

## ***Fasciola hepatica* ile Enfekte Koyunlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzimler ve Nitrik Oksit Düzeyleri\***

Fulya BENZER, Sema TEMİZER OZAN

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 09.04.2002

**Özet:** Bu çalışmada, *Fasciola hepatica* ile enfekte koyunlarda malondialdehid düzeyleri, antioksidant enzimlerden katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri ile nitrik oksit düzeyleri ölçülmüştür. Malondialdehid düzeyi plazmada Yagi, dokuda Ohkawa yöntemine göre, katalaz aktivitesi Aebi, glutatyon peroksidaz aktivitesi Beutler, nitrik oksit düzeyi ise Griess yöntemine göre çalışılmıştır.

Fasciolasisli grubun plazma malondialdehid düzeyleri, eritrosit katalaz, glutatyon peroksidaz aktiviteleri ile serum nitrik oksit düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak herhangi bir değişiklik göstermemiştir ( $P > 0,05$ ). Fasciolasisli grubun karaciğer malondialdehid düzeyi, katalaz aktivitesi ile nitrik oksit düzeyi kontrol grubuna göre önemli derecede düşerken, glutatyon peroksidaz aktivitesi ise önemli derecede artmıştır ( $P < 0,01$ ). *Fasciola hepatica*'nın sebep olduğu sirotik karaciğer dokusunda malondialdehid düzeyleri, antioksidant enzim aktiviteleri ve nitrik oksit düzeylerinde değişiklikler meydana gelirken, kanda herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir.

Kanda değişiklik meydana gelmemesi *Fasciola hepatica*'nın sebep olduğu hasarın mekanik olmasından kaynaklanabilir.

**Anahtar Sözcükler:** *Fasciola hepatica*, siroz, malondialdehid, katalaz, glutatyon peroksidaz, nitrik oksit

### **Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes and Levels of Nitric Oxide in Sheep Infected with *Fasciola hepatica***

**Abstract:** In this study, the levels of malondialdehyde and activities of catalase and glutathione peroxidase, two antioxidant enzymes, and the levels of nitric oxide in sheep infected with *Fasciola hepatica* were measured. The level of malondialdehyde in plasma and tissue was measured according to the Yagi and Ohkawa methods, respectively. The activities of catalase and glutathione peroxidase were measured according to the methods of Aebi and Beutler, respectively. The level of nitric oxide was determined by the method of Griess.

There were no statistically significant differences in the level of plasma malondialdehyde, activities of erythrocytes catalase and glutathione peroxidase and levels of nitric oxide of the group with fasciolosis in comparison with the control group ( $P > 0.05$ ). However, the level of malondialdehyde in the liver, the activity of catalase and the level of nitric oxide in the group with fasciolosis were much lower than those in the control group while the activity of glutathione peroxidase increased significantly ( $P < 0.01$ ). Cirrhosis caused by *Fasciola hepatica* induced significant changes in malondialdehyde and nitric oxide levels and the activities of antioxidant enzymes in liver tissue, though blood parameters were not affected.

The fact that blood values were not affected is probably because the damage *Fasciola hepatica* caused was a mechanical process.

**Key Words:** *Fasciola hepatica*, cirrhosis, malondialdehyde, catalase, glutathione peroxidase, nitric oxide

### **Giriş**

Fasciolosis ruminantların bir trematod invazyonu olup, büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Parazitin genç formları tahribatı karaciğer parankimasında, olgunları ise safra kanallarında oluştururlar. Siroz, karaciğer interstitiumunun süregen ve proliferatif yangısı olup, karaciğerde ilerleyici bir fibrozis veya nedbeleşme

söz konusudur. Sirozda karaciğer parankimi gözden kaybolur ve bunun yerini giderek yaygın bir biçimde üreyen interstitial doku alır. Sirozun toksik, enfeksiyöz, paraziter olmak üzere pek çok sebepleri vardır (1,2).

Lipid peroksidasyonu, membranlarda bulunan poliansatüre yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehitler gibi

\* Doktora tezinin bir kısmından alınmıştır.

çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehidler oluşurlar. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffuze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar, böylece birçok hastalığa ve doku hasarına sebep olurlar (3). Orotik asit, etanol ve fosfor tarafından meydana getirilen karaciğer hasarının lipid peroksidasyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (4).

Katalaz; (EC 1.11.1.6) hidrojen peroksidi ( $H_2O_2$ ) oksijen ve suya parçalar. Birçok hastalıkta örneğin kanser, Down sendromu ve anemide serumda katalaz aktivitesinin değiştiği bildirilmiştir (5).

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px EC 1.11.1.9), hidroperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu sitozolik bir enzimdir. Eritrositlerde GSH-Px oksidant strese karşı en etkili antioksidant olup fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır (6). *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*)'da katalaz, GSH-Px ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağlı glutatyon redüktaz aktivitesine rastlanılmamıştır. Düşük seviyelerde nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) bağlı glutatyon redüktaz ve süperoksid dismutaz aktivitesine rastlanılmıştır (7).

Nitrik oksit ( $NO$ )'in moleküler orbitalinde eşlenmemiş elektron çifti bulunduğu için serbest radikal olarak yarı ömrü çok kısadır.  $NO$  oluşumu memeli hücrelerinde yaygındır ve NADPH'a bağımlı Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimini gerektirir (8). Karaciğer sirozlu hastalarda artmış intrahepatik rezistans sonucu oluşan portal hipertansiyon yaygın komplikasyonlardan biridir. Endotelial NOS'in enzimatik fonksiyonundaki azalmadan kaynaklanan  $NO$  üretimindeki azalmanın ve karaciğerin stallet hücrelerinin artmış olan kontraksiyonunun sirotik karaciğerdeki intrahepatik rezistansın artışına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (9).  $NO$ 'in son ürünleri olan nitrit ve nitrat düzeylerinin sirozlu hastaların serumunda arttığı ve bu artışın endotoksemi ile paralellik gösterdiği bildirilmiştir (10).

Fasciolasiste genç parazitlerin karaciğerdeki göçleri sırasında oluşan mekanik hasarın serbest radikal oluşumu, antioksidant enzim sistemi ve  $NO$  üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını anlayabilmek için sağlıklı ve fasciolasizli koyunların kan ve karaciğer dokularında lipid peroksidasyonu, katalaz, glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri ile  $NO$  düzeylerinin ölçülmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırma materyallerini, Elazığ Elet Tesislerine getirilerek yaş ve cinsiyet ayrımı yapılmaksızın klinik ve postmortem muayene sonrası sağlıklı ve fasciolasis teşhisi konulan koyunlardan alınan ortalama 44 adet kan ve 35 adet karaciğer doku örnekleri oluşturmuştur. Kan ve doku örnekleri kesim sırasında alınarak en kısa zamanda laboratuvara getirilip analizlere tabi tutulmuştur.

Antikoagülanlı alınan kan örneklerinden bir miktar ayrılarak GSH-Px aktivitesine ve hemoglobin miktarına bakılmıştır. Geriye kalan kanlar santrifüj edilerek plazmaları ayrılmış ve bu plazmada malondialdehid (MDA) tayini yapılmıştır. Plazması ayrıldıktan sonra kanlar 3 defa serum fizyolojik ile yıkanmak suretiyle hazırlanan hemolizatta katalaz aktivitesine ve hemoglobin miktarına bakılmıştır.  $NO$  tayini için serum kullanılmıştır. Serum fizyolojik içinde laboratuvara getirilen karaciğer doku örneklerini homojenize etmek için MDA tayininde % 1,15'lik KCl, katalaz tayininde % 1'lik triton x -100, GSH-Px tayininde tris tamponu ve  $NO$  tayininde fosfat tamponu kullanılmıştır.

Plazmada MDA tayini modifiye edilmiş Yagi (11), dokularda ise Ohkawa (4) yöntemiyle spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Bu metot lipid peroksidasyonunun aldehid ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbansının 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır.

Eritrosit ve doku katalaz aktivitesi Aebi (12) metodu ile saptanmıştır.  $H_2O_2$ 'in katalaz tarafından yıkım hızı,  $H_2O_2$ 'in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Eritrosit ve doku GSH-Px aktivitesi Beutler (13) metoduna göre, NADPH'in NADP<sup>+</sup>'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak okunması ile tayin edilmiştir.  $NO$  düzeyi Griess yöntemine göre ölçülmüştür (14). Serumda ve dokuda  $NO$  düzeyi, nitrit ve nitratın toplamı olarak ölçülmüştür. Protein miktarları Lowry (15), hemoglobin miktarı ise siyanomethemoglobin (16) yöntemine göre yapılmıştır. Sonuçlar student-t testi ile değerlendirilmiştir.

## Bulgular

Tablo 1'de kontrol ve fasciolasisli koyunların plazma MDA düzeyleri, eritrosit katalaz ve GSH-Px aktiviteleri ile serum NO<sup>•</sup> düzeyleri gösterilmiştir. Plazma MDA, eritrosit katalaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri ile serum NO<sup>•</sup> düzeyleri kontrol grubunda sırasıyla,  $1,85 \pm 0,68$  nmol/ml,  $15,88 \pm 5,10$  k/g Hb,  $58,90 \pm 16,75$  U/g Hb,  $47,60 \pm 10,38$   $\mu$  mol/L iken, fasciolasisli grupta sırasıyla  $1,99 \pm 0,60$  nmol/ml,  $15,02 \pm 5,80$  k/g Hb,  $51,65 \pm 11,65$  U/g Hb,  $46,33 \pm 12,65$   $\mu$  mol/L olarak saptanmıştır.

Tablo 2'de karaciğer dokusunda MDA düzeyi, katalaz ve GSH-Px aktiviteleri ile NO<sup>•</sup> düzeyleri sırasıyla kontrol grubunda  $28,25 \pm 7,09$  nmol/g doku,  $1548 \pm 526,17$  k/g protein,  $34,63 \pm 9,50$  U/g protein,  $37,05 \pm 7,21$   $\mu$  mol/L iken, fasciolasisli grupta sırasıyla  $1,18 \pm 1,41$  nmol/g doku,  $484,27 \pm 189,98$  k/g protein,  $90,54 \pm 33,19$  U/g protein,  $11,45 \pm 2,82$   $\mu$  mol/L olarak ölçülmüştür.

Kontrol grubu ile fasciolasisli grup arasında plazma MDA düzeyleri, eritrosit katalaz ve GSH-Px aktiviteleri ile

serum NO<sup>•</sup> düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $P > 0,05$ ). Doku MDA, NO<sup>•</sup> düzeyleri ile katalaz aktivitesi kontrol grubuna göre düşerken, GSH-Px aktivitesinde bir artış gözlenmiştir ( $P < 0,01$ ).

## Tartışma

*F. hepatica* gibi ruminantlarda yaygın olarak görülen karaciğer parazitleri konakçılarının karaciğerinde büyük harabiyet meydana getirdiği için karaciğer enzim aktivitelerinde de değişiklikler gözlenmektedir.

Lipid peroksidasyonu ve sonuçları ilk aşamada biyolojik zararları ilgilendirir. Kanser hücrelerinde lipid peroksidasyonu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada; tümörün büyüme hızıyla ilgili olarak peroksidasyon derecesinin azaldığı görülmüştür. Peroksidasyona karşı hücrenin duyarlılığının azalması hücrel membranlardaki lipid kompozisyonunun değişmesi özellikle de PUFA'lerinin belirgin derecede azalması ve membranın statik ve dinamik özelliklerinin değişmesiyle açıklanmıştır (17).

Tablo 1. Sağlıklı ve *Fasciola hepatica* ile Enfekte Koyunların Plazma MDA Düzeyleri, Eritrosit Katalaz ve GSH-Px Aktiviteleri ile Serum NO<sup>•</sup> Düzeyleri.

	MDA nmol/ml		Katalaz k/g Hb		GSH-Px U/g Hb		Nitrik Oksit $\mu$ mol/L	
	n		n		n		n	
Kontrol Grup	70	$1,85 \pm 0,68$	72	$15,88 \pm 5,10$	28	$58,90 \pm 16,75$	20	$47,60 \pm 10,38$
Fasciolasisli Grup	64	$1,99 \pm 0,60$	74	$15,02 \pm 5,80$	13	$51,65 \pm 11,65$	15	$46,33 \pm 12,65$
P		>0,05		>0,05		>0,05		>0,05

Tablo 2. Sağlıklı ve *Fasciola hepatica* ile Enfekte Koyunların Karaciğer Dokusunda MDA Düzeyleri, Katalaz ve GSH-Px Aktiviteleri ile NO<sup>•</sup> Düzeyleri.

	MDA nmol/ gr doku		Katalaz k/g protein		GSH-Px U/g protein		Nitrik Oksit $\mu$ mol/L	
	n		n		n		n	
Kontrol Grup	40	$28,25 \pm 7,09$	50	$1548 \pm 526,17$	21	$34,63 \pm 9,50$	20	$37,05 \pm 7,21$
Fasciolasisli Grup	20	$1,18 \pm 1,41$	20	$484,27 \pm 189,98$	20	$90,54 \pm 33,19$	20	$11,45 \pm 2,82$
p		<0,01		<0,01		<0,01		<0,01

Zidenberg-Cherr ve ark. (18)'ları 12-20 ay süre ile alkolle besledikleri domuzlarda karaciğer homojenatı ve mikrozomlarda aşırı doymamış yağ asidi miktarının azaldığını ve bunun sonucu olarak peroksid oluşum indeksinin de düşük olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada fasciolisli hayvanların plazma MDA düzeylerinde herhangi bir değişiklik olmadığı, karaciğer MDA düzeylerinde ise kontrollere göre önemli oranda bir düşme meydana geldiği gözlenmiştir. Karaciğer dokusunun ileri derecede fibrotik olması, hücre membran yapısının bozulmuş olabileceğini ve bunun da hücrenin lipid peroksidasyonuna karşı direnç sağlayabileceğini düşündürmektedir.

Karaciğer hücrelerinin şişmesi ve dejenerasyonu ile karakterize olan Hindistan çocukluk devresi sirozunda, antioksidant enzimlerden katalaz aktivitesi sağlıklı kişilere oranla önemli derecede azalmıştır. Moleküler düzeyde yapılan araştırmalar sonucunda DNA fragmentasyonunda bir artış görülmüştür. Nükleusta bakırın birikmesi ve katalaz aktivitesindeki azalma bu hastalıkta görülen hepatositlerdeki DNA fragmentasyonu ile ilgili bulunmuştur (19).

Sanz ve ark. (20)'ları tarafından yapılan bir çalışmada; ratlara 6 ay boyunca haftada 3 kez intraperitoneal tiyoasetamit verilerek hiperplastik nodüler siroz oluşturulmuş ve bazı enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda peroksitlerin eliminasyonundan sorumlu olan enzimlerden katalaz ve GSH-Px 6 aylık intoksikasyonun sonucunda belirgin derecede azalmış, Cu-Zn ve Mn süperoksid dismutaz ise toksikasyon süresince artmaya devam etmiştir.

Cordero ve ark. (21)'ları tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli karaciğer hastalıklarında (steatosis, alkolik hepatitis, hepatik siroz, aktif kronik hepatitis ve şiddetli kronik aktif hepatitis) karaciğer ve eritrosit GSH-Px aktiviteleri ile MDA seviyeleri ölçülmüş ve bu ölçümler sonucunda eritrosit GSH-Px aktivitesinde bir değişiklik görülmemiştir. Karaciğerde ise kontrol grubuna göre steatosisde GSH-Px aktivitesi artmıştır. Alkolik karaciğer hastalığının başlangıç aşamasındaki toksik ajanlar tarafından meydana getirilen aktivite artışı karaciğer hasarındaki artış ile açıklanmıştır. Karaciğer MDA seviyesi ile GSH-Px arasında kontrol grubunda negatif bir korelasyon görülmüştür.

Yağlı karaciğer ile ilgili yapılan bir çalışmada (22), ratlar deneysel olarak alkol ile beslenmiş ve karaciğer

GSH-Px aktivitesi ve lipid peroksidasyonu ölçülmüştür. Karaciğer lipid peroksidasyon içeriği 4-6. haftalarda artmış, GSH-Px aktivitesi 4. haftada artmıştır. Karaciğer GSH-Px aktivitesindeki artışın lipid peroksid üretimiyle ilgili olabileceği şeklinde yorum getirilmiştir.

Yılmaz ve Bahçecioğlu (23) yapmış oldukları bir çalışmada CCl<sub>4</sub> ile ratlarda siroz oluşturmuş ve karaciğer dokusunda MDA, GSH-Px, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve pirüvat kinaz aktivitelerini ölçmüşlerdir. Sirozlu grubun karaciğer MDA düzeylerinin kontrollere göre yüksek, GSH-Px aktivitelerinin, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerinin ise düşük olduğunu bulmuşlardır.

*F. hepatica* ile ilgili olarak yapılan bu araştırmada, eritrosit katalaz, GSH-Px enzim aktivitesinde sağlıklı ve fasciolisli hayvanlar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamazken, fasciolisli hayvanlarda karaciğer katalaz enzim aktivitesinde düşüş, GSH-Px enzim aktivitesinde ise artış tespit edilmiştir. Katalaz ve GSH-Px ile ilgili sonuçlar yapılan çalışmalar ile uyum içerisindedir.

Gupta ve ark. (24)'ları tarafından sirotik intrahepatik mikrosirkülasyonda artmış vasküler ton üzerine endoteliumun fonksiyonel rolünün araştırıldığı çalışmada sirotik ratların intrahepatik mikrosirkülasyonunda NO<sup>-</sup> üretiminde bir azalma ve endotelial disfonksiyonu gözlenmiştir. Yapılan çalışmada sirotik karaciğerlerde nitrit ve nitrat üretiminin belirgin olarak azaldığı bulunmuştur. Sirotik mikrosirkülasyonda asetilkoline verilen damar gevşetici cevabın azalması vazorelaksasyon sağlayıcı faktörlerin sentezinin azalması ile açıklanmıştır. Sirotik karaciğerdeki NO<sup>-</sup> üretiminin azalması endotelial disfonksiyonu doğrulamaktadır.

Cervi ve ark. (25)'ları tarafından *F. hepatica* ile enfekte ratlarda mitojenlere karşı mononükleer dalak hücrelerinin proliferatif cevaplarının araştırıldığı çalışmada, NO<sup>-</sup> seviyelerini belirlemek için peritoneal hücre süpernatant kültürlerinde nitrit düzeyleri ölçülmüştür. Lipopolisakkarit uyarımlı peritoneal hücreler tarafından üretilen NO<sup>-</sup> miktarında giderek bir azalma belirlenmiş ve bu azalma *F. hepatica*'nın ekskretor-sekretor antijenleri ile kısmen ilgili bulunmuştur. Öte yandan enfekte ratların peritoneal hücreleri tarafından üretilen NO<sup>-</sup> miktarındaki azalma peritoneal göç boyunca NO<sup>-</sup>'in öldürücü etkisinden kaçınmak için parazitine stratejilerinden biri olabilir.

Çalışmada sağlıklı hayvanlardaki değerler ile karşılaştırdığımızda fascioliasisin serum NO<sup>+</sup> düzeyini etkilemediği, ancak karaciğer NO<sup>+</sup> düzeyini önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Karaciğer ile ilgili olarak bulunan bu sonuçlar Gupta ve ark.'ları (24) ile Cervi ve ark.'larının (25) yapmış olduğu çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

*F. hepatica* enfeksiyonu sonucu karaciğer dokusunda MDA düzeyinde, katalaz aktivitesinde ve NO<sup>+</sup> düzeyinde meydana gelen düşüş karaciğer dokusunun ileri derecede fibrotik olmasından kaynaklanabilir. Karaciğerdeki hasarın kandaki parametreleri değiştirmemesi, *F. hepatica*'nın yapmış olduğu hasarın endotoksemik değil de mekanik olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

## Kaynaklar

1. Aykan, T.B., Tüzüner, N., Sav, A., İnce, Ü.: Kısa Patoloji. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, 1990.
2. Aytuğ, C.N., Alaçam, E., Özkoç, Ü., Yalçın, B.C., Türker, H., Gökçen, H.: Koyun-Keçi Hastalıkları ve Yetiştiriciliği. Tüm-Vet Hay. Hizm. Yay. No: 2. İstanbul, 1990.
3. Halliwell, B.: Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry and Role in Human Disease. Am. J. Med. 1991; 91: 14-21.
4. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.: Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. Anal. Biochem. 1979; 95: 351-358.
5. Laurie, D., Kaplowitz, D.N.: Glutathione Metabolism and Its Role in Hepatotoxicity. Pharmacol. Ther. 1991; 52: 287-305.
6. Lunec, J., Blake, D.: Oxygen Free Radicals: Their Relevance to Disease Processes. In: Cohen R.D., Lewis B., Albert K.G.M.M. The Metabolic and Molecular Basis of Acquired Disease. Balliere Tindall, London. 1990; 189-212.
7. Barrett, J.: Peroxide Metabolism in the Liver Fluke, *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 1980; 66: 697.
8. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A.: Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. Pharmacol. Rev. 1991; 43: 109-142.
9. Fiorucci, S., Antonelli, E., Morelli, O., Mencarelli, A., Casini, A., Mello, T., Palazzetti, B., Tallet, D., Soldato, P., Morelli, A.: NCX-1000, a NO-Releasing Derivate of Ursodeoxycholic Acid, Selectively Delivers NO to the Liver and Protects against Development of Portal Hypertension. Physiology. 2001; 98: 8897-8902.
10. Guarner, C., Sorino, G., Tomas, A., Bulbena, O., Novella, M.T., Balanzo, J., Vilardell, F., Mourelle M., Moncada S.: Increased Serum Nitrate and Nitrite Levels in Patients with Cirrhosis; Relationship to Endotoxemia. Hepatology. 1993; 18: 1139-1143.
11. Yagi, K.: Assay for Blood Plasma or Serum. Methods Enzymol. 1984; 105: 328-331.
12. Aebi, H.: Catalase. In Vitro. Methods Enzymol. 1984; 105: 121-126.
13. Beutler, A.: A Manual of Biochemical Methods. 2<sup>nd</sup> Ed. Grunef Strottan, New York. 1975.
14. Lyall, F., Young, A., Greer, I.A.: Nitric Oxide Concentrations Are Increased in the Fetoplacental Circulation in Preeclampsia. Am. J. Obstet. Gynecol. 1995; 173: 714-718.
15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193: 265-275.
16. Tietz, N.W.: Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986; pp 1532-1534.
17. Masotti, L., Casali, E., Gesmundo, N., Sartor, G., Borello, S., Piretti, M.V., Pagliuca, G.: Lipid Peroxidation in Cancer Cells: Chemical and Physical Studies. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1988; 551: 47-57.
18. Zidenberg-Cherr, S., Halsted, C.H., Olin, K.L., Reisenauer, A.M., Keen, C.L.: The Effect of Chronic Alcohol Ingestion on Free Radical Defence in the Miniature Pig. J. Nutr. 1990; 120: 213-217.
19. Prasad, R., Kaur, G., Nath, R., Wallia, B.N.: Molecular Basis of Pathophysiology of Indian Childhood Cirrhosis: Role of Nuclear Copper Accumulation in Liver. Mol. Cell. Biochem. 1996; 156: 25-30.
20. Sanz, N., Diez-Fernandez, C., Fernandez-Simon, L., Alvarez, A., Cascales, M.: Relationship between Antioxidant Systems, Intracellular Thiols and DNA Ploidy in Liver of Rats during Experimental Cirrhogenesis. Carcinogenesis. 1995; 16: 1585-1593.
21. Cordero, R., Ortiz, A., Hernandez, R., Lopez, V., Gomez, M.M., Mena, P.: Hepatic and Erythrocytic Glutathione Peroxidase Activity in Liver Diseases. Rev. Esp. Fisiol. 1996; 52: 167-172.
22. Lizuka, J., Sato, J., Sugimoto, M.: Glutathione S-Transferase in Alcoholic Fatty Liver. Arukuro Kenkyuto Yakabutsu Ison. 1991; 26: 428-446.
23. Yılmaz, S., Bahçecioglu, İ.H.: Karbontetraklorür ile Siroz Oluşturulmuş Ratlarda Lipid Peroksidasyonu, Antioksidant Enzim ve Pirüvat Kinaz Aktiviteleri. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2000; 24: 25-28.
24. Gupta, T.K., Toruner, M., Chung, M.K., Groszmann, R.J.: Endothelial Dysfunction and Decreased Production of Nitric Oxide in the Intrahepatic Microcirculation of Cirrhotic Rats. Hepatology. 1998; 28: 926-931.
25. Cervi, L., Rossi, G., Cejas, H., Masih, D.T.: *Fasciola hepatica*-Induced Immune Suppression of Spleen Mononuclear Cell Proliferation: Role of Nitric Oxide. Clin. Immunol. Immunopathol. 1998; 87: 145-154.