

## **Koledok Kanalı Tıkanıklığı Yapılan Ratlarda L-Arjinin ve N -Nitro-L-Arjinin Metil Ester Tedavisinin Karaciğer Dokusu Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzimler Üzerine Etkisi\***

Dr. Ahmet GÜREL<sup>1</sup>, Dr. Ferah ARMUTCU<sup>1</sup>, Dr. Sadık SÖĞÜT<sup>2</sup>,  
Dr. Alper CİHAN<sup>3</sup>,

*Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya<sup>1</sup>, ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı<sup>3</sup>, ZONGULDAK*

*Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı<sup>2</sup>, HATAY*

- ✓ Tıkanma sarılığına bağlı karaciğer hasarının en önemli etkenlerinden birisi de, bozulmuş karaciğer kan akımının neden olduğu, artmış reaktif oksijen türevi bileşiklerdir. Bu çalışmada koledok kanalı tıkanıklığı oluşturulan ratlarda L-arjinin ve L-NAME tedavisinin oksidatif karaciğer hasarı üzerine etkileri araştırıldı. Bu amaçla onbeş rat beşerli üç gruba ayrıldı. İlk gruba koledok kanalı ligasyonu (KKL) yapıldı. İkinci gruba ligasyonla beraber L-arjinin tedavisi uygulanırken üçüncü gruba ligasyonla birlikte L-NAME verildi. Yedi gün sonra genel anestezi altında ratların karaciğer dokuları çıkarıldı. Doku örnekleri homojenize edildi ve bu örneklerde malondialdehid (MDA) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri ile ksantin oksidaz (XO), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ölçüldü. L-arjinin grubu MDA düzeyi KKL ve L-NAME grubundan anlamlı derecede düşük bulundu. L-arjinin grubu SOD aktivitesi hem KKL hem de L-NAME grubundan anlamlı derecede düşük bulunurken, CAT aktivitesi ve NO düzeyi sadece KKL grubundan anlamlı derecede düşüktü. L-NAME grubu MDA aktivitesi KKL grubundan anlamlı derecede yüksek bulunurken diğer parametreler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Bu sonuçlar safra kanalı tıkanıklığına bağlı oksidatif karaciğer hasarının önlenmesinde L-arjinin tedavisinin etkili olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Safra kanalı tıkanıklığı, karaciğer, nitrik oksit, oksidan stres.

- ✓ **Effects of L-Arginine and N -nitro-L-arginine Methyl Ester on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Liver of Rats With Ductus Choledochus Ligation**

One of the most important reasons of liver destruction in obstructive jaundice is reactive oxygen derived compounds which are formed as a result of demolished liver circulation.

In this experimental study, we investigated the effects of L-arginine and L-NAME on liver antioxidant system and lipid peroxidation in rats after ductus choledochus ligation (BDL). For this purpose, fifteen rats were divided randomly into three equal groups. BDL group (n=5): bile duct ligation was performed in rats. L-Arginine group (n=5): Anaesthetized rats were given L-arginine (1 mg/kg) for 7 days after BDL. L-NAME group (n=5): Anaesthetized rats were given L-NAME (2 mg/kg) for 7 days after BDL. Liver tissue was removed in all rats under anesthesia seven days after surgical procedure. Tissue was homogenized and malondialdehyde (MDA) and nitric oxide levels, xanthine oxidase, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) levels were studied in the homogenate. Liver tissue MDA level of

\* Bu çalışma 15-25 Eylül 2001 tarihinde Ioannina-Yunanistan'da yapılan Balkan Klinik Laboratuvarlar Federasyonunun 9. toplantısında poster bildiri olarak sunulmuştur.

L-arginine group was significantly lower than control and L-NAME groups. Activity of SOD in L-arginine group was significantly lower than L-NAME and BDL groups. Activity of CAT and level of NO in L-arginine group were significantly lower than those of L-NAME group. Liver tissue MDA level of L-NAME group was significantly higher than BDL group. These findings show that L-arginine treatment is effective in prevention of oxidative liver destruction as a result of bile duct obstruction.

**Key words:** bile duct ligation, liver, nitric oxide, oxidant stress.

## GİRİŞ

Reaktif oksijen türevi (ROT) bileşikler ve lipit peroksidasyonu bir çok hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır<sup>(1,2)</sup>. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile kolestaza bağlı karaciğer hasarında bu bileşiklerin ve lipit peroksidasyonunun etkili olduğu ortaya konmuştur<sup>(3-6)</sup>. Koledok kanalı ligasyonu (KKL) yapılan ratlarda hidroksil ve süper oksit anyon radikallerinin arttığı bildirilmiştir<sup>(7)</sup>. Artan ROT bileşikler başta membran yapısında bulunan doymamış yağ asitleri olmak üzere diğer hücre bileşenlerinin oksidasyonuna neden olurlar. Okside olan yapılar hücrenin parçalanmasına kadar giden süreci başlatabilirler. Bütün hücreler ROT bileşiklerinin zararlı etkilerini önleyecek antioksidan savunma sistemine sahiptir. Safra kanalı tıkanıklığının zamanla antioksidan savunma sistemini de etkilediği; antioksidan enzim aktivitelerinde azalma ve nonenzimatik antioksidan bileşiklerin düzeyinde düşme olduğu bildirilmiştir<sup>(8,9)</sup>. Oksidan etkiye karşı antioksidan savunma sisteminde meydana gelen değişikliklerde kolestaza bağlı hepatik kan akımının azalması ve buna bağlı karaciğer perfüzyon bozukluğunun etkili olduğu ileri sürülmektedir.

L-arjinin, güçlü vazodilatasyon yapıcı etkiye sahip olan nitrik oksit (NO) donörü bir aminoasittir ve NO sentezini artırmak amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kan dolaşımının bozulduğu deney modellerinde NO sentezini uyarmak ve L-arjinin uygulamasının lipit peroksidasyonu üzerine etkilerini araştırmak amacı ile değişik çalışmalar yapılmıştır<sup>(10-13)</sup>.

Bu çalışma KKL yapılan ratlarda nitrik oksit sentez ve inhibisyonunun oksidatif karaciğer hasarı üzerine etkisini araştırmak amacı ile planlandı. Bu amaçla NO sentezini uyar-

mak için L-arjinin, NO sentezini inhibe etmek için de non spesifik nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü olan N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) kullanılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 200-250 gram ağırlığında 15 tane Wistar Albino rat üç eşit gruba ayrıldı. KKL grubu (n=5): genel anestezi altında koledok kanalı ligasyonu yapılan ve herhangi bir tedavi uygulanmayan grup. L-arjinin grubu (n=5): KKL ile birlikte oral olarak L-arjinin (1 mg/kg/gün Sigma Chemical Co St Louis USA) uygulanan grup. L-NAME grubu (n=5): KKL ile birlikte intraperitoneal olarak N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (150 mg/kg/gün; Sigma) verilen grup. Yedinci günde genel anestezi altında uyutulan ratların karaciğer dokuları alındıktan sonra, Tris-HCl tamponu (pH 7.5, 0.2 mM) ile homojenize edildi.

**Malondialdehid (MDA) ölçümü:** MDA ölçümünde Draper ve Hadley'in<sup>(14)</sup> tanımladığı metot kullanıldı. Reaksiyonun prensibi, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın tiyobarbitirik asit ile reaksiyona girmesi sonucu 532 nm de maksimum absorban veren pembe renkli bileşiğin oluşmasına dayanır. Daha sonra standart grafiği kullanılarak numune absorbanlarının karşılık geldiği MDA düzeyleri bulundu. Sonuç doku ağırlığına bölünerek µmol/mg doku şeklinde hesaplandı.

**Nitrik oksit ölçümü:** Biyolojik sistemlerde NO ölçümü çok zor olduğu için doku nitrit ve nitrat miktarı NO üretiminin bir indeksi olarak kullanılmaktadır. Karaciğer total nitrit miktarı Griess<sup>(15)</sup> reaksiyonu temeline dayanan metotla yapıldı. Numuneler Somogyi reaktifi ile deproteine edildikten sonra aktifleşmiş kadmiyum granülleri ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numuneler N-naftilaminitilendiamin

ve sülfanilamid reaktifleri ile karıştırılarak tekrar inkübe edildi. İnkübasyon sonrası oluşan renkli bileşiğin absorbansı 545 nm de okundu ve sonuçlar doku ağırlığına bölünerek nmol/gram doku olarak hesaplandı.

**Süperoksit Dismutaz aktivitesi (SOD):** Total SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının<sup>(16)</sup> tanımladığı metota göre ölçüldü. Reaksiyonun prensibi ksantin-ksantinoksidaz sisteminin nitroblue tetrazolium redüksiyonunun inhibisyonuna dayanır. Numunedeki protein miktarı ölçülerek sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.

**Katalaz aktivitesi (CAT):** Katalaz aktivitesi Aebi's metoduna göre ölçüldü<sup>(17)</sup>. Sonuçlar k/mg protein olarak ifade edildi.

**Ksantin oksidaz (XO) aktivitesi:** Metot ksantinden ürik asit oluşumu reaksiyonuna dayanmaktadır<sup>(18)</sup>. Reaksiyon sonucu oluşan ürünün absorbans artışı 293 nm'de okundu. Enzim aktivitesi 37 °C'de pH 7.5'da bir dakikada oluşan 1 µmol ürik asit miktarı üzerinden değerlendirildi ve sonuçlar U/gram protein olarak hesaplandı.

**Protein ölçümü:** Numunelerdeki protein miktarı Lowry ve arkadaşlarının<sup>(19)</sup> tanımladığı metot ile çalışıldı. Standart grafiği kullanılarak sonuçlar hesaplandı.

İstatistiksel değerlendirme amacı ile her bir parametrenin ortalama ± standart sapması hesaplandı ve verilerin analizinde nonparametrik

Kruskall Wallis testi kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmada Mann-Whitney U testi kullanıldı. P değeri 0.05' ten küçük olan değerler anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Grupların karaciğer doku sonuçları tablo'da toplu olarak verilmiştir. L-arjinin grubu MDA düzeyi KKL ve L-NAME grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. L-arjinin grubu SOD aktivitesi hem KKL hem de L-NAME grubundan anlamlı derecede düşük bulunurken, CAT aktivitesi ve NO düzeyi sadece KKL grubundan anlamlı derecede düşüktü. L-NAME grubu MDA düzeyi KKL grubundan anlamlı derecede yüksek bulunurken diğer parametreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Grupların XO aktiviteleri arasında anlamlı fark bulunamadı.

## TARTIŞMA

Safra kanalı tıkanıklığının karaciğer dokusu ROT bileşikleri üretiminde ve lipit peroksidasyonunda artışa neden olduğu klinik ve laboratuvar çalışmalarla gösterilmiştir<sup>(20,21)</sup>. Bu çalışmada lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılan MDA düzeyinin L-arjinin uygulaması ile anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir. L-arjininin KKL'de karaciğer lipit peroksidasyonunu önleyici etkisi Muriel ve ark.<sup>(22)</sup> tarafından da bildirilmiştir. Bu azalma

**Tablo.** Gruplara Ait Karaciğer Dokusu MDA ve NO Seviyeleri ile SOD, CAT ve XO Enzimi Aktivite Değişiklikleri (Ortalama ± Standart sapma).

	KKL (n=5)	KKL + L-arjinin (n=5)	KKL+L-NAME (n=5)
MDA (µmol/mg doku)	2,75 ± 0,52	1,73 ± 0,23 <sup>a,b</sup>	3,53 ± 0,69 <sup>d</sup>
NO (nmol/g doku)	172 ± 11	154 ± 24	206 ± 29 <sup>e</sup>
SOD (U/mg protein)	0,097± 0,018	0,068± 0,012 <sup>c</sup>	0,094 ± 0,014
CAT (k/mg protein)	53,16 ± 27,77	23,70 ± 3,87 <sup>b</sup>	36,00 ± 9,10
XO (U/g protein)	2,01 ± 0,33	2,45 ± 0,46	2,21 (0,09)

<sup>a</sup>p < 0.05 KKL grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup>p < 0.01 L-NAME grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>c</sup>p < 0.05 L-NAME ve KKL grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>d</sup>p < 0.05 KKL grubu ile karşılaştırıldığında

<sup>e</sup>p < 0.05 L-arjinin grubu ile karşılaştırıldığında

L-arjininin KKL'de görülen artmış süper oksit anyon radikali üretimini önleme özelliğinden kaynaklanabilir. Heiman ve Gipson<sup>(23)</sup> in vitro ortamda L-arjinin varlığında süper oksit anyon radikal üretiminde doza bağımlı olarak azalma olduğunu göstermişlerdir. Benzer sonuç Vergnani ve ark.<sup>(24)</sup> tarafından yapılan çalışma ile de ortaya konmuştur. Bu araştırmacılar okside ve nativ LDL'nin süper oksit anyon radikalini artırıcı etkilerinin L-arjinin tarafından önlendiğini bulmuşlardır. L-arjinin grubu karaciğer dokusu MDA düzeyindeki azalmada; bu amino asitin ROT bileşik üretimini önleme etkisi ile birlikte NO sentezini artırıcı etkisinin de katkısı olabilir. Çünkü safra kanalı tıkanıklığı karaciğer dokusunun perfüzyonunu bozmaktadır. Perfüzyon bozukluğu karaciğer dokusunun metabolizmasını olumsuz yönde etkileyerek fonksiyon bozukluğuna ve karaciğer tarafından uzaklaştırılan toksik bileşiklerin birikmesine neden olmaktadır. L-arjinin verilmesi ile NO sentezinin indüklenmesi karaciğer dokusunun mikrosirkülasyonunu artırabilir. Bu da karaciğer dokusunun perfüzyonunu artırarak hepatositlerin fonksiyonlarında düzelleme sağlayabilir. L-NAME grubu MDA düzeyi her iki gruptan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bazı araştırmacılar in vitro çalışmalarda L-NAME'nin süper oksit anyon radikali üretimini artırdığını bildirmişlerdir<sup>(23,24)</sup>. Ayrıca Heiman ve Gipson L-NAME bulunan ortamda KKL'da düzeylerindeki artış gözlenen TNF- gibi sitokinlerin süper oksit anyon radikal üretimini artırdığını rapor etmişlerdir<sup>(25)</sup>. Solenski ve Kwan ise fokal serebral iskemi çalışmasında iskemi fazında L-NAME'nin ROT bileşiklerin üretiminde artışa neden olurken reperfüzyon döneminde tersi bir etki oluşturduğunu tespit etmişlerdir<sup>(26)</sup>. Bu nedenle L-NAME'nin oksidan sistem üzerine etkileri tartışmalı olmakla birlikte genel yaklaşım ROT bileşiklerini artırdığı yönündedir. L-NAME grubu karaciğerinde artmış MDA düzeyleri; artmış ROT bileşik üretimi, NO sentezinin inhibisyonuna bağlı kan akımının azalması ve trombüs gelişimine yatkınlık gibi nedenlerle açıklanabilir<sup>(27,28)</sup>.

Kolestaz karaciğer dokusu antioksidan savunma sistemini olumsuz yönde etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda glutatyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinde ve glutatyon gibi nonenzimatik antioksidan bileşiklerin miktarlarında azalma olduğu bildirilmiştir<sup>(29,30)</sup>. Bizim çalışmamızda L-arjinin grubu SOD ve CAT aktivitesi diğer gruplardan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Benzer sonuç Tsai ve ark. tarafından da rapor edilmiştir<sup>(31)</sup>. Bu araştırmacılar rat yanık modeli çalışmalarında L-arjinin tedavisinin yanık sonrası doku MDA düzeyi ile birlikte antioksidan enzim aktivitelerinde de düşme gözlemişlerdir. Bu durum enzimlerin tüketimi veya inhibisyonundan daha çok L-arjinin'in süper oksit üretimini önleme özelliği ile açıklanabilir. Çünkü SOD süper oksidi substrat olarak kullanılmaktadır CAT ise SOD'un katalizlediği reaksiyonun ürünü olan hidrojen peroksidi substrat olarak kullanılmaktadır. Süper oksit anyon radikali miktarındaki azalma, substratları azaldığı için, bu enzimlerin aktivitelerinde azalmaya neden olabilir.

Safra kanalı tıkanıklığının farklı dokularda nitrik oksit metabolizması üzerine etkilerini araştırmak amacı ile değişik çalışmalar yapılmıştır. Vallance ve Moncada KKL'na bağlı sirozun vasküler düz kaslarda ve makrofajda nitrik oksit sentaz (NOS) enzim aktivitesini artırarak aşırı miktarda NO sentezlenmesine neden olduğunu ve sirozda görülen hiperdinamik sirkülasyonun bu aşırı NO üretiminden kaynaklanmış olabileceğini ileri sürmüşlerdir<sup>(32)</sup>. Buna karşın Kanwar ve ark. yaptıkları rat modeli çalışmalarında safra kanalı tıkanıklığının başta karaciğer olmak üzere mide, jejunum ve aortada NOS enzim aktivitelerinde değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir<sup>(33)</sup>. Aynı araştırmacılar böbrekte hem Ca<sup>+2</sup> bağımsız hem de Ca<sup>+2</sup> bağımlı NOS aktivitesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Mayoral ve arkadaşları ise KKL'nun karaciğer iNOS aktivitesini artırırken cNOS aktivitesinde değişiklik yapmadığını rapor etmişlerdir<sup>(34)</sup>. Bu çalışmalar KKL'unun NOS enzimi üzerine etkilerinin dokuya ve enzimin tipine göre farklılık gösterdiğini or-

taya koymaktadır. Safra kanalı tıkanıklığı olan hastalarda ve rat modeli çalışmalarında serum NO miktarı yüksek bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda L-arjinin verilen grupta karaciğer dokusu NO miktarı diğer gruplardan düşük bulunmuştur. L-arjininin NO sentezini artırmasına rağmen böyle bir sonucun ortaya çıkması bir çelişki gibi durmaktadır. L-arjinin uygulanan çalışmalarda NO sentezinde artış beklenmekle birlikte bazı çalışmalarda bu çalışma sonucuna benzer bulgular gözlenmiştir<sup>(31)</sup>. Nahavandi ve arkadaşları kolestaza bağlı bradikardide NO'in etkilerini araştırırken; KKL grubu serum nitrit+nitrat düzeyini kontrol grubundan yüksek bulurlarken L-arjinin grubu serum nitrit+nitrat düzeyi ile kontrol grubu arasında fark bulamamışlardır<sup>(35)</sup>. Aynı araştırmacılar L-arjinin grubu nitrit+nitrat düzeyini KKL grubundan anlamlı derecede düşük bulmuşlardır. Bu durum böbreklerin süzme ve ekstraksiyon fonksiyonlarının bozulmasından kaynaklanabilir. Nitekim KKL'nun böbrek kan akımında ve glomerüler fitrasyon oranında %50'den fazla bir düşüklüğe neden olduğu ve böbrek yetersizliğine yol açtığı bildirilmiştir<sup>(36-38)</sup>. NO' in yarılanma ömrünün çok kısa olması nedeni ile direk ölçme yöntemi oldukça sınırlıdır. Bu nedenle NO miktarının değerlendirilmesi daha çok, ölçüm yöntemi daha kolay ve ucuz olması nedeni ile, NO'in daha stabil ürünü olan nitrit/nitrat ölçümü ile yapılmaktadır. Nitratın da en önemli atılım yolu böbreklerdir. Böbrek fonksiyon yetersizliğine bağlı nitrat atılımının bozulması serum ve doku NO ürünlerinin düzeyinde yükselmeye neden olabilir.

XO pürin katabolizma enzimidir ve katalizlediği reaksiyonla süper oksit anyon radikalinin oluşumuna neden olmaktadır. Mun ve arkadaşları tıkanma sarılığının hem serum hem de karaciğer dokusu XO aktivitesini artırdığını ve bu artışın karaciğer hasarında önemli bir etkiye sahip olduğunu rapor etmişler, XO inhibitörü ile bu hasarın azaltıldığını göstermişlerdir<sup>(38)</sup>. Ayrıca KKL yapılan ratlarda karaciğer dışı organlarda görülen oksidatif doku hasarında XO aktivitesinde bir azalma olmazken L-

arjinin grubu MDA düzeyindeki azalma bir çelişki gibi görülebilir. Bu durum L-arjininin süper oksit anyon radikalini temizleme yeteneği ile açıklanabilir. Her ne kadar L-arjinin grubu XO aktivitesinde bir değişiklik gözlenmese bile bu aminoasidin, doğrudan süper oksit anyon radikalini temizleme özelliği ile lipid peroksidasyonunda azalmaya neden olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak; L-arjinin'in nitrik oksit sentezini uyararak doku mikro sirkülasyonunu artırdığı ve ROT bileşiklerin sentezini inhibe ettiği ve böylece KKL'na bağlı oksidatif karaciğer hasarının önlenmesinde etkili olduğu söylenebilir.

**Geliş Tarihi** : 19.01.2004

**Yayına kabul tarihi** : 07.05.2004

**Yazışma adresi:**

Dr. Ahmet GÜREL

Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı

ZONGULDAK

## KAYNAKLAR

1. Lunec J, Blake D. Oxygen free radicals: their relevance to disease processes. In:Chone RD, Lewis B, Alberti KGMM, Denman AM editors. The metabolic and molecular basis of acquired disease. Balliere Tindalls-London, 1990; 189-212.
2. Janssen YM, Houten B, Borm PJ, et al. Cell and tissue responses to oxidative damage. Lab. Invest. 1993; 69: 261-274.
3. Schimpl G, Pesendorfer P, Steinwender G, et al. Allopurinol reduces bacterial translocation, intestinal mucosal lipid peroxidation, and neutrophil-derived myeloperoxidase activity in chronic portal hypertensive and common bile duct-ligated growing rats. Pediatr Res 1996; 40: 422-428.
4. Jiang WG, Puntis MC. Immune dysfunction in patients with obstructive jaundice, mediators and implications for treatments. HPB Surg 1997; 10: 129-142.
5. Orellana M, Rodrigo R, Thielemann L, et al. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2000; 126: 105-111.
6. Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, et al. On the role

- of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 351-359.
7. Tsai LY, Lee KT, Liu TZ. Evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in experimental obstructive jaundice of rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 732-737.
  8. Krahenbuhl S, Talos C, Lauterburg BH, et al. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *J. Hepatology* 1995; 22: 607-612.
  9. Baron V, Hernandez J, Noyola M, et al. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2000; 127: 243-249.
  10. Barlas M, Hatiboglu C. The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *Int Urol Nephrol* 2002; 34: 81-86.
  11. Rhoden EL, Pereira-Lima L, Rhoden CR, et al. Role of the L-arginine/nitric oxide pathway in renal ischaemia-reperfusion in rats. *Eur J Surg* 2001; 167: 224-228.
  12. Haklar G, Ulukaya-Durakbasa C, Yuksel M, et al. Oxygen radicals and nitric oxide in rat mesenteric ischaemia-reperfusion: modulation by L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester.: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25: 908-912.
  13. Chen JC, Chen HM, Shyr MH, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. *J Formos Med Assoc* 2000; 99: 213-218.
  14. Draper H, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-431.
  15. Cortas NK and Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; 36: 1440-1443.
  16. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
  17. Aebi H. Catalase, In Bergmeyer HU. (ed): *Methods of Enzymatic Analysis.* New York and London, Academic Press,. 1974; 673-677.
  18. Prajda N, Weber G. Malign transformation-linked imbalance: decreased XO activity in hepatomas. *FEBS Lett.* 1975; 59 :245-249.
  19. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L. et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 195; 183: 265-275.
  20. Alptekin N, Mehmetçik G, Uysal M, et al. Evidence for oxidative stress in the hepatic mitochondria of bile duct ligated rats. *Pharmacol. Res.* 1997; 36: 243-247.
  21. Singh S, Shackleton G, Ah-Sing E, et al. Antioxidant defenses in the bile duct ligated rats. *Gastroenterology* 1992; 103: 1625-1629.
  22. Muriel P, Gonzalez P. Liver damage induced by acute cholestasis in the rat is ameliorated partially by L-arginine. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1998; 120: 421-424.
  23. Heiman AS, Allen-Gibson D. Cytokines potentiate human eosinophil superoxide generation in the presence of N -nitro-L-arginine methyl ester. *International Journal of Immunopharmacology* 2000; 22: 171-181.
  24. Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, et al. Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production: key role of L-arginine availability. *Circulation* 2000; 101: 1261-1266.
  25. Lin M, Rippe RA, Niemela O, et al. Role of iron in NF-kappa B activation and cytokine gene expression by rat hepatic macrophages. *Am J Physiol* 1997; 272: G1355-1364.
  26. Solenski NJ, Kwan A. Attenuation of free radical generation during reversible focal cerebral ischemia with the nitric oxide inhibitor, L-NAME (L-N(G)-nitro-L-arginine methyl ester). *Brain Res* 2000; 862: 262-265.
  27. Harbrecht BG, Billiar T, Stadler J, et al. Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J. Leukocyte Biol.* 1992; 52: 390-394.
  28. Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, et al. Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: NG-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrite/nitrate biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukocyte Biol* 1990; 48: 565-569.
  29. Krahenbuhl S, Talos C, Lauterburg BH, et al. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 1995; 22: 607-612.
  30. Tsai LY, Lee KT, Lu FJ. Biochemical events associated with ligation of the common bile duct in Wistar rats. *J Formos Med Assoc* 1997; 96: 17-22.

31. Vallance P, Moncada S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* 1991; 337: 776-778.
32. Kanwar S, Kubes P, Tepperman BL, et al. Nitric oxide synthase activity in portal-hypertensive and cirrhotic rats. *J Hepatol* 1996; 25: 85-89.
33. Mayoral P, Criado M, Hidalgo F, et al. Effects of chronic nitric oxide activation or inhibition on early hepatic fibrosis in rats with bile duct ligation. *Clin Sci (Colch)* 1999; 96: 297-305.
34. Nahavandi A, Dehpour AR, Mani AR, et al. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *Eur J Pharmacol* 2000; 411: 135-141.
35. Hishida A, Honda N, Sudo M, et al. Mechanisms of altered renal perfusion in the early stage of obstructive jaundice. *Kidney Int.* 1980; 17: 223-230.
36. Kramer HJ, Schwarting K, Backer A. Impaired renal function in obstructive jaundice: enhanced glomerular thromboxane synthesis and effects of thromboxane receptor blockade in bile duct-ligated rats. *Clin Sci (Lond)* 1995; 88: 39-45.
37. Ackerman Z, Karmeli F, Amir G, et al. Renal vasoactive mediator generation in portal hypertensive and bile duct ligated rats. *J Hepatol* 1996; 24: 478-486.
38. Mun KC, Kwak CS, Kwon KY. The protective effect of allopurinol on cholestatic liver injury induced by bile duct ligation. *Korean Med Sci.* 1996; 11: 239-243.
39. Schimpl G, Pabst MA, Feierl G, et al. A tungsten supplemented diet attenuates bacterial translocation in chronic portal hypertensive and cholestatic rats: role of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *Gut.* 1999; 45: 904-910.
40. Ito H, Asahi H, Horiuchi S. Role of oxygen radicals in the pathogenesis of acute gastric mucosal lesion under obstructive jaundice. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1993; 94: 225-233.