

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GASTROENTEROLOJİ B.D.

129701

KRONİK VİRAL HEPATİTLERDE SERUM NİTRİT ve NİTRAT SEVİYELERİ

YANDAL UZMANLIK TEZİ

129701

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HİKMET AKKIZ

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI
DOKÜMANİZASYON BİRLİĞİ

TEZ SAHİBİ
DR. FATİH YÜKSEL İŞIKSAL

ADANA - 2003

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatım boyunca beni hiç bıkmadan destekleyen ve yanımda olan aileme,
kıymetli katkılarından dolayı tüm hocalarıma teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	I
İçindekiler.....	II
Tablo Listesi.....	V
Özet ve Anahtar Sözcükler.....	VII
Abstract – Keywords.....	VIII
Kısaltma Listesi.....	IX
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	2
2.1. Tarihçe.....	2
2.2. Karaciğer.....	2
2.2.1 Anatomi.....	2
2.2.2 Metabolik Süreç.....	2
2.2.3 Kan Akımının Hepatik Metabolizma ve Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi.....	3
2.2.4 Hepatik Arter Kan Akımının Hepatik Metabolizma Üzerindeki Etkileri.....	3
2.3. Nitrik Oksit (NO)	4
2.3.1. Nitrik Oksitin Sentezi.....	5
2.3.2. Nitrik Oksit Sentetazın İzofomları.....	5
2.3.3. Nitrik Oksitin Biyolojik Akıbeti ve Diğer Nitrat Radikallerinin Oluşumu.....	8
2.3.4. Nitrik Oksitin Karaciğer Metabolizmasına Direk Etkileri.....	9
2.3.4.1 Akut Faz Proteinlerinin Rolü.....	10
2.3.4.2 Kupffer Hücreleri ve Glikojenoliz.....	10
2.3.4.3 Siklik Guanozin Monofosfatın Rolü.....	11
2.3.4.4 Sitokrom P ₄₅₀ 'nin Rolü.....	11
2.3.4.5 Endotokseminde Nitrik Oksitin Rolü.....	12
2.3.4.6 Sirozda Nitrik Oksitin Rolü.....	13
2.3.4.7 Safra Yapımında Nitrik Oksit.....	14
2.3.4.8 İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Nitrik Oksit.....	15

2.3.5.	Nitrik Oksitin Karaciğer Metabolizmasına Dolaylı Etkileri.....	15
2.3.5.1.	Hepatik Arter ve Portal Venin Damar Tonusunun Kontrolünde Otakoidler ve Nitrik Oksitin Rolü.....	15
2.3.5.2.	Pürinlerin Rolü.....	16
2.4.	Nitrit ve Nitrat.....	16
2.4.1.	Nitrit ve Nitratın Diyetle Alımı.....	17
2.4.2.	Plazma ve İdrarda Nitrit ve Nitratın Ölçülme Yöntemleri.....	19
2.4.2.1.	Kolorimetrik Metodlar.....	20
2.4.2.2.	Ultraviyole Spektrofotometrik Metod.....	21
2.4.2.3.	Fluorimetrik Metodlar.....	21
2.4.2.4.	Elektrodları ya da Biyoanalitik Elementleri Kullanan Metodlar.....	21
2.4.2.5.	NO Analizörlerinin Kullanıldığı Metodlar.....	21
2.4.2.6.	Kapiller Elektroforez.....	22
2.4.2.7.	Gaz Kromatografisi ve Gaz Kromatografi-Kütle Spektrofotometrisi.....	22
2.4.2.8.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi.....	22
2.4.2.9.	Kontaminasyondan Korunma.....	23
2.4.3.	Klinik Değerlendirme.....	23
2.4.3.1.	Referans Değerleri.....	23
2.4.3.2.	Cinsiyet ve Yaş Farklılıkları.....	24
2.4.3.3.	Çocuklardaki Değerler.....	25
2.4.3.4.	Genel Değerlendirme.....	26
2.4.3.5.	İdrar Yolu Enfeksiyonunun Bir Göstergesi Olarak İdrar Nitriti.....	26
2.4.3.6.	Diğer Enfeksiyonlarda Nitrit ve Nitrat.....	26
2.4.3.7.	İmmün Aktivasyon Göstergesi Olarak Nitrit ve Nitrat.....	26
2.4.3.8.	Hipertansiyon, Renal ve Kardiyovasküler Hastalıklarda Nitrit ve Nitrat.....	28
2.4.3.9.	Transplantasyon ve Rejeksiyonda Nitrit ve Nitrat.....	29
2.4.3.10.	Kan Sisteminde Nitrit ve Nitrat.....	30
2.4.3.11.	Solunum Hastalıkları ve Sigara İçicilerinde Nitrit ve Nitrat.....	30
2.4.3.12.	Değişik Durumlarda Nitrit ve Nitratın Ölçümü.....	31
2.4.4.	Gastroenterolojide Nitrit ve Nitratın Yeri.....	32
2.4.5.	Hepatolojide Nitrit ve Nitratın Yeri.....	33
2.4.5.1.	Karaciğer Sirozunda Nitrit ve Nitrat.....	33

2.4.5.2. Hepatoselüler Karsinomada Nitrit ve Nitrat.....	36
2.4.5.3. Alkolik Hepatitte Nitrit ve Nitrat.....	37
2.4.5.4. İlaç İlişkili Karaciğer Hasarında Nitrit ve Nitrat.....	37
2.4.5.5. Kronik Viral Hepatitte Nitrit ve Nitrat.....	38
3. Gereç ve Yöntem.....	45
3.1. Serum Nitrit ve Nitrat Tayini.....	50
3.2. İstatistiki Analiz.....	51
4. Bulgular.....	52
5. Tartışma.....	69
6. Sonuçlar ve Öneriler.....	76
7. Kaynaklar.....	78
8. Özgeçmiş.....	102



TABLO LİSTESİ

<u>Tablo - 1:</u>	Nitrik oksitle ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar.....	4
<u>Tablo - 2:</u>	NOS izoformları ve özellikleri.....	7
<u>Tablo - 3:</u>	Farklı araştırmalarda kullanılan sağlıklı kontrol vakalarının serum nitrit, nitrat ve NOx seviyeleri.....	23
<u>Tablo - 4:</u>	Knodell Skorlama Sistemi.....	40
<u>Tablo - 5:</u>	HAI – Eski sınıflama adaptasyon tablosu.....	40
<u>Tablo - 6:</u>	Kronik hepatit C’de IFN-alfa tedavisine cevabı etkileyen faktörler....	41
<u>Tablo - 7:</u>	Araştırmaya dahil olma kriterleri.....	45
<u>Tablo - 8:</u>	Araştırmaya alınmama kriterleri.....	46
<u>Tablo - 9:</u>	Yazılı Hasta bilgilendirme formu örneği.....	47
<u>Tablo-10:</u>	Yazılı hasta rıza (olur) formu örneği.....	48
<u>Tablo-11:</u>	Laboratuvar normal değerleri.....	49
<u>Tablo-12:</u>	Tüm vakalara verilen standart diyet örneği.....	50
<u>Tablo-13:</u>	Çalışmaya katılan vakaların gruplara göre yaş ve cinsiyet dağılımı.....	52
<u>Tablo-14:</u>	Çalışmaya katılan vakaların gruplara göre boy, kilo, vücut kitle indeksi, arteriyel tansiyon, nabız ve koltuk altı ateş değerleri.....	53
<u>Tablo-15:</u>	Çalışmaya katılan vakaların gruplara göre beyaz küre, hemoglobin, trombosit, INR ve eritrosit sedimentasyon hızı değerleri.....	54
<u>Tablo-16:</u>	Çalışmaya katılan vakaların gruplara göre AST, ALT, ALP, GGT, albumin, total bilirubin, açlık kan şekeri, TSI, tiroid uyarıcı hormon seviyesi ve alfa fetoprotein değerleri.....	56
<u>Tablo-17:</u>	Hastaların gruplara göre Knodell histolojik aktivite indeksi (HAI) ve fibrozis skorları.....	57
<u>Tablo-18:</u>	Histolojik şiddet sınıflamasına göre hastaların serum nitrit, serum nitrat ve toplam nitrit+nitrat değerleri.....	58
<u>Tablo-19:</u>	Kronik hepatit B’li hastaların serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri.....	59
<u>Tablo-20:</u>	Kronik hepatit C’li hastaların serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri.....	61
<u>Tablo-21:</u>	Histolojik ciddiyet ve etiyolojiye göre hastaların serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri.....	61

<u>Tablo-22:</u>	Hasta gruplarına göre ortalama serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri.....	62
<u>Tablo-23:</u>	Gruplar arasında çeşitli parametrelerin karşılaştırılması.....	63
<u>Tablo-24:</u>	Kontrol grubunda çeşitli parametreler arasındaki korelasyonlar.....	64
<u>Tablo-25:</u>	Kronik hepatit B grubunda çeşitli parametreler arasındaki korelasyonlar.....	64
<u>Tablo-26:</u>	Kronik hepatit C grubunda çeşitli parametreler arasındaki korelasyonlar.....	65
<u>Tablo-27:</u>	Kontrol grubunda cinsiyete göre nitrit, nitrat ve NOx karşılaştırmaları.....	66
<u>Tablo-28:</u>	Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyete göre serum nitrit, serum nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyelerinin karşılaştırılması.....	66
<u>Tablo-29:</u>	Kronik hepatit C grubunda cinsiyete göre nitrit, nitrat ve NOx karşılaştırmaları.....	67
<u>Tablo-30:</u>	Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyete göre serum nitrit, serum nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyelerinin karşılaştırılması.....	67
<u>Tablo-31:</u>	Erkek hastalarda gruplara göre serum NOx seviyeleri.....	68

ÖZET

Kronik Viral Hepatitlerde Serum Nitrit Ve Nitrat Seviyeleri

Nitrik oksit (NO) sinyal molekülü olarak vücuttaki tüm dokularda bulunan bir serbest radikal gaz molekülüdür. Bir çok iltihabi bozukluğun patogenezinde rol alıyor gibi düşünülmektedir. NO'nin inflamasyondaki rolü fizyolojinin en fazla çalışılan ancak halen tartışmalı olan konularından biridir. NO'nin güçlü anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğunu gösteren bir çok rapor vardır, oysa bir çok çalışma NO'nin inflamasyonu artırabildiğini göstermektedir. Hepatit B ve C virüsleri akut ve sıklıkla kronik karaciğer hastalığına neden olurlar. NO'nin karaciğerde bir çok etkisi ve hücresel kaynağı vardır ve hepatosit hasarında aracı olabilir. Fakat, literatürde, NO'nin karaciğer hücre hasarının birincil bir aracısı mı yoksa hasar verici uyarıya karşı güçlü bir koruyucu mekanizması olduğu konusunda karışık veriler vardır.

Bu çalışmada biz, kronik hepatit B ve C'li hastalarda kolorimetrik metod ile serum nitrit ve nitrat seviyelerini ölçtük. Serum örnekleri kronik hepatit B'li 29 (26 erkek, 3 kadın), kronik hepatit C'li 27 (13 erkek, 14 kadın) hasta ve ortalama kan basıncı uyumlu olan 25 (11 erkek, 14 kadın) sağlıklı gönüllüden alındı.

Ortalama serum nitrit, nitrat ve nitrit+nitrat seviyeleri kontrol grubunda sırasıyla $23,95 \pm 2,51$, $23,95 \pm 2,51$ ve $53,30 \pm 2,86$ mikromol/L idi. Hepatit B hastaları grubunda bu seviyeler sırasıyla $20,11 \pm 1,78$, $27,12 \pm 1,84$ ve $47,23 \pm 2,54$ mikromol/L idi. Hepatit C hastaları grubunda ise sırasıyla $18,55 \pm 1,41$, $26,54 \pm 1,34$ ve $45,10 \pm 2,22$ mikromol/L idi.

Sonuç olarak, her ne kadar hepatit gruplarında bu seviyeler kontrol grubuna göre daha düşük ise de istatistiksel analizler gruplar arasında anlamlı farklar olmadığını gösterdi. Fakat, hepatit C'li hastaların toplam nitrit+nitrat değerleri kontrol grubunun toplam nitrit+nitrat değerlerine göre anlamlı olarak düşüktü.

Anahtar sözcükler: Nitrat, Nitrik oksit, Nitrit, Viral hepatit

ABSTRACT

Serum nitrite and nitrate concentrations in patients with chronic viral hepatitis.

Nitric oxide (NO) is a free radical gas molecule identified as a signaling molecule in every tissue in the body. It appears to play a central role in the pathogenesis of many inflammatory disorders. The role of NO in inflammation represents one of the most studied yet controversial subjects in physiology. There are many reports have demonstrated that NO possesses potent anti-inflammatory properties, whereas a number of studies suggest that NO may promote inflammation. Hepatitis B and C viruses cause acute and often chronic liver disease. Nitric oxide has many actions and cellular sources in liver and may mediate hepatocyte injury. But, in literature, there is confusing evidence that NO is either a primary mediator of liver cell injury or a potent protective mechanism against injurious stimuli.

In this study we have analysed the serum levels of nitrite and nitrate from patients with chronic hepatitis B and C by using colorimetric method. Serum samples were obtained from 29 (26 male, 3 female) patients with chronic hepatitis B, 27 (13 male, 14 female) patients with chronic hepatitis C, and 25 (11 male, 14 female) mean blood pressure-matched healthy control subjects.

Mean serum nitrite, nitrate and total nitrite+nitrate levels were $23,95 \pm 2,51$, $23,95 \pm 2,51$ and $53,30 \pm 2,86$ micromol/L in control group, respectively. In HBV patients group, these levels were $20,11 \pm 1,78$, $27,12 \pm 1,84$ and $47,23 \pm 2,54$ micromol/L, respectively. In HCV patients group, these levels were $18,55 \pm 1,41$, $26,54 \pm 1,34$ and $45,10 \pm 2,22$ micromol/L, respectively.

As a result, although, these levels in hepatitis groups were lower than levels in control group, statistical analysis was shown that there were no significant differences between both groups. But total nitrite+nitrate levels of patients with hepatitis C were significantly lower than total nitrite+nitrate levels of control group.

Keywords: Nitrate, Nitric oxide, Nitrite, Viral hepatitis

KISALTMA LİSTESİ

ADMA:	Asimetrik dimetil arginin
AIDS:	Kazanılmış bağışıklık eksikliği sendromu
AKŞ:	Açlık kan şekeri
ALP:	Alkalen fosfataz
ALT :	Alanin transferaz
AST :	Aspartat transferaz
BMI:	Vücut kitle indeksi
CAH:	Kronik aktif hepatit
cGMP :	Siklik guanozin monofosfat
CGRP :	Kalsitonin geni-ilişkili peptid
CLH:	Kronik lupoid hepatit
COX:	Siklooksijenaz
CPH:	Kronik persistan hepatit
CRP:	C reaktif protein
DNIC:	Dinitrozil demir-sistein
eNOS:	Endotelial nitrik oksit sentetaz
ESR:	Eritrosit sedimentasyon hızı
GAPDH :	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GGT:	γ glutamil transferaz
HAI:	Histolojik aktivite indeksi
HAV:	Hepatit A virüsü
HBV:	Hepatit B virüsü
HCC:	Hepatoselüler karsinoma
HCV:	Hepatit C virüsü
HDV:	Hepatit D virüsü
HEV:	Hepatit E virüsü
HIV:	İnsan bağışıklık eksikliği virüsü
HPLC:	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IFN:	İnterferon

IL:	İnterlökin
iNOS:	Uyarılabilir nitrik oksit sentetaz
L-NAME:	N ^G -nitro-L-arginin metil ester
L-NMMA:	N(G)-monometil-L-arginin
NANC:	Nonadrenarjik, nonkolinerjik
ncNOS:	Nöronal nitrik oksit sentetaz
NO:	Nitrik oksit
NOS:	Nitrik oksit sentetaz
NOx:	Nitrit+nitrat
O ₂ ^{•-} :	Süperoksit
ONOO ⁻ :	Peroksinitrit
SDMA:	Simetrik dimetil arginin
SNAP:	S-nitrozo-N-asetil-penisilamin
Th:	T – helper hücresi
TNF:	Tümör nekrozis faktör
VIP :	Vazoaktif intestinal peptid

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Fonksiyonları kritik bir şekilde yeterli kan akımına bağılı olan her organ uygun bir doku perfüzyonuna ihtiyaç duyar. Damar endotelinin bir çok vazoaaktif madde salgıladığının bulunması bu konuya yeni ışıklar tutmaktadır. Bu vazoaaktif maddeler genel damar tonusunu ya da kan basıncını etkilemeden bölgesel ya da lokalize seviyede periferik damarları etkileyerek kan akımının yeniden düzenlenmesini sağlamaktadır. Bu, özellikle karaciğer gibi metabolik açıdan aktif olan organlarda etkilidir. Zira, sinüzoidal basıncı etkileyen her bir faktör karaciğer metabolizmasını da doğrudan etkilemektedir. Doğal bir vazodilatör olan nitrik oksit hepatik damarlar üzerinde ciddi etkilere haizdir. Ancak nitrik oksitin karaciğer metabolizması üzerindeki gerek doğrudan gerekse dolaylı etkileri konusunda bilinenler oldukça azdır.

İnsan vücudundaki metabolizması oldukça karmaşık olan nitrik oksitin çeşitli klinik tablolarındaki değişimleri bir çok değişik çalışmada araştırılmıştır. Bununla beraber, farklı araştırmalarda farklı sonuçlar elde edilmiş olması bu konudaki karışıklığı artırmaktadır. Nitrik oksit metabolizmasının son ürünleri olan nitrit ve nitratın serum veya plazma seviyelerinin ölçümü bir çok araştırmada toplam nitrik oksit yükünün bir göstergesi olarak kabul edilmiş ve ölçülmüştür.

Biz, hastanemize başvuran ve viral hepatit saptanan hastalarda serum nitrit ve nitrat seviyelerini belirlemeyi ve bunun klinik ve laboratuvar bulguları ile ilişkisini belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

İlk olarak 1981 yılında Ignarro ve arkadaşları (1) tarafından endotel kaynaklı gevşetici faktörün nitrik oksit (NO) olduğu ifade edilmiştir. Bu hipotez, nitrovazodilatörlerin ve NO'nun vazodilatasyon oluşturmak üzere guanilat siklazı aktive ederek siklik guanozin monofosfat (cGMP) seviyelerini yükseltmesi temeline dayanmaktadır. NO, tüm vücutta bir çok etkilere haizdir ve damar endoteli, Kupffer hücreleri, plateletler, mast hücreleri, makrofajlar, sinir uçları ve beyin hücreleri tarafından salgılanmaktadır. NO ayrıca prostaglandinlerin ve diğer vazoaktif maddelerin etkileri sonucu da salınabilmektedir. Ek olarak, NO bir çok farklı uyarıya cevap olarak karaciğerden de salınabilmektedir (2).

Çeşitli vücut sıvılarında nitrit ve nitrat seviyelerinin ölçülmesine ilgi son yıllarda giderek artmaktadır. Bu iyonlar günlük diyetle alındığı gibi, nitrik oksitten vücutta endojen olarak da yapılmaktadırlar.

2.2. Karaciğer

2.2.1. Anatomi

Karaciğerde fonksiyonel ünite asinüstür. Asinüsten kan hepatik venlere, safra ise safra kanallarına akmaktadır. Her bir fonksiyonel ünite yani asinüs, anatomik olarak hepatik damar sistemi etrafına yerleşmiş hücre kümeleri içermektedir. Karaciğerin hepatoselüler mimarisi oldukça komplekstir. Çünkü;

- 1) Karaciğer çok sayıda hücre tipi barındırır,
- 2) Karaciğerin yüksek rejenerasyon kapasitesi nedeniyle içerdiği hücre tiplerinin birbirine oranı çeşitli hasarların tipine ve şiddetine göre değişebilmektedir,
- 3) Kupffer hücreleri, yani monositlerden geliştiği düşünülen hepatik makrofajlar vücuttaki toplam doku makrofajı sayısının % 90'ından fazlasını oluşturmaktadır,
- 4) Yağ depolanmasından sorumlu olan *Ito* hücreleri aynı zamanda sinüzoidal direncin düzenlenmesinde de rol oynamaktadır.

2.2.2. Metabolik Süreç

Karaciğerin sayısız ve birbirinden çok farklı fonksiyonları protein ve peptidlerin sentezinden ve karbohidratların depolanmasından, ilaçların ve barsak metabolitlerinin

detoksifikasyonuna ve hormonların inaktivasyonuna kadar uzanmaktadır. Karaciğer aynı zamanda, safra ve ürenin yapılmasından, yağ metabolizmasından ve hatta bir çok immün fonksiyondan da sorumludur. Karaciğerin bir çok yaşamsal metabolik fonksiyonu için yeterli kan akımı alması şarttır. Üstelik, karaciğerde yürüyen bir çok metabolik ve farmakolojik reaksiyon oksijen bağımlıdır ve yeterli oksijen desteği ile birlikte uygun gaz değişimi de gereklidir.

2.2.3. Kan Akımının Hepatik Metabolizma ve Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi

Karaciğer metabolizmasının düzenlenmesi, kan akımının düzenlenmesine bağlıdır. Total hepatic kan akımının % 75'i portal ven kanalıyla barsaklardan, geri kalan % 25'i ise hepatic arter yoluyla sistemik dolaşımdan gelmektedir. Portal hipertansiyonun dekompresyonu amacıyla cerrahi olarak oluşturulan portokaval şantlarla portal akım sistemik dolaşıma yönlendirildiği zaman hem karaciğer metabolizmasında hem de sistemik metabolizmada dramatik değişiklikler olmaktadır.

Total hepatic kan akımının, altına düştüğü zaman normal bir karaciğerin metabolizmasının bozulacağı kritik bir alt sınırı olduğu düşünülmektedir. Total kan akımının normalin % 25'inin altına düşmemesi gerektiği hipotezi ileri sürülmüştür. Yapılan bir çalışmada ise sağlıklı gönüllülerde ve sirozlu hastalarda vücut ağırlığına göre portal ven kan akımı hesaplanmıştır. Buna göre sağlıklı gönüllülerde 12-20 ml/min/kg olarak ölçülmüş ve bu değerler normal sınırlar olarak kabul edilmiştir. Sirozlu hastalarda ise değerler 12 ml/min/kg'nin altında ölçülmüş ve bozuk karaciğer fonksiyonları ile ilişkili bulunmuştur (3).

2.2.4. Hepatik Arter Kan Akımının Hepatik Metabolizma Üzerindeki Etkileri

Hepatic arterin karaciğer metabolizması üzerindeki etkileri halen tam olarak anlaşılamamıştır. Bunun rolünün daha çok portal kan akımının azaldığı durumlarda kompensasyon sağlamak olduğu düşünülmektedir. Zira yapılan hayvan deneylerinde hepatic arteri bağlanan ratların karaciğer metabolizmalarında anlamlı değişiklikler saptanmamıştır. Ayrıca, hepatic arter kan akımının düzenlenmesi de hepatic metabolizmadan bağımsız olarak gerçekleşmektedir (4).

2.3. Nitrik Oksit (NO)

Bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan nitrik oksit, doğadaki sayısız molekül arasında en küçük olan 10 molekülden biridir (5). Proteinler gibi oldukça büyük ve karmaşık moleküllerin yanında böylesine basit ve küçük bir gaz molekülünün son derece büyük etkilerinin olabileceği son birkaç yıla kadar düşünülmemekteydi. Son yıllarda nitrik oksitin vücutta bir çok hücrede doğal yollarla üretildiğinin bulunmasıyla etkileri üzerine yoğunlaşan ilgi de artmıştır (6). Nitrik oksitin, kan damarlarının genişletilmesi yoluyla kan basıncı kontrolü, penis ereksiyonu veya yemek sonrası mide genişlemesinin sağlanması, makrofaj aracılıklı tümör hücrelerinin öldürülmesi gibi birbirine tamamen zıt olan geniş bir etki yelpazesi vardır (7). Nitrik oksit metabolizmasında gelişebilecek bozuklukların sonucunda septik şok, Alzheimer hastalığı, Huntington koresi, diyabetes mellitus, nörodejenerasyon, iskemi-reperfüzyon hasarı, transplantasyon materyalinin reddi ve kronik inflamasyon gibi bazı patofizyolojik süreçler başlayabilir (8, 9, 10, 11). Tablo-1’de nitrik oksitle ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlardan bazıları özetlenmektedir.

Tablo-1: Nitrik oksitle ilişkili fizyolojik ve patolojik durumlar (12).

Fizyolojik etkileri	Patolojik durumlar
Guanilat siklaz aktivasyonu	Mitokondriyal solunumun inhibisyonu
Siklooksigenaz aktivasyonu	Hipertansiyon
Normal damar tonusu	İnfantil hipertrofik pilor stenozu
Trombosit agregasyonunun inhibisyonu	Kartagener sendromu
Yemek sonrası mide dilatasyonu	İskemi-reperfüzyon hasarı
Penis ereksiyonu	Septik şokta hipotansiyon
Hafıza	Priapizm
Mukozal hücre korunması	Alzheimer hastalığı
Makrofajların tümör hücrelerini öldürmesi	Ülseratif kolit

Nitrik oksitin biyolojik etkileri, molekülündeki elektronların dağılımı ile kontrol edilmektedir. Bir molekül nitrik oksit, nitrojen atomundan gelen 7 elektron ve oksijen atomundan gelen 8 elektron olmak üzere 15 elektrona sahiptir. Bir molekülde bulunan bu 15 elektron tek sayıda olduğu için bir elektron eşlenmemiş pozisyonadadır. Molekül elektron paylaşma kuralı gereği bir elektron eşlenmemiş kalamayacağı için bu elektron bir diğer molekül ile birleşir. Bu nedenle nitrik oksit yüksek oranda reaktiftir (12).

Moleküler oksijen, süperoksit ve proteine bağlı demir gibi metaller, nitrojen monoksit kaynaklı moleküllerle güçlü bir şekilde etkileşirler.

Ortama bağlı olarak, nitrojen monoksit 3 formda olabilir:

1. Nitrozonyum katyonu
2. Nitrik oksit
3. Nitroksil anyonu

2.3.1. Nitrik Oksitin Sentezi

İnsanlarda NO endojen olarak birçok farklı kaynaktan üretilir. Bunlardan en önemlisi L-arginin'dir (13, 14, 15, 16, 17, 18).

Arginin, sitokrom P₄₅₀-tip enzim grubu ile homologiler gösteren bir enzim olan nitrik oksit sentetaz (NOS) tarafından oksidize edilerek, sitrullin ve NO'e dönüştürülür. Sentez, L-argininin guanido nitrojeninin NADPH-bağımlı oksidasyonu ile gerçekleşir. Çok oynak bir ara molekülün var olduğuna inanılmaktadır. Bu molekül N-hidroksil L-arginin'dir ve NO'in serbestleşmesi ile L-sitrullinin oluşumundan önce NADPH'nin oksidasyonunu gerektirir. Her bir molekül sitrulline karşılık bir molekül NO oluştuğu gösterilmiştir. Karaciğerde, üre siklusu içinde aspartik asitin α -amino nitrojeninin transaminasyonu yoluyla L-sitrullin tekrar L-arginine dönüştürülebilir. L-arginin aynı zamanda arginaz enziminin doğal substratıdır. Bu enzim, arginini ornitine geri dönüşümsüz olarak çevirir. Ornitin amonyağın vücuttan uzaklaştırılabilmesi için üre yapımında kullanılır. NOS'un K_m değerinin arginazinkinden büyük olup olmadığı ya da bu iki yol arasında fizyolojik gereksinimlere göre değişim olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir (19).

Nitrik oksit, önceleri sadece endotel hücrelerinde yapılan bir madde olarak tanımlanmıştır. Ancak, yakın zamanda makrofaj fonksiyonlarının düzenlenmesinde de görev aldığı ortaya çıkarılmıştır. Normal monositlerin bazal bir NO yapımı söz konusudur. Endotoksin kullanılarak bu üretim 6 kattan fazla artırılabilir (20, 21).

Son yıllarda, nitrik oksitin bir çok hastalık durumunda hem faydalı hem de zararlı etkilerinin bulunmuş olması nedeniyle nitrik oksit donörlerinin ve nitrik oksit sentetaz inhibitörlerinin tedavide kullanımı gündeme gelmeye başlamıştır (22).

2.3.2. Nitrik Oksit Sentetazın İzofomları

NOS' un izofomları önce bir çok alt gruba ayrılmışsa da temel olarak üç kategoride incelenmektedir (23). Bu temel kategoriler, enzimlerin lokalizasyonuna, moleküler farklılıklarına ve Ca²⁺/kalmodullin bağımlılıklarına göre yapılmıştır:

1. NOS-1 (ncNOS): nöronal ve esas izoformdur.
2. NOS-2 (iNOS): uygun bir uyarıyı takiben tüm vücutta yapılabilen, uyarılabilir formdur.
3. NOS-3 (eNOS): endotelial ve esas NOS, yani endotel hücrelerinde bulunan esas NOS izoformudur.

eNOS ve ncNOS, aktifleşebilmek için Ca^{+} kalmodulline bağımlıdır ve dimerik komplekslerdir. iNOS'un fonksiyonu ise kalmodullin bağlanmasına ve aktivitesine bağımlı değildir ve trimerik ya da tetramerik kompleksler şeklindedir (24, 25).

iNOS ile diğer iki esas NOS izoformu arasındaki yapısal ayırım, eNOS'un kalmodullin reseptörüne bağlanmamış durumu nedeniyle yapılmıştır. Bu reseptör iNOS (NOS-2) üzerinde sıkıca bağlı olarak bulunur, dolayısıyla aktivite için kalsiyum-kalmodullin bağlanmasına ihtiyacı yoktur. iNOS'un aktivasyonunun temel olarak, bakteriyel endotoksinler (lipopolisakkarit), interlökin-1 (IL-1) ve tümör nekrozis faktör (TNF) gibi inflamatuvar ya da immünolojik uyarılara maruziyet sonucu olduğuna inanılmaktadır (26). iNOS bir kez uyarılınca, bir çok hücre tipinde aktive olarak eNOS'un yapabileceğinin 1000 katından daha fazla NO üretilmesine neden olur. iNOS mRNA'sı, glukokortikoidler, tümör büyüme faktörü, IL-4 ve IL-10 tarafından inhibe edilebilir. eNOS, dimetilarginin tarafından, iNOS ise aminoetil-izotiyoure ve aminoguanidin tarafından inhibe edilir (27, 28).

eNOS, neredeyse tamamen vasküler endotele yerleşmiştir. Bunun ürettiği NO kan damarlarının duvarındaki düz kas hücreleri üzerinde gevşetici faktör olarak rol oynar ve böylece vazodilatasyona neden olur (15). Bu nedenle kan basıncının düzenlenmesinde nitrik oksit çok önemli bir belirleyicidir (29, 30).

İkinci, yani uyarılabilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) makrofajlarda ve diğer bir çok inflamasyon cevabında ya da enfeksiyonlarda rol oynayan hücrede üretilir (31, 32, 33, 34, 35). Makrofajlardaki NOS tarafından üretilen NO sadece iltihabi yanıt sırasındaki atakta görev almaz. Aynı zamanda makrofajın apoptozisine de neden olur (36). NO diğer hücrelerin de apoptozisinde görev alır (37). Uyarılabilir NOS kalsiyum ve kalmodulline sıkıca bağlıdır ve genellikle dolaşan kalsiyum konsantrasyonuna karşı duyarsızdır (23, 38).

Diğer izoenzim olan nöronal NOS, beyin, nöronal doku, nöroblastomalar, iskelet kası, pankreasın β -hücre adacıkları ve ayrıca bronşiyoller, uterus ve midenin epiteliyal hücrelerinde bulunur (31, 39). Her üç tip izoenzim de böbreklerde bulunmaktadır (40). NOS izoformları ve özellikleri Tablo-2'de özetlenmiştir.

Tablo-2: NOS izoformları ve özellikleri (12).

Özellik	Yapısal NOS	iNOS
Bulunduğu yer	Endotel hücreleri Bazı nöronlar Mast hücreleri Trombositler Adrenal medulla	Makrofajlar Hepatositler Tümör hücreleri Endotel hücreleri Mezengiyal hücreler
Ca⁺⁺ bağımlılığı	Bağımlı	Bağımsız
Salınım özellikleri	Geçici Az miktarda (pikomol)	Devamlı Çok miktarda (nanomol)
Aktivatörleri	Uyarıcı amino asitler Asetilkolin Trombin, ADT, ATP	Endotoksin Sitokinler
İnhibitörleri	L-arginin analogları (L-NAME vb.)	L-arginin analogları (L-NAME vb.)
Özgül inhibitörleri	7-nitroindazoller	Aminoguanidin L-kanavanin Deksametazon

Östradiyol gibi bazı hormonlar NO sentezini artırabilirler. (41) Dolaşımda bulunan nitritin yaklaşık %90'ı L-arginin:NO yolundan kaynaklanmaktadır. (42) Düşük nitrat içeren kontrollü diyet alan kişilerin idrarında saptanan nitratın yaklaşık yarısı plazma arginininden kaynaklanmaktadır (43).

NO ayrıca “geri dönüştürülen” nitrit ya da nitrattan değişik yollarla üretilir. Nitritin asidifikasyonu ile midede NO ortaya çıkabilir (44). Enfekte idrarda, idrar nitratından da NO oluşturulabilir (45). İnfarkte kalp dokusunda NO üretildiği gösterilmiştir (46). Bu oluşum NOS'tan bağımsızdır zira spesifik NOS inhibitörlerinden etkilenmemektedir. NO ayrıca ağızda ve terde de bulunmaktadır (47, 48, 49). Bu

10.01.2013
DOKÜMANASYON KURUMU

örnekler, kommensal bakterilerin sentezde rol aldığını ve üretilen NO'nin patojenlere karşı savunma mekanizmalarında rol aldığını göstermektedir (50).

NO, pulmoner hipertansiyonu bulunan hastalarda tedavi amacıyla kullanılmaktadır. NO inhalasyonu ile serum nitrit ve nitratları veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ölçülen plazma nitrat seviyeleri yükselmektedir (51, 52). NO, eşlenmemiş bir elektron ihtiva eder ve bu özelliği ile kimyasal, biyokimyasal ve farmakolojik kompleksler oluşturur (53).

2.3.3. Nitrik Oksitin Biyolojik Akıbeti ve Diğer Nitrat Radikallerinin Oluşumu

Nitrik oksitin biyolojik yarı-ömrü 5 dakika ya da daha kısadır. Bu nispeten kısa yarı-ömür ile biyolojik oluşumlar içinde NO oldukça oynak bir moleküldür. NO, gerek oksidize formu (NO^+), gerekse indirgenmiş formu (NO^-) ile moleküler oksijen, süperoksitler ve geçiş metalleri ile reaksiyona girerek, NO_2^- gibi daha yüksek nitrojen oksitleri ya da değişik metallerle nitrozil-metal komplekslerini oluşturur (54). Üretildikten sonra, daha durağan ürünler olan nitrozotiyol (NO-THIOL) ve dinitrozil demir-sistein (DNIC) şeklinde saklanabilir. NG-hidroksi-L-arginin, NO sentezi için bir başka substrat olabilir. Muhtemelen, en önemli olan NO'nin akut karaciğer yetmezliği ve iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası gibi durumlarda yapılan O_2^- ile reaksiyona girerek sitotoksik bir ürün olan peroksinitrit (ONOO^-) oluşturmasıdır (55). Hepatik metabolizmada daha etkin olan demir gibi geçiş metalleriyle etkileşim, hemoglobinin demir-porfirin komplekslerini, myoglobini ve diğer P_{450} -tip enzimleri de içerir. NO'nin ayrılmasından sonra eriyik guanilat siklaz içinde nitrozil-hem komplekslerinin oluşması, sitokrom P_{450} enzimlerinin inhibisyonuna neden olur. Bu enzimlerin NOS yapımının düzenlenmesi ve NO yapımının negatif geri-besleme yoluyla düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Ek olarak, bir çok sitokrom P_{450} izoenzimi, N-hidroksil-L-arginini ve nitrogliserin ve sodyum nitropurussid gibi nitrik oksit donörlerini etkileyerek NO ortaya çıkartabilir. Araşidonik asitten prostaglandinlerin yapımında ilk iki basamağı katalizleyen siklooksigenaz (COX) enzimi bir başka hem içeren proteindir. Dolayısıyla, NO siklooksigenaz enzimi ile de etkileşmektedir (56).

Çeşitli dokular tarafından üretilen NO'nin bir kısmı, hızlı bir şekilde damar duvarlarındaki düz kas hücreleri veya plateletler gibi bazı efektör hücrelerdeki guanilat siklaz gibi enzimlerin hem gruplarına bağlanır. Bu yolla cGMP seviyesi artar ve NO bir ara veya ikincil elçi gibi hareket etmiş olur (57). Bazı hücrelerde doğrudan hücre-içi

kalsiyum bağlanmasını etkiler. NO'nın artan miktarları su ile reaksiyona girerek nitrit oluşturur. Bu nitrit, myoglobin, hemoglobin gibi proteinlerin ya da enzimlerin içindeki hem grupları ile etkileşerek hızla nitrat oksidize olur ve met-hem proteinleri oluşur (58). Örneğin, NO alyuvarların içine girdiğinde oksihemoglobin ile hızlı bir şekilde etkileşerek methemoglobin ve nitrit oluşturur. Oksijen ve methemoglobin redüktaz varlığında bunlar hızla yeniden nitrat ve hemoglobine dönüştürülürler (59). NO ayrıca, tiyol grupları ile etkileşerek nitrososistein, nitrosohemoglobin ya da nitrosoalbumin gibi nitrosotiyollerini oluşturur (60, 61). Tiyoller ile NO arasındaki ilişki nispeten zayıftır ve nitrosotiyoller, yavaş salınan NO'nın "endotel kaynaklı gevşetici faktör benzeri" etkileri gibi uzun etkili olabilirler. Nitrosohemoglobin deoksijene olduğunda yapısal değişiklikler olur ve NO salınır. Bu durum, endotelde etkili olarak en çok nerede ihtiyaç varsa orada vazodilatasyona neden olur (62).

NO, enfeksiyon sırasında makrofajlar tarafından salgılandığında oldukça önemli etkileri olan bakterisidal bir ajandır (33, 63). Bu savunma mekanizması evrim boyunca korunmuş gibi görünmektedir (64). Peroksinitrit ($\text{ONOO}^\cdot$), NO ve süperoksit ($\text{O}_2^\cdot$)'ten oluşturulur ve muhtemelen bu moleküllerin sitotoksik etkilerinden sorumludur (65, 66). Peroksinitrit ($\text{ONOO}^\cdot$), protonlandığı zaman doku hasarı oluşturan hidroksil (OH) ve nitrojen dioksit (NO_2) radikallerini verir (67). Yine nitrit de, hem peroksidaz ile katalizlenen hidrojen peroksit tarafından oksidize edilerek nitrojen dioksit radikali verebilir (68). NO, memelilerin düz kas hücrelerinde, hücre siklusunda oldukça kritik görevleri olan siklin-bağımlı kinazları etkileyerek proliferasyonu inhibe edebilir (69).

2.3.4. Nitrik Oksitin Karaciğer Metabolizmasına Direk Etkileri

Karaciğer metabolizması üzerine NO'nın etkilerini inceleyen çalışmalarda genellikle NOS'un değişik izoformlarının karakterizasyonu üzerinde durulmuştur (70). NO'nın aktivasyon derecesini gösteren reseptör bağlanma kapasitesi ölçülmemiş ve NOS ekspresyonunun ve aktivitesinin ölçümü ile yetinilmiştir (71). İlginin merkezinde genellikle Kupffer hücrelerinin hepatositler üzerindeki etkileri ve fonksiyonları olmuştur. Kupffer hücreleri sabit yerleşimli hepatik makrofajlar olarak görev alırlar ve dolaşan makrofajlar gibi fagositoz yapma yetenekleri vardır. Fagosit ettikleri arasında karbon kolloid gibi dışardan alınan partiküllerden mikroorganizmalara ve bakteriyel endotoksinlere kadar birçok madde vardır (72).

Kupffer hücrelerinin hepatosit sayısına oranının, hepatosit sitotoksitesinde ve NO sentezinde önemli bir rolü olduğu ileri sürülmüştür. Bu oran, endotoksin ya da immünostimulan enjeksiyonundan sonra Kupffer hücrelerinin artışı nedeniyle

yükselmektedir. Hem hepatositler hem de Kupffer hücreleri, normal şartlarda ya da hastalık durumunda NO sentezleme yeteneğine sahiptir. Ancak, Kupffer hücreleri aynı zamanda diğer süperoksit radikallerini, proteinleri, aykosanoidleri, TNF ve IL-1'i de sentezleyebilmektedir. Lipopolisakkarit ve γ -interferon gibi inflamatuvar bir uyarıya maruz kaldığı zaman, Kupffer hücresi TNF ve IL-1 salıvermektedir. Kupffer hücresinden yapılan bu TNF ve özellikle de IL-1 salınımının daha sonra hepatositlerde iNOS sentezini uyardığına inanılmaktadır. TNF, IL-1, IL-6 ve NO gibi Kupffer hücrelerinin inflamatuvar mediyatörlerinin, oldukça kompleks fonksiyonları sonucunda, sitoprotektif mi yoksa sitotoksik mi oldukları konusu halen tartışmalıdır (73).

Vücuttaki tüm organlarda olduğu gibi karaciğerde de apoptozis yaşamsal öneme sahip ve karmaşık bir mekanizmadır. Çeşitli çalışmalarda nitrik oksitin hepatosit apoptozisinde düzenleyici bir rol oynadığını gösterilmiştir (74, 75).

2.3.4.1.Akut Faz Proteinlerinin Rolü

Akut faz proteinleri, inflamatuvar mediyatörler ya da glukokortikoidler tarafından uyarılan hepatositler tarafından yapılır ve bir travma ya da enfeksiyonun ardından vücudun homeostazında önemli roller oynarlar. iNOS upregülasyonunu sağlayan faktörler ile akut faz proteinlerinin salınmasına neden olan faktörler birbirinden farklıdır. Dolayısıyla iNOS bir akut faz proteini değildir (76). iNOS'un upregülasyonunun akut faz proteinlerinin upregülasyonundan bağımsız olduğu, lipopolisakkarite maruz bırakılan hepatosit ve Kupffer hücre kültürlerinde protein sentezinin düşüşü ile gösterilmiştir. Protein sentezindeki düşüşe paralel olarak NO'nin metabolik ürünleri olan nitrit, nitrat ve sitrullinin seviyeleri yükselmektedir. Kültürlere NOS inhibitörü olan NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME)'in eklenmesi ile protein sentezi tekrar düzelmektedir. Bu da, protein sentezindeki azalmanın endojen NO yapımı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Kültüre dışardan NO eklenmesi ile protein sentezi tekrar inhibe olmaktadır. Bununla beraber, endotoksemiye konak savunma sisteminin cevabı olarak artan protein sentezi de iNOS inhibitörleriyle azalmaktadır. Bu durum lipopolisakkarit endotoksemisine sokulmuş ratlardaki, artmış endojen N-nitrozamin ve NO yapımına neden olan iNOS aktivitesini açıklamaktadır (77).

2.3.4.2.Kupffer Hücreleri ve Glikojenoliz

Karaciğerin eşsiz fonksiyonel karakteristiklerinden biri, birçok stres durumunda vücudun homeostazını sağlayan depolama kapasitesidir. Hepatoselüler glikojenolizin Kupffer hücreleri ve endotel hücrelerinin aykosanoidler gibi çeşitli sekresyonları ile

düzenlendiğine inanılmaktadır (78). Aykosanoidler dışardan verildiğinde glikojenolizi artırmaktadır. Glikojenoliz özellikle protein fosforilasyonu gerektirdiği için, aykosanoidler tarafından uyarılan glikojenolizin cAMP sinyal aracılığı ile olduğu sanılmaktadır (79).

Bir NO donörü olan S-nitrozo-N-asetil-penisilamin (SNAP), cAMP ve glukagon tarafından uyarılan glikojenolizi inhibe ettiği için, NO'nin glikojenolizi azalttığı ve homeostazi düzenlediği söylenebilir. Endotoksemi sırasında glikojenoliz inhibe olmaktadır. Endotoksemik şokta Kupffer hücrelerinden aykosanoidlerin salınımı artmakta böylece hepatosit ya da Kupffer hücrelerinde iNOS sentezi ve sonuç olarak NO yapımı artmaktadır (80). İzole hepatositlerde NO yapımı yapay olarak artırıldığı zaman hem glikojenoliz için hem de glukoneogenesis için gerekli olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) seviyelerinin azalması da bu görüşü desteklemektedir. Sepsis sırasında glukoz yapımı azalmaktadır ve bunun artan NO seviyeleri nedeniyle fosfoenolpiruvat karboksikinazın inhibisyonu yoluyla glukoz sentezinin azalmasına bağlı olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber, lipopolisakkarite maruz kalan rat hepatik endotelial hücrelerinde glukozun aşırı tüketiminin olduğu da gösterilmiştir (81).

2.3.4.3. Siklik Guanozin Monofosfatın Rolü

NO, oksihemoglobine ve bir çoğu karaciğer enzimini olan çeşitli proteinlerin demir-sülfidril komplekslerine bağlanabilmektedir. NO, bazı etkilerini guanilat siklazın hem merkezinin aktivasyonu ve böylece düz kas hücrelerinde hücre-içi siklik guanozin monofosfat (cGMP) seviyelerinin yükselmesini sağlayarak yapmaktadır. Ancak, cGMP'nin düz kas hücrelerinde hangi mekanizma ile etkili olduğu halen net olarak bilinmemektedir.

2.3.4.4. Sitokrom P₄₅₀'nin Rolü

Lipopolisakkarit ile muamele edilmiş rat hepatosit ve Kupffer hücre kültürlerine L-arginin eklendiğinde protein sentezinin azaldığı ve nitrit, nitrat ve sitrullin seviyelerinin yükseldiği görülmüştür. Bu etki bir NOS inhibitörü olan N-monometil-L-arginin ile durdurulabilmektedir. Bu durumda, artan NO yapımının protein sentezini inhibe etmesi nedeniyle sitotoksik olduğu yorumu yapılabilir. NO, sitokrom P₄₅₀ kompleksleri gibi bazı sitoprotektif enzim sistemlerini inhibe edebilmektedir.

Sitokrom P₄₅₀ grubu enzim sistemleri hem içeren proteinlerdir ve detoksifikasyondan metabolik (solunum) fonksiyonlara kadar bir çok farklı işlevden sorumludurlar. Lipopolisakkaritlerin NO yapımını artırdıkları birincil hedeflerinin

Kupffer hücreleri ve endotel hücreleri olduğu gösterilmiştir. Sitokrom P₄₅₀ aktivasyonunu indükleyen alkol, Kupffer ve endotel hücrelerinden lipopolisakkarit etkisiyle artan nitrit ve nitrat çıkışını azaltmaktadır (82). Muhtemelen artan iNOS aktivitesi sayesinde yapımı artan NO'nin metabolitleri olan nitrit ve nitratın dolaşımdaki seviyelerinin artışı negatif geri-besleme etkisi ile daha fazla NO yapımını engellemekte ve sitoprotektif bir rol oynamaktadır. Hücre kültürlerinde, inflamatuvar uyarılarla sitokrom P₄₅₀ aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Ana mediyatör muhtemelen karaciğerde sitokrom P₄₅₀ mRNA ekspresyonunu azaltan IL-1'dir. NO'nin karaciğerde sitokrom P₄₅₀ aktivitesini azaltabilmesi de mümkündür (83).

2.3.4.5.Endotokseminde Nitrik Oksitin Rolü

Normal monositlerin bazal bir NO üretimi söz konusudur. Endotoksemi sırasında bu üretim 6 kattan fazla artabilir (20).

Lipopolisakkarit verilen ratların akciğer ve karaciğerlerinde, verilmeyen ratlarda görülmeyen miktarda, kalsiyum-bağımsız NOS yapımı saptanmıştır (84). Kalsiyum bağımsız NOS'un (iNOS) en yüksek konsantrasyonlarına düz kas hücrelerinde rastlanmaktadır (85). Lipopolisakkarit verilen ratlarda görülen ve karaciğer disfonksiyonunun göstergeleri olan yüksek serum aspartat transferaz (AST), alanin transferaz (ALT), γ glutamil transferaz (GGT) ve bilirubin seviyeleri, selektif iNOS inhibisyonundan sonra düşmektedir. Ayrıca, NO vazokonstriktör ajanlara hiporeaktivite ile ilişkili bulunmuştur. Septik şok sırasında yapımı aşırı artan NO'nin, başta karaciğer fonksiyonları olmak üzere sağlığa zararlı olduğu ve selektif inhibisyonunun tedavi edici etkileri olabileceği düşünülmektedir (86).

Endotoksemi sırasında oluşan hipotansiyon, *Ito* hücrelerinden NO salınımına neden olan sitokinler nedeniyle ortaya çıkabilir (87). Deneysel olarak hem rat hem de insan hepatosit kültürlerinde en yüksek iNOS aktivitelerine lipopolisakkarit verilerek ulaşılabileceği gibi, normalde doku hasarı sırasında üretilen IL-1 ve interferon- γ verilerek de aynı seviyeler elde edilebilir. Bu durumda, protein sentezinde % 36'lık bir düşüş gözlenmektedir ve bu azalmanın iskemi-reperfüzyon hasarında rol oynayabileceği düşünülmektedir (88).

Konvansiyonel tedavilerle hipotansiyonları düzeltilemeyen septik şok hastalarına nonspesifik bir NOS inhibitörü olan L-NMMA'nın verilmesi ile hipotansiyon düzelebilmekte ve bu açıdan NOS inhibitörleri umut vaatetmektedir. Child A ve B

sınıftaki hastalarda görülebilen periferik vazodilatasyondan tek başına artmış NO yapımının sorumlu olduğu gösterilememiştir (89).

Bunun tersine başka araştırmacılar, akut endotoksemi sırasında NO sentezi inhibisyonunun hepatoselüler hasarı artırdığını saptamışlardır (90). Endotoksemi sırasında gelişen kardiyovasküler kollapsta NO'nun sitoprotektif etkileri olduğu görüşü de ileri sürülmektedir. Lipopolisakkarid verilmiş olan tavşanlarda, NO sentezinin nonselektif bir inhibitör olan L-NMMA ile (iNOS ve ncNOS) inhibisyonu yaşamı tehdit edici sonuçlara yol açarken, iNOS'un selektif bir inhibitörü olan deksametazon faydalı olmuştur. Yine, sepsisle ilişkili karaciğer hasarı modelleri üzerinde yapılan başka çalışmalarda da, L-NMMA kullanımı ile karaciğer hasarının arttığını gösteren AST ve ALT yükselmeleri saptanmıştır. L-NMMA ile sepsiste intestinal hasarın arttığı ve periferik dolaşımdaki vazokonstriktör duyarsızlığının geri döndüğü de bildirilmiştir (91).

Günümüzde mevcut olan veriler oldukça zihin bulandırıcıdır. Genel olarak, sepsiste ncNOS ve iNOS'un birlikte inhibisyonunun zararlı olabileceği, iNOS'un selektif inhibisyonunun ise faydalı sonuçlar doğurabileceği kabul edilmektedir (92).

2.3.4.6.Sirozda Nitrik Oksitin Rolü

Sirotik hastalarda, artmış periferik NO salınımına bağlı olabilecek, hiperdinamik bir splanknik dolaşım vardır (93). İlk çalışmalarda, cGMP'yi inhibe ederek nonspesifik olarak NO aktivitesini inhibe eden metilen mavisi ile dekompanse alkolik sirozu bulunan hastalarda, bu hastalıkla ilgili ciddi hipotansiyonun düzeldiği bildirilmiştir. Yine, asetil sistein verilerek sirozlu hastalarda görülen hiperdinamik dolaşımın gelişmesinden korunulabileceği saptanmıştır (94). Portal hipertansif ve sirotik ratların mezenterik arterlerinin noradrenalin, vazopressin, potasyum klorid ve metoksamin gibi vazokonstriktörlere cevabının, sirotik olmayan ratlarınkine göre daha az olduğu saptanmış ve bu kısmen de olsa NO'nun artmış salınımına bağlanmıştır (95). Ek olarak, portal veni kısmen bağlanmış olan ratlarda NO sentezinin inhibisyonu ile bazal perfüzyon basıncının değişmemesi sağlanmış ve vazokonstriktör duyarlılığı da düzelmiştir (96). Yine benzer bir portal hipertansiyon modelinde L-NMMA ile portal vasküler direnç değişmeden kalırken düşmüş olan sistemik kan basıncı düzelmiştir (97).

Portal hipertansiyon sırasında meydana gelen vasküler tonus değişiklikleri anatomik lokalizasyona göre değişebilir. Örneğin, karbon tetraklorid ile oluşturulmuş sirozlu ratlarda izole aortik ringlerin karaciğer damarlarında bulunmayan anjiyotensin-II'ye cevabında bozulma vardır ve bu durum artmış NO sentezi ile açıklanabilmektedir

(98). Portal hipertansif ratlarda mezenter arterin izole parçaları ile yapılan çalışmalarda vazokonstriktörlere vasküler cevapta herhangi bir azalma gösterilememiştir. Hatta, vazokonstriktörlere karşı bu ratların aortlarında bulunmayan bir artmış maksimum cevaplılık saptanmıştır. Bu artmış maksimum cevaplılık kontrol ratlarında L-NMMA varlığında mezenterik arterlerde elde edilememiştir. Böylece, düz kaslardaki artmış cevaplılığının muhtemelen azalan NO salınımına bağlı olduğu düşünülmüştür. L-NMMA arteriyel cGMP konsantrasyonlarını değiştirmemektedir ve hem siroz hem de kontrol vakalarında NO sentezindeki azalmanın aynı olması nedeniyle sirozda NO sentezinin değişmiyor olması ihtimal dahilindedir. Portal hipertansiyon modeli olarak portal ven ve ortak safra kanalı kısmen bağlanmış ratların kullanıldığı bir başka çalışmada deksametazon ile iNOS inhibisyonu yapılmasının her iki modelde de hiperdinamik sistemik ve splanknik dolaşımda bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (99).

Sekonder biliyer siroz modelinde de artmış NO sentezi saptanmamıştır. Hatta, sekonder biliyer fibrozisli ratlarda cNOS aktivitesi ve dolaşımdaki nitrit ve nitrat konsantrasyonlarında düşüş saptanmıştır. Buna karşılık bir çok araştırmacı tarafından primer biliyer sirozda nitrik oksit yapımının artmış olduğu bulunmuştur (100, 101, 102). Ratlarda deneysel portal hipertansiyonla iNOS ekspresyonunda artış saptanmamıştır. Her ne kadar portal hipertansiyonun gelişimi sırasında sistemik ve splanknik dolaşımdaki NO seviyeleri yükselir ve vazodilatasyonla splanknik hipersirkülasyona neden olursa da bu, intrahepatik portal hipertansiyonun gelişmesinde etkili başka faktörlerin varlığını inkar ettiremez (103).

Sonuç olarak;

- 1) Karaciğer sirozu sırasında görülen hiperdinamik splanknik sirkülasyon tamamen ve sadece periferik NO salınımının artmasına bağlanamaz
- 2) Endotoksemi ilişkili karaciğer yetmezliğinin patogenezi ve portal hipertansiyonunki aynı değildir.

2.3.4.7.Safra Yapımında Nitrik Oksit

Bilirubin ve taurokolatin biliyer klirensi lipopolisakkarit ile endotoksemiye sokulmuş ratlarda bozulur. Bilirubin glukuronidlerinin atılmasındaki azalmanın sebebi, konjugasyonun bozulması değil transportun yavaşlamasıdır. Safra tuzları tarafından oluşturulan vazoaktivite (hiperpolarizasyon) endotelden bağımsızdır ve NOS inhibitörlerinden etkilenmez. Endotoksemide görülen konjuge safra tuzlarının azalmış transportu membranda lokalize transport mekanizmalarının ya nitrat radikallerinin

artmış yapımı ya da glukuronid transportunu etkileyebilen artmış NOS aktivasyonu yoluyla olabilir. Endotoksemi ile ilişkili NO sentezinin doğrudan bilirubin transportunu etkileyip etkilemediği net olarak bilinmemektedir (104).

2.3.4.8. İskemi-Reperfüzyon Hasarı ve Nitrik Oksit

Reperfüzyon hasarı ile oluşan hepatoselüler hasar, NO gibi reaktif oksijen türevlerine bağlıdır (105). Süperoksitlerin faktör κB 'nin nükleer transkripsiyonunu ve sonunda sitokin salınımını artırdıkları, hepatik protein sentezini azalttıkları düşünülmektedir. Karaciğerin iskemi-reperfüzyon hasarı sadece NO salınımına bağlanamaz ise de bir çok çalışmada seviyesinin yükseldiği net olarak gösterilmiştir (106, 107). Karaciğerin reperfüzyonu sırasında artan süperoksit sentezi, NO-süperoksit etkileşimlerini artırarak peroksinitrit (ONOO⁻) gibi hepatoselüler hasarı oluşturan ve oldukça toksik olan türevleri ortaya çıkarmaktadır. Karaciğer transplantasyonu sonrası oluşan reperfüzyon hasarında Kupffer hücrelerinin yanında diğer hücreler de rol oynamaktadır (108). Özakyol ve arkadaşları (109) tarafından yapılan bir çalışmada hayvan modelinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarlanmasının karaciğerde lipid peroksidasyonundan tamamen bağımsız olduğu, ancak bir nitrik oksit sentez inhibitörü olan L-NAME verilmesi ile hasarın net bir şekilde azaldığı gösterilmiştir.

2.3.5. Nitrik Oksitin Karaciğer Metabolizmasına Dolaylı Etkileri

Karaciğer metabolizması yeterli kan akımının sağlanmasına kritik olarak bağlıdır. Total hepatik kan akımı kardiyak atım hacminin % 25'e kadarlık kısmını alabilir. NO'in portal ven ve hepatik arterin damar tonusunu değiştirebildiği bilinmektedir. Böylece kan akımının değişmesi yoluyla karaciğer metabolizması NO'ten dolaylı olarak da etkilenmektedir. Bu durum, NO'in hepatositler ve Kupffer hücreleri üzerindeki çeşitli direk sitotoksik ve sitoprotektif etkilerinin var olması ile tezat teşkil etmektedir (110).

2.3.5.1. Hepatik Arter ve Portal Venin Damar Tonusunun Kontrolünde Otakoidler ve Nitrik Oksitin Rolü

Karaciğerde nonadrenarjik-nonkolinerjik (NANC) bir nörotransmisyonun olduğuna dair bir çok kanıt vardır. Bir çok NANC nörotransmitterin vazodilatasyon etkilerini NO aracılığıyla yaptığına inanılmaktadır. Substans P, kalsitonin geni-ilişkili peptid (CGRP) ve vazoaktif intestinal peptidin (VIP) immünohistokimyasal olarak hepatik arter sinir liflerinde gösterilmesi ile karaciğerdeki NANC nörotransmisyonunun varlığı daha da kesinleşmiştir (111).

Asetil koline ek olarak, NO adenozin, ATP, proendotelin, endotelin-1, CGRP, 5-HT, atriyal natriüretik peptid, VIP, bradikinin, histamin ve substans P tarafından da salınabilir (112). Nitrik oksit, portal ven damar tonusu üzerindeki etkilerini, ATP, asetilkolin, noradrenalin, fenilefrin, endotelin ve prostaglandin $F_{2\alpha}$ 'ya vazokonstriktör cevabı artırarak oluşturur. böylece NO, hepatik arter ve portal venin akım direncini değiştirerek karaciğer metabolizmasını dolaylı olarak etkilemiş olur (113).

Pentagastrin, doza bağımlı olarak hepatik arter rezistansını düşürür. Ancak, bu etki zayıftır ve ilk geçiş etkisine maruz kalmaktadır. Portal ven direncine ise etkisi yoktur. Benzer etkiler, sekretin ve kolesistokininde de vardır. Glukagon zayıf bir vazodilatördür fakat, bunun uzun süreli etki etmesi halinde noradrenalin, anjiyotensin ve vazopressine karşı verilen vazokonstriktör cevapta artma olmaktadır. CGRP, bradikinin, atriyal natriüretik faktör ve en önemli vazodilatör olan substans P NO salınımını artırmak suretiyle hepatik arter üzerinde vazodilatasyona neden olurken portal venin damar tonusu üzerine etkileri ya hiç yoktur ya da çok azdır (114).

2.3.5.2. Pürinlerin Rolü

Pürinler hepatik damar tonusu üzerine oldukça önemli etkilere haizdirler. ATP, pürinerjik P_{2Y} -pürinoreseptörleri uyararak, NO salınımını artırmak suretiyle hepatik arterde vazodilatasyona neden olur. Portal venöz sistemin içine enjekte edildiğinde, ATP hepatik arterde vazodilatasyona neden olmaktadır. Ancak, ATP'nin oluşturduğu bu hepatik arter vazodilatasyonunun sadece NO aracılığıyla mı olduğu yoksa hepatik parankime yayılan ATP'nin mi bunu yaptığı net olarak bilinmemektedir (115).

2.4. Nitrit ve Nitrat

Nitrik oksit metabolizmasının son ürünleri olan anyonlar nitrit (NO_2^-) ve nitrattır (NO_3^-). Reaktif olmayan bu durağan moleküllerin serum veya plazma konsantrasyonlarının ölçümü organizmadaki NO yapımını yansıtmaktadır (116). Normal sıçanlarda nitrik oksitin sürekli atılımının saptanması ve genetik olarak makrofajları eksik olan farelerde bu atılımın kaybolduğunun bulunması sayesinde vücutta sürekli bir nitrik oksit yapımının olduğunu göstermektedir (117). Makrofaj kültürlerinde nitratin kaynağının araştırılması kaynağın arginin olduğunu ve bu aminoasitin kültür ortamına eklenmesinin makrofajların öldürme fonksiyonlarını artırdığını göstermiştir (117). Daha sonraki çalışmalar önceden endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak bilinen molekülün aslında nitrik oksit olduğunu göstermiştir (57). Hem endotel kaynaklı gevşetici faktör hem de nitrik oksit donörleri sadece kan

damarlarını değil diğer tüm düz kasları gevşetirler ve bu gevşemeye düz kas hücresindeki hücre içi siklik guanozin monofosfat (cGMP) artışı eşlik eder (12).

2.4.1. Nitrit ve nitratın diyetle alımı

Nitrit ve nitrat iyonları suda yüksek oranda çözünürler. Nadiren, hemen hemen tüm katyonlarla birlikte suda çözünür tuzlar şeklinde de bulunabilirler. Oral olarak alındıklarında ince barsaklardan kolayca emilirler (119). Oral olarak alınan nitratın yaklaşık % 25'i aktif olarak tükürüğe sekrete edilir. Bu nitrat daha sonra oral bakteriler tarafından kısmen nitrite ve mide asiti tarafından nitrik oksite dönüştürülür. Bu da gastrointestinal sistem enfeksiyonlarının önlenmesinde yardımcı rol oynar. Nitrit ve nitratın transport sistemleri yakın zamanda anlaşılabilmiştir. Bir nitrat ve H⁺ kotransporter sisteminin önemi üzerinde durulmaktadır (120). Nitrit ve nitratlar, et ürünleri ve peynirler gibi birçok gıda maddesinin içine koruyucu olarak ya da içerik zenginleştirici olarak katılmaktadır ancak, bunlar aynı zamanda diyetin doğal parçalarıdır. Eğer bir bakteriyel kontaminasyon söz konusu değilse içme suyunda genellikle 10 mg/L 'nin altındaki konsantrasyonlarda bulunurlar. İçme suyunda bundan daha yüksek konsantrasyonlarda nitrat bulunan bölgelerde, özellikle infantlarda methemoglobinemiye önlemek için bu konsantrasyonların düşürülmesine yönelik önlemler alınmalıdır. Sebzeler, özellikle de pancar, kereviz, ıspanak ve marul gibi çok yapraklı sebzeler nitratlar açısından zengindirler. Diğer sebzeler daha düşük konsantrasyonlarda nitrat içermekle beraber diyetle çok alınmaları nedeniyle önem arz edebilirler. Günlük diyetle alınan gıdalar içinde en yüksek nitrit seviyeleri (36 µg/g) işlenmiş et ürünlerinde, en yüksek nitrat seviyeleri (88 µg/g) ise sebze konservelerinde bulunmaktadır (121, 122). Uygun olmayan saklama koşulları ve bakteriyel kontaminasyon nitrit seviyesinin yükselmesine neden olabilir (123). Batı diyetinde, bir erişkinin aldığı ortalama nitrit (0,1 mg) seviyesi nitrat seviyesinin (80 mg) oldukça altındadır (124). Polonya'da yapılan bir çalışmada normal bir günlük diyetle vücudun her bir kilogramı için alınan nitrit miktarı 0.2 mg NaNO₂ ve nitrat miktarı ise 5 mg KNO₃ olarak ölçülmüştür. Altmış kilogram ağırlığındaki bir erişkinin bir gün içinde aldığı diyetin içinde ortalama NaNO₂ miktarı 1.8-8.4 mg arasında değişmektedir ve ortalama miktar ise 4.39 mg olarak ölçülmüştür. KNO₃ seviyesi ise 69.5-737.5 mg arasında oynamaktadır ve ortalama miktar 304.55 mg'dır (125).

Diyetle aşırı miktarlarda nitrit ya da nitrat alımının, karsinojenik olan N-nitroso bileşiklerinin fazla yapılmasına neden olabileceği bildirilmekle beraber bu konu halen tartışmalıdır (126).

Nitrit ve nitratın %95'ten fazlası böbreklerden atılır. Nitrat, olduğu gibi ya da üreye çevrilerek idrarla atılır (127). Nitratın kandan idrara klirens hızı yetişkinlerde yaklaşık 20 ml/dk'dır (51). Feçeste az miktarda ölçülebilir nitrit ya da nitrat bulunur (128). Ter yoluyla bir miktar nitrit (3 $\mu\text{mol/ml}$) veya nitrat (40 $\mu\text{mol/ml}$) kaybı olmakla birlikte bu esas atılım yolu değildir. Antibiyotik tedavisi alan kişilerin terinde daha az nitrit bulunması deri bakterilerinin de nitrit sentezinde rol aldıklarını düşündürmektedir (49).

Diyetle alımın değişkenliği, plazma nitrat seviyelerini ve idrarla atılan miktarı da büyük oranda etkilemektedir. Tahmin edilebileceği gibi, kontrollü çalışmalarda alım arttıkça idrarla atılan miktar da artmıştır (128). Plazma nitrat seviyesi, yüksek nitratlı diyetten sonra 30 $\mu\text{mol/ml}$ 'den 200 $\mu\text{mol/ml}$ seviyesine kadar yükselmiş, 500 mg oral potasyum nitrat alımından sonra ise 300 $\mu\text{mol/ml}$ 'e kadar çıkmıştır (13). Nitrit ve nitrat iyonları vücudun tüm sıvı boşluklarına dağıldığı için oldukça geniş bir dağılım hacmine (0,28 L/Kg) sahiptirler. Yüksek oranda nitrat içeren bir diyetten bir gün sonra dahi idrar seviyeleri yüksek kalmaktadır. Normal bir Japon diyeti alan 5 gönüllüden 4 saatte bir toplanan kan örneklerinde oldukça geniş bir değişkenlik saptanmıştır (129). Bazı araştırmacılar sabah kalkıldığında hemen alınacak rasgele örneklerin kullanılabileceğini savunurken, bazıları sabah açlıkta alınacak ikinci örneğin sağlıklı olacağını savunmaktadır. Bir başka tez ise değişkenliği azaltmak için akşam yemeğinden hemen sonra örnekleme yapılması gerektiğidir (130). Bundan sonra ekskresyon idrar kreatinini ile karşılaştırılmaktadır. Bir grup araştırmacı nitrik oksit metabolizmasını temsil edebilmesi için örneklemenin en az 48 saatlik diyet kısıtlaması sonrasında yapılması gerektiğini belirtmektedir (13). Diğer araştırmacılar ise sadece distile suyun içilebildiği 15 saatlik açlığı yeterli bulmaktadır.

Eğer diyetin nitrit ve nitrattan kısıtlı olması isteniyorsa, Westfeld ve arkadaşları (14), diyetten alkollü içkilerin, havyarın, şarküteri ürünlerinin (pişmiş ya da terbiyelenmiş et), peynirin, baharatların, tuzlanmış balığın, köklerin ve sebzelerin çalışmadan en az 2 gün öncesinden çıkarılması gerektiğini belirtmişlerdir. Viinikka (131) ise bir çok gıda maddesinin önemli ölçüde nitrat içerdiğini belirtmiş ve listesine et ürünleri, sebzeler, baharatlar, balık, kavun, siyah çay ve şarap gibi mayalı içecekleri de eklemiştir. Wang ve arkadaşları (132) standart bir Japon diyetinin plazma NO

seviyelerine ve 24 saatlik idrar atılımına etkilerini en aza indirmek için örneklemeden önceki 3-4 gün boyunca bu yiyecek ve içeceklerin kısıtlanması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacılar plazma seviyelerinin düşük nitrit ve nitrat içeren diyetin üçüncü ile altıncı günleri arasında sabah saat 06:00'da tutarlı olduğunu bulmuşlardır.

Yüksek oranda tuz içeren diyetlerin alımı ile iNOS aktivitesinin azalabileceğinin gösterilmiş olması nedeniyle doğru ölçüm ve vakalar arası standardizasyonun yapılabilmesi için diyetteki tuz miktarı kısıtlı ve sabit olmalıdır (133).

Nitrat içeren ilaçlar anjina pektorisin tedavisinde uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Bunlar NO ortaya çıkarırlar ve idrar nitrat seviyesini yükseltirler. Ancak, terapötik dozları diyetle alınan nitrat miktarlarına oranla oldukça az olduğundan bunların üriner ekskresyona katkısı oldukça küçük olmaktadır.

2.4.2. Plazma ve idrarda nitrit ve nitratın ölçülme yöntemleri

Klinik kimyada nitrik oksit sentetazın aktivitesinin ve nitrik oksit radikalleri yapımının göstergeleri olarak plazma ve serum nitrit ve nitrat ölçümleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Nitritin kanda tam bir doğrulukla ölçülmesi oldukça zordur. Tam kan ve plazma içindeki nitrit ve nitratın yaklaşık % 87'si ölçülebilir. Nitrit durağan değildir ve tam kan içindeki nitritin % 95'inden fazlası 1 saat içinde nitrata oksidize olur. Dolayısıyla, tek başına plazma nitrit ölçümü yapılmasının bir anlamı yoktur. Kana eklendiğinde, oda sıcaklığında 30 dakika sonra % 16'sı kalır. Bir saat sonra ise kalan miktar % 5'in altındadır. Ancak +4 °C'de bu oranlar 30 dakikada % 69 ve 60 dakikada % 55'e çıkar. Hemolizden korunmak şartıyla plazma kandan ayrıldıktan sonra hem nitrit hem de nitrat -20 °C'de en az bir yıl süreyle sabit olarak saklanabilir. Doğru ölçüm yapılabilmesi için plazma örnekleri deproteinize edilmeli ve hatalı ölçümlerden sakınmak için her bir örnek için kontrol kullanılmalıdır (134).

İdrar nitrit ve nitratı ise mikrobiyal kontaminasyon olmazsa durağandır. Asit pH nitriti parçaladığından asidik koruculardan kaçınılmalıdır. Örnekler buz içinde toplanmalı ve toplama sırasında idrara antibiyotik ya da isopropanol eklenmelidir (135). Uzun süreli saklama için örneğin toplandıktan hemen sonra dondurulması önerilmektedir.

Plazma nitrit ve nitrat konsantrasyonları birbiriyle paralel değildir. Nitrit, toplam nitrit+nitrat'ın % 3.9 ile % 88'i arasında değişebilir (134). Plazma ve idrardaki nitrit konsantrasyonları, genellikle nitrat konsantrasyonunun küçük bir parçasıdır (<%5) ve

bu iyonların diyetle alımındaki ve biyoreaktivitelerindeki farklılıkları yansıtır (136). Kolorimetrik testler kullanılarak nitrit ile nitratın birlikte (NO_x) ölçülmesi sıklıkla tercih edilmektedir. Zira böylece prosedür basitleştirilebilmekte ve nitrit analizi için gerekli olan oldukça zorlu örnek hazırlama mecburiyetinden kurtulmuş olunmaktadır. Eğer araştırmacı özellikle nitrit ile ilgilenmiyorsa, serum NO_x belirlenmesi için kullanılabilir. Nitrit vücut sıvılarında nitrata oranla çok daha düşük konsantrasyonlarda bulunduğu için, NO_x kısaltması genellikle ve hemen hemen nitrat ile eşanlamli olarak kullanılmaktadır. Literatürde terminoloji ile ilgili bir karışıklık bulunmaktadır. Bazı yazarlar “NO_x”u ifade etmek için “nitrit”i kullanmaktadırlar çünkü nitrit nitratın indirgenmesinden sonra ölçülen komponenttir (137, 138, 139, 140).

Bu yazıda ise NO_x kısaltması ile nitrit+nitrat ifade edilecektir. Nitrik oksit araştırmalarında kullanılmak üzere standart bir terminoloji önerisi yakın zamanda yayınlanmıştır (141).

2.4.2.1.Kolorimetrik metodlar

Nitrit reaktiftir ve yaygın olarak boya yapımında kullanılmaktadır. Ölçülmesi için 50’den fazla kolorimetrik metod önerilmiştir ve bunların çoğu azo boyalarının oluşumuna dayanmaktadır. Günümüzde, **Brucine** metodunun kullanıldığı bir kaç referans yazı bulunmaktadır. Bu metodda, nitrit nitrata permanganat ile oksidize edilmekte ve sonra sarı renk vermesi için stiriknin ile kaynatılmaktadır (130). Bununla beraber en yeni klinik yazılarda kullanılan kolorimetrik metodlar **Griess** reaksiyonuna dayanmaktadır. Nitrit bir azo boyası oluşturması için sulfanilamid ve N-(1-naftil) etilendiamid ile reaksiyona sokulmaktadır (134). Ayrıca, eğer bakterilerden (*Escherichia coli*, *Pseudomonas oleovorans*) ya da mantarlardan (*Aspergillus*) elde edilen bir enzim olan nitrat redüktaz ile önce nitrite dönüştürülürse nitrat da ölçülebilir (142, 143). Alternatif olarak, bakır kaplanmış kadmiyum ya da granüle kadmiyum üzerinde metalik indirgenme de kullanılabilir (144). **Griess** reaksiyonunun, çeşitli reaktif etkileşmelerinden kurtulmak için düzenlenmiş olan bir çok varyantları bulunmaktadır. Plazma ölçümleri proteinden arındırmayı gerektirmektedir. Bunun için çinko hidroksit, çinko sülfat ya da ultrafiltrasyon kullanılabilir (134). Temeli **Griess** reaksiyonu ve akım enjeksiyon analizine ya da HPLC’ye dayanan bir çok otomatik metod bulunmaktadır.

Griess reaksiyonu temel alınarak yapılan ölçümlerde, tekniğin doğru kullanımı ile metodun duyarlılığı artmaktadır. Aynı metod kullanılarak kan, idrar ve beyin-omurilik sıvısı gibi bir çok biyolojik materyalde nitrit ve nitrat ölçümleri yapılabilir. Bu

metodda metanol ya da dietileter ile deproteinizasyon yapılması gereklidir. NADPH-hassas nitrat redüktazın varlığında indirgenme gerçekleştirilerek elde edilen materyal 540 nm spektrofotometre yardımıyla okunur. Ölçümde elde edilen sonuçların birimi $\mu\text{mol/L}$ 'dir (145).

2.4.2.2.Ultraviyole spektrofotometrik metod

Serum ve idrar nitratının ölçülebilmesi için doğrudan devamlı bir kinetik spektrofotometrik metod tanımlanmıştır (146). *Aspergillus*'un nitrat redüktazı kullanılarak nitrat NADPH ile indirgenmektedir. Yine buna benzer tek basamaklı yöntemler de bulunmaktadır (147).

2.4.2.3.Florumetrik metodlar

Nitrit ve indirgendikten sonra nitrat florumetrik olarak da ölçülebilmektedir. Bir metodda, nitrit 2,3-diaminoftalen ile asit katalizörlüğünde kapalı bir halka oluşturarak hayli floresan olan 2,3-diaminoftotriazol'u oluşturmaktadır (148, 149). Bu metod *Griess* reaksiyonuna göre 50-100 kat daha hassastır ve serum ya da plazmada ve doku kültürü ortamlarında kullanılmaktadır. Küçük adaptasyonlarla bu metodla S-nitrosotiyollerin ölçülmesi de mümkündür (150). Rhodamin 6G'nin sülfirik asit içinde oksidizasyonuna dayanan basit ve oldukça seçici bir florumetrik yöntem daha tanımlanmıştır. Bu yöntem süt analizleri için kullanılmaktadır (151).

2.4.2.4.Elektrodları ya da biyoanalitik elementleri kullanan metodlar

Birçok nitrit ya da nitrat spesifik elektrodlar ve biyoanalitik elementler geliştirilmiştir (152). Bunlar genellikle sıvı örneklerin çalışılabilmesi için düzenlenmiştir. Tükürük ve süt örneklerinin çalışılabilmesi için düzenlenmiş olanları da bulunmaktadır (153).

2.4.2.5.NO analizörlerinin kullanıldığı metodlar

NO analizörleri hava örneklerindeki NO'nin, ozon varlığında kemiluminesans vermesi esasına dayalı olarak düzenlenmişlerdir. Ozon oksijen beslemesi bulunan bir silindir içinde elektriksel bir boşalmaya neden olur. NO' ten elde edilen ilk ürün geçici olarak kemiluminesans veren nitrojen dioksittir (154). Bu analizörler klinik olarak, pulmoner vasküler hastalık için NO'nin tedavi amacıyla verildiği hastaların nefeslerindeki NO ve NO₂'yi monitörize etmek için kullanılmaktadır (155, 156, 157). Bu cihazlarla nefesteki NO' i ölçmek nitrit ya da nitratı ölçmekten daha kolaydır. Bunlar

ayrıca bir çok farklı durumda klinik araştırmalar için modifiye edilmişlerdir. Bununla beraber, nefesteki NO miktarı nefes verme tekniğinden çok fazla etkilenmektedir. Üstelik, nefesteki NO'nın kaynağı net olarak bilinmemektedir. Nefeste ölçülen NO'nın büyük bölümü alveoller yerine nazofarinkste ya da hava yollarında üretiliyor olabilir (155, 158).

NO analizörleri ile nitrit ya da nitratı ölçebilmek için nitrojen ya da helyum gibi inert bir gazı içeren ek bir donanım gerekmektedir (159). Bundan sonra nitrit için asetik asit/iyodid, nitrat için ise vanadyum III/NaOH kullanılarak kimyasal indirgenme sağlanarak NO elde edilmekte ve bu monitörize edilmektedir (160).

2.4.2.6.Kapiller elektroforez

Kapiller elektroforez, oldukça geniş bir yelpazede kullanılabilen ve gelecek vadeden bir metoddur. Bu yöntemle serum, plazma ve idrarda nitrit veya nitrat ölçülebileceğı yayınlanmıştır. Her iki anyon da sadece ultrafiltrasyon gibi minimal bir örnek hazırlığından sonra tek bir enjeksiyonla ölçülebilmektedir. Kapiller izotakiforez metodu ile ise S-nitroso içerikleri ölçülebilmektedir. Süt ve kan örneklerindeki nitrit ve nitratı ölçebilmek için “miçellar elektrokinetik kapiller kromatografi metodu” da kullanılabilir (161).

Kapiller elektroforez bir mikrotekniktir ve çok küçük hacimlerdeki sıvı örnekleri dahi çalışabilmek için uygundur. Deneysel çalışmalarda ratların havayolu sıvılarının ve tek nöronların nitrit ve nitrat içeriklerini saptayabilmek amacıyla kullanılmıştır (162). Bu avantajlarına rağmen, kapiller elektroforez yapabilmek için gereken donanım ve tecrübeli eleman bulunan laboratuvar sayısı oldukça azdır.

2.4.2.7. Gaz kromatografisi ve gaz kromatografi-kütle spektrofotometrisi

Gaz kromatografisi, su ve tükürükteki nitrit ve nitrat ve ayrıca rat idrarındaki nitrat analizleri için kullanılmıştır. Gaz kromatografi-kütle spektrofotometrisi metodunda ¹⁵N işaretli internal standartlar ya da izotop seyreltme teknikleri kullanılmaktadır (163).

2.4.2.8.Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), bazı deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Bu teknikle yiyeceklerde, idrarda ve serumda nitrit ve nitrat ölçümü yapılmış olan çalışmalar mevcuttur. Metod temel olarak, iyon değışimi ile ayırştırmaya

dayanmaktadır. Plazma örneklerinin ultrafiltrasyon ya da protein çöktürmesi yoluyla deproteinize edilmesi gerekmektedir (51, 164).

2.4.2.9.Kontaminasyondan korunma

Muhtemel kontaminasyonlardan kaçınmak nitrit ve nitrat analizi yapmak isteyen tüm klinisyenler ve laboratuvar çalışanları için kaçınılmaz bir gerekliliktir. Özellikle eser elementlerin çalışılması için üretilmemiş olan cam malzemeler kolaylıkla nitrat ve bazen de nitrit ile kontamine olabilmektedir. Ultrafiltrasyon filtreleri, plastik pipetler, eldivenler ve eldiven pudraları ve hatta kan tüplerinde antikoagulan olarak kullanılan EDTA dahi nitrat içerebilmektedir. Yine bazı heparinize şırıngalar ve lastik stoperler de nitrat barındırabilmektedir (165).

2.4.3. Klinik değerlendirme

2.4.3.1.Referans değerleri

Toplam 11 çalışmanın değerlendirilmiş olduğu iki raporda referans değerleri belirlenmiştir. Çeşitli maksatlarla farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda kullanılmış olan sağlıklı gönüllülerden oluşan kontrol gruplarında elde edilen nitrit, nitrat ve nitrit+nitrat (NO_x) konsantrasyonları Tablo-3'te toplanmıştır (131, 166).

Tablo-3: Farklı araştırmalarda kullanılan sağlıklı kontrol vakalarının serum nitrit, nitrat ve NO_x seviyeleri.

YAZAR	YAYIN YILI	VAKA SAYISI (n)	NİTRİT (ort.±SD) $\mu\text{mol/L}$	NİTRAT (ort.±SD) $\mu\text{mol/L}$	NO _x (ort.±SD) $\mu\text{mol/L}$
Jilma	1996	40		21.1±6.5	
Suzuki	2001	12	4.1±3.9	35.9±11.3	
Sakai	2001	24			25.8±12.5
Tankurt	1998	10			29.0±4.6
Guevara	1998	7			34.9±9.7
Giovannoni	1997	24			36.0±5.9
Moshage	1995	26	4.2±2.5	19.7±7.3	
Watanabe	2000	263			38.5±7.8
Squeira	2002	20	4.4±2.3	6.7±2.9	
Moussa	2000	8			35.8±15.1
Coşkun	2001	10		16.8±21.7	

Diyet kısıtlaması ile plazma ve idrar konsantrasyonları yaklaşık 1/3 – 1/2 oranında azalmaktadır (166, 167). Yirmi dört saatlik açlık sonrasında da kan ve idrar NOx seviyeleri % 30 oranında azalmaktadır. Böbrek fonksiyonlarının direk bir göstergesi olan inülin klirensi ile serum NOx konsantrasyonları arasında ise negatif bir doğrusal ilişki söz konusudur (168).

2.4.3.2. Cinsiyet ve yaş farklılıkları

Bir çalışmada 22 erkekte ortalama plazma nitrat seviyesi 27 µmol/L olarak ölçülürken, 18 kadın gönüllüde bunun yaklaşık yarısı kadar olan 14 µmol/L'lik bir ortalama nitrat seviyesi ölçülmüştür. Yine vücut ağırlıklarına göre düzeltilmiş nefes NO seviyeleri de erkeklerde daha yüksek ölçülmüştür (169). Bu çalışmada diyet kontrollü değildir ancak örnekler 12 saatlik açlıktan sonra alınmıştır. Başka çalışmalarda da ortalama plazma nitrat seviyeleri erkeklerde daha yüksek ölçülmüş ve artan yaş, atherogenezis, plazma lipidleri, serum glukozu ve kan basıncı ile ilişkili olarak yüksek değerlerden bahsedilmiştir. Giovannoni ve arkadaşları ise cinsiyetler arasında bu kadar önemli farklar saptayamamışlardır. Ortalama serum NOx konsantrasyonları erkeklerde (n=12) 39 µmol/L olarak ölçülürken kadınlarda (n=12) 33 µmol/L bulunmuştur. Bu araştırmacılar, ayrıca ortalama plazma nitrat seviyelerinin serum seviyelerine göre 2-3 kat daha yüksek olduğuna dikkat çekmişlerdir. Ancak, bu konsantrasyon farklılıklarını muhtemel bir kontaminasyon odağı olan antikoagulanların nitrat içeriğini dikkate almamışlardır (170). Bir başka çalışmada ise plazma seviyeleri ile serum seviyeleri arasında farklılık saptanmamıştır (134). Erkekler ve postmenapozal kadınların ortalama serum NOx konsantrasyonları birbirine çok yakındır (171, 172).

Menstrüel siklusun NOx konsantrasyonları üzerindeki etkileri halen tartışmalıdır. Plazma NOx konsantrasyonları erişkin kadınlarda folliküler faz sırasında artmaktadır (173). İn vitro fertilizasyon amacıyla hormon tedavisi almakta olan kadınlarda plazma NOx seviyesi ile plazma östradiyol seviyesi arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu çalışmada da diyet kontrol edilmemiş olmakla beraber örnekler 12 saatlik açlık sonrasında alınmıştır (41). Aynı araştırmacılar daha sonra bir başka çalışmada östrojen tedavisi verilen postmenapozal kadınlarda plazma NOx seviyelerinin yükseldiğini saptamışlardır. Benzer çalışmalarda 3 günlük transdermal östradiyol kullanımından sonra ya da 12 aylık tedaviden sonra kadınlarda artmış serum NOx konsantrasyonları saptanmıştır (171, 174). Bunun tersine Jilma ve arkadaşları, kadınlarda menstrüel döngü sırasında nefes NO seviyeleri ya da serum nitrat konsantrasyonlarında değişiklik

saptamamışlardır. Yine, Morris ve arkadaşları da, 30 gün boyunca nefes NO seviyesi ve sabah idrar nitrit/kreatinin oranlarında değişiklik saptamamışlardır. Bununla beraber, hiperprolaktinemi nedeniyle amenoreyik olan kadınlarda serum NOx konsantrasyonları düşük bulunmuş ve değerler başarıyla tedavi edilenlerde yükselmiştir (175).

Cinsiyet ve yaş farklılıklarının serum nitrit ve nitrat seviyeleri üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların en kapsamlılarından biri Watanabe ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Çalışmaya yaşları 20-69 arasında değişen 118 kadın ve 145 erkek olmak üzere toplam 263 sağlıklı gönüllü alınmış ve serum NOx seviyeleri *Griess* metodu kullanılarak ölçülmüş. Lineer regresyon analizleri ile NOx seviyelerinin kadınlarda yaşla birlikte belirgin şekilde yükseldiği ($r=0.22$, $p<0.05$) fakat erkeklerde böyle bir değişim olmadığı saptanmış. Kadınlarda genç yaş grubunda (<40 yıl) aynı yaştaki erkeklere göre daha düşük NOx seviyeleri saptanırken ($p<0.05$) 40 yaş üstü grupta erkeklerle kadınlar arasında bir fark olmadığı görülmüş. Ayrıca, çoklu lojistik regresyon analizleri ile orta yaş grubu (46-55 yıl) kadınlarda menapozun serum NOx konsantrasyonlarını artıran bağımsız bir risk faktörü olduğu bulunmuş ($r=0.4$, $p<0.05$). Bu sonuçlara göre serum NOx konsantrasyonlarının kadınlarda, muhtemelen menapozun etkisiyle, yaşla birlikte arttığı, erkeklerde ise böyle bir farklanmanın olmadığı yorumu yapılmıştır (176).

2.4.3.3. Çocuklardaki değerler

Genel olarak, 3 yaşına kadar olan çocuklarda daha belirgin olmak üzere 12-17 yaşlarına kadar olan yaşlarda plazma ve idrar NOx konsantrasyonları cinsiyetten bağımsız olarak daha yüksek olarak bulunmaktadır.

2.4.3.4. Genel Değerlendirme

NO'nin vücuttaki bir çok farklı aktiviteleri nedeniyle metabolizması da bir çok farklı durumdan etkilenebilmekte ve dolayısı ile kan ve idrardaki metabolitlerinin konsantrasyonları değişebilmektedir. NOS'un iki izoenziminin aktivitesi çeşitli hastalık durumlarında fazla değişmemekle birlikte neredeyse tüm vücutta yaygın olarak bulunabilen uyarılabilir NOS izoenziminin aktivitesi enfeksiyon ya da inflamasyon ile çok belirgin oranlarda artabilmektedir. Enzimin aktivitesi tam olarak uyarılmış bir makrofajda bir endotel hücresindeki orana yaklaşık 1000 kat artabilmektedir (16).

2.4.3.5.İdrar Yolu Enfeksiyonunun Bir Göstergesi Olarak İdrar Nitriti

Nitrit, esas olarak bakteriyel nitrat redüktaz aktivitesiyle ve bir miktar da NOS gibi farklı yollar sayesinde idrar nitratından üretilir (45, 177). Asidik idrarda bir miktar nitrit NO'ten dönüşürse de bunun miktarı azdır. Artmış idrar nitriti idrar yolu enfeksiyonunun tanısında yardımcı bir kriterdir ve bu temele dayalı test stripleri yıllardır ticari olarak bulunmaktadır. Bazı araştırmalarda bakteriyel lökosit esterazı gösteren testlerin daha hassas olduğu gösterilmiştir (178). Nitrofurantoin nitrit testlerinin etkinliğini azaltmaktadır. Bu testlerin kullanımı bireyselleştirilmeli, sonuçları dikkatle yorumlanmalı ve klinisyeni doğrudan antibiyotik tedavisine yönlendirmemelidir. Zira pozitif kestirim değerleri düşüktür.

2.4.3.6.Diğer Enfeksiyonlarda Nitrit ve Nitrat

Hastanede yatan hastalarda diyetle alımının idrar ve plazma nitrit ve nitrat seviyelerine katkısı daha azdır. Bu nedenle, bu iyonların kan veya idrardaki konsantrasyonlarının artması NO sentezinin, yıkımının ya da atılımının değişmesi sayesinde önemli bir gösterge olabilir. Bu durum, septik şok, ağır siroz, endotoksemi, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ve çoklu organ yetmezliği hastalarına uygulanabilir (179, 180, 181, 182, 183). Normal kontrol vakaları ile sepsis ve septik şok içerisinde bulunan hastaların *Griess* reaksiyonu ile ölçüle plazma NO_x seviyeleri arasında ciddi farklılıklar vardır (184). Ortalama değerler kontrol vakalarında 35 µmol/L, sepsis hastalarında 126 µmol/L ve septik şok hastalarında 582 µmol/L olarak ölçülmüştür (180). Septik şokta spesifik NOS inhibitörlerinin kullanımının faydalı olup olmayacağı halen tartışılmaktadır. Akciğer tutulumu ve diğer ilişkili enfeksiyonları olan AIDS hastalarında plazma nitrit seviyesi artmaktadır (185). Başka çalışmalarda ciddi enfeksiyonu bulunmayan AIDS hastalarında NO üretiminde değişiklik saptanmamıştır. Sonuç olarak HIV ile enfekte hastalarda nitrik oksit yapımının artıp artmadığı kadar var olan nitrik oksit yapımının da konak için iyi mi yoksa kötü mü olduğu sorusu halen yanıtsız kalmaktadır (186).

2.4.3.7.İmmün Aktivasyon Göstergesi Olarak Nitrit ve Nitrat

Plazma nitratı immün sistem aktivasyonunun bir göstergesi olarak önerilmiştir (187). Deney hayvanlarında endotoksin ya da zimosan verilerek oluşturulan immün olaylar sırasında, seviyesi 20 kat kadar artmaktadır. Ratlarda ve sıçanlarda lipopolisakkarit ile plazma NO_x seviyeleri artmaktadır (188). Değerler enjeksiyondan yaklaşık 20 dakika sonra en yüksek seviyeye çıkmaktadır. Ayrıca lökosit

fonksiyonlarının nitrik oksit tarafından düzenlendiği ya da en azından etkilendiği ortaya konmuştur (189).

Çeşitli ilaçların, sitokinlerin ya da insülin, paratiroid hormon ve atriyal natriüretik peptid gibi hormonların etkilerinin değerlendirilebilmesi için nitrit veya nitrat, kanda, idrarda ya da kültür sıvılarında ölçülebilir (190, 191).

Serum nitriti romatoid artiritli ve osteoartritli hastalarda yükselmektedir. Tutulan eklemlerden alınan sinoviyal sıvıdaki seviyelerin serum düzeylerinden daha yüksek olması nitritin eklemden kaynaklandığını düşündürmektedir (192, 193). Değişiklikler romatoid artritte daha belirgindir ve yaklaşık üç kat kadar artmış olan idrar nitratı/kreatinin oranı bu hastalıkta NO yapımının iyi bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (192). Romatoid artiritin prednisolon ile tedavi edilmesi sonucunda idrar nitrat seviyeleri % 28 kadar azalmakta ancak yine de kontrol vakalarına göre yüksek kalmaktadır. Ancak tedaviden önce bile hastalarla kontrol vakalarının değerleri arasında çakışmalar olduğundan bir tanı aracı olarak kullanılması mümkün gözükmemektedir. Serum nitrat seviyesi eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve C-reaktif protein (CRP) seviyeleri ile paralel olarak değişmektedir. Romatoid artritte serum NOx'tan daha hassas olarak, askorbat indirgenmesinden sonra serum NO da ölçülebilir. Ortalama serum NO seviyeleri kontrol vakalarında 36 nmol/L bulunurken romatoid artiritli hastalarda bunun yaklaşık sekiz katı (293 nmol/L) ve osteoartritli hastalarda ise yedi katı (266 nmol/L) yüksek bulunmuştur (194).

Serum NOx birçok kanserin tedavisinde kullanılan interlökin ve interferon tedavilerinin etkinliklerini izlemek için de kullanılabilir (195). Nefeste NO ölçülmesi de akciğer inflamasyonunun bir belirteci olarak önerilmiştir. Ortalama serum nitrat seviyeleri sistemik lupus eritematozus vakalarında da kontrol vakalarına göre daha yüksektir. Bu vakaların cilt biyopsi örneklerinde endotel hücreleri ve keratinositlerde uyarılabilir-NOS proteininin ekspresyonu da artmıştır. Bir başka çalışmada ise sistemik lupus eritematozus, trombotik trombositopenik purpura ve primer antifosfolipid sendromlu hastalar ile kontrol vakaları arasında serum nitrat seviyeleri açısından fark saptanamamıştır. İmmünolojik anormalliklerin bulunduğu bir çocukluk çağı sistemik panvaskülitisi olan Kawasaki hastalığında da idrar NOx ve neopterin seviyeleri hastalığın birçok evresinde yüksek olarak ölçülmektedir (196).

2.4.3.8.Hipertansiyon, Renal ve Kardiyovasküler Hastalıklarda Nitrit ve Nitrat

NO'nin kan akımının ve arteriyel basıncın düzenlenmesindeki rolü ayrıntılı olarak incelenmiştir. Endoteliyal NOS geni bulunmayan sıçanlarda hipertansiyon görülmektedir. Spontan olarak hipertansif olan sıçanlarda ise insan NOS geni verilmesi ile kan basınçlarında azalma olmaktadır. Bu prosedür ile idrar ve serum NOx seviyeleri ile birlikte idrar ve aorttaki cGMP seviyeleri yükselmektedir (197). Endotelin kendisi kan basıncının düzenlenmesinde önemli fonksiyonlara sahiptir ve disfonksiyonu atherogenezde etkilidir. NO sisteminin yaşlanma ve atherogenez ile olan ilişkisi geneldir ve homosistin metabolizması ile ilişkili atherotrombozis tam olarak anlaşılamamıştır (198).

NO böbrekte çok sayıda etkiye sahiptir. Saha önce de belirtildiği gibi, böbrek her üç NOS izoenzimine de sahiptir ve bunların normal fizyoloji, hipertansiyon ve diyabetteki kesin rolleri tamamen açıklanamamıştır. Selektif ve nonselektif NOS inhibitörlerinin kullanımı ile renal tübülün kompleks fizyolojisine ve bunların diüretik ve natriüretik etkilerine biraz ışık tutulmaya çalışılmıştır. Ratlarda, böbreğin makula densa hücrelerinde de bulunan nöronal NOS'un spesifik olarak inhibe edilmesi muhtemelen tübüloglomeruler geri-besleme ve geçici olarak düşen glomerüler filtrasyon hızı ile alakalı olarak hipertansiyona neden olmuştur (199). Nitrit ve nitrat böbreklerden atıldığı için eğer bunlar NO yapımının birer göstergesi olarak kullanılacaklarsa renal fonksiyonlar ve klirens hızları ile birlikte değerlendirilmeleri gereklidir. Yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan 71 hastada serum NOx konsantrasyonları ile kreatinin seviyeleri arasında çok güçlü bir pozitif korelasyon saptanmıştır (200). Böbrek yetmezliği olan hastaların ortalama plazma nitrat konsantrasyonları diyaliz öncesinde normalin yaklaşık 3-4 katı yüksek iken diyaliz sonrasında normalin altına düşmektedir (201).

NO hipertansiyonun başlamasında rol alabilir. Tek böbrekli rat modelinde artan serum NOx seviyeleri ile sistolik kan basıncı arasında ilişki gösterilmiştir. Ancak, benzer insan çalışmalarında renovasküler hipertansiyonlu vakalarda benzer ilişki gösterilememiştir. Artmış plazma NOx seviyeleri renal parankimal hastalıkta azalan glomerüler filtrasyon hızı ile alakalıdır. Nefrotik sendromda, idrar nitriti minimal değişiklik nefriti olan hastalarda artarken, fokal segmental glomerülosklerozis ya da IgA nefropatisi olan hastalarda normal sınırlardadır. Birçok endojen NOS inhibitörü tanımlanmıştır: N(G)-monometil-L-arginin (L-NMMA), asimetrik dimetil arginin

(ADMA) ve simetrik dimetil arginin (SDMA). Bunlar özellikle de düşük glomerüler filtrasyon hızı bulunanlar olmak üzere hipertansif hastalarda yükselmiş olarak ölçülürler. Ancak bunların hipertansiyonun sebebi mi yoksa hastalıkla birlikte bulunan bir durum mu olduğu tam olarak bilinmemektedir (202).

Östrojenlerin koroner damarlar üzerindeki koruyucu etkileri NOS'un kompleks etkileri sayesinde olabilir (203). Kısa süreli yüksek doz antioksidan tedavi verilen vakalardan hem normotansif hem de hipertansif olanlarda kan basıncı düşmekte ve nitrit atılımı artmaktadır. Plazma kolesterolü ve LDL ile plazma NOx konsantrasyonları arasında ters korelasyon vardır. Kalp yetmezliği ve kardiyomyopatiye NO'nın yeri tam olarak bilinmemektedir (204, 205). Bazı çalışmalarda ciddi kalp yetmezliği olan vakalarda monositlerin sitokin salıverme fonksiyonlarının azaldığı gösterilmiştir (206). Portal hipertansiyonu olan hastalarda transözefagial varis ligasyonundan sonra, hemodinamiklerin değişmesi ile beraber serum nitrat seviyesi belirgin olarak düşer. (39 $\mu\text{mol/L}$ 'den 29 $\mu\text{mol/L}$ 'ye) Ancak, serum nitratı uzun süreli iyi klinik gidişin bir göstergesi olarak kullanılması mümkün gözükmemektedir (114, 207).

Preeklampside nitrit ve nitratın yeri ile ilgili literatür bilgileri çelişkilidir. Ortalama serum nitrat konsantrasyonları, preeklampsili kadınlarda normal gebelere ve gebe olmayan sağlıklı kontrol vakalarına göre daha yüksektir (sırasıyla 47 $\mu\text{mol/L}$, 31 $\mu\text{mol/L}$ ve 32 $\mu\text{mol/L}$) (208, 209).

2.4.3.9. Transplantasyon ve Rejeksiyonda Nitrit ve Nitrat

NO, karaciğerin birçok hücresinde üretilir ve mikroorganizmalar, parazitler ve tümör hücrelerine karşı savunma mekanizmaları içinde bir ikincil elçi olarak görev alır. Hepatopulmoner sendromlu hastalarda nefes NO seviyeleri yükselir ve başarılı bir transplantasyondan sonra tekrar normal seviyelere döner (210, 211, 212). Karaciğer transplantasyonu sonrasında rejeksiyon gelişen vakalarda plazma NOx seviyeleri yükselmektedir (213). Bu vakalarda bazı değerler çakışmakla birlikte en yüksek seviyeler Grade 2 ve 3 rejeksiyonlarda görülmektedir. Plazma nitrat seviyesi orta ve ciddi rejeksiyonda yükselmekte ancak hafif rejeksiyonda değişmemektedir (214). Ortalama değerler ciddi rejeksiyon grubunda 50 $\mu\text{mol/L}$, hafif rejeksiyon grubunda ise 20 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir. Glukokortikoidlerle yapılan başarılı bir anti-rejeksiyon tedavisinden sonra değerler normal sınırlara dönmektedir (215). Plazma nitratındaki hafif yükselmeler postoperatif periyoddaki birçok hastada görülmektedir ve muhtemelen geçici olarak yetersiz bir anti-rejeksiyon tedavisine bağlıdır. Ancak, ratlarda parsiyel

hepatektomiden sonra NO sentezinde artış saptanmaktadır, bu nedenle transplantasyondan sonra görülen yükselmeler hasara karşı oluşan nonspesifik bir cevap da olabilir (216).

Ratlarda kalp transplantasyonundan sonra idrar Na atılımında sekiz katlık bir artış olmaktadır. Oysa deksametazon ile tedavi edilen hayvanlarda bu artış daha az olmakta ve normal kontrol vakalarının ancak 2-3 katı kadar artışlara rastlanmaktadır (217). Bu artışlar muhtemelen myokarddaki uyarılabilir NOS'un ve makrofajlardaki NOS aktivitesinin artışı ile olmaktadır. İnsanlarda da kalp transplantasyonundan sonra rejeksiyon olması durumunda idrar nitrat seviyeleri yükselmektedir. Ortalama değerler, rejeksiyon belirtisi bulunmayan 86 kalp transplantasyonu hastasında 100 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin iken, rejeksiyon gelişen hastalarda bu değer 128 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinin olarak ölçülmüştür. Ancak, bu değerlerin hem vakalar arasında hem de her bir vakanın kendi içinde farklılıklar gösteriyor olması nedeniyle rejeksiyonun tanısında kullanımı zordur. Yine de, serum NOx değerlerinin rejeksiyonun ciddiyeti ile korelasyon gösterdiğini saptayan bazı araştırmacılar tarafından 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 'nin üzerindeki plazma nitrat değerleri Grade 2 rejeksiyonun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir (218).

Ratlarda, deneysel ince barsak rejeksiyonunda da serum NOx seviyelerinin yükseldiği saptanmıştır. Anti-rejeksiyon tedavisinin başlanmasından hemen sonra değerler hızla düşmeye başlamaktadır.

Renal transplantasyonda, dipstik metoduyla bakılan idrar nitriti bakteriürinin tespitinde başarılı bir yöntem olarak kabul edilmemektedir.

2.4.3.10.Kan Sisteminde Nitrit ve Nitrat

Sağlıklı kontrol vakaları ile karşılaştırıldığında orak hücreli aneminin ağırlı krizi içinde olan hastalarda plazma NOx konsantrasyonları artmıştır. Bu artışın sebebi tam olarak bilinmemektedir ancak rutin NOx ölçümlerinin bu hastaların takibinde faydası olamaz zira, ağırlı krizde olmayan orak hücreli anemi hastalarında da ortalama plazma NOx seviyeleri orta derecede yüksek olarak bulunmaktadır (59, 219).

2.4.3.11.Solunum Hastalıkları ve Sigara İçicilerinde Nitrit ve Nitrat

Bronşiyoler lavaj sıvısındaki ortalama NOx konsantrasyonu sigara içen vakalara göre akciğer kanseri olan hastalarda yaklaşık 20 kat daha yüksektir. Bu, muhtemelen sitokin aktivasyonuna bağlıdır (220). Yine bronkopnömonisi olan hastalarda da değerler yaklaşık 2 kat artmış olarak ölçülmüştür. Astımlı hastaların balgam örneklerindeki NOx seviyeleri Griess reaksiyonu ile ölçülmüş ve kontrol vakalarınınkine göre yaklaşık iki

kat yüksek değerlere ulaşılmıştır (221). Nefeste NO ölçümü de benzer ve anlamlı sonuçlar verebilir (222).

Sigara içiminin NO metabolizması üzerindeki etkileri oldukça komplekstir. Sigara dumanı 500 ppm'in üstündeki içeriği ile mükemmel bir NO kaynağıdır. Dumanın NO konsantrasyonu tütünün nasıl üretildiği ve nasıl işlendiğine bağlı olarak oldukça geniş bir yelpazede değişmektedir (223). Sigara içimi, endotele bağlı damar gevşemesini bozmaktadır. Sigara içimi, özellikle de ağır içicilik, paradoksal olarak daha düşük serum NOx seviyeleri ile ilişkilidir. Üstelik, sigara içiminden vazgeçildiğinde, muhtemelen akciğer fonksiyonlarının düzelmesi nedeniyle, nefes NO seviyeleri yükselmektedir (224, 225, 226).

2.4.3.12.Değişik Durumlarda Nitrit ve Nitratın Ölçümü

Plazma nitrat konsantrasyonları yanık hastalarında yükselmektedir. En yüksek değerler vücudunun % 10-40'ı yanan hastalarda ölçülmektedir. Hafif yanıklarda plazma NOx seviyeleri değişmemektedir (227). Hafif yanık olmasına rağmen yüksek plazma NOx seviyelerine, yanma sırasında dumana maruz kalan ya da yanan alanın tedavisi amacıyla kullanılan seryum nitrat ile kontaminasyon olan vakalarda rastlanmaktadır (228).

Benzer şekilde yaygın künt travmalar sonrasında gelişen doku hasarlanmalarında da plazma nitrat seviyeleri yüksek bulunmaktadır (229).

İnsan gözyaşının nitrat konsantrasyonu seruma göre düşük seviyelerdedir. Ancak, NO sisteminin birçok intraoküler oluşum ve göz iritasyonu durumlarında oldukça önemli olmasına rağmen, bunun çeşitli göz rahatsızlıklarındaki kullanılabilirliği konusunda yeterli veri yoktur.

NO, nöronal hücreler, pankreas hücreleri, kondrositler ve makrofajlar gibi bir çok çeşit hücrenin apoptozisinin başlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır. NO ile p53 tümör süpresör gen arasındaki etkileşim halen araştırılmaktadır ve NO tümör büyümesini destekliyor olabilir (230). Tümör büyümesi ya da apoptozisin monitörize edilmesi amacıyla plazma ya da idrar NOx ölçümleri ile ilgili bir çalışma henüz yapılmamıştır. Ancak bir çok çalışmada çeşitli kanser türlerinde ilgili alanlardan alınan örneklerde plazma NOx seviyelerinin yükselmiş olarak bulunduğu rapor edilmektedir (231). NO, kemikte hücreler arası iletişimde önemli roller oynuyor olabilir ancak metabolitleri artrit ve spondiloartropati gibi inflamatuvar hastalıklar dışındaki kemik ve eklemler hastalıklarında çalışılmamıştır (232).

Bazı ön çalışmalarda NOS inhibitörlerinin antidepresan-benzeri etkileri olduğu bulunmuştur. Gerçekten de majör depresyon rahatsızlığı bulunan hastaların plazma nitrat konsantrasyonları anksiyete bozukluğu olanlardan ($p<0,05$) ve sağlıklı kontrol vakalarından ($p<0.01$) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (233).

Erken doğum yapan kadınların vajinal sekresyonlarında nitrit ve nitrat seviyeleri yüksek bulunmuştur (234, 235).

2.4.4. Gastroenterolojide Nitrit ve Nitratın Yeri

Nitrik oksit mukozanın savunma sisteminde önemli rollere sahip olduğu gibi çeşitli hastalıklarda ve hasarlanmalarda da anahtar rolü oynamaktadır (236, 237).

Gastroenterolojik rahatsızlığı olan hastaların muhtemel düşük sebze içerikli diyetle beslenmeleri nedeniyle plazma ve idrar nitratının seçicilik ve faydasını artırabilir. Bununla beraber, bir çok araştırmada hem plazma veya serumdaki hem de nefesteki nitrit ve nitrat seviyesi ölçümlerinin gastrointestinal sistemin çeşitli hastalıkları hakkında önemli bilgiler verebileceği saptanmıştır (238).

NO ve diğer serbest radikallerin sekreteruar diyaredeki gerçek rolü halen araştırılmaktadır (239). Enteroinvazif bakterilerle oluşan enfeksiyonların doğrudan doğruya kolon epitel hücrelerinde iNOS ekspresyonunu ve nitrik oksit yapımını artırdığı bilinmektedir (240).

İnflamatuvar barsak hastalığında, başka bir inflamatuvar hastalığı bulunmayan hastalarinkine göre yaklaşık dört katlık bir idrar nitrat/kreatinin oranı vardır (241). Bununla beraber, başka araştırmacılar ortalama serum nitrat konsantrasyonlarını, ülseratif kolitli ve Crohn hastalıklı hastalarla sağlıklı kontrol vakaları arasında belirgin derecede farklı saptamamışlar ancak, aktif hastalığı bulunan hastalarda inaktif hastalığı olanlara göre daha yüksek seviyeler bulunduğunu göstermişlerdir (242). Serum NOx konsantrasyonları ile inflamatuvar barsak hastalığının aktivitesi ve prognozu arasında paralellik saptanmıştır. Hatta bunun hastalık aktivitesinin belirlenmesinde oldukça hassas bir gösterge olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (243). Bu nedenle serum NOx konsantrasyonları belirgin derecede artmış olan ülseratif kolit hastalarının medikal ya da cerrahi tedavilerinin değiştirilmesi gerektiği düşünülebilir (244). Bu bulgulara benzer biçimde, medikal tedaviye cevap vererek düzelme gösteren ülseratif kolitli hastaların idrar nitratı seviyelerinde düşüş saptanmıştır (245). Lenfositik koliti ve kollajenöz koliti olan küçük bir hasta grubunda da plazma NOx seviyeleri belirgin derecede yüksek bulunmuştur. Aynı hasta grubunda kolonoskopi sırasında mukozal yüzeye yakın kısımlardan toplanan kolon örneklerindeki NO seviyeleri de kontrol

vakalarından toplanan örneklere kıyasla daha yüksek konsantrasyonlarda ölçülmüştür (246).

Bu gibi durumlarda NO yapımının arttığının başka kanıtları da vardır. Biyopsi örneklerinden hazırlanan kolon mukoza kültürlerinde, normal kontrol vakalarına kıyasla aktif Crohn Hastalığı yada ülseratif koliti bulunan hastalardan hazırlananlarda NOS aktivitesinin 4-10 kat daha fazla olduğu ve nitrit yapımının da 4-8 kat artmış olduğu saptanmıştır. Metilprednizolon ya da ketotifen varlığında hazırlanan kültürlerde ise ölçüm değerleri daha düşük seviyelerde kalmıştır (247, 248). NO sentezinin dolaylı bir göstergesi olan mukozal L-sitrullin seviyeleri de aktif hastalığı olan hastalarda daha yüksek seviyelerdedir (249). Bir NOS inhibitörü olan L-NAME (N-omega-nitro-L-arginine methyl ester)'nin topikal uygulaması ile rat modelinde kolonik inflamasyonun azalması, NO sentezinin bu hastalıkta inflamasyonla ilişkili olduğunu düşündürmektedir (250). Yine, nitrik oksit sentetaz inhibitörleri ile kolitle ilişkili megakolonun tedavi edilebildiğinin gösterilmiş olması da inflamatuvar barsak hastalıklarında nitrik oksit yapımının artmış olduğunun ve bu artışın patolojik mekanizmalarda oldukça önemli rollere sahip olduğunun ikincil bir göstergesidir (251). Üstelik inflamatuvar barsak hastalıklarında sadece inflamasyonun olduğu mukoza alanlarında değil normal görünen mukoza alanlarında da nitrik oksit yapımı artmış olarak bulunmakta ve bunun prognostik bir gösterge olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (252).

Sıçanlarda, oral arginin desteği ile barsaklardan diğer organlara bakteriyel translokasyonunun azalıyor olması, konağın barsak yoluyla giren patojenlere karşı savunmasında NO sentezinin önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir (253).

Kolera, şigelloz gibi özgül intestinal enfeksiyonlar sırasında da nitrik oksit yapımı artmaktadır (254).

Gastrointestinal hastalıklarda barsaklarda yapılan NO'nin koruyucu etkileri potansiyel zararlı etkilerini de beraberinde getirmektedir (237). Kronik atrofik gastritli hastaların mide sıvılarında nitrit konsantrasyonlarının yüksek olduğu bulunmuştur (255). Bu hastalarda hafifçe yükselmiş olan mide pH'sı nitritin stabilitesini artırabilmektedir. Oysa, ağızdaki bakteriyel flora tarafından nitrattan nitrit üretilmesi konağı *Candida* gibi patojenlerden korumaktadır (256, 257).

NO (nitrerjik) sinir sistemi barsak motilitesi, sekresyonu ve diğer fonksiyonları üzerinde önemli roller oynayabilir (258). İnfantlardaki pilor stenozu nöronal NOS geni polimorfizmi ile ilişkilidir. Yine, Hirshprung hastalığında intestinal sinir lifleri içindeki

nöronal NOS azalmıştır (259). Çeşitli çalışmalarda NO'nın pankreasın hem endokrin hem de ekzokrin sekresyonları içinde bulunduğu saptanmıştır (258).

2.4.5. Hepatolojide Nitrit ve Nitratın Yeri

2.4.5.1. Karaciğer sirozunda nitrit ve nitrat

Oksidatif strese sürekli maruz kalmanın bir çok organda olduğu gibi karaciğerde de fibrozisle sonuçlanacağı düşüncesi karaciğer sirozunda nitrik oksit metabolizması değişikliklerinin daha fazla araştırılmasına yol açmıştır (260, 261, 262).

Sirotik hastalarda hem nefes NO hem de serum NOx seviyeleri kontrol vakalarına göre yüksektir. Farklılık derecesi ortalama NO için 252 nL/dk/m^2 'ye karşılık 75 nL/dk/m^2 , ortalama NOx için ise $48 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 'e karşılık $3 \text{ } \mu\text{mol/L}$ 'dir ve değerler birbiriyle paralel değildir (263). Karaciğer sirozunda oksidatif stresin biyolojik göstergeleri olarak NOx ve miyeloperoksidaz seviyelerini inceleyen bir çalışmada hem NOx hem de miyeloperoksidaz seviyeleri yüksek bulunmuştur (264). Çalışmaya 40 adet sirozlu hasta (32 alkolik, 6 viral, 1 hematokoromatozis ve 1 şistozomiyazis) ve 20 sağlıklı kontrol vakası alınmış. Sağlıklı kontrol vakalarında ve sirotik hastalarda sırasıyla miyeloperoksidaz seviyeleri, $249.9 \pm 107.05 \text{ } \mu\text{g/L}$ 'ye karşı $348.40 \pm 194.12 \text{ } \mu\text{g/L}$; nitrit seviyeleri, $4.43 \pm 20.38 \text{ } \mu\text{M}$ 'e karşı $8.38 \pm 3.62 \text{ } \mu\text{M}$; nitrat seviyeleri ise $6.72 \pm 2.9 \text{ } \mu\text{M}$ 'e karşı $12.12 \pm 7.7 \text{ } \mu\text{M}$ olarak ölçülmüş ve her bir fark anlamlı bulunmuş. Ayrıca, miyeloperoksidaz seviyeleri ile nitrit ve nitrat seviyeleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu bulgular NO sentezi ile stellat hücre kaynaklı fibrojenesis arasında bir ilişki olabileceğini gösteriyor olabilir (265).

On yıl kadar önce, periferik arteriyel vazodilatasyonun sirozlu hastalardaki asit oluşumunun patofizyolojisinde önemli olduğu görüşü ortaya atılmıştır. Aynı zamanda, nitrik oksitin vasküler tonüsün düzenlenmesinde önemli rollere sahip olan güçlü bir vazodilatör olduğu bulunmuş ve NO'nın sirozlu hastalarda görülen hiperdinamik sirkülatuar durumdan sorumlu olabileceği düşünülmüştür (262, 266). Bundan sonra, çeşitli hayvan ve insan deneyleri ile, sirozda görülen hemodinamik değişikliklerde ve asit oluşumuna yol açan sodyum ve su retansiyonunda NO'nın çok önemli rolleri olduğunu gösteren deliller elde edilmiştir (267, 268).

Sirozlu hastalarda görülen noktürnal hemodinamik değişikliklerin nitrik oksit metabolizmasındaki değişikliklere bağlı olabileceği sanılmaktadır (114, 269).

Siroz ratlarda ve asiti bulunan insanlarda plazma NOx'u da yükseltmektedir (270, 271). Sirozlu hastalarda bu yükseliş bir çok farklı çalışmada gösterilmiş olmakla

beraber klinik önemi ve sebebi net olarak saptanamamıştır ve yapılan yorumlar birbiri ile çelişmektedir (272). Elli adet sirozlu hastanın serum ve asit sıvısındaki nitrat seviyelerin ölçülerek 10 sağlıklı kontrol ile kıyaslandığı bir çalışmada yine serum nitrat seviyeleri kontrollere göre aşikar olarak yüksek bulunmuştur (273). Ayrıca spontan bakteriyel peritoniti olan sirotiklerin hem serum hem de asit mayi nitrat seviyeleri spontan bakteriyel peritoniti olmayan sirotiklere göre daha yüksek olarak ölçülmüş. Asiti olan sirotiklerde serum nitrat seviyeleri olmayan sirotiklere göre daha yüksek bulunmuş. Hatta NO ölçümlerinin sirozda görülen spontan bakteriyel peritonit tanısında yeri olabileceği iddia edilmiştir (274). Sirotik hastalarda görülen anemi ile serum nitrat seviyeleri arasında ilişki saptanmazken, Child-Pugh B ve C skoruna sahip olan sirotiklerin serum nitrat seviyeleri Child-Pugh A sınıfındaki sirotiklere göre aşikar olarak yüksek bulunmuş (275). Bu bulgulara göre sirotik hastalarda artmış olan NO yapımı karaciğer hasarının derecesi ve birlikte spontan bakteriyel peritonit bulunup bulunmamasıyla ilişkilidir (276). İdrar ve serumdaki nitrat konsantrasyonları hastalığın ilerleyişi ile ilişkilidir. Bu artış, daha önceleri savunulan endotoksinin hepatik ve diğer makrofajlar üzerine etkisi sonucu olduğu görüşünün aksine böbrek fonksiyonlarındaki bozulma ile alakalıdır (182, 271, 272).

Karaciğer sirozu hastalarında inülin klirensi ile temsil edilen böbrek fonksiyonları ve Child-Pugh skoru NOx seviyeleri üzerinde etkili bağımsız faktörlerdir (277). Karaciğer hastalığının ileri aşamalarında böbrek fonksiyonlarının da bozulmaya başladığı göz önüne alınarak sirotik hastalarda NOx seviyeleri yorumlanırken dikkatli olunmalı ve renal fonksiyonlar mutlaka hesaplanmalıdır (168). Tip I hepatorenal sendromda NOS inhibitörlerinin kullanılması ile düzelme saptanması nitrik oksitin bu tablonun gelişmesi üzerindeki etkilerine dikkat çekmiştir (278, 279).

Intrahepatik vasküler direnç endotelin ve NO gibi vazokonstriktör ve vazodilatör maddelerin birlikte çalışması ile düzenlenmektedir. Karaciğerde sinüzoidal endotelial hücreler ecNOS (endotel hücresi nitrik oksit sentetaz) için önemli bir kaynaktır (280). Karaciğer hasarı sırasında her ne kadar sinüzoidal endotel hücrelerindeki ecNOS mRNA ve protein seviyelerinde değişiklik olmazsa da ecNOS fonksiyonları değişmekte ve sonuçta sirotik karaciğerde sinüzoidal endotel hücrelerinden NO salınımı azalmaktadır. Bu bulgu intrahepatik portal hipertansiyonun ve endotelyumu etkileyen diğer hastalıkların patogeneğinde önemli olabilir (281, 282).

Kronik alkolizm, viral hepatitler ya da toksik ilaçların yüksek doz kullanılması gibi karaciğer yetmezliği ile sonuçlanabilen bir çok durumda gelişen nöropsikiyatrik

tabloya hepatik ansefalopati denmektedir. Her ne kadar altta yatan patofizyolojinin moleküler mekanizmaları kesin olarak bilinmiyorsa da eksitator/inhibitör nörotransmitterler arasındaki denge bozukluğunun yol açtığı glutamat-nitrik oksit sistemindeki bozukluğun önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (283). Son yıllarda yapılan çalışmalar hem akut hem de kronik hepatik ansefalopatide iNOS ekspresyonunun ve bir NO öncüsü olan L-arjinin alımının arttığını göstermektedir. Karaciğer fonksiyon bozukluğu ile ilişkili amonyak artışı da NO seviyelerini artırmaktadır (284).

Hepatopulmoner sendrom, kronik karaciğer hastalığının varlığında fonksiyonel sağdan sola intrapulmoner şantların gelişmesi ve hipoksemi şeklinde tanımlanan ve sıklıkla son dönem karaciğer yetmezliğinde olmakla birlikte kronik hepatitte de görülebilen bir tablodur. Bu tablonun gelişmesinde de nitrik oksitin rolü olabileceği düşünülmektedir (285).

2.4.5.2.Hepatoselüler karsinomada nitrit ve nitrat

Vücutta NO, inflamatuvar ve mitojenik uyarılara bir cevap olarak üretilir ve karsinogenezde rol oynayabilir. Ancak, hepatit C virüs kaynaklı hepatoselüler karsinomanın gelişiminde NO'nun rolü net değildir (286). Yapılan bir çalışmada kronik hepatit C'li 20 hasta, karaciğer sirozlu 30 hasta, hepatoselüler karsinomalı 22 hasta ve 8 sağlıklı kontrol vakasında plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ölçülmüş. Hepatoselüler karsinomalı hastaların plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ise (49.4 ± 49.11 $\mu\text{mol/L}$) sirotik hastalarinkinden de yüksek olarak saptanmış. Plazma NO_x seviyeleri ile serum alanin aminotransferaz seviyeleri arasında herhangi bir ilişki saptanamamış. Oysa, plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ile serum alkalen fosfataz, bilirubin ve gama glutamil transferaz seviyeleri arasında pozitif bir ilişki saptanmış. Bu bulgular karaciğer parankim hasarının NO yapımı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir (287).

Plazma endotelin ve NO_x seviyeleri hepatoselüler karsinomalı hastalarda da yüksektir (288). Ölçülen değerler, tümör çapı ile doğrudan ilişkilidir ve kanserin siroz yerine kronik viral hepatit zemininde geliştiği hastalarda daha yüksektir (289). Buna benzer bulgulara dayanılarak plazma nitrit ve nitrat seviyelerinin hepatoselüler karsinoma için bir tümör göstergesi olarak kullanılabileceği iddia edilmiştir (290). Notas ve arkadaşları (288) 18 viral kökenli hepatoselüler karsinomalı (HCC) hastanın (6 Okuda evre I, 6 Okuda evre II ve 6 Okuda evre III), endotelin-1 ve NO_x seviyelerini 22 viral sirozlu hasta (14 dekompanse ve 8 kompanse) ve 7 sağlıklı kontrol vakası ile karşılaştırmışlar. Viral kökenli HCC hastaları en yüksek endotelin-1 ve NO_x

seviyelerine (13.24 ± 0.82 pg/ml ve 112.28 ± 18.56 μ mol/L) sahip iken bu değerler kompanse siroz hastalarında (9.47 ± 0.50 pg/ml ve 54 ± 2.36 μ mol/L), dekompanse siroz hastalarında (9.57 ± 0.32 pg/ml ve 90.20 ± 11.23 μ mol/L) ve sağlıklı kontrol vakalarında (8.84 ± 0.61 pg/ml ve 51.17 ± 6.18 μ mol/L) daha düşük seviyelerde ölçölmüş. Okuda evre III hastalarında evre I ve II hastalarına, sirotik hastalara ve sağlıklı kontrol vakalarına göre belirgin olarak daha yüksek endotelin-1 ve NOx seviyeleri saptanmış. Evre III HCC hastaları ayrıca diğer hasta gruplarına kıyasla daha yüksek NOx/endotelin-1 oranına sahip iken virüs kaynaklı HCC hastaları sirotik hastalara göre daha yüksek endotelin seviyelerine sahipmiş. En yüksek endotelin-1 seviyesi ise Okuda evre III hastalarında görölmüşür.

2.4.5.3. Alkolik hepatitte nitrit ve nitrat

Alkol alımı, Amerika Birleşik Devletlerinde alkolik karaciğer sirozuna kadar ilerleyen hepatitler içinde en sık görölenidir. Ağır içicilerin üçte birinde karaciğer hücre ölümlü ve parankimde lökosit infiltrasyonu ile karakterize alkolik hepatit gelişir. Her ne kadar alkolik hepatitin patogeneğinde bu lökosit infiltrasyonu suçlanmaktaysa da karaciğer parankimine lökosit göçünü sağlayan ve doku hasarını başlatan moleküler mekanizma net olarak bilinmemektedir (189). Ancak bu oluşumun başlamasında Kupffer hücrelerinin rolü ve etkili olan aracı moleküller üzerinde ağırlıklı olarak durulmaktadır (291).

Alkolik hepatit bulguları olan ve olmayan alkolikler arasında monositlerin NO yapımı arasında ciddi farklar vardır (292). Alkolik hepatiti olmayan alkoliklerin nitrit seviyeleri sağlıklı kontrol vakaları ile yakın seviyelerde iken, hepatit bulguları olan alkoliklerde belirgin derecede yüksek sonuçlar elde edilmektedir (293). Alkolik hepatitli hastalarda bir NOS inhibitörü olan ve NO yapımını azaltan L-N-monometil-arginin yapımının inhibisyonu söz konusudur. Bu sonuçlar, monositlerden kaynaklanan NO'ın alkolik karaciğer hastalıklarının özellikle de alkolik hepatitin patogeneğinde önemli rolleri olduğunu düşündürmektedir (20, 294).

2.4.5.4. İlaç ilişkili karaciğer hasarında nitrit ve nitrat

Bir çok ilaç çeşitli mekanizmalarla tedavi dozlarında dahi karaciğer hasarı yapabilmektedir. Bu hasarlanmanın moleküler düzeydeki mekanizmalarında nitrik oksit ve metabolitleri rol oynamaktadır (295).

Karbon tetraklorid ile oluşturulan deneysel bir rat karaciğer hasarlanmasında nitrik oksitin karaciğeri lipid peroksidasyonundan ve oksidatif hasarlardan koruduğu, L-

NAME ile NOS inhibisyonu yapıldığında ise karaciğer hasarlanmasının arttığı görülmüştür (296).

Yüksek dozlarda sentrilobüler karaciğer nekrozu yapabilen bir analjezik ve antipiretik olan parasetamol ile oluşturulan hepatit tablosunda da iNOS ekspresyonunda artış saptanmıştır (298). Dahası özgül bir iNOS inhibitörü olan aminoguanidin ile durdurulmuştur. Aminoguanidin ön-tedavisi ile koruma altına alınan ratlarda parasetamol ile karaciğer hasarı oluşmadığı görülmüştür. Tüm bu bulgular nitrik oksitin parasetamol ilişkili karaciğer hasarında çok önemli bir aracı olduğunu göstermiştir (298).

2.4.5.5.Kronik viral hepatitte nitrit ve nitrat

1960'lı yıllarda hepatit B virüsü ve 1970'li yıllarda hepatit A virüsü bulunarak bunlara özgü antijenik yapılar belirlenmiştir. 1989 yılında Choo ve arkadaşları (299) rekombinant cDNA tekniği kullanarak, kontamine faktör-VIII konsantresi ile deneysel olarak enfekte edilmiş şempanzelerden bir viral genom klonlamış ve buna *Hepatit C Virüsü* (HCV) adını vermişlerdir. Viral hepatitlerde hücresel hasar, replikasyon ve viral persistansın mekanizmaları iyi bilinmemektedir. HBV enfeksiyonunun aksine persistan HCV enfeksiyonunda konağın genomuna entegrasyon söz konusu değildir (300). Çünkü virüsün yaşam siklusunda DNA aracıları yoktur. HCV replikasyonunun kanıtı sayılan negatif sarmallı aracılardan varlığı karaciğerde gösterilmiş olmakla beraber, periferik kan mononükleer hücreleri ve serum gibi karaciğer dışı bölgelerde varlığı kanıtlanamamıştır (301). Moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olmakla beraber HCV enfeksiyonunda konağın immün yanıtı yetersiz kalmaktadır ve enfeksiyonun gelişmesinde hem humoral hem de hücresel immün yanıtlar önemli gibi gözükmemektedir (302). Viremisi olan hastaların mononükleer hücrelerinde bazal ve uyarılmış 2',5' oligoadenilat sentetaz aktivitesi ve rekombinant insan interferonuna in vitro cevap kapasitesi, viremisi olmayan hastaların mononükleer hücrelerine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Bunun tersine, bazal ve uyarılmış (tumor necrosis factor) TNF- α ya da interlökin-1 β (IL-1 β) yapımı açısından iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Öyle görünmektedir ki, kanda hepatit virüsünün varlığı interferon sisteminin aktivasyonundaki bir eksiklik ile ilişkilidir (303). Progresif karaciğer hasarı olan vakalarda T helper hücresi (Th)-1 ilişkili sitokinler olan interlökin (IL)-2 ve IFN- γ 'nın intrahepatik ekspresyonu artmış buna karşılık Th-2 ilişkili bir sitokin olan IL-10 ekspresyonu azalmıştır. Bu bulgular hepatit virüslerinin özellikle de hepatit C virüsünün

oluşturduğu karaciğer hasarının gecikmiş tip aşırı duyarlılık yanıtı olabileceğini düşündürmektedir (304, 305).

Kronik viral hepatitlerde klinikopatolojik korelasyon zayıf olduğu için hastalığın doku düzeyindeki ciddiyetini anlamanın tek yolu karaciğer biyopsisidir. Histolojik aktiviteyi belirlemek için birçok sistem önerilmiştir. Knodell ve arkadaşlarının (306) semikantitatif skorelama sistemi bunlardan biridir. Bu sistemde, fibrozis ve portal, periportal ve lobular alanlardaki nekrotik ve inflamatuvar komponentler ayrı ayrı değerlendirilerek kodlanır. Toplam puan hastanın histolojik aktivite puanını temsil eder. (Tablo-4)

Bu semikantitatif skorelama sistemi, farklı patoloğlar arasındaki terminoloji karışıklıklarını ortadan kaldırdığı gibi aynı ya da farklı hastalara ait ardışık biyopsi materyallerinin birbiriyle kıyaslanabilmesine de olanak tanımaktadır. Söz konusu histolojik aktivite indeksi daha önce yaygın olarak kullanılan sınıflama terminolojisine adapte edilebilir (307). (Tablo-5)

Hem HBV hem de HCV enfeksiyonu karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinoma (HCC) gibi komplikasyonlara ilerleyen yüksek kronisite ile ilişkilidir. Birincil enfeksiyondan son dönem siroz hastalığına ağır bir seyirle yaklaşık 20-30 yılda ilerleyiş ile karakterizedir. Bu nedenle, etkili antiviral tedaviye başlamak için bu hastaların erken teşhisi önemlidir. Tedavinin amacı virüsü eradike etmek ve karaciğer hasarını durdurmaktır. Bu amaçla antiviral ajanlar ve immünomodulator ilaçlar kullanılır. Başarılı tedavinin göstergesi olarak bir çok klinik çalışmada serum aminotransferaz seviyelerinin normalleşmesi ve karaciğer histolojik bulgularının düzelmesi kabul edilir. Bununla beraber tedaviye biyokimyasal ve virolojik yanıtlar arasında farklar vardır. Tedaviye cevabın en iyi belirteci HCV RNA seviyesidir. Fakat, uzamış cevap, nüks ya da viral klirens için mükemmel bir gösterge değildir. Gerçekte, interferon (IFN)-alfa tedavisi ile biyokimyasal hastalık remisyonunun hastaların yarısından daha çoğunda gerçekleştiğine inanılmakla beraber cevap veren hastaların neredeyse yarısında tedavi sonlandırıldıktan itibaren altı ay sonra nüks olur (308).

İnterferonlar kronik viral hepatitlerin tedavisinde kullanılabilen antiviral ve immünomodulator etkileri olan hücre-içi proteinlerdir. Özgül hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar. Birçok enzimi ve geni aktive ederler. Böylece, viral replikasyon, *uncoating* ve hücreye giriş engellenir.

Tablo - 4: Knodell Skorlama Sistemi.

1-Periportal köprüleşme nekrozu	2-İntralobular dejenerasyon fokal nekroz	3-Portal inflamasyon	4-Fibrozis
A. Yok	A. Yok	A. Yok	A. Yok
B. Hafif piecemeal nekroz	B. Hafif (asidofilik cisimler, balonlaşma dejenerasyonu, lobül veya nodüllerin 1/3'ünde yamalı nekroz)	B. Hafif (portal traktın 1/3'ünden azında serpilmiş iltihabi hücre)	B. Fibroz portal genişleme
C. Orta derece piecemeal nekroz	C. Orta (lobül veya nodüllerin 1/3-2/3'ünün tutulumu)	C. Orta (portal traktın 1/3-2/3'ünde artmış iltihabi hücre)	C. Köprüleşme nekrozu
D. Belirgin piecemeal nekroz	D. Belirgin (lobül veya nodüllerin 2/3'ünden fazlasının tutulumu)	D. Belirgin (portal traktın 2/3'ünden fazlasında artmış iltihabi hücre)	D. Siroz
E. Orta derecede piecemeal nekroz ve köprüleşme nekrozu			
F. Belirgin piecemeal nekroz ve köprüleşme nekrozu			
G. Multilobüler nekroz			

Tablo - 5: HAI – Eski sınıflama adaptasyon tablosu. (CLH: Kronik lupoid hepatit, CPH: Kronik persistan hepatit, CAH: Kronik aktif hepatit)

HAI	Özet Tanımlama	Eski Sınıflama
1-3	Minimal kronik hepatit	Nonspesifik reaktif hepatit, CLH, CPH
4-8	Orta-hafif kronik hepatit	Ciddi CLH, CPH, orta-hafif CAH
9-12	Orta-hafif kronik hepatit	Orta-ağır CAH
13-18	Ciddi CAH	Köprüleşme nekrozlu ciddi CAH

IFN'lar *natural killer* hücre aktivitesini artırır, sitotoksik T hücre maturasyonunu hızlandırır ve HLA klas-I antijenlerinin ekspresyonunu artırır. Böylece, enfekte hücrelerin immün klirensini sağlarlar. Dalgalandıran ya da sebat eden aminotransferaz düzey yüksekliği ve piecemeal nekrozlu aktif inflamasyonu olan hastalar tedavi için uygundur.

Standart başlangıç tedavisi, 6 ay boyunca kronik hepatit C'de haftada 3 kez 3-5 milyon ünite (MU) ve kronik hepatit B'de 9-10 MU rekombinant IFN-alfa'nın cilt altı verilmesi şeklindedir. Birçok vakada cevap ilk 12 haftada görülür ve histolojik düzelme ile birliktedir. Ancak hastaların önemli bir kısmında ilk tedavi kürü kesildikten sonra nüks olur. Böylece uzun dönem uzamış cevap oranları düşer. Cevabın muhtemel belirteçleri: hafif ya da orta dereceli karaciğer inflamasyonu, düşük vücut ağırlığı, sirozun olmaması, enfeksiyonun kısa süreli olması, düşük karaciğer demir içeriği, düşük serum ve karaciğer viral yükü ve HCV için tip 1b haricinde bir genotip olmasıdır (309). (Tablo-6)

Tablo-6: Kronik hepatit C'de IFN-alfa tedavisine cevabı etkileyen faktörler.

Cevabı arttıran	Cevabı azaltan
Daha hafif karaciğer hasarı	Sirotik karaciğer
Düşük viremi (HCV-RNA<1000000 c/ml)	Yüksek viremi
HCV genotip II, III, IV	HCV genotip 1b
Kısa hastalık süresi	Uzun hastalık süresi
Genç yaş	İleri yaş (>40)
Kadın cinsiyet	Erkek cinsiyet
Normal serum GGT düzeyi	Obesite
	Artmış demir yükü (Ferritin>250 ng/ml)

IFN tedavisiyle virüs eradikasyonunu etkileyen en önemli faktör viral yüküdür. IFN tedavisi ile viral eradikasyonu etkileyen bir diğer faktör virüsün genotipidir. Verilen IFN dozu da önemli bulunmuştur. Yüksek doz rejimleri ile hemen tüm serilerde cevap oranları daha yüksek bulunmuştur. Ancak yüksek doz rejimlerinde yan etki oranı da artmakta ve hasta uyumu güçleşmektedir. Birçok çalışmada değişik doz rejimleri önerilmekle beraber, tedavinin optimal süresi belirlenememiştir. IFN' un daha yüksek doz ve süre verilmesi erken nüks riskini azaltır ve uzamış cevabı artırabilir. Birinci kürden sonra nüks olan hastalar ikinci kür tedaviye yanıt verirler ancak ikinci kürden

sonra yine nüks olurlar. IFN tedavisi, otoimmün hepatiti alevlendirebilir. Ayrıca, IFN ile hipotiroidi, hipertiroidi, psöriyazis, liken planus, idiyopatik trombositopenik purpura, lupus benzeri sendrom gibi otoimmün bozukluklar da alevlenebilir. IFN, depresyonun nüksüne ya da kötüleşmesine neden olabileceğinden, majör psikiyatrik problem öyküsü olan hastalara önerilmez.

Kronik viral hepatitli hastalarda IFN tedavisiyle fibrogenesis markerlerinin (karaciğer *transforming growth factor-β* mRNA seviyeleri ve tip-III prokollajenin N-terminal propeptidi gibi) azaldığını gösteren çalışmaların tersine ilerlemiş sirozu olan vakalarda bunu destekleyen çok az bulgu vardır. Sirozlu hastalar, düşük yanıt oranları ve tedavi ile dekompanse olma riskleri nedeniyle IFN için iyi birer aday değillerdir.

IFN' a yanıt oranlarını artırmak için, uygun hasta seçimi, yüksek doz kullanımı, uzun süreli tedavi, demirin azaltılması ya da nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçların birlikte kullanımı gibi uygulamalar denenebilir. NSAID'ler, siklooksigenaz yolunu inhibe ederek immüsupresif etkileri olan prostaglandin E2 yapımını bloke ederler (310).

Son yıllarda kronik hepatit C tedavisinde interferona ek olarak bir nükleozid analogu olan ribavirinin, kronik hepatit B tedavisinde ise yine bir nükleozid analogu olan lamivudinin eklenmesi ile daha iyi sonuçlar alındığı bildirilmektedir. Yine polietilen glikol eklenerek plazma yarı ömrü uzatılmış interferonun haftada bir kez yapılan uygulamaları ile daha yüksek başarı oranlarına erişildiğine ilişkin yayınlar gün geçtikçe artmaktadır.

Hepatit sırasında, TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin dolaşımdaki seviyeleri artmaktadır. Karaciğerin inflamasyonu sırasında birçok sitokinin ekspresyonunun arttığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (311). Literatürde, hepatositlerin TNF, IL-1, IFN- γ ve IL-6 gibi bir çok sitokine maruz kaldıktan sonra artmış iNOS ekspresyonu gösterdiğini saptamış olan çalışmalar vardır (312). Kronik hepatik inflamasyonda artmış NO yapımı ve yüksek plazma nitrit ve nitrat seviyelerinin bulunması inflamatuvar uyarıya karşı karaciğerin savunma cevabı içinde NO'nın de rol aldığını düşündürmektedir (313). Kronik hepatit C hastalarında yorgunluk şikayetine sıklıkla rastlanmaktadır. Bir çok çalışmada bu şikayet ile serum sitokin seviyeleri arasında anlamlı bir paralellik saptanmıştır. Oysa sitokin seviyeleri ile serum transaminaz seviyeleri veya histolojik bulguların ağırlığı arasında paralel bir ilişki söz konusu değildir. Gershon ve arkadaşları (305) yaptıkları çalışmada kronik aktif hepatit C

hastalarında IL-1, IL-6 ve TNF- α seviyelerini yüksek bulmakla beraber, yorgunluk ciddiyet skoru ile bu seviyeler arasında paralellik saptamamışlardır.

Sakai ve arkadaşları (102) kronik hepatit C hastalarında plazma nitrit ve nitrat seviyelerini araştırmışlar. Çalışmaya kronik hepatit C'li 12 hasta (ortalama yaş 56.7), asemptomatik HCV taşıyıcısı 11 olgu (ortalama yaş 56.5), karaciğer sirozlu 18 hasta (ortalama yaş 65.3), karaciğer sirozu+hepatomalı 24 hasta (ortalama yaş 66.0) ve 24 adet sağlıklı kontrol vakası alınmış. Plazma NOx seviyeleri tüm hasta gruplarında kontrol vakalarına göre yüksek seviyelerde tespit edilmiş. Özellikle asemptomatik HCV taşıyıcılarında ortalama ALT seviyeleri normal sınırlar içinde (24.8 ± 6 IU/L) ve kontrol vakalarının ALT seviyelerinden (16.8 ± 6 IU/L) istatistiki olarak farklı olmamasına rağmen, ortalama plazma NOx seviyeleri belirgin olarak yüksek bulunmuş. (60.5 ± 27.9 μ mol /L'ye karşılık 25.8 ± 12.5 μ mol/L). Ortalama NOx yoğunlukları kronik hepatit, karaciğer sirozu ve siroz+hepatoma hastaları arasında farklı bulunmamış. Bu bulgulara göre NOx konsantrasyonları tüm kronik karaciğer hastalıklarında olduğu gibi asemptomatik HCV taşıyıcılarında da artmaktadır. Bu bulgular Mihm ve arkadaşlarının (314) yaptığı çalışmanın sonuçları ile paralel gözükmektedir. Söz konusu çalışmada, iNOS mRNA ekspresyonu ile HCV RNA viral yükü ve karaciğer hasarı arasındaki ilişki araştırılmış ve hem iNOS mRNA ekspresyonu hem de karaciğer HCV RNA içeriği, hepatik inflamatuvar aktivite ile ilişkisiz bulunmuştur. Bu bulgulara dayanılarak, her ne kadar asemptomatik HCV taşıyıcılarında portal alanlarda minimal inflamasyon bulunsada plazma NOx konsantrasyonlarının sağlıklı kontrol vakalarından aşıkarak yüksek bulunması nedeniyle, karaciğer inflamasyonunun değil bizzat HCV enfeksiyonunun kendisinin konakta iNOS ekspresyonunu artırdığı söylenebilir. Yine, Lim ve arkadaşları da (315) kronik hepatit C'li 87 hastada nitrik oksit seviyesini 105 μ M bulurken, 197 adet sağlıklı kontrol vakasında 64 μ M olarak ölçmüşler ($p=0.00076$). Hepatoma hastalarında ise nitrik oksit seviyesini 115 μ M olarak saptamışlardır ($p=0.00053$).

Tankurt ve arkadaşları (316) tarafından yapılan, HAI skorları 6-8, fibrozis skorları 1-3 ve ALT seviyeleri 65-80 IU/L arasında değişmekte olan kronik viral hepatitli 21 hastanın (8 hepatit B, 13 hepatit C) serum nitrit ve nitrat seviyelerinin 10 adet sağlıklı kontrol vakası ile karşılaştırıldığı bir çalışmada kronik hepatit vakalarının ortalama serum nitrit+nitrat konsantrasyonları 72.1 ± 6.91 μ mol/L, kontrol vakalarınınki ise 29.0 ± 4.6 μ mol/L olarak ölçülmüş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunarak NO yapımının bir göstergesi olarak serum nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının kronik viral hepatit vakalarında yüksek bulunabileceği yorumu yapılmıştır.

Kronik hepatit C’de elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar kronik hepatit B’de de elde edilmektedir. Hepatit B virüsü tarafından insan karaciğerinde iNOS transkripsiyonu, nitrik oksit tarafından promotерinin transaktivasyonu yoluyla artırılmaktadır (317). Virüsün bu özelliğini saptayan araştırmacılar daha sonra olayın moleküler boyutunu ve mekanizmalarını araştırmışlar ve hepatit B virüsü tarafından yapılan ve virüsün enfektivitesinde vazgeçilmez etkilere sahip olan HBx proteininin sitoplazmik yerleşiminin iNOS geninin transkripsiyonal aktivasyonu için gerekli bir faktör olduğunu göstermişlerdir (318).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya başlanmadan önce T.C. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'na başvurularak onay alındı. (Başkan: Prof. Dr. İlter Uzel, Toplantı sayısı: 10, Karar sayısı: 4)

Çalışma kapsamına 2002 yılı içinde hastanemizin gastroenteroloji polikliniğine başvuran ve anti-HCV antikoru ya da hepatit B virüsü yüzey antijeni pozitif olan, serum aminotransferaz değerleri yüksek olan, ve karaciğer biyopsisinde aktif kronik hepatit tespit edilen hastalar dahil edildi. Kronik hepatit B grubunda, yaşları 19 ile 75 arasında (ortalama 39.03 ± 12.31 , ortanca 42) değişen 29 hasta (3 kadın, yaş ortalaması 37.33 ± 11.59 ve 26 erkek, yaş ortalaması 39.23 ± 12.59) hasta vardı. Kronik hepatit C grubunda ise, yaşları 28 ile 67 arasında (ortalama 52.74 ± 9.18 , ortanca 56) değişen 27 hasta (14 kadın, yaş ortalaması 54.71 ± 5.95 ve 13 erkek, yaş ortalaması 50.61 ± 11.61) hasta bulunmaktaydı. Çalışmanın kontrol grubunu teşkil etmek üzere herhangi bir hastalığı bulunmayan, yaşları 22 ile 65 arasında (ortalama 42.36 ± 9.81 , ortanca 45) değişen 25 sağlıklı gönüllü (14 kadın, yaş ortalaması 42.07 ± 11.88 ve 11 erkek, yaş ortalaması 42.72 ± 6.85) hastalarla aynı prosedüre tabi tutuldu.

Çalışma kapsamına alınan hastaların çalışmaya katılma kriterleri Tablo-7'de ve çalışmaya alınmama kriterleri ise Tablo-8'de özetlenmiştir.

Tablo – 7: Araştırmaya dahil olma kriterleri

Hastaların bu çalışmaya katılabilmeleri için aşağıdaki kriterleri bulundurmaları gerekmektedir:	
1.	Yaş >18
2.	Karaciğer biyopsisinde alınan karaciğer örneğinin histolojik tanısının kronik hepatit ile uyumlu olması
3.	Açlık kan şekeri 70-115 mg/dL arasında olması. (115 – 140 mg /dL arasındaki değerler tekrarlanan açlık kan şekeri ölçümünün <140 mg/dL ve HbA1c'nin <%8.5 olmasını gerektirir. Diyabetik kişilerde HbA1c <%8.5 olmalıdır.)
4.	TSH ve serbest T3 ve serbest T4 seviyeleri normal sınırlarda olması
5.	Serum alfa-fetoprotein (AFP) seviyesi normal sınırlarda olması
6.	Yazılı bilgilendirilmiş onay formunu imzalayan hastalar

Tablo – 8: Araştırmaya alınmama kriterleri

Aşağıdakilerden herhangi birine sahip olan hasta katılım için uygun değildir :
1. 18 yaşından küçük hastalar
2. Başka bir çalışmanın kapsamında olan hastalar
3. Ağır kardiyak hastalık öyküsü bulunan hastalar (örn. NYHA 3. ya da 4. Derece kalp yetmezliği, son 6 ay içinde geçirilmiş miyokard infarktüsü, tedavi gerektiren ventriküler taşiaritmiler, unstabil anjina pectoris ya da diğer önemli kardiyovasküler hastalıklar)
4. Patogenezlerinde immün mekanizmaların rol oynadığı düşünülen hastalıklar (inflamatuvar barsak hastalıkları, idiyopatik trombositopenik purpura, sistemik lupus eritematozis, otoimmün hemolitik anemi, ağır psöriazis, skleroderma, romatoid artrit gibi)
5. Sistemik kortikosteroid kullanan veya çalışma sırasında kullanma ihtiyacı olabilecek hastalar
6. US tetkikinde karaciğerinde bir veya daha fazla sayıda 1.5 cm.den daha büyük nodülü olup ileri tetkiklerle (arteriyel portografi fazında BT, BT anjiyografi, hepatik anjiyografi veya biyopsi gibi) HCC tanısı dışlanamayan hastalar
7. Serum alfa-fetoprotein seviyesi yüksek olan hastalar
8. İlaçlarla iyi kontrol edilemeyen tiroid hastalığı öyküsü. Tiroid peroksidaza karşı antikor yükselmesi ile birlikte yükselmiş tiroid stimulan hormon seviyeleri olan hastalar ve tiroid hastalığı ile ilişkili herhangi bir klinik bulgusu olan hastalar
9. Muayene ve tetkiklerine uymayan hastalar
10. Verilen standart diyetle uymayan hastalar
11. Hemodinamik dengeyi etkileyen ve/veya nitrat içeren ilaçları kullanan ve kesmesi sakıncalı olan hastalar.
12. Aşık diyabetes mellitusu bulunan hastalar.
13. Kronik böbrek hastalığı olanlar ve glomerüler filtrasyon hızı azalmış olan hastalar
14. Son 8 gün içinde yüksek ateş öyküsü olan hastalar
15. Sistemik enfeksiyonu olan hastalar.
16. Son 8 gün içinde GIS sistem kanaması geçirmiş olan hastalar.
17. Sigara kullanan ve çalışma süresince bırakmayı reddeden hastalar
18. Alkol kullanan ve çalışma süresince bırakmayı reddeden hastalar
19. Yazılı onay formunu imzalamayan hastalar.

Tüm hastalara çalışmaya alınmadan önce, çalışmanın amacı ve içeriği ile ilgili olarak sözlü ve yazılı açıklama yapılarak yazılı onayları alındı ve yazılı onay formunun bir örneği kendilerine teslim edildi. Söz konusu yazılı onay formunun örneği aşağıdadır. (Tablo-9 ve Tablo-10)

Tablo-9: Yazılı hasta bilgilendirme formu örneği.

HASTA BİLGİLENDİRME FORMU Sizden klinik bir çalışmaya katılmanız isteniyor. Bu çalışmanın amacı kronik viral hepatitli hastalarda serum nitrit / nitrat düzeyleri ile tedaviye yanıt arasındaki ilişkiyi belirlemektir. Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi – Gastroenteroloji Bilim Dalında yürütülecektir. Eğer bu çalışmada yer almayı kabul ederseniz ve çalışma için tüm şartları karşılıyorsanız, size aşağıdaki işlemler yapılacaktır: Tam bir tıbbi öykünüz alınacak ve fizik muayeneniz yapılacaktır. Tıbbi durumunuzu ve karaciğer hastalığınızın derecesini kontrol etmeye yönelik kan testleri yapılacaktır. Hekiminiz size vücudunuzda bir enfeksiyon olup olmadığını anlamak üzere bir takım testler (kan, idrar ve asit kültürleri) yaptıracaktır. Bundan sonra hekiminiz size günlük 60-70 gram protein ve 2 gram tuz içeren bir diyet listesi verecek ve 5-8 gün süreyle bu diyetle uymanızı isteyecektir. Ayrıca eğer kullanıyorsanız sigara ve alkolü de çalışma süresi boyunca almamanız istenecektir. Süre sonunda sizden bir gece aç kalmanız istenecek ve sabah kan numunesi alınacaktır. Bu güne kadar karaciğer biyopsisi yaptırmadıysanız başlangıçta hekiminiz size biyopsi yapılmasını isteyebilir. Hekiminize almakta olduğunuz ilaçların ayrıntılarını bildirmeniz ve herhangi bir başka ilacı almadan önce hekiminize danışmanız istenecektir. Çalışmanın tamamı boyunca herhangi bir araştırma ilacı ya da kalp-damar ve böbrek sistemini düzenleyici ilaç almamanız gerekmektedir. Bu nedenle, herhangi bir ilaç almadan önce mutlaka hekiminize başvurunuz. Bu çalışma sırasında araştırmanın yapısı ya da bir hasta olarak haklarınız hakkında soru ya da sorunlarınız varsa istediğiniz zaman 0322 3386060 (dahili 3167) numaralı telefondan Uzm. Dr. Fatih Yüksel Işıksal ile temas kurabilirsiniz. Bu çalışmaya katılma kararınız tamamen kendi isteğinize bağlıdır. Katılmayı reddetmeniz herhangi bir ceza ya da hastalığınızın tedavisinde ilişkin bir çıkar kaybına yol açmayacaktır. Ek olarak, çalışmadan istediğiniz zamanda herhangi bir ceza ya da çıkar kaybına uğramadan ayrılabilirsiniz. Çalışmaya katılmamayı ya da çalışmadan ayrılmayı tercih ederseniz, size en uygun olduğunu düşündüğü tedaviyi önermesi için hekiminizle temasa geçiniz. Hekiminiz, herhangi bir nedenle uygun görürse, çalışmaya katılmamanıza ya da çalışmadan çıkarılmanıza karar verme hakkına sahiptir. Hiç bir şekilde adınız bu çalışmadan yaralanan herhangi bir yayın ya da raporda geçmeyecektir. Bununla birlikte, teftiş yapanların veya yasal düzenleme makamlarının tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişimi, çalışmanın sağlıklı olması için gerekli olabilir.
--

Hastalara hepatit virüsünün muhtemel kaynağını saptamak amacıyla, dış tedavisi, cerrahi müdahale, kan transfüzyonu, aile bireylerinde anti-HCV pozitifliği öyküsü olup olmadığı, kendilerinin ve eşlerinin mesleği sorularak kaydedildi. Yine hastaların demografik verileri (yaş, cinsiyet, meslek, doğum yeri ve yaşanılan yer) kendilerine sorularak kaydedildi.

Tablo-10: Yazılı hasta rıza (olur) formu örneği.

HASTA RIZA (OLUR) FORMU

Bana sunulan bir sayfalık metni dikkatle okudum ve tüm hususları anladım. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Yönelttiğim tüm sorulara tatmin edici yanıtlar aldım. Bana bu onay formunun bir fotokopisi verildi. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmamın gelecekteki bakımım açısından herhangi bir dezavantaj ya da sıkıntı oluşturmadığını anladım.

Bu çalışmaya hiçbir zorlanma olmadan katılmaya karar verdim.

GÖNÜLLÜNÜN ADI:.....

GÖNÜLLÜNÜN İMZASI:.....

GÖNÜLLÜNÜN ADRESİ:.....

GÖNÜLLÜNÜN TELEFONU:.....

TARİH:.....

ARAŞTIRMACININ ADI:.....

ARAŞTIRMACININ İMZASI:.....

TARİH:.....

TANIK ADI:.....

TANIK İMZASI:.....

TANIK GÖREVİ:.....

Tüm hastalar tam bir fizik muayeneye tabi tutuldu. Varsa patolojik bulgularla birlikte kan basıncı, nabız, koltuk altı ateşi, boy ve kiloları kaydedildi.

Çalışmaya alınan hastaların viral göstergeleri (anti-HCV antikoru, hepatit B virüs yüzey antijeni, hepatit B virüs yüzey antikoru, hepatit B virüs c antikoru, hepatit B virüs e antijeni, hepatit B virüs e antikoru, hepatit D virüs antikoru, hepatit A virüs antikoru ve HIV antikorları) tayini Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında AXSYM cihazı (Abbott) ve MEIA (Micro Particullar Enzyme Immuno Assay) yöntemi ile yapıldı.

Hastaların ayrıca, açlık kan şekerleri, karaciğer fonksiyon testleri (AST, ALT, ALP ve GGT), böbrek fonksiyon testleri (kan üre azotu, serum kreatitini ve kreatinin klirensi), tam kan sayımları, tiroid fonksiyon testleri (serbest T3, serbest T4 ve TSH), alfa-feto protein seviyeleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi merkezi laboratuvarında ölçülerek kaydedildi. Hastaların serum örneklerinde; AST (Aspartat aminotransferaz) düzeyi kinetic UV test (Cat no:66026, Olympus) ile, ALT (Alanine aminotransferaz) düzeyi kinetic UV test (Cat no:66028, Olympus) ile, GGT (Gama glutamil transpeptidaz) düzeyi kinetic cholourimetric test (Diasys) ile ve ALP (Alkalen fosfataz) düzeyi ise DGGKC metodu (cholourimetric method) ile ölçüldü.

Biyokimyasal, hematolojik ve immünolojik testlerde laboratuvar tarafından belirlenmiş olan normal değer aralıkları kabul edildi. Bu değerler Tablo-11’de gösterilmektedir.

Tablo-11: Laboratuvar normal değerleri.

TEST	BİRİM	ALT SINIR	ÜST SINIR
Beyaz küre	µL	4,3	10,3
Hemoglobin	g/dL	13,6	17,2
Trombosit	µL	156	373,3
Glukoz	mg/dL	70	105
Albumin	g/dL	3,4	4,8
Total bilirubin	mg/dL		<1
AST	U/L		<37
ALT	U/L		<41
ALP	U/L	5	270
GGT	U/L	11	49
Demir	µg/dL	60	150
TIBC	µg/dL	250	400
HTSH	µIU/ml	0,47	5,01
AFP	ng/ml	0	15

Çalışma kapsamına alınan hastalara gerekli tetkikler yapıldıktan sonra, bir örneği Tablo-12’de görülen standart bir diyet verildi ve varsa kullanmakta oldukları hemodinamik denge üzerinde etkili olabilecek ya da nitrat içeren ilaçlara ara vermeleri istendi. Yine, sigara kullanmakta olan hastalardan 5-8 gün süreyle sigara kullanmayı bırakmaları ve yoğun sigara dumanı bulunan ortamlarda bulunmamaları istendi. 5-8 gün bu diyeti alan ve sigara ve ilaç kullanmayı bırakan hastalardan 12 saatlik açlık sonrası tek sağlık personeli tarafından 10 ml venöz kan örneği alınarak 10000 devir/dakika hızında 10 dakika çevrildi ve serum örneği ayrılarak 10 dakika içinde -26 °C ısısındaki derin dondurucuya konarak saklandı.

Kontrol grubuna dahil edilen vakalara yine standart diyet verilerek 5-8 gün sonra serum örnekleri aynı şartlarda ve tek sağlık personeli tarafından alınıp saklandı.

Tablo-12: Tüm vakalara verilen standart diyet örneği.

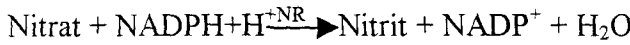
Standart diyet örneği:	
1. Diyet (7 gün)	
a- Nitrat kısıtlaması	
- Sucuk, sosis, salam	
- her türlü konserve	
- ıspanak, fasulye, patlıcan, salatalık	
b- Na kısıtlaması - 2 g/gün	
c- Protein kısıtlaması - 60-70 g/gün	
2. İlaç kısıtlaması (7 gün) - diüretik, vasoaktif ajan, antibiyotik, laktüloz, kortikosteroid.	
3. Sigara kısıtlaması (7 gün)	
4. Alkol kısıtlaması (7 gün)	

3.1. Serum Nitrit ve Nitrat Tayini

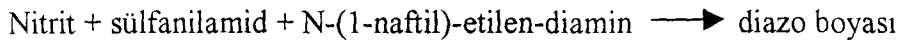
Serum nitrat ve nitrit seviyeleri, “Nitrit/nitrat kolorimetrik metod kiti” kullanılarak (*Nitrite/Nitrate, Colorimetric Method kit, Roche Applied Science*) belirlendi. Söz konusu testler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD’nda gerçekleştirildi.

Testin Esası:

1- Nitrat, nitrat redüktaz varlığında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ile nitrite dönüştürülür.



2- Oluşan nitrit sülfanilamid ve N-(1-naftil)-etilen-diamin dihidroklorid ile etkileşerek kırmızı-mor diazo boyası oluşturur.



Diazo boyası 540 nm dalga boyunda absorbansına göre ölçülür.

Yukarıdaki esaslar ışığında, serum örnekleri 5 ml Carrez I solüsyonu (3,6 g potasyum hekzasiyanofosfat, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3\text{H}_2\text{O}$ /100 ml) ve daha sonra 5 ml Carrez II solüsyonu (7,2 g çinko sülfat, $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ / 100 ml) ile karıştırıldıktan sonra üzerine 1 M pH 8 sodyum hidroksit solüsyonu eklendi. Filtreden süzülerek deproteinizasyon sağlandı.

Nitrit ölçümü için 0,5 ml örnek, 0,27 ml saf su ile karıştırılarak 15 – 25 C° sıcaklıkta 30 dakika bekletilip 540 nm dalga boyunda okundu ve A₁ değeri olarak kaydedildi. Daha sonra bunun üzerine 0,25 ml sülfanilamid ve 0,25 ml N-(1-naftil)-etilen-diamin dihidroklorid eklendi. Karıştırıldıktan sonra 15 – 25 C° sıcaklıkta 10 - 15 dakika bekletilip 540 nm dalga boyunda okundu ve A₂ değeri olarak kaydedildi. Kör solüsyonunun hazırlanması için serum örneği yerine 0,5 ml saf su kullanılarak aynı işlemler yapıldı. Hesaplama aşağıdaki formülle yapıldı:

$$\Delta A_{\text{nitrit}} = (A_2 - A_1)_{\text{nitrit}} - (A_2 - A_1)_{\text{kör nitrit}}$$

Nitrit + nitrat ölçümü için serum örneği yine Carrez I ve Carrez II solüsyonları ile muamele edildikten sonra 0,5 ml'sinin üzerine 22 ml potasyum fosfat içine 0,5 mg NADPH eklenerek elde edilen karışımdan 0,25 ml ve daha sonra da 0,7 ml saf su içinde 4 U nitrat redüktaz eritilerek hazırlanan karışımdan 0,02 ml konuldu. Elde edilen karışım 15 – 25 C° sıcaklıkta 30 dakika bekletilip 540 nm dalga boyunda okundu ve A₁ değeri olarak kaydedildi. Daha sonra bunun üzerine 0,25 ml sülfanilamid ve 0,25 ml N-(1-naftil)-etilen-diamin dihidroklorid eklendi. Karıştırıldıktan sonra 15 – 25 C° sıcaklıkta 10 - 15 dakika bekletilip 540 nm dalga boyunda okundu ve A₂ değeri olarak kaydedildi. Kör solüsyonunun hazırlanması için serum örneği yerine 0,5 ml saf su kullanılarak aynı işlemler yapıldı. Hesaplama aşağıdaki formülle yapıldı:

$$\Delta A_{\text{nitrit} + \text{nitrat}} = (A_2 - A_1)_{\text{nitrit} + \text{nitrat}} - (A_2 - A_1)_{\text{kör nitrit} + \text{nitrat}}$$

Daha sonra nitrit + nitrattan nitrit çıkartılarak nitrat miktarı hesaplandı:

$$\Delta A_{\text{nitrat}} = \Delta A_{\text{nitrit} + \text{nitrat}} - \Delta A_{\text{nitrit}}$$

Sonuçlar mikromol/L cinsinden elde edildi.

3.2. İstatistiki Analiz

Çalışma için elde edilen verilerin istatistiksel analizi “SPSS For Windows (Version 9.0.0 Chicaco SPSS Inc. Copyright:18.Dec.1998)” paket programında yapıldı.

Ölçülen serum nitrit, nitrat seviyeleri, biyokimyasal, hematolojik ve immünolojik parametrelerin gruplar arasındaki karşılaştırmaları *Student t-test* ile yapıldı. Grupları oluşturan vakaların cinsiyet dağılımlarının *Ki kare testi* kullanıldı. Hastalık şiddetine göre serum NOx seviyelerinin karşılaştırmasında *One Way Anova testi* kullanıldı. Biyokimyasal, hematolojik ve immünolojik parametrelerin kendi aralarındaki korelasyonu ise *Spearman Correlation Test* ile saptandı. Testlerde, p değeri 0.05'ten daha düşük ise anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamına dahil edilenlerden kronik hepatit B grubunda, yaşları 19 ile 75 arasında (ortalama 39.03 ± 12.31 , ortanca 42) değişen 29 hasta (3 kadın, yaş ortalaması 37.33 ± 11.59 ve 26 erkek, yaş ortalaması 39.23 ± 12.59) vardı. Kronik hepatit C grubunda ise, yaşları 28 ile 67 arasında (ortalama 52.74 ± 9.18 , ortanca 56) değişen 27 hasta (14 kadın, yaş ortalaması 54.71 ± 5.95 ve 13 erkek, yaş ortalaması 50.61 ± 11.61) bulunmaktaydı. Çalışmanın kontrol grubunu, her hangi bir hastalığı bulunmayan, yaşları 22 ile 65 arasında (ortalama 42.36 ± 9.81 , ortanca 45) değişen 25 sağlıklı gönüllü (14 kadın, yaş ortalaması 42.07 ± 11.88 ve 11 erkek, yaş ortalaması 42.72 ± 6.85) oluşturmaktaydı. Tablo-13’de çalışmaya katılan vakaların gruplara göre yaş ve cinsiyet dağılımları görülmektedir.

Tablo-13: Çalışmaya katılan vakaların gruplara göre yaş ve cinsiyet dağılımı.

Grup	Cinsiyet	Sayı	Ortalama	Ortanca	En az	En çok	Std. Sapma
HBV	Kadın	3	37,333	43,0000	24,00	45,00	11,5902
	Erkek	26	39,230	42,0000	19,00	75,00	12,5994
	Toplam	29	39,034	42,0000	19,00	75,00	12,3157
HCV	Kadın	14	54,714	56,0000	45,00	67,00	5,9540
	Erkek	13	50,615	52,0000	28,00	64,00	11,6156
	Toplam	27	52,740	56,0000	28,00	67,00	9,1844
Kontrol	Kadın	14	42,071	40,0000	22,00	65,00	11,8871
	Erkek	11	42,727	46,0000	30,00	49,00	6,8570
	Toplam	25	42,360	45,0000	22,00	65,00	9,8102

Hepatit B grubundaki hastaların ortalama boyu $172,96 \pm 6,65$ cm, ortalama vücut ağırlığı $73,25 \pm 12,56$ Kg, ortalama vücut kitle indeksi (BMI) $24,43 \pm 3,74$, ortalama arteriyel tansiyonu $93,79 \pm 7,33$ mmHg, ortalama nabız sayısı $74,27 \pm 9,30$ /dk ve ortalama koltuk altı ateş ölçümü $36,57 \pm 0,15$ C° idi. Hepatit C grubundaki hastaların, ortalama boyu $167,48 \pm 10,27$ cm, ortalama vücut ağırlığı $75,81 \pm 14,51$ Kg, ortalama vücut kitle indeksi (BMI) $26,94 \pm 4,19$, ortalama arteriyel tansiyonu $92,96 \pm 10,18$ mmHg, ortalama nabız sayısı $74,74 \pm 7,10$ /dk ve ortalama koltuk altı ateş ölçümü $36,54 \pm 0,18$ C° iken kontrol gurubuna alınan sağlıklı gönüllülerin ortalama boyu $166,48 \pm$

8,64 cm, ortalama vücut ağırlığı $68,56 \pm 8,54$ Kg, ortalama vücut kitle indeksi (BMI) $24,71 \pm 2,20$, ortalama arteriyel tansiyonu $94,40 \pm 11,63$ mmHg, ortalama nabız sayısı $72,64 \pm 4,99$ /dk ve ortalama koltuk altı ateşi $36,75 \pm 0,19$ C° olarak ölçüldü. Tablo-14'te bu bilgiler gösterilmektedir.

Tablo-14: Çalışmaya katılan vakaların gruplara göre boy, kilo, vücut kitle indeksi, arteriyel tansiyon (sistolik, diyastolik ve ortalama), nabız ve koltuk altı ateş değerleri.

		BOY	KILO	BMI	SISTOL	DIYASTOL	ORT. TAN	NABİZ	ATES
HBV	Sayı	29	29	29	2	29	29	29	29
	Ortalama	172,96	73,25	24,43	117,9	81,72	93,79	74,27	36,57
	Ortanca	175,00	73,00	23,51	120,0	80,00	93,33	72,00	36,50
	Std. Sapma	6,65	12,56	3,74	10,4	6,58	7,33	9,30	,15
	En az	153,00	49,00	19,56	90,0	60,00	70,00	68,00	36,30
	En çok	180,00	99,00	31,35	140,0	95,00	103,33	112,00	37,00
HCV	Sayı	27	27	27	2	27	27	27	27
	Ortalama	167,48	75,81	26,94	120,0	79,44	92,96	74,74	36,54
	Ortanca	165,00	74,00	26,12	120,0	80,00	93,33	72,00	36,50
	Std. Sapma	10,27	14,51	4,19	13,0	9,43	10,18	7,10	,18
	En az	150,00	48,00	17,63	90,0	60,00	70,00	68,00	36,40
	En çok	187,00	108,00	39,06	150,0	100,00	116,67	100,00	36,80
Kontrol	Sayı	25	25	25	2	25	25	25	25
	Ortalama	166,48	68,56	24,71	119,2	81,00	94,40	72,64	36,75
	Ortanca	165,00	66,00	25,39	120,0	80,00	93,33	72,00	36,80
	Std. Sapma	8,64	8,54	2,20	12,7	10,10	11,63	4,99	,19
	En az	150,00	58,00	20,31	90,0	60,00	70,00	58,00	36,40
	En çok	180,00	84,00	28,40	150,0	95,00	120,00	82,00	37,10

Kronik hepatit B grubundaki hastaların ortalama beyaz küre sayısı 6100 ± 1180 μ L, ortalama hemoglobin seviyesi $15,19 \pm 1,17$ g/dl, ortalama trombosit sayısı 329137 ± 50591 μ L, ortalama INR değeri $1,43 \pm 0,26$ ve ortalama eritrosit sedimentasyon hızı $8,93 \pm 6,81$ idi. Hepatit C grubundaki hastaların ortalama beyaz küre sayısı 6255 ± 1046 μ L, ortalama hemoglobin seviyesi $14,12 \pm 1,57$ g/dl, ortalama trombosit sayısı 238370 ± 53264 μ L, ortalama INR değeri $1,3 \pm 0,3$ ve ortalama eritrosit

sedimentasyon hızı $11,48 \pm 4,83$ idi. Kontrol grubundaki vakaların ise ortalama beyaz küre sayısı $6452 \pm 1192 \mu\text{L}$, ortalama hemoglobin seviyesi $13,63 \pm 1,46 \text{ g/dl}$, ortalama trombosit sayısı $263680 \pm 50267 \mu\text{L}$, ortalama INR değeri $1,31 \pm 0,20$ ve ortalama eritrosit sedimentasyon hızı $10,44 \pm 6,21$ idi. Hematolojik parametrelerin gruplara göre dağılımı Tablo-15'te gösterilmiştir.

Tablo-15: Çalışmaya katılan vakaların gruplara göre beyaz küre (BK), hemoglobin (Hb), trombosit (Plt), INR ve eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) değerleri.

		BK	Hb	Plt	INR	ESR
HBV	Sayı	29	29	29	29	29
	Ortalama	6106,89	15,19	329137,93	1,43	8,93
	Ortanca	5900,00	15,20	198000,00	1,40	8,00
	Std. Sapma	1180,09	1,17	50591,03	,26	6,81
	En az	3600	12,00	93000	1,10	1,00
	En çok	8800	17,40	2800000	2,40	24,00
HCV	Sayı	27	27	27	27	27
	Ortalama	6255,92	14,12	238370,37	1,30	11,48
	Ortanca	6300,00	13,60	225000,00	1,30	10,00
	Std. Sapma	1046,71	1,57	53264,32	,20	4,82
	En az	4600	11,75	161000	1,00	4,00
	En çok	8700	18,34	338000	1,70	23,00
Kontrol	Sayı	25	25	25	25	25
	Ortalama	6452,0000	13,6356	263680,00	1,31	10,44
	Ortanca	6100,0000	13,6200	259000,00	1,30	11,00
	Std. Sapma	1192,0291	1,4657	50267,38	0,2	6,21
	En az	4800	11,20	191000	1,20	2,00
	En çok	10200	16,29	391000	1,50	23,00

Kronik hepatit B grubundaki hastaların ortalama AST seviyesi $70,20 \pm 81,42 \text{ U/L}$, ortalama ALT seviyesi $100,55 \pm 93,61 \text{ U/L}$, ortalama ALP seviyesi $198,72 \pm 67,08 \text{ U/L}$, ortalama GGT seviyesi $33,65 \pm 17,6 \text{ U/L}$, ortalama serum albumin seviyesi $4,5 \pm 0,31 \text{ g/dl}$, ortalama total bilirubin seviyesi $0,85 \pm 0,21 \text{ mg/dl}$, ortalama glukoz seviyesi $94,03 \pm 9,4 \text{ mg/dl}$, ortalama transferrin doygunluk indeksi (TSI) $38,76 \pm 10,95$, ortalama tiroid uyarıcı hormon (TSH) seviyesi $1,14 \pm 0,55 \mu\text{IU/ml}$, ortalama alfa feto protein (AFP) seviyesi $5,64 \pm 6,66 \text{ ng/ml}$ idi. Hepatit C grubundaki hastaların ortalama AST

seviyesi $72,22 \pm 32,27$ U/L, ortalama ALT seviyesi $87,44 \pm 34,85$ U/L, ortalama ALP seviyesi $170,55 \pm 68,17$ U/L, ortalama GGT seviyesi $58,18 \pm 37,68$ U/L, ortalama serum albumin seviyesi $4,49 \pm 0,25$ g/dl, ortalama total bilirubin seviyesi $0,99 \pm 0,51$ mg/dl, ortalama glukoz seviyesi $98,96 \pm 6,95$ mg/dl, ortalama transferrin doygunluk indeksi (TSI) $36,54 \pm 15,13$, ortalama tiroid uyarıcı hormon (TSH) seviyesi $1,12 \pm 0,65$ μ IU/ml, ortalama alfa fetoprotein (AFP) seviyesi $4,64 \pm 1,74$ ng/ml idi. Kontrol grubunda ise ortalama AST seviyesi $17,16 \pm 4,11$ U/L, ortalama ALT seviyesi $18,36 \pm 7,39$ U/L, ortalama ALP seviyesi $162,24 \pm 32,47$ U/L, ortalama GGT seviyesi $16,68 \pm 6,42$ U/L, ortalama serum albumin seviyesi $4,8 \pm 0,19$ g/dl, ortalama total bilirubin seviyesi $0,64 \pm 0,25$ mg/dl, ortalama glukoz seviyesi $98,52 \pm 8,44$ mg/dl, ortalama transferrin doygunluk indeksi (TSI) $22,12 \pm 9,38$, ortalama tiroid uyarıcı hormon (TSH) seviyesi $1,52 \pm 0,94$ μ IU/ml, ortalama alfa fetoprotein (AFP) seviyesi $2,87 \pm 1,59$ ng/ml olarak ölçüldü. Vakaların biyokimyasal ölçümleri Tablo-16’te gösterilmiştir.

Hasta grubundaki tüm vakalara perkütan karaciğer biyopsisi yapıldı. Alınan biyopsi örnekleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji ABD’nde incelenerek Knodell skorlaması yapıldı. Tüm vakalar kronik hepatit olarak değerlendirildi. Kronik hepatit B grubundaki hastalarda ortalama HAI skoru $7,89 \pm 2,49$, ortalama fibrozis skoru $2,13 \pm 0,99$ iken kronik hepatit C grubundaki hastaların ortalama HAI skoru $9,37 \pm 3,07$ ve ortalama fibrozis skoru $2,55 \pm 0,89$ idi. Hastaların Histolojik aktivite indeksleri (HAI) ve fibrozis skorları Tablo-17’de görülmektedir.

Histolojik aktivite indeksi 1-3 arasında olan vakalar minimal hepatit, 4-8 arasında olanlar hafif şiddette kronik hepatit, 9-12 arasında olanlar orta şiddette kronik hepatit ve 13-18 arasında olanlar ise ağır şiddette kronik hepatit olarak sınıflandı. Böylece, toplam 56 hastanın 2’sinde minimal hepatit, 22’sinde hafif şiddette kronik hepatit, 27’sinde orta şiddette kronik hepatit ve 5 tanesinde ise şiddetli derecede kronik hepatit vardı. Minimal hepatit saptanan hastaların ortalama serum nitrit seviyesi $19,73 \pm 7,07$ μ mol/L, ortalama serum nitrat seviyesi $31,31 \pm 20,03$ μ mol/L ve ortalama serum nitrit+nitrat seviyesi ise $51,04 \pm 12,96$ idi. Hafif şiddette kronik hepatit saptanan hastaların ortalama serum nitrit seviyesi $20,35 \pm 8,10$ μ mol/L, ortalama serum nitrat seviyesi $25,69 \pm 6,05$ μ mol/L ve ortalama serum nitrit+nitrat seviyesi ise $46,05 \pm 7,70$ idi. Orta şiddette kronik hepatit saptanan hastaların ortalama serum nitrit seviyesi $18,78 \pm 9,67$ μ mol/L, ortalama serum nitrat seviyesi $28,01 \pm 10,20$ μ mol/L ve ortalama serum nitrit+nitrat seviyesi ise $46,79 \pm 16,51$ idi. Ağır şiddette kronik hepatit saptanan hastalarda ise ortalama serum

nitrit seviyesi $17,97 \pm 5,65 \mu\text{mol/L}$, ortalama serum nitrat seviyesi $23,82 \pm 2,37 \mu\text{mol/L}$ ve ortalama serum nitrit+nitrat seviyesi ise $41,79 \pm 6,13$ olarak tespit edildi. Bu sınıflamaya göre hastaların serum nitrit, serum nitrat ve nitrit+nitrat değerleri Tablo-18’de gösterilmektedir.

Tablo-16: Çalışmaya katılan vakaların gruplara göre AST, ALT, ALP, GGT, albumin, total bilirubin, açlık kan şekeri, transferrin doygunluk indeksi, tiroid uyarıcı hormon seviyesi ve alfa fetoprotein değerleri.

		AST	ALT	ALP	GGT	Alb.	T.Bil	Glukoz	TSI	TSH	AFP
HBV	Sayı	29	29	29	2	29	29	29	29	29	29
	Ortalama	70,20	100,55	198,72	33,6	4,50	,85	94,03	38,76	1,14	5,64
	Ortanca	45,00	70,00	184,00	32,0	4,50	,87	92,00	37,06	1,10	3,51
	Std.	81,42	93,61	67,08	17,6	,31	,21	9,40	10,95	,55	6,66
	Sapma										
	En az	15	14	88	1	3,90	,49	75	19,94	,36	1,53
	En çok	454	476	322	10	5,00	1,31	111	60,73	3,13	28,52
HCV	Sayı	27	27	27	2	27	27	27	27	27	27
	Ortalama	72,22	87,44	170,55	58,1	4,49	,99	98,96	36,54	1,12	4,64
	Ortanca	63,00	76,00	161,00	43,0	4,50	,83	101,00	29,76	1,02	4,42
	Std.	32,27	34,85	68,17	37,6	,25	,51	6,95	15,13	,65	1,74
	Sapma										
	En az	25	41	46	1	3,90	,38	84,00	17,94	,32	1,23
	En çok	160	173	350	14	4,90	2,90	109,00	83,73	2,92	9,93
Kontrol	Sayı	25	25	25	2	25	25	25	25	25	25
	Ortalama	17,16	18,36	162,24	16,6	4,80	,64	98,52	22,12	1,52	2,87
	Ortanca	16,00	16,00	164,00	15,0	4,80	,58	96,00	21,53	1,31	2,86
	Std.	4,11	7,39	32,47	6,4	,19	,25	8,44	9,38	,94	1,59
	Sapma										
	En az	12	9	101		4,40	,40	74,00	7,00	,53	,97
	En çok	28	41	231	2	5,10	1,22	111,00	38,78	4,61	8,79

Tablo-17: Hastaların gruplara göre Knodell histolojik aktivite indeksi (HAI) ve fibrozis skorları.

		HAI	Fibrozis Skoru
HBV	Sayı	29	29
	Ortalama	7,8966	2,1379
	Ortanca	8,0000	3,0000
	Std. Sapma	2,4978	,9901
	En az	2,00	,00
	En çok	12,00	3,00
HCV	Sayı	27	27
	Ortalama	9,3704	2,5556
	Ortanca	9,0000	3,0000
	Std. Sapma	3,0778	,8916
	En az	3,00	,00
	En çok	14,00	3,00

Bu ciddiyet sınıflaması hepatitin etiyojisine göre ayrıldığında kronik hepatit B grubundaki 29 hastanın bir tanesinin (%3,46) minimal hepatit, 14 tanesinin (%48,27) hafif şiddette kronik hepatit, 14 tanesinin (%48,27) orta şiddette kronik hepatit grubunda bulunduğu görüldü. Şiddetli derecede kronik hepatit grubunda kronik hepatit B hastası bulunmamaktaydı. Bu hastaların serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri Tablo-19’da görülmektedir.

Kronik hepatit C grubundaki 27 hastanın bir tanesinin (%3,70) minimal hepatit, 8 tanesinin (%29,63) hafif şiddette kronik hepatit, 13 tanesinin (%48,15) orta şiddette kronik hepatit grubunda, 5 tanesinin ise (%18,52) şiddetli derecede kronik hepatit grubunda bulunduğu görüldü. Bu hastaların serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri Tablo-20’de görülmektedir.

Diğer bir deyişle minimal hepatit saptanan iki hastanın biri kronik hepatit B diğeri kronik hepatit C iken, hafif şiddette kronik hepatit saptanan 22 hastanın 14’ü (%63,64) HBV, 8’i (%36,36) HCV ile, orta şiddette kronik hepatit saptanan 27 vakanın 14’ü (%51) HBV, 13’ü (%48) HCV ile enfekteydiler. Ağır hepatit saptanan 5 hastanın tümü kronik hepatit C idi. Bu açıdan değerlendirildiğinde vakaların serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri Tablo-21’de görülmektedir.

Tablo-18: Histolojik şiddet sınıflamasına göre hastaların serum nitrit, serum nitrat ve toplam nitrit+nitrat değerleri.

CİDDİYET		NİTRİT	NİTRAT	TOTALNN
Minimal	Sayı	2	2	2
	Ortalama	19,7300	31,3100	51,0400
	Ortanca	19,7300	31,3100	51,0400
	Std. Sapma	7,0711	20,0394	12,9683
	En az	14,73	17,14	41,87
	En çok	24,73	45,48	60,21
Hafif	Sayı	22	22	22
	Ortalama	20,3559	25,6955	46,0514
	Ortanca	20,0550	25,8250	46,5800
	Std. Sapma	8,1004	6,0561	7,7003
	En az	10,00	12,99	33,81
	En çok	46,04	36,89	62,24
Orta	Sayı	27	27	27
	Ortalama	18,7874	28,0163	46,7956
	Ortanca	15,2200	26,4200	35,9100
	Std. Sapma	9,6713	10,2081	16,5152
	En az	7,80	2,81	30,57
	En çok	37,47	51,90	73,96
Ağır	Sayı	5	5	5
	Ortalama	17,9700	23,8240	41,7940
	Ortanca	17,5800	24,4500	41,1800
	Std. Sapma	5,6532	2,3779	6,1353
	En az	10,66	20,05	34,56
	En çok	23,55	26,57	48,00

Vakalar sadece kronik hepatitin etiyolojisine göre ayrıldığında, kronik hepatit B grubundaki hastaların ortalama serum nitrit seviyesi $20,11 \pm 1,78 \mu\text{mol/L}$, ortalama serum nitrat seviyesi $27,12 \pm 1,84 \mu\text{mol/L}$ ve ortalama toplam nitrit+nitrat seviyesi $47,23 \pm 2,54 \mu\text{mol/L}$ idi. Kronik hepatit C grubundaki hastaların ortalama serum nitrit seviyesi $18,55 \pm 1,41 \mu\text{mol/L}$, ortalama serum nitrat seviyesi $26,54 \pm 1,34 \mu\text{mol/L}$ ve ortalama toplam nitrit+nitrat seviyesi $45,10 \pm 2,22 \mu\text{mol/L}$ idi. Kronik hepatit hastaları

birlikte değerlendirildiğinde ise ortalama serum nitrit seviyesi $19,36 \pm 1,14 \mu\text{mol/L}$, ortalama serum nitrat seviyesi $26,84 \pm 1,14 \mu\text{mol/L}$ ve ortalama toplam nitrit+nitrat seviyesi $46,20 \pm 1,69 \mu\text{mol/L}$ olarak hesaplandı. Kontrol grubunda ise bu değerler sırasıyla $23,95 \pm 2,51 \mu\text{mol/L}$, $23,95 \pm 2,51 \mu\text{mol/L}$ ve $53,30 \pm 2,86 \mu\text{mol/L}$ olarak ölçüldü. (Tablo-22)

Tablo-19: Kronik hepatit B’li hastaların serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri.

CİDDİYET		NİTRİT	NİTRAT	NİTRİT+NİTRAT
Minimal	Sayı	1	1	1
	Ortalama	14,7300	45,4800	60,2100
Hafif	Sayı	14	14	14
	Ortalama	22,0657	25,0029	47,0686
	Ortanca	21,6500	27,7800	48,5100
	Std. Sapma	8,7000	6,6955	7,8538
	En az	13,08	12,99	33,81
	En çok	46,04	36,89	62,24
Orta	Sayı	14	14	14
	Ortalama	18,5471	27,9407	46,4721
	Ortanca	13,9000	24,5950	33,6550
	Std. Sapma	10,6794	11,7190	18,1627
	En az	7,80	2,81	30,57
	En çok	37,47	51,90	73,96

Gruplar arasında çeşitli parametrelerin karşılaştırılması güven aralığı %95 alınarak, t-test ile yapıldı. Cinsiyet dağılımı ise Ki kare testi karşılaştırıldı. Kronik hepatit B grubu ile kronik hepatit C grubu arasında yaş, cinsiyet, histolojik aktivite indeksi, boy, vücut kitle indeksi, hemoglobin seviyesi, INR değeri, serum GGT seviyesi ve açlık kan şekeri seviyeleri arasında anlamlı farklılık vardı. Kronik hepatit B grubundaki hastalar, kronik hepatit C grubundakilere göre daha genç yaşta, daha uzun boylu ve vücut kitle indeksleri daha düşük, hemoglobin seviyeleri ve INR değerleri daha yüksek, serum GGT seviyesi ve açlık kan şekeri ise daha düşüktü. Yine kronik hepatit B’li hastaların serum transaminaz seviyeleri kronik hepatit C’li hastalarinkinden farklı olmamakla beraber histolojik aktivite indeksleri anlamlı derecede daha düşüktü. Ancak kronik hepatit B grubunda sadece 3 kadın hasta bulunması nedeniyle cinsiyet

dağılımı açısından iki grup farklıydı. Kronik hepatit B grubundaki hastalar kontrol vakaları ile kıyaslandığında, yine cinsiyet dağılımı açısından farklılık bulunmakla beraber, iki grup arasında boy, hemoglobin seviyesi, INR değeri, serum AST, ALT, ALP, GGT, demir, albumin, total bilirubin ve alkalen fosfataz seviyeleri ve TSI değerleri arasında anlamlı farklılıklar bulunmaktaydı. Kronik hepatit B grubundaki hastalar kontrol vakalarına kıyasla daha uzun boylu olup, hemoglobin seviyeleri daha düşük, INR değerleri ve serum transaminaz ve bilirubin seviyeleri, transferrin doygunluk indeksleri ve AFP seviyeleri daha yüksek idi. Kronik hepatit C grubundaki hastalar kontrol vakaları ile karşılaştırıldığında ise iki grup arasında yaş, vücut ağırlığı, vücut kitle indeksi, serum AST, ALT, GGT, bilirubin, albumin, demir, TSI ve AFP seviyeleri açısından farklılıklar bulunduğu görüldü. Kronik hepatit C grubundaki hastalar daha şişman olup transaminaz, bilirubin, demir, TSI, AFP seviyeleri daha yüksek, albumin seviyeleri ise daha düşüktü. Üstelik, kronik hepatit C'li hastaların toplam nitrit+nitrat seviyeleri kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede daha düşüktü. ($p=0.027$) Oysa, kronik hepatit C'li hastalarla kronik hepatit B'li hastalar arasında ve kronik hepatit B'li hastalarla kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamaktaydı. Tablo-23'te bu parametrelerin gruplar arasındaki karşılaştırmaları gösterilmektedir.

Her bir grubun kendi içinde çeşitli parametrelerin birbiriyle ilişkisi olup olmadığına Spearman korelasyon testi ile bakıldı;

Kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireylerde vakanın yaşı ile ortalama arteriyel kan basıncı ve serum AST düzeyi arasında, toplam serum nitrit+nitrat düzeyi ile serum ALT seviyesi arasında, ortalama kan basıncı ile serum AST seviyesi arasında iyi derecede ($>50\%$) pozitif korelasyon ve serum albumin seviyesi ile eritrosit sedimentasyon hızı arasında iyi derecede negatif korelasyon bulunduğu görüldü. Toplam nitrit+nitrat seviyeleri ile ortalama kan basıncı, serum albumin seviyesi, serum AST seviyesi ve beyaz küre sayısı arasında zayıf ($25\%-50\%$) derecede pozitif korelasyon saptanırken, eritrosit sedimentasyon hızı ve nabız ile zayıf derecede negatif korelasyon bulunmaktaydı. Toplam serum nitrit+nitrat seviyeleri ile yaş, vücut kitle indeksi ve açlık kan şekeri arasında ise korelasyon saptanmadı ($<25\%$). Bu bulgular tablo-24'te gösterilmektedir.

Tablo-20: Kronik hepatit C'li hastaların serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri.

CİDDİYET		NİTRİT	NİTRAT	NİTRİT+NİTRAT
Minimal	Sayı	1	1	1
	Ortalama	24,7300	17,1400	41,8700
Hafif	Sayı	8	8	8
	Ortalama	17,3638	26,9075	44,2713
	Ortanca	16,3200	24,4950	44,4100
	Std. Sapma	6,3407	4,9128	7,5920
	En az	10,00	22,91	35,11
	En çok	27,36	36,74	56,88
Orta	Sayı	13	13	13
	Ortalama	19,0462	28,0977	47,1438
	Ortanca	15,2200	26,8900	46,5100
	Std. Sapma	8,8860	8,7741	15,2754
	En az	10,22	16,05	30,66
	En çok	33,33	40,69	73,11
Ağır	Sayı	5	5	5
	Ortalama	17,9700	23,8240	41,7940
	Ortanca	17,5800	24,4500	41,1800
	Std. Sapma	5,6532	2,3779	6,1353
	En az	10,66	20,05	34,56
	En çok	23,55	26,57	48,00

Tablo-21: Histolojik ciddiyet ve etiyolojiye göre hastaların serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri.

CİDDİYET	ETİYOLOJİ	Sayı	(%)	NİTRİT	NİTRAT	Nitrit+Nitrat
Minimal	HBV	1	50	14,73	45,48	60,21
	HCV	1	50	24,73	17,14	41,87
Hafif	HBV	14	63,64	22,06±8,70	25,00±6,69	47,06±7,85
	HCV	8	36,36	17,36±6,34	26,90±4,91	44,27±7,59
Orta	HBV	14	51,85	18,54±10,76	27,94±11,71	46,47±18,16
	HCV	13	48,15	19,04±8,88	28,09±8,77	47,14±15,27
Ağır	HCV	5	100	17,97±5,65	23,82±2,37	41,79±6,13

Tablo-22: Hasta gruplarına göre ortalama serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri.

GRUP	SAYI	ORT. NİTRİT	ORT. NİTRAT	ORT.NİTRİT+NİTRAT
HBV	29	20,11±1,78	27,12±1,84	47,23±2,54
HCV	27	18,55±1,41	26,54±1,34	45,10±2,22
HBV+HCV	56	19,36±1,14	26,84±1,14	46,20±1,69
Kontrol	25	23,95±2,51	23,95±2,51	53,30±2,86

Aynı test kronik hepatit B grubundaki hastalarda yapıldığında, hastanın yaşı ile serum AST seviyesi, fibrozis derecesi ve histolojik aktivite indeksi arasında, serum nitrit+nitrat seviyesi ile serum albumin düzeyi arasında, serum AST seviyesi ile serum ALT seviyesi arasında, eritrosit sedimentasyon hızı ile nabız sayısı arasında ve histolojik aktivite indeksi ile fibrozis derecesi arasında iyi derecede pozitif bir korelasyon olduğu görüldü. Ayrıca, hastanın yaşı ile kan basıncı, vücut kitle indeksi, serum ALT seviyesi, eritrosit sedimentasyon hızı ve nabız sayısı arasında, kan basıncı ile vücut kitle indeksi, eritrosit sedimentasyon hızı, beyaz küre sayısı, nabız sayısı fibrozis derecesi ve histolojik aktivite indeksi arasında, vücut kitle indeksi ile eritrosit sedimentasyon hızı, nabız sayısı ve fibrozis derecesi arasında, serum AST seviyesi ile eritrosit sedimentasyon hızı, nabız sayısı, fibrozis derecesi ve histolojik aktivite indeksi arasında, serum ALT seviyesi ile fibrozis derecesi arasında, beyaz küre sayısı ile fibrozis derecesi arasında, nabız sayısı ile fibrozis derecesi ve histolojik aktivite indeksi arasında zayıf derecede pozitif korelasyon vardı. Buna ek olarak, hastaların yaşı ile serum nitrit+nitrat seviyeleri ve serum albumin seviyeleri arasında, serum nitrit+nitrat seviyeleri ile serum AST seviyesi ve nabız sayısı arasında, kan basıncı ile serum albumin seviyesi arasında, açlık kan şekeri ile serum AST seviyesi arasında, serum albumin düzeyi ile fibrozis derecesi ve histolojik aktivite derecesi arasında zayıf derecede negatif bir korelasyon olduğu görüldü. Bu bulgular tablo-25’de gösterilmiştir.

Tablo-23: Gruplar arasında çeşitli parametrelerin karşılaştırılması. (p değeri t-test ile hesaplanmıştır. GA: %95)

	HBV & HCV	HCV & Kontrol	HBV & Kontrol
Yaş	< ,001	< ,001	,283
Cinsiyet (#)	,001	,788	< ,001
HAI	,050		
Fibrozis	,104		
Boy	,021	,707	,003
Ağırlık	,483	,032	,120
BMI	,021	,022	,739
Kan basıncı	,726	,637	,817
Nabız	,835	,227	,435
Beyaz küre	,620	,531	,291
Hemoglobin	,006	,256	< ,001
Trombosit	,345	,085	,523
INR	,043	,727	,032
ESR	,114	,501	,402
AST	,905	< ,001	,002
ALT	,497	< ,001	< ,001
ALP	,125	,582	,013
GGT	,004	< ,001	< ,001
Demir	,379	< ,001	< ,001
TIBC	,623	,587	,226
TSI	,531	< ,001	< ,001
Albumin	,923	< ,001	< ,001
T. Bilirubin	,197	,004	,002
AKŞ	,031	,837	,070
TSH	,864	,077	,074
AFP	,455	< ,001	,038
NİTRİT	,502	,062	,229
NİTRAT	,803	,087	,260
NOx	,535	,027	,118
# = Ki kare test			

Tablo-24: Kontrol grubunda çeşitli parametreler arasındaki korelasyonlar.

Spearman Korelasyon Karşılaştırmaları (%)											
N=25	Yaş	NOx	TA	BMI	AKŞ	Alb.	AST	ALT	ESR	WBC	Nb.
Yaş		19	60	26	-24	-9	64	24	-12	13	-4
NOx	19		35	-12	13	46	47	55	-42	30	-35
TA	60	35		15	-30	-28	59	35	21	-1	10
BMI	26	-12	15		8	-38	27	-28	22	40	10
AKŞ	-24	13	-30	8		16	-43	-34	-12	14	10
Alb.	-9	46	-28	-38	16		-16	10	-50	12	-24
AST	64	47	59	27	-43	-16		47	4	13	-38
ALT	24	55	35	-28	-34	10	47		-44	-21	-44
ESR	-12	-42	21	22	-12	-50	4	-44		-12	28
WBC	13	30	-1	40	14	12	13	-21	-12		16
Nb.	-4	-35	10	10	10	-24	-38	-44	28	16	

Tablo-25: Kronik hepatit B grubunda çeşitli parametreler arasındaki korelasyonlar.

N=29	Yaş	NOx	TA	BMI	AKŞ	Alb.	AST	ALT	ESR	WBC	Nb.	Fib.	HAI
Yaş		-28	45	38	-4	-28	58	34	31	3	42	52	54
NOx	-28		-23	-6	10	59	-33	-21	2	-1	-40	-20	-15
TA	45	-23		46	3	-29	10	-1	31	38	43	47	41
BMI	38	-6	46		-6	8	-1	-10	36	24	42	34	7
AKŞ	-4	10	3	-6		6	-33	-9	5	-8	-22	-11	1
Alb.	-28	59	-29	8	6		-19	-7	15	-22	-10	-39	-36
AST	58	-33	10	-1	-33	-19		84	27	1	33	35	30
ALT	34	-21	-1	-10	-9	-7	84		23	5	9	31	22
ESR	31	2	31	36	5	15	27	23		7	52	17	1
WBC	3	-1	38	24	-8	-22	1	5	7		-6	35	22
Nb.	42	-40	43	42	-22	-10	33	9	52	-6		36	27
Fib.	52	-20	47	34	-11	-39	35	31	17	35	36		87
HAI	54	-15	41	7	1	-36	30	22	1	22	27	87	

Spearman korelasyon testi kronik hepatit C hasta grubuna uygulandığında ise, hastanın yaşı ile histolojik aktivite indeksi arasında, kan basıncı ile serum ALT seviyesi arasında, vücut kitle indeksi ile beyaz küre sayısı arasında, serum AST seviyesi ile ALT seviyesi arasında, eritrosit sedimentasyon hızı ile beyaz küre sayısı arasında ve fibrozis derecesi ile histolojik aktivite indeksi arasında iyi derecede pozitif korelasyon ve hastanın yaşı ile serum albumin seviyesi arasında iyi derecede negatif korelasyon olduğu görüldü. Hastanın yaşı ile açlık kan şekeri ve fibrozis derecesi arasında, serum nitrit+nitrat seviyesi ile vücut kitle indeksi arasında, kan basıncı ile vücut kitle indeksi, serum AST seviyesi, eritrosit sedimentasyon hızı, beyaz küre sayısı ve nabız sayısı arasında, vücut kitle indeksi ile serum ALT seviyesi ve eritrosit sedimentasyon hızı arasında, açlık kan şekeri ile serum ALT seviyesi, eritrosit sedimentasyon hızı ve beyaz küre sayısı arasında, serum AST ve ALT seviyeleri ile eritrosit sedimentasyon hızı ve nabız sayısı arasında, nabız sayısı ile fibrozis derecesi ve histolojik aktivite indeksi arasında zayıf derecede pozitif korelasyon vardı. Serum nitrit+nitrat seviyesi ile serum ALT ve AST seviyeleri arasında, vücut kitle indeksi ile serum albumin seviyesi arasında, serum albumin seviyesi ile eritrosit sedimentasyon hızı ve fibrozis derecesi arasında ise zayıf derecede negatif bir korelasyon bulunmaktaydı. Bu bulgulara ilişkin veriler tablo-26'da görülmektedir.

Tablo-26: Kronik hepatit C grubunda çeşitli parametreler arasındaki korelasyonlar

n=27	Yaş	NOx	TA	BMI	AKŞ	Alb.	AST	ALT	ESR	WBC	Nb.	Fib.	HAI
Yaş		-17	-18	-1	35	-56	20	-4	16	8	31	48	50
NOx	-17		20	27	-16	-18	-25	-25	10	10	21	-12	-6
TA	-18	20		40	-1	-5	31	57	27	36	30	1	-13
BMI	-1	27	40		15	-33	5	30	25	50	16	18	-14
AKŞ	35	-16	-1	15		-9	21	25	34	46	-1	15	3
Alb.	-56	-18	-5	-33	-9		-26	1	-38	-23	-5	-26	-23
AST	20	-25	31	5	21	-26		79	25	-2	29	16	20
ALT	-4	-25	57	30	25	1	79		32	21	38	16	7
ESR	16	10	27	25	34	-38	25	32		67	5	18	9
WBC	8	10	36	50	46	-23	-2	21	67		10	17	10
Nb.	31	21	30	16	-1	-5	29	38	5	10		30	30
Fib.	48	-12	1	18	15	-26	16	16	18	17	30		70
HAI	50	-6	-13	-14	3	-23	20	7	9	10	30	70	

Her bir grup ayrı ayrı ele alınıp değerlendirildiğinde serum nitrit, nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri arasında anlamlı farklılık olmadığı görülmekle, beraber etiyojisine bakılmaksızın kronik hepatit hastaları ile kontrol grubu arasında kıyaslama yapıldığı zaman hasta grubunda serum nitrit ve NOx seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. (t-test ile p değerleri; serum nitrit için 0,05, serum nitrat için 0,13 ve NOx için 0,02)

Cinsiyetin NOx üzerine etkisi olup olmadığını anlamak için kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kontrol vakalarında, cinsiyete göre karşılaştırmalar yine t-test ile yapıldı. Nitrat seviyeleri arasında fark bulunmazken, serum nitrit ve toplam nitrit+nitrat seviyelerinin kadınlarda erkeklere göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü. (Tablo-27)

Tablo-27: Kontrol grubunda cinsiyete göre nitrit, nitrat ve NOx karşılaştırmaları.

	Cinsiyet	Sayı	Ortalama (μmol/L)	p
Nitrit	Kadın	14	17,3±6,7	,004
	Erkek	11	32,42±13,3	
Nitrat	Kadın	14	31,3±6,4	,136
	Erkek	11	27,6±5,2	
Toplam Nitrit+nitrat	Kadın	14	47,9±9,8	,048
	Erkek	11	60,0±16,5	

Kronik hepatit B grubunda cinsiyete göre serum NOx seviyelerinin farklı olup olmadığı benzer şekilde test edildi ve anlamlı sonuç elde edilemedi. Ancak bu grupta kadın hasta sayısının az olması nedeniyle yorum yapılamadı. (Tablo-28)

Tablo-28: Kronik hepatit B grubunda cinsiyete göre nitrit, nitrat ve NOx karşılaştırmaları.

	Cinsiyet	Sayı	Ortalama (μmol/L)	p
Nitrit	Kadın	3	16,6±7,9	,521
	Erkek	26	20,5±9,8	
Nitrat	Kadın	3	26,7±9,9	,951
	Erkek	26	27,1±10,1	
Toplam Nitrit+nitrat	Kadın	3	43,4±10,8	,623
	Erkek	26	47,6±14,1	

Aynı şekilde kronik hepatit C hastaları değerlendirildiğinde, her ne kadar kadın hastalarda daha düşük değerler elde edilmiş ise de, cinsiyet farklılığı ile serum NOx seviyeleri arasında anlamlı değişiklikler bulunmadığı görüldü. (Tablo-29)

Tablo-29: Kronik hepatit C grubunda cinsiyete göre nitrit, nitrat ve NOx karşılaştırmaları.

	Cinsiyet	Sayı	Ortalama (μmol/L)	p
Nitrit	Kadın	14	17,2±6,7	,364
	Erkek	13	20,0±8,0	
Nitrat	Kadın	14	25,3±6,6	,334
	Erkek	13	27,8±7,4	
Toplam Nitrit+nitrat	Kadın	14	42,5±9,9	,242
	Erkek	13	47,8±12,9	

Bu farklanmanın hasta grubu (kronik hepatit B + C) ile kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalarında da olup olmadığı araştırıldığında, iki grup arasında kadınlarda serum nitrit ve toplam nitrit+nitrat seviyeleri açısından anlamlı farklılık bulunmadığı serum nitrat seviyelerinin ise hasta grubundaki kadınlarda anlamlı derecede daha düşük olduğu görüldü. Erkeklerde ise hasta grubunda serum nitrit seviyesi ve toplam nitrit+nitrat seviyesi anlamlı derecede daha düşük olmakla beraber nitrat seviyeleri açısından anlamlı bir farklılık yoktu. (Tablo-30)

Tablo-30: Hasta ve kontrol grupları arasında cinsiyete göre serum nitrit, serum nitrat ve toplam nitrit+nitrat seviyelerinin karşılaştırılması.

		Sayı	Ort. Nitrit	Ort. Nitrat	Ort. NOx
Kadın	Hasta	17	17,1±6,6	25,5±6,9	42,7±9,7
	Kontrol	14	17,3±6,7	31,3±6,4	47,9±9,8
p			,938	,024	,149
Erkek	Hasta	39	20,3±9,1	27,3±9,2	47,7±13,5
	Kontrol	11	32,4±13,3	27,6±5,2	60,0±16,5
p			,001	,925	,014

Kronik hepatit B grubunda az sayıda kadın hasta bulunması nedeniyle tüm gruplardaki erkek hastalar göz ardı edilerek sadece erkek hastalar değerlendirildiğinde, kontrol vakalarına kıyasla hem kronik hepatit B grubundaki hem de kronik hepatit C

grubundaki erkek hastaların serum NOx seviyelerinin anlamlı derecede daha düşük olduğu görüldü. (Tablo-31)

Tablo-31: Erkek hastalarda gruplara göre serum NOx seviyeleri.

Grup	Sayı	Serum NOx (Ortalama±SD)	p
HBV	26	47,6±14,1	,02
Kontrol	11	60,0±16,5	
HCV	13	47,8±12,9	,05
Kontrol	11	60,0±16,5	
HBV	26	47,6±14,1	,96
HCV	13	47,8±12,9	

Hasta grupları arasında kronik hepatitin şiddetine göre ayırım yapılarak Ki-kare test ile bakıldığında HCV'nin daha ağır bir histolojik tablo oluşturduğu görülmektedir. (p=0,05). Ayrıca One Way Anova test ile kronik hepatit şiddetine göre sınıfla yapılarak her bir grubun serum NOx seviyeleri karşılaştırıldığında ise anlamlı bir farklılık olmadığı görülmekteydi. (p=0,819).

5. TARTIŞMA

NO'nun birçok karmaşık fizyolojik etkisi vardır. Bu kadar kısa etkili ve basit bir molekülün bu kadar çok ve önemli işlevleri olduğuna inanmak oldukça zordur. Belki de, molekül bu özellikleri sayesinde bu kadar çok yönlü ve "becerikli" olabilmektedir. Hepatik damar tonusu ve metabolizması üzerinde bu kadar önemli etkileri olan bir molekülün kaçınılmaz olarak tüm vücudun hemodinamiklerini ve dolaşım homeostazını da etkileyeceği açıktır. Ek olarak, NO'nun prostaglandinler ve serbest oksijen radikalleri gibi vücuttaki diğer maddelerle etkileşme yeteneği ve ATP ve asetilkolin gibi sinyal transdüksiyon molekülleri ile kompleks ilişkileri nedeniyle kimyası iyice karmaşıklaşmakta, fizyolojik ve patofizyolojik etkilerini yorumlamak zorlaşmaktadır.

Plazma ve idrarda nitrit ve nitrat ve ayrıca nefeste NO ölçümleri, NO metabolizmasının etkilediği bir çok farklı durumda kullanılmıştır. Bir çok örnekte, yüksek in vivo stabilitesi nedeniyle nitrat daha çok kullanılan iyon olmuştur. Bazı durumlarda, nitrit ya da "oynak NOx" (nitrit ya da nitroso türevleri) nitrattan daha yüksek kestirim değerine sahip olabilir (319). NO'nun oldukça geniş bir biyokimyasal ya da fizyolojik fonksiyonlar yelpazesinden etkileniyor olması nedeniyle, çeşitli hastalık durumlarında ya da patolojik olaylarda kullanımı kısıtlı kalmaktadır. Diyetsetel kaynaklarla ve daha az önemli olmak üzere çeşitli ilaçlarla dışardan alınan nitrit ve nitrat miktarlarının değişkenliği ve sigara içimi veya hava kirliliği nedeniyle alınan NO konsantrasyonları da kontrollü deneysel laboratuvar şartları dışında yapılan klinik çalışmalardan alınan sonuçların yorumunu güçleştirmektedir. Klinik açıdan değerlendirildiğinde, yorumlama gücü bakımından "problemlili" bir molekül olmasına rağmen, plazma ve idrar nitrit ve nitrat seviyelerinin ölçümlerinin, enfeksiyon, rejeksiyon ve inflamasyon gibi uyarılabilir-NOS (iNOS) aktivitesinin ciddi düzeyde arttığı çeşitli hastalık durumlarında önemli bir tanı ve takip parametresi olarak kullanılabileceğini düşünen araştırmacılar mevcuttur (320).

Nitrik oksitin toksisitesi kısmen de olsa süperoksitle reaksiyona girip peroksinitrit oluşturması yoluyla olur. Peroksinitrit hücrelerde nitrotirozin oluşumunu uyarır. Viral kaynaklı kronik karaciğer hastalıklarında hepatositlerde iNOS ekspresyonu belirgin şekilde artmıştır. Bu artış yaygın lobüler şekildedir. Oysa, nitrotirozinin dağılımı hepatositler ve Kupffer hücrelerinde sadece hücresele odaklar şeklindedir. Ayrıca nitrotirozinin karaciğer içindeki miktarı ile karaciğer hasarının şiddeti arasında gözle görülür bir birliktelik söz konusudur (321). Cuzzocrea ve arkadaşları da (322) benzer

bulgular elde ettikleri çalışmalarında, sirozlu hastalarda daha yoğun nitrotirozin birikimi saptamışlardır. (Kronik viral hepatitli hastalarda % 57'ye karşılık, kompanse sirozu bulunan hastalarda % 72.)

Hepatit sırasında, TNF- α ve IL-6 gibi sitokinlerin dolaşımdaki seviyeleri artmaktadır. Karaciğerin inflamasyonu sırasında birçok sitokinin ekspresyonunun arttığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (311). Dolayısıyla, kronik viral hepatitli hastalarda bir çok inflamasyon durumunda aktivitesi artan iNOS'un etkisiyle, serum nitrit ve nitrat seviyelerinin de artması beklenen bir bulgu olacaktır.

Literatürde, hepatositlerin TNF, IL-1, IFN- γ ve IL-6 gibi bir çok sitokine maruz kaldıktan sonra artmış iNOS ekspresyonu gösterdiğini saptamış olan çalışma vardır. Kronik hepatik inflamasyonda artmış NO yapımı ve yüksek plazma nitrit ve nitrat seviyelerinin bulunması inflamatuvar uyarıya karşı karaciğerin savunma cevabı içinde NO'nin de rol aldığını düşündürmektedir (313).

Karaciğer hastalıklarında nitrik oksitini yerini akut ve kronik olarak ikiye ayırmak gereklidir. Zira nitrik oksitin zararlı mı yoksa yararlı mı etkileri olacağını maruziyetin süresi ve miktarı belirlemektedir. Akut sepsis ve reperfüzyon hasarlanmalarında düşük doz nitrik oksit kan akımını artırmakta, trombosit çökmesini ve pıhtılaşmayı azaltmakta ve karaciğerdeki toksik oksijen radikallerini nötralize etmektedir (323). Nitrik oksit yine, akut hepatit ve diğer inflamatuvar olaylarda antimikrobiyal ve anti-apoptotik etkiler göstermektedir. Ancak, kronik karaciğer hastalıklarında yüksek dozda ve uzun süreli nitrik oksit maruziyeti olmaktadır. Bu durumda nitrik oksit, genotoksik olabilmekte ve karaciğer kanseri gelişimine yol açabilmektedir. Ek olarak, uzamış iskemide yüksek seviyelere ulaşan nitrik oksit sitotoksik etkiler göstererek ağır karaciğer hasarlanmasına neden olabilmektedir (324).

Bununla beraber, literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda kronik hepatitte nitrit ve nitrat seviyelerinin yükselip yükselmediği sorusuna farklı cevaplar verilmektedir. Bazı çalışmalarda kontrol vakalarına kıyasla yüksek seviyeler elde edilirken, başka çalışmalarda düşük ya da normal seviyeler ölçülmüştür. Üstelik bu bulgular kronik viral hepatitin etiolojisinde rol alan virüse göre de değişiklikler göstermektedir.

Moriyama ve arkadaşları kronik viral hepatitte normal serum nitrit ve nitrat seviyeleri ölçmüşlerdir. Ancak ilginç olarak, bu çalışmada nitrit ve nitrat seviyeleri kronik hepatit zemininde hepatoselüler karsinoma gelişen hastalarda oldukça yüksek ölçülürken, karaciğer sirozu zemininde hepatoselüler karsinoma gelişmiş olan vakalarda daha düşük değerlere ulaşılmıştır (289).

Buna benzer sonuçlar Mihm ve arkadaşları tarafından da elde edilmiştir. Bu araştırmacılar kronik hepatit C hastalarında iNOS ekspresyonunu artmış olarak bulmalarına karşın plazma nitrit ve nitrat seviyelerinin buna eşlik etmediğini saptamışlardır. Ne iNOS ekspresyonu ne de HCV RNA seviyesi hepatik inflamatuvar aktivite ile ilişkili bulunmuştur. Çalışmaya vaka düzeyinde bakıldığında bazı kronik hepatit C hastalarının sağlıklı kontrol vakalarına göre oldukça yüksek plazma nitrit ve nitrat seviyelerine, bazılarının ise normal seviyelere sahip olduğu görülmektedir. Vakalar arasında görülen bu farklılığın sebebi kesin olarak bilinmemektedir. Bu durumun muhtemel açıklaması inflamasyon ve fibrozis dereceleri arasındaki farklılığın serum nitrit ve nitrat seviyelerini farklı etkileyebileceği şeklinde yapılabilir. Yine, kronik hepatitin farklı etiyolojileri de bu durumu etkileyebilir. Zira, özellikle kronik hepatit C hastalarında yüksek iNOS ekspresyonunun bulunduğu gösteren çalışmalar vardır. Ortalama serum NOx konsantrasyonları, 24 kronik hepatit C hastasında 63 $\mu\text{mol/L}$ olarak ölçülürken, başka karaciğer hastalıkları olan 8 hastada 33 $\mu\text{mol/L}$ ve normal kontrol vakalarında ise 25 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptanmıştır. Bu vakaların biyopsi materyallerinde de uyarılabilir-NOS RNA transkriptlerinde artış saptanmıştır. Bu değişikliklerin doğrudan doğruya virüs tarafından mı yoksa interferon-gama (IFN- γ) tarafından mı oluşturulduğu henüz açıklık kazanmamıştır (314).

Hem kronik hepatit B hem de kronik hepatit C hastalarında nitrit ve nitrat seviyelerini sağlıklı kontrol vakalarından daha yüksek saptayan Tankurt ve arkadaşlarının (316) bulgularına paralel olarak, Sakai ve arkadaşları da plazma NOx konsantrasyonlarının kronik karaciğer hastalıklarında ve HCV enfeksiyonunda yükseldiğini bulmuşlardır. Sakai ve arkadaşları ayrıca asemptomatik HCV taşıyıcılarında da NOx konsantrasyonlarının sağlıklı kontrol vakalarına göre yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu durum Mihm ve arkadaşlarının iNOS mRNA ekspresyonu ve HCV viral yükü ile hepatik inflamatuvar aktivite arasında ilişki olmadığı yönündeki bulguları ile de desteklenmektedir (102).

Bunun tersine çeşitli sebepler nedeniyle oluşmuş kronik hepatitlerde serum nitrit seviyelerinin kontrol vakalarınınkinden düşük ölçüldüğü çalışmalar da vardır (325).

Monoviral kronik hepatitlerde idrar nitrit ve nitrat seviyelerini karşılaştıran bir çalışmada Vinogradov ve arkadaşları (326) kronik hepatit C ve D'deki seviyelerin kronik hepatit B ve ardından hepatit A'daki değerlerden daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Garcia-Monzon ve arkadaşları (321) hepatoselüler proteinlerin nitrik oksit aracılıklı nitrasyonunu incelemişler ve hepatoselüler NO yapımının kronik viral hepatitin histolojik ağırlığı ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Bu da NO'nin kronik viral hepatitin patogeneğinde önemli mekanizmalarda rol aldığını düşündürmektedir. Mihm ve arkadaşlarının bulgularının tersine hepatit B virüsünün insan hepatositlerinde NO yapımını artırdığına ilişkin yayınlar da bulunmaktadır (327).

Kronik viral hepatitlerde verilen antiviral tedavilerin ve özellikle de interferon alfa tedavisinin karaciğerde inflamasyonu azalttığı bilinmektedir. Üstelik inflamasyondaki bu azalma hem biyokimyasal hem de virolojik yanıt parametrelerinden bağımsız gibi gözükmektedir. Bu bilgiler ışığında interferon tedavisi verilen kronik viral hepatit hastalarında nitrik oksit yapımının, dolayısıyla da serum nitrit ve nitrat seviyelerinin değişmesi beklenebilir. Literatür incelendiğinde yine bu konuya açıklık getirmek amacıyla yapılan çalışmalarda da çelişkili sonuçlar alındığı görülmektedir. Moussa ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kronik hepatit C'li hastaların plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ($32.3 \pm 8.94 \mu\text{mol/L}$) sağlıklı kontrol vakalarının değerlerinden ($35.5 \pm 15.12 \mu\text{mol/L}$) istatistiki olarak farklı bulunmamış. Yine kronik hepatit C hastalarında alfa interferon tedavisi alanların plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ($31.6 \pm 10.55 \mu\text{mol/L}$) ile tedavi almayanların değerleri ($33.0 \pm 7.51 \mu\text{mol/L}$) arasında da anlamlı fark bulunamamış. Sirotik hastaların plazma nitrit ve nitrat seviyeleri ($42.36 \pm 26.86 \mu\text{mol/L}$) kronik hepatit C'li hastalarinkine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş. Sirozun sebebi ile sonuçlar arasında ise ilişki bulunamamış (287). Hayvan modellerinde interferonun hücre içi virüs replikasyonunu durdurucu etkisi doğrudan doğruya nitrik oksit yapımı ile alakalıdır. Ancak insanlarda aynı ilişki söz konusu değildir. Halai ve arkadaşları interferon tedavisi verilen hastalarda HCV RNA seviyesi ile serum nitrit ve nitrat seviyelerini kıyasladıkları çalışmalarında, HCV RNA seviyelerinin interferon verildikten sonraki 7. ($\pm 2,2$) saatte düştüğünü oysa NOx seviyelerindeki pik artışın 120. saatte olduğunu yani interferonun etkisinden bağımsız olduğunu saptamışlardır (328).

Nitrik oksit metabolizması oldukça karmaşıktır ve serum nitrit ve nitrat seviyelerini etkileyen oldukça fazla etken bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri hastanın kullanmakta olduğu ilaçlar, sigara kullanımı, aldığı diyetin içeriği, birlikte bulunan hastalıklar (romatolojik hastalıklar, diyabetes mellitus, hipertansiyon, kalp yetmezliği vs.) ve kan örneğinin alındığı sıradaki açlık durumudur. Literatürde konuyla ilgili olarak yapılmış olan bir çok çalışmada bu etkenlerin hepsine birden dikkat

edilmemiştir. Biz çalışmamızda ölçüm farklılıkları oluşmasını önlemek maksadıyla serum NOx seviyelerini etkileyebilecek faktörleri bulunan hastaları çalışma dışı bıraktık ve en az 12 saatlik açlık sonrası kan örneği aldık.

Serum nitriti periferik kanda hem vücut içinde hem de vücut dışında hızla nitrata dönüşmektedir. Ölçüm hatalarından sakınabilmek için kan örneği hastadan alındıktan sonra en kısa zamanda ve en fazla 10 dakika içinde -20 C°'den daha düşük bir sıcaklıkta dondurulmalıdır. Yine de bu zaman zarfında bir miktar nitrit nitrata dönüşmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçlar üzerinde yorum yapılırken çok dikkatli olunmalı ve daha da iyisi toplam nitrit+nitrat (NOx) seviyeleri kullanılmalıdır. Bu nedenle yazımızda yapılan yorumlar daha çok NOx üzerinden olacaktır.

Çalışmamızda, hepatit B grubundaki hastaların çoğunluğunun erkek olması nedeniyle hem kronik hepatit C grubu hem de kontrol grubunu oluşturan vakalarla yapılan kıyaslamalarda boy ve vücut kitle indeksleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktaydı. Bu cinsiyet dağılımı kronik hepatit B hastalarının kontrol vakalarına kıyasla daha yüksek hemoglobin seviyelerine sahip olmalarını da açıklamaktadır.

Kronik hepatit C grubundaki hastalar ise diğer iki gruptaki hastalara göre daha ileri yaşlardaydılar. Bu farklılık da diğer gruplara göre daha yüksek vücut kitle indeksi değerlerini açıklayabilir. Kronik hepatit C hastalarının HAI değerlerinin daha yüksek bulunmuş olması bu yaş farkı ile açıklanabilir. Ancak, HCV'nin karaciğerde daha ağır inflamasyon oluşturduğu da bilindiğinden bu farklılık viral etiyoloji nedeniyle de ortaya çıkmış olabilir. Kronik hepatit C'de serum transaminaz seviyeleri ile karaciğer histolojisinin ağırlığı arasında paralellik bulunmadığı da bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, kronik hepatit B hastaları ile kronik hepatit C hastalarının HAI skorları birbirinden farklı olmakla birlikte serum transaminaz değerleri arasında farklılık bulunmamaktaydı. Yine, korelasyon testlerinde de HAI ile serum transaminaz değerleri arasında kronik hepatit B grubunda zayıf korelasyon saptanırken, kronik hepatit C grubunda korelasyon saptanmamıştır.

Hastalar kronik hepatitin şiddetine göre minimal, hafif, orta ve şiddetli hepatit olarak dört gruba ayrıldığında HCV'nin daha ağır hepatit oluşturduğu görülmekle beraber minimal hepatit grubunda sadece iki hasta bulunması nedeniyle yorum yapmak güçleşmektedir. Yine de şiddetli hepatit grubundaki hastaların tamamının hepatit C'li olması dikkat çekicidir. Bununla beraber kronik hepatit C'li hastaların daha yaşlı olması histolojik aktivite skorları arasındaki farklanmayı açıklayabilir. Ancak, hastaların enfeksiyonu ne zaman aldıkları ve hastalık yaşları net olarak bilinemediğinden bu

konuda yorum yapmak doğru olmayabilir. Diğer taraftan, hastalar hastalığın şiddetine göre sınıflanarak serum NOx seviyeleri arasında farklılık olup olmadığı araştırıldığında, istatistiksel açıdan anlamlı bir sonuç elde edilememektedir.

Kontrol grubunda serum NOx seviyeleri ile serum ALT seviyeleri arasında iyi derecede pozitif korelasyon, kan basıncı, serum albumin ve AST seviyesi arasında zayıf bir pozitif korelasyon, eritrosit sedimentasyon hızı ve nabız sayısı arasında zayıf bir negatif korelasyon bulunmaktaydı. Yaş, vücut kitle indeksi, açlık kan şekeri ve beyaz küre sayısı ise serum NOx seviyeleri üzerine etkisiz gözükmekteydi. Hasta gruplarında ise bu parametrelerle serum NOx seviyeleri arasındaki korelasyon katsayıları tamamen farklı bir tablo çizmekteydi.

Kontrol grubunda serum NOx seviyeleri, cinsiyete göre anlamlı derecede farklılık göstermekte ve kadınlarda daha düşük seviyelerde kalmaktaydı. Bununla beraber hem kronik hepatit B hem de kronik hepatit C grubunda cinsiyete göre serum NOx seviyeleri arasında böyle bir istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmamaktaydı.

Kronik hepatit B'li hastaların serum NOx seviyeleri kontrol vakalarından farklı değildi. Oysa, bu gruplarla arasında serum NOx seviyelerini etkileyebilen parametrelerden serum ALT seviyesi başta olmak üzere diğer transaminazlar açısından anlamlı farklılıklar bulunmaktaydı. Ancak, kronik hepatit B grubunu oluşturan hastaların çoğunluğunun erkek olması ve genel olarak erkeklerde NOx seviyelerinin daha yüksek olması nedeniyle kontrol grubunun serum NOx seviyelerine yakın sonuçlar elde edilmiş olabilir.

Kronik hepatit B grubu hastalarının serum NOx seviyeleri ile kontrol grubunun serum NOx seviyeleri arasında anlamlı bir fark yoktu. İki grup arasındaki diğer farklılıklar (HAI, boy, BMI, hemoglobin, INR, GGT ve AKŞ) ise serum NOx seviyeleri üzerine etkili olabilecek parametreler değildi. Ancak, iki grup arasındaki cinsiyet dağılım farkı nedeniyle bu konuda yorum yapmak güçleşmektedir. Kronik hepatit B grubunda sadece 3 kadın hasta bulunduğundan, kadın hastalar arasında karşılaştırma yapılamadı. Ancak, her bir grubun erkek hastaları karşılaştırıldığında, hem kronik hepatit B hem de kronik hepatit C grubunu oluşturan erkek hastaların serum NOx seviyelerinin kontrol grubunun erkek hastalarının serum NOx seviyelerinden anlamlı derecede daha düşük seviyelere sahip oldukları görülmektedir. Muhtemelen bu sebeptendir ki, hastalar cinsiyet ayrımı yapılmaksızın değerlendirildiğinde kronik hepatit grubu ile kontrol grubunun serum NOx seviyeleri arasındaki fark anlamsız olmaktadır.

Zira kronik hepatit B grubunu daha çok erkek hastalar oluşturmaktadır. Bununla beraber, kronik hepatit B grubu ile kronik hepatit C grubu arasında erkek hastaların serum NOx seviyeleri açısından anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Kronik hepatit C grubundaki hastaların serum NOx seviyeleri hiçbir biyokimyasal veya hematolojik parametre ile paralellik göstermemektedir. Sadece, vücut kitle indeksi ile pozitif yönde, serum ALT ve AST seviyeleri ile ise negatif yönde zayıf dereceli bir korelasyon bulunmaktaydı. Kontrol vakalarına kıyasla, kronik hepatit C hastalarında serum NOx seviyeleri anlamlı derecede yüksekti. İki grup arasında, serum NOx seviyelerini etkileyebilecek parametrelerden en önemlisi serum ALT ve AST seviyesiydi. İlginç olan, serum AST ve ALT seviyeleriyle serum NOx seviyeleri arasında, kontrol grubunda pozitif bir korelasyon bulunurken kronik hepatit C'li hastalarda zayıf derecede negatif bir korelasyon bulunmasıydı.

Yukarda yapılan açıklamalardan da anlaşılacağı üzere yaptığımız bu çalışmanın bulguları literatürde yer alan bazı çalışmalarla paralel bazı çalışmalar ile ise zıt özellikler göstermektedir. Ancak çalışma grubunu oluşturan kronik viral hepatitli hastalar ve sağlıklı kontrol grubu vakalarının hem kendi içlerinde hem de birbirleri arasında, özellikle serum NOx seviyelerini etkileyebilecek parametreler olan yaş, cinsiyet, boy ve vücut ağırlığı açısından farklılıklar gösteriyor olması önemli bir problem olarak karşımıza çıkmakta ve yorum yapmayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenle konu ile ilgili olarak daha geniş ve homojen vaka serilerine ihtiyaç vardır. Ayrıca kronik viral hepatitli hastaların anti-viral tedavilerinden sonra yapılacak ikinci serum NOx ölçümlerinin tedavi öncesi değerlerle karşılaştırılması ve gerek biyokimyasal ve histolojik gerekse de virolojik yanıt ile ilişkisinin değerlendirilmesi konuya yeni ışıklar tutacaktır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Serum nitrit ve nitrat seviyeleri bir çok değişik faktörden etkilenmektedir.
2. Hepatit C virüsü daha şiddetli bir karaciğer inflamasyonuna sebep olmaktadır.
3. Kronik hepatit C’de serum transaminazları ile histolojik aktivite indeksi arasında paralellik yoktur.
4. Kronik hepatit B’de serum transaminazları ile histolojik aktivite indeksi arasında zayıf bir pozitif korelasyon mevcuttur.
5. Kronik hepatitin şiddeti ile serum NOx seviyeleri arasında paralellik yoktur.
6. Serum NOx seviyeleri ile serum ALT seviyeleri arasında iyi derecede pozitif korelasyon bulunmaktadır.
7. Serum NOx seviyeleri ile kan basıncı, serum albumin ve AST seviyesi arasında zayıf bir pozitif korelasyon vardır.
8. Serum NOx seviyeleri ile eritrosit sedimantasyon hızı ve nabız sayısı arasında zayıf bir negatif korelasyon bulunmaktadır.
9. Yaş, vücut kitle indeksi, açlık kan şekeri ve beyaz küre sayısı ise serum NOx seviyeleri üzerine etkisiz gözükmemektedir.
10. Sağlıklı bireylerde serum NOx seviyeleri, cinsiyete göre anlamlı derecede farklılık göstermekte ve kadınlarda daha düşük seviyelerde kalmaktadır.
11. Hem kronik hepatit B hem de kronik hepatit C hastalarında cinsiyete göre serum NOx seviyeleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.
12. Kronik hepatit B’li hastaların serum NOx seviyeleri kontrol vakalarından farklı gözükmemekle beraber sadece erkek hastalar ele alındığında anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir.
13. Kronik hepatit C’li hastaların serum NOx seviyeleri kronik hepatit B’li hastaların serum NOx seviyelerinden farklı değildir.
14. Kronik hepatit C’li hastaların serum NOx seviyeleri sağlıklı bireyleri serum NOx seviyelerinden anlamlı derecede daha düşüktür.

15. Bu çalışmada, hasta ve kontrol gruplarını oluşturan vakaların yaş, cinsiyet, boy ve kilo dağılımları açısından farklılıklar göstermesi nedeniyle bazı konularda yorum yapmak güç olmaktadır.
16. Serum NOx seviyelerinin çok fazla sayıda faktörden etkileniyor olması nedeniyle bu konuda düzenlenecek çalışmaların hasta ve kontrol grupları oluşturulurken grupları homojen olmasına azami dikkat sarf edilmelidir.
17. Kronik viral hepatit hastalarının serum NOx seviyelerinin antiviral tedavilerden etkilenip etkilenmediğinin ve alınacak biyokimyasal ya da virolojik yanıt/yanıtsızlığın bu seviyeler üzerindeki etkisinin araştırılması ilginç olacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. **Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA.** Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981; 218(3): 739-749.
2. **Maher JJ.** Macrophage-Induced Inhibition of Nitric Oxide Production in Primary Rat Hepatocyte Cultures Via Prostaglandin E₂ Release. *Hepatology*, 1998; 28 (5): 1300-1308.
3. **Kawasaki T, Moriyasu F, Kimura T, et al.** Hepatic function and portal haemodynamics in patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*, 1990; 85: 1160-1166.
4. **Pannen BHJ, Bauer M.** Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats. *Life Sci*, 1998; 62 (22): 2025-2033.
5. **John W. Coleman** The physiological role and pharmacological potential of nitric oxide in neutrophil activation. *International Immunopharmacology*, 2001; 1 (8): 1501-1512.
6. **Joan Bloch, Changbin Qiu, Aaron Erdely and Chris Baylis.** Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends in Biochemical Sciences*, 2002; 27 (1): Pages 33-39.
7. **Kern H, Wittich R, Rohr U, Kox WJ, Spies CD.** Increased Endothelial Injury in Septic Patients With Coronary Artery Disease. *Chest*, 2001; 119: 874-883.
8. **Soszynski D, Krajewska M.** Time-course of changes in plasma nitric oxide following lipopolysaccharide and turpentine injection in rats. *Journal of Thermal Biology*, 2002; 27 (5): 387-391.
9. **Goodwin DC, Landino LM, Marnett LJ.** Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J*, 2001; 13: 1121-1136.
10. **Koti RS, Seifalian AM, McBride AG, Yang W, Davidson BR.** The relationship of hepatic tissue oxygenation with nitric oxide metabolism in ischemic preconditioning of the liver. *FASEB J*. 2002; 10: 1096-1104.
11. **Vural P, Çevik A, Çurgunlu A, Canbaz M.** Effects of diabetes mellitus and acute hypertension on plasma nitric oxide and endothelin concentrations in rats. *Clinica Chimica Acta*, 2002; 320 (1-2): 43-47.

12. **Aydos TR, Güç MO.** Yaşamı hem sürdüren hem de sonlandıran bir madde: nitrik oksit. *Güncel Gastroenteroloji*, 1997; 1(4): 494-499.
13. **Jungersten L, Edlund A, Petersson AS, Wennmalm A.** Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analyses of kinetics and confounding factors. *Clin Physiol* 1996; 16: 369-379.
14. **Westfelt UN, Benthin G, Lundin S, Stenqvist O, Wennmalm A.** Conversion of inhaled nitric oxide to nitrate in man. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 1621-1624.
15. **Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH.** Nitric oxide – a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 1994; 120: 227-237.
16. **Anggard E.** Nitric oxide – mediator, murderer, and medicine. *Lancet*, 1994; 343: 1199-1206.
17. **Griffith OW.** Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999; 27: 922-935.
18. **Farrell AJ, Blake DR.** Nitric oxide. *Ann Rheum Dis*, 1996; 55: 7-20.
19. **Wang JH, Redmond HP, Wu QD, Bouchier-Hayes D.** Nitric oxide mediates hepatocyte injury. *Am. J. Physiol*, 1998; 275: G1117–G1126.
20. **Hunt NC, Goldin RD.** Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease. *J Hepatol*, 1992; 14: 146-150.
21. **Farghali H, Canova N, Gaier N, Dagmar L, Kmonickova E, Sterstikova P, Masek K.** Inhibition of endotoxemia-induced nitric oxide synthase expression by cyclosporin A enhances hepatocyte injury in rats: amelioration by NO donors. *International Immunopharmacology*, 2002; 2(1): 117-127.
22. **Muscara', Marcelo N., and John L. Wallace.** Nitric Oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am. J. Physiol*, 1999; 276 (Gastrointest. Liver Physiol. 39): G1313–G1316.
23. **Knowles RG, Moncada S.** Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*, 1994; 298: 249-258.
24. **Fischer H, Becker JC, Boknik P, Huber V, Lüss H, Neumann J, Schmitz W, Domschke W, Stachura J, Konturek JW.** Expression of constitutive nitric oxide synthase in rat and human gastrointestinal tract. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999; 1450: 414-422.
25. **Forstermann U, Boissel JP, Klemert H.** Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*, 1998; 12: 773–790.
26. **Schroeder RA, Gu JS, Kuo PC.** Interleukin 1–Stimulated Production of Nitric Oxide In Rat Hepatocytes Is Mediated Through Endogenous Synthesis of Interferon Gamma. *Hepatology*, 1998; 27 (3): 711-719.

27. **Sass G, Koerber K, Bang R, Guehring H, Tiegs G.** Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. *J Clin Invest*, 2001; 107: 439-447.
28. **Majano PL, Garcia-Monzon C, Garcia-Trevijano ER, Corrales FJ, Camara J, Ortiz P, Mato JM, Avila MA, Moreno-Otero R.** S-Adenosylmethionine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in rat liver and isolated hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 2001; 35 (6): 692-699.
29. **Coper CJ, Landzberg MJ, Anderson TJ, et al.** Role of nitric oxide in the local regulation of pulmonaryvascular resistance in humans. *Circulation*, 1996; 93: 266-271.
30. **Kawanaka H, Jones MK, Szabo IL, Baatar D, Pai R, Tsugawa K, Sugimachi K, Sarfeh IJ, Tarnawski AS.** Activation of eNOS in Rat Portal Hypertensive Gastric Mucosa Is Mediated by TNF- α Via the PI 3-Kinase-Akt Signaling Pathway. *Hepatology*, 2002; 35: 393-402.
31. **Nathan C, Xie QW.** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 1994; 269: 13725-13728.
32. **MacMicking J, Xie QW, Nathan C.** Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*, 1997; 15: 323-350.
33. **Jungersten L, Edlund A, Hafstrom Lo, Karlsson L, Petesson AS, Wennmalm A.** Plasma nitrate as an index of immune system activation in animals an man. *J Clin Lab Immunol*, 1993; 40: 1-4.
34. **Saleh D, Barnes PJ, Giaid A.** Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155: 1763-1769.
35. **Dawson VL, Dawson TM.** Nitric oxide in neuronal degeneration. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1996; 211: 33-40.
36. **Shimaoka M, Iida T, Ohara A, et al.** NOC, a nitric-oxide-releasing compound, induces dose dependent apoptosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995; 209: 519-526.
37. **Blanco FJ, Ochs RL, Schwarz H, Lotz M.** Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol*, 1995; 146: 75-85.
38. **Miralles C, Busquets X, Santos C, Togores B, Hussain S, Rahman I, MacNee W, Agusti AGN.** Regulation of iNOS expression and glutathione levels in rat liver by oxygen tension. *FEBS Letters*, 2000; 476: 253-257.
39. **Armstrong R.** Nitric oxide metabolites, nitrates and nitrites in the cerebrospinal fluid in children with west syndrome, *Epilepsy Research*, 2001; 46 (1): 3-13.
40. **Galle J, Wanner C.** Impact of nitric oxide on renal hemodynamics and glomerular function: modulation by atherogenic lipoproteins? *Kidney Blood Press Res*, 1996; 19: 2-15.

41. **Rosselli M, Imthurn B, Macas E, Keller PJ, Dubey RK.** Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol mediated NO release. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; 202: 1543-1552.
42. **Rhodes P, Leone AM, Francic PL, Struthers AD, Moncada S, Rhodes PM.** The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995; 209: 590-6.
43. **Castillo L, Beaumier L, Ajami AM, Young VR.** Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N]-arginine-to-[15N]citrulline labeling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93: 11460-11465.
44. **McKnight GM, Smith LM, Drummond LS, Duncan CW, Golden M, Benjamin N.** Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut*, 1997; 40: 211-214.
45. **Lundberg JON, Carlsson S, Engstrand L, morcos E, Wiklund NP, Weitzberg E.** Urinary nitrite: more than a marker of infection. *Urology*, 1997; 50: 189-191.
46. **Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P.** Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med*, 1995; 1: 804-809.
47. **Duncan C, Dougall H, Johnston P, et al.** Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat Med*, 1995; 1: 546-551.
48. **Dougall HT, Smith L, Duncan C, Benjamin N.** The effect of amoxycillin on salivary nitrite cocentrations: an important mechanism of adverse reactions? *Br J Clin Pharmacol*, 1995; 39: 460-462.
49. **Weller R, Pattulo S, Smith L, Golden M, Ormerod A, Benjamin N.** Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol*, 1996; 107: 327-331.
50. **Vosatka RJ, Hassoun PM, Harvey-Wilkes KB.** Dietary L-arginine prevents fetal growth restriction in rats. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178: 242-246.
51. **Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, et al.** Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res*, 1993; 73: 1121-1127.
52. **Valvini EM, Young JD.** Serum nitrogen oxides during nitric oxide inhalation. *Br J Anaesth*, 1995; 74: 338-339.
53. **Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J.** Biochemistry of nitric oxide and its redox activated forms. *Science*, 1992; 258: 1898-1902.
54. **Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C.** Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: Role of nitric oxide. *Hepatology*, 1997; 25 (2): 361-367.

55. **Cottart CH, Do L, Blanc MC, Vaubourdolle M, Ve Descamps G, Durand D, Galen FX, Clot JP.** Hepatoprotective Effect of Endogenous Nitric Oxide During Ischemia-Reperfusion in the Rat. *Hepatology*, 1999; 29 (3): 809-813.
56. **Shu Z, Jung M, Beger HG, Marzinzig M, Han F, Butzer U, Bruckner UB, Nussler AK.** pH-dependent changes of nitric oxide, peroxynitrite, and reactive oxygen species in hepatocellular damage. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: G1118-G1126.
57. **Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991; 43: 109-142.
58. **Busse R, Fleming I.** Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation.
59. **Rees DC, Cervi P, Grimwade D, et al.** The metabolites of nitric oxide in sickle-cell disease. *Br J Haematol*, 1995; 91:834-837.
60. **Buttler AR, Rhodes P.** Chemistry analyses, and biological roles of S-nitrosotriols. *Anal Biochem*, 1997; 249: 1-9.
61. **Jia R, Bonaventura J, Stamler JS.** S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature*, 1996; 380: 221-226.
62. **Stamler JS, Jia L, Eu JP, et al.** Blood flow regulation by S-nitrosohaemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science*, 1997; 276: 2034-2037.
63. **Lewis RS, Tamir S, Tannenbaum SR, Deen WM.** Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro. *J Biol Chem*, 1995; 270: 29350-29355.
64. **Franchini A, Conte A, Ottaviano E.** Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. *Adv Neuroimmunol*, 1995; 5: 463-478.
65. **Miller RA, Britigan BE.** The formation and biologic significance of phagocyte-derived oxidants. *J Investig Med*, 1995; 43: 39-49.
66. **Zingarelli B, Day BJ, Crapo JD, Salzman AL, Szabo C.** The potential role of peroxynitrite in the vascular contractile and cellular energetic failure in endotoxic shock. *Br J Pharmacol*, 1997; 120: 259-267.
67. **Beckman JS, Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*, 1996; 271: C1424-C1437.
68. **van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE.** Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalysed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem*, 1997; 272: 7617-7625.

69. **Ishida A, Sasaguri T, Kosaka C, Nojima H, Ogata J.** Induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Sdi1/Cip1/Waf1) by nitric oxide-generating vasodilator in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 10050-10057.
70. **Clemens MG.** Nitric Oxide in Liver Injury *Hepatology*, 1999; 30 (1): 1-5.
71. **Duclos-Vallée JC, Capel F, Mabit H, Petit MA.** Protein kinase and NO-stimulated ADP-ribosyltransferase activities associated with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isolated from human liver. *Hepatology Research*, 2002; 22 (1): 65-73.
72. **Nishikawa M, Sato EF, Kuroki T, Utsumi K, Inoue M.** Macrophage-Derived Nitric Oxide Induces Apoptosis of Rat Hepatoma Cells In Vivo. *Hepatology*, 1998; 28 (6): 1474-1480.
73. **Sergent O, Griffon B, Morel I, Chevanne M, Dubos MP, Cillard P, Cillard J.** Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. *Hepatology*, 1997; 25 (1): 122-127.
74. **Jones BA, Gores GJ.** Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am. J. Physiol*, 1997; 273: G1174-G1188.
75. **Kim PKM, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR.** The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *International Immunopharmacology*, 2001; 1 (8): 1421-1441.
76. **Takayama F, Egashira T, Yamanaka Y.** ESR measurement of endogenous nitric oxide in liver and blood of mice subjected to hepatic ischemia-reperfusion. *Pathophysiology*, 1999; 6: 45-51.
77. **Albornoz L, Motta A, Alvarez D, Estevez A, Bandi JC, McCormack L, Matera J, Bonofiglio C, Ciardullo M, Santibanes E, Gimeno M, Gadano A.** Nitric oxide synthase activity in the splanchnic vasculature of patients with cirrhosis: relationship with hemodynamic disturbances. *Journal of Hepatology*, 2001; 35 (4): 452-456.
78. **Borgs M, Bollen M, Keppens S, Yap SH, Stalmans W, Vanstapel F.** Modulation of basal hepatic glycogenolysis by nitric oxide. *Hepatology*, 1996; 23 (6): 1564-1571.
79. **Shamimunisa BM, Howard KM, Olson MS.** Platelet-activating factor augments lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation by rat Kupffer cells. *Hepatology*, 1996; 23 (6): 1622-1630.
80. **Hoetzel A, Vagts DA, Loop T, Humar M, Bauer M, et al.** Effect of nitric oxide on shock-induced hepatic heme oxygenase-1 expression in the rat. *Hepatology*, 2001; 33 (4): 925-937.
81. **Irshad M, Chaudhuri PS, Joshi YK.** Superoxide dismutase and total anti-oxidant levels in various forms of liver diseases. *Hepatology Research*, 2002; 23 (3): 178-184.
82. **Nishida J, Baker GL, McCuskey RS.** Protective role of nitric oxide in the TNF α -mediated hepatic microvascular inflammatory response following acute ethanol ingestion. *Hepatology Research*, 2000; 16: 98-111.

83. **Giuseppe P.** Introduction—serial review: reactive oxygen and nitrogen in inflammation *Free Radical Biology and Medicine*, 2002; 33 (3): 301-302.
84. **Moazzam FN, Brems JJ, Yong SL, Filkins JP, Fisher SG, Holt DR, Gamelli RL, Ding JW.** Endotoxin potentiates hepatocyte apoptosis in cholestasis. *Journal of the American College of Surgeons*, 2002; 194 (6): 731-739.
85. **Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA.** Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science*, 2000; 287: 1253-1258.
86. **Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, Marley R, Fernando B, Goodier D, Moore K.** Increased Sensitivity to Endotoxemia in the Bile Duct–Ligated Cirrhotic Rat. *Hepatology* 1999; 30 (5): 1198-1205.
87. **Shamimunisa BM, Olson MS.** Effects of calcium channel antagonists on LPS-induced hepatic iNOS expression. *Am. J. Physiol*, 1999; 277: G351–G360.
88. **Inoue T, Kwon AH, Oda M, Kaibori M, Kamiyama Y, Nishizawa M, Ito S, Okumura T.** Hypoxia and Heat Inhibit Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression by Different Mechanisms in Rat Hepatocytes. *Hepatology*, 2000; 32 (5): 1037-1044.
89. **Eckhardt W, Bellmann K, Kolb H.** Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in b cells by environmental factors: heavy metals. *Biochem. J*, 1999; 338: 695–700.
90. **Orsi A, Beltran B, Clementi E, Hallen K, Feelisch M, Moncada S.** Continuous exposure to high concentrations of nitric oxide leads to persistent inhibition of oxygen consumption by J774 cells as well as extraction of oxygen by the extracellular medium. *Biochem. J*, 2000; 346: 407–412.
91. **McCormick CC, Li WP, Calero M.** Oxygen tension limits nitric oxide synthesis by activated macrophages. *Biochem. J*, 2000; 350: 709–716.
92. **Hoebe KHN, Witkamp RF, Fink-Gremmels J, et al.** Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001; 80: G720–G728.
93. **Hadoke PWF, Hayes PC.** In vitro evidence for vascular hyporesponsiveness in clinical and experimental cirrhosis. *Pharmacol Ther*, 1997; 75 (1): 51-68.
94. **Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Smith R, Hamilton G, Moore K.** N-Acetylcysteine Prevents Development of the Hyperdynamic Circulation in the Portal Hypertensive Rat. *Hepatology*, 1998; 28 (3): 689-694.
95. **Jiménez W, Ros J, Morales-Ruiz M, Nasava M, Sole M, Colmenero J, Sort P, Rivera F, Arroyo V, Rodes H.** Nitric Oxide Production and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Peritoneal Macrophages of Cirrhotic Patients. *Hepatology*, 1999; 30 (3): 670-676.

96. **Takemura S, Minamiyama Y, Kawada N, Inoue M, Kubo S, Hirohashi K, Kinoshita H.** Extracellular nucleotides modulate the portal circulation with generation of nitric oxide. *Hepatology Research*, 1998; 13: 29-36.
97. **La Villa G, Barletta G, Pietro P, Pantaleo P, Del Bene R, Vizzutti F, Vecchiarino S et al.** Hemodynamic, renal, and endocrine effects of acute inhibition of nitric oxide synthase in compensated cirrhosis. *Hepatology*, 2001; 34 (1): 19-27.
98. **Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, Frangos JA, Mennone, A, Groszmann RJ, Sessa WC.** Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest*, 1997; 100: 2923-2930.
99. **Bosch-Marce' M, Morales-Ruiz M, Jiménez W, Bordas N, Solé M, Ros J, Deulofeu R, Arroyo V, Rivera F, Rodés J.** Increased Renal Expression of Nitric Oxide Synthase Type III in Cirrhotic Rats With Ascites. *Hepatology*, 1998; 27 (5): 1191-1199.
100. **Battista S, Bar F, Mengozzi G, Pollet C, Torchio M, Cavalli G, Rosina F, David E, Cutrin JC, Cavalieri B, et al.** Evidence of an increased nitric oxide production in primary biliary cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology*, 2001; 96 (3): 869-875.
101. **Sanz-Cameno P, Garcia-Monzon C, Majano PL, Garcia-Buey L, Borque MJ, Garcia-Sanchez A, Moreno-Otero R.** Inducible nitric oxide synthase (iNOS) liver expression and nitrotyrosine (NTY) accumulation in primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune hepatitis (AIH). *Journal of Hepatology*, 2001; 34 (1): 91-92.
102. **Sakai T, Shiraki K, Sawai T, Ohmori S, Takase K, Nakano T.** Increased plasma nitrite and nitrite concentrations in patients with hepatitis C virus infection. *J Hepatol*, 2001; 34: 485-486.
103. **Sogni P, Moreau R, Gadano A, Lebrec D.** The role of nitric oxide in the hyperdynamic circulatory syndrome associated with portal hypertension. *J Hepatol*, 1995; 23: 218-224.
104. **Criado M, Flores O, Ortiz MC, Hidalgo F, Rodriguez-Lopez AM, Eleno N, Atucha NM, Sanchez-Rodriguez A, Arevalo M, Garcia-Estan J, Lopez-Novoa JM.** Elevated glomerular and blood mononuclear lymphocyte nitric oxide production in rats with chronic bile duct ligation: Role of inducible nitric oxide synthase activation. *Hepatology*, 1997; 26 (2): 268-276.
105. **Kim YI, Hwang YJ, Song KE, Yun YK, Lee JW, Chun BY.** Hepatocyte protection by a protease inhibitor against ischemia/reperfusion injury of human liver. *Journal of the American College of Surgeons*, 2002; 195 (1): 41-50.
106. **Köken T, İnal M.** The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clinica Chimica Acta*, 1999; 288 (1-2): 55-62.
107. **Wheeler MD, Katuna M, Smutney OM, Froh M, Dikalova A, Mason RP, Samulski RJ, Thurman RG.** Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hum Gene Ther*; 2001;12:2167- 2177.
108. **Pannen BHJ, Al-Adili F, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK.** Role of Endothelins and Nitric Oxide in Hepatic Reperfusion Injury in the Rat. *Hepatology*, 1998; 27 (3): 755-764.

109. **Özakıyol AH, Tunçel N, Sarıçam T, Uzuner K, Ak D, Gürer F.** Effect of nitric oxide inhibition on rat liver ischemia reperfusion injury. *Pathophysiology*, 2000; 7: 183-8.
110. **Stolz DB, Zamora R, Vodovotz Y, Loughran PA, Billiar TR, Kim YM, Simmons RL, Watkins SC.** Peroxisomal localization of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Hepatology*, 2002; 36 (1): 81-93.
111. **Shah V, Garcia-Cardena G, Sessa WC, Groszmann RJ.** The Hepatic Circulation in Health and Disease: Report of a Single-Topic Symposium. *Hepatology*, 1998; 27 (1): 279-288.
112. **Dhar DK, Yamanoi A, Haruyuki O, Nakashima Y, Osama EA, Kubota H, Kohno H, Nagasue N.** Modulation of Endothelin and Nitric Oxide: A Rational Approach to Improve Canine Hepatic Microcirculation. *Hepatology*, 1998; 28 (3): 782-788.
113. **Griffon B, Cillard J, Chevanne M, Morel I, Cillard P, Sergent O.** Endothelial Dysfunction and Decreased Production of Nitric Oxide in the Intrahepatic Microcirculation of Cirrhotic Rats. *Hepatology*, 1998; 28 (4): 926-931.
114. **Boyer TD.** Pharmacologic treatment of portal hypertension: Past, present, and future. *Hepatology*, 2001; 34:834-839.
115. **Alexander B.** The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition*, 1998; 14 (4): 376-90.
116. **Ellis G, Adatia I, Yazdanpanah M, Makela SK.** Nitrite and nitrate analyses: A clinical biochemistry perspective. *Clinical Biochemistry*, 1998; 31 (4): 195-220.
117. **Deite EA, Sorstein A, Houghton J, Lu Q, Xu D.** Inducible Nitric Oxide Synthase Knockout Mice Are Resistant to Diet-Induced Loss of Gut Barrier Function and Intestinal Injury. *J Gastrointest Sur*, 2002; 6(4): 599-605.
118. **Higgins R.** Acute and Chronic Inflammation. In: *Cotran: Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6th.Ed., New York: W. B. Saunders Company, 1999; 75-76.
119. **Walker R.** The metabolism of dietary nitrites and nitrates. *Biochem Soc Trans*, 1996; 24: 780-785.
120. **Chow CW, Kapas A, Romanek R, Grinstein S.** NO₃⁻-induced pH changes in mammalian cells. Evidence for an NO₃⁻-H⁺ cotransporter. *J Gen Physiol*, 1997; 110: 185-200.
121. **Santillana MI, Ruiz E, Nieto MT, de Alba M.** High performance ion chromatography determination of nitrite ve nitrate in foodstuffs. *J Liqu Chromatogr*, 1993; 16: 1561-1571.
122. **Petersen A; Stoltze S.** Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. (abstract) *Food Addit Contam*, 1999; 16 (7): 291-299.
123. **Hunt J, Turner MK.** A survey of nitrite concentrations in retail fresh vegetables. *Food Addit Contam*, 1994; 11: 327-332.

124. **van Vliet JJ, Vaessen HA, van den Burg G, Schothorst RC.** Twenty-four-hour duplicate diet study 1994; nitrate and nitrite: method development and intake per person per day. *Cancer Lett*, 1997; 114: 305-307.
125. **Markowska A, Furmanek W, Gackowska L, Siwek B.** The evaluation of nitrates and nitrites in daily food intake of adults. (abstract) *Rocz Panstw Zakl Hig*, 1999; 50 (3): 299-306.
126. **Hecht SS.** Approaches to cancer prevention based on an understanding of N nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1997; 216: 181-191.
127. **Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner D, et al.** Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78: 7764-7768.
128. **Bednar C, Kies C.** Nitrate and vitamin C from fruits and vegetables: impact of intake variations on nitrate and nitrite excretions of humans. *Plant Foods Hum Nutr*, 1994; 45: 71-80.
129. **Tanaka S, Yashiro A, Nakashima Y, Nanri H, Ikeda M, Kuroiwa A.** Plasma nitrite/nitrate level is inversely correlated with plasma low-density lipoprotein cholesterol level. *Clin Cardiol*, 1997; 20: 361-365.
130. **Tsukahara H, Hiraoka M, Hor, C, Miyanomae T, Kikuchi K, Sudo M.** Age-related changes of urinary nitrite/nitrate excretion in normal children. *Nephron*, 1997; 76: 307-309.
131. **Viinikka L.** Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. (abstract) *Scand J Clin Lab Invest*, 1996; 56: 577-581.
132. **Wang J, Brown MA, Tam SH, Chan MC, Whitworth JA.** Effects of diet on measurement of nitric oxide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1997; 24: 418-420.
133. **Soszynski D.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase during high dietary salt intake. *American Journal of Hypertension*, 2002; 15 (3): 230-235.
134. **Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL.** Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*, 1995; 41: 892-896.
135. **Moshage H.** Nitric oxide determinations: much ado about NO[•]-thing. *Clin Chem*, 1997; 43: 553-536.
136. **Tsukahara H, Miyanomae T, Sudo M.** Urinary nitrite/nitrate levels in children with bronchial asthma. *Eur J Pediatr*, 1997; 156(8): 667.
137. **Trachtman H, Gauthier B, Frank R, Futterweit S, Goldstein A, Tomczak J.** Increased urinary nitrite excretion in children with minimal change nephrotic syndrome. *J Pediatr*, 1996; 128: 173-176.

138. **Huang A, Palmer LS, Hom D, Valderrama E, Trachtman H.** The role of nitric oxide in obstructive nephropathy. *J Urol*, 2000; 163 (4):1276-1281.
139. **Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB.** The role of nitric oxide in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 1994; 171: 944-946.
140. **Lyall F, Young A, Greer IA.** Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in pre-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 1995; 173: 714-718.
141. **Moncada S, Higgs A, Furchgott R.** International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev*, 1997; 49: 137-142.
142. **Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB.** Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol*, 1996; 268: 142-151.
143. **Verdon CP, Burton BA, Prior RL.** Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces ne while avoiding interference by NADP⁺ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem*, 1995; 224: 502-508.
144. **Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper L, Wishnok JS, Tannenbaum SR.** Analyses of nitrate, nitrite and ¹⁵N nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982; 126: 131-138.
145. **Guevara I, Iwanejko J, Dembinska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Anna P, Gobek I, Bartus S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A.** Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clinica Chimica Acta*, 1998; 274 (2): 177-188.
146. **Gilliam MB, Sherman MP, Griscavage JM, Ignarro LJ.** A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by Aspergillus nitrate reductase. *Anal Biochem*, 1993; 212: 359-265.
147. **Valgimigli L, Pedulli GF, Paolini M.** Measurement of oxidative stress by EPR radical-probe technique. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001; 31 (6): 708-716.
148. **Bories PN, Bories C.** Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem*, 1995; 41: 904-907.
149. **Miles AM, Wink DA, Cook JC, Grinsham MB.** Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods Enzymol*, 1996; 268: 105-120.
150. **Park JK, Kostka P.** Fluorometric detection of biological S-nitrosothiols. *Anal Biochem*, 1997; 249: 61-66.
151. **Jie NQ, Si ZK, Yang JH, et al.** Fluorometric determination of traces of nitrite with rhodamine 6G. *Microchem J*, 1997; 55: 351-356.
152. **Katrlík J, Zalesakova P.** Nitric oxide determination by amperometric carbon fiber microelectrode. *Bioelectrochemistry*, 2002; 56 (1-2): 73-76.

153. **Vanifatova NG, Isakova NV, Kolycheva NV, et al.** Ion selective field effect transistors with plasticised membranes: nitrate ion sensor. *J Anal Chem*, 1997; 52: 52-55.
154. **Fontijn A, Sabadel AJ, Ronco RJ.** Homogeneous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. *Anal Chem*, 1970; 42: 575-279.
155. **Silkoff PE, McClean PA, Slutsky AS, et al.** Markes flow-dependence of exhaled nitric oxide using a new technique to exclude nasal nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 155: 260-267.
156. **Kharitonov SA, Yates D, Barnes PJ.** Increased nitric oxide in exhaled air of normal human subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J*, 1995; 8: 295-297.
157. **Alving K, Weitzberg E, Lundberg JM.** Increased amount of nitric oxide in exhaled air of asthmatics. *Eur Respir J*, 1993; 6: 1368-1370.
158. **Sampsa Vanhatalo and Raili Riikonen.** Mixed exhaled nitric oxide and plasma nitrites and nitrates in newborn infants. *Life Sciences*, 2001; 68 (25): 2789-2797.
159. **Cox RD.** Determination of nitrate and nitrite at parts per billion level by chemiluminescence. *Anal Chem* 1980; 5: 332-335.
160. **Yang F, Troncy E, Franceour M, et al.** Effects of reducing reagents and temperature on conversion of nitrite and nitrate to nitric oxide and detection of NO by chemiluminescence. *Clin Chem*, 1997; 43: 657-662.
161. **Landers JP.** Clinical capillary electrophoresis. *Clin Chem*, 1995; 41: 495-509.
162. **Cruz L, Moroz LL, Gillette R, Sweeder JV.** Nitrite and nitrate levels in individual molluscan neurons: single-cell capillary electrophoresis analysis. *J Neurochem*, 1997; 69: 110-115.
163. **Johnson AA, Burleson DG.** Nitrate analysis in biological fluids by gas chromatography-nitrogen-phosphorus detection. *Anal Biochem*, 1996; 236: 331-337.
164. **Hui Li, Cynthia J. Meininger and Guoyao Wu.** Rapid determination of nitrite by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000; 746 (2): 199-207.
165. **Dembny KD, Roza AM, Johnson C, Adams MB, Pieper GM.** Heparin interferes with the determination of plasma nitric oxide by inhibition of enzymatic conversion of nitrate to nitrite by nitrate reductase. *Clinica Chimica Acta*, 1998; 275 (1): 107-114.
166. **Tsikas D, Gutzky FM, Rossa S, et al.** Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay—solutions by gas chromatography-mass spectrometry. (abstract) *Anal Biochem*, 1997; 244: 208-220.

167. **Tsikas D, Boger RH, Bode-Boger SM, Gutzki FM, Frolich JC.** Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their ¹⁵N-labeled analogs. *J Chromatogr B*, 1994; 661: 185-191.
168. **Heller J, Kristeleit H, Brensing KA, Woitas RP, Spengler U, Sauerbruch T.** Nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis of the liver: influence of kidney function and fasting state. *Scand J Gastroenterol*, 1999; 3: 297-302.
169. **Jilma B, Kastner J, Mencik C, et al.** Sex differences in concentrations of exhaled nitric oxide and plasma nitrate. *Life Sci*, 1996; 58: 469-476.
170. **Giovannoni G, Land JM, Keir G, Thompson B, Heales SJ.** Adaptation of the Griess reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. *Ann Clin Biochem*, 1997; 34: 193-198.
171. **Kawano H, Motoyama T, Kugiyama K, et al.** Gender difference in improvement of endothelium dependent vasodilation after estrogen supplementation. *J Am Coll Cardiol*, 1997; 30: 914-919.
172. **Cicinelli E, Ignarro LJ, Matteo MG, Galantino P, Schonauer LM, Falco N.** Effects of estrogen replacement therapy on plasma levels of nitric oxide in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol*, 1999; 180:334-339.
173. **Weeks AD, Massmann AG, Monaghan JM, Crowther D, Duffy S, Walker JJ, Figueroa JP.** Decreasing estrogen in nonpregnant women lowers uterine myometrial type I nitric oxide synthase protein expression. *Am J Obstet Gynecol*, 1999; 181:25-30.
174. **Imthurn B, Rosselli M, Jaeger AW, Keller PJ, Dubey RK.** Differential effects of hormone replacement therapy on endogenous nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta estradiol valerate and cyproterone acetate or medroxyprogesterone acetate. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82: 388-394.
175. **Shaarawy M, Nafei S, Abul Nasr A, el Sharkawy S, Younis A.** Circulating nitric oxide levels in galactorrhagic, hyperprolactinemic, amenorrhagic women. *Fertil Steril*, 1997; 68: 454-459.
176. **Watanabe T, Akishita M, Toba K, Kozaki K, Eto M, Sugimoto N, Kiuchi T, Hashimoto M, Shirakawa W, Ouchi Y.** Influence of sex and age on serum nitrite/nitrate concentration in healthy subjects. *Clinica Chimica Acta*, 2000; 301(1-2): 169-179.
177. **Smith SD, Wheeler MA, Weiss RM.** Nitric oxide synthase: an endogenous source of elevated nitrite in infected urine. *Kidney Int*, 1994; 45: 586-591.
178. **Hiraoka M, Hida Y, Hori C, Tsuchida S, Kuroda M, Sudo M.** Rapid dipstick test for diagnosis of urinary tract infection. *Acta Paediatr Jpn*, 1994; 36: 379-382.
179. **Wong HR, Carcillo JA, Burckart G, Shah N, Janosky JE.** Increased serum nitrite and nitrate concentrations in children with the sepsis syndrome. *Crit Care Med*, 1995; 23: 835-842.

180. **Shi Y, Li H-Q, Shen C-K, et al.** Plasma nitric oxide levels of newborn infants with sepsis. *J Pediatr*, 1993; 123: 435-438.
181. **Grover R, Zaccardelli D, Colice G, Guntupalli K, Watson D, Vincent JL.** An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N^G-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. *Critical Care Medicine*, 1999; 27 (5): 913-922.
182. **Guarner C, Soriano G, Tomas A, et al.** Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship to endotoxemia. *Hepatology*, 1992; 18: 1139-1143.
183. **Bories PN, Campillo B, Azaou L, Scherman E.** Long-lasting NO overproduction in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*, 1997; 25: 1328-1333.
184. **Shiomi M, Wakabayashi Y, Sano T, Shinoda Y, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M.** Nitric Oxide Suppression Reversibly Attenuates Mitochondrial Dysfunction and Cholestasis in Endotoxemic Rat Liver. *Hepatology*, 1998; 27 (1): 108-115.
185. **Torre D, Ferrario G, Speranza F, Orani A, Fiori GP, Zeroli C.** Serum concentrations of nitrite in patients with HIV-1 infection. *J Clin Pathol*, 1996; 49: 574-576.
186. **Torre D, Pugliese A, Speranza F.** Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? *The Lancet Infectious Diseases*, Volume 2, Issue 5, 1 May 2002, Pages 273-280.
187. **Chris E. Cooper** Nitric oxide in immunity and inflammation, International Immunopharmacology, Volume 1, Issue 8, August 2001, Pages 1397-1406.
188. **Soszynski D.** Inhibition of nitric oxide synthase delays the development of tolerance to LPS in rats. *Physiology & Behavior*, 2002; 76 (1): 159-169.
189. **Sonia Sethi and Madhu Dikshit.** Modulation of Polymorphonuclear Leukocytes Function by Nitric Oxide. *Thrombosis Research*, 2000; 100 (3): 223-247.
190. **Jiang B, Morimoto S, Yang J, et al.** Parathyroid hormone-related protein upregulates interleukin-1 β -induced nitric oxide synthesis. *Hypertension*, 1997; 30: 922-927.
191. **Kiemer AK, Vollmar AM.** Effects of different natriuretic peptides on nitric oxide synthesis in macrophages. *Endocrinology*, 1997; 138: 4282-4290.
192. **Farrell AJ, Blake DR, Palmer RM, Moncada S.** Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis*, 1992; 51: 1219-1222.
193. **Miyasaka N, Hirata Y.** Nitric oxide and inflammatory arthritides. *Life Sci*, 1997; 61: 2073-2081.
194. **Ueki Y, Miyake S, Tominaga Y, Eguchi K.** Increased nitric oxide levels in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1996; 23: 230-236.

195. **Citterio G, Pellegatta F, Lucca GD, et al.** Plasma nitrate plus nitrite changes during continuous intravenous infusion interleukin 2. *Br J Cancer*, 1996; 74: 1297-1301.
196. **Grisham MB, Jourdain D, Wink DA.** Nitric Oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am. J. Physiol*, 1999; 276: G315-G321.
197. **Lin KF, Chao L, Chao J.** Prolonged reduction of high blood pressure with human nitric oxide synthase gene delivery. *Hypertension*, 1997; 30: 307-313.
198. **Susic D.** Hypertension, aging, and atherosclerosis. The endothelial interface. *Med Clin North Amer*, 1997; 81: 1231-1240.
199. **Kone BC.** Nitric oxide in renal health and disease. *Am J Kidney Dis*, 1997; 30: 311-333.
200. **Mackenzie IMJ, Ekangaki A, Young JD, Garrod CS.** Effect of renal function on serum nitrogen oxide concentrations. *Clin Chem*, 1996; 42: 440-444.
201. **Martensson L, Hegbrant J, Thysell H.** Generation of nitrate during dialysis as a measure of nitric oxide synthesis. *Artif Organs*, 1997; 21: 163-167.
202. **Goonasekera CD, Rees DD, Woolard P, Friend A, Shah V, Dillon MJ.** Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens*, 1997; 15: 901-909.
203. **Ikejima K, Enomoto N, Imuro Y, Ikejima A, Fang D, Xu J, Forman DT, Brenner DA, Thurman RG.** Estrogen increases sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin. *Am J Physiol*, 1998; 274: G669-G676.
204. **Winlaw DS, Smythe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM, Macdonald PS.** Increased nitric oxide production in heart failure. *Lancet*, 1994; 344: 373-374.
205. **Weiss G, Umlauf F, Grunewald K.** Raised nitrate concentrations in chronic heart disease. *Lancet*, 1994; 344: 960-961.
206. **Shimokawa H, Kuroiwa-Matsumoto M, Takeshita A.** Cytokine generation capacities of monocytes are reduced in patients with severe heart failure. *Am Heart J*, 1998; 136: 991-1002.
207. **Yokoyama M, Shijo H, Ota K, et al.** Systemic hemodynamics and serum nitrate levels in patients undergoing endoscopic variceal ligation. *Hepatology*, 1996; 24: 47-52.
208. **Davidge ST, Stranko CP, Roberts JM.** Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 1996; 174: 1008-1013.
209. **A. H. Shaamash, E. D. Elsonosy, M. M. Zakhari, Sh. H. Radwan and H. M. El-Dien.** Placental nitric oxide synthase (NOS) activity and nitric oxide (NO) production in normal pregnancy, pre-eclampsia and eclampsia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2001; 72 (2): 127-133.

210. **Toshio C, Ohi R, Takahashi T, Ogawa H, Hida W.** Nitric Oxide in Hepatopulmonary Syndrome. *Hepatology*, 1998; 27 (5): 1450-1451.
211. **Liu H, Lee S.** Cardiopulmonary dysfunction in cirrhosis. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 1999; 14 (6): 600-608.
212. **Liu L, Zhang M, Luo B, Abrams GA, Fallon MB.** Biliary Cyst Fluid From Common Bile Duct-Ligated Rats Stimulates Endothelial Nitric Oxide Synthase in Pulmonary Artery Endothelial Cells: A Potential Role in Hepatopulmonary Syndrome. *Hepatology*, 2001; 33:722-727.
213. **Devlin J, Palmer RMJ, Gonde CE, et al.** Nitric oxide generation a predictive parameter of acute allograft rejection. *Transplantation* 1994; 58: 592-595.
214. **Yamaguchi Y, Okabe K, Matsumura F, Akizuki E, Matsuda T, Ohshiro H, Liang J, Yamada S, Mori K, Ogawa M.** Peroxynitrite Formation During Rat Hepatic Allograft Rejection. *Hepatology*, 1999; 29 (3): 777-784.
215. **Benjamin N, Vallance P.** Plasma nitrite as a marker of nitric oxide production. *Lancet*, 1994; 344: 960.
216. **Decker KF, Obolenskaya MY.** Cytokines, nitric oxide synthesis and liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol*, 1995; 10(Suppl 1): S12-S7.
217. **Winlaw DS, Schyvens CG, Smythe GA, et al.** Urinary nitrate excretion is a noninvasive indicator of acute cardiac allograft rejection and nitric oxide production in the rat. *Transplantation*, 1994; 58: 1031-1036.
218. **Benvenuti C, Bories PN, Loisanche D.** Increased serum nitrate concentration in cardiac transplant patients. A marker of acute allograft cellular rejection. *Transplantation*, 1996; 61: 745-749.
219. **Lisman T, Leebeek FWG, de Groot PG.** Haemostatic abnormalities in patients with liver disease *Journal of Hepatology*, 2002; 37 (2): 280-287.
220. **Silkoff PE, Martin D, Pak J, Westcott JY, Martin RJ.** Exhaled Nitric Oxide Correlated With Induced Sputum Findings in COPD. *Chest*, 2001; 119: 1049-1055.
221. **Hart M.** Nitric Oxide in Adult Lung Disease *Chest*, 1999; 115: 1407-1417.
222. **Persson MG, Zetterstrom o, Agrenius V, Ihre E, Gustafsson LE.** Single-breath nitric oxide measurements in asthmatic patients and smokers. *Lancet*, 1994; 343: 146-147.
223. **Tsang KW, Leung R, Fung PC, Chan SL, Tipoe GL, Ooi GC, Lam WK.** Exhaled and Sputum Nitric Oxide in Bronchiectasis : Correlation With Clinical Parameters. *Chest*, 2002; 121: 88-94.

224. **Barnes PJ.** Nitric oxide and airway disease. *Ann Med*, 1995; 27: 389-393.
225. **Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M.** Reversible reduction in plasma concentration of nitric oxide induced by cigarette smoking in young adults. *Am J Cardiol*, 1997; 79: 1538-1541.
226. **Robbins RA, Millatmal T, Lassi K, Rennard S, Daughton D.** Smoking cessation is associated with an increase in exhaled nitric oxide. *Chest*, 1997; 112: 313-318.
227. **H. Nakae, S. Endo, K. Inada, Y. Yamada, W. Nasu, S. Taniguchi, H. Ishikura, T. Tanaka, G. Wakabayashi and S. Sato.** Are nitrite/nitrate (NOx) levels elevated by inhalation injury? *Burns*, 2000; 26 (6): 515-519.
228. **Onuoha G, Alpar K, Jones I.** Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide in the acute phase following burns and trauma. *Burns*, 2001; 27 (1): 17-21.
229. **Derici U, Ozkaya O, Arinsoy T, Erbas D, Sindel S, Musa Bali, Necla Buyan, Enver Hasanoglu and Oguz Soylemezoglu** Increased plasma nitrate levels in patients with crush syndrome in the Marmara earthquake. *Clinica Chimica Acta*, 2002; 322 (1-2): 99-103.
230. **Kim YM, Kim TH, Chung HT, Talanian RV, Yin XM, Billiar TR.** Nitric Oxide Prevents Tumor Necrosis Factor –Induced Rat Hepatocyte Apoptosis by the Interruption of Mitochondrial Apoptotic Signaling Through S-Nitrosylation of Caspase-8. *Hepatology*, 2000; 32 (4): 770-778.
231. **Timoshenko AV, Maslakova OV, Werle B, Bezmen VA, Rebeko V, Kayser K.** Presentation of NO-metabolites (nitrate/nitrite) in blood serum and pleural effusions from cancer patients with pleurisy. *Cancer Letters*, 2002; 182: 93–99.
232. **Ralston SH.** Nitric oxide and bone: what a gas. *Br J Rheumatol*, 1997; 36: 831-838.
233. **Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, Kanba S, Asai M.** Elevated plasma nitrate levels in depressive states. *Journal of Affective Disorders*, 2001; 63(1-3): 221-224.
234. **Jung M, Drapier JC, Weidenbach H, Renia L, Oliveira L, Wang A, Beger HG, Nussler AK.** Effects of hepatocellular iron imbalance on nitric oxide and reactive oxygen intermediates production in a model of sepsis. *Journal of Hepatology*, 2000; 33: 381-394.
235. **Miller SL, Jenkin G, Walker DW.** Effect of nitric oxide synthase inhibition on the uterine vasculature of the late-pregnant ewe. *Am J Obstet Gynecol*, 1999; 180: 1138-1145.
236. **Elliott SN, Wallace JL.** Nitric oxide: A regulator of mucosal defense and injury. *Journal of Gastroenterology*, 1998; 33 (6): 792-803.
237. **Konturek P, Brzozowski T, Sliwowski Z, Pajdo R, Stachura J, Hahn EG, Konturek SJ.** Involvement of nitric oxide and prostaglandins in gastroprotection induced by bacterial lipopolysaccharide. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 1998; 33: 691–700.

238. **Mitsui T, Kondo T.** Assessing nitrate metabolism in the intestinal tract by measuring breath nitric oxide and nitrous oxide, and its clinical significance. *Clinica Chimica Acta*, 2002; 319 (1): 57-62.
239. **Gaginella TS, Kachur JF, Tamai H, Keshavarzian.** The active oxygen and nitrogen metabolites as mediators of secretory diarrhea. *Gastroenterology*, 1995; 109: 2019-2028.
240. **Witthoft T, Eckmann L, Kim JM, Kagnoff MF.** Enteroinvasive bacteria directly activate expression of iNOS and NO production in human colon epithelial cells. *Am. J. Physiol*, 1998; 275 (Gastrointest. Liver Physiol. 38): G564-G571.
241. **Melichar B, Karlicek R, Tichy M.** Increased urinary nitrate excretion in inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1994; 32: 3-4.
242. **Oudkerk Pool M, Bouma G, Visse JJ, et al.** Serum nitrat levels in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*, 1995; 30: 784-788.
243. **Rachmileitz D, Eilakim R, Ackerman Z, Karmeli F.** Direct Determination of Colonic Nitric Oxide Level--A Sensitive Marker of Disease Activity in Ulcerative Colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 1998; 93 (3): 409-412.
244. **Rees DC, Satsangi J, Cornelissen PL, Travis SP, White J, Jewel DP.** Are serum concentrations of nitric oxide metabolites useful for predicting the clinical outcome of severe ulcerative colitis? *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1995; 7: 227-230.
245. **Sasajima K, Yoshisa Y, Yamakado S, et al.** Changes in urinary nitrate and nitrite during treatment of ulcerative colitis. *Digestion*, 1996; 57: 170-173.
246. **Lundberg JON, Herulf M, Olesen M, et al.** Increased nitric oxide production in collagenous and lymphocytic colitis. *Eur J Clin Invest*, 1997; 27: 869-871.
247. **Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Acherman Z, Podolsky DK.** Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 1995; 36: 718-723.
248. **Kimura H, Miura S, Shigematsu T, et al.** Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci*, 1997; 42: 1047-1054.
249. **Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO.** Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993; 341: 465-466.
250. **Neilly PJD, Kirk SJ, Gardiner KR, Anderson NH, Rowlands BJ.** Manipulation of the L-arginine nitric oxide pathway in experimental colitis. *Br J Surg*, 1995; 82: 1188-1191.
251. **Schworer H, Bohn M, Waezsada SY, Raddatz D, Ramarodi G.** Successful treatment of megacolon associated with colitis with a nitric oxide synthase inhibitor. *The American Journal of Gastroenterology*, 2001; 96 (7): 2273-2274.

252. **Colon AL, Menchén L, Liasoain I, Leza JC, Menchén P, Gonzalez-Lara V, Moro MA, Lorenzo P.** Inducible nitric oxide synthase activity is expressed not only in inflamed but also in normal colonic mucosa in patients with ulcerative colitis: a potential prognostic marker. *The American Journal of Gastroenterology*, 2000; 95 (5): 1371-1373.
253. **Adjei AA, Yamauchi K, Nakasone Y, Konishi M, Yamamoto S.** Arginine-supplemented diets inhibit endotoxine-induced bacterial translocation in mice. *Nutrition*, 1995; 11: 371-374.
254. **Rabbani GH, Islam S, Chowdhury AK, Mitra AK, Miller MJS, Fuchs G.** Increased nitrite and nitrate concentrations in sera and urine of patients with cholera or shigellosis. *The American Journal of Gastroenterology*, 2001; 96 (2): 467-472.
255. **Farinati F, Della Libera G, Cardin R, et al.** Gastric antioxidant, nitrites, and mucosal lipoperoxidation in chronic gastritis and helicobacter pylori infection. *J Clin Gastroenterol*, 1996; 22: 275-281.
256. **Dougall H, Johnston P, et al.** Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat Med*, 1995; 1: 546-551.
257. **Helmer KS, West SD, Shipley GL, Chang L, Cui Y, Mailman D, Mercer DW.** Gastric Nitric Oxide Synthase Expression During Endotoxemia: Implications in Mucosal Defense in Rats. *Gastroenterology*, 2002; 123: 173-186.
258. **Konturek SK, Konturek PC.** Role of nitric oxide in the digestive system. *Digestion*, 1995; 56: 1-13.
259. **Larsson LT, Shen Z, Ekblad E, Sundler F, Alm P, Andersson KE.** Lack of neuronal nitric oxide synthase in nerve fibres of aganglionic intestine: a clue to Hirschprung's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1995; 20: 49-53.
260. **Parola M, Robino G.** Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis *Journal of Hepatology*, 2001; 35 (2): 297-306.
261. **Emerit J, Beaumont C, Trivin E.** Billiar Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 2001; 55 (6): 333-339.
262. **Genesca J, Gonzalez A, Segura R, Catalan R, Marti R, Varela E, Cadelina G, Martinez M.** Interleukin-6, nitric oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *The American Journal of Gastroenterology*, 1999; 94 (1): 169-177.
263. **Rolla G, Brussino L, Colagrande P, et al.** Exhaled nitric oxide and oxygenation abnormalities in hepatic cirrhosis. *Hepatology*, 1997; 26: 842-847.
264. **Minana JB, Gomez-Cambronero L, Lloret A, Pallardo FV, Olmo JD, Escudero A, Rodrigo JM, Pellin A, Vina JR, Vina J, Sastre J.** Mitochondrial oxidative stress and CD95 ligand: A dual mechanism for hepatocyte apoptosis in chronic alcoholism. *Hepatology*. 2002; 35 (5):1205-1214.

265. **Siqueira MC, Pedro AJ, Rocha P, Ramalho F, Carneiro de Moura MC.** Nitric oxide and myeloperoxidase as biomarkers of oxidative stress in liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002; 17(Suppl): A503.
266. **Wiest R, Groszmann RJ.** The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: Too much, not enough. *Hepatology*, 2002; 35 (2): 478-491.
267. **Chatila R, Ferayorni L, Gupta T, Groszmann RJ.** Local Arterial Vasoconstriction Induced by Octreotide in Patients With Cirrhosis. *Hepatology*, 2000; 31 (3): 572-576.
268. **Martin PY, Ginés P, Schrier RW.** Nitric oxide as a mediator of hemodynamic abnormalities and sodium retention in cirrhosis. *N Eng J Med*, 1998; 339: 533-541.
269. **Genesca J, Segura R, Gonzalez A, Catalan R, Marti R, Torregrosa M, Cereto F.** Nitric oxide may contribute to nocturnal hemodynamic changes in cirrhotic patients. *The American Journal of Gastroenterology*, 2000; 95 (6): 1539-1544.
270. **Chu CJ, Lee FY, Wang SS, et al.** Hyperdynamic circulation of cirrhotic rats: role of substance P and its relationship to nitric oxide. *Scand J Gastroenterol*, 1997; 32: 841-845.
271. **Campillo B, Bories PN, Benvenuti C, Dupeyron C.** Serum and urinary nitrate levels in liver cirrhosis: endotoxemia, renal function and hyperdynamic circulation. *J Hepatol*, 1996; 25: 707-714.
272. **Woitak RP, Heller J, Stoffel Wagner B, Spengler U, Sauerbruch T.** Renal functional reserve and nitric oxide in patients with compensated liver cirrhosis. *Hepatology*, 1997; 26: 858-864.
273. **Trevisani F, Sica G, Mainqua P, Santese G, De Notarus S, Caraceni P, Domenicali M, Zaca F, Grazi GL, Mazziotti A, Cavallari A, Bernardi M.** Autonomic Dysfunction and Hyperdynamic Circulation in Cirrhosis With Ascites. *Hepatology*, 1999; 30 (6): 1387-1392.
274. **Tsao GG, Angulo P, Garcia JC, Groszmann R, Cadelina GW.** The Diagnostic and Predictive Value of Ascites Nitric Oxide Levels in Patients with Spontaneous Bacterial Peritonitis. *Hepatology*, 1998; 28 (1): 17-21.
275. **Lee WC, Lin HC, Hou MC, Lee FY, Chang FY, Tsai YT, Lee SD.** Effect of anemia on haemodynamics in patients with cirrhosis. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 1999; 14 (4): 370-375.
276. **Coşkun U, Özenirler S, Sancak B, Bukan N.** Serum and ascitic fluid nitrate levels in patients with cirrhosis. *Clinica Chimica Acta*, 2001; 306: 127-132.
277. **Wong F, Blendis L.** New challenge of hepatorenal syndrome: Prevention and treatment. *Hepatology*, 2001; 34 (6): 1242-1251.
278. **Angeli P, Volpin R, Gerunda G, Craighero R, Roner P, Merenda R, Amadio P, Sticca A, Caregaro L, Maffei-Faccioli A, Gatta A.** Reversal of Type 1 Hepatorenal Syndrome With the Administration of Midodrine and Octreotide. *Hepatology*, 1999; 29 (6): 1690-1697.

279. **Florence Wong, Laurence Blendis.** Hepatorenal Failure. *Clinics in Liver Disease*, 2000; 4 (1): 169-189.
280. **Nagasue N, Dhar DK, Yamanoi A, Emi Y, Udagawa J, Yamamoto A, Tachibana M, Kubota H, Kohno H, Harada T.** Production and Release of Endothelin-1 From the Gut and Spleen in Portal Hypertension Due to Cirrhosis. *Hepatology*. 2000; 31 (5): 1107-1114.
281. **Rockey DC, Chung JJ.** Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: Endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology*, 1998; 114: 344-51.
282. **Arieh Bomzon, Predrag Ljubuncic.** Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 2001; 89 (3): 295-308.
283. **Freimut Schliess, Dieter HaEussinger.** Hepatic encephalopathy and nitric oxide. *Journal of Hepatology*, 2001; 34 (4): 610-612.
284. **Vemuganti L, Raghavendra R.** Nitric oxide in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Neurochemistry International*, 2002; 41 (2-3): 161-170.
285. **Teuber G, Teupe C, Dietrich CF, Caspary WF, Buhl R, Zeuzem S.** Pulmonary dysfunction in non-cirrhotic patients with chronic viral hepatitis. *European Journal of Internal Medicine*, 2002; 13 (5): 311-318.
286. **Nishikawa M, Sato EE, Kashiba M, Kuroki T, Utsume K, Inoue M.** Role of Glutathione in Nitric Oxide-Dependent Regulation of Energy Metabolism in Rat Hepatoma Cells. *Hepatology*, 1998; 27 (2): 422-426.
287. **Moussa YI, Plevris JN, Hayes PC.** Plasma nitrites/nitrates in HCV infection and hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2000; 12 (2): 159-163.
288. **Notas G, Xidakis C, Valatas V, Kouroumalis A, Kouroumalis E.** Levels of circulating endothelin-1 and nitrates/nitrites in patients with virus-related hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepatitis*, 2001; 8: 63-69.
289. **Moriyama A, Masumoto A, Nann H, Tabaru A, Unoki H, Ikeda M, et al.** High plasma concentrations of nitrit/nitrat in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*, 1997; 92: 1520-1523.
290. **Moriyama A, Tabaru A, Unoki H, Abe S, Masumoto A, Otsuki M.** Plasma nitrite/nitrate concentrations as a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 2000; 296 (1-2): 181-191.
291. **Vishnudutt Purohit, Denise Russo.** Cellular and molecular mechanisms of alcoholic hepatitis; introduction and summary of the symposium. *Alcohol*, 2002; 27 (1): 3-6.
292. **Gorce FB, French BA, Li J, Rley NE, Yuan QX, Valnluck V, Fu P, Ingelman-Sundberg M, Yoon S, French SW.** The Importance of Cycling of Blood Alcohol Levels in the

- Pathogenesis of Experimental Alcoholic Liver Disease in Rats. *Gastroenterology*, 2002; 123: 325-335.
293. **Batey RG, Cao Q, Gould B.** Lymphocyte-mediated liver injury in alcohol-related hepatitis. *Alcohol*, 2002; 27 (1): 37-41.
294. **Kono H, Arteel GE, Rusyn I, Sies H, Thurman RG.** Ebselen Prevents Early Alcohol-Induced Liver Injury In Rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 2001; 30 (4): 403-411.
295. **Bissell DM, Gores GJ, Laskin DL, Hoofnagle JH.** Drug-induced liver injury: Mechanisms and test systems. *Hepatology*, 2001; 33 (4): 1009-1013.
296. **Muriel P.** Nitric oxide protection of rat liver from lipid peroxidation, collagen accumulation, and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochemical Pharmacology*, 1998; 56: 773-779.
297. **Bourdi M, Masubuchi Y, Reilly TP, Amouzadeh HR, Martin JL, George JW, Shah AG, Pohl LR.** Protection against acetaminophen-induced liver injury and lethality by interleukin 10: Role of inducible nitric oxide synthase. *Hepatology*, 2002; 35 (2): 289-298.
298. **Gardner CR, Heck DE, Yang CS, Thomas PE, Zhang XJ, DeGeorge GL, Laskin JD, Laskin DL.** Role of Nitric Oxide in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in the Rat. *Hepatology*, 1998; 27 (3): 748-754.
299. **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al.** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989; 244: 359-362.
300. **Bud C. Tennant.** Animal Models Of Hepatitis B Virus Infection. *Clinics in Liver Disease*, 1999; 3 (2): 241-266.
301. **Wozniak MA, Itzhaki RF, Faragher EB, James MW, Ryder SD, Irving WL.** Apolipoprotein E-4 Protects Against Severe Liver Disease Caused by Hepatitis C Virus. *Hepatology*, 2002; 36: 456-463.
302. **Araya V, Rakela J, and Wright T.** Hepatitis C after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology*, 1997; 112: 575-582.
303. **Podevin P, Guechot J, Serfaty L, et al.** Evidence for a deficiency of interferon response in mononuclear cells from hepatitis C viremic patients. *J Hepatol*, 1997; 27: 265-271.
304. **Napoli C, Bishop AG, McGuinness PH, et al.** Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology*, 1996; 24: 759-765.
305. **Gershon AS, Margulies M, Gorczynski RM, Heathcote EJ.** Serum cytokine values and fatigue in chronic hepatitis C infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 2000; 7 (6): 397-402.
306. **Bedossa P and Poynard T.** An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1996; 24: 289-293.

307. **Kipiani V, Kipiani N, Sanikidze T, Topuridze N, Pkhaladze N.** Certain aspects of membrane damage during hepatitis. *Pathophysiology*, 1998; 5(Supplement 1): 116.
308. **Frese M, Schwarzle V, Barth K, Krieger N, Lohmann V, Mihm S, Haller O, Bartenschlager R.** Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology*, 2002; 35 (3): 694-703.
309. **Shiratori Y, Kato N, Yokosuka O, et al.** Predictors of the efficacy of interferon therapy in chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 1997; 113: 558-566.
310. **Lai OF, Chow P, Tan S, Song IC, Soo KC, Aw SE, Yu WK, Fook-Chong S, Satchithanantham S, Chan S.** Changes in prostaglandin and nitric oxide levels in the hyperdynamic circulation following liver resection. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2000; 15 (8): 895-901.
311. **Simpson KJ, Lukacs NW, Coletti L, Strieter RM, Kunkel SL.** Cytokines and the liver. *J Hepatol*, 1997; 27: 1120-1132.
312. **Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C.** Mechanisms of Hepatic Toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: G387-G392.
313. **Geller DA, DiSilvio M, Nussler AK, Wang SC, Shapiro RA, Simmons RL, Billiar TR.** Nitric oxide synthase expression is induced in hepatocytes in vivo during hepatic inflammation. *J Surg Res*, 1993; 55: 427-432.
314. **Mihm S, Fayyazi A, Ramadori G.** Hepatic expression of inducible nitric oxide synthase transcripts in chronic hepatitis C virus infection: relation to hepatic viral load and liver injury. *Hepatology*, 1997; 26: 451-458.
315. **Lim MH, Yen MH, Tschen SY, Wang CH.** Increased nitric oxide levels in patients with chronic hepatitis C and liver tumors. *Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 2001; 16 (4), pA11.
316. **Tankurt E, Kirkali G, Ozcan MA, Mersin N, Ellidokuz E, Akpinar HA.** Increased serum nitrite and nitrate concentrations in chronic hepatitis. *J Hepatol*, 1998; 29: 512-513.
317. **Amaro MJ, Bartolomé J, Carreño V.** Hepatitis B Virus X Protein Transactivates the Inducible Nitric Oxide Synthase Promoter. *Hepatology*, 1999; 29 (3): 915-923.
318. **Majano P, Lara-Pezzi E, López-Cabrera M, Apolinario A, Moreno-Otero R, García-Monzón C.** Hepatitis B virus X protein transactivates inducible nitric oxide synthase gene promoter through the proximal nuclear factor κ B-binding site: Evidence that cytoplasmic location of X protein is essential for gene transactivation. *Hepatology*, 2001; 34 (6): 1218-1224.
319. **Ottesen LH, Harry D, Frost M, Davies S, Khan K, Halliwell B, Moore K.** Increased formation of S-nitrothiols and nitrotyrosine in cirrhotic rats during endotoxemia. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001; 31 (6): 790-798.

320. **Pellaton C, Kubli S, Feihl F, Waeber B.** Blunted vasodilatory responses in the cutaneous microcirculation of cigarette smokers. *Am Heart J*, 2002; 144: 269-274.
321. **Garcia-Monzon C, Majano PL, Zubia I, Sanz P, Apolinario P, Moreno-Otero R.** Intrahepatic accumulation of nitrotyrosine in chronic viral hepatitis is associated with histological severity of liver disease. *J Hepatol*, 2000; 32 (2): 331-338.
322. **Cuzzocrea S, Zingarelli B, Villari D, Caputi AP, Longo G.** Evidence for in vivo peroxynitrite production in human chronic hepatitis. *Life Sci*, 1998; 63 (2): PL25-30.
323. **Nadler EP, Dickinson EC, Beer-Stolz D, Alber SM, Watkins SC, Pratt DW, Ford HR.** Scavenging nitric oxide reduces hepatocellular injury after endotoxin challenge. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G173-G181.
324. **Luss H, DiSilvio M, Litton AL, Molina y Vedia L, Nussler AK, Billiar TR.** Inhibition of nitric oxide synthesis enhances the expression of inducible nitric oxide synthase mRNA and protein in a model of chronic liver inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994; 204 (2): 635-640.
325. **Amaro MJ, Bartolome J, Pardo M, Cotonat T, Lopez-Farre A, Carreno V.** Decreased nitric oxide production in chronic viral hepatitis B and C. *J Med Virol*, 1997; 51: 326-331.
326. **Vinogradov NA.** Synthesis of nitric oxide in patients with viral hepatitis. (abstract) *Antibiot Khimioter*, 2001; 46(4): 26-28.
327. **Majano PL, Garcia-Monzon C, Lopez-Cabrera M, Lara-Pezzi E, Fernandez-Ruiz E, Garcia-Iglesias C, et al.** Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation. (abstract) *J Clin Invest*, 1998; 101: 1343-1352.
328. **Halai A, Ruffini L, Lake-Bakaar G.** The inhibitory effect of interferon on hepatitis C virus replication is not mediated via nitric oxide in man. *The American Journal of Gastroenterology*, 2000; 95 (9): 2524.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatih Yüksel İŞIKSAL
Doğum tarihi ve Yeri : 09/04/1969 - KİLİS
Medeni Durumu : Evli ve iki çocuk babası
Adres : Güzelyalı Mahallesi 6. Sokak Şen Coşkun Apt.
Kat:2 No:4 Seyhan / ADANA
Telefon : 0532 657 66 46
Fax : 0322 338 66 30
E-mail : isiksalfatih@hotmail.com
Mezun olduğu Tıp Fakültesi : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Varsa mezuniyet derecesi : İyi
Görev yerleri : Şarkonak Sağlık Ocağı/HATAY (1992-1994)
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları ABD/ADANA (1994-1999)
Numune Hastanesi Dahiliye/ADANA (1999-2000)
Dernek üyelikleri : Türk Tabipler Birliği
Türk Gastroenteroloji Derneği
Alınan burslar : -
Yabancı dil(ler) : İngilizce
Diğer hususlar : -