

**RATLARDA LİPOLİSAKKARİD VE LİPOTEİKOİK ASİT İLE OLUŞAN KARACİĞER
HASARINDA L-ARGİNİN VE N^G-NİTRO-L-ARGİNİN METİLESTER'İN ETKİSİ¹****THE EFFECTS OF L-ARGININE AND N^G-NITRO-L-ARGININE METHYLESTER ON
LYPOPOLYSACCHARIDE AND LIPOTEICHOIC ACID INDUCED LIVER INJURY IN THE RAT****Dr. Atilla ENGİN¹, Dr. Osman KURUKAHVECİOĞLU², Dr. Neslihan BUKAN³, Dr. Ayşe DURSUN⁴****ÖZET**

Amaç: Sepsisin erken döneminde, nitrik oksit'in (NO) karaciğerin yapı ve fonksiyonu üzerindeki etkileri halen tartışmalıdır. Bu çalışmanın amacı; lipopolisakkarid (LPS) veya lipoteikoik asid (LTA) verilen ratlarda, NO'in karaciğer hasarına etkisini incelemektir.

Gereç ve yöntem: Yüzyirmialtı rat randomize ve eşit olarak LTA veya LPS verilen iki gruba ayrıldı. Her grup, üç alt gruba bölünerek, birinci alt gruba %0.9 sodyum klorür (SF), ikinci alt gruba L-Arginin (L-Arg), üçüncü alt gruba ise N^G-nitro-L-arginin metilester (L-NAME) verildi. Bir saat sonra birinci gruba 3mg/kg LTA, ikinci gruba ise 5mg/kg LPS uygulanarak plazma nitrit ve nitrat [NO_x] değerleri ölçüldü. Karaciğer hasarı, serum aminotransferaz seviyeleri ve hücre nekrozunun yaygınlığına göre skorlandırıldı.

Bulgular: L-NAME, LPS'den sonra plazma [NO_x] düzeyinde azalma, karaciğer hasarında artma meydana getirdi, LTA'dan sonra ise [NO_x] düzeyinde artışla (p=0.0006) birlikte karaciğerde sinüzoidal dilatasyona yol açtı. L-Arg, [NO_x] düzeyini artırarak hepatositleri LPS hasarına karşı korurken, LTA'dan sonra oluşan karaciğer hasarını belirgin biçimde artırdı.

Sonuçlar: NO, LPS verilen ratlarda karaciğer hasarını azaltmakta, LTA verilenler de ise artırmaktadır.

Anahtar kelimeler: nitrik oksit, lipoteikoik asid, endotoksin, septik şok

ABSTRACT

Background: Whether nitric oxide (NO) protects or impairs the liver function and structure during the early phase of sepsis is still controversial. The aim of this study is to evaluate the effect of NO on lipopolysaccharide (LPS) or lipoteichoic acid (LTA) induced liver injury in rats.

Methods: One hundred twenty-six Wistar rats were assigned randomly and equally to LTA and LPS groups. Each group was divided into three subgroups which received saline, L-Arginine (L-Arg) or N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME) consecutively, one hour prior to either 5 mg/kg LPS or 3 mg/kg LTA injection. Plasma nitrite plus nitrate [NO_x] were measured. Liver injury was assessed by measuring the rises in circulating liver enzymes and by scoring the extent of liver necrosis.

Results: Administration of L-NAME+LPS not only reduced [NO_x] production but also enhanced liver damage. L-NAME+LTA caused an increase in the plasma levels of [NO_x] (p=0.0006), and produced sinusoidal enlargement in liver. L-Arg protected the hepatocytes against LPS injury, whereas, enhanced the liver damage in the LTA group.

Conclusion: Our data indicated that overproduction of NO exerts detrimental effect on LTA-treated rats while providing a protective function in LPS group.

Key words: nitric oxide, lipoteichoic acid, endotoxin, septic shock

GİRİŞ

Genel cerrahi yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda multiorgan yetmezliğinin en yaygın sebebi intraabdominal enfeksiyonlardır.¹ Bu hastalarda meydana gelen sepsiste 1980'li yıllara kadar %90 oranında gram negatif bakteriler sorumlu iken, bu gün gram pozitif bakteri izole edilme oranı %30-50'ye yükselmiş ve sepsis patogenezinde de önemli değişiklikler gündeme gelmiştir.²⁻⁶ Gram

negatif bakteri sepsisinde sistemik cevap bir hücre duvarı komponenti olan LPS'le başlatılmakta, gram pozitif bakteri sepsisinde ise aktivatör molekül yine bir bakteri duvar komponenti olan LTA-peptidoglikan (pep-G) kompleksidir.^{7,8} Gram negatif bakterideki LPS'in gram pozitif bakterideki LTA'ya eşdeğer olarak kabul edilmesine rağmen,⁹ gram pozitif bakteri sepsisinde karaciğer hasarının ancak LTA ve pep-G'nin sinerjistik etkisi ile müm-

kün olabildiği ileri sürülmektedir.^{1,10,11} Aslında, LTA'nın tek başına da TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve NO gibi mediyatörlerin serbestleşmesini uyardığı gösterilmiş, ancak, LPS'le karşılaştırıldığında toksisitesinin daha düşük olduğu tesbit edilmiştir.¹² Yapılan çalışmalar, LTA'nın daha çok hemodinamik etkileri üzerinde yoğunlaşmakta ve sebep olduğu dolaşım yetmezliği ve karaciğer hasarının indüklenebilir nitrik oksid sentaz'ın (iNOS) ekspresyonu sonucunda NO sentezinde artmaya bağlı olduğu düşünülmektedir.¹³⁻¹⁵ Endotoksemide ise, LPS'le NO sentezinde görülen artmanın karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmüştür. Non-selektif ve iNOS-selektif inhibitörlerle yapılan çalışmalar iNOS'dan daha çok, sinüzoidal hücrelerdeki endotelial nitrik oksid sentaz'ın (eNOS) endotoksemisinin erken fazında aktive olarak karaciğer perfüzyonunu koruduğunu ortaya koymaktadır.¹⁶

Bu çalışmanın amacı, sepsisteki inflamatuvar cevapta önemli mediyatörlerden biri olan NO'nin, LPS ve LTA ile meydana gelen karaciğer hasarındaki etkisini karşılaştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, 250-300 g ağırlığında 126 adet erişkin erkek Wistar albino rat'da, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Komitesi tarafından onaylanan protokola göre yapıldı. Çalışma öncesi standart rat yemi ile beslenen denekler, deneyden 8 saat önce aç bırakıldılar. Ratlar randomize olarak önce iki eşit gruba ayrıldılar. Daha sonra her iki gruptaki 63 rat, her biri 21 denekten meydana gelen üç alt gruba bölündü. Birinci alt gruplara subkütan (sc) 1ml SF, ikinci alt gruplara sc 100mg/kg L-Arg, üçüncü alt gruplara ise non-spesifik bir iNOS inhibitörü olan L-NAME sc. 5mg/kg verildi. Bu uygulamadan bir saat sonra birinci gruptaki 63 rata intraperitoneal (ip) 3mg/kg LTA (Staphylococcus aureus), ikinci gruba ise ip 5 mg/kg LPS (E.coli O55 : B5) verildi. LTA ve LPS'i takip eden 6 saatlik izleme süreci içinde, her alt gruptan; ikinci, dördüncü ve altıncı saatlarda randomize olarak alınan yedişer rata 30 mg/kg intramüsküler ketamin-Hcl (Ketalar®, Eczacıbaşı Warner Lambert, İstanbul, Turkey) anestezisi verilerek venöz kan ve karaciğer örnekleri alındı.

Kan örneklerinde 2., 4. ve 6. saatlerde hepatik pankanal hasar için spesifik bir belirleyici olan serum aspartat aminotransferaz (AST), nonspesifik belirleyiciler olarak da alanin aminotransferaz (ALT) ile laktik dehidrogenaz (LDH) aktiviteleri ölçüldü ve bunlarla eş zamanlı plazma [NO_x] ölçümleri yapıldı. Karaciğer enzimleri klinik analizörde ticari kitlerle ölçüldü. NO'nin primer oksidasyon ürünü olan nitrit Green ve ark.¹⁷, nitrat ise Phuong

ve ark.¹⁸, tarafından tarif edilen yöntemlere göre ölçüldü.

Karaciğer örnekleri %10 luk formalinde tesbit edildikten sonra Hematoksilin-Eosin'le boyanıp ışık mikroskopunda incelendi ve doku hasarı, 0, nekroz görülmedi; 1+ her lezyonda 1 veya 2 fokal hücre nekrozu; 2+, her lezyonda ikiden fazla hücre nekrozu; 3+, yaygın birleşik nekroz alanları; 4+, yaygın nekroz ve santral venler arasında nekrotik köprü teşekkülü olarak skorlandırıldı.¹⁹ LPS verilen deneklerde ışık mikroskobu düzeyinde yukarıdaki skorlandırmaya uygun olarak hasar tesbiti yapılabildiği halde, LTA verilen ratlarda değerlendirmenin yeterli olmadığı anlaşıldığından ip LTA dan 2, 4 ve 6 saat sonra alınan doku örnekleri gluteraldehidle tesbit edildi. Daha sonra uranil asetat ve kurşun sitratla boyanarak elektron mikroskobu düzeyinde organel hasarları değerlendirildi.

Sonuçlar ortalama \pm SEM olarak verildi. İki bağımsız grup arasındaki karşılaştırma nonparametrik Mann-Whitney U-Test'ine göre yapılarak 0.05 den daha küçük olarak elde edilen p değerleri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

SONUÇLAR

Bu çalışmada, deneklerin gözlem süresi olan altı saat içinde herhangi bir mortalite tesbit edilmedi. Tek başına SF, L-Arg veya L-NAME uygulaması ile bazal plazma [NO_x] konsantrasyonlarında ve serum karaciğer enzim düzeylerinde önemli bir değişiklik görülmedi. SF ön uygulaması yapılan ratlarda LPS veya LTA dan sonra 2. saatta plazma [NO_x] düzeyleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı. Ancak, SF+LPS grubunda, dördüncü saatta 2.5 kat, altıncı saatta ise 3.2 kat artış meydana gelirken, SF+LTA grubunda önemli bir yükselme tesbit edilmedi (p=0.0012). Buna karşılık, L-NAME verilen deneklerde LTA'dan sonra 2. saatta hem SF+LTA verilenlere göre hem de LPS verilenlere göre önemli bir [NO_x] artışı meydana geldi (p=0.0017). LPS verilenlerde L-NAME ile 2. saatta başlayan [NO_x] sentez inhibisyonu altıncı saata kadar düzenli bir şekilde devam ederek ikinci saatte %47, dördüncü saatte %15 ve altıncı saatte %51 oranında azalma meydana getirdi. L-NAME ön uygulaması yapılan ratlarda ip LTA'dan sonra ise SF+LTA verilenlere göre plazma [NO_x] düzeylerinde, ikinci saatte %34, dördüncü saatte %186, altıncı saatte %50 artış meydana geldiği görüldü. Bu bulgu, elektron mikroskopik kesitlerde görülen sinüzoidal dilatasyon ve stazla uyumludur. L-Arg ön uygulaması yapılan ratlarda, LPS verilenlerde daha fazla olmak üzere hem LPS, hem de LTA'dan sonra [NO_x] sentezinde üniform şekilde istatistiksel olarak önemli artış gözlemlendi. Ancak, L-Arg+LPS veri-

Ratlarda Lipopolisakkarid ve Lipoteikoik Asit ile Oluşan Karaciğer Hasarında ...

Tablo 1. SF, L-NAME ve L-Arg ön uygulamasından bir saat sonra LTA ve LPS'in plazma [NO_x] düzeylerine etkisi. Ortalama \pm SEM (μ M/l)

LPS veya LTA'dan sonra geçen süre (saat)	LPS (n=63)			LTA (n=63)		
	2	4	6	2	4	6
SF	107 \pm 8.4	267.1 \pm 13.8	341.4 \pm 13.2	97.1 \pm 3.7	70.3 \pm 1.3	106.9 \pm 3.7
L-NAME	57.1 \pm 6.4	228.9 \pm 6.8	166.8 \pm 11.7	130.6 \pm 3.7	202.5 \pm 3.7	159.1 \pm 2
L-arg	224.8 \pm 3.5	405.7 \pm 8.4	421.3 \pm 16.9	189.5 \pm 5.1	290.6 \pm 5.4	157 \pm 3.8

lenlerle L-Arg+LTA verilenlerin [NO_x] düzeylerinin istatistiksel karşılaştırılmasında; LPS uyarısının daha etkin olduğu tespit edildi (2. saatte p=0.0027, 4.saatte p=0.0017, 6.saatte p=0.0017) (Tablo 1). SF+LPS ve SF+LTA verilen ratlar, serum AST, ALT ve LDH düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında (Tablo 2); LPS'in serum AST, ALT ve LDH düzeyle-

tirildiğinde; [NO_x] konsantrasyonlarında LTA ile ikinci ve dördüncü saatlarda görülen önemli artış (p=0.0017), karaciğer hasarı için spesifik olan AST düzeyini ikinci ve dördüncü saatlarda LPS verilen deneklerde elde edilen AST düzeyine çıkardı. Bununla beraber, serum ALT ve LDH düzeyleri altı saat süresince L-NAME+LPS verilen ratlarda yaklaşık

Tablo 2. SF, L-NAME ve L-Arg ön uygulamasından bir saat sonra verilen ip LTA ve LPS'in 2, 4 ve 6. saatlerde meydana getirdiği karaciğer hasarına bağlı serum AST ve ALT değerlerinin karşılaştırılması.

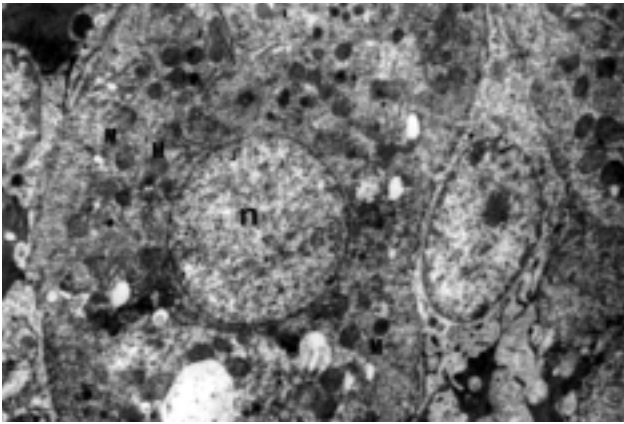
Serum Karaciğer Enzimi (Saat)	Karşılaştırılan gruplar ve gruplar arası kantitatif fark	P değerleri
AST (2)	SF+LPS> SF+LTA	p= 0.0081
AST (4)	SF+LPS> SF+LTA	p= 0.0027
AST (6)	SF+LPS> SF+LTA	p= 0.0027
ALT (2)	SF+LPS> SF+LTA	p= 0.0214
ALT (4)	SF+LPS> SF+LTA	p= 0.0027
ALT (6)	SF+LPS> SF+LTA	p= 0.0027
AST (2)	L-NAME+LPS<L-NAME+LTA	p= NS
AST (4)	L-NAME+LPS<L-NAME+LTA	p= NS
AST (6)	L-NAME+LPS>L-NAME+LTA	p= 0.0017
ALT (2)	L-NAME+LPS>L-NAME+LTA	p= 0.0017
ALT (4)	L-NAME+LPS>L-NAME+LTA	p= 0.0017
ALT (6)	L-NAME+LPS>L-NAME+LTA	p= 0.0017
AST (2)	L-Arg+LPS> L-Arg+LTA	p= 0.0126
AST (4)	L-Arg+LPS> L-Arg+LTA	p= 0.0126
AST (6)	L-Arg+LPS> L-Arg+LTA	p= 0.0407
ALT (2)	L-Arg+LPS> L-Arg+LTA	p= 0.0087
ALT (4)	L-Arg+LPS> L-Arg+LTA	p= 0.0017
ALT (6)	L-Arg+LPS> L-Arg+LTA	p= 0.0017

rinde istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirerek daha fazla hepatoselüler hasara yol açtığı görüldü. Ancak, L-NAME ön uygulaması yapılan ratlarda, bu non-spesifik iNOS inhibitörüne rağmen ip LTA'dan sonra, SF+LTA verilenlere göre plazma [NO_x] düzeylerinde artışın karaciğer hasarı için spesifik olan AST değerlerinde yükselme ile birlikte olduğu görüldü. Aynı şekilde LPS verilenlerle karşıla-

şma iki kat yüksek bulunmuştur (p=0.0017). Genel olarak, LPS, LTA'ya nazaran daha fazla karaciğer hasarı meydana getirmekle birlikte, en fazla hasar L-NAME+LPS verilen ratlarda tesbit edilmiştir. L-Arg verilen ratlarda, gerek SF gerekse L-NAME verilenlere oranla LTA'dan sonra ilk dört saatte en yüksek [NO_x] düzeyleri elde edilmiş ancak, AST düzeyleri SF+LTA grubundan yüksek, L-NAME+LTA grubun-

dan düşüktür. L-Arg+LTA ile L-NAME+LTA grupları arasında ALT ve LDH düzeyleri bakımından önemli bir fark bulunmamıştır. LPS verilen ratlarda en düşük serum enzim düzeyleri L-Arg grubunda olmakla birlikte, LTA verilenlere oranla bütün gruplarda karaciğer hasarının daha fazla olduğu görülmüştür.

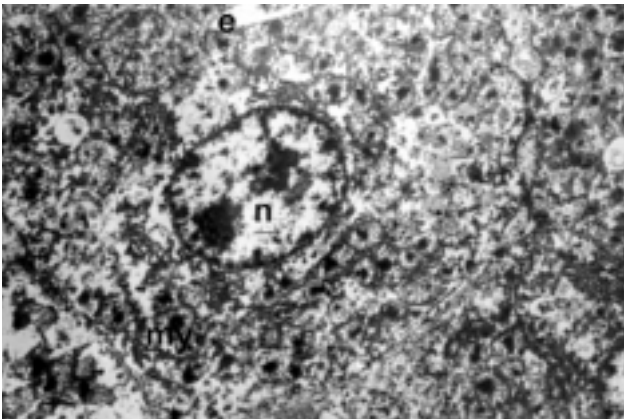
Tüm deneklerin karaciğer örnekleri ışık mikroskobu düzeyinde değerlendirildi: SF+LPS verilen grupta 2+, L-NAME+LPS verilen grupta 3+, L-Arg+LPS verilen grupta ise 0, 1+ ortalama hasar düzeyleri elde edildi. LTA verilen ratlarda ise ışık mikroskobu düzeyinde karaciğer hasar skorlaması mümkün olmadığından yapılan elektron mikroskopik incelemelerde; SF+LTA grubunda (Resim 2), kontrol grubu (Resim 1)



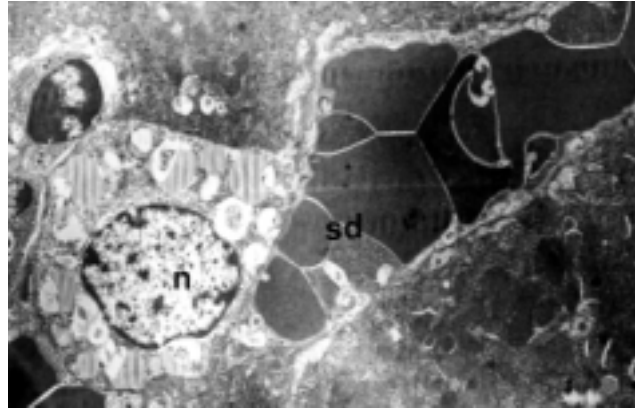
Resim 1. Normal hepatositin elektron mikroskopik görünümü.

(Uranil asetat / kurşun sitrat x 13200) n: nukleus, M: mitokondri

ile karşılaştırıldığında mitokondrilerde sferik görünüm ve santral yoğunlaşma meydana geldiği görüldü. L-NAME ön uygulaması yapılanlarda ise mitokondri,



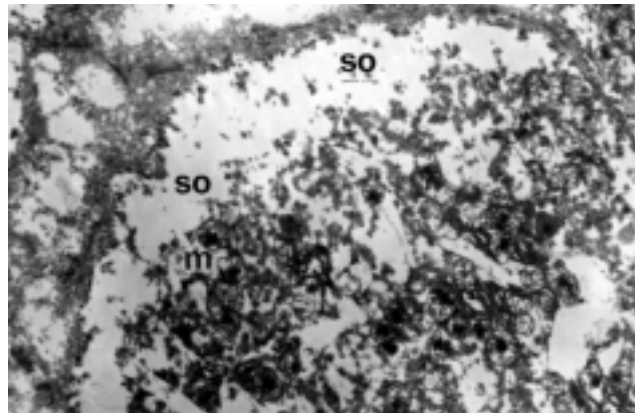
Resim 2. SF+LTA grubunda mitokondrilerde santral yoğunlaşma ve nukleusta kromatin dağılımında bozulma. (Uranil asetat / kurşun sitratx12000) n: nukleus, my: mitokondrilerde santral yoğunlaşma



Resim 3. L-NAME+LTA grubunda sinüzoidal dilatasyon ve sinüzoidal akımda staz.

(Uranil asetat / kurşun sitratx12000) n: nukleus, sd: sinüzoidal dilatasyon

endoplazmik retikülüm ve kollajen miktarında artış, sinüzoidlerde dilatasyon ve stagnasyon, Kupffer hücrelerinde ise proliferasyon tespit edildi (Resim 3). L-Arg ön uygulaması yapılan ratlarda (Resim 4) hepatositlerin sitoplazmalarında periferel organel kaybı ile en ağır hasarın meydana geldiği anlaşıldı.



Resim 4. L-Arg+LTA grubunda hepatositlerin periferel zonunda dejenerasyon ve organel kaybı.

(Uranil asetat / kurşun sitratx12000) m: mitokondri, so: sitoplazmik dejenerasyon ve organel kaybı bölgeleri

TARTIŞMA

Gram pozitif ve gram negatif bakterilerle meydana gelen sepsiste karaciğer hasarına sebep olan en önemli faktörün reaktif oksijen radikalleri olduğu gösterilmiştir.^{10,20} Sepsiste makrofajlar, Kupffer hücreleri ve hepatositler tarafından bir inflamasyon mediatörü olarak üretilen NO, bu reaktif oksijen radikalleri ile tepkimeye girerek biyolojik etkilerini antagonize ederler veya daha sitotoksik bir

radikal olan peroksinitritlere dönüşürler. Endotoksemide, karaciğer hasarında etkili olan nitrik oksit sentaz tipini belirleme çalışmaları, erken fazda meydana gelen eNOS ekspresyonunun karaciğer perfüzyonunun korunması ve trombüs teşekkülünün önlenmesinde koruyucu rolü olduğunu göstermiştir.²¹ Daha sonraki aşamalarda ise iNOS indüksiyonu ile, iNOS eksprese eden hücrenin tipine bağlı olarak farklı miktar ve sürelerde NO sentezi meydana gelir.^{16,22} NO, karaciğerin redoks durumu, reaktif oksijen radikallerinin yoğunluğu ve uyarının tipine bağlı olarak farklı etkiler meydana getirebilmektedir. Eğer, NO ve reaktif oksijen radikalleri üretimi eşit oranlarda olursa NO, lipid peroksidasyonu uyararak hücre hasarına yol açmakta, buna karşılık, reaktif oksijen radikallerine oranla daha fazla NO sentez edilirse, NO, peroksil ve alkoksil radikallerini tutarak peroksidasyonun azalmasını ve hücrenin korunmasını sağlamaktadır.^{23,24} İntrasellüler süperoksit anyonları tutarak hidroksil radikal oluşumunu önleyen piperidin nitroksitin, LTA/PepG verilen ratlarda sentezlenen NO karşısında serbest radikal üretimini azaltarak peroksinitrit/ reaktif oksijen radikal hasarını önlediği gösterilmiştir.¹⁰

Bu çalışmada, ratlara LPS ve LTA verilmesi fark-

lı miktarlarda NO sentezi indüksiyonu ile sonuçlanmıştır. LTA, LPS'e nazaran daha zayıf bir uyarıcı olup, meydana getirdiği karaciğer hasarı da daha azdır. İNOS'a göre eNOS için daha potent bir inhibitör olan L-NAME ön uygulaması yapılan ratlarda, LPS'den sonraki erken fazda NO sentezinde düşme, LPS'in başlangıç fazında eNOS uyarısı yaptığı bulgusunu doğrulamaktadır.^{25,26} Bu ratlarda karaciğer hasarında da artma tespit edilmiştir. Buna karşılık, L-Arg verilmesi NO düzeyini yükseltmiş fakat, karaciğer hasarını önemli ölçüde azaltmıştır. LPS verilen grupta NO sentezi ve karaciğer hasarı arasında bir ters orantı söz konusudur.

LTA verilen grupta ise, L-NAME'in, daha çok eNOS inhibitörü olması ve LTA ile erken fazda da iNOS uyarısı meydana gelmesi nedeniyle¹³⁻¹⁵, eNOS inhibisyonu aşamasında, pek muhtemelen reaktif bir NO artışı olmuş ve bu da karaciğerde sinüzoidal dilatasyon ve stazla ortaya çıkmıştır. L-Arg verilmesi de LTA'dan sonra hepatositlerde periferik sitoplazmik zonda organel kaybı ve karaciğer hasarına yol açmaktadır. LTA verilen ratlarda plazma NO düzeyindeki artış ile hepatosit hasarı doğru orantılıdır. Ancak, hasarla NO/ reaktif oksijen radikalleri oranı ve antioksidan sistem arasındaki ilişkiye açıklık getirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. De Kimpe J, Kengatharan M, Thiemermann C, et al. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from staphylococcus aureus act in synergy to cause shock and multipl organ failure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 10395-10363.
2. Bone RC. Gram-positive organism and sepsis. *Arch Intern Med*. 1994; 154:26-34.
3. Nogare AR. Southwestern internal medicine conference: septic shock. *Am J Med Sci*. 1991; 302: 50-65.
4. Nathanson C, Hoffman WD, Suffredini A. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Intern Med*. 1994; 120:771-783.
5. Munoz C, Carlet J, Fitting C, et al. Dysregulation of invitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991; 88: 1747-1754.
6. Schberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med*. 1991; 91 (Suppl 3B) 72-75.
7. Mattsson E, Verhage L, Roloff J, et al. Peptidoglycan and teichoic acid from Staphylococcus epidermidis stimulate human monocytes to release tumor necrosis factor- μ , interleukin-1b and interleukin-6. *FEMS Immunol. Med Microbiol*. 1993; 7: 281-287.
8. Heumann D, Barras C, Severin A, et al. Gram-positive cell wall stimulate synthesis of tumor necrosis factor- μ and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun*. 1994; 62: 2715-2721.
9. Fischer W. Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv Microb Physiol*. 1988; 29: 233-302.
10. Zacharowski K, Olbrich A, Cuzzocrea S, et al. Membrane-permeabl radical scavenger, tempol, reduces multipl organ injury in a rodent model of Gram-positive shock. *Crit Care Med*. 2000; 28: 1953-1961.
11. Kengatharan KM, De Kimpe SJ, Thiemermann C. The role of nitric oxide in the circulatory failure and organ injury in a rodent model of gram-positive shock. *Br J Pharmacol*. 1996; 119: 1411-1421.
12. Hermann C, Spreitzer I, Schroder NW et al. Cytokine induction by purified lipoteichoic acids from various bacterial species : Role of LBP, sCD14, CD14 and failure to induce IL-12 and subsequent IFN-gamma release. *Eur J Immunol*. 2002; 32: 541-551.
13. Lonchampt MO, Auguet M, Delaflotte S, et al. Lipoteichoic acid: a new inducer of nitric oxide synthase. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992; 20 Suppl. 12: 145-147.

14. De Kimpe SJ, Hunter ML, Bryant CE, et al. Delayed circulatory failure due to the induction of nitric oxide synthase by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol.* 1995; 114: 1317-1323.
15. Tsuneyoshi I, Kanmura Y, Yoshimura N. Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* depresses contractile function of human arteries in vitro due to the induction of nitric oxide synthase. *Anesth Analg.* 1996; 82: 948-953.
16. Li J, Billiar TR. Nitric oxide IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol.* 1999; 276 (Gastrointest. Liver Physiol. 39): G 1069-G 1073.
17. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126: 131-138.
18. Phuong NB, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem.* 1995; 41: 904-907.
19. Orrego H, Carmichael FJ, Phillips MJ, et al. Protection by propylthiouracil against carbon tetrachloride-induced liver damage. *Gastroenterology* 1976; 71: 821-826.
20. Sugino K, Doki K, Yamada K, et al. Changes in the levels of endogenous antioxidants in the liver of the mice with experimental endotoxemia and the protective effects of antioxidants. *Surgery* 1989; 105: 200-206.
21. Ou J, Carlos TM, Watkins SC, et al. 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.* 1997; 1: 404-416.
22. Taylor BS, Alarcon LH, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase in the liver: Regulation and function. *Biochemistry.* 1998; 63: 766-781.
23. Rubbo H, Darley-Usmar V, Freeman BA. Nitric oxide regulation of tissue radical injury. *Chem Res Toxicol.* 1996; 9: 809-820.
24. Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, et al. Nitric oxide inhibition of lipooxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 324: 15-25.
25. Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmac.* 1997; 29: 159-166.
26. Nishida J, Mc Cuskey RS, Mc Donnell D, et al. Protective role of nitric oxide in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am J Physiol.* 1994; 267: G1135-G1141.

¹Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, TR-06500 Beşevler, Ankara, Türkiye.

²Ankara Onkoloji Hastanesi, Dördüncü Cerrahi Kliniği, Demetevler, Ankara, Türkiye.

³Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, TR-06500 Beşevler, Ankara, Türkiye.

⁴Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, TR-06500 Beşevler Ankara, Türkiye.

*Bu çalışma Gazi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

Yazışma Adresi: Dr. Atilla Engin

Turan Güneş Bulvarı 71. Sokak, Efes Apt. 16/5, TR-06550 Yıldız, Çankaya, Ankara, Türkiye

E-mail: atillaengin@ttnet.net.tr