

## Endotoksemik Sıçanların Karaciğerinde Artan Oksidatif Stres Üzerinde İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz İnhibisyonunun Etkisi

### The Effect of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibition on Increased Oxidative Stress in the Liver of Endotoxemic Rats

Seyhan ŞAHAN FIRAT<sup>1</sup>, Necmiye CANACANKATAN<sup>2</sup>, Belma KORKMAZ<sup>1</sup>, Hatice YILDIRIM<sup>3</sup>, Lülüfer TAMER<sup>3</sup>, A Nihal SARI<sup>1</sup>, Bahar TUNÇTAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Mersin

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

<sup>3</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

#### Özet

**Amaç:** Bu çalışmada, endotoksemik sıçanlardan izole edilen karaciğerde indüklenebilir nitrik oksit sentaz aracılığı ile oluşan nitrik oksitin oksidatif stres üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Erkek Wistar sıçanlara, kontrol grubuna serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.), endotoksik şok grubuna endotoksin (10 mg/kg, i.p.) ve diğer gruplara serum fizyolojik veya endotoksin injeksiyonundan bir saat sonra seçici indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea]dihydrobromide (10 mg/kg, i.p.) uygulanmasının ardından, dört saat süre ile kuyruktan ortalama arter basıncı ölçülmüştür. Deneyler sonunda öldürülen sıçanlardan izole edilen karaciğerlerde nitrik oksit oluşumunun bir göstergesi olarak nitrit, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olarak malondialdehit ve güçlü bir antioksidan molekül olarak indirgenmiş glutatyon düzeyleri ölçülmüştür. Antioksidan enzimlerden ise süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktiviteleri ve nötrofil infiltrasyonunun bir göstergesi olarak miyeloperoksidaz enzim aktivitesi ölçülmüştür.

**Bulgular:** Endotoksinin neden olduğu kan basıncındaki düşmenin karaciğer dokusunda nitrit düzeylerindeki anlamlı artmanın ( $p<0.05$ ), malondialdehit ve indirgenmiş glutatyon düzeyleri ile miyeloperoksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitelerinde anlamlı bir azalma ( $p<0.05$ ) ile birlikte olduğu gözlenmiştir. Endotoksinin kan basıncı ve karaciğer dokusunda ölçülen parametreler üzerindeki bütün etkileri 1,3-PBIT ile önlenmiştir ( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** Bu çalışma, endotoksemi sırasında indüklenebilir nitrik oksit sentaz aracılığı ile aşırı miktarda üretilen nitrik oksitin karaciğerde oluşan oksidatif strese katkıda bulunabileceğini ve değişmiş olan karaciğer antioksidan kapasitesinin indüklenebilir nitrik oksit sentazın inhibisyonu ile düzeltilebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Sözcükler:** endotoksemi, oksidatif stres, indüklenebilir nitrik oksit sentaz

*Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2008;1(3):28-35*

Geliş Tarihi : 28.11.2008

Kabul Tarihi : 23.12.2008

#### Yazışma Adresi:

Dr. Seyhan ŞAHAN FIRAT

Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı,

Yenişehir Kampüsü, 33169, Mersin

Tel : 0-324-3412815/2607

Faks : 0-324-3413022

E-posta : seyhansahan06@gmail.com

#### Abstract

**Objective:** In this study, we aimed to investigate the effect of nitric oxide produced by inducible nitric oxide synthase to oxidative stress in the liver of endotoxemic rats.

**Method:** Male Wistar rats received either saline (4 ml/kg, i.p.) in control group, endotoxin (10 mg/kg, i.p.) in endotoxic shock group and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide (10 mg/kg, i.p.) one hour after saline or endotoxin injection in the other groups. Mean arterial blood pressure was measured within four hours. The liver was isolated from the rats for the measurement of nitrite as an index of nitric oxide production, malondialdehyde for lipid peroxidation and the level of a potent antioxidant reduced glutathione. The activities of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase and the activity of myeloperoxidase as an index of neutrophil infiltration were measured.

**Results:** Endotoxin-induced hypotension was prevented by phenylene-1,3-bis [ethane-2-isothiourea] dihydrobromide ( $p<0.05$ ). Endotoxin caused an increase in nitrite levels, a decrease in reduced glutathione level and myeloperoxidase, superoxide dismutase and catalase activities ( $p<0.05$ ). The effects of endotoxin were prevented by phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothiourea] dihydrobromide ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** This study indicates that increased production of nitric oxide by induced nitric oxide synthase during endotoxemia contributes to oxidative stress and the inhibition of nitric oxide synthase restores the decreased antioxidant capacity in the liver.

**Key Words:** endotoxemia, oxidative stress, inducible nitric oxide synthase

\*Bu çalışma, MEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP ECZF EMB (BT) 2006-3) tarafından desteklenmiştir.

<sup>§</sup>Bu çalışma, 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, 24-27 Ekim 2007'de yazılı bildiri olarak sunulmuştur.

## Giriş ve Amaç

Organizmada, reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) ile antioksidan sistem arasında homeostatik bir denge bulunmaktadır. Oksidan moleküllerin oluşum hızında artma ya da antioksidan savunma sistemi etkinliğinde azalmaya bağlı olarak, oksidan/antioksidan dengenin bozulması ile "oksidatif stres" olarak adlandırılan durum ortaya çıkmaktadır (1,2,3). Bu denge, endotoksemik şok gibi yüksek oranda ölümle sonuçlanan birçok hastalıkta bozulmaktadır (1,3). Sepsis sırasında, birincil olarak etkinleşen inflamatuvar ve immün hücrelerde oluşan ROT ve RNT'ye karşı antioksidan kapasitede belirgin düzeyde düşme görülmektedir (1,2).

İnflamasyon ile ilişkili olarak oksidan moleküllerin neden olduğu oksidatif stres, endotoksemik şok gibi ölüm oranı yüksek olan birçok patofizyolojik olayda önemli bir rol oynamaktadır (2,3). Sepsisli hastalarda antioksidan kapasitenin azaldığı, septik şokta ise bu kapasitenin arttığı bildirilmiştir. Sepsisli hastalarda, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz enzim aktivitelerindeki artışın, ROT üretimindeki artmanın göstergesi olduğu bildirilmiştir (1-4). Öte yandan, endotoksemi sırasında indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyinde azalma ile birlikte, SOD ve katalaz aktivitelerinde de belirgin bir azalmanın olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (5). Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)'in oksidatif stres durumunda antioksidan etkisini gösterebilmesi için, ortamda aynı zamanda kendisi de güçlü bir antioksidan molekül olan GSH bulunması gerekmektedir. Endotoksinin neden olduğu oksidatif streste GSH düzeylerinde önemli ölçüde azalma olduğu bildirilmiştir. Endotoksinin GSH düzeylerindeki azalmaya sentezini ya da konjugasyon yollarını inhibe ederek neden olduğu bildirilmiştir (1,5).

Oksidatif streste oluşan lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeylerindeki artış hücre hasarının olduğunu göstermektedir (4). Nitrik oksit (NO)'nun endotoksemide görülen doku hasarı üzerindeki etkilerinin değişik olmasına karşın, yapılan klinik çalışmalarda indüklenbilir NO sentez (iNOS) inhibitörlerinin doku hasarının önlenmesinde güçlü etkileri olduğu bildirilmiştir (1,3,5,6). Sepsiste ROT artışının bir göstergesi olarak antioksidan enzim aktivitelerinde artış gözlenmesine karşın, MDA düzeylerinde de artışın gözlenmesi antioksidan enzim düzeylerindeki bu artışın hücre hasarını yeterli düzeyde korumadığını göstermektedir (7).

Endotoksemik şokta, iNOS aracılığı ile oluşan NO ile ilişkili olarak, vazokonstriktör maddelere karşı hiporeaktivite ve kan basıncında ileri derecede bir düşmenin eşlik ettiği, mikrosirkülatuvar işlevsizlik ile birlikte hayati organlarda doku perfüzyonu ve oksijen kullanımında bozulma sonucu bu organların işlevsizliği ve ölüm gibi yerel ve sistemik yanıtların görüldüğü, sistemik bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkmaktadır (1,8,9). NO, sepsis ve septik şokta, gerek oksidan ve antioksidan olarak, gerekse inflamatuvar

ya da antiinflamatuvar olarak, hem yararlı hem de zararlı olmak üzere birbirine ters etkiler göstermektedir (10,11).

Endotoksemi sırasında hayati organlarda meydana gelen çoklu organ yetmezliğinde karaciğerin de önemli bir rol oynaması nedeniyle bu çalışmada, endotoksemik sıçanlardan izole edilen karaciğer dokusunda iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun oksidatif stres üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

## Yöntem

### Kimyasal Maddeler

Endotoksin (lipopolisakkarit, *Escherichia coli* lipopolisakkaridi, O111:B4), phenylene-1,3-bis[ethane-2-isothioure] dihydrobromide (1,3-PBIT), sodyum nitrit, sıgır serum albumini (SSA) ve Bradford reajanı Sigma (St. Louis, ABD)'dan alınmıştır. Diğer kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya)'ten satın alınmıştır. Tüm maddeler deneylerin yapıldığı gün, distile su ya da serum fizyolojik ile hazırlanmıştır.

### Deney Hayvanları ve Endotoksik Şok Modeli

Deneysel uygulamalarda 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda senkronize edilen 40 adet erkek Wistar sıçan (250-350g) kullanılmıştır. Çalışma protokolü Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 06.03.2006 tarih ve 02/03 sayılı kararı ile 18.08.2007 tarih ve 07/16 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Kontrol grubu olarak sıçanlara serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.), endotoksik şok grubu olarak endotoksin (10 mg/kg, i.p.) ve diğer gruplara serum fizyolojik ya da endotoksin injeksiyonundan 1 saat sonra seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT (10 mg/kg) uygulanmıştır. Sıçanlara endotoksin (10 mg/kg, i.p., subletal doz) ya da serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) (12) injeksiyonundan hemen önce ve uygulandıktan 1, 2, 3 ve 4 saat sonra ortalama arter basıncı (OAB) kayıtları alınmıştır. OAB'nin kaydı için, sıçanların kuyruğundan ölçüm yapılmasına olanak veren kan basıncı kayıt sistemi kullanılmıştır. Deneyler sonunda, sıçanlar başları sert bir zemine hızla vurularak sersemletildikten sonra hızla boyunlarından kanatılarak öldürülüp karaciğerleri alınmıştır. Dokular ölçüm yapılmaya kadar -20°C'de dondurularak saklanmıştır.

### Doku Homojenati Süpernatantlarının Hazırlanması

Dokular çözüldükten sonra üzerine tampon çözelti (mM: HEPES 20 (pH 7.5),  $\beta$ -gliserofosfat 20, sodyum pirofosfat 20; sodyum ortovanadat 0.2, EDTA 2, benzamidin 10, ditiyotreytol 1, löpeptin 20 ve aprotinin 10) (12) eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenatlar 18.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildikten sonra, süpernatantlar alınmıştır, üzerlerine Tris (50 mM, pH 8.0)+KCl (0.5 M) çözeltisi eklenerek, ardarda iki kez 15 saniye su banyosu sonikatöründe bekletilmiş ve 18.000 rpm'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir.

Süpernatantlarda protein, nitrit, MDA ve GSH düzeyleri düzeyleri ile miyeloperoksidaz (MPO), SOD ve katalaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

#### *Dokularda Toplam Protein Düzeylerinin Belirlenmesi*

Karaciğer homojenatı süpernatantlarındaki toplam protein miktarı Coomassie mavisi (Bradford) yöntemi ile ölçülmüştür (13). Standart olarak kullanılan SSA'nın % 0.1 (a/h) biçiminde distile suda hazırlanan stok çözeltisinden, 0-50 µl SSA içeren seri dilüsyonları (0-50 µg/ml) hazırlanmış ve toplam hacimleri distile su ile 800 µl'ye ayarlanmıştır. Aynı şekilde, 5 µl doku homojenatı üzerine 795 µl distile su ilave edilerek 800 µl hacimde çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler üzerine 200 µl Bradford reajanı eklenerek, bu çözeltilerden alınan 100 µl örnek (aynı örnekten 2 kez olmak üzere) kültür plağına aktarılmıştır ve örneklerin verdikleri absorbanslar, kültür plağı okuyucuda (ELX800, Biotek, Türkiye), 630 nm'de okunmuştur. SSA derişimlerine karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile, SSA'nın kalibrasyon doğru denklemleri belirlenmiştir. Bu denklemlerden yararlanılarak, örneklerde okunan absorbans değerlerinden protein düzeyleri hesaplanmıştır.

#### *Doku Nitrit Düzeylerinin Ölçülmesi*

Doku homojenatlarından hazırlanan süpernatantlarda endotelial NO sentaz (eNOS) ve iNOS aktivitesinin bir göstergesi olarak nitrit düzeyleri, ortamda nitrit varlığında oluşan pembe rengin spektrofotometrik olarak 550 nm'de ölçülmesi prensibine dayanan diazotizasyon yöntemi (Griess reaksiyonu) ile ölçülmüştür (14). Doku homojenatlarındaki nitrit derişimleri, sodyum nitritin standart kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile belirlenmiştir.

#### *Doku MDA Düzeylerinin Ölçülmesi*

Oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve hücre hasarının bir göstergesi olarak doku örneklerindeki MDA düzeyleri, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın tiyobarbitürik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi temeline dayanan yöntem ile ölçülmüştür (15). Doku homojenatlarındaki MDA düzeyleri, 1,1,3,3-tetraetoksipropanın standart kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak, doğrusal regresyon yöntemi ile belirlenmiştir.

#### *Doku MPO Aktivitesinin Ölçülmesi*

Nötrofil infiltrasyonun bir göstergesi olarak doku MPO düzeyleri, hidrojen peroksidin doku tarafından oksitlenerek o-dianozidini indirgemesi ve indirgenmiş o-dianozidinin ölçülmesi temeline dayanan yöntem ile ölçülmüştür (16).

#### *Doku SOD Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi*

Antioksidan enzimlerden SOD enzim aktivitesi Mc Cord ve ark. (17)'nin yöntemine göre belirlenmiştir.

Yöntemde, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak 2-[4-iyodofenil]-3-[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid (INT) ile tepkimeye giren ve kırmızı renkli formazon boyası oluşturan süperoksit radikalleri üretilmektedir. Enzim aktivitesi ölçümü ise reaksiyonun 505 nm'de ortamda bulunan SOD enzimi ile inhibisyonuna dayanmaktadır.

#### *Doku Katalaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi*

Antioksidan enzimlerden hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ )'nin su ve moleküler oksijene yıkımını katalizleyen katalaz enzim aktivitesi,  $H_2O_2$ 'nin ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak 230 nm'de enzimin yıkım hızının spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanan Beutler yöntemine göre belirlenmiştir (18).

#### *Doku GSH Düzeylerinin Ölçülmesi*

Güçlü bir antioksidan molekül olan GSH düzeyi, protein olmayan sülfidril gruplarının, bir disülfid bileşiği olan 5,5'-ditiyo-bis [2-nitrobenzoik asit] (DTNB)'yi redükleyerek, 412 nm dalga boyunda absorbans veren sarı rengin ölçülmesi prensibine dayanan Beutler yöntemine göre belirlenmiştir (18).

#### *İstatistiksel Analiz*

Sonuçlar ortalama±standart hata şeklinde gösterilmiştir. Kullanılan sıçan sayısı n ile ifade edilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için verilerin normal dağılıma uygunluğu belirlendikten sonra ikiden çok grup olduğunda tek yönlü varyans analizi ve ardından Student-Newman-Keuls çoklu karşılaştırmalar testi (veriler normal dağılıma uygun olduğunda), iki grup olduğunda ise Student's t testi (veriler normal dağılıma uygun olduğunda) veya Mann-Whitney U testi (veriler normal dağılıma uygun olmadığında) kullanılmıştır. 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## **Bulgular**

#### *iNOS İnhibitörü 1,3-PBIT'nin Endotoksin ile Azalan OAB Üzerindeki Etkisi*

Endotoksin uygulanan sıçanların OAB'sinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmiştir (p<0.05). Endotoksinin neden olduğu OAB'deki azalma 1,3-PBIT ile anlamlı bir şekilde önlenmiştir (p<0.05) (Şekil 1).

#### *1,3-PBIT'nin Endotoksin Uygulanan Sıçanların Karaciğer Nitrit Düzeyleri Üzerindeki Etkisi*

Endotoksin uygulanan sıçanların karaciğer nitrit düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0.05). Endotoksinin neden olduğu nitrit düzeylerindeki artma 1,3-PBIT ile anlamlı bir şekilde önlenmiştir (p<0.05). 1,3-PBIT karaciğer bazal nitrit düzeylerinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır (p>0.05) (Şekil 2).

### 1,3-PBIT'nin Endotoksin Uygulanan Sıçanların Karaciğer MPO Enzim Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Endotoksin uygulanan sıçanların karaciğer MPO enzim aktivitesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Endotoksinin neden olduğu MPO enzim aktivitesindeki azalma 1,3-PBIT ile anlamlı bir şekilde önlenmiştir ( $p<0.05$ ). 1,3-PBIT karaciğer bazal MPO enzim aktivitesinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır ( $p>0.05$ ) (Şekil 3).

### 1,3-PBIT'nin Endotoksin Uygulanan Sıçanların Karaciğer MDA Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

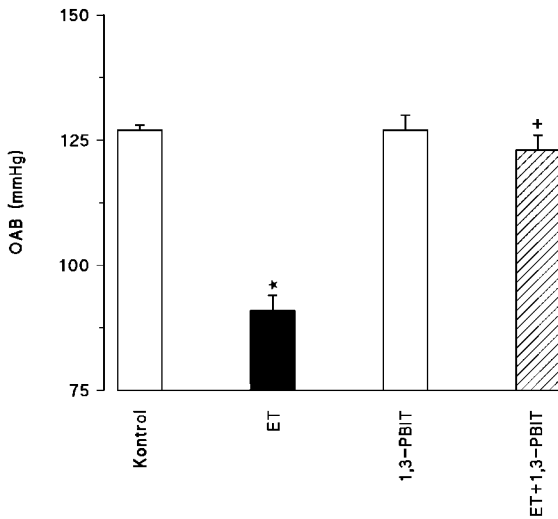
Endotoksin uygulanan sıçanların karaciğer MDA düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Endotoksinin neden olduğu MDA düzeylerindeki azalma 1,3-PBIT ile anlamlı bir şekilde önlenmiştir ( $p<0.05$ ). 1,3-PBIT karaciğer bazal MDA düzeylerinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır ( $p>0.05$ ) (Şekil 4).

### 1,3-PBIT'nin Endotoksin Uygulanan Sıçanların Karaciğer SOD ve Katalaz Enzim Aktiviteleri Üzerindeki Etkisi

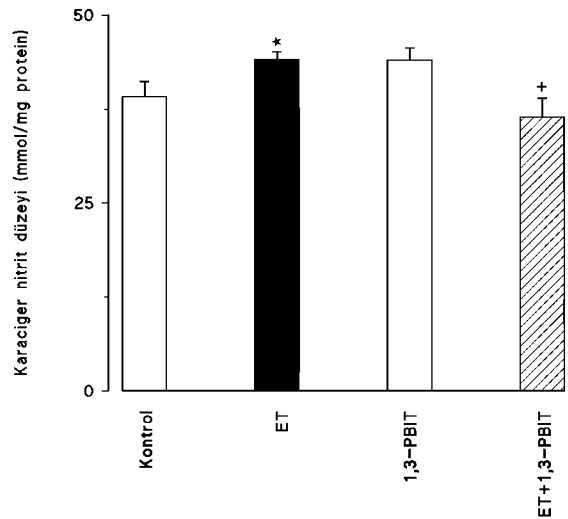
Endotoksin uygulanan sıçanların karaciğer SOD ve katalaz enzim aktivitelerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Endotoksinin neden olduğu SOD ve katalaz enzim aktivitelerindeki azalma 1,3-PBIT ile anlamlı bir şekilde önlenmiştir ( $p<0.05$ ). 1,3-PBIT karaciğer bazal SOD aktivitesinde anlamlı bir azalmaya neden olurken ( $p<0.05$ ), katalaz enzim aktivitesinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır ( $p>0.05$ ) (Şekil 5 ve 6).

### 1,3-PBIT'nin Endotoksin Uygulanan Sıçanların Karaciğer GSH Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

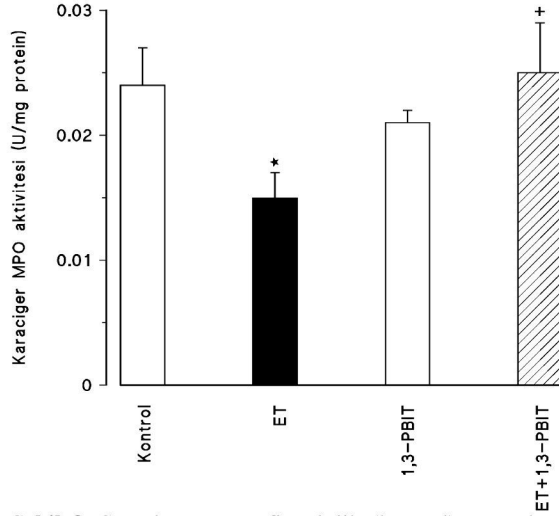
Endotoksin uygulanan sıçanların karaciğer GSH düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Endotoksin ile indüklenen GSH düzeylerindeki azalma 1,3-PBIT ile anlamlı bir şekilde önlenmiştir ( $p<0.05$ ). 1,3-PBIT karaciğer bazal GSH düzeylerinde anlamlı bir etki oluşturmamıştır ( $p>0.05$ ) (Şekil 7).



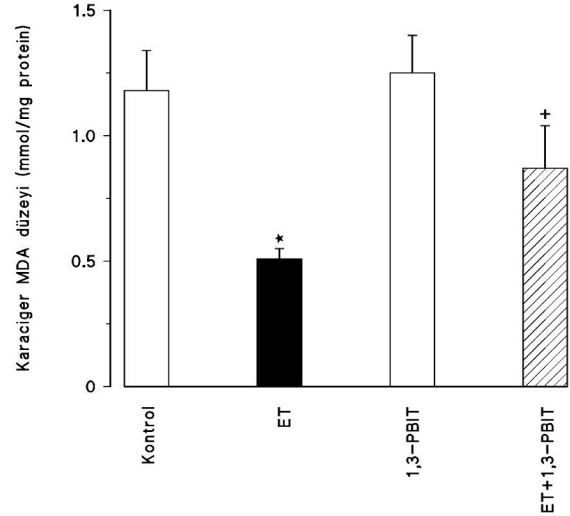
**Şekil 1.** Sıçanlara serum fizyolojik (kontrol) ve endotoksin (ET) uygulamasından 4 saat sonra ortalama arter basıncı (OAB) üzerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü 1,3-PBIT'nin etkisi. 1,3-PBIT (10 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) veya ET (10 mg/kg, i.p.) injeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası şeklinde gösterilmiştir.  $n= 10$ . \* Kontrol veya + ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı ( $p<0.05$ ).



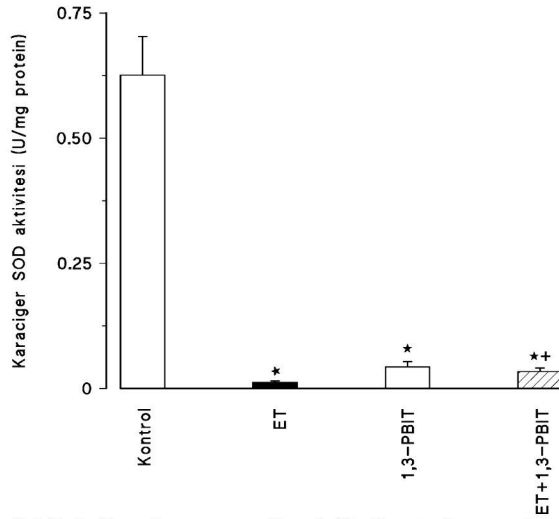
**Şekil 2.** Sıçanlara serum fizyolojik (kontrol) ve endotoksin (ET) uygulamasından 4 saat sonra karaciğer nitrit düzeyleri üzerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü 1,3-PBIT'nin etkisi. 1,3-PBIT (10 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) veya ET (10 mg/kg, i.p.) injeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası şeklinde gösterilmiştir.  $n= 6-10$ . \* Kontrol veya + ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı ( $p<0.05$ ).



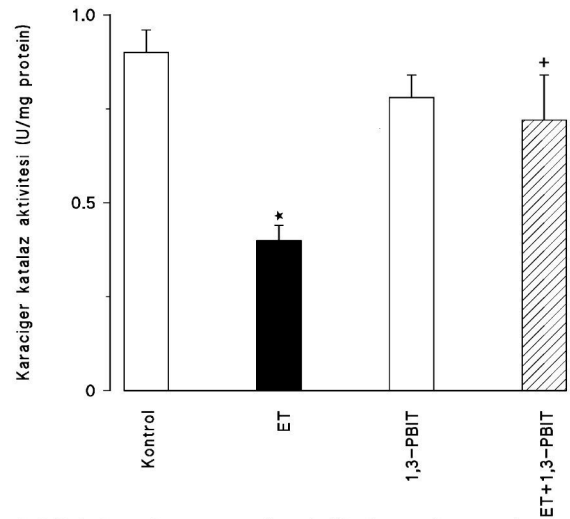
**Şekil 3.** Sıçanlara serum fizyolojik (kontrol) ve endotoksin (ET) uygulamasından 4 saat sonra karaciğer miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi üzerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü 1,3-PBIT'nin etkisi. 1,3-PBIT (10 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) veya ET (10 mg/kg, i.p.) injeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası şeklinde gösterilmiştir. n= 9-10. \* Kontrol veya + ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı ( $p<0.05$ ).



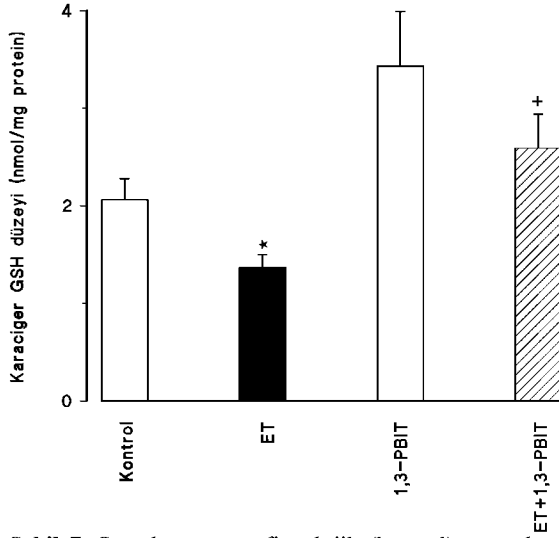
**Şekil 4.** Sıçanlara serum fizyolojik (kontrol) ve endotoksin (ET) uygulamasından 4 saat sonra karaciğer malondialdehit (MDA) düzeyleri üzerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü 1,3-PBIT'nin etkisi. 1,3-PBIT (10 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) veya ET (10 mg/kg, i.p.) injeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası şeklinde gösterilmiştir. n= 7-10. \* Kontrol veya + ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 5.** Sıçanlara serum fizyolojik (kontrol) ve endotoksin (ET) uygulamasından 4 saat sonra karaciğer süperoksit (SOD) aktivitesi üzerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü 1,3-PBIT'nin etkisi. 1,3-PBIT (10 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) veya ET (10 mg/kg, i.p.) injeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası şeklinde gösterilmiştir. n= 9-10. \* Kontrol veya + ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 6.** Sıçanlara serum fizyolojik (kontrol) ve endotoksin (ET) uygulamasından 4 saat sonra karaciğer katalaz aktivitesi üzerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü 1,3-PBIT'nin etkisi. 1,3-PBIT (10 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) veya ET (10 mg/kg, i.p.) injeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası şeklinde gösterilmiştir. n= 5-10. \* Kontrol veya + ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı ( $p<0.05$ ).



**Şekil 7.** Sıçanlara serum fizyolojik (kontrol) ve endotoksin (ET) uygulamasından 4 saat sonra karaciğer indirgenmiş glutatyon (GSH) düzeyleri üzerinde indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitörü 1,3-PBIT'nin etkisi. 1,3-PBIT (10 mg/kg, i.p.), serum fizyolojik (4 ml/kg, i.p.) veya ET (10 mg/kg, i.p.) injeksiyonundan 1 saat sonra uygulanmıştır. Sonuçlar ortalama±ortalamaların standart hatası şeklinde gösterilmiştir. n= 6-10. \* Kontrol veya + ET grubu değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı farklı (p<0.05).

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, endotoksemik sıçanların karaciğerinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun oksidatif strese katkıda bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Bulgularımız, endotoksin uygulanmasından 4 saat sonra, karaciğerde iNOS aracılığı ile oluşumu artan NO'nun belirgin düzeyde gözlenen hipotansiyona katkıda bulunduğunu göstermektedir. Daha da önemlisi, endotoksemi ile indüklenen NO üretimindeki artışın karaciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonunu ve lipit peroksidasyonunu baskıladığı ve seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile karaciğer antioksidan kapasitesindeki antioksidan moleküller ve antioksidan enzim aktivitelerine bağlı olarak ortaya çıkan azalmayı önlediği gösterilmiştir.

NO sepsis ve septik şok patofizyolojisinde birbirine ters etkiler göstermektedir (10). Lipit peroksidasyonu üzerinde hem uyarıcı hem de önleyici etkileri bulunmaktadır (10). NO'nun hem oksidan hem de antioksidan olarak etki gösterdiği ve bundan dolayı vücutta hem yararlı hem de zararlı etkilere neden olabileceği bildirilmiştir (19). Sepsiste, endotoksinle bağlı olarak lipit peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA düzeylerinde belirgin bir artış gözlenmektedir ki bu artış oksidatif stres ile sonuçlanmaktadır (20). Batra ve ark. (7) tarafından sepsiste antioksidan kapasitenin artmasına karşın, aynı zamanda MDA düzeylerinde de bir artış olduğu bildirilmiştir. Bu durumda antioksidan enzim düzeylerindeki artışın hücrel

hasarı tam anlamıyla korumadığı görülmektedir. Öte yandan, inhalasyon yolu ile uygulandığında sıçanlarda (21) ya da *in vitro* olarak doyurulmuş sulu çözeltisi insan lösemi hücrelerine uygulandığında (22) NO'nun MDA düzeylerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda, endotoksinin neden olduğu nitrit düzeylerindeki artışla birlikte MDA düzeylerindeki azalma 1,3-PBIT ile önlenmiştir. Daha önce tarafımızdan yapılan çalışmalarda da, sıçanlara endotoksin uygulanmasının ardından kalp, böbrek, aort ve mezenterik arterlerinde MDA düzeylerinde belirgin bir artış gözlenmiştir (23,24). NO düzeylerinin süperoksit radikali düzeyine eşit ya da daha düşük olduğu durumlarda peroksinitrit oluşumuna neden olarak lipit peroksidasyonunu uyardığı, daha yüksek derişimlerde ise bu serbest radikalden oluşturduğu nitratlanmış lipit radikallerinin son ürünleri aracılığı ile lipit peroksidasyonunu önlediği belirtilmiştir (19). NO aynı zamanda peroksinitritin neden olduğu lipit peroksidasyonunu da önlemektedir (10,19). Bu nedenle, iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun endotoksinin neden olduğu toplam antioksidan kapasite üzerinde etkili olduğu ve böylece lipit peroksidasyonunu önlediği ileri sürülebilir. Elde edilen sonuçlar, NO'nun güçlü bir antioksidan etki gösterdiği yönündeki bulgular ile paralellik göstermektedir (19).

NO'nun güçlü proinflatuvar etkiler gösterdiğine ilişkin birçok çalışma bulunmasına karşın, aynı zamanda NO'nun inflamasyonun neden olduğu doku hasarını artırabildiği de bildirilmiştir (10,25). NO, insan nötrofillerinden tümör nekroze edici faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )'nın salıverilmesini artırarak (26) ya da farelerde endotoksinin TNF- $\alpha$  oluşumu üzerindeki etkisini aşağı düzenleyerek (*down-regulation*) inflamatuvar sitokinlerin üretiminde azalmaya neden olur (27). Daha önce yaptığımız çalışmalarda, endotoksin kalp ve aortada MPO enzim aktivitesinde artışa neden olurken, böbrek ve mezenterik arter dokularında ise belirgin bir azalmaya neden olmuştur (23,24). Bu çalışmada, endotoksinin neden olduğu karaciğer nitrit düzeylerindeki artış ile birlikte MPO enzim aktivitesinde belirgin bir azalma olduğu görülmüştür. MPO enzim aktivitesindeki bu azalma, seçici iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile önemli ölçüde önlenmiştir. Endotoksemi modelinde iNOS aracılığı ile oluşan NO'nun antiinflatuvar etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Sepsiste ROT ya da RNT ile antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulması sonucunda oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (8). Önemli antioksidan enzimlerden olan SOD, katalaz ve GSH-Px serbest radikallerin prekürsörlerini süpürerek ya da katalizini önleyerek oksijen radikalının oluşumunu önlemektedir (1,28). Bunun yanında, NO da hücrel redoks dengesinin düzenlenmesinde rol oynayan en önemli etkenlerden birisidir. NO donörlerinin dışarıdan uygulanması yanında, endotoksin gibi etkenlerle indüklenen iNOS aracılığı ile

oluşan NO'nun antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (28). NO, katalazın hem kısmına bağlanarak enzimin yıkılmasına ve inhibisyonuna aynı zamanda, oluşturduğu peroksinitrit aracılığı ile SOD enziminin tirozin rezidülerinin nitrasyonu sonucunda yıkımına neden olmaktadır (29,30). Bununla birlikte, endotoksin sentez ve konjugasyon yollarını inhibe ederek, önemli bir hücre içi antioksidan molekül olan GSH düzeylerinde azalmaya neden olmakta ve antioksidan enzimlerin aktivitesini aşağı düzenlemektedir (5). Çalışmamızda, iNOS aracılığı ile oluşan NO, SOD ve katalaz enzim aktivitelerinde seçici inhibitörü 1,3-PBIT ile önlenemeyen belirgin bir azalmaya neden olmuştur. Ayrıca, NO oluşumundaki artış ile birlikte GSH düzeylerinde de önemli derecede azalma gözlenmiştir; bu azalma ise iNOS inhibitörü 1,3-PBIT ile önlenmiştir. Bulgularımız, oksidatif stres sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerini süpürmesi amacı ile GSH tüketiminde önemli derecede artış olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bulgularımız endotoksemi sırasında indüklenen iNOS aracılığı ile oluşumu artan NO'nun karaciğer dokusunda nötrofil infiltrasyonunu ve lipid peroksidasyonunu baskılayarak hem antiinflamatuvar hem de antioksidan etki gösterdiğini düşündürmektedir. iNOS'un 1,3-PBIT ile seçici olarak inhibisyonu, endotoksemi sırasında ortaya çıkan oksidatif stres durumunda azalan karaciğer antioksidan kapasitesinin ve antioksidan enzim aktivitelerinin yeniden düzenlenmesine neden olmuştur. Septik şokta oksidatif stres sonrasında doku zedelenmesine bağlı olarak ortaya çıkan ve ölümlü sonuçlanan çoklu organ yetmezliğinde yaşamsal organlardan birisi olan karaciğer işlevindeki azalmanın önemli bir yer tutmasından dolayı, karaciğer işlevsizliğinin önlenmesi ya da düzeltilmesinde seçici iNOS inhibitörlerinin kullanımı terapötik açıdan büyük bir önem taşımaktadır.

## Kaynaklar

- Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidant in sepsis. *Int Immunopharmacol* 2004;4:327-47.
- Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1173-85.
- Sakaguchi S, Furusawa S. Oxidative stress and septic shock: metabolic aspects of oxygen-derived free radicals generated in the liver during endotoxemia. *Immunol Med Microbiol* 2006;47:167-77.
- Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle D, Reinhart K. Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis. *Crit Care Med* 1998;26:705-9.
- Payabvash S, Ghahremani MH, Goliaei A, Mandegary A, Shafaroodi H, Amanlou M, Dehpour AR. Nitric oxide modulates glutathione synthesis during endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 2006;41:1817-28.
- Tunctan B, Altug S. The use of nitric oxide synthase inhibitors in inflammatory diseases: A novel class of anti-inflammatory agents. *Curr Med Chem: Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 2004;3:271-301.
- Batra S, Kumar R, Seema R, Kapoor AK, Ray G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann Trop Paediatr* 2000;20:27-33.
- Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative Stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth* 2003;90:221-32.
- Cadenas S, Cadenas AM. Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity. *Toxicology* 2002;18:45-63
- Hauser B, Bracht H, Matejovic M, Radermacher P, Balasubramanian V. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg* 2005;101:488-98.
- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53:135-59.
- Tunctan B, Yaghini FA, Estes A, Malik KU. Inhibition by nitric oxide of cytochrome P450 4A activity contributes to endotoxin-induced hypotension in rats. *Nitric Oxide* 2006;14:51-7.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper P, Wishnok JS, Tanenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131-8.
- Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytic Biochem* 1979; 95:351-58.
- Chance B, Maehley AC. Assay of catalases and peroxidases. Colowick S, Kaplan N. *Methods in Enzymology*, Eds., New York: Academic Press, 1955: 764-75.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase An enzymatic function for erythrocyte protein (hemocyanin). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
- Beutler E. Red Cell Metabolism, A manual of biochemical methods. 3<sup>rd</sup> Ed. Orlando: Grune & Stratton, 1984:72-3, 105-6.

19. Groeneveld AB, Sipkema P. Interaction of oxyradicals, antioxidants, and nitric oxide during sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:2161-62.
20. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995;23:646-51.
21. Brady TC, Crapo JD, Mercer RR. Nitric oxide inhalation transiently elevates pulmonary levels of cGMP, iNOS mRNA, and TNF-alpha. *Am J Physiol* 1998;275:L509-15.
22. Kelley EE, Wagner BA, Buettner GR, Burns CP. Nitric oxide inhibits iron-induced lipid peroxidation in HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 1999;370:97-104.
23. Tunctan B, Korkmaz B, Yildirim H, Tamer L, Atik U, Buharalioglu CK. Reversal of endotoxin-induced hypotension by inhibition of inducible nitric oxide synthase activity is associated with improved oxidative status in rat heart, aorta and mesenteric artery. *Turk J Med Sci* 2006;36:71-80.
24. Tunctan B, Korkmaz B, Yildirim H, Tamer L, Atik U, Buharalioglu CK. Increased production of nitric oxide contributes to renal oxidative stress in endotoxemic rat. *Am J Infectious Dis* 2005;1:111-15.
25. Hogg N, Kalyanaraman B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1993;1411:378-84.
26. Van Dervort AL, Yan L, Madara PJ, Cobb JP, Wesley RA, Corriveau CC, Tropea MM, Danner RL. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF- $\alpha$  production by human neutrophils. *J Immunol* 1994;152:4102-9.
27. Florquin S, Amraoui Z, Dubois C, Decuyper J, Goldman M. The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J Exp Med* 1994;180:1153-8.
28. Dobashi K, Pahan K, Chahal A, Singh I. Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells. *J Neurochem* 1997;68:1896-1903.
29. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992;298:446-51.
30. Brown GC. Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide. *Eur J Biochem* 1995;232:188-191.