

# DeneySEL Sistemik Hipoksi Geliştirilmiş Yenidoğan Ratlarda N–Asetilsistein Uygulamasının Etkileri

[The Effect of N-Acetylcysteine Administration on Pups with Neonatal Hypoxia]

Hasan Kurtuluş<sup>(1)</sup>  
Sevgi Eskioçak<sup>(2)</sup>  
Filiz Tütüncüler<sup>(3)</sup>  
Ümit N. Başaran<sup>(4)</sup>  
Şendoğan Gülen<sup>(5)</sup>

- (1) Uzm.Dr.T.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.
- (2) Yrd.Doç.Dr. T.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
- (3) Yrd.Doç.Dr.T.Ü.Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı Anabilim Dalı
- (4) Yrd.Doç.Dr. T.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı
- (5) Prof.Dr. T.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

## Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Sevgi ESKİOÇAK

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

Tel: 0(284) 235 76 41

e-mail: drseskiocak@hotmail.com

## ÖZET

**Amaç:** Yenidoğanlarda önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olan prenatal hipoksinin patogenezinde serbest oksijen reaktifleri suçlanmaktadır. Çalışmamızda antioksidan etkinliği olduğu ileri sürülen ve non-enzimatik antioksidanlardan glutatyonun öncülü olan N-asetilsisteinin (NAS) yenidoğan ratlarda oluşturulan hipoksidedeki etkinliğini araştırmayı amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Yenidoğan 25 tane rat randomize bir şekilde kontrol, hipoksik ve tedavi grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. %8 O<sub>2</sub> ve %92 N<sub>2</sub> gazı karışımıyla doldurulan özel düzenekten oluşan cam fanusta ratlar 2 saat tutularak hipoksi oluşturuldu. Tedavi grubundaki ratlara hipoksi oluşturulmadan 30 dakika önce 20 mg/kg NAS periton içine ve hipoksi geliştirildikten 24 ve 48 saat sonra aynı dozda NAS kas içine verildi. Karaciğer dokularında, lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), arjinaz aktivitesi ve ornitin düzeyleri analiz edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile, her bir grupta veriler arasındaki korelasyonlar, Pearson korelasyon analizi ile yapıldı ve p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi.

**Bulgular:** Hipoksik grupta MDA düzeyi ve arjinaz aktivitesi kontrollere göre yüksek bulundu (her ikisinde p<0.01). Tedavi grubunda ise hipoksik gruba göre MDA seviyesi ve arjinaz aktivitesinin azaldığı görüldü (her ikisinde p<0.05). Tedavi grubunda kontrol grubuna göre ornitin seviyesinin azalmış olduğu tespit edildi (p<0.05). Hipoksik grupta arjinaz aktivitesi ile MDA düzeyi arasında pozitif korelasyon bulundu (r=0.809, p<0.01).

**Sonuç:** Çalışmamızın bulguları ışığında hipoksidede arjinaz aktivitesindeki artışın lipid peroksidasyonu ile ilişkili ve NAS tedavisinin doku hasarını önlemede etkili olduğunu söyleyebiliriz.

**Anahtar Kelimeler:** Hipoksi, N-asetilsistein, lipid peroksidasyonu, arjinaz, ornitin

## ABSTRACT

**Objectives:** Prenatal hypoxia is an important cause for mortality and morbidity in newborns. It is suggested that reactive oxygen species may play a role at this pathogenesis. In the present study, we investigated the effect of N-Acetylcysteine (NAC), a precursor of glutathione and a non-enzymatic antioxidant in newborn rats undergoing hypoxia.

**Materials and methods:** The pups were randomly divided into three groups; control, hypoxic and NAS. The pups were placed in a chamber and hypoxia induced by a mixture of 92% nitrogen and 8% oxygen for 2 hours. NAC was administered intraperitoneally at the dose of 20 mg/kg 30 minutes before hypoxia and at the same dose intramuscularly 24 and 48 h after hypoxia in the NAC group. The liver tissue malondialdehyde (MDA), lipid peroxidation end product, and ornithine levels and arginase activity were analyzed. Comparisons of data between groups were accomplished by Mann-Whitney U test. Correlation between parameters in the each groups also were examined by Pearson Correlation test. A value of *p* less than 0.05 was considered statistically significant. The result was presented as mean±standard deviation ( $\bar{x} \pm SD$ ).

**Results:** Hepatic levels of lipid peroxidation and arginase activity were found significantly elevated in the hypoxic group as compared to those observed in control group (p<0.01 for both). The level of lipid peroxidation and arginase activity were lower in NAC group than those found in hypoxic group (p<0.05 for both). The level of ornithine was lower in NAC group than those found in control group (p<0.05). A significantly positive correlation was observed between lipid peroxidation and arginase activity in hypoxic group (r=0.809, p<0.01).

**Conclusion:** Under the light of these results, we may suggest that higher activity of arginase in hypoxia is related to lipid peroxidation and administration of NAC can be a useful tool to protect tissue damage.

**Key Words:** Hypoxia, N-Acetylcysteine, lipid peroxidation, arginase, ornithine

## GİRİŞ

Hipoksi; dokuların yeterince oksijen alamama durumu olarak tanımlanmaktadır. Dokuda azalan oksijen miktarı ile beraber; dokunun enerji metabolizmasında değişiklikler olduğu, doku adenozin trifosfat (ATP) miktarının azaldığı ve biriken adenozin moleküllerinin aşırı oranda yıkıma uğradığı bildirilmektedir. Ayrıca normal koşullarda serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşumuna yol açmayan ksantin dehidrogenazın, hipoksik koşullarda aşırı adenozin yıkımı sonucu oluşan hipoksantin enzimatik yıkımı sırasında SOR üretimine neden olduğu bildirilmektedir (1). Organizmada oksidatif mekanizmalar sonucu oluşan SOR aşırı üretim veya vücuttaki oksidan/antioksidan dengenin bozulması durumunda, protein, lipid, karbonhidrat ve nükleotid gibi biyomolekülleri etkileyerek zararlı etki göstermeye başlar. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA), SOR'nin zararlı etkisinden daha kolay etkilenir ve zincirleme olarak devam eden, lipid yapısında bozukluk ve parçalanmaya yol açan lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Membranlar ÇDYA'den zengin oldukları için SOR etkisine açıktırlar ve membranda yapı ve fonksiyon bozuklukları oluşmaktadır (2,3). SOR bileşiklerinden biri olan nitrik oksit (NO); nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi ile arjininden üretilmekte ve organizmada çift yönlü etki gösterdiği bildirilmektedir. Hem birçok fizyolojik fonksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olduğu ve antioksidan savunmaya katkıda bulunduğu, hem de aşırı üretim durumunda radikal etki gösterdiği ve peroksinitrit gibi daha güçlü radikal bileşiklerin oluşmasına yol açtığı vurgulanmaktadır (4). Üre döngüsü enzimlerinden olan arjinazın (L-arjinin amidinohidrolaz; EC 3.5.3.1) ana kaynağı karaciğer olmakla beraber böbrek, barsak, beyin gibi karaciğer dışı dokularda da yer aldığı görülmüş, enzimin üre döngüsü dışında biyolojik fonksiyonları olabileceği ileri sürülmüştür. Arjinazın; (a) NOS ile ortak substrat olan L-arjinini kullanarak substrat tükenmesine yol açtığı ve böylece NO sentezini düzenlediği; (b) poliaminlerin (putresin, spermidin ve spermin) sentezinde kullanılan ornitini sentez ederek, hücre büyümesinde rolü olabileceği bildirilmektedir (5,6). Arjinaz aktivitesinin yükselmesinin poliamin biyosentezinde hız kısıtlayıcı enzim olan ornitin dekarboksilaz (ODK) aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (7-9). Poliaminlerin hücre membranı ve organellerini, DNA'yı stabilize ettiği, DNA ve RNA sentezinin uyarılmasında rolü olduğu ileri sürülmüş ve yüksek spermidin konsantrasyonlarının sinir dokusunda koruyucu etkili olduğu bildirilmiştir (10).

Bir tripeptid ( $\gamma$ -glutamil-sisteinil-glisin) olan glutatyon (GSH); hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve organik peroksitlerin glutatyon peroxidaz etkisi ile indirgenmesinde ve ksenobiyotiklerin merkaptürat yolu ile detoksifikasyonunda yer almaktadır. Ayrıca, GSH direkt olarak serbest sülfidril grubu aracılığıyla  $H_2O_2$ , süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksil ( $\cdot OH$ ) ve alkoksil radikalleri ( $RO\cdot$ ) ile etkileşime girebilmekte, böylece hücreyi oksidanların, elektrofilik maddelerin, serbest radikallerin hasarına karşı korumada önemli bir rol üstlenmektedir (11,12). Ayrıca doku için GSH konsantrasyonunun düştüğü durumlarda glikolitik enzim olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz aktivi-

tesinin ve doku ATP içeriğinin azaldığı gösterilmiş ve GSH'un hücresel enerji durumunu etkileyebileceği ileri sürülmüştür (13). Hipoksik koşullarda kan ve doku GSH düzeylerinin azaldığı, lipid peroksidasyon ürünlerinin ise arttığı bildirilmektedir (14-17).

Gelişen tüm bakım ve teknik olanaklara rağmen doğum sırasında veya sonrasında ortaya çıkabilen hipoksi, yenidoğanlarda halen önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olmaya devam etmektedir. Çalışmamızda deneysel sistemik hipoksi geliştirilmiş yenidoğan ratlarda, bir glutatyon öncülü olan N-asetilsisteinin karaciğer lipid peroksidasyonu, arjinaz aktivitesi ve ornitin düzeyleri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

**Çalışma Grubu:** Çalışma için gerekli Yerel Etik Kurul onayı alındı ve 7 günlük, ağırlıkları yaklaşık 10 gr olan, 25 tane Wistar Sprague cinsi rat kullanıldı. Yenidoğan ratlar rastgele 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubu 6, hipoksik grup 9 ve tedavi grubu da 9 adet yenidoğan rattan oluşturuldu. Kontrol grubundaki ratlara kendi annelerinin yanında standart bakım yapıldı. Hipoksi ve tedavi grubuna deneysel hipoksi modeli uygulandı. Deneysel sistemik hipoksi modeli; %8  $O_2$  ve %92  $N_2$  gazı karışımıyla doldurulan özel düzenekten oluşan cam fanusta ratların 2 saat süreyle bırakılmasıyla oluşturuldu. Hipoksi oluşturulduktan sonra, ratlar kendi annelerinin yanına bırakıldı. Tedavi grubundaki ratlara deneysel hipoksi modeli uygulamadan 30 dakika önce 20 mg/kg NAS'in ilk dozu intraperitoneal olarak, hipoksi uygulamasından sonra 24'er saat ara ile aynı miktarda 2 doz intramüsküler olarak verildi. Hipoksik gruba tedavi grubundaki uygulamayla aynı zamanlarda serum fizyolojik uygulandı. Hipoksi oluşturulduktan sonraki 4. gün ratlar dekapite edilerek, karaciğer dokuları alındı. Araştırmamızda kullanılan karaciğer doku örnekleri alınır alınmaz hemen soğuk % 0,9'luk serum fizyolojik ile yıkandı ve doku ikiye bölünerek  $-20^\circ C$ 'de saklandı.

**Biyokimyasal analizler:** Doku örnekleri 1:10 (w:v) oranında Tris/HCl tamponu (50 mM, pH: 8.0) ile homojenize edildi. Homojenatlar  $13000 \times g$  ve  $+4^\circ C$ 'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra, elde edilen berrak süpernatantlarda arjinaz aktiviteleri ile ornitin düzeyleri sırasıyla Geyer ve Dabich (18) ve Chinard (19) metodları kullanılarak ölçüldü. Homojenatlar 9 mM  $MnCl_2$  ile  $55^\circ C$  de öninkübasyona tutulduktan sonra,  $37^\circ C$  ve pH 9.7 olan ortamda 15 dakika tutularak arjinaz aktivitesi gerçekleştirildi. Elde edilen değerler, hazırlanan üre standart grafiğinde değerlendirildi, doku protein değerine oranlanarak arjinaz aktivitesinin 1 ünitesi; doku proteinin 1 miligramı başına bir saatte oluşan 1  $\mu mol$  üre olarak tanımlandı. Ornitin amino asidinin ninhidrin ile oluşturduğu mor renkli kompleks spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Doku örneklerinin diğer kısmı 1:10 (w:v) oranında %1.15'lik KCl ile homojenize edildi,  $4000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj aşamasından sonra berrak süpernatantlarda lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'in tiyobarbitürik asitle verdiği absorpsiyon 532 nm.de spektrofotometrik olarak ölçüldü (20). Protein miktarları Lowry (21) metodu ile ölçüldü. Biyokimyasal analizler için kullanılan kimyasal

**Tablo 1** Deneysel hipoksi modelinde NAS uygulamasının karaciğer dokusu arjinaz aktivitesi, ornitin ve MDA düzeylerine etkileri

	<b>Kontrol</b> (n=6)	<b>Hipoksik Grup</b> (n=9)	<b>NAS Grubu</b> (n=9)
<b>MDA</b> (nmol/mg protein)	2.41±0.51	4.36±1.40**	2.61±1.04 <sup>§</sup>
<b>Arjinaz</b> (µmol üre/dk/mg protein)	230.83±45.09	381.89±33.87**	331.00±39.39** <sup>§</sup>
<b>Ornitin</b> (nmol/mg protein)	48.80±11.29	40.62±14.02	27.67±12.79*

kontrol grubuna karşı \* p<0.05, \*\* p<0.01 düzeyinde,  
hipoksi grubuna karşı <sup>§</sup>p<0.05 düzeyinde istatistiksel anlamlılık.

maddeler analitik saflıkta olup, Sigma (St. Louis, USA) ve Merck (Darmstadt, Germany) firmalarından temin edilmiştir.

**Veri Analizi:** Kontrol, hipoksik ve tedavi gruplarının karaciğer doku örneklerinden her biri için ölçülen spesifik arjinaz aktiviteleri ile ornitin ve MDA düzeylerinin gruplar arasındaki karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi ile, her bir grupta veriler arasındaki korelasyonlar Pearson korelasyon analizi ile yapıldı ve p<0.05 anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verildi.

## BULGULAR

Kontrol, hipoksik ve tedavi gruplarında karaciğer dokularında saptanan arjinaz aktiviteleri, ornitin ve MDA düzeyleri Tablo 1'de görülmektedir.

Hipoksik ve NAS gruplarında karaciğer dokusundaki arjinaz aktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (her ikisinde p=0.001). NAS grubu ve hipoksik grup karşılaştırıldığında, karaciğerdeki arjinaz aktivitesinin NAS grubunda daha düşük olduğu görülmüştür (p=0.012).

Karaciğer ornitin düzeylerinde kontrol grubuna göre hipoksik grupta anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Ornitin düzeylerinin NAS grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu görülürken (p=0.011); NAS grubu ile hipoksi gruplarında gözlenen ornitin düzeyleri arasındaki farkın anlamlı olmadığı görülmüştür (p=0.200). Doku MDA düzeylerinin hipoksik grupta kontrollere göre anlamlı derecede arttığı, NAS grubunda ise hipoksik gruba göre anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır (sırasıyla p=0.005 ve p=0.019).

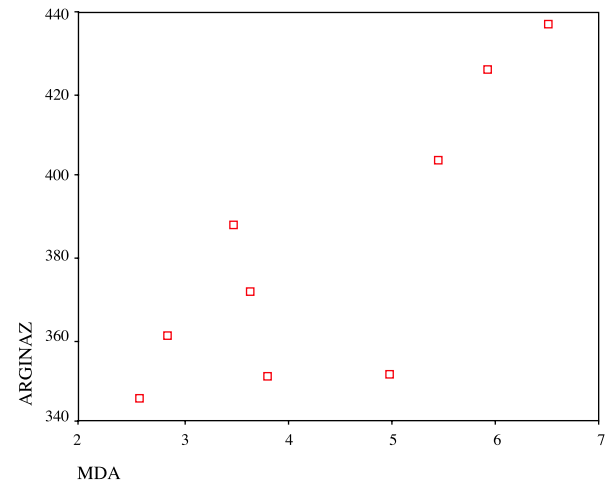
Hipoksik grupta doku MDA düzeyi ile arjinaz aktivitesi arasında pozitif korelasyon olduğu (r=0.809, p=0.008) görülmüştür (Şekil 1). Diğer gruplarda, ölçülen parametreler arasında anlamlı bir korelasyon saptanamamıştır.

## TARTIŞMA

Ksantin hipoksantine dönüşümünü katalizleyen ksantin dehidrogenazın normal koşullarda enzimatik aktivitesi sırasında SOR açığa çıkmamaktadır. Hipoksi durumunda ksantin dehidrogenaz değişikliğe uğramakta ve aktivitesi sırasında SOR oluşumuna yol açan ksantin oksidaza dönüşmektedir. Hipoksidede görülen SOR artışından; ksantin dehidrogenazın değişimi sorumlu

tutulmakta ve bu değişimin proteolitik olabileceği gibi enzimin sistin kalıntılarının sistine oksidasyonu ile de olabildiği bildirilmektedir (22). NO'in ksantin oksidazı inhibe ettiği gösterilmiş ve böylece radikal oluşumunu azaltabileceği ileri sürülmüştür (23). Çalışmamızda hipoksik koşullarda arjinaz aktivitesinin ve doku lipid peroksit düzeyinin yüksek olduğu görülmüştür. Hipoksik grupta doku arjinaz aktiviteleri ile MDA düzeylerinin arasında güçlü korelasyon bulunması; arjinazın SOR üretimi ve hasarı ile bir ilişkisi olabileceğini göstermektedir. Sonuçlarımız; arjinaz enziminin arjinini tüketerek, NO üretiminde azalmaya yol açmış olabileceğini, azalan NO'in lipid peroksidasyonunu inhibe edememesinin bir sonucu olarak doku hasarının oluşmuş olabileceğini düşündürmektedir. Fizyolojik derişimlerdeki NO, lipid peroksidasyonunda sonlandırıcı etkiye sahiptir. Kantrow ve arkadaşları (24) hipoksik akciğerde NO üretiminin azaldığını göstermişlerdir. Louis ve arkadaşları (25); intakt hücrelerde hipoksi veya anoksi uygulandığında arjinaz enziminin aktivitesinin ve m-RNA düzeyinin arttığını bildirmişlerdir. Kılıç ve arkadaşları (26) hipoksidede beyin, kalp, akciğer ve karaciğer dokularında lipid peroksidasyon artışı olduğunu göstermişlerdir.

Çeşitli çalışmalarda hipoksidede hem doku, hem de kan GSH seviyesinde azalma olduğu gösterilmiştir (13-16). Demir ve arkadaşları (27) iskemi ve reperfüzyon hasarında karaciğerde lipid peroksit düzeylerinin arttığını ve NAS uygulamasının doku lipid peroksit seviyele-

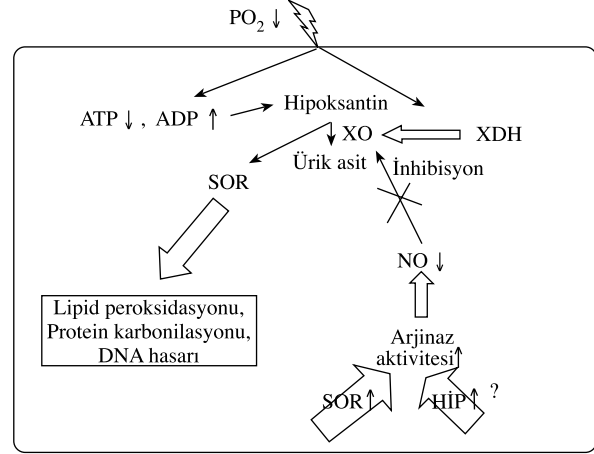


**Şekil 1** Hipoksi grubunda karaciğer dokusu MDA düzeyi ile arjinaz aktivitesi arasında gözlenen ilişki (r=0.809, p<0.01).

rinde azalmaya yol açtığını öne sürmüşlerdir. Bir GSH öncülü olan NAS uygulamasının doku GSH düzeyinde yükselmeyi sağladığı bildirilmektedir (28). Tiyol grubu içeren NAS'ın GSH öncülü olduğu ve ayrıca çeşitli SOR bileşikleri ile tepkimeye girdiği bildirilmektedir (29). Enzimatik olmayan bir antioksidan olan GSH'un azalmasının hipokside görülen doku hasarına katkıda bulunabileceğini düşünerek NAS uyguladığımız grupta, doku lipid peroksit düzeyinde hipoksik gruba göre anlamlı derecede düşüş görülmüştür. Çalışmamızın sonuçları, hipoksi uygulamasının artan ROS üretimine bağlı olarak doku GSH seviyesinde azalmaya yol açabileceği ve NAS uygulamasının gerek GSH öncülü olması, gerekse direkt antioksidan etkileri aracılığı ile oksidan stresi azaltmış olabileceği savını güçlendirmektedir. Tedavi grubunda NAS uygulamasının doku GSH seviyesinde artışa yol açarak ksantin dehidrogenaz enziminin sistin kalıntılarını oksitlemesini azalttığı ve bu yolla ROS oluşumunun azalmasını da sağlamış olabileceğini düşünülmektedir.

Sitozolik bir enzim olan ODK poliamin biyosentezinin hız kısıtlayıcı basamağını kataliz etmektedir (11,20). Poliaminler tüm memeli hücrelerinde bulunur ve hücrelerin büyümesi ve gelişmesi için önemli olan biyomoleküllerdir. Çalışmamızda, karaciğer dokusu ornitin düzeylerinde, sadece tedavi grubunda kontrol grubundakilere göre anlamlı azalma olduğu görülmüştür. Bu sonuç, NAS tedavisinde ornitin amino asidinin daha fazla oranda poliamin sentezinde kullanılmış olabileceği savını kuvvetlendirmektedir.

Sonuç olarak şekil 2'de görüldüğü gibi; dokularda oksijen kısmi basıncının azalması, çeşitli noktalarda SOR açığa çıkmasını tetiklemektedir. Bu noktalardan biri ksantin oksidaz aktivitesidir. Doku ATP içeriğinin azalması, ADP artışıyla sonlanmakta ve artan adenozin nükleotidleri yıkıma uğramaktadır. Ksantin oksidaz aktivitesi hipoksik koşullarda SOR molekülleri oluşturarak, oksidan hasarın gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Arjinaz aktivitesindeki artış, hipoksik koşullarda SOR moleküllerinin artışına bağlı kovalent modifikasyonla olabileceği gibi; hipoksiye adaptasyon da olabilir. Hipoksik koşullarda bazı proteinlerin sentezi azalırken, bazılarının artmaktadır. Arjinaz aktivitesi sonucu oluşan ornitin, RNA sentezinde rolü olduğu ileri sürülen



Şekil 2 Hipokside Arjinaz Enziminin Olası Rolü.

PO<sub>2</sub>: Parsiyel oksijen basıncı, ATP: Adenozin trifosfat, ADP: Adenozin difosfat, XO: Ksantin oksidaz, XDH: Ksantin dehidrogenaz, NO: Nitrik oksit, SOR: Serbest oksijen radikalleri, HİP: Hipoksi ile indüklenen protein

poliamin sentezinde kullanılacaktır. Ancak artan arjinaz aktivitesi, NOS aktivitesini de sınırlayabilmekte ve böylece NO'nun ksantin oksidaz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisinde zayıflamaya yol açabilmektedir. Bunun da daha fazla SOR oluşumu ve doku hasarı ile sonuçlanacağını söyleyebiliriz.

Yenidoğan ratlardaki GSH düzeyinin yetişkin ratların GSH düzeyinin %57' si kadar olduğu bildirilmektedir (28). Yenidoğanların hipokside çok etkilenmelerinin nedenlerinden biri GSH düzeyinin düşük olması olabilir. Hipoksik koşullarda artan ROS üretimi ile dokularda GSH'un hızla tüketiminin söz konusu olacağını ve GSH azlığında ksantin dehidrogenazın oksidaza dönüşümünün kolaylaşacağını düşünmekteyiz. NAS; hem GSH öncülü olduğu için doku tiyol redoks durumunu koruyarak, hem direkt radikal tutucu etkisi ile hem de arjinaz aktivitesinde önemli bir azalma sağlayarak, hipokside görülen doku hasarını önlemiş olabilir. Bu nedenle, hipoksi gelişen yenidoğanlarda NAS tedavisinin doku hasarının önlenmesinde yararlı bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır.

## Kaynaklar

1. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1985; 17(2): 145-152.
2. Halliwell B, Chirio S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5 Suppl): 715-724
3. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan-oksidan dengesi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 336-341
4. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 1993; 14(3): 191-197
5. Chang CI, Liao JC, Kuo L. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 1998; 274: H342-H348

6. Braissant O, Gotoh T, Loup M, Mori M, Bachmann C. L-arginine uptake, the citrulline-NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 70(2): 231-241
7. Aminlari M, Vaseghi T. Arginase distribution in tissues of domestic animals. *Comp Biochem Physiol B* 1992; 103(2): 385-389
8. Konarska L, Tomaszewski L. Studies on L-arginase in developing rat small intestine, brain, and kidney. Ontogenic evolution of arginase isoenzymes. *Biochem Med Metab Biol* 1986; 35(2): 156-169
9. Pegg AE, McCann PP. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 1982; 243(5): 212-221

10. Ferchmin PA, Perez D, Biello M. Spermine is neuroprotective against anoxia and N-methyl-D-aspartate in hippocampal slices. *Brain Res* 2000; 859(2): 273-279
11. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983; 52: 711-760
12. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27(9-10): 916-921
13. Pullar JM, Winterbourn CC, Vissers MC. Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *Am J Physiol.* 1999; 277(4Pt2): H1505-1512
14. Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2002; 133(4): 537-556
15. El-Bassiouni EA, Abo-Ollo MM, Helmy MH, Ismail S, Ramadan MI. Changes in the defense against free radicals in the liver and plasma of the dog during hypoxia and/or halothane anaesthesia. *Toxicology.* 1998; 128(1): 25-34
16. Sarada SK, Sairam M, Dipti P, Anju B, Pauline T, Kain AK, et al. Role of selenium in reducing hypoxia-induced oxidative stress: an in vivo study. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(4): 173-178
17. Ilavazhagan G, Bansal A, Prasad D, Thomas P, Sharma SK, Kain AK, et al. Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviat Space Environ Med.* 2001; 72(10): 899-903
18. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem.* 1971; 39(2): 412-417
19. Chinard FP. Photometric Estimation of Proline and Ornithine. *J Biol Chem* 1952; 199: 91-95
20. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95(2): 351-358
21. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
22. Nishino T, Nishino T. The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene. *J Biol Chem.* 1997; 272(47): 29859-29864
23. Ichimori K, Fukahori M, Nakazawa H, Okamoto K, Nishino T. Inhibition of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase by nitric oxide. Nitric oxide converts reduced xanthine-oxidizing enzymes into the desulfo-type inactive form. *J Biol Chem.* 1999; 274(12): 7763-7768
24. Kantrow SP, Huang YC, Whorton AR, Grayck EN, Knight JM, Millington DS, et al. Hypoxia inhibits nitric oxide synthesis in isolated rabbit lung. *Am J Physiol.* 1997; 272(6 Pt 1): L1167-L1173
25. Louis CA, Reichner JS, Henry WL Jr, Mastrofrancesco B, Gotoh T, Mori M: Distinct arginase isoforms expressed in primary and transformed macrophages: regulation by oxygen tension. *Am J Physiol* 1998; 274(3 Pt 2): R775-R782
26. Kılıç İ, Kılıç BA, Güven C, Demirpençe E, Akşit MA: Role of nitric oxide in hypoxia-induced changes in newborn rats. *Biol Neonate* 2000; 78: 191-197
27. Demir S, İnal-Erden M: Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Chim Acta* 1998; 275(2): 127-135
28. Allameh A, Vansoun EY, Zarghi A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mech Ageing Dev* 1997; 95(1-2): 71-79
29. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6(6): 593-597