{\cdot}$'nun çok büyük miktarlarını oluşturabilmektedir. iNOS'un bu aşırı aktivitesi septik şok, hemorrojik şok ve hepatit gibi akut ve kronik hastalıklarda görülmektedir (8).

İnflamasyon durumunda iNOS ekspre edilir. Endotelyum NOS ve beyin NOS'undan farklı olan iNOS yapısal olarak aktiftir ve regüle edilebilir. Makrofaj biyolojisi şartlarında tanımlanmış olan iNOS, sitokinlerin yüksek miktarlarda üretildiği yerlerde açıga çıkar. iNOS tarafından $NO^{\cdot}$ sentezi, $O_2^{\cdot -}$ gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile eş zamanlı oluşmaktadır (5).

İnsanlardaki septik şokta iNOS aktivitesinin, infeksiyon bölgelerinde daha fazla olduğu buna paralel olarakda TNF-α ve IL-1β miktarının bu bölgelerde fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca endotoksik şok oluşturulan hayvan deneylerinde NOS'un indüklenebilir izoformunun aktivitesinin arttığı görülmektedir. NOS aktivitesinin indüksiyonu; LPS (endotoksin) aracılı şokta organlar arası farklılık göstermektedir. LPS ve diğer bakterial ürünlere (toksinlere,endotoksinlere vb.) cevap olarak IFN-γ direkt olarak iNOS'u sitümüle eder ve iNOS'un makrofaj ürünü olan NO·'yu artırır (9).

Bakteriyal enfeksiyonlarada iNOS indüklenmektedir. Enfeksiyon oluşumu için *E.coli* kullanılan bir çalışmada; sıçanlara deneysel üriner bölge enfeksiyonu uygulandıktan sonra belirli periyotlarda idrar örnekleri alınarak NO_2^- konsantrasyonları ölçülmek suretiyle, iNOS indüklü NO· oluşumunun artmasını, enfeksiyon sonrasında artan NO_2^- konsantrasyonu ile ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca iNOS aktivitesi immünokimyasal metodla ölçülerek, enfeksiyon uygulaması sonrasında arttığı gözlenmiştir (10).

Yapılan çalışmalarda endotoksemi sırasında sitokinlerin hem iNOS aktivitesi hem de akut faz reaktanların sentezini artırdığı ve iNOS aktivitesinin akut faz reaktanları tarafından paralel bir şekilde artırılarak regüle edildiğini bildirmişlerdir (11).

Eser elementler oldukça düşük konsantrasyonlarda vucudda var olup (12), çeşitli minör ve de majör elementler, çok sayıda biyolojik proseslerde önemli rol oynarlar (13). Eser elemntlerden bakır, demir, magnezyum, mangan ve çinko farklı biyokimyasal reaksiyonlarda önemli rolleri vardır. Bazı metalloenzimlerde kofaktör olarak bulunan bakır, normal selüler homeostazis, immün sistemin optimum fonksiyonu, kardiyovasküler, sinir sistemi ile iskelet fonksiyonu ve yapısı için yani optimal sağlığın korunması için gerekli bir elementtir (14). Çinko, hücre proliferasyonu ve gen transkripsiyonunu sitimüle etmesi dolayısıyla önemli bir hücresel faktördür. Diğer taraftan artmış hücresel çinko konsantrasyonu, tümör hücre çoğalmasına katkıda bulunur. Bakır ve çinko önemli antioksidan enzimlerin kofaktörü olarak görev yaparlar (15). Mağnezyum, ATP gerektiren tüm enzim katalizli reaksiyonlarda bir kofaktör olarak gereklidir. Ayrıca magnezyum DNA nın fosfat gruplarıyla da kombine olur, ancak histonlar tarafından tutulamaz, bundan dolayı DNA'nın kopyalanmasında önemli bir rol oynadığı ileri sürülmektedir (16). Mangan, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinlerin sentezinde önemli bir rol oynar. Bir grup enzimlerin aktivitesi için mangan gereklidir. Bu gerekliliğe rağmen mangan eksikliği oldukça nadirdir, bu durum muhtemelen çoğu reaksiyonlarda mağnezyumun, manganın yerine geçmesinden kaynaklanmaktadır (17). Fenton

reaksiyonunu sürdüren demirin +2 formudur ve Fe^{+2}'nin daha az reaktif Fe^{+3} formuna oksidasyonu bundan dolayı antioksidan bir etkidir (18,19).

Eser elementlerin yukarda anlatıldığı üzere önemli bir çok fonksiyonları bulanmakta olup akut inflamasyonda herhangi bir değişikliğe uğrayıp uğramadıkları ve değişim var ise hangi oranda oldukları, inflamasyon periyodundaki sitokin ve eser element profilindeki ön gördüğümüz değişikliklerin nasıl olacağını ve muhtemel nitrotirozin oluşumu ile ilişkilerini, özellikle bu değişikliklere lipoik asidin etkisini görmeyi amaçladık.

R.J. Erskine ve arkadaşları, Holstein ineklerde deneysel olarak *E.coli* indüklü mastitis oluşturmuşlar ve enfeksiyon esnasında alınan serum örneklerinde bakır, demir ve çinko düzeylerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, ortalama Zn, Fe ve Cu konsantrasyonlarında sırayla normale göre %28, %35 ve %52 oranında azalmalar tesbit etmişlerdir (20).

Mi Jeong Sung ve arkadaşları, ratlarda *E.coli* indüklü endotelyal Fractalkine ekspresyonunda, α-lipoik asidin koruyucu etkisini incelemişler ve sonuç olarak, TNF-α, IL-1β sitokinlerinin ve Fractalkine mRNA ekspresyonunun indükleme sonucu arttığını ancak bu durumu lipoik asidin baskıladığını göstermişlerdir (21).

Yılmaz ve arkadaşları kronik otoimmün bir hastalık olan sistemic lupus erythematosus'lu hastalarda serum çinko, bakır, mağnezyum, mangan ve demir elementleri düzeylerini incelemişler ve sonuç olarak, kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında SLE'li hastalarda serum çinko, magnezyum, mangan ve demir düzeyleri düşük iken bakır düzeylerini yüksek bulmuşlar ve belirli inflamasyon şartlarında meydana gelen bu değişikliğin izaha ihtiyaç olduğunu vurgulamışlardır (22).

Ann Van Compenhout ve arkadaşları kontrolere göre, diabetes mellutuslu hastalarda serum demirinin azaldığını, bazı akut faz rektanlarının arttığını ve antioksidan kapasitenin zayıfladığını göstermişler ve bu durumun diabetes mellutusdan kaynaklanan oksidatif stres durumu olduğunu göstermişlerdir (23).

Vilient ve arkadaşları (24), $ONOO^-$'in lipidleri oksidasyona uğrattığını, methionini okside ederek bu şekilde α1-antiproteinazı inaktive ettiğini, proteinlerdeki SH gruplarını okside ettiğini, antioksidanları azalttığını, DNA harabiyetine neden olduğunu, tirozini nitratlaştırdığını göstermişler ve bu etkilerin α-lipoik asit ve dihidrolipoik asit ile korunabileceğini göstermişlerdir.

Zingarelli ve arkadaşları (25), yaptıkları bir çalışmada, endotoksemik ratlardan elde edilen peritoneal makrofaj kültürlerinde bir saat içinde $O_2^{\cdot -}$, sekiz saat içinde de $NO^{\cdot}$ oluştuğunu ve bunlara paralel olarak $ONOO^-$'in arttığını, oluşan bu $ONOO^-$'in DNA zincir

kırılmalarına ve intrasellüler NAD^+'nin, mitokondrial solunumun ve dolayısıyla enerjinin azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada makrofaj kültürlerine, enerji harcayan bir enzim olan PARS ve iNOS inhibitörleri uygulanarak hücre NAD^+ ve ATP azalmasının önlendiği bildirilmiştir

Lıaudet ve arkadaşları (26), yaptıkları bir çalışmada, ıv olarak ratlara LPS uygulamışlar ve aynı ratlara bir saat sonra güçlü bir iNOS inhibitörü olan L-canavanin verilerek beşinci saatte karaciger, böbrek ve bağırsaklardan aldıkları biyopsi numulerinde doku ATP miktarını ölçmüşlerdir. Bu dokularda ATP miktarının belirgin bir şekilde azalmasının iNOS aktivasyonuna bağlı olduğunu göstererek, L-canavanin'in hücrede ATP azalmasını önlediğini bildirmişlerdir.

Çimen ve arkadaşları, guinea pig'lerde LPS-indüklü bakteriyal enfeksiyon oluşturup, bunun karacigerde iNOS'u aktivite ettiğini, bunun sonucu olarak da patolojik düzeylerde nitrotirozin oluştuğunu ve doku Na K ATPaz aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmayla, endotoksemide meydana gelen serbest radikal oluşum mekanizmasını vurgulamışlardır (27).

Çimen ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, akut endotokseminin serbest radikal aracılıklı böbrek enerji yükünü azalttığını ve böbrekte nitrotirozin düzeylerini artırdığını göstermişler ve LPS indüklü stresin ONOO oluşturduğunu vurgulamışlardır (28).

Tanaka ve arkadaşları (29), canlı *E.coli* suşuyla ratlarda yaptıkları bir çalışmada, subletal ve letal dozlarda *E.coli*'yi ıv olarak uygulamalarını takiben 3.6.12. ve 24. saatlerde kullanılan doza uygun olarak 6. ve 12. saatlerde karaciğer mitokondri ve sitoplazmik enerji miktarının azaldığını ve mitokondrial NAD/NADH oranının arttığını gözlemişlerdir. Araştırıcılar bu enerji azalmasını mitokondrial solunum zincirinin kısıtlanmasına bağlamışlardır.

Pedersen ve arkadaşları (30), ıv olarak canlı *E.coli* uyguladıkları ratlarda enjeksiyonu takiben 24.saatte karaciğer doku ATP, ADP ve AMP konsantrasyonlarını HPLC ile ölçerek enerji yükünün değişmediğini göstermişlerdir. Araştırıcılar ayrıca septik ratlarda karaciğer hemodinamik değişikliklerin ortaya çıktığını ve karaciğer doku kan akımının azaldığını kanıtlamışlardır. Ancak bu değişikliklerin doku enerji yükü ile ilişkili olmadığını göstermişlerdir.

Ottesen ve arkadaşları (31), biliyer sirozisli ratlara 0.5 mg/kg LPS enjekte ederek, enjeksiyonun ikinci saatinde LPS aracılıklı $ONOO^-$ oluşumunu kanıtlamak amacıyla, elde ettikleri karaciğerde 3-NT miktarını GC-Mass spektrometresi ve immünohistokimyasal olarak

ölçmüşlerdir. Bu ratlarda, kontrollere göre hepatik 3-NT seviyesinin 2-3 kat arttığını gözlemişlerdir.

Türközkan ve arkadaşları (32), eritrosit metabolizması üzerine $ONOO^-$'in etkisini in vivo ve in vitro şartlarda araştırmışlardır. İn vitro olarak, kobaylardan elde edilen eritrosit süspansiyonlarına sentez edilen $ONOO^-$ ilave edilmiş, in vivo olarak ise, ıp (intraperitonal) olarak 12× koloni oluşturan *E.coli* suşu uygulanmıştır. Her iki durumda da $ONOO^-$ oluşumu HPLC yöntemiyle 3-NT tayiniyle gösterilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇLER

Kullanılan Deney Hayvanları

Erciyes Üniversitesi DEKAM dan sağlanan ve ağırlıkları 200-270 g arasında değişen (ortalama 250g) erkek Wistar ratları bu çalışma için kullanıldı. Toplam 3 grup oluşturuldu ve her grupta 10 adet olmak üzere toplam 30 adet rat bu çalışmalarda kullanıldı.

Çalışmaya başlamadan önce, hayvanları herhangi bir enfeksiyondan korumak amacıyla ayrı bir yerde özel bakıma alındılar ve kesim işlemine kadar hayvanların diyetlerine ve sularına dikkat edildi.

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metanol (HPLC grade), siteril serum fizyolojik, α-Lipoik asit, sitrik asit, sodyum sitrat, sodyum asetat, triklorasetikasit, 3-nitro-L-tirozin, vs. Sigma firmasından; IL-1 beta-rat-kit/96 test, TNF-alfa-rat-kit/96 test Invitrogen firmasından, 20 mg/ml ksilazin HCl (20 ml'lik şişede) provet firmasından, 100 mg/ml ketamin HCl (10 ml'lik şişede) ege vet firmasından temin edilmiştir.

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

1-Yüksek basınçlı sıvı kromotografisi: Agilent 1100

HPLC elemanları:

Diode-array dedektör

Otomatik örnekleme sistemi

Pompa

Mikroişlemci

Kromatografi programı

Printer

2-Kolonlar

Analitik kolon: C_{18} hidrokarbon zincirine bağlı silika içeren, partikül büyüklüğü 5 μm olan, 4.6 x 250 mm boyutlarındaki Allsphere ODS-2 reverse-phase kolonu (Alltech, Deerfield, IL, USA)

*Koruyucu Kolon:*Analitik kolon ile enjektör modülü arasına koruyucu olarak; C_{18} hidrokarbon zincirine bağlı silika içeren, partikül büyüklüğü 5 μm olan, Spherisorb ODS-2 cartridge (Alltech, Deerfield, IL, USA)

3- Ultrasonik karıştırıcı (degaser)

4-Santrifüjler:

Masa üstü soğutmalı santrifüj

Masa üstü normal santrifüj

5- Millex-HV örnek süzme filtresi (sellüloz asetat 0.2 ve 0.45 μm)

6-Homojenizatör

7- Sonikatör (The Virtis Company-Vir Sonic 50)

8-pH metre

9- ICP-MS

10-ELISA

11-Vakum motoru ve süzme düzeneği

12- Kapaklı cam tüp (Hidroliz tüpleri)

13-Otomatik pipetler (Socorex,ABD), Terazi, Benmari, küvetler, ependorf tüpleri, sogutmalı santrifüj ve ultra santrifüj tüpleri, vorteks, enjektörler, cam malzemeler ve biyokimyasal analizler için gerekli olan diğer malzemeler.

YÖNTEMLER

Kontrol Grubu:

Enjeksiyonun uygulanması esnasında oluşan stres bazı biyokimyasal parametrelerin değişimine yol açabileceği düşüncesiyle, kontrol grubu hayvanlara da aynı stresi oluşturma amacıyla, steril serum fizyolojik ıp olarak enjekte edildi. Serum fizyolojik enjeksiyonundan 6 saat sonra hayvanlar ksilazin/ketamin anestezisi altında sakrifiye edilerek kanları alındı.

Deney Grubu (Lipolisakkarit):

Bu gruptaki hayvanlara, steril salinde hazırlanmış 20 mg/kg-ağırlık olacak şekilde lipopolisakkarit ıp olarak enjekte edildi (33). LPS enjeksiyonundan 6 saat sonra hayvanlar ksilazin/ketamin anestezisi altında sakrifiye edilerek kanları alındı (34).

Lipoik Asit Grubu:

Lipoik asidin antioksidan etkisini araştırmak amacıyla, bu gruptaki hayvanlara 10 mg/kg/gün olacak şekilde, 3 gün boyunca lipoik asit ıp olarak enjekte edildi (35). Lipoik asit enjeksiyonunun üçüncü günü sonunda, LPS ıp olarak enjekte edilip 6 saat sonra ksilazin/ketamin anestezisi altında hayvanlar sakrifiye edilerek kanları alındı (34,36).

Her üç gruptan da elde edilen kanların serumları ayrılıp biyokimyasal analizler için kullanıldı.

HPLC ile Nitrotirozin Analizi:

Serum örneklerindeki nitrotirozin analizleri için Çimen ve ark (27,28) ile Ünlü ve ark (37)'nın kullandığı HPLC yöntemi uygulandı:

Reaktiflerin Hazırlanması:

1- 3-nitro-L-tirozin standartları: 0.2-0.5-1-2-5-10 μM konsantrasyonlarında 0.01 N HCI içinde hazırlandı.

2- Mobil Faz: İçinde 50 mM NaOAc , 50 mM sitrik asit, % 8 saf metanol içerecek şekilde hazırlandı ve pH'sı 3.1'e ayarlandı. Hazırlanan mobil faz daha sonra 0.45 μm'lik selülöz asetat filtreden süzülerek degaze edildi.

3- Asit hidroliz reaktifleri: Serumların asit hidroliz işlemleri için % 10'luk TCA, 6 N HCI, 6 N NaOH hazırlandı.

4- Potasyum-Fosfat tamponu: 50 mM olacak şekilde K_2HPO_4 ve KH_2PO_4'den pH'sı 7.4'e ayarlanarak hazırlandı.

HPLC Sistem Parametreleri ve Çalışma Koşulları:

Ölçüme geçmeden önce HPLC cihazı 3- Nitrotirozin çalışma koşullarına ayarlandı. Bu çalışma koşulları aşağıdaki tabloda gösterildiği şekilde yapıldı. Bu çalışma koşulları saptanırken optimum mobil faz konsantrasyonu ve pH'sı, optimum akım hızı, optimum çalışma süresi dikkate alınarak ayarlanmıştır.

Tablo 1: 3-NT çalışması için HPLC sistemine ait çalışma koşulları ve sistem parametreleri

Çalışma Koşulu	**Sistem Parametreleri**
HPLC Modeli	Agilent 1200
Dedektör	Diode Array Dedector
Mobil Faz	%8 Metanol içeren 50 mmol/L NaOAc / 50 mmol/L sitrat tampon, pH:3.1
Analitik Kolon	4.6 x 250 mm, Allsphere ODS-2, C_{18} 5 μm reverse-phase kolon
Koruyucu Kolon	Spherisorb ODS-2, C_{18} 5 μm reverse-phase cartridge
Dalga boyu	274 nm
Akım Hızı	1.0 mL/dakika
Örnek Hacmi	70 μL
Çalışma Süresi	15 dakika
Ayırım (Elution)	Ters (reverse) faz iyon değişimi (ion exchange)

Standart 3-Nitrotirozin Ölçümleri:

0.01 N HCI içinde hazırlanan 0.2-0.5-1-2-5-10 μM konsantrasyonlarındaki 3-nitrotirozin standartları 0.45 μm'lik selülöz asetat filtreden süzüldü.Her bir standart otosampler ile HPLC sistemine veridikten sonra, pikin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı.Standart çalışmalardan elde edilen pik alanları esas alınarak, regresyon analizi yapılarak 3-NT standart eğrisi çizildi. Elde edilen standart 3-NT değerlerine göre, numunelerin pik alanlarından 3-NT konsantrasyonları hesaplandı.

Numunelerin 3-Nitrotirozin Ölçümüne Hazırlanması:

Elde edilen serum numunelerine asit hidroliz işlemleri aşagıdaki şekilde uygulandı:

Bu işlem için 0.3 ml serum alındı ve proteinleri çöktürmek için üzerine eşit miktarda % 10 TCA eklenerek vortekslendi. Karışım 3000 rpm de 5 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatan atılarak geriye kalan protein içeren çökelti alındı. Çökeltiye hidroliz amacıyla 1 ml 6 N HCI eklenerek, hidrolizin tüm protein içeriginde gerçekleşmesi ve asidin nufuz alanını artırmak amacıyla sonikasyon yapıldı. Numuneler; sonikasyon işleminden sonra özel hidroliz tüplerine alındı. Asidin sıvı-buhar dengesini sağlamak amacıyla hidroliz tüplerinin havası alınarak sıkıca kapatıldı. Daha sonra etüvde 90-. 18-24 saat bekletilen hidroliz tüpleri alınarak su altında soğutuldu. Numunelere nötralizasyon amacıyla 1 ml 6 N NaOH eklenerek 3000 rpm de 10 dk. santrifüj edildi. Daha sonra üstteki temiz fazdan alınan numuneler 0.45μm'lik selülöz asatat filtreden süzülerek otosampler aracılığı ile HPLC sistemine verildi.

Serumlarda 3-NT miktar hesabı:

HPLC de elde edilen standart 3-NT değerlerine göre, numunelerin pik alanlarından numune 3-NT konsantrasyonları olarak elde edilmektedir.

ELISA ile Sitokin Analizi:

Serumda IL-1β ve TNF-α proinflammatuar sitokinleri ELISA cihazında (Synergy HT, Biotek) ölçülmüştür. Bu ölçümde rat için hazırlanmış olan IL-1 beta-rat-kit/96 test, TNF-alfa-rat-kit/96 test kitleri (Invitrogen firmasının ticari ELISA kitleri) kullanılmıştır. Ölçümler, kit prospektüsü uygulanarak yapılmıştır.

ICP-MS İle Eser Element Analizi:

Serum örneklerindeki eser metal iyonlarının tayinleri (Zn, Mg, Fe, Mn, ve Cu) ICP-MS ile yapıldı. Yöntem, Isabel De Blas Bravo ve ark.(38), Jean-Pierre Goulle´ve ark (39) ile Berghof Company (Germany) (40)'nin tanımladığı işlemler uygulanarak yapıldı. Buna göre final çalışma şartları aşağıdaki tablolarda görüldüğü gibi yapıldı:

Tablo 2. ICP-MS Agilent 7500a için optimum çalışma şartları

Parameter	Value	Units
RF power	1230	W
RF matching	1.7	V
Smpl depth	7.6	mm
Torch-	-1.2	mm
Torch-V	0.8	mm
Carrier gas	1.11	L/min
Make up gas	0.00	L/min
Nebulizer pump	0.11	Rps
S/Ctemp	2	deg
İnternal standarts (,,,)		

Tablo 3. Ölçüm parametreleri

Nebulizer	0.11 rps
Spray chamber temperature	
RF generator	1220 W
Ar flow rate (L/min)	15L/min
Auxiliary gas flow rate (L/min)	0.9 L/min
Nebuliser gas flow rate (L/min)	1,11 L/min
Sample uptake rate(µL/min)(speed)	0,3 rps
Number of replicates	3
Integration time (s)	3s
Internal standards	Be,Sc,RhBi (200 ppb)

Sonuçların İstatistiksel Analizi

Veriler IBM SPSS Statistics 21 ve SigmaStat 3.5 istatistik paket programlarında değerlendirildi. Verilerin özet istatistikleri normal dağılım gösterenler için ort ± std sapma şeklinde normal dağılım göstermeyenler için de medyan (min-max) değerleri olarak verildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun değerlendirilmesinde Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Gruplar Kruskal-Wallis Analizi ile değerlendirildi. Çoklu karşılaştırma testi olarak parametrik olmayan Student-Newman-Keuls testi kullanıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

NİTROTİROZİN ÖLÇÜMÜ

Serum Numunelerine Ait 3-Nitrotirozin Ölçüm Sonuçları:

Serum numunelerine ait nitrotirozin ölçüm sonuçları (μmol / L)			
Örnek no	**Kontrol grubu**	**LPS grubu**	**Lipoik asit grubu**
1	Tesbit edilemedi	2,76	Tesbit edilemedi
2	Tesbit edilemedi	2,64	Tesbit edilemedi
3	Tesbit edilemedi	2,88	Tesbit edilemedi
4	Tesbit edilemedi	2,66	Tesbit edilemedi
5	Tesbit edilemedi	2,71	Tesbit edilemedi
6	Tesbit edilemedi	2,67	Tesbit edilemedi
7	Tesbit edilemedi	2,85	Tesbit edilemedi
8	Tesbit edilemedi	2,64	Tesbit edilemedi
9	Tesbit edilemedi	2,92	Tesbit edilemedi
10	Tesbit edilemedi	2,60	Tesbit edilemedi
LPS grup: Mean ± SD: 2,733 ± 0,1134			

SİTOKİNLERİN ÖLÇÜMÜ

TNF-alfa Ölçüm Sonuçları:

Serum numunelerine ait TNF-alfa ölçüm sonuçları (pg / ml)			
Örnek no	**Kontrol grubu**	**LPS grubu**	**Lipoik asit grubu**
1	Tesbit edilemedi	29,8	Tesbit edilemedi
2	Tesbit edilemedi	52,8	Tesbit edilemedi
3	Tesbit edilemedi	79,8	Tesbit edilemedi
4	Tesbit edilemedi	114,2	Tesbit edilemedi
5	Tesbit edilemedi	34	Tesbit edilemedi
6	Tesbit edilemedi	12,1	Tesbit edilemedi
7	Tesbit edilemedi	11,2	Tesbit edilemedi
8	Tesbit edilemedi	22,2	Tesbit edilemedi
9	Tesbit edilemedi	13,4	Tesbit edilemedi
10	Tesbit edilemedi	Tesbit edilemedi	Tesbit edilemedi
LPS grup: Max: 114,20, Min: 11,20 Median: 29,80			

IL-1-beta Ölçüm Sonuçları:

Serum numunelerine ait IL-1-beta ölçüm sonuçları (pg / ml)			
Örnek no	**Kontrol grubu**	**LPS grubu**	**Lipoik asit grubu**
1	Tesbit edilemedi	23,2	Tesbit edilemedi
2	Tesbit edilemedi	48,8	Tesbit edilemedi
3	Tesbit edilemedi	245,2	Tesbit edilemedi
4	Tesbit edilemedi	133,8	Tesbit edilemedi
5	Tesbit edilemedi	76,8	Tesbit edilemedi
6	Tesbit edilemedi	45,1	Tesbit edilemedi
7	Tesbit edilemedi	10,3	Tesbit edilemedi
8	Tesbit edilemedi	64,8	Tesbit edilemedi
9	Tesbit edilemedi	30,4	Tesbit edilemedi
10	Tesbit edilemedi	Tesbit edilemedi	Tesbit edilemedi
LPS grup: Max: 245,20, Min: 10,30 Median: 48,80			

ESER ELEMENT ANALİZLERİ ÖLÇÜMÜ

Magnezyum Ölçüm Sonuçları:

Serum numunelerine ait magnezyum ölçüm sonuçları (ppm)			
Örnek no	**Kontrol grubu**	**LPS grubu**	**Lipoik asit grubu**
1	28,335	26,0977	22,0454
2	13,848	27,3727	47,7939
3	6,360	34,1852	26,5363
4	6,360	50,4963	25,6939
5	14,060	39,7954	34,3939
6	16,885	32,2563	20,0454
7	11,910	27,6763	17,3954
8	33,385	50,2163	31,4204
9	31,698	21,1163	23,9704
10	11,023	25,6163	27,3204

Mangan Ölçüm Sonuçları:

Serum numunelerine ait mangan ölçüm sonuçları (ppm)			
Örnek no	**Kontrol grubu**	**LPS grubu**	**Lipoik asit grubu**
1	0,020	0,0066	<1.008E-04
2	0,020	0,0385	0,0476
3	0,038	0,0393	0,0600
4	0,038	<1.008E-04	<1.008E-04
5	<1.008E-04	0,0055	<1.008E-04
6	<1.008E-04	<1.008E-04	<1.008E-04
7	<1.008E-04	0,0101	<1.008E-04
8	<1.008E-04	0,0036	<1.008E-04
9	<1.008E-04	<1.008E-04	<1.008E-04
10	<1.008E-04	0,0087	<1.008E-04

Demir Ölçüm Sonuçları:

Serum numunelerine ait demir ölçüm sonuçları (ppm)			
Örnek no	**Kontrol grubu**	**LPS grubu**	**Lipoik asit grubu**
1	2,579	9,0265	3,1505
2	2,338	10,0303	7,1773
3	2,944	17,8853	4,0824
4	2,944	10,1804	11,1707
5	2,085	17,9655	5,9640
6	2,500	5,9224	8,9680
7	2,093	10,3964	6,9805
8	2,992	8,3064	11,0605
9	2,219	7,9384	12,9830
10	1,575	7,0184	6,1180

Bakır Ölçüm Sonuçları:

Serum numunelerine ait bakır ölçüm sonuçları (ppm)			
Örnek no	**Kontrol grubu**	**LPS grubu**	**Lipoik asit grubu**
1	0,026	0,0947	0,3449
2	0,001	0,0237	<0.001
3	<0.001	0,0937	<0.001
4	<0.001	<0.001	<0.001
5	<0.001	<0.001	<0.001
6	0,080	<0.001	<0.001
7	0,016	<0.001	<0.001
8	0,108	<0.001	<0.001
9	0,102	<0.001	<0.001
10	0,172	<0.001	<0.001

Çinko Ölçüm Sonuçları:

Serum numunelerine ait çinko ölçüm sonuçları (ppm)			
Örnek no	**Kontrol grubu**	**LPS grubu**	**Lipoik asit grubu**
1	<0.0005	<0.0005	<0.0005
2	<0.0005	<0.0005	<0.0005
3	<0.0005	<0.0005	<0.0005
4	<0.0005	<0.0005	<0.0005
5	<0.0005	<0.0005	<0.0005
6	<0.0005	<0.0005	<0.0005
7	<0.0005	<0.0005	<0.0005
8	<0.0005	<0.0005	<0.0005
9	<0.0005	<0.0005	<0.0005
10	<0.0005	<0.0005	<0.0005

Tüm Grup ve Parametrelerin Analiz Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi:

Statistics

grup			mg	mn	fe	cu
K	N	Valid	10	10	10	10
		Missing	0	0	0	0
	Mean		17,3864	,0236	2,4269	,0508000
	Median		13,9540	,0200	2,4190	,0210000
	Std. Deviation		10,10023	,00759	,45800	,06071939
	Minimum		6,36	,02	1,58	,00100
	Maximum		33,39	,04	2,99	,17200
	Percentiles	25	9,8573	,0200	2,0910	,0010000
		50	13,9540	,0200	2,4190	,0210000
		75	29,1758	,0245	2,9440	,1035000
L	N	Valid	10	10	10	10
		Missing	0	0	0	0
	Mean		33,4829	,0123	10,4670	,0219100
	Median		29,9663	,0061	9,5284	,0010000
	Std. Deviation		10,28330	,01420	4,17958	,03875276
	Minimum		21,12	,00	5,92	,00100
	Maximum		50,50	,04	17,97	,09470
	Percentiles	25	25,9774	,0036	7,7084	,0010000
		50	29,9663	,0061	9,5284	,0010000
		75	42,4006	,0172	12,2686	,0412000
E	N	Valid	10	10	10	10
		Missing	0	0	0	0
	Mean		27,6615	,0488	7,7655	,0353900
	Median		26,1151	,0476	7,0789	,0010000
	Std. Deviation		8,68322	,00392	3,21293	,10875073
	Minimum		17,40	,05	3,15	,00100
	Maximum		47,79	,06	12,98	,34490
	Percentiles	25	21,5454	,0476	5,4936	,0010000
		50	26,1151	,0476	7,0789	,0010000
		75	32,1638	,0476	11,0880	,0010000

Statistics

		lps TNF	lps IL	lps NT
N	Valid	9	9	10
	Missing	1	1	0
Mean		41,0556	75,3778	2,7330
Median		29,8000	48,8000	2,6900
Std. Deviation		35,38323	73,28917	,11344
Minimum		11,20	10,30	2,60
Maximum		114,20	245,20	2,92
Percentiles	25	12,7500	26,8000	2,6400
	50	29,8000	48,8000	2,6900
	75	66,3000	105,3000	2,8575

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 in Notebook 1

Dependent Variable: **MG**

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
K	10	0	13,954	11,023	28,335
L	10	0	29,966	26,098	39,795
E	10	0	26,115	22,045	31,420

H = 8,629 with 2 degrees of freedom. (P = 0,013)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,013)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,05
L vs K	115,000	4,131	Yes
L vs E	47,000	2,512	No
E vs K	68,000	3,635	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Çarşamba, Temmuz 03, 2013, 14:09:33

Data source: Data 1 in Notebook 1

Dependent Variable: **MN**

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
K	10	0	0,0200	0,0200	0,0200
L	10	0	0,00605	0,00360	0,0101
E	10	0	0,0476	0,0476	0,0476

H = 22,766 with 2 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,05
E vs L	180,000	6,466	Yes
E vs K	120,000	6,414	Yes
K vs L	60,000	3,207	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Çarşamba, Temmuz 03, 2013, 14:10:32

Data source: Data 1 in Notebook 1

Dependent Variable: **FE**

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
K	10	0	2,419	2,093	2,944
L	10	0	9,528	7,938	10,396
E	10	0	7,079	5,964	11,060

H = 20,105 with 2 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,05
L vs K	167,000	5,999	Yes
L vs E	34,000	1,817	No
E vs K	133,000	7,109	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Çarşamba, Temmuz 03, 2013, 14:11:03

Data source: Data 1 in Notebook 1

Dependent Variable: **CU**

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
K	10	0	0,0210	0,001000	0,102
L	10	0	0,001000	0,001000	0,0237
E	10	0	0,001000	0,001000	0,001000

H = 4,624 with 2 degrees of freedom. (P = 0,099)

The differences in the median values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,099)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Enfeksiyon sırasında karaciğerde gözlenen metabolik değişiklikler, bu hücrelerde bol miktarda oluşan $NO^{\cdot}$ ve $O_2^{-\cdot}$'e bağlanmaktadır (41). $NO^{\cdot}$, NOS enzimlerinin kataliziyle L-arjinin'den oluşur. Çeşitli sitokinler ve LPS'ler, karaciğer ve diğer hücrelerde iNOS indüklenmesine neden olarak fazla miktarda $NO^{\cdot}$ Oluşturmaktadırlar (8, 9,42). $NO^{\cdot}$'nun $O_2^{-\cdot}$'e karşı olan yakın ilgisi $NO^{\cdot}$'ya göre çok daha güçlü bir oksidan olan $ONOO^{-}$'i oluşturur. Birçok hastalığın patolojisi $NO^{\cdot}$'dan ziyade $ONOO^{-}$'in sitotoksisitesi ile açıklanmaktadır (11, 41, 43, 44, 45, 46).

Biz bu deneysel çalışmada, ratlara ıp olarak LPS uyguladıktan 6 saat sonra iNOS'un kontrollere göre arttığını gözledik. Çünkü, kontrol ve deney hayvanlarına ait nitrotirozin ve sitokin sonuçları bunu doğrulamaktadır. Biz çalışmamızda LPS enjeksiyonundan 6 saat sonraki iNOS indüksiyonundan kaynaklanan nitrotirozin ve sitokin değerlerini ölçtük. Çünkü bu konuda çalışan diğer araştırıcılar, karaciğer ve diğer dokularda iNOS indüksiyonunun LPS enjeksiyonundan sonraki 6. saatde maksimuma ulaştığını, 12 saatten sonra hızla düştüğünü, 18 ve 24. saatlerde kontrol değerlere ulaştığını göstermişlerdir(34, 47).

Geller ve arkadaşları (11) yaptıkları in vivo ve in vitro çalışmalarda LPS uygulamasını takiben hepatosit iNOS ekspresyonu ve aktivitesinin paralel bir şekilde arttığını rapor etmişlerdir. Bu araştırıcılar, in vivo iNOS mRNA'sının 6. saatte maksimum seviyeye ulaştığını, sonra hızla düştüğünü, 18-48. saatlerde karaciğer iNOS mRNA'sının aynı kontrol rat hepatositlerinde olduğu gibi gözlenemediğini rapor etmişlerdir.

Diğer bazı araştırıcılar da yine ratlara ıp olarak E.coli uygulanmasından 6 saat sonra elde ettikleri karaciğer homojenatlarında, safra kanalı epitelinde, hepatositlerde güçlü bir iNOS indüksiyonu gözlemişlerdir (44).

İnsan ve hayvan modeliyle yapılan bir çalışma; akut hepatit, siroz ve kronik hepatit gibi hepatik inflammasyon içeren patolojik şartların, karaciğerde aşırı $NO^{\cdot}$ üretimine ve artmış iNOS indüksiyonuna neden olduğunu ortaya koymuştur (45).

Çalışmamızda; iNOS aktivasyonu sonucu oluşması beklenen $ONOO^{-}$'i, onun markırı olan 3-NT miktarını HPLC yöntemiyle ölçerek gösterdik. Sonuçlarımız diğer çalışmacıların bulgularına uygunluk gösterdi. Çünkü $ONOO^{-}$ aracılıklı doku harabiyetlerinde $ONOO^{-}$'in direkt ölçümü, onun çok kısa bir yaşam süresine sahip olması nedeniyle 3-NT'nin değişik yöntemlerle ölçümü yoluyla gözlenebilmektedir (31, 48, 49, 50).

Güçlü bir oksidan olan $ONOO^-$'in önemli reaksiyonlarından biri de tirozinin orto pozisyonunda nitratlaşması ve 3-NT oluşturmasıdır. Stabil ve son ürün olan 3-NT ölçümü $ONOO^-$ aracılıklı doku harabiyetinin tanısında markır olarak kullanılmaktadır (31, 48, 49, 50).

3-NT ölçümü için değişik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak araştırıcılar en iyi ve hassas yöntemin HPLC olduğunu savunmaktadırlar (51, 52, 53).

Biz, kontrol grubuna ait serum numunelerinde tayin edilebilir 3-NT seviyesini gözleyemedik ve bunu UV dedektör kullanımına bağladık. Eğer nmol/L ve pmol/L seviyelerini yakalayan elektrokimyasal dedektör kullansaydık gözlenebilir bir miktarda 3-NT tesbit edebilirmiydik diye düşünerek, bu konuyla ilgili literatür taramaları yaptık.Yaptığımız literatür taramalarında Monzon (48) ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmaya rastladık. Bu araştırıcılar histolojik olarak normal kabul edilen karaciğer numunelerinde 3-NT'yi tüm yöntemlerle ölçmüşler, ya çok eser miktarda veya hiç bulamadıklarını bildirmişlerdir. Bu yönüyle de kontrol gruplarında 3-NT'yi tesbit edemeyişimiz bu araştırmacıların yaptıkları sonuçlarla uygunluk göstermektedir. Ayrıca bu araştırıcılar; 3-NT miktarının, viral karaciğer hastalıklarında hastalığın patojenisitesiyle paralel bir şekilde iNOS ekspresyonu ile birlikte önemli derecede arttığını gözlemişlerdir (48).

Bian ve Murad'ın (49) ratlarda yaptıkları bir çalışmada, LPS uygulamasının 24 saat sonrasında, hepatositlerde yogun bir 3-NT boyanmasını immünohistokimyasal yöntemle tesbit etmişlerdir. Ayrıca westen blood analiziyle endotoksemili karaciğerlerde LPS uygulamasından 24 saat sonra iNOS ekspresyonu gözlenmediğini bildirmişlerdir.

Araştırıcılar, LPS uygulamasından sonraki harabiyetin derecesini LPS nin konsantrasyonuna, $NO^{\cdot}$ ve diğer reaktif türlerin bölgesel oluşumu gibi multipl faktörlere bağlı olduğunu söylemektedirler (44).

Ottesen ve arkadaşları (31), endotoksemiden 2 saat sonra bilier sirozlu ratlarda, hepatik 3-NT'nin orta derecede artışını değişik yöntemlerle göstermişlerdir. Ancak bu artışın siroz sonucu mu, yoksa endotoksemi sonucu mu olduğu açık değildir.

Diğer bazı araştırıcılara göre $ONOO^-$ glikolitik yol, krebs döngüsü ve elektron transport zincirini direkt olarak inhibe etmekte ve hücre enerji miktarını azaltmaktadır (4).

Çalışmamızın ikinci amacı; lipoik asidin iNOS ekspresyonundan kaynaklanan 3-NT oluşumu ve sitokin indüksiyonu üzerine etkisini incelemek ve bu antioksidanın düzeltme kapasitesini ölçmektir. Lipoik asidi koruyucu amaçla, etkisinin olup olmadığını araştırmak için kullandık.

Koruyucu amaçla kullandığımız lipoik asidin, iNOS ekspresyonundan kaynaklanan nitrotirozin ve sitokinler üzerine etkili olduğunu ve LPS'li grupta artan bu indüklenmeyi önemli oranda düşürdüğünü gözledik.

Dugo ve arkadaşları (55) makrofaj kültürleri ile yaptıkları bir çalışmada artan iNOS'un aktivitesine paralel olarak, $NO^{\cdot}$ üretiminin de arttığını gözlemişlerdir. Ancak, melatonin kullanımından sonra iNOS aktivitesinin doza bağımlı bir şekilde azaldığını ve hücrede $ONOO^{-}$ aracılıklı mitokondrial solunum zincirinin düzeldiğini, NAD^{+} miktarının azalmadığını ve PARS aktivasyonunun inhibe olduğunu tesbit etmişlerdir.

Rodriguez ve arkadaşları (56) rat karaciğer iskemi-reperfüzyon modellerinde melatoninin iNOS'u inhibe ederek, $NO^{\cdot}$ oluşumunu inhibe ettiğini, solunum zincirini koruyarak ATP depolarını sürdürdüğünü rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar, iNOS mRNA analizi yapmışlar ve iNOS mRNA ekspresyonunun melatoninin ile inhibe edildiğini tesbit etmişlerdir.

Yapılan başka bir araştırmada LPS'nin oluşturduğu akut ve kronik inflammasyon hayvan modellerinde melatoninin, antiinflammatuar etki gösterdiği savunulmuştur (57).

Biz de bu çalışmamızda; kullandığımız lipoik asidin iNOS aktivitesini inhibe ettiğini bu yüzden ONOO oluşamadığını ve dolayısıylada nitrotirozin tesbit edilemediğini; ayrıca iNOS aktivitesinin lipoik asitle inhibisyonu nedeniyle proinflammatuar sitokinlerin ekspre edilemediğini ve bu sonuçlarımızdan dolayı da lipoik asidin yukardaki bahsedilen çalışmalarda olduğu gibi melatonin benzeri güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğunu ifade edebiliriz.

Çalışmalarımızda lipoik asidin de melatoninde olduğu gibi, LPS uygulanan deney grubunda 3-NT oluşumunu engellediğini gözledik. iNOS aktivasyonunun lipoik asit ile inhibe olması sonucu $ONOO^{-}$'in oluşamaması, 3-NT oluşumunu engellemektedir.

Araştırıcılar LPS uygulamalarında, azalan enerji depolarının ancak 12. saatten sonra artmaya başlayacağını, 24. saatte kontrol değerlere ulaşacağını yaptıkları ölçümlerle kanıtlamışlardır (29, 30). Biz de bundan dolayı tüm ölçümlerimizi, iNOS aktivitesinin maksimuma ulaştığı 6. saatde yaptık.

Ayrıca bu çalışmada; LPS uygulaması ve koruyucu amaçla lipoik asidin kullanılması, serum eser element miktarı ve enfeksiyon arasında gözle görülebilir ciddi bir ilişki vermedi.

Sonuç olarak;

Lipoik asidin LPS ile indüklenen enfeksiyonlarından sonra iNOS'u inhibe ettiğini ve bu nedenle de 3-NT oluşumunu ve proinflammatuar sitokinlerin ekspresyonunu engellediğini,

ancak enfeksiyon ve serum eser element miktarı arasında kaydedeğer bir değişikliğin olmadığını bu çalışmada gösterdik.

Lipoik asidin ise enfeksiyonda iNOS oluşumunu dolayısı ile ONOO oluşumunu ve 3-NT oluşumunu ve TNF-alfa ve IL-1beta sitokinlerinin ekspresyonunu baskıladığını in vivo şartlarda gösterdik. Bu nedenle LPS indüklü bakteriyal enfeksiyonlarında $ONOO^-$ aracılıklı harabiyetlerin tedavisinde kullanılabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. ZHANG, C., WALKER, L.M., MAYEUX, P.R.: Role of Nitric Oxide in Lipopolysacchride-Induced Oxidant Stress in the Rat Kidney, Biochem. Pharmacol., 59, 203-9 (2000)

2. BILLOW, A.: Not Just Cachestin Involved in Toxic Shock, Nature., 331, 665 (1998)

3. PARMELY, M.J., WANG, F., WRIGHT, D.: Gamma Interferon Prevents the Inhibitory Effects of Oxidative Stress on Host Responses to *Escherichia coli* Infection, Infect. Immun., 69, 2621-9 (2001)

4. CUZZOCREA, S., REITER, R.J.: Pharmacological Action of Melatonin in Shock, İnflammation and Ischemia/Reperfusion İnjury, Eur. J. Pharm., 426, 1-10 (2001)

5. HENSLEY, K., WILLIAMSON, K.S., FLOYD, R.A.: Measurement of 3-Nitrotyrosine and 5-Nitro-γ-Tocopherol by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Dedection, Free Radic. Biol. Med., 28, 520-8 (2000)

6. AKAIKE, T., MAEDA, H.: Nitric Oxide and Virus Infection, Immunology., 101, 300-8 (2000)

7. CERIELLO, A., MERCURİ, F., QUAGLİARO, L., ASSALONİ, R., MOTZ, E., TONUTTI, L., TABOGA, C.: Detection of Nitrotyrosine in The Diabetic Plasma: Evidence of Oxidative Stress, Diabetologia., 44, 834-8 (2001)

8. SASS, G., KOERBER, K., BANG, R., GUEHRING, H., TIEGS G.: Inducible Nitric Oxide Synthase is Critical for Immune-Mediated Liver Injury in Mice, J. Clin. Invest., 107, 439-447 (2001)

9. ANNANE, D., SANQUER, S., SEBİLLE, V., FAYE, A., DJURANOVIC, D., RAPHAEL, J.C.: Compartmentalished Inducible Nitric Oxide Synthase Activity in Septic Shock, The Lancet., 355, 1143-48 (2000)

10. POLJAKOVIC, M., SVENSSON, M.L., SVANBORG, C., JOHANSSON, K., LARSSON, B., PERSSON, K.: *Escherichia coli*-Induced Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase Expression in the Mouse Bladder and Kidney, Kidney Int., 59, 893-904 (2001)

11. GELLER, D.A., FREESWICK, P.D., NGUYEN, D., NUSSLER, A.K., SİLVİO, M.D., SHAPİRO, R.A., WANG, S.C., SIMMONS, R.L., BİLLİAR, T.R.: Differential Induction of Nitric Oxide Synthase in Hepatocytes During Endotoxemia and the Acute-Phase Response, Arch. Surg., 129, 165-71 (1994)

12. VURAL H, UZUN K, UZ U, KOÇTİĞİT A, CİĞLİ A, AKYOL O. Concentrations of copper, zinc and various elements in serum of patients with bronchial asthma. J Trace Elem Med Biol**.** 14:88–91(2000)

13. DURAK I, KAVUTCU M, CANPOLAT O, IŞIK AU, AKYOL O Concentrations of some major and minor elements in larynx tissues with and without cancer. Bio Metal 7:45-48(1994)

14. TAYSİ S, GÜLÇİN I, SARI RA, KUSKAY S, BAKAN N. Trace elements and disease activity score in patients with rheumatoid arthritis. Pain Clin 15:435–439(2003)

15. MAGALOVA T, BELLA V, BRTKOVA A, BENO I, KUDLACKOVA M,
VOLKVOVA K. Copper, zinc and superoxide dismutase in precancerous, benign diseases and gastric, colorectal and breast cancer. Neoplasma 46:100–104(1999).

16. KOHLI GS, BHARGAVA A, GOEL H, YARDAV SPS, SAINI AS, SINGH
GP, LAL H. Serum magnesium levels in patients with head and neck cancer. Magnesium 8:77–86(1989).

17. APPS DK, COHEN BB, STEEL CM. Biochemistry concise text for medical students, 5th edn. Mackays of Chatham PLC, Chatham, p 412(1994).

18. YOUNG IS, WOODSIDE JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 54:176–186(2001).

19.ATANASIU RL, STEA D, MATEESCU MA et al. Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. Mol Cell Biochem 189:127–135(1998).

20. ERISKINE RJ, BARLETT PC. Serum concentrations of copper, iron and zinc during E.coli-induced mastitis. Journal of Dairy Science. 76:408-413. (1993).

21. SUNG MJ, KIM W, AHN SY, et al. Protective effect of α-lipoic acid in LPS-induced endothelial fractalkine expression. Circulation Research. 28:880-890.(2005).

22. YILMAZ A, SARI RA, GUNDOGDU M, et al. Trace elements and some extracellular antioxidant proteins levels in serum of patients with systemic lupus erythematosus. Clin Rheumatol. 24:331-335. (2005).

23. COMPENHOT AV, COMPENHOUT CV, LAGROU AR, et al. Impact of diabetes mellutus on the relationships between iron-inflammatory-and oxidative stres status. Diabetes metabolismResearch and Reviews.22:444-454. (2006).

24. VAN DER VLIET, A., O'NEILL, C.A., HALIIWELL, B., CROSS, C.E., KAUR, H.: Aromatic Hydroxylation and Nitration of Phenylalanine and Tyrosine by Peroxynitrite. Evidence for Hydroxyl Radical Production from Peroxynitrite, FEBS Lett., 339, 89-92 (1994)

25. ZİNGARELLİ, B., CONNOR, M.O., WONG, H., SALZMAN, A.L., SZABO, C.: Peroxynitrite Mediated DNA Strand Breakage Activates Poly-Adenosine Diphosphate Ribosyl Synthetase and Causes Cellular Energy Depletion in Macrophages Stimulated with Bacterial Lipopolysaccharide, J. Immunol., 156, 350-8 (1996)

26. LIAUDET, L., FISHMAN, D., MARKERT, M., PERRET,C., FEIHL, F.: L-Canavanine Improves Organ Function and Tissue Adenosine Triphosphate Levels in Rodent Endotoxemia, Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 155, 1643-8 (1997)

27. ÇİMEN B, TÜRKÖZKAN N, SEVEN I, et al. Impaired Na-K-ATPase activity as a mechanism of reactive nitrogen species induced cytotoxicity in guinea pig liver exposed to lipopolysaccharides. Molecular and Cellular Biochemistry.; 259(1-2):53-7.(2004).

28. ÇİMEN B, TÜRKÖZKAN N, ÜNLÜ A, ERBİL MK. Effects of Melatonin on 3-Nitrotyrosine Formation and Energy Charge in Rat Kidney in LPS-Induced Stress.
Cell Biochem Function.; 23(4):273-277.(2004).

29. TANAKA, J., SATO, T., KAMIYAMA, Y., JONES, R.T., COWLEY, R.A., TRUMP, BF.: Bacteremic Shock: Aspects of High-Energy Metabolism of Rat Liver following Living *Escherichia coli* Injection, J. Surg. Res., 33, 49-57 (1982)

30. PEDERSEN, P., SALJO, A., HASSELGREN, P.O.: Protein and Energy Metabolism in Liver Tissue Following Intravenous Infusion of Live *E. Coli* Bacteria in Rats, Circ. Shock., 21, 59-64 (1987)

31. OTTESEN, L.H., HARRY, D., FROST, M., DAVIES, S., KHAN, K., HALLIWELL, B., MOORE, K.: İncreased Formation of S-Nitrothiols and Nitrotyrosine in Cirrhotic Rats During Endotoxemia, Free Radic. Biol. Med., 31, 790-8 (2001)

32. TÜRKÖZKAN, N., ÜNLÜ, A., ERTABAK, A., ÇİMEN, B., KARABIÇAK, U.: The Effects of Peroxynitrite on Erythrocyte, Clin. Chem. Lab. Med.,39, 1263-6 (2001)

33. UEKI M, TAIE S, CHUJO K, et al. Urinary Trypsin Inhibitör Reduces Inflammatory Response in Kidney Induced by LPS. J Bioscience and Bioengineering. 104(4):315-320 (2007).

34. TOTH, I., HEARD, S.O.: Nitric Oxide does not Mediate Lipopolysaccharide-Induced Myocardial Depression in Guinea Pigs, Crit. Care Med., 25, 684-688 (1997)

35. SUNG MJ, KIM W, AHN SY, et al. Protective Effects α-Lipoic acide in LPS-Induced Endothelial Fractalkine Expression. Circulation Research. 97(9): 880-890 (2005).

36. VAN DER BERG, C., VAN AMSTERDAM, J.G.C., BISSCHOP, A., PIET, J.J., WEMER, J., DE WILDT, D.J.: Septic Shock: No Correlation Between Plasma Levels of Nitric Oxide Metabolites and Hypotension or Lethality, Eur. J. Pharmacol., 270, 379-382 (1994)

37. ÜNLÜ A, TÜRKÖZKAN N, ÇİMEN B, KARABIÇAK U, YAMAN H. The Effect of E.coli-derived Lipopolysaccharides on Plasma Levels of Malondialdehyde and 3-Nitrıtyrosine. Clin Chem Lab Med. 39(6):491-493 (2001).

38. ISABEL DE BLAS BRAVO, RAMO´N SANZ CASTRO, NATİVİDAD LO´PEZ RİQUELME, CONSUELO TORMO DI´AZ, DAVİD APRAİZ GOYENAGA. Optimization of the trace element determination by ICP-MS in human blood serum. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 21 (2007) S1, 14–17

39. JEAN-PİERRE GOULLE´ , LOI¨C MAHİEU, JULİEN CASTERMANT, NİCOLAS NEVEU, LAURENT BONNEAU, GİLBERT LAİNE´, DANİEL BOUİGE, CHRİSTİAN LACROİX. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair Reference values. Forensic Science International 153 (2005) 39–44

40. BERGHOF COMPANY (GERMANY), "Application report microwave pressure digestion speedwave food, pharma, cometics" prospectus. Microwave digestion of blood p 5.

41. SHU, Z., JUNG, M., BEGER, H.G., MARZINZIG, M., HAN, F., BUTZER, U., BRUCKNER, U.B., NUSSLER, A.K.: pH-Dependet Changes of Nitric Oxide, Peroxynitrite, and Reactive Oxygen Species in Hepatocellular Damage, Am. J. Physiol., 273, G1118-26. (1997).

42. KANG, B.H., CHEN, S.S., JOU, L.S., WENG, P.K., WANG, H.W.: Immunolocalization of Inducible Nitric Oxide Synthase and 3-Nitrotyrosine in the Nasal Mucoza of Patients with Rhinitis, Eur. Arch. Otorhinolaryngol., 257, 242-6. (2000).

43. MERCER, D.W., SMITH,G.S., CROSS, J.M., RUSSELL, D.H., CHANG, L., CACIOPPO, J.: Effects of Lipopolysaccharide on Intestinal Injury: Potential Role of Nitric Oxide and Lipid Peroxidation, J. Surg. Res., 63, 185-92. (1996).

44. VOS, T.A., GOUW A.S.H., KLOK, P.A., HAVINGA, R., GOOR, H.V., HUITEMA, S., ROELOFSEN, H., KUIPERS, F., JANSEN, P.L.M.: Differential Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitörs on Endotoxin-Induced Liver Damage in Rats, Gastroenterology., 113, 1323-33. (1997).

45. WATANABE, N., MIURA, S., ZEKI, S., ISHII, H.: Hepatocellular Oxidative DNA Injury Induced by Macrophage-Derived Nitric Oxide, Free Radic. Biol. Med., 30, 1019-28 (2001).

46. THIEMERMANN, C., RUETTEN, H., WU, C.C., VANE, J.R.: The Multiple Organ Dysfunction Syndrome Caused by Endotoxin in the Rat: Attenuation of Liver Dysfunction by İnhibitörs of Nitric Oxide Synthase, Br. J. Pharm., 116, 2845-51 (1995).

47. KNOWLES, R.G., MERRETT, M., SALTER, M., MONCADA, S.: Differential Induction of Brain, Lung and Liver Nitric Oxide Synthase by Endotoxin in The Rat, Biochem. J., 270, 833-6 (1990).

48. MONZON, C.G., MAJANO, P.L., ZUBIA, I., SANZ, P., APOLİNARİO, A., OTERO, R.M.: Intrahepatic Accumulation of Nitrotyrosine in Chronic Viral Hepatits is Associated with Histological Severity of Liver Disease, J. Hepatol.,32, 331-38 (2000).

49. BIAN, K., MURAD, F.: Diversity of Endotoxin-Induced Nitrotyrosine Formation in Macrophage-Endothelium-Rich Organs, Free Radic. Biol. Med., 31, 421-9 (2001).

50. GIRAULT, I., KARU, A.E., SCHAPER, M., HOFF, M.H.B., HAGEN, T., VOGEL, D.S., AMES, B.N., CHRISTEN, S., SHIGENAGA, M.K.: İmmunodedection of 3-Nitrotyrosine in the Liver of Zymosan-Treated Rats with a New Monoclonal Antibody: Comparison to Analysis by HPLC, Free Radic. Biol. Med., 31,1375-87 (2001).

51. VAN DER VLIET, A., EISERICH, J.P., KAUR, H., CROSS, C.E., HALLIWELL B.: Nitrotyrosine as Biomarker for Reactive Nitrogen Species, Method. Enzymol., 269,175-209 (1996).

52. VAN DER VLİET, A., SMITH, D., O'NEILL, C.A., KAUR, H., DARLEY-USMAR, V., CROSS, C.E., HALLIWELL, B.: Interaction of Peroxynitrite with Human Plasma and Its Constituents: Oxidative Damage and Antioxidant depletion, Biochem. J., 303, 295-301 (1994).

53. KAMISAKI, Y., WADA, K., NAKAMOTO, K., KISHIMOTO, Y., KITANO, M., ITOH, T.: Sensitive Determination of Nitrotyrosine in Human by High-Performance Liquid Chromatography, J. Chromatog. B., 685, 343-347 (1996).

54. MONZON, C.G., MAJANO, P.L., ZUBIA, I., SANZ, P., APOLİNARİO, A., OTERO, R.M.: Intrahepatic Accumulation of Nitrotyrosine in Chronic Viral Hepatits is Associated with Histological Severity of Liver Disease, J. Hepatol.,32, 331-38 (2000).

55. DUGO, L., SERRAINO, I., FULIA, F., DE SARRO, A., CAPUTİ, A.P., CUZZOCREA, S.: Effects of Melatonin on Cellular Energy Depletion Mediated by Peroxynitrite and Poly(ADP-Ribose) Synthetase Activation in an Acute Model of Inflammation, J. Pineal. Res., 31, 76-84 (2001).

56. REYNOSO, SR., LEAL, C., PORTILLA, E., OLIVARES, N., MUNIZ, J.: Effect of Exogenous Melatonin on Hepatic Energetic Status during Ischemia/Reperfusion: Possible Role of Tumor Necrosis Factor-α and Nitric Oxide, J. Surg. Res., 100, 141-9 (2001).

57. RAGHAVENDRA, V., AGREWALA, J.N., KULKARNI, S.K.: Melatonin Reversal of Lipopolysaccharides-Induced Thermal and Behavioral Hyperalgesia in Mice, Eur. J. Pharm., 395, 15-21 (2000).