

DENEYSSEL ENDOTOKSEMİDE NİTRİK OKSİT SENTAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİLERİ

Mehmet ÖZEK, Yağız ÜRESİN, Mehmet GÜNGÖR*

ÖZET

Nitrik oksidin sepsisteki olası rolünü değerlendirmek üzere planlanan bu çalışmada, endotoksemik sıçanlarda serum nitrit-nitrat düzeyleri ile karaciğer ve böbrek fonksiyonlarındaki değişiklikler ve bu değişikliklere nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin etkileri araştırılmıştır. Deneysel endotoksemide artan nitrit-nitrat düzeyleri ve organ bozukluklarına karşı iki değişik dozda uygulanan nonselektif nitrik oksit sentaz inhibitörü NG-nitro-L-arginin-metil ester artan nitrit-nitrat düzeylerini anlamlı olarak düşürürken, organ fonksiyonlarına belirgin bir etki oluşturmamış, selektif inhibitör L-Kanavanin ise nitrit-nitrat düzeylerini etkilemeden, düşük dozda karaciğer fonksiyon bozukluğuna neden olup, yüksek dozda belirgin iyileştirici etkinlik sağlamıştır. Elde edilen sonuçlar septisemide nitrik oksit yanında başka mekanizmaların rol oynayabileceğini ve nitrik oksit sentaz inhibitörü drogların ise bu inhibisyon yanında başka etkilere sahip olabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Nitrik oksit, endotoksemi, L-Kanavanin

SUMMARY

The effects of nitric oxide synthase inhibitors in experimental endotoxemia. In this study, that has been planned to evaluate the probable role of nitric oxide in sepsis, in endotoxemic rats serum nitrite+nitrate levels, the changes in liver and kidney functions and the effects of nitric oxide synthase inhibitors to these alterations have been investigated. In experimental endotoxemia, NG-nitro-L-argininine-methyl ester, has been administered at two different doses for increased serum nitrite+nitrate levels and organ dysfunctions and has decreased nitrite+nitrate levels, but has not revealed obvious effect on organ functions; however, selective inhibitor L-Canavanine, without effecting nitrite+nitrate levels, in low doses has caused liver dysfunction and in high doses provided evident improving effect. The results obtained in this study show that other mechanisms, in addition to nitric oxide, may play role in septicemia and nitric oxide synthase inhibition can have different effects beside this inhibition.

Key words: Nitric oxide, endotoxemia, L-Canavanine

GİRİŞ

Septik şok, septik hastalarda ortaya çıkan inatçı hipotansiyon ve hipoperfüzyona bağlı olarak akciğer, karaciğer, böbrekler ve beyin gibi yaşamsal öneme sahip organlara yeterlikan ve oksijenin ulaşamaması sonucu bu organlarda giderek ilerleyen işlev bozukluklarının gelişmesi ile karakterize bir klinik tablodur. Şoku oluşturan patojenezde rol oynayan endojen mediyatörler üzerindeki yoğun araştırmalarda kimi mekanizmalar belirli derecelerde aydınlatılarak bu mekanizmalara yönelik tedavilerde bazı gelişmeler sağlanmış olmasına karşılık klinikte şok tablosu

gelişmiş hastalarda hala %40-70 gibi yüksek oranlarda ölüm görülmektedir (21).

Son yıllarda pek çok fizyolojik ve fizyopatolojik olaylarda oynadığı rolü çok sayıda yoğun araştırmaların konusunu teşkil eden nitrik oksidin şokun oluşumunda da önemli bir endojen etken olabileceğine ilişkin araştırmalar bulunmaktadır. Nitrik oksidin septik şokta görülen vazodilatasyon ve inatçı hipotansiyonda major bir mediyatör olduğu iddia edilmektedir (9). Endotoksik şok sürecinde uyarıldığı açıkça belirlenen nitrik oksidin (18) bu süreç içinde açığa çıkarak etkinlik kazanan sitokin ve diğer endojen mediyatörlerle

perfüzyon bozukluğu ve karaciğer hasarı yaptığı ve bu hasarın nitrik oksit sentaz inhibitörü N^G -monometil-L-arginin (L-NMMA) ile inhibe edildiği gösterilmiştir ⁽¹⁾. Aynı şekilde sepsis sırasında ortaya çıkan ve şokun prognozunda kimi zaman belirleyici rol oynayan böbrek işlevlerinin bozulmasında da nitrik oksidin önemli katkısı bildirilmiştir ⁽¹⁵⁾.

Nitrik oksidin endotoksemi ve buna paralel olarak gelişen şoktaki önemini giderek daha iyi anlaşılmasına paralel olarak vücutta nitrik oksidin oluşumuna aracılık eden nitrik oksit sentazın etkinliğini inhibe edecek drogların şok tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir. Buna karşılık eldeki nitrik oksit sentaz inhibitörleri ile yapılan bilimsel çalışmalarda oldukça değişik sonuçlar elde edilmiştir. Bu inhibitör droglarla şokta dokularda görülen nitrit-nitrat düzey artışlarında azalma ve hemodinamik bozukluklarda iyileşme olduğunu bildiren araştırmalara karşılık ^(2,10,11,19), bu drogların etkisiz, dahası oluşan tabloyu daha da kötüleştirdiğini bildiren yayınlar da bulunmaktadır ^(4,13). Ayrıca yeni bulunan selektif nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin şoktaki etkinliğini konu alan araştırmaların sayısı da sınırlıdır.

Bu çalışmada, sıçanlarda lipopolisakkarid ile oluşturulan deneysel endotoksemide nonselektif N^G -nitro-L-argininin-metil ester (L-NAME) ile selektif L-Kanavanin'in iki farklı dozda karşılaştırmalı olarak dokulardaki nitrit-nitrat düzeyleri ile karaciğer ve böbrek işlevlerine etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Deney hayvanı :

Çalışmada Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında üretilen, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen erkek Wistar türü sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar de-

ney süresince sabit laboratuvar koşullarında tutularak, musluk suyu ve pelet şeklindeki standart hayvan yemi ile serbest beslendi.

Droglar :

Lipopolisakkarid (Lipopolysaccharide, LPS Escherichia coli serotype 0127:B8, Sigma); L-Kanavanin (L-Canavanine, Sigma); NG-nitro-L-argininin-metil ester (L-NAME, Sigma). İnjesiyon eriyikleri her gün taze olarak ve injesiyondan hemen önce hazırlandı. Droglar serum fizyolojik içinde eritilerek 0.1ml/10g olacak biçimde sulandırıldı.

Deneyin uygulanması :

Deney hayvanları her birinde 5 sıçan bulunan 6 gruba ayrıldı. 0.1 ml/10g serum fizyolojik injesiyonu yapılan ilk grup kontrol olarak alındı. Deney gruplarına ise periton içi uygulanan 10 mg/kg lipopolisakkarid ile deneysel endotoksemi oluşturuldu. Deney gruplarının ilki deneysel endotokseminin kontrol grubu olarak alındı, diğerlerine ise 1 saat sonra iki nitrik oksit sentaz inhibitörünün iki farklı dozu uygulandı. (Tablo 1).

Tablo 1. İlaç grupları ve dozlar

İlaç grupları	Uygulama
K 1	L-Kanavanin 100 mg/kg
K 2	L-Kanavanin 300 mg/kg
N 1	L-NAME 50 mg/kg
N 2	L-NAME 150 mg/kg

Deneyde kullanılan tüm hayvanlar ilk injesiyondan 5 saat sonra dekapitasyonla öldürüldü ve her hayvandan 6 ml kan alındı. Alınan kanlar ayrı ayrı santrifüje edilerek serumları ayrıldı ve ölçüm yapıncaya kadar derin dondurucuda $-20^{\circ}C$ 'de tutuldu.

Alınan serum örneklerinde alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), üre ve kreatinin değerlerinin ölçümü Hitachi 902 otoanalizör ile yapıldı;

nitrit+nitrat düzeyleri ise Griess reaksiyonu yöntemi ile spektrofotometrede (Pharmacia Biotech) ölçüldü (3).

İstatistiksel analiz :

Gruplardaki her hayvan için saptanan değerlerin ortalamaları ve bu ortalamaların standart hata değerleri hesaplandı. Hesaplanan değerlerin karşılaştırılabilirliği "One-Way ANOVA" ile belirlendikten sonra drog uygulanan gruplarda saptanan değerler ile kontrol ve lipolisakkarid gruplarının ortalama değerleri arasındaki farkın istatistiksel anlamlı olup olmadıkları Dunnett Çoklu Karşılaştırma (Multiple Comparison) testi ile araştırıldı. Ortalama değerler arasındaki farkta $p < 0.05$ olması durumunda farkın istatistiksel anlama sahip olduğu kabul edildi.

SONUÇ

Deneyel Endotoksemide Serum

Nitrit+Nitrat Düzeyleri ile Böbrek ve Karaciğer İşlevleri

Sıçanlarda, periton-içi 10 mg/kg lipopolisakkarit uygulanması ile oluşturulan deneyel endotoksemide, serum nitrit+nitrat düzeyleri kontrol grubuna göre yaklaşık 4 misli artmıştır (Tablo 2). Böbrek işlevlerinin göstergesi olan serum üre ve kreatinin düzeylerinde kontrol grubuna göre yine anlamlı bir artış görülmektedir. Serum AST ve ALT düzeylerinde endotoksemili sıçanlarda belirgin olarak artış olmakla birlikte, kontrol grubuna göre oluşan bu fark istatistiksel anlamlılık kazanmamıştır (Tablo 2).

Tablo 2. Deneyel endotoksemili sıçanlarda serum nitrit+nitrat düzeyleri ile üre, kreatinin, AST ve ALT değerleri

Gruplar	Nitrit+Nitrat	Üre	Kreatinin	AST	ALT
Kontrol	64.9 ± 1.01	31.4 ± 0.51	0.50 ± 0.003	268.0 ± 5.63	92.2 ± 3.16
Endotoksemi	252.0 ± 21.78*	88.6 ± 3.85*	0.81 ± 0.04	439.4 ± 39.55	144.2 ± 10.6

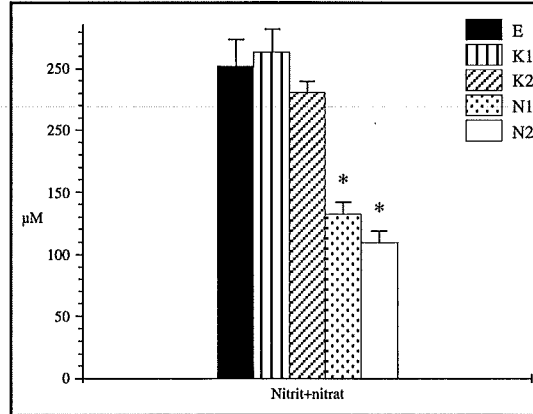
Kontrol grubundaki sıçanlara 0.1 ml/10g serum fizyolojik, endotoksemi oluşturmak için 10 mg/kg Lipopolisakkarit (E.coli) periton içi uygulandıktan 5 saat sonra elde edilen serumda değerler saptanmıştır. Değerler her gruptaki 5 sıçanın ortalama ± standart hata değerleri olarak gösterilmiştir.

* $p < 0.05$ (Dunnett)

Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörlerinin Deneyel Endotoksemide Serum Nitrit+Nitrat Düzeylerine Etkisi

Nitrik oksit sentazın selektif inhibitörü olan L-Kanavanin deneyde kullanılan her iki dozda da serum nitrit+nitrat düzeylerinde önemli bir değişiklik oluşturmamıştır (Şekil 1). Buna karşılık selektif olmayan nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NAME her iki dozda da serum nitrit+nitrat düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır.

Şekil 1. Nitrik oksit sentaz inhibitörleri L-Kanavanin ve L-NAME'nin deneyel endotoksemili sıçanlarda serum nitrit+nitrat düzeylerine etkisi. Periton-içi 100 mg/kg ve 300 mg/kg L-Kanavanin (K1 ve K2) ile 50 mg/kg ve 150 mg/kg L-NAME (N1 ve N2) uygulandıktan 4 saat sonra elde edilen serumlarda nitrit+nitrat düzeyleri saptanmıştır. Her gruptaki 5 sıçanın ortalama değerleri hesaplandıktan sonra, drog uygulanan gruplarla uygulanmayan grubun istatistiksel analizi yapılmıştır. * $p < 0.05$ (Dunnett)



Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörlerinin Endotoksemili Sıçanlarda Böbrek İşlevlerine Etkisi

Nitrik oksit sentazın selektif olmayan inhibitörü L-NAME uygulanan her iki dozda da

serum üre ve kreatinin düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır (Şekil 2). Selektif inhibitör L-Kanavanin 100 mg/kg dozda serum üre düzeylerini anlamlı olarak artırmıştır (Tablo 3). Buna karşılık aynı doz L-Kanavanin serum kreatinin düzeylerinde belirgin bir değişiklik oluşturmadağı gibi, daha yüksek dozlarda (300 mg/kg) L-Kanavanin ne serum üre düzeylerinde ne de kreatinin düzeylerinde önemli bir değişiklik oluşturmuştur. Bu dozda serum kreatinin düzeylerinde görülen azalmada ise istatistiksel anlamlılık saptanamamıştır.

Tablo 3. L-Kanavanin ve L-NAME'nin deneySEL endotoksemili (E) sıçanlarda serum üre ve kreatinin düzeylerine etkileri

Gruplar	Üre	Kreatinin
E	88.6 ± 3.85	0.81 ± 0.04
K 1	109.0 ± 3.70*	0.82 ± 0.07
K 2	95.4 ± 2.04	0.66 ± 0.02
N 1	98.8 ± 3.70	0.91 ± 0.02
N 2	94.6 ± 3.28	0.84 ± 0.09

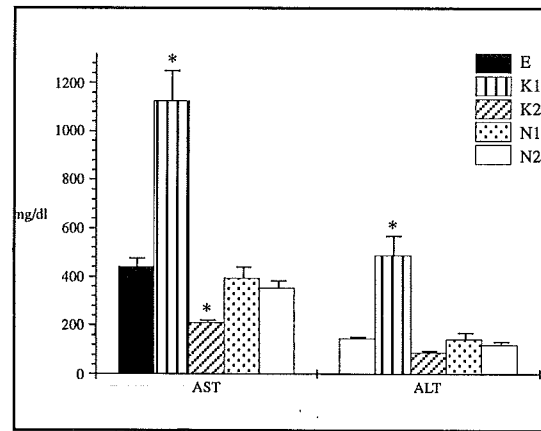
^a Periton-içi 100 mg/kg ve 300 mg/kg L-Kanavanin (K1 ve K2) ile 50 mg/kg ve 150 mg/kg L-NAME (N1 ve N2) uygulandıktan 4 saat sonra elde edilen serumlarda üre ve kreatinin düzeyleri saptanmıştır. Her gruptaki 5 sıçanın ortalama değerleri hesaplandıktan sonra, drog uygulanan gruplarla uygulanmayan grubun istatistiksel analizi yapılmıştır. *p<0.05 (Dunnett)

Nitrik Oksit Sentaz İnhibitörlerinin DeneySEL Endotoksemide Karaciğer İşlevlerine Etkisi

Selektif nitrik oksit sentaz inhibitörü L-Kanavaninin 100 mg/kg dozlarda serum AST düzeyini belirgin ve anlamlı bir biçimde artırdığı, 300 mg/kg dozlarda ise karşıt bir etkinlikle AST düzeyini anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır (Şekil 3). Düşük doz L-Kanavanin serum ALT düzeyini de anlamlı olarak artırmış, yüksek dozu ise serum ALT düzeyini kontrol hayvanlarının değerine düşürmüştür. Selektif olmayan nitrik oksit sentaz inhibitörü L-NAME'nin ise çalışmada kulla-

nılan her iki dozda da (50 mg/kg ve 150 mg/kg) AST ve ALT düzeylerinde önemli bir değişiklik oluşturmadağı görülmüştür (Şekil 3).

Şekil 2. L-Kanavanin ve L-NAME'nin endotoksemili (E) sıçanlarda serum AST VE ALT düzeylerine etkileri. Periton-içi 100 mg/kg ve 300 mg/kg L-Kanavanin (K1 ve K2) ile 50 mg/kg ve 150 mg/kg L-NAME (N1 ve N2) uygulandıktan 4 saat sonra elde edilen serumlarda AST ve ALT düzeyleri saptanmıştır. Her gruptaki 5 sıçanın ortalama değerleri hesaplandıktan sonra, drog uygulanan gruplarla uygulanmayan grubun istatistiksel analizi yapılmıştır. *p<0.05 (Dunnett)



TARTIŞMA

Daha etkin tedavi için yoğun çalışmalar yapıldığı, buna karşılık büyük oranda ölümlerle sonuçlanan şokun klinikte en sık rastlanan biçimi septisemi oluşturan bakterilerin toksinleriyle ortaya çıkan septik şoktur. Bu nedenle deneySEL modellerde septik şokun en sık rastlanan etkenlerinden birisi olan E.coli'den elde edilen lipopolisakkarit endotoksin kullanılır. Lipopolisakkarit endotoksinle oluşturulan deneySEL endotoksemi klinikte karşılaşılan septik şok tablosu ile birebir özdeş sayılmasa da pek çok yönde yakın benzerlikler gösterir. Bu çalışmada sıçanlara uygulanan lipopolisakkarit endotoksin ile böbrek ve karaciğer işlevlerinde, olasılıkla hipotansiyon ve perfüzyon yetersizliğine bağlı, değişen derecelerde işlev bozuklukları saptanmıştır (Tablo 2).

Şok tablosunun oluşumunda pek çok endojen madde ve mediyatörün rol oynadığı ka-

bul edilmektedir. Son yıllarda nitrik oksidin şoktaki rolü üzerinde yoğun araştırmalar yapılmıştır (6,17,18). Çalışmamızda nitrik oksidin dokulardaki oluşumu ve etkinliğinin artmasının bir göstergesi olarak kabul edilen serum nitrit+nitrat düzeylerinin kontrol grubuna göre çok yüksek düzeylere çıkmasının saptanması (Tablo 2) nitrik oksidin şokta kabul edilen rolünün bir kez daha destekleyen bir bulgudur.

Nitrik oksidin fizyolojik koşullarda oluşumunu sağlayan yapısal nitrik oksit sentaz yanında patolojik durumlarda oluşumuna aracılık eden indüklenebilir nitrik oksit sentaz bu tür olaylarda belirleyici faktör olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle bu enzimi inhibe eden drogların diğer patolojik olaylarda olduğu gibi şokun tedavisinde de yararlı olabileceği düşünülmektedir. Fakat nitrik oksit sentaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda umulan belirgin sonuçlar elde edilememiştir. Nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin şokta yararlı olduklarını bildiren araştırmalar (7,8,11,15,16) yanında herhangi bir etkinlik sağlanamadığını (14,20,22) ve dahası bu drogların şokta olumsuz ve kimi zaman zararlı etkinlik oluşturduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (12,13). Bu çalışmada nitrik oksit sentazın nonselektif inhibitörü olan L-NAME'nin kullanılan iki dozda serum nitrit+nitrat düzeylerini anlamlı olarak azaltmakla birlikte (Şekil 1), deneysel endotoksemide bozulan böbrek ve karaciğer işlevlerini iyileştirici yöndeki etkinliği belirgin olmamıştır (Şekil 2 ve 3). Selektif inhibitör L-Kanavanin ise çok daha farklı ve ilginç bir etkinlik göstermiştir. Şöyle ki, düşük doz (100 mg/kg) L-Kanavanin serum nitrit+nitrat düzeylerini daha da artırıp (Şekil 1), böbrek ve karaciğer işlevlerinin de bozulmasına neden olurken, yüksek dozları (300 mg/kg) ölçülen parametrelerde olumlu bir etkinlik göstermiştir (Şekil 2, Tablo 3)

Bu çalışmada, deneysel endotoksemide ortaya çıkan organ fonksiyon bozukluklarında

nitrik oksit sentazın nonselektif inhibisyonu ile olumlu ya da olumsuz bir etki görülmemiştir. Selektif inhibitör L-Kanavanin ile ortaya çıkan sonuçlar ise L-Kanavanin'in indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibisyonundan farklı, başka mekanizmalarla organ fonksiyonlarını doza bağımlı olarak hem olumlu hem de olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen bu sonuçlar, deneysel endotoksemide nitrik oksidin rol oynayabileceği fakat nitrik oksit sentaz inhibitörü drogların etkinliğinin kullanılan doz ve septik şokta ölçülen parametrelerdeki farklılıklar nedeniyle değişkenlik sağlayabileceği ve bu değişkenlikte nitrik oksit sentaz inhibitörlerinin diğer etkinliklerinin önem taşıyabileceğini düşündürmektedir. İnhibitör drogların diğer özelliklerinin ortaya konabileceği yeni araştırmalar konunun daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Di Silvio M, Nussler AK, Geller DA, Billiar TR: A role for nitric oxide in liver inflammation and infection, in Nitric oxide : Principles and Actions, Academic Press, New York (1996), sayfa: 219
2. Evans TE, Carpenter A, Silva A, Cohen J: Inhibition of nitric oxide synthase in experimental gram negative sepsis. J Inf Dis 169:343 (1994).
3. Fink MP, Fiallo V, Stein KL, Gardiner WM: Systemic and regional hemodynamic changes after intraperitoneal endotoxin in rabbits. Development of a new model of the clinical syndrome of hyperdynamic sepsis. Circ Shock 22:73 (1987).
4. Fukatsu K, Saito H, Fukushima R et al: Detrimental effects of a nitric oxide synthase inhibitor (N-ω-nitro-L-arginine-methyl-ester) in a murine sepsis model. Arch Surg 130:410 (1995).
5. Kilbourn R: Nitric oxide and shock. Dis Mon 43:281 (1997).
6. Kirkebøen KA and Strand ØA: The role of nitric oxide in sepsis-an overview. Acta Anaesthesiol Scand 43:275 (1999).
7. 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 (1997).
8. Liaudet L, Rosselet A, Schaller MD, Markert M, Perret C, Feihl F: Nonselective versus selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental endotoxic shock. J Infect Dis 177:127 (1998).
9. Lorente JA, Landin L, De Pablo R, Renes E, Liste D: L-arginine pathway in the sepsis syndrome. Crit Care Med 21:1287 (1993).

10. Meyer J, Ientz CW, Stothert JC, Traber LD, Herndon DN, Traber DL: Effects of nitric oxide synthesis inhibition in hyperdynamic endotoxemia. *Crit Care Med* 22:306 (1994).
11. Nava E, Palmer RMJ, Moncada S: The role of nitric oxide in endotoxin shock: effects of L-NMMA. *J Cardiovasc Pharmacol* 20(suppl):S132 (1992).
12. Ou J, Carlos TM, Watkins SC, Saavedra JE, Keefer LK, Kim YM, Harbrecht BG, Billiar TR: Differential effects of nonselective nitric oxide synthase (NOS) and selective inducible NOS inhibition on hepatic necrosis, apoptosis, ICAM-1 expression, and neutrophil accumulation during endotoxemia. *Nitric Oxide* 1:404 (1997).
13. Park JH, Chang SH, Lee KM, Shin SH: Protective effect of nitric oxide in an endotoxin-induced septic shock. *Am J Surg* 171:340 (1996).
14. Rosselet A, Feihl F, Markert M, Gnaegi A, Perret C, Liaudet L: Selective iNOS inhibition is superior to norepinephrine in the treatment of rat endotoxic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 157:162 (1998).
15. Schwartz D, Mendonca M, Schwartz I, Xia Y, Satriano J, Wilson CB, Blantz RC: Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. *J Clin Invest* 100:439 (1997).
16. Szabó C, Southan GJ, Thiemeermann C: Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12472 (1994).
17. Thiemeermann C: Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol* 29:159 (1997).
18. Titheradge MA: Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta* 1411:437 (1999).
19. Tracey WR, Tse J, Carter G: Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 272:1011 (1995).
20. Vos TA, Gouw ASH, Klok PA, Havinga R, Van Goor H, Huitema S, Roelofsen H, Kuipers F, Jansen PLM, Moshage H: Differential effects of nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced liver damage in rats. *Gastroenterology* 113:1323 (1997).
21. Wenzel RP: The mortality of hospital acquired infections: need for a new vital statistics ? *Int J Epidemiol* 17:225 (1998).
22. Wu CC, Ruetten H, Thiemeermann C: Comparison of the effects of aminoguanidin and N- ω -nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxemia in the rat. *Eur J Pharmacol* 300:99 (1996).