

Renal iskemi-reperfüzyon hasarında üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresinin etkisi

Mustafa Yaşar Özdamar¹, Müslim Yurtçu¹, Hatice Toy², Mehmet Aköz³, Engin Günel¹

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi ¹Çocuk Cerrahisi, ²Patoloji ve ³Biyokimya Anabilim Dalları, Konya

Amaç: Bu çalışmada üzüm çekirdeği proanthocyanidin ekstresinin (GSPE) renal iskemi-reperfüzyon (I-R) hasarında profilaktik etkisini araştırmak amaçlandı. **Yöntem:** Kırk adet sıçan her biri 10 sıçandan oluşan 4 gruba ayrıldı: Kontrol (K), sham (S), iskemi-reperfüzyon (I-R) ve I-R+ GSPE. K grubunda her iki renal pedikül eksplere edildi. S grubunda sol renal pedikül eksplere edildi ve sağ nefrektomi yapıldı. I-R ve I-R+GSPE gruplarında sağ nefrektomi sonrası, sol renal pedikülde oklüzyon (45 dakika) ve reperfüzyon (60 dakika) gerçekleştirildi. Bununla birlikte, I-R+GSPE grubuna cerrahiden önce 15 gün süre ile 15 mg/kg GSPE verildi. Dokuda malondialdehid (MDA) ve glutatyon redüktaz (GR) seviyesi; serumda üre, kreatinin, aspartat aminotransferaz (AST) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) değerlendirildi. **Bulgular:** I-R grubundaki MDA seviyeleri S ve I-R+GSPE gruplarındaki MDA seviyelerinden anlamlı olarak yüksekti. I-R grubundaki GR seviyeleri, S ve I-R+GSPE gruplarındaki GR seviyelerinden anlamlı olarak daha düşüktü. I-R grubundaki üre, kreatinin, AST ve TNF- α seviyeleri K, S ve I-R+GSPE gruplarındaki seviyelerden daha yüksekti. **Sonuç:** Profilaktik GSPE tedavisi renal I-R hasarını önemli oranda azaltır.

Anahtar kelimeler: İskemi-reperfüzyon, böbrek, hasar, üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresi

The effect of grape seed proanthocyanidin in renal ischemia-reperfusion injury

Objective: This study aimed to determine the prophylactic effect of grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) in ischemia-reperfusion (I-R) injury-induced renal tissue damage. **Methods:** Forty rats were divided into 4 groups each containing 10 rats: control (C), sham (S), I-R, and I-R+GSPE. Both renal pedicles were explored in the C group and the left renal pedicle was explored and right nephrectomy was performed in the S group. Occlusion (45 minutes) and reperfusion (60 minutes) of the left renal pedicle were performed after right nephrectomy in the I-R and I-R+GSPE groups. However, 15 mg/kg GSPE was given to the I-R+GSPE group for 15 days before surgery. The levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione reductase (GR) in tissue and urea, and levels of creatinine, aspartate aminotransferase (AST), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were evaluated. **Results:** MDA levels in the I-R group were significantly higher than those in the S and I-R+GSPE groups. GR levels in the I-R group were significantly lower than those in the S and I-R+GSPE groups. Urea, creatinine, AST, and TNF- α levels in the I-R group were higher than those in C, S, and I-R+GSPE groups. **Conclusion:** Prophylactic GSPE treatment significantly decreases renal I-R injury.

Key words: Ischemia-reperfusion, kidney, injury, grape seed proanthocyanidin extract

Genel Tıp Derg 2010;20(1):1-5

Damar cerrahisi ve özellikle böbrek transplantasyonu gibi birçok alanda ortaya çıkan I-R hasarına bağlı akut böbrek yetersizliği, yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır. Renal iskemi,

kompleks bir olayı başlatır; böbrek hücrelerinin hasarına ve ölümüne neden olur. İskemik böbrek dokusunun dolaşımının yeniden sağlanması için reperfüzyon gerekli olduğu halde, bu durum böbreğin I-R'u ile ilişkili hasar ve renal disfonksiyona neden olan ilave bir yıkıma neden olur (1,2). Özellikle proksimal epitelyal hücreler, akut tübüler nekrozun görüldüğü ve akut böbrek yetersizliği patogeneğinde önemli rol oynayan hücrelerdir (3). Böbreğin reperfüzyon hasarına neden olan patofizyolojik

Yazışma adresi: Yard.Doç.Dr.Müslim Yurtçu, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Konya

E-posta: muslimyurtcu@selcuk.edu.tr

mekanizmalar içerisinde; polimorfonükleer lökosit (PMNL)'lerin yapışma ve aktivasyonu, proinflamatuar sitokinlerin serbestleşmesi, reaktif oksijen türleri (ROT) ile reaktif nitrojen türleri (RNT) lerinin oluşumu sayılabilir (1,4,5).

Deneyel çalışmalarda allopurinol, oxypurinol, vitamin E, melatonin ve zinc aspartat gibi çeşitli antioksidan maddeler; glutathion peroksidaz, glutathion redüktaz (GR), polietilen glikol (PEG)-superoxid dismutaz (SOD), superoksid dismutaz ve katalaz gibi çeşitli antioksidan enzimler kullanılmıştır (6-13). Bundan başka, bir antioksidan ajan olan trapidil de renal I-R hasarında kullanılmıştır (14). Bununla birlikte böbrek dokusunda I-R hasarında, kuvvetli bir antioksidan ajan olan GSPE'nin koruyucu etkisi henüz araştırılmamıştır (15-17). Biz deneyel renal I-R hasarı modelinde, sıçan böbreği üzerine GSPE'nin koruyucu etkisini araştırmak için bu çalışmayı planladık.

Yöntem

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneyel Tıp ve Araştırma Merkezi'nde Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 27/4/2007 tarihli etik kurul kararı doğrultusunda etik yönden "uygun" bulunarak gerçekleştirildi. (Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü: Proje no: 07102017).

Bu çalışmada kırk adet 200-250 gr ağırlığındaki Sprague-Dawley erkek sıçan kullanıldı. Denekler; 24 °C oda sıcaklığı, havalandırılmalı oda, %70-80 nemli ortamı olan şartlarda, polikarbon kafeslerde su ve standart rat yemi ile beslenerek 1 hafta gözlemlenip çalışmaya başlandı. Çalışmaya kadar su ve yiyecek kısıtlaması yapılmadı. Ratlar 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda tutuldu.

Yapılan deneyde anestezi için, ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer İlaç) 50 mg/kg ve 2 mg/kg xylazine hidroklorid (Rompun, Bayer İlaç) intramüsküler uygulandı. Steril şartlarda, orta hat kesiyile karın içine ulaşıldı ve eksplorasyonda sağ ve sol renal arter ve ven bulundu ve askıya alındı. Sağ nefrektomi yapıldı. Ardından sol renal pedikül, mikrovasküler klemple oklüze edildi ve pulsasyon olmayışı ile arteriel kan akımının durduğu teyid edildi. İşlemler sonlanıncaya kadar sıvı kaybını önlemek için intraperitoneal izotonik verildi. 45 dakikalık iskemi sonrası mikrovasküler klemp açılarak arteriovenöz akımın

tekrar başladığı, böbreğin renginin açılması ve pulsasyonun başlaması ile teyid edildi. 60 dakikalık reperfüzyon sonunda sol nefrektomiyle biokimyasal ve histopatolojik inceleme için doku örneği ile intrakardiak ponksiyonla biokimyasal inceleme için 6 cc kan örneği alındı ve deney sakrifikasyonla sonlandırıldı.

Sıçanlar her biri 10'arlı 4 gruba ayrıldı ve şu yöntem izlendi:

Kontrol grubu: Sadece laparotomi yapıldı ve her iki böbrek pedikülü eksplore edildi.

Sham grubu: Sol renal pedikül eksplorasyonu ve sağ nefrektomi yapıldı. Toplam I-R süresi olan, 105 dakika sonra sol nefrektomi yapıldı.

İskemi-Reperfüzyon grubu: Sağ nefrektomi, sol böbreğe 45 dakika iskemi ve ardından 60 dakika reperfüzyon uygulandı ve sonrasında sol nefrektomi yapıldı.

İskemi-Reperfüzyon+GSPE grubu: Deneklere; 100 mg/kg/gün dozunda 15 gün süreyle oral (orogastrik gavajla) GSPE (IH636 GSPE ActiVin, InterHealth Nutraceuticals Incorporated, Benicia, Canada) verildi. 15.gün sağ nefrektomi, sol böbreğe 45 dakika iskemi ve ardından 60 dakika reperfüzyon uygulanarak sol nefrektomi yapıldı. 4. gruptan 2 sıçan gavajla ilaç verilirken pulmoner aspirasyon nedeniyle 3. gün öldü ve bu grupta çalışma 8 sıçanla tamamlandı. Bu işlemler sonunda biyokimyasal, serolojik ve histopatolojik inceleme için kan örnekleri alındı. Alınan 6 ml.lik kanlardan 3 ml.si biyokimyasal inceleme için, 3 ml.si de TNF- α seviyelerinin belirlenmesi için kullanıldı.

Serum üre ve Cr seviyeleri renal fonksiyonun; AST seviyeleri renal I-R hasarının göstergeleri olarak değerlendirildi (18). Spinreact marka kitler kullanılarak, Tokyo Boeki marka Prestige 241 model analizatörde ölçüldü.

Serum TNF- α seviyeleri; Biosource TNF- α -rat marka kitler kullanılarak, Bio-Tek marka Micro Quant model analizatörde ölçüldü. Güçlü proinflamatuar sitokinlerden olan TNF- α , inflamasyonun ve tübüler hasarın şiddetini belirlemek amacıyla kullanıldı.

Doku MDA seviyeleri; Yagi yöntemi (19) ile ölçüldü. Doku MDA oksidatif hasarın neden olduğu lipid peroksidasyonunun şiddetini belirlemede

kullanıldı. Doku GR seviyeleri; Biosource marka kitler kullanılarak, Bio-Tek marka Micro Quant model ELISA spektrofotometresinde ölçüldü ve antioksidan enzim aktivitesinin etkinliğinin tespiti için kullanıldı.

Alınan böbrek dokusu % 10'luk formolde tespit edilip, rutin işlemler sonrası parafin bloklara gömüldü. 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı, deparafinize ve hidrate edilip H&E (Hemotoksilen eozin) ile boyandı. Işık mikroskopunda incelendi. Değerlendirmede histopatolojik inceleme için "vasküler yapılarda dilatasyon-konjesyon", "tübüler vakoulizasyon", "mononükleer hücre artışı" ve "tübüler nekroz" olarak 4 parametre belirlendi. Her parametre için "0 (yok)", "1 (az)", "2 (orta)" ve "3 (şiddetli)" şeklinde 0'dan 3'e kadar skor verildi.

Grupların hepsinde biyokimyasal parametrelerin ortalama değerleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak karşılaştırıldı. ANOVA testinin anlamlı olduğu durumlarda ikincil (post hoc) test olarak Tukey HSD testi kullanıldı. Tüm veriler ortalama değer \pm standart sapma (SD) şeklinde belirlendi, P değerleri 0,05'ten küçük çıktığı zaman anlamlı kabul edildi. Renal iskemi, önce Kruskal-Wallis non-parametrik varyans analizi ile değerlendirildi. Kruskal-Wallis testinin anlamlı olduğu durumlarda Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı, $p < 0,017$ olduğunda aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm istatistiksel hesaplamalar SPSS (Version 13.0) istatistik paket programı ile yapıldı.

Bulgular

I-R grubunda üre (76.20 \pm 3.79), Cr (0.89 \pm 0.05), AST (460.10 \pm 92.64) ve TNF- α (52.30 \pm 7.97) değerleri; S ve K grupları ile karşılaştırıldığı zaman, anlamlı olarak arttığı görüldü (P<0.001). I-R+GSPE tedavi grubunda ise üre (64.75 \pm 3.84), Cr (0.78 \pm 0.06), AST (283.13 \pm 82.44) ve TNF- α (26.25 \pm 4.26) değerlerinin anlamlı olarak düşük olduğu saptandı (P<0.001) (Tablo 1).

I-R grubunda MDA doku değerleri (153.60 \pm 12.98), S (35.10 \pm 6.11) ve I-R+GSPE (112.75 \pm 8.01) grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi (P<0.001) (Tablo 2). I-R grubunda GR

doku değerleri (358.60 \pm 46.19), S (1158.20 \pm 95.24) ve I-R+GSPE (732.50 \pm 76.26 U/L) grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldı (P<0.05) (Tablo 2). I-R+GSPE grubundaki GR seviyeleri, S grubundakilerden anlamlı olarak düşük bulundu (P<0.001) (Tablo 2).

S ve I-R gruplarında normal morfoloji tespit edildi (Şekil 1). I-R grubundaki böbreklerin vasküler yapılarında tübüler vakuolizasyon, dilatasyon, konjesyon ve mononükleer hücre artışı saptandı (Şekil 2). Sham grubunda vasküler dilatasyon-konjesyon (0.40 \pm 0.51), I-R grubundan (2.60 \pm 0.51) anlamlı olarak daha düşüktü (P<0.001), fakat S ve I-R+GSPE (1.13 \pm 0.35) grupları arasında fark yoktu ve I-R grubundaki değerler I-R+GSPE grubundaki değerlerden daha yüksekti (P<0.001). S grubundaki mononükleer hücreler (0.00 \pm 0.00), I-R grubundan (0.80 \pm 0.63) anlamlı olarak daha azdı (P=0.007) (Tablo 3) (Şekil 3).

Tablo 1. Serum üre, kreatinin, AST ve TNF- α değerleri (ort. \pm SS)

Gruplar	Üre (mg/dl)	Kreatinin(mg/dl)	AST (u/L)	TNF- α (ng/dl)
Kontrol	44.30 \pm 2.26	0.55 \pm 0.05	140.30 \pm 13.51	5.80 \pm 1.54
Sham	46.20 \pm 1.03	0.59 \pm 0.05	151.90 \pm 13.27	9.00 \pm 2.40
I-R	76.20 \pm 3.79 ^a	0.89 \pm 0.05 ^a	460.10 \pm 92.64 ^a	52.30 \pm 7.97 ^a
I-R+GSPE	64.75 \pm 3.84 ^b	0.78 \pm 0.06 ^c	283.13 \pm 82.44 ^b	26.25 \pm 4.26 ^b

^ap < 0.001 Kontrol ve Sham, ^bp < 0.001 Kontrol, Sham ve I/R,

^cp=0.003 I/R'ya göre

Tablo 2. Doku MDA ve GR değerleri (ort. \pm SS)

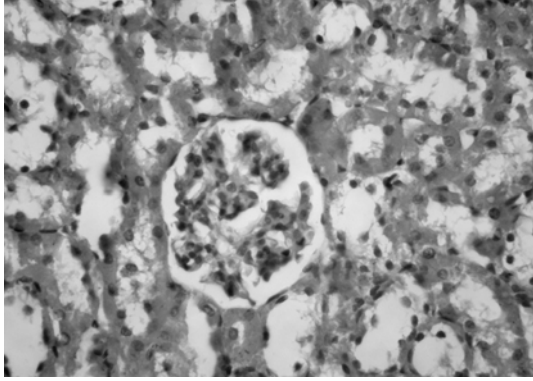
Gruplar	MDA (nmol/g doku)	GR (u/l)
Sham	35,10 \pm 6.11	1158.20 \pm 95.24
I-R	153.60 \pm 12.98 ^a	358.60 \pm 46.19 ^a
I-R+GSPE	112.75 \pm 8.01 ^{a,b}	732.50 \pm 76.26 ^{a,b}

^ap < 0.001 Sham'a göre, ^bp < 0.001 I-R'ya göre

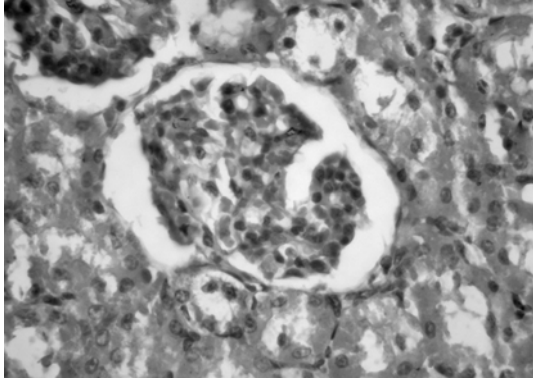
Tablo 3. Doku histopatolojik değerlendirme sonuçları (ort. \pm SS)

Gruplar	VDK	TV	MHA	TN
Sham	0.40 \pm 0.51	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
I-R	2.60 \pm 0.51 ^a	2.80 \pm 0.42 ^a	0.80 \pm 0.63 ^a	0.60 \pm 0.63
I-R+GSPE	1.13 \pm 0.35 ^b	1.13 \pm 0.35 ^{a,b}	0.38 \pm 0.51	0.38 \pm 0.51

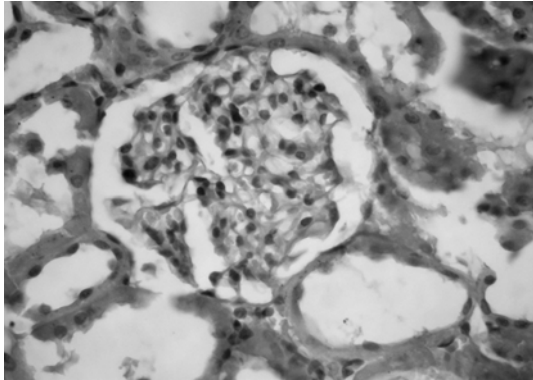
^ap < 0.001 Sham, ^bp < 0.001 I-R'ya göre VDK: vasküler dilatasyon-konjesyon, TV: tübüler vakuolizasyon, MHA: mononükleer hücre artışı, TN: tübüler nekroz



Şekil 1. Sham grubunda normal renal parankimin histopatolojik görünümü (H&EX10).



Şekil 2. I-R grubunda tübüllerde artmış vakuolizasyon, dilatasyon, konjesyon ve vasküler yapılarda artmış mononükleer hücrelerin histopatolojik görünümü (H&EX10).



Şekil 3. I-R+GSPE grubunda tübüllerde azalmış vakuolizasyon, vasküler yapılarda dilatasyon, kongesyon ve mononükleer hücrelerin histopatolojik görünümü (H&EX40).

Tartışma ve sonuç

Renal I-R'a bağlı akut tübüler nekroz, hastalarda çoğunlukla kardiyak ve aortik operasyonlar, travma, ağır dehidratasyon, yanıklar, vb durumlardan sonra ortaya çıkar. Çünkü bu nedenlerden dolayı ortaya çıkan böbrek yetersizliği, böbreğe zarar verici bir problem olabildiğinden dolayı; yeni tedavi edici ajanlar gereklidir. Renal I-R hasarı, hem glomeruler hem de tübüler disfonksiyona neden olur. I-R hasarının, hücre membranlarına oksidatif hasarın önemli bir nedeni olduğu düşünülen lipid peroksidasyonu ve nihayet hücre ölümü ile ilişkili olduğu, ROT ve RNT'nin renal I-R hasarında lipid peroksidasyonunda önemli bir rol oynadığı birçok çalışmada (4,5,20,21) net olarak gösterilmiştir. GR, peroksid radikallerini toplayan ve indirgenmiş glutationu glutationa çeviren bir enzimdir (22). Singh ve ark. (23), normal böbrek dokusunda GR seviyeleri arttığı halde, I-R hasarına bağlı böbrek dokusunda GR seviyelerinin azaldığını bildirmişlerdir. Doku hasarı, vasküler dilatasyon-konjesyon, tübüler vakuolizasyon, mononükleer hücre artışı ve tübüler nekroz gibi renal hasarın histopatolojik skorlaması ile gösterilmiştir. Ek olarak, böbrek reperfüzyon hasarı; üre, kreatinin, AST ve TNF- α 'nın artmış serum seviyeleri ile de ortaya konulur. AST sadece karaciğere spesifik değildir; böbrek ve düz kas gibi diğer dokularda da bulunur. Bu enzim özellikle sıçanlarda renal tübüler hasardan sonra yükselir (24). AST, proksimal tubulusun içinde mevcuttur ve ağır hücre hasarının nonspesifik bir belirteci olarak değerlendirilir (25).

Bizim çalışmamızda, K grubu ile karşılaştırıldığında I-R grubunda lipid peroksidasyonunun ürünü olan doku MDA seviyelerinin arttığını ve doku GR seviyelerinin azaldığını tespit ettik. Ek olarak K grubu ile karşılaştırıldığında, I-R grubunda üre, kreatinin, AST ve TNF- α serum değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu.

Deneysel çalışmalarda allopurinol, oxypurinol, vitamin E, melatonin ve zinc aspartat gibi çeşitli antioksidan maddeler; glutathion peroksidaz, glutathion redüktaz (GR), polietilen glikol (PEG)-superoxid dismutaz (SOD), superoksid dismutaz ve katalaz gibi çeşitli antioksidan enzimler kullanılmıştır (6-13). Bundan başka, bir antioksidan ajan olan trapidil de renal I-R hasarında kullanılmıştır (14). Bununla birlikte böbrek dokusunda I-R hasarında,

kuvvetli bir antioksidan ajan, geniş doz aralığı olan ve ağızdan alındıktan sonra 7-10 gün kan serumunda kalan ve toksik etkisi olmayan GSPE'nin koruyucu etkisi henüz araştırılmamıştır (15-17). Biz deneysel renal I-R hasarı modelinde, sıçan böbreği üzerine GSPE'nin koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık. I-R+GSPE grubunda böbrek dokusunda doku MDA seviyeleri anlamlı olarak azaldı ve doku GR seviyeleri anlamlı olarak arttı. I-R+GSPE grubunda vasküler dilatasyon-konjesyon, mononükleer hücreler ve tübüler nekroz azaldı. Serum üre, kreatinin, AST ve TNF- α yine I-R+GSPE grubunda azaldı.

Sonuç olarak, bu çalışmamıza göre renal I-R hasarında ROT ve RNT nedensel faktör olarak rol oynadığı görüldü. Ayrıca GSPE tedavisinin, lipid peroksidasyonunu ve TNF- α gibi inflammatuar sitokinleri birçok yönden etkileyerek I-R'a bağlı böbrek hasarını azalttığı ortaya konuldu.

Teşekkür

İstatistiksel analiz ile ilgili yardımlarından dolayı Dr. Tahir Kemal Şahin'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Lien YHH, Lai LW, Silva AL. Pathogenesis of renal ischemia reperfusion injury: lessons from knock out mice. *Life Sci*. 2003;74:542-52.
2. Thandani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med*. 1996;360:1148-60.
3. Lieberthal W, Levine JS. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol*. 1996;271:F477-88.
4. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med*. 2000;109:655-78.
5. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, Cuzzocrea S, Brown PA, Stewart KN, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2002;61:862-71.
6. Yurtçu M, Abasıyanık A, Avunduk MC, Muhtaroglu S: Effects of melatonin on spermatogenesis and testicular ischemia-reperfusion injury after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg*. 2008;43:1873-78.
7. Akgür FM, Kiliç K, Aktuğ T, Olguner M. The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *J Urol*. 1994;151:1715-17.
8. Akhter S, Sridher S, Katlowitz NM, et al. Immune response to testicular ischemia and reperfusion. *J Urol*. 1990;143:62.
9. Greenstein A, Smith-Harrison LI, Wakely PE, Kololgi S, Salzberg AD, Koontz WW. The effect of polyethylene glycol-superoxide dismutase administration on histological damage following spermatic cord torsion. *J Urol*. 1992;148:639-41.

10. Blank ML, O'Neill PJ, Steigman CK, Cobb LM, Wilde RA, Havenstein PJ, Chaudry IH.. Reperfusion injury following testicular torsion and detorsion in prepubertal rats. *Urol Res*. 1993;21:389-93.
11. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. *J Urol*. 1997;157:340-5.
12. Ozkan KU, Boran C, Kiliç M, Garipardıç M, Kurutaş EB. The effect of zinc aspartate pretreatment on ischemia-reperfusion injury and early changes of blood and tissue antioxidant enzyme activities after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg*. 2004;39:91-5.
13. Kehinde EO, Anim JT, Mojiminiyi OA, Al-Awadi F, Shihab-Eldeen A, Omu AE, et al. Allopurinol provides long-term protection for experimentally induced testicular torsion in a rabbit model. *BJU Int* 2005;96:175-80.
14. 14-Avlan D, Tamer L, Ayaz L, Polat A, Oztürk C, Ozturhan H et al. Effects of trapidil on renal ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg*. 2006;41:1686-93.
15. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuzynski CA, et al. Free radicals and grape seed and proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 2000;128:187-97.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *Lab Clin Med*. 1992; 99:598-20.
17. Nijveldt RJ. Flavonoids. A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 2001;74:418-25.
18. Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, Zacharowski K, Stewart KN, Mota-Filipe H, et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int*. 2000;58:658-73.
19. Yagi K. Lipid peroxides and related radicals in clinical medicine. In: Armstrong D, ed. *Free radicals in diagnostic medicine*. New York: Plenum Press: 1994:1-15.
20. Paller MS. Nitric oxide mediated renal epithelial cell injury during hypoxia and reoxygenation. *Ren Fail*. 1998;61:459-69.
21. Walker LM, Walkwer PD, Imam SZ. Evidence for peroxynitrite formation in renal ischemia-reperfusion injury: studies with the inducible nitric oxide synthase inhibitor L-N⁶-(1-Yminothyl) lysine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;61:417-22.
22. Senga S, Onituka A, Hirose H, Yamamoto K, Niwa K. Protective effect of liposomal encapsulated superoxide dismutase on ischemically injured liver in the rat. *Transplant Proc*. 1990;22.
23. Singh D, Chopra K. Effect of trimetazidine on renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacol Res*. 2004;50 :623-29.
24. Feilleux-Duché S, Garlatti M, Aggerbeck M, Poyard M, Bouguet J, Hanoune J, et al. Cell specific regulation of cytosolic aspartate aminotransferase by glucocorticoids in the rat kidney. *Am J Physiol* 1993;265:C1298-305.
25. Guder WG, Ross BD: Enzyme disruption along the nephron. *Kidney Int* 1984;26:101-11.