

İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI VE OKSİDATİF STRES İLİŞKİSİNE BİYOKİMYASAL BAKIŞ

Biochemical Aspect of Oxidative Stress Related to Ischemia-Reperfusion Damage

Oguzhan Ozcan¹, Huseyin Erdal², Zafer Yonden¹

¹Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Hatay, Türkiye

²Mustafa Kemal Üniversitesi, Moleküler Biyokimya ve Genetik AD, Hatay, Türkiye

ÖZET

İskemi-reperfüzyon hasarı; miyokard infarktüsü, serebrovasküler infarkt, organ transplantasyonları, kardiyopulmoner resusitasyon, trombolitik tedavi ve hemorajik şok gibi birçok klinik durumda halen hastalar için yüksek morbidite ve mortalite nedenidir. Dokuya giden kan akımının azalması ve oksijen yetersizliği ile başlayan iskemik doku hasarı, reperfüzyon sağlandığında hasarlanmış dokuların yeniden oksijenasyonu ile artarak devam eder. Hücrelerdeki mitokondriyel ATP üretiminin azalması hücre içi metabolizmanın anaerobik yöne kaymasına ve hücre içi asidoza sebep olur. ATP bağımlı Na-K iyon pompalarının yavaşlaması, hücre içi hidrojen artışına yol açar. Artmış hidrojen yükünü dengelemek için ATP bağımlı olmayan Na-Ca pompası intraselüler kalsiyum miktarını artırır. Artmış kalsiyum yükü ise birçok sitozolik proteazı aktive eder. Hücre içi proteaz aktivasyonu ve reperfüzyonla dokuların yeniden oksijenasyonu ise sonuçta hidroksil radikali (OH•), süperoksit radikali (O₂•-) ve hidrojen peroksit H₂O₂ gibi reaktif oksijen türleri (ROS) ile peroksinitrit (ONOO-) gibi reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimine yol açan kritik biyokimyasal yolları hızlandırır. Ayrıca artmış serbest radikallerin neden olduğu inflamasyon, bölgeye inflamatuvar hücrelerin toplanmasını tetikler. Endotelial hücrelerle başta polimorf çekirdekli lökositler olmak üzere inflamatuvar hücreler arasındaki etkileşimler, birçok sitokin salınmasına ve iskeminin yol açtığı hasarın reperfüzyonla genişlemesine yol açar. Ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz, mitokondrielerde bulunan elektron transport zinciri ve fagositlerdeki solunumsal patlamadan sorumlu NADPH oksidaz, ROS ve RNS üretiminden sorumlu başlıca mekanizmalardır. Sonuçta oluşan serbest radikaller hücre membranlarındaki lipit yapılar, hücre içi yapısal ve fonksiyonel proteinler ve genetik materyal gibi önemli makromoleküllere zarar vererek hücre hasarı veya ölümüne yol açarlar. İskemi-reperfüzyonda hasar oluşumu oldukça kompleks bir süreç olup, bu derlemede başlıca oksidatif stres ile ilişkisi ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: İskemi-reperfüzyon hasarı, oksidatif stres, reaktif oksijen türleri

ABSTRACT

Ischemia-reperfusion damage causes high morbidity and mortality for patients who have clinical conditions such as myocardial infarction, organ transplantations, cerebrovascular infarction, cardiopulmonary resuscitation, thrombolytic therapy and hemorrhagic shock. Ischemic tissue damage starting with decreasing blood supply and oxygen deficiency in affected tissues increases through reoxygenation when reperfusion provided. Decreasing mitochondrial ATP production causes shift from aerobic to anaerobic intracellular metabolism and leads to acidosis. Decelerating of ATP dependent Na-K pumps leads to increased intracellular hydrogen load. This increase in hydrogen ions is balanced with increased intracellular calcium levels via Na-Ca pumps. Increased calcium ions also activate many cytosolic proteases. Tissue reoxygenation with reperfusion accelerates several critical biochemical pathways for the production of reactive oxygen species (ROS) such as hydroxyl radicals (OH•), superoxide radicals (O₂•-) and hydrogen peroxides H₂O₂ and reactive nitrogen species (RNS) such as peroxynitrides (ONOO-). However, increased reactive radicals can lead to collection of inflammatory cells to the inflammatory region. Cytokines released through the interaction between inflammatory (especially polymorphonuclear leukocytes) and endothelial cells cause expanding of damage due to reperfusion. Xanthine oxidase, nitric oxide synthase, NADPH oxidase, which is responsible for respiratory burst in phagocytes, and electron transport chain in mitochondria are the main mechanisms responsible for the production of ROS and RNS. These free radicals attack important macromolecules such as lipid structures of cell membranes, intracellular proteins and genetic material and can cause cell damage and death. Since ischemia-reperfusion injury is a quite complex process, the relationship between ischemia-reperfusion and oxidative stress mainly discussed in this review.

Key words: Ischemia-reperfusion damage, Oxidative stress, Reactive oxygene species

Gönderme tarihi / Received: 17.08.2015

Kabul tarihi / Accepted: 22.09.2015

İletişim: Oğuzhan Özcan, Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, posta kodu:31100, Serinyol-Hatay

E-posta: drozan29@hotmail.com

Telefon No: +90 326 221 33 17

Faks: +90 326 221 33 20

GİRİŞ

Organ veya dokulara giden kanın herhangi bir nedene bağlı olarak belirgin şekilde azalması veya tamamen kesilmesi sonucunda perfüzyonunun bozulmasına iske mi denir. İske miye uğrayan dokunun belirli bir süre oksijenden yoksun kalması, doku hasarı veya nekrozu ile sonuçlanır. Kan akımının iske mi sonrasında yeniden sağlanması ise reperfüzyon olarak adlandırılır ve iskeminin neden olduğu hasarın genişlemesine yol açar. Bu durum genel olarak iske mi-reperfüzyon (İ-R) hasarı olarak adlandırılır ve yol açtığı lokal ve sistemik etkilerin organ transplantasyonu, miyokard infarktüsü, serebrovasküler hastalıklar, major cerrahi girişimler, trombolitik tedavi, hemorajik şok ve resüsitasyon gibi birçok klinik durumda ortaya çıkan yüksek morbidite ve mortaliteye katkıda bulunduğu düşünülmektedir (1-3). “Oksijen paradoksu” (4) olarak da bilinen İ-R hasarının biyokimyasal mekanizmalarının anlaşılması klinikte doku hasarını azaltacak yeni tedavi seçeneklerinin ve prosedürlerinin geliştirilebilmesi açısından oldukça önemli bir role sahiptir.

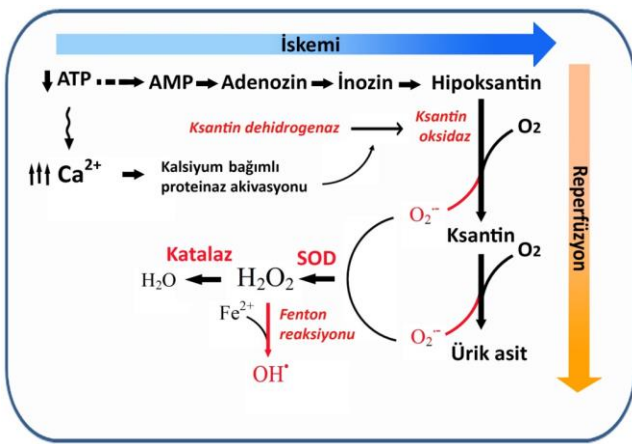
İske mi-reperfüzyonda ortaya çıkan hasardan başlıca sorumlu olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu genel olarak I) Ksantin oksidaz aracılı, II) Mitokondriyal elektron transport zinciri (ETZ), III) Nitrik oksit sentaz ve IV) Fagositik hücre aracılı olmak üzere birbiri ile ilişkili 4 ana biyokimyasal mekanizma ile açıklanmaktadır (5,6). Ortaya çıkan doku hasarının şiddeti, iskeminin süresi dışında doku ve organların yapısal ve biyokimyasal metabolizma açısından spesifik farklılıkları ile de yakından ilişkilidir. Ancak bu derlemede genel olarak tüm organlarda görülen ortak biyokimyasal süreçler ele alınacaktır.

İske mi-Reperfüzyonda ROS Oluşumu

Ksantin oksidaz aracılı ROS oluşumu

İlk defa Granger ve arkadaşları tarafından ortaya atılmıştır (7). İske mi süresince mitokondriyal ATP üretimi durur ve hücre içerisinde bulunan mevcut ATP katabolize olarak sırasıyla ADP, AMP, adenozin, inozin ve son basamakta da hipoksantin açığa çıkarır (Şekil 1). Hem mitokondriyal üretimin durması hem de hücre içerisindeki ATP yıkımına bağlı oluşan enerji kaybı, membrandaki enerji bağımlı iyon pompalarında fonksiyon bozukluğuna ve hücre içi metabolizmanın anaerobik faza yönelmesine yol açar. Laktat ve hidrojen birikimi ile hücre içi pH düşer ve asidoz oluşur. Hücre içi artan hidrojen yükünü dengelemek için $\text{Na}^+\text{-H}^+$ pompası ile artan hidrojen hücre dışına atılır ve $\text{Na}^+\text{-Ca}^{+2}$ pompası ile de kalsiyum hücre içine yer değiştirir (8). Hasarlanan endoplazmik retikulum da hücre içine kalsiyum salınımına yol açarak kalsiyum artışına katkıda bulunur (9). İntraselüler kalsiyum artışı, kalsiyum bağımlı sitozolik proteazları aktive eder (10). Aktivasyonu artan proteazlar, hücre içi hipoksantin dehidrogenaz enzimini ksantin oksidaza dönüştürür (11). Ksantin oksidaz ise reperfüzyonla gelen oksijeni oksidan olarak kullanır ve hipoksantini önce ksantine ve sonra da ürik aside dönüştürür. Son iki basamakta ürün olarak reaktif oksijen türlerinden süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\bullet-}$) oluşur. Normal fizyolojik koşullarda oluşan $\text{O}_2^{\bullet-}$, süperoksit dismutaz (SOD) ile önce hidrojen peroksite sonra da katalaz etkisi ile suya dönüşür. Ancak İ-R’da ksantin oksidaz etkisine bağlı olarak artan süperoksit radikali ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2), antioksidan kapasiteyi aşar ve ortamdan etkin bir şekilde temizlenemez. Hidrojen peroksit daha sonra

Fe^{2+} gibi geçiş metalleri veya süperoksit radikalleri ile (Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları) reaksiyona girer ve en güçlü radikal olarak bilinen hidroksil radikalini (OH^*) oluşturur (12). Reaktif oksijen türleri miktarındaki bu artış sonuçta hücre membranlarındaki lipid yapılarda hasar, hücre içi proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma ve DNA'da yapısal hasar meydana getirerek hücre zedelenmesine yol açar (13,14).



Şekil 1. İskemi-reperfüzyon hasarında ksantin oksidaz aracılı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu.

Mitokondriyal hasar ve ROS oluşumu

Normal fizyolojik koşullarda mitokondrium hücre içi oluşan $O_2^{\bullet-}$ 'nin başlıca kaynağıdır. Hürelere giren oksijenin %90'ı elektron transport zincirinde suya indirgenirken %1-2'lik bir kısım ETZ den (başlıca kompleks I ve III) elektron kaçağına bağlı olarak süperoksite dönüşür. Normalde oluşan bu süperoksitler, SOD enzimi tarafından hızlıca dismutasyona uğrattılır. İskemi durumunda ETZ'inde moleküler oksijen yokluğuna bağlı olarak elektron akışı durduğundan bu kompleksler (özellikle kompleks I) indirgenmiş düzeyde kalır. ETZ'den sızan elektronlar rezidüel oksijenle reaksiyona girerek $O_2^{\bullet-}$ üretimine yol açarlar.

Reperfüzyonda ise moleküler oksijenin gelişi ile ETZ'den elektron sızıntısı artar ve patolojik süreç $O_2^{\bullet-}$ üretiminin artışı ile devam eder (15). Ayrıca serbest radikallerin mitokondriyal membran yapılarında oluşturduğu hasar sonucunda mitokondrilerden ortama daha fazla serbest radikal salınır.

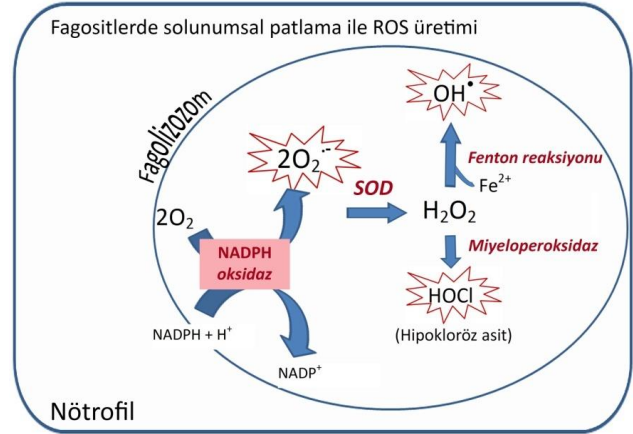
Mitokondrium dışı zarında bulunan monoaminoksidaz (MAO) enzimi ise mitokondriyal ROS üretiminden sorumlu diğer önemli mekanizmadır. Normal şartlarda MAO, nörotransmitter deaminasyonundan sorumludur ancak reaksiyon sırasında yan ürün olarak pro-oksidan bir molekül olan H_2O_2 üretilir (16). Özellikle kardiyak İ-R hasarında oksidatif stres oluşumunda önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (17). Reperfüzyonda mitokondriyal ROS üretiminin yukarıdaki mekanizmalara bağlı olarak artışına, mitokondriyal antioksidan kapasitenin azalması da eklenince oksidatif denge net ROS üretiminin artışı yönüne kayar ve sonuçta hücre içi oksidatif denge bozularak doku hasarı ortaya çıkar.

Fagositler (makrofaj, nötrofil v.b.) ve endotel hücre aracılı ROS oluşumu

İskemi-reperfüzyon hasarında ROS oluşumdan sorumlu bir diğer neden ise endotel hücreler ve reperfüzyonla bölgeye gelen başta nötrofiller olmak üzere inflamatuvar hücreler arasındaki etkileşimlerdir. İskemi-reperfüzyon sırasında dokuda meydana gelen inflamasyon ve endotel hücreleri ile vasküler yatakta bulunan diğer hücrelerce (makrofajlar ve mast hücreleri) salınan pro-inflamatuvar mediyatörler, polimorf çekirdekli lökositlerin (PMNL) bölgeye migrasyonuna ve adhezyonuna yol açar (18). Birçok çalışmada karaciğer (19), kalp (20), böbrek (21), akciğer (22) ve beyin (23) gibi

organların İ-R'a bağlı zedelenmesinde nötrofillerin doku düzeyinde ve sistemik olarak arttığı gösterilmiştir. Normal fizyolojik şartlarda fagositik lökositler (makrofaj, nötrofil v.b) ROS'un tetiklediği inflamatuvar mediyatörlere yanıt olarak aktive olurlar ve solunumsal patlama adı verilen mekanizmayla oksidan mediyatörler üretirler. Fagositik hücrelerde solunumsal patlamada ROS—üretiminden sorumlu başlıca enzim NADPH oksidaz (NOX) olup aktivasyon sırasında oksidan üretimi yaklaşık 50-100 kata kadar artabilir (18). NOX aracılığıyla üretilen süperoksitler, SOD aracılığı ile önce hidrojen peroksite ve sonrasında miyeloperoksidaz etkisi ile de hipokloröz asite (24) veya Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikaline (OH^*) dönüşür ve ortama salınır (Şekil 2). Polimorf çekirdekli lökositler kaynaklı bu artmış ROS üretimi, reperfüzyon hasarında başlıca rolü oynar. PMNL'den bunun dışında IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ ve TNF α gibi sitokin ve kemokinler ile elastaz ve kollejenaz gibi proteazlar salınarak bölgeye daha fazla inflamatuvar hücre toplanmasına ve daha fazla ROS üretimine yol açar (25).

İskemi-reperfüzyonda endotel hücrelerinin selektin ve integrin gibi adhezyon molekülleri aracılığıyla lökosit toplanmasını ve dolayısıyla daha fazla ROS üretimini tetiklemesi dışında, yüzeyinde bulunan ksantin oksidaz enzimi ile de oksidatif strese katkıda bulunduğu bilinmektedir. Ancak bu enzim hepatosit, enterosit ve kapiller endotel hücrelerde diğer dokulara göre daha belirgin olarak bulunmaktadır (26).

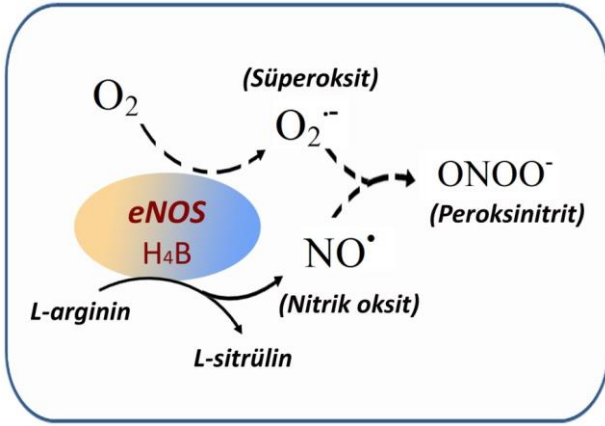


Şekil 2. İskemi-reperfüzyonda bölgeye göç eden fagositik hücrelerde görülen "solunumsal patlama".

İskemi-reperfüzyonda nitrik oksitin rolü

Nitrik oksit (NO^*), reaktif bir radikal olup başlıca nitrik oksit sentaz (NOS) ailesinin endotelial (eNOS), indüklenebilir (iNOS) ve nöronal (nNOS) izoformları tarafından sentezlenir (27). Oldukça kompleks etki mekanizmasına sahip olan nitrik oksitin bu etkileri üretim hızı ve miktarına göre değişiklik gösterir ve bu durum İ-R hasarında kritik rol oynar. Dokularda normalde oksijen varlığında argininin sitrülline oksidasyonu ile sentezlenir, kofaktör olarak tetrahidrobiopterin kullanılır (28). Normal fizyolojik koşullarda eNOS tarafından endotelial hücrelerde oldukça az miktarda üretilir ve vazodilatasyon, düz kaslarda relaksasyon, lökosit adhezyonunu engelleyici, trombosit fonksiyonları, ve hücre içi sinyal iletiminde düzenleyici rol oynar (29). İskemi-reperfüzyonda ise süperoksit radikallerinin oluşumu artar. Artan süperoksit, ortamda endojen olarak bulunan NO^* ile reaksiyona girerek oldukça reaktif ve potansiyel olarak toksik peroksinitrit ($ONOO^-$) ve nitrojen trioksit (N_2O_3) oluşumunu sebep olur (Şekil 3) (27). Ayrıca endojen üretilen NO^* miktarının azalmasına yol açtığından, NO^* in koruyucu

etkilerini engeller ve oksidatif strese katkıda bulunur. Ortamda bulunan NO^\bullet ile arginin ve/veya tetrahidrobiopterin kofaktörünün azalması da “eNOS-uncoupling” olarak adlandırılır ve NOS'un süperoksit üretimine yönelmesini tetikleyerek ROS oluşumunu artırır (30).



Şekil 3. Nitrik oksit sentaz yolağı; Normal fizyolojik koşullarda ve yeterli substrat varlığında nitrik oksit (NO^\bullet) sentezlenir. İskemi-reperfüzyonda ise artmış süperoksit üretimi nitrik oksitle birlikte peroksinitrit üretimine yol açar.

eNOS, endotelial nitrik oksit. H4B, tetrahidrobioptrein. Kesik çizgiler, “eNOS uncoupling” ile artan süperoksit üretimi.

İskemi-reperfüzyonda sistemik etki ve uzak organ hasarı

İskemi-reperfüzyona bağlı oluşan doku hasarı, olduğu bölgeye sınırlı kalmayıp diğer organ sistemleri üzerinde de değişen derecelerde hasar oluşturabilir. Mekanizması henüz tam aydınlatılmamış olsa da, akciğer dokusu, böbrekler, karaciğer, iskelet kasları, kalp ve gastrointestinal sistem (31-34) gibi organlarda meydana gelen İ-R’da uzak organ hasarı olduğu gösterilmiştir. Uzak organ hasarına yol açan faktörler direk olarak primer hasarlanan dokudan kaynaklanabileceği gibi dolaşımdaki

aktive lökositler ve inflamatuvar mediyatörlerden de kaynaklanabilir. Özellikle GIS’te ve karaciğerde meydana gelen İ-R hasarının başlıca akciğerlerde uzak organ hasarına yol açtığı gösterilmiştir ve bu hasardan endotelial ksantin oksidaza bağlı artmış ROS üretimi sorumlu tutulmuştur (35).

Öne sürülen bir diğer mekanizma ise dokuda lokal olarak oluşan oksidanların indüklediği sitokinler veya kemotaksis faktörlerinin sistemik dolaşıma geçerek uzak organlarda PMNL migrasyonu oluşturmasıdır. Uzak dokulara PMNL toplanması, lokal doku hasarlanmasına benzer şekilde solunumsal patlama ile ROS üretimine ve sonuçta oksidatif hasara yol açar (36).

Sonuç olarak, İ-R hasarı birçok faktörün rol aldığı kompleks bir patofizyolojiye sahiptir. İskeminin yol açtığı doku hasarı, reperfüzyon sırasında hücre içinde birçok biyokimyasal yolda üretilen reaktif oksijen türleri aracılığı ile hücre ölümüne yol açabilir. Ayrıca pro-inflamatuvar mediyatörlerin oluşumu ve nötrofil, makrofaj ve lenfositlerin bölgeye toplanması, hasarın genişlemesini sağlar ve İ-R hasarının sistemik etkilerinden sorumludur. Tüm bu mekanizmalar iskeminin süresi ve şiddetine göre dokular arasında da farklılıklar gösterir. Bu nedenle İ-R hasarında oksidatif stresin biyokimyasal mekanizmalarının anlaşılması doku ve organlara yönelik yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesi açısından klinikte önemli bir role sahiptir.

REFERANSLAR

1. Douzinas EE, Livaditi O, Tasoulis MK, Prigouris P, Bakos D, Goutas N, et al. Nitrosative and oxidative stresses contribute to post-ischemic liver injury following severe hemorrhagic shock: the role of hypoxemic resuscitation. *PLoS ONE* 2012;7:3.
2. Arkadopoulos N, Defterevos G, Nastos C, Papalois A, Kalimeris K, Papoutsidakis N, et al. Development of a porcine model of post-hepatectomy liver failure. *J Surg Res* 2011;170:233-42.
3. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:15-26.
4. Homer-Vanniasinkam S, Crinnionand JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14:195-203.
5. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15:4405-9.
6. Dokuyucu R, Karateke A, Gokce H, Kurt RK, Ozcan O, Ozturk S, et al. Antioxidant effects of erdosteine and lipoic acid in ovarian ischemia-reperfusion injury. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014;183:23-7.
7. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Role of superoxide radicals in intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981;81:22-29.
8. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2009;104:181-8.
9. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol* 2011;301:1723-41.
10. De Martino GN. Calcium-dependent proteolytic activity in rat liver: identification of two proteases with different calcium requirements. *Arch Biochem Biophys* 1981;211:253-7.
11. Schaffer SW, Roy RS, and McCord JM. Possible role for calmodulin in calcium paradox-induced heart failure. *Eur Heart J* 1983;4:81-7.
12. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005;12:1161-208.
13. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
14. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1482-95.
15. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J* 2005;390:377-94.
16. Di Lisa F, Kaludercic N, Carpi A, Menabó R, Giorgio M. Mitochondrial pathways for ROS formation and myocardial injury: the relevance of p66 (Shc) and monoamine oxidase. *Basic Res Cardiol* 2009;104:131-9.
17. Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med* 2012;52:556-92.
18. Serracino-Inglott F, Habib NA, and Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2001;181:160-6.
19. Schmid-Schoenbein GW and Engler RL. Granulocytes as active participants in acute myocardial ischemia and infarction. *Am J Cardiovasc Pathol* 1987;1:15-30.
20. Hansson RO, Jonsson O, Lundstam S, Pettersson S, Schersten T, Waldenström J. Effects of free radical scavengers on renal circulation after ischemia in the rabbit. *Clin Sci* 1983;65:605-10.
- de Perrot M, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003;167, 490-511.
21. Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, John Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 2007;49: 93-102.
22. Dworakowski R, Walker S, Momin A, Desai J, El-Gamel A, Wendler O, et al. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-derived superoxide and vascular endothelial dysfunction in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1349-56.

23. Rodriguez SF, Granger DN. Role of blood cells in ischemia-reperfusion-induced endothelial barrier failure. *Cardiovasc Res* 2010;87:291–9.
24. Parks DA, Granger DN. Xanthineoxidase: biochemistry distribution and physiology. *Acta Physiol Scand* 1986;548:87–99.
25. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012;298:229-317.
26. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009;22:46-55.
27. Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *Gen Physiol Biophys* 2004;23:265-95.
28. Hein TW, Zhang C, Wang W, Chang CI, Thengchaisri N, Kuo L. Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilation in coronary arterioles: counteracting role of arginase. *FASEB J* 2003;17:2328–30.
29. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29:294–8.
30. Vaghasiya JD, Sheth NR, Bhalodia YS, Jivani NP. Exaggerated liver injury produced by renal ischemia reperfusion in diabetes: effect of exenatide. *Saudi J Gastroenterol* 2010;16:174–180.
31. Hirsch J, Niemann CU, Hansen KC, Choi SJN, Su X, Frank JA, et al. Alterations in the proteome of pulmonary alveolar type II cells in the rat after hepatic ischemia-reperfusion. *Crit Care Med* 2008;36:1846–54.
32. Vega VL, Mardones L, Maldonado M, Nicovani S, Manriquez V, Roa J, et al. Xanthine oxidase released from reperfused hindlimbs mediate kupffer cell activation, neutrophil sequestration, and hepatic oxidative stress in rats subjected to tourniquet shock. *Shock* 2000;14:565–71.
33. He GZ, Dong LG, Chen XF, Zhou KG, Shu H. Lymphduct ligation during ischemia/reperfusion prevents pulmonary dysfunction in a rat model with omega-3 polyunsaturated fatty acid and glutamine. *Nutrition* 2011;27:604–14.
34. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 2000;190:255–66.