

N-asetilsistein sıçanlarda tıkanma sarılığına bağlı karaciğer hasarını azaltabilir

N-acetylcysteine can attenuate liver injury in obstructive jaundice in rats

H.Hakan Mersin*, Murat Akbaba*, Emel Başkan*, Uğur Berberoğlu*

Amaç: Tıkanma sarılıklı sıçanlarda N-Asetilsisteinin (NAS) plazma tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) düzeyleri üzerine ve karaciğer parenkim hasarına etkisini araştırmak.

Gereç ve Yöntem: Ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 36 adet Wistar-Albino cinsi sıçan sham operasyonu yapılan (sham grubu), koledok kanalı bağlanarak NAS tedavisi verilen (tedavi grubu) ve koledok kanalı bağlanan ama tedavi verilmeyen (kontrol grubu) olmak üzere 12'şerli üç gruba ayrıldı. Tedavi ve kontrol grubundaki sıçanlara ameliyat sonrası 10 gün süresince sırasıyla NAS veya serum fizyolojik uygulandı. On günlük tedaviyi takiben parenkim hasarını değerlendirmek için tüm sıçanların karaciğer fonksiyon testleri ve plazma TNF- α düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Tedavi grubunda parenkim hasarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az olduğu ve plazma TNF- α düzeylerinin de anlamlı ölçüde düşük olduğu saptandı.

Sonuç: NAS deneysel tıkanma sarılığında plazma TNF- α düzeylerinin baskılanması ve karaciğer parenkim hasarının azaltılmasında faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Tıkanma sarılığı, n-asetilsistein, tümör nekrozis faktör-alfa

*Ankara Onkoloji Hastanesi,
2. Genel Cerrahi Kliniği, Ankara,
Türkiye

Dr. H.Hakan Mersin
E-posta:
hhakanmersin@yahoo.com

Makale Geliş Tarihi: 14.10.2009
Makale Kabul Tarihi: 01.12.2009

GİRİŞ

Tıkanma sarılığı, safra yollarının herhangi bir seviyesinde, değişik hastalıklarda ortaya çıkan kısmi veya tam tıkanma sonucu safra akımının engellenmesi ile gelişir. Tıkanma sarılıklı hastalarda cerrahi morbidite ve mortalitenin en önde gelen nedeni sepsis gibi infeksiyöz komplikasyonların gelişimidir (1,2).

Safra tuzlarının barsak bakterilerinin çoğalmasını önlediği ve endojen barsak florasının düzenlenmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Tıkanma sarılığında, safra tuzlarının barsağa ulaşmaması aşırı bakteriyel çoğalmaya ve barsak mukozal bariyer fonksiyonunun bozulmasına (bakteriyel translokasyon) neden olur. Ayrıca tıkanma sarılığında Kupffer hücre fonksiyonlarının azalması da bakteri ve endotoksinlerin portal venden sistemik dolaşıma kaçışına neden olur. Böylece tıkanma sarılığında sistemik endotoksemi gelişir, bu da septik komplikasyonların ortaya çıkmasında anahtar rol oynar (3-5).

Diğer taraftan safra yollarının tıkanması, sonunda siroza kadar ilerleyebilen, karaciğer parenkim

hasarına da neden olabilir (6). Hepatosit hasarının nedeni net değilse de tıkanma sarılığında yoğun oksidatif stresin tetiklendiği, bu stresin de kolestatik karaciğer hasarının patogeneğinde önemli bir faktör olduğu konusunda giderek artan kanıtlar vardır (6,7).

N-Asetilsistein (NAS) hücre içi oksidan-antioksidan dengesinin bozulduğu klinik durumları tedavi etmek için kullanılan bir serbest radikal tutucudur. NAS'ın bir diğer faydalı etkisi de sitokin salınımını, nüklear faktör kappa B (NF- κ B) ve adhezyon molekül üretimini baskılayarak gösterdiği antiinflamatuvar etkidir (8-10). Dolayısıyla NAS'ın antioksidan ve antiinflamatuvar fonksiyonları ile kolestatik karaciğer hasarını engelleyebileceği bildirilmektedir (11,12). NAS, üzerinde geniş araştırmalar yapılan bir ajan olmakla birlikte tıkanma sarılığında, özellikle de antiinflamatuvar etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle NAS'ın tıkanma sarılığında gelişen inflamasyona ve kolestatik karaciğer hasarına etkilerini araştırmak amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Yerel Hayvan Etik Kurul onayı alındıktan sonra Ankara Onkoloji hastanesinde gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 250-300 g arasında değişen Wistar-Albino cinsi 36 adet sıçan kullanıldı. Deney hayvanları tabanı ve yanları plastik, üstü tel örgülü kafeslere ikili olarak yerleştirildi, standart sıçan yemi ve su ile beslenerek uygun oda ısısı ve ışık ortamında barındırıldı. Deneyden 12 saat önce yem alımı durdurulan sıçanlara 50 mg/kg dozda kas içine ketamin (Ketalar®, Eczacıbaşı, İstanbul) verilerek anestezi sağlandı. İnsizyonun uygulanacağı karın orta bölgesi tıraş edildikten ve %10 polivinilprolidon iyot antiseptik solüsyonu ile temizlendikten sonra 3 cm'lik orta hat kesisi ile karın boşluğuna girildi.

Sıçanlar her biri 12 hayvan içeren 3 gruba ayrıldı. Tedavi ve kontrol gruplarındaki sıçanların supraduodenal koledok kanalı belirlenip, çevre dokulardan serbestlendikten sonra proksimali çift, distali tek olacak şekilde 5/0 ipekle bağlanarak kesildi ve tıkanma sarılığı oluşturuldu. Tedavi grubundaki sıçanlara intraperitoneal olarak 150 mg/kg NAS, kontrol grubundakilere ise aynı hacimde serum fizyolojik, ameliyat sonrası 1.günden başlayarak 10. güne kadar her gün uygulandı. Sham grubundaki sıçanların supraduodenal koledok kanalı belirlenip, çevre

dokulardan serbestlendikten sonra 5/0 ipekle altından geçildi, fakat ipek bağlanmadan çıkarıldı. İşlem sonrası tüm sıçanların karın insizyonu 3/0 ipek kullanılarak kapatıldı. Tüm denekler cerrahi girişimden 10 gün sonra kan örnekleri alınarak sakrifiye edildi. Karaciğer hasarının göstergesi olarak plazma aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalen fosfataz (ALP), gama glutamil transferaz (GGT), total ve direkt bilirubin düzeyleri standart tanı kitleri kullanılarak belirlendi. Plazma tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) düzeyleri ticari olarak bulunan ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sıçan TNF- α kiti (Biosource, California, USA) kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel değerlendirme

Verilerin analizi SPSS 10.0 paket programı (SPSS Inc., Chicago, USA) ile yapıldı. Gruplar arası farkı değerlendirmek üzere t-testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA); varyans analizinin anlamlı çıktığı durumlarda ise LSD çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Analizlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Tüm hayvanlar deney süresince sağlıklı bir şekilde yaşamlarını sürdürdü. Koledok kanalı bağlanan sıçanlarda 3 gün içerisinde klinik olarak sarılık fark edilmeye

başlandı. Koledok kanalı bağlanarak tıkanma sarılığı yaratılan deneklerde (tedavi ve kontrol grubu) plazma total bilirubin, direkt bilirubin düzeylerinin yanı sıra plazma ALT, AST, AP, GGT düzeylerinin de sham grubundakilere göre belirgin olarak yükseldiği saptandı. Sham grubundaki sıçanların direkt bilirubin değerleri ölçülemeyecek kadar düşüktü. NAS ile tedavi edilen sıçanlarda ALT, AST, AP, GGT düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük bulundu (Tablo 1).

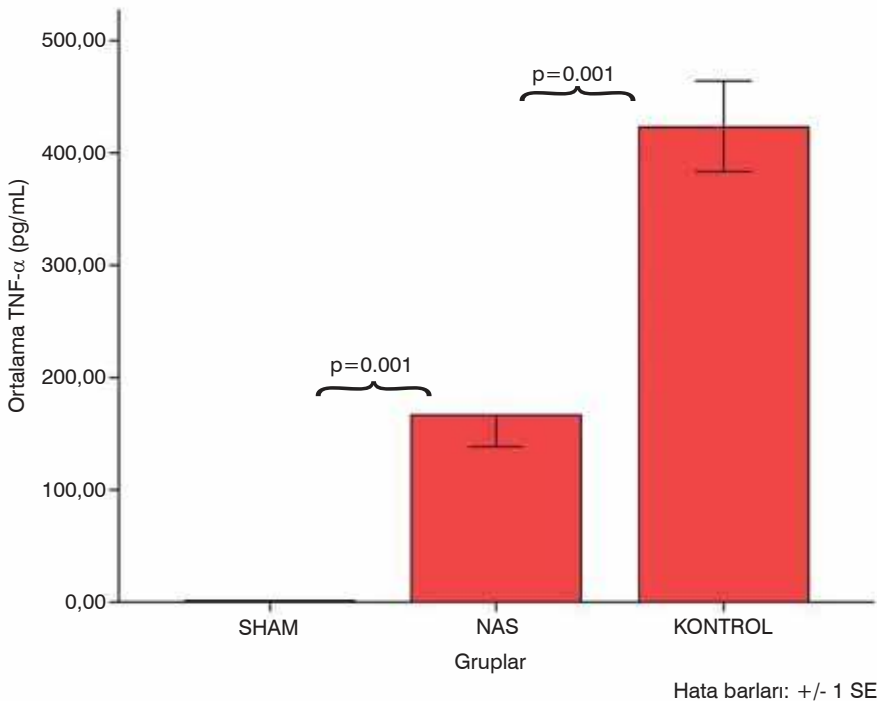
Benzer şekilde plazma TNF- α düzeyleri NAS ile tedavi edilen grupta kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha azdı (Şekil 1).

TARTIŞMA

Tıkanma sarılığında gelişen kolestatik karaciğer hasarının mekanizması tam olarak bilinmiyorsa da, safra yollarında gelişen tıkanma sonucu safra asitlerinin retansiyonu ve hepatosit içinde birikmesinin karaciğer hücre hasarında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Toksik, hidrofobik safra asitleri inflamatuvar sitokin üretimini artırır ve hem apoptozu hem de nekrozu tetikleyerek hepatosit hasarına neden olur (13). Kolestatik karaciğer hasarının patogenezinde rol oynayan önemli bir faktörün de oksidatif stres olduğu belirtilmektedir (6,7,14-18). Bu nedenle, deneysel tıkanma sarılığı modellerinde inflamasyonu ve oksidatif travmayı azaltacak tedavi stratejileri ilgi odağı olmaktadır. Bu çalışmada da anti-inflamatuvar ve antioksidan etkileri olan NAS'ın tıkanma sarılığında tedavi edici etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamızda kullanılan deneysel model akut tıkanma sarılığı kliniği ile uyumludur. 10 günlük süre, tıkanma sarılığına bağlı gelişecek barsak bariyer fonksiyon bozukluğu ve sistemik endotoksemi gibi yüksek morbidite ve mortalite olasılığını arttıran faktörlerin gelişimi için yeterlidir. Ayrıca oksidatif stres göstergelerinin ortaya çıkması için de 10 günün yeterli olduğu gösterilmiştir (19).

Çalışmamızda koledok kanalı bağlanan sıçanlarda, karaciğer parenkim hasarına bağlı olarak karaciğer fonksiyon testlerinde belirgin yükselme ve TNF- α düzeylerinde artış saptanması diğer çalışmalarla uyumludur (6,20,21). Tıkanma sarılığı geliştikten sonra 7 gün içerisinde hepatik makrofaj fonksiyonları artmakta (22,23) ve gelişen endotoksemisinin uyarımıyla Kupffer hücrelerinden TNF- α salı-



Şekil 1. Gruplardaki plazma TNF-alfa düzeyleri (Ortalama \pm SE).

Tablo 1. Gruplardaki plazma total bilirubin, direkt bilirubin, ALT, AST, AP, GGT düzeyleri (Ortalama \pm SE).

	NAS	Kontrol	Sham	p
AST ^a	324.33 \pm 29.06	632.08 \pm 41.60	135.92 \pm 8.34	<0.001*
ALT ^a	100.67 \pm 6.09	163.42 \pm 6.67	42.92 \pm 1.05	<0.001*
GGT ^b	46.17 \pm 1.80	54.50 \pm 3.45	6.42 \pm 0.83	<0.001*
ALP ^a	363.33 \pm 15.87	640.08 \pm 29.99	243.92 \pm 14.57	<0.001*
Total bilirubin ^a	6.90 \pm 0.34	8.99 \pm 0.27	0.28 \pm 0.02	<0.001*
Direkt bilirubin ^a	5.64 \pm 0.34	7.68 \pm 0.23		<0.001**

* Tek yönlü varyans analizi (ANOVA)

** t testi

LSD ile yapılan çoklu karşılaştırmalardaki p değerleri

a		b	
NAS vs Kontrol:	p=0.001	NAS vs Kontrol:	p<0.05
NAS vs Sham:	p=0.001	NAS vs Sham:	p=0.001
Kontrol vs Sham:	p=0.001	Kontrol vs Sham:	p=0.001

nımında belirgin artış olmaktadır (24). Artmış TNF- α düzeylerinin de tıkanma sarılığında organ hasarında ve çoklu organ fonksiyon bozukluğunun patogenezinde katkısı olabileceği bildirilmektedir (3). Bu nedenle tıkanma sarılığında Kupffer hücrelerinin bloke edilmesinin ve aşırı TNF- α üretiminin azaltılmasının tedavide faydalı olabileceği ve endotoksemi ile ilişkili komplikasyonları ve ölüm riskini azaltabileceği bildirilmiştir (24). Tıkanma sarılığında gelişen endotoksemi, sadece Kupffer hücrelerinden TNF- α salınımını uyarmakla kalmaz, aynı zamanda karaciğer ve barsakta oksidatif travmaya da neden olur (25).

Oksidatif travma, radikal oluşumu ile radikal temizlenmesi arasındaki dengenin oluşum lehine bozulması ile gelişir. Sonuç olarak, belli oksidasyon ürünlerinin üretimi artar. Tıkanma sarılığında karaciğerin lipid peroksidasyonu ile ilişkili oksidatif travmaya maruz kaldığına dair kanıtlar vardır (6,7). Bu travmanın potansiyel mekanizmaları arasında endotoksemi ve neden olduğu inflamatuvar yanıt, safra asitlerinin düzeyinin artması,

antioksidan enzim düzeylerinin azalması sonucu superoksit radikali (O₂) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) üretiminin artması da bulunur (6,13,25). Koledok kanalı bağlanmış sıçanlarda değişik antioksidan tedavilerin belirgin koruyucu etkisi gösterilmiştir (12,26).

Bu çalışmada tıkanma sarılığının tedavisinde tercih edilen NAS, thiol grubu içeren serbest oksijen radikali temizleyicisi ve glutatyonun ön maddesidir ve değişik patolojilerde antioksidan etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (26,27). NAS'ın antioksidan özelliklerinin yanı sıra antiinflamatuvar etkisi de vardır (28).

Bu çalışma NAS'ın koledok kanalı bağlanmış sıçanlarda oluşan karaciğer hasarında belirgin koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Koledok kanalı bağlandıktan sonra NAS verilen grupta, ALT, AST, GGT, ALP ve bilirubin düzeylerindeki belirgin azalma ile kanıtlandığı gibi, karaciğer hasarı daha az olmaktadır. Bunda NAS'ın antioksidan etkisi ile karaciğerde gelişen oksidatif travmayı ön-

lemesinin etkisi olabilir. Ayrıca NAS ile tedavi edilen hayvanlarda TNF- α salınımının da azalması, barsak bariyer fonksiyonunun desteklenmesi sonucu endotoksemisinin azalması ile ilişkili olabilir. TNF- α düzeylerindeki azalmanın bir diğer olası nedeni de NF- κ B aktivasyonunun engellenmesi olabilir, çünkü tıkanma sarılığında ROM'un aşırı üretimi hepatik dokuda NF- κ B'nin aktivasyonuna neden olur ki, bu da TNF- α , interlökin (İL)-1 ve İL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salgısını artırır. Bu sitokinler de oksidatif travmayı arttıracak ROM'un üretimini artırır. Oksidatif travma hem karaciğer hücrelerine direkt etkiyle hasar oluştururken hem de NF- κ B aktivasyonu yoluyla sitokin üretimini artırarak karaciğer hasarını devamlı hale getirir (6). NAS bu kısır döngüyü kırarak karaciğer parenkim hasarını azaltıyor olabilir.

Bu çalışmanın sınırlaması NAS gibi antioksidan etkisi de olan bir tedavi kullanılmasına rağmen grupların oksidatif travma belirteçleri açısından karşılaştırılmamasıdır. Bu çalışmada tedavi ile parenkim hasarının ve inflamasyon sürecinin azaldığı gösterilmiş olmasına ve inflamasyon süreci ile oksidatif hasar arasında yakın ilişkinin de bilinmesine rağmen antioksidatif etkinin mekanizması tam aydınlatılmamıştır. Çalışmanın bir başka kısıtlaması da histopatolojik değişikliklerin araştırılmamasıdır. Biyokimyasal parametrelerdeki düzelmenin histopatolojik bulgularla ne kadar örtüştüğü bilinmemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma deneysel tıkanma sarılığında NAS'ın plazma TNF- α düzeylerini baskıladığını, karaciğer hasarını azaltabildiğini ve karaciğer hücre bütünlüğünün korunmasında faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak klinik uygulama için daha ayrıntılı klinik çalışmalara gereksinim vardır.

SUMMARY

N-acetylcysteine may attenuate liver injury in obstructive jaundice in rats

Purpose: To investigate the effect of N-acetylcysteine (NAC) on the level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and liver parenchyma injury in an experimental rat model of obstructive jaundice.

Patients and Methods: Thirty-six Wistar-Albino rats weighing 250-300 g were randomly divided into three groups of 12 animals in each, as sham-operated, bile duct ligated plus NAC-treated (treatment), bile duct ligated plus saline administered (control). After the operation, the rats in treatment and control groups were adminis-

tered NAC and saline, respectively. After 10 days of treatment, liver function tests were performed and plasma TNF- α levels were determined in all rats to assess the parenchymal damage.

Results: Parenchymal damage and plasma TNF- α levels were significantly lower in the treatment group, compared with the control group.

Conclusion: NAC can be useful in decreasing the parenchymal damage in the liver and suppress the plasma TNF- α levels in experimental obstructive jaundice.

Key Words: Obstructive jaundice, n-acetylcysteine, tumor necrosis factor- α

KATKIDA BULUNANLAR

Çalışmanın düşünülmüş ve planlanması:
Murat Akbaba, Emel Başkan, Uğur Berberoğlu

Verilerin elde edilmesi:
Murat Akbaba, Emel Başkan

Verilerin analizi ve yorumlanması:
H.Hakan Mersin, Murat Akbaba, Emel Başkan

Yazının kaleme alınması:
H.Hakan Mersin

İstatistiksel değerlendirme:
H.Hakan Mersin

KAYNAKLAR

- Greig JD, Krukowski ZH, Matheson NA. Surgical morbidity and mortality in one hundred and twenty-nine patients with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1988; 75: 216-219.
- Holman JM Jr, Rikkers LF, Moody FG. Sepsis in the management of complicated biliary disorders. *Am J Surg* 1979; 138: 809-813.
- Nehéz L, Andersson R. Compromise of immune function in obstructive jaundice. *Eur J Surg* 2002; 168: 315-328.
- Margaritis VG, Filos KS, Michalaki MA, Scopa CD, Spiliopoulou I, Nikolopoulou VN, Vagianos CE. Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J Surg* 2005; 29: 1329-1334.
- Clements WD, Erwin P, McCaigue MD, Halliday I, Barclay GR, Rowlands BJ. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction. *Gut* 1998; 42: 293-299.
- Liu TZ, Lee KT, Chern CL, Cheng JT, Stern A, Tsai LY. Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of proinflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. *Ann Clin Lab Sci* 2001; 31: 383-390.
- Tsai LY, Lee KT, Tsai SM, Lee SC, Yu HS. Changes of lipid peroxide levels in blood and liver tissue of patients with obstructive jaundice. *Clin Chim Acta* 1993; 215: 41-50.
- Tsuji F, Miyake Y, Aono H, Kawashima Y, Mita S. Effects of bucillamine and N-acetyl-L-cysteine on cytokine production and collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 26-31.
- Verhasselt V, Vanden Berghe W, Vanderheyde N, Willems F, Haegeman G, Goldman M. N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition. *J Immunol* 1999; 162: 2569-2574.
- Rahman A, Kefer J, Bando M, Niles WD, Malik AB. E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation. *Am J Physiol* 1998; 275: 533-544.
- Nakano H, Fujiwara Y, Kitamura N, Kumada K, Matsumiya A, Sakai H, Hatakeyama T, Yamaguchi M, Jaeck D. Susceptibility to lipopolysaccharide of cholestatic rat liver produced with bile duct ligation: assessments of the mitochondrial glutathione pool and the effects of N-acetylcysteine. *Eur Surg Res* 2000; 32: 148-154.
- Assimakopoulos SF, Maroulis I, Patsoukis N, Vagenas K, Scopa CD, Georgiou CD, Vagianos CE. Effect of antioxidant treatments on the gut-liver axis oxidative status and function in bile duct-ligated rats. *World J Surg* 2007; 31: 2023-2032.
- Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1677-1689.
- Krähenbühl S, Talos C, Lauterburg BH, Reichen J. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 1995; 22: 607-612.
- Parola M, Leonarduzzi G, Robino G, Albano E, Poli G, Dianzani MU. On the role of lipid peroxidation in the pathogenesis of liver damage induced by long-standing cholestasis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 351-359.
- Alptekin N, Mehmetçik G, Uysal M, Aykaç-toker G. Evidence for oxidative stress in the hepatic mitochondria of bile duct ligated rats. *Pharmacol Res* 1997; 36: 243-247.
- Tsai LY, Lee KT, Liu TZ. Evidence for accelerated generation of hydroxyl radicals in experimental obstructive jaundice of rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 732-737.
- Vendemiale G, Grattagliano I, Lupo L, Memeo V, Altomare E. Hepatic oxidative alterations in patients with extra-hepatic cholestasis. Effect of surgical drainage. *J Hepatol* 2002; 37: 601-605.
- Assimakopoulos SF, Scopa CD, Zervoudakis G, Mylonas PG, Georgiou C, Nikolopoulou V, Vagianos CE. Bombesin and neurotensin reduce endotoxemia, intestinal oxidative stress, and apoptosis in experimental obstructive jaundice. *Ann Surg* 2005; 241: 159-167.
- Fang HQ, Liu YB, Li HJ, Peng SY, Wu YL, Xu B, Wang JW, Li JT, Wang XB. Effects of glycine on plasma and liver tissue changes of TNF-alpha, ET-1 and nitric oxide contents in rats with obstructive jaundice. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2374-2376.
- Sheen-Chen SM, Chen HS, Ho HT, Chen WJ, Sheen CC, Eng HL. Effect of bile acid replacement on endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha production in obstructive jaundice. *World J Surg* 2002; 26: 448-450.
- Sheen-Chen SM, Chau P, Harris HW. Obstructive jaundice alters Kupffer cell function independent of bacterial translocation. *J Surg Res* 1998; 80: 205-209.
- Ito Y, Bethea NW, Baker GL, McCuskey MK, Urbaschek R, McCuskey RS. Hepatic microcirculatory dysfunction during cholestatic liver injury in rats. *Microcirculation* 2003; 10: 421-432.
- Kennedy JA, Lewis H, Clements WD, Kirk SJ, Campbell G, Halliday MI, Rowlands BJ. Kupffer cell blockade, tumour necrosis factor secretion and survival following endotoxin challenge in experimental biliary obstruction. *Br J Surg* 1999; 86: 1410-1414.
- Sakaguchi S, Furusawa S, Yokota K, Sasaki K, Takayanagi M, Takayanagi Y. The enhancing effect of tumour necrosis factor-alpha on oxidative stress in endotoxemia. *Pharmacol Toxicol* 1996; 79: 259-265.
- Nakano H, Boudjema K, Jaeck D, Alexandre E, Imbs P, Chenard MP, Nagasaki H, Kumada K, Wolf P, Cinqualbre J. Amelioration of hepatocellular integrity and inhibition of sinusoidal oxidative stress by N-acetylcysteine pretreatment in cold ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Eur Surg Res* 1996; 28: 245-255.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6: 593-597.
- Neuschwander-Tetri BA, Bellezzo JM, Britton RS, Bacon BR, Fox ES. Thiol regulation of endotoxin-induced release of tumour necrosis factor alpha from isolated rat Kupffer cells. *Biochem J* 1996; 320: 1005-1010.