

Rola stresu oksydacyjnego po transplantacji wątroby

The role of oxidative stress after liver transplantation

Piotr Czubkowski, Joanna Pawłowska, Piotr Socha

Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii, Warszawa, Polska

Summary: Imbalance between generation of free radicals and defense mechanisms leads to oxidative stress. In children after liver transplantation it results from ischemia-reperfusion, immunosuppression and post-transplant complications. Moreover, in the next years so as to increase the donor pool, we have to prepare for more challenging grafts vulnerable to oxidative injury, primary graft dysfunction and rejection. We discuss pathogenesis, complications and ways of action against oxidative stress in pediatric liver transplant recipients.

Słowa kluczowe: wolne rodniki • stres oksydacyjny • transplantacja wątroby

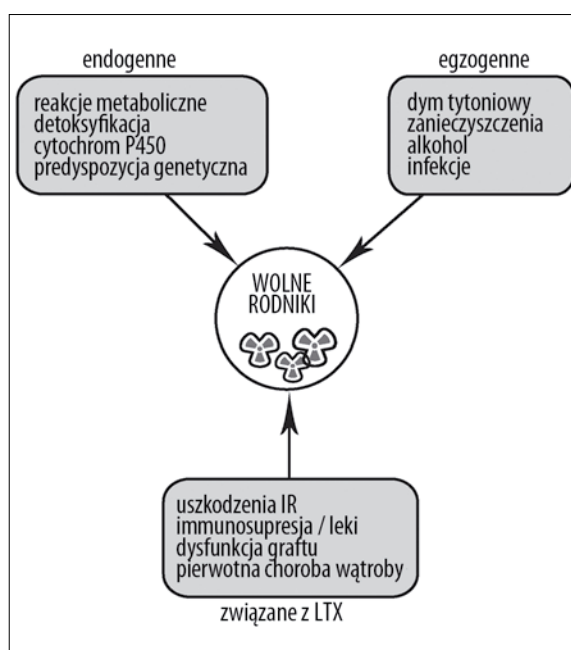
Key words: oxidative stress • liver transplantation

Adres do korespondencji: Piotr Czubkowski, Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Immunologii Instytut „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka”, Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa, e-mail: piotr.czubkowski@mp.pl

Wstęp

Wolne rodniki są to wysoce reaktywne molekuly posiadające przynajmniej jeden niesparowany elektron. Najbardziej powszechne są reaktywne pochodne tlenu (ROS): anionorodnik ponadtlenkowy ($*O_2$), rodnik hydroksylowy ($*OH$) oraz rodnik wodoronadtlenkowy ($HOO*$) [1]. Powstają wskutek działania szeregu czynników zewnętrznych oraz wewnętrznych na metabolizm komórkowy (Rycina 1). W hepatocytach, produkcja wolnych rodników oparta jest o reakcje łańcucha oddechowego w mitochondriach oraz cytochrom P450 w cytoplazmie. Dodatkowym źródłem ROS są komórki Kupfera oraz neutrofile naciekające wątrobę podczas odpowiedzi zapalnej.

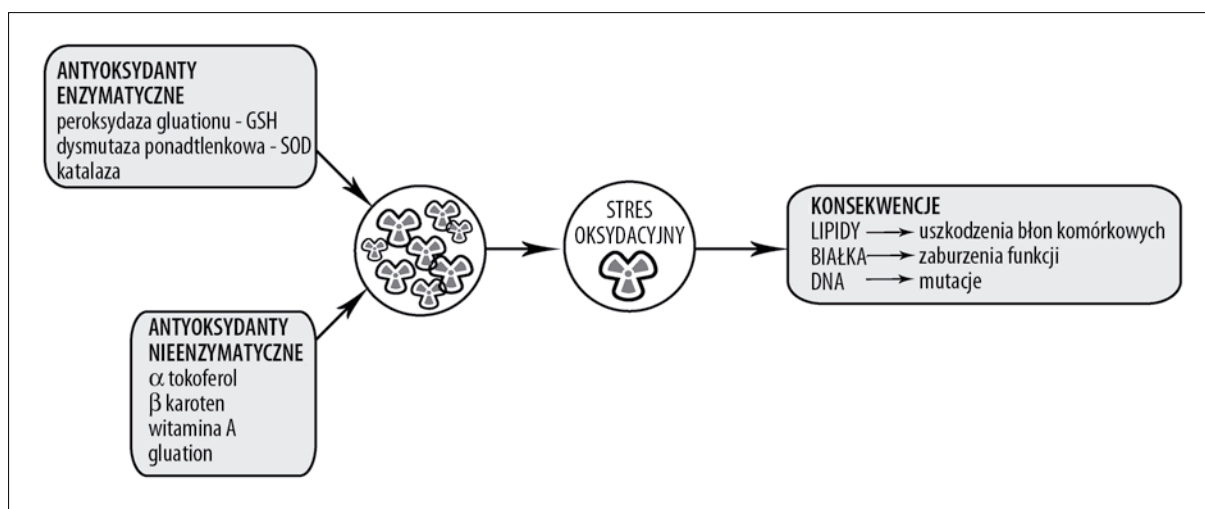
W warunkach fizjologicznych nadmiar ROS jest stale buforowany przez antyoksydacyjny system obronny oparty głównie o enzymatyczne i nieenzymatyczne wymiatacze wolnych rodników (Rycina 2). Barierą pierwszej linii jest dysmutaza ponadtlenkowa (SOD – *superoxide dismutase*), peroksydaza glutationowa (GPX – *glutathione peroxidase*) oraz katalaza [2]. Substratem dla GPX jest glutation (GSH), który może również bezpośrednio neutralizować wolne rodniki. GSH działający głównie wewnątrzkomórkowo jest zaangażowany w szereg procesów metabolicznych, chroniąc między innymi przed utlenieniem grupy sulfhydrylowe białek [3]. Pozostałe istotne antyoksydanty to witamina A, witamina E oraz B-karoten. Podkreślić należy, iż mechanizmy obronne są ściśle ze sobą powiązane, czego przykładem



Rycina 1. Czynniki wpływające na genezę wolnych rodników po transplantacji wątroby.

może być odbudowa potencjału antyoksydacyjnego witaminy E katalizowana przez peroksydazę glutationową i witaminę C [4].





Rycina 2. W przypadku niewydolności mechanizmów obronnych dochodzi do stresu oksydacyjnego.

W przypadku zaburzenia równowagi dochodzi do stresu oksydacyjnego i związanych z nim konsekwencji molekularnych, a następnie klinicznych. Nadmiar ROS prowadzi do uszkodzenia błon komórkowych wskutek peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, zaburzenia funkcji białek oraz mutacji DNA. Najważniejsze kliniczne skutki uszkodzenia wolnorodnikowego to powikłania sercowo-naczyniowe, nowotworowy oraz choroby neurodegeneracyjne.

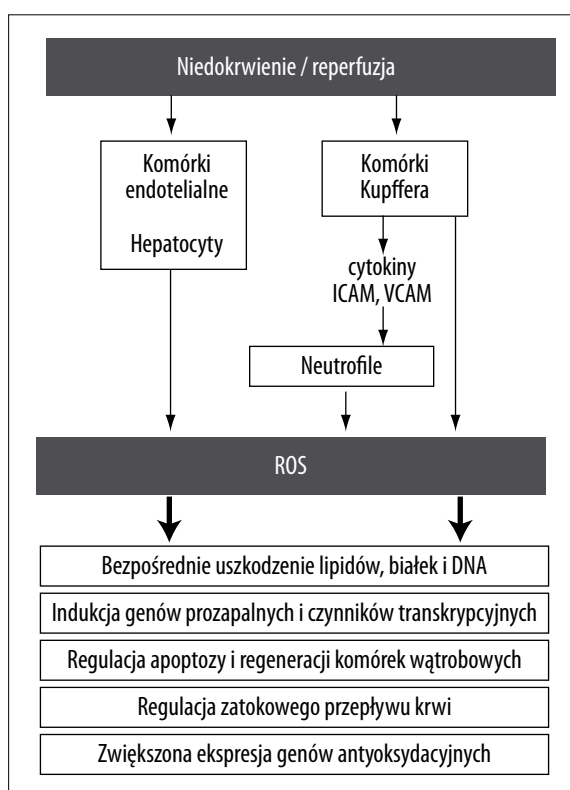
W warunkach klinicznych nie jesteśmy w stanie zmierzyć wolnych rodników. Możemy natomiast zastosować szereg metod, które w sposób pośredni oceniają status oksydacyjny. Opierają się one o pomiary poszczególnych antyoksydantów (aktywność enzymów, poziomy witaminy A, E itd.) oraz markerów uszkodzenia tkankowego (TBARS – *thiobarbituric reactive substances*, oksydowany LDL, ADMA – *asymmetric dimethylarginine*).

Grupa pacjentów po transplantacji wątroby (LTx) jest szczególnie narażona na działanie stresu oksydacyjnego. Geneza wolnych rodników tlenowych ma tu charakter wieloczynnikowy wynikający z uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego, leczenia immunosupresyjnego oraz powikłań poprzeczczepowych. Dodatkowym aspektem jest „bagaż” oksydacyjny związany z podstawową chorobą wątroby prowadzącą do transplantacji.

Stres oksydacyjny po transplantacji

Rola wolnych rodników w uszkodzeniu reperfuzyjnym

Uszkodzenie niedokrwiennie-reperfuzyjne (I/R – *ischemic reperfusion injury*) jest jednym największych i jak dotąd nierozwiązanych problemów transplantacyjnych. Predisponuje do pierwotnego braku funkcji narządu oraz ostrego odrzucania [5]. Zimne niedokrwienie jest lepiej tolerowane przez narząd, a do uszkodzenia dochodzi głównie w trakcie reperfuzyj. Szereg złożonych reakcji z udziałem komórek Kupfera [6], molekuł adhezyjnych [7], cytokin [8] i dopełniacza [9], prowadzi do masowego uwolnienia wolnych rodników [10], których działanie jest wielokierunkowe (Rycina 3). Przede wszystkim bezpośrednio uszkadzają komórki wątrobowe poprzez peroksydację lipidów, degradację białek i uszkodzenie DNA. Odgrywają istotną rolę w indukcji ekspresji



Rycina 3. Rola wolnych rodników w uszkodzeniu niedokrwiennie-reperfuzyjnym wątroby.

genów prozapalnych (TNF-alfa, IL-1, IL-8) [11] i czynników transkrypcyjnych (NF-kappa-B, aktywator proteiny-1) [12]. Biorą także udział w regulacji procesów apoptozy, nekrozy i regeneracji komórkowej [13] oraz indukują mechanizmy antyoksydacyjne [14].

Leczenie immunosupresyjne

Leczenie immunosupresyjne uważane jest za dodatkowy czynnik ryzyka stresu oksydacyjnego jednak danych z piśmiennictwa jest niewiele. Garnot i wsp. [15] ocenili status oksydacyjny u 23 dzieci 1,5–12 lat po przeszczepieniu wątroby. Pacjenci otrzymywali inhibitory kalcineuryny (14 cyklosporynę, 9 takrolimus) i byli porównani z grupą kontrolną

zdrowych i podobnych wiekowo dzieci. Nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie markerów stresu oksydacyjnego. U 35 pacjentów po transplantacji wątroby wykonanej w IPCZD oceniano zaburzenia gospodarki lipidowej oraz markery stresu oksydacyjnego od 3–5 lat po LTx. Warunkiem włączenia do badania były prawidłowe wyniki badań laboratoryjnych oraz brak istotnych komplikacji w ciągu ostatnich 6 miesięcy (ciężkie infekcje, ostre odrzucanie). Stwierdzono jedynie istotne obniżenie poziomu glutationu w porównaniu z grupą kontrolną, bez różnic pomiędzy stosowanymi inhibitorami kalcyneuryny (CsA/TAC). Parametry gospodarki lipidowej nie były zaburzone [16].

Antyoksydacyjne właściwości takrolimusa opisywano po ciężkim niedokrwieniu wątroby [17] jak również po transplantacji nerki, gdzie takrolimus korzystniej wpływał na profil lipidowy oraz markery miażdżycy [18].

Ostre odrzucanie narządu

Eozynofile naciekające wątrobę podczas epizodu ostrego odrzucania mają istotne znaczenie zarówno w patogenezie, jak również mogą odgrywać rolę prognostyczną [19]. Peroksydaza eozynofilowa (EPO – *eosinophil peroxidase*) katalizuje reakcję powstania niezwykle toksycznego kwasu podchloraowego (HOCl), indukującego apoptozę komórek epitelialnych dróg żółciowych [20]. Uwalniany z komórek Kupffer'a TNF- α jest kolejnym mediatorem w inicjacji apoptozy [21]. W badaniach na szczurach wykazano, że wzrost TNF- α mRNA korelował z ciężkością ostrego odrzucania narządu i uszkodzeniem DNA [22].

Interwencje antyoksydacyjne

Jednym z podstawowych wyzwań w transplantacji wątroby jest zminimalizowanie uszkodzenia reperfuzyjnego oraz długoterminowa kontrola statusu oksydacyjnego po przeszczepieniu narządu. Aktualnie trzy główne strategie mogą odgrywać rolę w neutralizowaniu skutków I/R: leczenie farmakologiczne, kondycjonowanie niedokrwienne (IP – *ischemic preconditioning*) oraz terapia genowa.

Szereg antyoksydantów podawanych doustnie, dożylnie oraz jako dodatek do płynów perfuzyjnych może mieć korzystne działanie podczas uszkodzenia reperfuzyjnego (Tabela 1) [23–46]. W większości są to niestety badania na zwierzętach. Najlepiej udokumentowano efekt antyoksydacyjny dla N-acetylocysteiny (NAC) [47]. NAC w połączeniu z prostaglandyną E, daje zmniejszenie maksymalnej aktywności ALT po transplantacji, skrócenie średniego czasu pobytu w szpitalu, jak również łagodzi przebieg ostrego odrzucania [48]. Zastosowanie u dawców nie wykazało jednak istotnych korzyści [49].

IP polega na stworzeniu krótkotrwałych epizodów niedokrwienia, które indukują komórkowe mechanizmy obronne. Dochodzi między innymi do zahamowania aktywności interleukiny-1, indukcji HSP70 oraz hemoksygenazy-1 (HO-1). W konsekwencji zwiększają się możliwości regeneracyjne wątroby i zmniejsza uszkodzenie reperfuzyjne [50].

Propozycje terapii genowej prezentują się zachęcająco z uwagi na obiecujące wyniki u zwierząt, jednak użycie wektorów wirusowych w praktyce klinicznej powinno być bardzo ostrożne. W badaniach na szczurach transfer materiału

Tabela 1. Wybrane substancje antyoksydacyjne zmniejszające uszkodzenie niedokrwienno-reperfuzyjne.

Antyoksydant	Rodzaj badania	Droga podania	Piśm.
α -tokoferol	szczur	<i>iv</i>	23
α -tokoferol/kwas askorbinowy	kliniczne	<i>iv</i>	24
Allopurinol	szczur	<i>ip</i>	25
Kwas askorbinowy	szczur	<i>iv</i>	26
ANP	szczur	<i>iv</i>	27
Bucillamina	szczur	<i>iv</i>	28
Deferoksamina	pies	<i>iv</i>	29
Ebselen	szczur	<i>po</i>	30
Wyciąg z zielonej herbaty	szczur	<i>po</i>	31
Glutation	szczur	<i>iv</i>	32,33
Idebenon	szczur	<i>sol</i>	34
Leflunomid	szczur	<i>ig</i>	35
Kwas liponowy	szczur	<i>iv</i>	36
Melatonina	szczur	<i>po</i>	37
Metylprednisolon	człowiek	<i>iv</i>	38
Metylprednisolon	szczur	<i>iv</i>	39
Montelukast	szczur	<i>ip</i>	40
N-acetylocysteina	królik	<i>iv</i>	41
N-acetylocysteina	kliniczne	<i>iv</i>	42
Nikaraven	pies	<i>iv</i>	43
Relaksyna	szczur	<i>sol</i>	44
Quercetyna	szczur	<i>po</i>	45
Sylibilina	szczur	<i>sol</i>	46

iv – dożylnie; *sol* – płyn perfuzyjny; *po* – doustnie; *ig* – dożyłkowo; *ip* – dootrzewnowo; ANP – przedśionkowy peptyd natriuretyczny.

genetycznego odpowiedzialnego za ekspresję enzymów antyoksydacyjnych (SOD, katalaza) w postaci wektorów zwiększał prawdopodobieństwo przeżycia, zmniejszał uszkodzenie graftu po reperfuzji, zapobiegał pierwotnemu niepodjęciu funkcji poprawiał status antyoksydacyjny [51–53].

Suplementacja antyoksydacyjna po transplantacji

Pacjenci po transplantacji wątroby są niewątpliwie grupą podwyższonego ryzyka uszkodzenia wolnorodnikowego. Pozostaje zatem pytanie czy i którzy pacjenci powinni otrzymywać leczenie antyoksydacyjne. Jednym z głównych problemów w ocenie zagrożenia jest fakt, iż metody stosowane w ocenie statusu oksydacyjnego, nie odzwierciedlają rzeczywistego uszkodzenia oksydacyjnego tkanek. Dodatkowo brak jest norm wiekowych, szczególnie u pacjentów pediatrycznych.

Nie udowodniono jak dotąd skuteczności leczenia antyoksydacyjnego w zapobieganiu chorobom związanym ze stresem



oksydacyjnym, w szczególności powikłaniom sercowo-naczyniowym, nowotworom czy chorobom neurodegeneracyjnym. Co więcej, skutki zastosowania dużych dawek antyoksydantów są nieprzewidywalne i mogą paradoksalnie prowadzić do ciężkich powikłań. Zastosowanie alfa-tokoferolu zwiększało ryzyko gruczolaków odbytnicy [54], śmiertelność w przebiegu raka trzustki [55] oraz częstość występowania krwotoku mózgowego [56].

Z uwagi na brak wystarczających danych z piśmiennictwa trudno jest ustalić rekomendacje odnośnie leczenia antyoksydacyjnego po transplantacji wątroby. Należy jednak mieć świadomość ingerencji w równowagę oksydacyjną oraz szeregu fizjologicznych procesów, w których istotną rolę odgrywają wolne rodniki [57,58].

Zastosowanie wymiataczy rodników powinno być zatem zawsze prowadzone ostrożnie, najlepiej w ramach kontrolowanych badań klinicznych.

Piśmiennictwo:

- Ostrowska J, Makiela M, Zwierz K: Udział stresu oksydacyjnego w uszkodzeniach wątroby. *Med Sci Rev Hepatol*, 2004; 4: 28–32
- Halliwell B, Evans PJ, Kaur H i wsp.: Free radicals, tissue injury and human disease: a potential for therapeutic use of antioxidants. W: Kinney JM, Tucker HN (red). *Organ Metabolism and Nutrition: Ideas for Future Critical Care*. New York, NY, Raven Press, 1994; 425–45
- Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL: Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology*, 1999; 117: 200–10
- Socha P, Litwin M: Scurvy diagnosed in a pediatric liver transplant awaiting combined kidney and liver transplantation. *Pediatr Transplant*, 2008; 12(3): 257–60
- Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*, 1992; 53: 957–78
- Caldwell-Kenkel J, Currin R, Tanaka Y i wsp.: Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology*, 1991; 13: 83–95
- Glantzounis GK, Mikhailidis DP, Seifalian AM i wsp.: Pharmacological Modulation of Liver Ischemia – Reperfusion Injury. *Current Pharmaceutical Design*, 2006; 12(23): 2863–65
- Rudiger HA, Clavien PA: Tumor necrosis factor-alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*, 2002; 122: 202–10
- Jaeschke H, Farhood A: Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol*, 1993; 264: G801–9
- Jaeschke H: Kupffer cell-induced oxidant stress during hepatic ischemia-reperfusion: does the controversy continue? *Hepatology*, 1999; 30: 1527–28
- Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H i wsp.: Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*, 2000; 32: 169–73
- Liu TZ, Lee KT, Chern CL i wsp.: Free radical-triggered hepatic injury of experimental obstructive jaundice of rats involves overproduction of pro-inflammatory cytokines and enhanced activation of nuclear factor kappaB. *Ann Clin Lab Sci*, 2001; 31: 383–90
- Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 1989; 320: 365–76
- Nakatani T, Inouye M, Mirochnitchenko O: Overexpression of antioxidant enzymes in transgenic mice decreases cellular ploidy during liver regeneration. *Exp Cell Res*, 1997; 236: 137–46
- Granot E, Elinav H, Kohen R: Markers of Oxidative Stress in Cyclosporine-Treated and Tacrolimus-Treated Children After Liver Transplantation. *Liver Transpl*, 2002; 8: 469–75
- Wierzbička A, Pawłowska J, Socha P i wsp.: Lipid, Carbohydrate Metabolism, and Antioxidant Status in Children After Liver Transplantation. *Transpl Proc*, 2007; 39(5): 1523–25
- Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ i wsp.: Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation*, 1997; 64(4): 594–98
- Perrea DN, Moulakakis KG, Poulakou MV i wsp.: Correlation between oxidative stress and immunosuppressive therapy in renal transplant recipients with an uneventful postoperative course and stable renal function. *Int Urol Nephrol*, 2006; 38(2): 343–48
- Foster PF, Sankary HN, Hart M i wsp.: Blood and graft eosinophilia as predictors of rejection in human liver transplantation. *Transplantation*, 1989; 47: 72–74
- Salunga TL, Cui ZG, Shimoda S i wsp.: Oxidative stress-induced apoptosis of bile duct cells in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun*, 2007; 29: 78–86
- Colletti LM, Remick DG, Burtch GD i wsp.: Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest*, 1990; 85: 1936–43
- Nagakawa Y, Williams Gm, Zheng Q i wsp.: Oxidative mitochondrial DNA damage and deletion in hepatocytes of rejecting liver allografts in rats: role of TNF-alpha. *Hepatology*, 2005; 42(1): 208–15
- Gondolesi GE, Lausada N, Schinella G i wsp.: Reduction of ischemia-reperfusion injury in parenchymal and nonparenchymal liver cells by donor treatment with DL-alpha-tocopherol prior to organ harvest. *Transplant Proc*, 2002; 34: 1086–91
- Cerwenka H, Khoschsorur G, Bacher H i wsp.: Normothermic liver ischemia and antioxidant treatment during hepatic resections. *Free Radic Res*, 1999; 30: 463–69
- Karwinski W, Soreide O: Allopurinol improves scavenging ability of the liver after ischemia/reperfusion injury. *Liver*, 1997; 17: 39–143
- Seo MY, Lee SM: Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *J Hepatol*, 2002; 36: 72–77
- Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM i wsp.: Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol*, 1999; 276: G1137–44
- Amersi F, Nelson Sk, Shen Xd i wsp.: Bucillamine, a thiol antioxidant, prevents transplantation-associated reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 8915–20
- Park K, Chung KY, Sung SH i wsp.: Protective effect of desferrioxamine during canine liver transplantation: significance of peritransplant liver biopsy. *Transplant Proc*, 2003; 35: 117–19
- Ozaki M, Nakamura M, Teraoka S i wsp.: Ebselen, a novel anti-oxidant compound, protects the rat liver from ischemia/reperfusion injury. *Transpl Int*, 1997; 10: 96–102
- Zhong Z, Froh M, Connor Hd i wsp.: Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by green tea extract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002; 283: G957–64

Podsumowanie

Stan przeszczepianego organu jest jednym z najważniejszych czynników decydujących o powodzeniu transplantacji wątroby. Z uwagi na konieczność stałego zwiększania puli narządów, przyszłość transplantacji wątroby jest związana z podejmowaniem coraz bardziej ryzykownych zabiegów z użyciem marginalnych narządów (wielkość, stopień stłuszczenia, czasy niedokrwienia). Coraz lepsze wyniki transplantacji pozwalają na wieloletnie obserwacje pacjentów i ocenę odległych skutków działania stresu oksydacyjnego. Trudności z oceną skuteczności i bezpieczeństwa zastosowania przewlekłego leczenia antyoksydacyjnego, skierowały nurt badań w stronę zminimalizowania uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego. W najbliższych latach należy zatem oczekiwać optymalizacji metod chirurgicznych, zastosowania modyfikowanych płynów perfuzyjnych, a w przyszłości również technik inżynierii genetycznej.

32. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D i wsp.: Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg*, 2004; 239: 220–31
33. Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL i wsp.: Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver cells against reperfusion injury following rat liver transplantation. *World J Gastroenterol*, 2004; 10: 864–70
34. Wieland E, Schutz E, Armstrong VW i wsp.: Idirbenon protects hepatic microsomes against oxygen radical-mediated damage in organ preservation solutions. *Transplantation*, 1995; 60(5): 444–51
35. Karaman A, Fadillioglu E, Turkmen E i wsp.: Protective effects of leflunomide against ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Pediatr Surg Int*, 2006; 22: 428–34
36. Muller C, Dunschede F, Koch E i wsp.: Alpha-lipoic acid preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury of the rat liver via the PI3-kinase/Akt pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003; 285: G769–78
37. Sewerynek E, Reiter RJ, Melchiorri D i wsp.: Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatology*, 1996; 43: 898–905
38. Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A i wsp.: Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. *Ann Surg*, 2008; 248(6): 1042–50
39. Saidi Rf, Chang J, Verb S i wsp.: The effect of methylprednisolone on warm ischemia-reperfusion injury in the liver. *Am J Surg*, 2007; 193(3): 345–47
40. Daglar G, Karaca T, Yuksek YN, i wsp.: Effect of montelukast and MK-886 on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res*, 2009; 153(1): 31–38
41. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS i wsp.: Continuous infusion of N-acetylcysteine reduces liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 2004; 91: 1330–39
42. Weigand MA, Plachky J, Thies JC i wsp.: N-acetylcysteine attenuates the increase in alpha-glutathione S-transferase and circulating ICAM-1 and VCAM-1 after reperfusion in humans undergoing liver transplantation. *Transplantation*, 2001; 72: 694–98
43. Yokota R, Fukai M, Shimamura T i wsp.: A novel hydroxyl radical scavenger, nicaraven, protects the liver from warm ischemia and reperfusion injury. *Surgery*, 2000; 127: 661–69
44. Boehnert MU, Armbruster FP, Hilbig H: Relaxin as a protective substance in the preserving solution for liver transplantation. Relaxin and related peptides: Fifth International Conference: *Ann N.Y. Acad Sci*, 2009; 1160: 320–21
45. Su JF, Guo CJ, Wei JY i wsp.: Protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats by oral pretreatment with quercetin. *Biomed Environ Sci*, 2003; 16: 1–8
46. Ligeret H, Braults A, Vallerand D i wsp.: Antioxidant and mitochondrial protective effects of silibinin in cold preservation – warm reperfusion liver injury. *J Ethnopharmacol*, 2008; 12: 507–14
47. Tahan G, Tarcin O, Tahan V i wsp.: The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci*, 2007; 52(12): 3348–54
48. Bucuvalas Jc, Ryckman Fc, Krug S i wsp.: Effect of treatment with prostaglandin E1 and N-acetylcysteine on pediatric liver transplant recipients: a single-center study. *Pediatr Transplant*, 2001; 5: 274–78
49. Khan AW, Fuller BJ, Shah SR i wsp.: A prospective randomized trial of N-acetyl cysteine administration during cold preservation of the donor liver for transplantation. *Ann Hepatol*, 2005; 4: 121–26
50. Franco-Gou R, Roselló-Catafau J, Casillas-Ramirez A i wsp.: How ischemic preconditioning protects small liver grafts. *J Pathol*, 2006; 208(1): 62–73
51. Lehmann TG, Wheeler MD, Schoonhoven R i wsp.: Delivery of Cu/Zn superoxide dismutase genes with a viral vector minimizes liver injury and improves survival after liver transplantation. *Transplantation*, 2000; 69: 1051–57
52. Lehmann TG, Luedde T, Schwabe RF i wsp.: Minimizing oxidative stress by gene delivery of superoxide dismutase accelerates regeneration after transplantation of reduced-size livers in the rat. *Liver Transpl*, 2006; 12: 550–59
53. He Sq, Zhang Yh, Venugopal Sk i wsp.: Delivery of Antioxidative Enzyme Genes Protects Against Ischemia/Reperfusion-Induced Live Injury in Mice. *Liver Transpl*, 2006; 12: 1869–79
54. Mailila N, Virtamo J, Virtanen M i wsp.: The effect of alpha-tocopherol and betacarotene supplementation on colorectal adenomas in middle-aged male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999; 8: 489–93
55. Rautalahti MT, Virtamo JR, Taylor PR i wsp.: The effects of supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene on the incidence and mortality of carcinoma of the pancreas in a randomized, controlled trial. *Cancer*, 1999; 86: 37–42
56. Leppala JM, Virtamo J, Fogelholm R i wsp.: Controlled trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on stroke incidence and mortality in male smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000; 20: 230–35
57. De Lamirande E, Gagnon C: Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod*, 1995; 10(Suppl.1): 15–21
58. Ramacle J, Raes M, Toussaint O i wsp.: Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function. *Mutat Res*, 1995; 316: 103–22

