

# Renal İskemi-Reperfüzyonu Sırasında Sıçan Böbreğinde Oluşan Oksidatif Stres Hasarına Silimarin Etkisi

Hakan Şentürk<sup>1,\*</sup>, Dürdane Kolankaya<sup>2</sup>, and Yalçın Şahin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biyoloji Bölümü, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir 26480, Turkey*

<sup>2</sup>*Biyoloji Bölümü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara 06800, Turkey*

\*Corresponding author: [hsenturk@ogu.edu.tr](mailto:hsenturk@ogu.edu.tr)

---

**Özet.** Renal iskemi reperfüzyon hasarı akut böbrek yetmezliğinin temel sebebidir. *Silybum marianum* L. Gaertn. (devedikeni), *Asteraceae* familyasına ait bir bitkidir. Silimarin, *S. marianum* L. tohumlarından elde edilen bitkisel kaynaklı bir flavonoiddir. Bu çalışmada silimarinin, deneysel renal iskemi reperfüzyon sırasında oluşan hasar üzerine koruyucu etkileri histolojik ve biyokimyasal olarak araştırıldı.

**Anahtar Kelimeler.** İskemi reperfüzyon, böbrek, silimarin, sıçan.

**Abstract.** Renal ischemia reperfusion injury is the most common causes of acute renal failure. *Silybum marianum* L. Gaertn. (milk thistle) is a plant which belongs to *Asteraceae* family. Silymarin is a plant derived flavonoid which is extracted from the seeds of the *S. marianum* L. In this study, we investigated the protective effect of silymarin during the experimental renal ischemia reperfusion injury in rats histologically and biochemically.

**Keywords.** Ischemia-reperfusion, kidney, silymarin, rat.

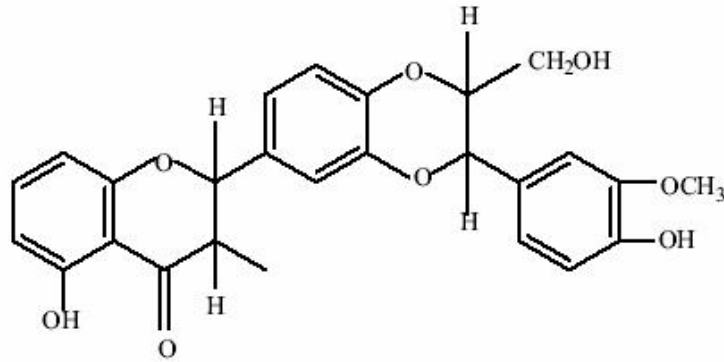
---

## 1. Giriş

Birçok hastalığın oluşması ve patolojik durumun ortaya çıkmasında serbest radikallerin önemli rolü vardır [1,2,3]. Serbest radikallerin zararlı etkileri antioksidan maddeler tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılır. Flavonoidler de bitkilerde yaygın olarak görülen ve antioksidan özellik taşıyan polifenolik bileşiklerdir. Tüm flavonoidlerin antioksidan etkileri, kimyasal yapılarında bulunan fenolik hidrojenler ile ilgilidir. *Silybum marianum* L. Gaertn. (devedikeni), *Asteraceae* familyasına ait bir bitkidir. *S. marianum* L. tohumları, karaciğer ve safra kesesi hastalıkları ile

Received May 6, 2010; accepted July 13, 2010.

toksin zehirlenmelerine karşı karaciğeri korumada; aynı zamanda mantar zehirlenmeleri, yılan sokması, böcek ısırıkları gibi durumların tedavisinde de 2000 yıldan beri kullanılmaktadır. *S. marianum* L. tohumlarından elde edilen ekstraları bol miktarda silimarin içermektedir. Kimyasal olarak silimarin (Şekil 1); silibin (silibinin), izosilibin, silikristin, silidianin ve dehidrosilibinin adı verilen izomer flavanolignanlardan oluşmaktadır [4]. Silimarinin biyolojik aktivitesinden sorumlu olduğu düşünülen temel bileşeni silibin'dir ancak yapısında bulunan diğer flavano-lignanların da bu biyolojik aktivitede rolü olabileceği düşünülmektedir [5]. Fakat silimarinin asıl aktivitesi; içerdiği flavano-lignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile antioksidan özellik göstermesi ve buna bağlı olarak serbest radikal tutucu işlevinin bulunmasıdır [6]. Silimarinin hücre GSH seviyesinde artışa neden olduğu [7], SOD aktivitesini arttırdığı [8] ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini [9] ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır.



ŞEKİL 1. Silimarin kimyasal formül.

Nefropatolojik durumlarda silimarin kullanımı diğer organlar ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Böbrek nakillerinde kullanılan soğuk iskemi/reperfüzyon işlemi sırasında serbest radikaller oluşmakta ve bu serbest radikaller böbrek tübüler hücrelerde hasara neden olmaktadır [10]. Sonnenbichler ve ark. 1999'da yapmış oldukları çalışmada deney hayvanlarında parasetamol, cisplatin ve vincristin ile kimyasal hasar oluşturulmuş, silimarin ve silistrinin böbrek üzerinde koruyucu etkisi olup olmadığını incelemiştir [11]. Sonuçta hücrelerde, protein-DNA biyosentezinde ve laktat dehidrogenaz aktivitesinde bir artış gözlenmiştir

ve buna bağlı olarak oluşturulan kimyasal hasarın etkisi azaltılmış ya da tamamen ortadan kaldırılmıştır.

## 2. Materyal Metod

Deneyssel çalışmamızın tamamı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Deney Hayvanları Laboratuvarında, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 2007/149 sayılı izni ile yapılmıştır.

*Deney hayvanları.* Deneyssel alışmamızda her grupta, rastgele seçimle,  $n = 7$  sıçan olacak şekilde 200-250 gram ağırlığında, sağlıklı, 3-4 aylık, *Sprague Dawley* cinsi, 28 adet albino sıçan kullanıldı. Tüm deney hayvanları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Deney Hayvanları retim Laboratuvarından temin edildi. Deney hayvanları deney süresince 12; 12 aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısı ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) ve nemi (%45-50) otomatik olarak ayarlanmış odalarda yaşatıldı. Deney sürecinde tüm sıçanlar polikarbonat şeffaf kafeslerde standart sıçan yemi ile beslendi ve eşme suyu verildi.

*Deney protokolü.* Deney hayvanları rastgele seçimle 4 deney grubuna (her grupta  $n = 7$ ) ayrıldı. Bu gruplar: Grup 1, Kontrol; Grup 2, I/R; Grup 3, 50 mg/kg ve Grup 4, 100 mg/kg silimarin olarak belirlendi. Grup 1'e herhangi bir cerrahi işlem yapılmazken, Grup 2, 3 ve 4'e sırasıyla 0,5cc. serum fizyolojik ile 50 ve 100 mg/kg'lık silimarin dozları intraperitoneal olarak verildi.

*Silimarin enjeksiyonu.* Deneyde 3. ve 4. gruplara periton içine uygulanan silimarin SIGMA'dan temin edildi (Katalog no: S0292). Silimarin, uygulanacak doza göre (50 ya da 100 mg/kg) her bir deney hayvanı için 0,5 mL %0,9'luk steril serum fizyolojik içerisinde czlerek enjeksiyona hazır duruma getirildi. Madde enjeksiyonları, czeltilerin taze olarak hazırlanmasından sonra, steril tek kullanımlık enjektörler ile cerrahi girişimlerden 60 dakika önce, tek doz olarak periton altına uygulandı. Çalışmada kullanılan diğer malzemeler yerel firmalardan temin edildi.

*Cerrahi protokolü.* Deney hayvanlarına intramüsküler yol ile  $10 \text{ mg.kg}^{-1}$  ksilazin (Rompun, Bayer, Türkiye) ve  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$  ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) anesteziyi uygulandı. Nefroktami uygulanacak deney hayvanları anestezi altında, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edilip rektal ısı kontrolü yapıldı. Cerrahi uygulama bölgesinin %70'lik etanol ile temizliği yapıp I/R, 50 ve 100 mg/kg Silimarin gruplarına sağ böbrek nefroktamisi gerçekleştirildi [12, Ch. 29, 174-175].

İskemi/reperfüzyon yapılacak deney hayvanlarına anestezi altında, midline laparotomi yapılmıştır. Sol renal arter izole edilerek, antitravmatik vaskular klemp yardımıyla 45 dakika süre ile sol renal arterden kan akışı durduruldu. 45 dakika iskeminin hemen ardından 6 saatlik reperfüzyon süreci uygulandı [12,13]. Hem nefroktami hem de reperfüzyon süresince her bir deney hayvanına yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verildi [14]. Bu işlemi takiben, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütürle dikilerek kesi bölgesi kapatıldı ve poviodeks antiseptik solusyon ile laparotomi bölgesi temizlendi. Deney hayvanları kimyasal sterilizasyonu yapılmış, tek bireylik, polikarbonat bileşimli ve şeffaf nitelikteki kafeslere ayrı ayrı koyularak 6 saat boyunca yaşatıldı.

*Serum biyokimya analizleri.* Serum biyokimya analizleri için deney hayvanlarının diseksiyonu sırasında kalpten alınan kan örnekleri jelli tüplere aktarıldı. MSE Mistral 2000 marka ve model santrifüjde 3000 rpm.'de 10 dakika santrifüj yapılarak [15,16] elde edilen serumlar polietilen tüplere aktarılıp analizleri yapılana kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda bekletildi [17]. Karaciğer hücrelerinde meydana gelecek olası fonksiyon bozukluklarını tespit etmek amacı ile serum örneklerinde aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) enzim seviyeleri ile böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi için üre (BUN) ve kreatinin düzeyleri ölçüldü [14]. Tüm serum analizleri HITACHI-917 marka oto analizatörde, Human (Human Gessellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH, Wiesbaden Germany) marka ticari kitler kullanılarak yapıldı.

### **Böbrek dokusunda antioksidan enzim analizleri**

*Lipit peroksidasyonu tayini.* Uygulama ve kontrol gruplarına ait böbrek dokularındaki lipid peroksidasyonunu belirlemek için malondialdehit (MDA) ölçümü yapılmıştır. Yöntem için esas olarak Okhawa ve ark.'nın (1979) yapmış olduğu çalışma temel alınmıştır [18]. Bu yöntemin referans noktası barbitürat-MDA konjugatının 532 nm'de oluşturacağı pembe rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Elde edilen absorbans değerler, ekstinksiyon katsayısı kullanılarak nmol MDA  $\text{g}^{-1}$  doku olarak ifade edilmiştir.

*Redükte glutatyon tayini.* Analiz için Sedlack and Lindsay'in (1968) doku homojenatlarında geliştirdikleri yöntem esas alınmıştır [19]. Bu spektrofotometrik yöntemin temeli, Ellman reaktifi olarak da bilinen 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoik asitin (DTNB),

ortamda var olan SH grupları ile redüklenerek sarı renkli bir ürün olan 2-nitro-5-merkaptobenzoik asite dönüşmesine ve bu bileşiğin 412 nm'de verdiği absorbansın ölçülmesine dayanmaktadır. Elde edilen değerler, ekstinksiyon katsayısı kullanılarak  $\mu\text{mol GSH g}^{-1}$  doku olarak ifade edilmiştir.

*Protein miktarı tayini.* Tüm gruplara ait böbreklerdeki protein miktarları Lowry ve arkadaşlarının (1951) geliştirdiği yönteme göre hazırlanmış ticari Bio-Rad ölçüm kiti ile yapılmıştır [20]. Böbrek dokuları %1,15'lik KCl ile homojenize edildikten sonra 1000 g'de santrifüj edilerek partiküller çöktürülmüştür. Elde edilen süpernatantın bir miktarı kitin reaktifleri ile reaksiyon ortamına konularak 15 dakika sonunda 750 nm'de kör tüpe karşı okunmuştur. Standartlar kitin içinde mevcut olan BSA ile hazırlanmış ve Curve Expert 1.3. programı ile standart grafik çizilmiştir. Tüm gruplara ait örneklerin absorbans değerleri standart grafikte yerine konarak mg/ml cinsinden sonuçlar elde edilmiştir.

*Katalaz (CAT) aktivitesi tayini.* Kontrol ve uygulama gruplarına ait böbrek dokularında CAT aktivitesi ölçümü Beutler'in (1985) geliştirdiği metoda göre yapılmıştır [21]. Böbrek dokuları 1/10 oranında %15'lik KCl tamponuna alınarak Ultra Tur-rax homogenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat soğutmalı santrifüj yardımı ile 2000 rpm'de 10 dakika  $+4^{\circ}\text{C}$  'de santrifüj yapılarak, süpernatant fraksiyonu enzim aktivite tayini için ayrıldı.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin CAT tarafından yıkım hızı,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçüm yapılarak doku CAT aktivitesi K/mg olarak ifade edildi.

*Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini.* Winterborn ve arkadaşlarının (1975) geliştirdiği yöntem referans alınarak çalışıldı [22]. Bu yöntemin temeli ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit radikalinin SOD enzimi ile ortadan kaldırılamadığında reaksiyon ortamında bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Absorbans 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Böbrek dokularında SOD aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

*Böbrek histopatolojik preparatlarının hazırlanması.* Deney hayvanlarının diseksiyonu sırasında histolojik incelemeler için yeterli boyutta alınan böbrek dokularının her biri tespit için %10 tamponlanmış formaldehit solüsyonunda 24-48 saat süre ile bekletildi. Tespit işlemi sonrasında rutin histolojik takip metodu kullanılarak parafin içine gömülen doku örneklerinden mikrotom yardımı ile  $5\mu\text{m}$  kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler hematoksilin-eozin boyama metodu kullanılarak boyandı ve mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekildi.

*İstatistiksel değerlendirmeler.* Çalışmalarımız sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 9.0 for Windows paket programı yardımı ile One Way Anova-Tukey testi kullanılmıştır. Tüm istatistiksel uygulamalar sonucunda sayısal değer (P) olarak ortaya çıkan deney grupları arasındaki farklar ( $p < 0,05$ ) oluşturulan tablolarda, <sup>a</sup>: kontrol grubuna göre  $p < 0.05$  seviyesinde önemli; <sup>b</sup>: IR grubuna göre  $p < 0.05$  seviyesinde önemli olarak belirtildi.

### 3. Bulgular

#### Böbrek dokularına ait histopatolojik sonuçlar

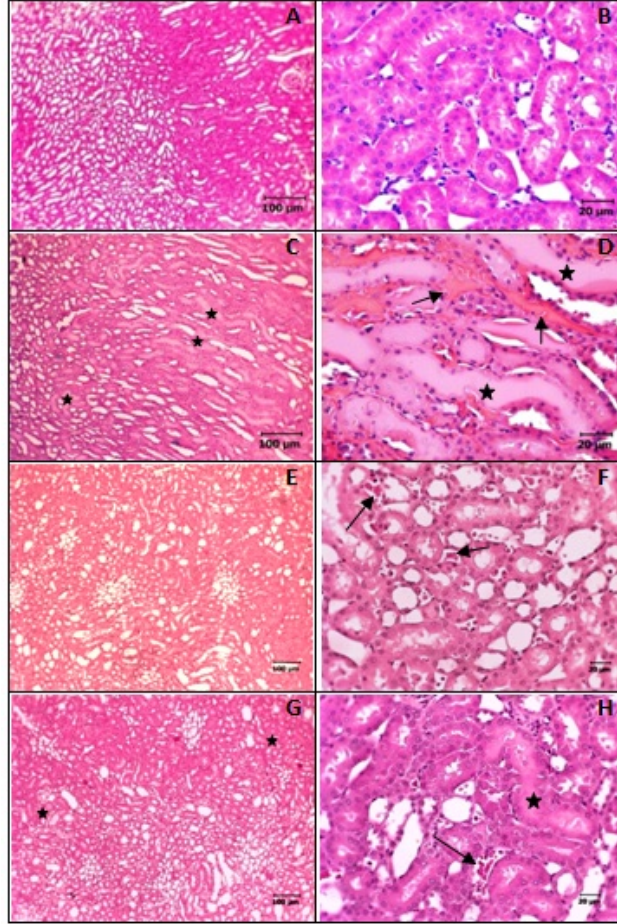
Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen histopatolojik sonuçlar Şekil 2, A-H'de görülmektedir.

Kontrol grubu (Grup 1) sıçanlarına ait preparatlardan yapılan inceleme sonucunda, böbrek korteks-medulla geçişindeki tübül hücrelerinin görünümünün normal olduğu, böbrek tübüllerinde nekrotik hücrelerin bulunmadığı, tübül hücreleri arasında kanlanmanın olmadığı, dolayısıyla patolojik olarak değerlendirilebilecek herhangi bir durumun bulunmadığı görüldü (Şekil 2, A-B). IR grubunda (Grup 2), IR hasarına bağlı olarak tübül hücrelerinde şişme ve buna bağlı olarak tübüller içerisinde sıvı birikimi ve hücre döküntülerinin oluşturduğu hücrelere bağlı tübüller deformasyon vardı. Bununla birlikte yoğun olarak tübüller arasında kanlanma olduğu görüldü (Şekil 2, C-D). 50 mg/kg silimarin uygulama grubu (Grup 3) preparatlarında, IR grubunda gözlenen tübül hücrelerinde şişmeler sonucu meydana gelen tübüller deformasyonun büyük miktarda azaldığı, tübüller lümen içerisinde oluşan nekrotik hücrelerin ve tübüller arasında meydana gelen kanamalı bölgelerin azaldığı saptandı. Tübül hücrelerinin apikallerinde de meydana gelen sitoplazma kayıplarının da çok aza indirgenmiş olduğu görüldü (Şekil 2, E-F).

Silimarinin 100 mg/kg uygulanan dozunda (Grup 4) IR grubuna göre histopatolojik hasarın azaldığı, tübüller deformasyon ve şişmeye bağlı tübüller içerisinde sıvı birikiminin oldukça az olduğu ve tübül hücrelerinin apikallerinde meydana gelen sitoplazma kaybının azaldığı görüldü (Şekil 2, G-H).

#### Biyokimyasal sonuçlar

Yapılan çalışmalar sonucunda kontrol ve uygulama gruplarına ait serum biyokimyasal analiz değerleri Tablo 1'de verilmiştir.



ŞEKİL 2. Kontrol ve uygulama gruplarına ait histolojik görüntüler. Kontrol grubu (A-B), I/R grubu (C-D), 50 mg/kg silimarin uygulama grubu (E-F), 100 mg/kg silimarin uygulama grubu (G-H). Tübül içi kanamalı bölgeler ( $\rightarrow$ ), Tübül lümenlerinde sıvı birikimine bağlı şişme( $\star$ ).

*Üre (BUN) değerleri.* IR ( $116,13 \pm 6,96$ ) grubunda üre değerleri, kontrol grubu ( $52,66 \pm 2,4$ ) değerlerinden anlamlı olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Üre değerleri; 50 mg/kg ( $107,96 \pm 7,32$ ) ve 100 mg/kg ( $113,25 \pm 9,88$ ) silimarin uygulanan gruplarda IR grubu ile anlamlı bir fark bulunmamış ( $p > 0,05$ ) fakat kontrol grubu ile anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Tablo 1).

*Kreatinin değerleri.* Serum Kreatinin değerleri IR ( $0,9 \pm 0,17$ ) grubunda kontrol ( $0,4 \pm 0,05$ ) grubuna göre anlamlı derece yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 50 mg/kg ( $0,83 \pm 0,12$ ) ve 100 mg/kg ( $0,96 \pm 0,15$ ) silimarin uygulanan gruplar ile IR grubu arasında anlamlı bir fark yoktur ( $p > 0,05$ ). 50 mg/kg silimarin uygulanan grubun

kreatinin değeri, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da IR grubundan düşük bulunmuştur (Tablo 1).

*GOT (AST) değerleri.* Serum GOT değerleri (Tablo 1), IR ( $289 \pm 11,9$ ) grubunda kontrol ( $120,43 \pm 20,7$ ) grubuna göre anlamlı derece yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). 50 mg/kg silimarin grubu ile ( $203,11 \pm 54,3$ ) kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış, IR grubuna göre ise anlamlı bir azalma saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). 100 mg/kg silimarin uygulanan grupta ise IR grubuna göre anlamlı bir azalma yoktur ( $p > 0,05$ ).

*GPT (ALT) değerleri.* Serum GPT değerleri (Tablo 1), IR ( $130,4 \pm 1,85$ ) grubunda, kontrol ( $90,63 \pm 10,58$ ) grubuna göre anlamlı derece yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Silimarinin 50 mg/kg ( $54,18 \pm 7,94$ ) ve 100 mg/kg ( $71,41 \pm 7,75$ ) uygulanan grupları ile kontrol ve IR grupları arasında anlamlı fark bulundu ( $p < 0,05$ ).

*Ürik asit değerleri.* Serum ürik asit değerleri IR ( $2,75 \pm 0,21$ ) grubunda kontrol ( $1,8 \pm 0,2$ ) grubuna göre anlamlı derece yüksektir ( $p < 0,05$ ). 50 mg/kg ( $1,8 \pm 0,17$ ) ve 100 mg/kg ( $1,9 \pm 0,12$ ) silimarin uygulanan gruplarda da kontrol grubuna göre anlamlı bir fark yokken, IR grubu ile anlamlı bir azalma olduğu saptandı (Tablo 1).

### **Böbrek doku enzim analizi sonuçları**

Yapılan çalışmalar sonucunda kontrol ve uygulama gruplarına ait böbrek dokusunda GSH, MDA, SOD ve CAT değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

*Doku GSH değerleri.* Kontrol ( $1,268 \pm 0,142$ ) grubuna ait doku GSH değerleri, uygulama grupları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. IR ( $0,82 \pm 0,157$ ), 50 mg/kg silimarin ( $0,636 \pm 0,074$ ) ve 100 mg/kg silimarin ( $0,566 \pm 0,066$ ) uygulama gruplarında azalma anlamlı düzeyde ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur. (Tablo 2).

*Doku MDA değerleri.* Böbrek dokusu MDA değerlerinin kontrol ( $16,423 \pm 1,221$ ) grubunda, IR ( $116,618 \pm 7,029$ ) grubuna göre anlamlı derecede ( $p < 0,05$ ) düşük olduğu saptanmıştır. 50 mg/kg ( $102,744 \pm 8,981$ ) ve 100 mg/kg ( $134,896 \pm 7,903$ ) silimarin uygulanan gruplar, kontrol ve IR grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bir artış saptanmıştır (Tablo 2).

*Doku SOD değerleri.* Doku SOD enzim değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında, IR ( $8 \pm 0,51$ ) grubu enzim değerlerinin, kontrol ( $3,61 \pm 0,42$ ) grubuna göre anlamlı derecede ( $p < 0,05$ ) yükseldiği saptanmıştır. Silimarinin 50 mg/kg ( $3,71 \pm 0,64$ ) ve 100 mg/kg ( $4,76 \pm 0,84$ ) uygulama dozlarından 50 mg/kg uygulama dozunda, kontrol ile anlamlı bir fark yokken, IR grubu arasında  $p < 0,05$  düzeyinde fark anlamlı bulunmuştur (Tablo 2).



TABLO 1. Kontrol ve deney gruplarına ait serum değerleri.

	Üre (BUN) mg/dl	KREATİNİN mg/dl	GOT (AST) U/L	GPT (ALT) U/L	ÜRİK ASİT mg/dl
<b>Kontrol</b>	52,66 ± 2,4 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,05 <sup>b</sup>	120,43 ± 20,7 <sup>b</sup>	90,63 ± 10,58 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,2 <sup>b</sup>
<b>IR</b>	116,13 ± 6,96 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,17 <sup>a</sup>	289 ± 11,9 <sup>a</sup>	130,4 ± 1,85 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,21 <sup>a</sup>
<b>50 mg/kg Silimarin</b>	107,96 ± 7,32 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,12 <sup>a,b</sup>	203,11 ± 54,3 <sup>a,b</sup>	54,18 ± 7,94 <sup>a,b</sup>	1,8 ± 0,17 <sup>b</sup>
<b>100 mg/kg Silimarin</b>	113,25 ± 9,88 <sup>a</sup>	0,96 ± 0,15 <sup>a,b</sup>	274,82 ± 53,56 <sup>a</sup>	71,41 ± 7,75 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,12 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>: kontrol grubuna göre p < 0.05 seviyesinde önemli; <sup>b</sup>: IR grubuna göre p < 0.05 seviyesinde önemli.

TABLO 2. Böbrek dokularına ait enzim değerleri.

	GSH μmol/g protein	MDA μmol/g protein	SOD μmol/g protein	KATALAZ K/mg
<b>Kontrol</b>	1,268 ± 0,142 <sup>b</sup>	16,423 ± 1,221 <sup>b</sup>	3,61 ± 0,42 <sup>b</sup>	8,85 ± 1,23 <sup>b</sup>
<b>IR</b>	0,82 ± 0,157 <sup>a</sup>	116,618 ± 7,029 <sup>a</sup>	8 ± 0,51 <sup>a</sup>	16,59 ± 0,95 <sup>a</sup>
<b>50 mg/kg Silimarin</b>	0,636 ± 0,074 <sup>a</sup>	102,744 ± 8,981 <sup>a</sup>	3,71 ± 0,64 <sup>b</sup>	14,35 ± 1,38 <sup>a,b</sup>
<b>100 mg/kg Silimarin</b>	0,566 ± 0,066 <sup>a</sup>	134,896 ± 7,903 <sup>a</sup>	4,76 ± 0,84 <sup>b</sup>	16,89 ± 1,35 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: kontrol grubuna göre p < 0.05 seviyesinde önemli; <sup>b</sup>: IR grubuna göre p < 0.05 seviyesinde önemli.

*Doku katalaz değerleri.* Katalaz (CAT) enzim aktivitesi değerleri Tablo 2’de verilmiştir. Tablo incelendiğinde; IR grubu ( $16,59 \pm 0,95$ ) ve 100 mg/kg silimarin uygulama grubu ( $16,89 \pm 1,35$ ) değerlerinin, kontrol ( $8,85 \pm 1,23$ ) grubu değerlerinden anlamlı ( $p < 0,05$ ) derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak değerlerde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış, IR grubu değerlerine göre de anlamlı bir azalış ortaya çıkmıştır ( $p < 0,05$ ). 50 mg/kg silimarin grubu katalaz enzim değerlerinde ise kontrol ve sham grubuna göre anlamlı bir yükselme, IR grubuna göre anlamlı ( $p < 0,05$ ) bir düşme olduğu bulunmuştur.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Renal IR hasarı, hücre içi haberleşme sisteminin, çeşitli aracı maddelerin ve hücrelerde meydana gelen zincirleme reaksiyonlar sonucu meydana gelen, hipoksi kaynaklı akut böbrek yetmezliğinin temel sebebini oluşturan karmaşık bir durumdur [23]. İskemik bir organın reperfüzyonu ise genellikle şiddetli doku hasarı ile sonuçlanmakta olup, bu durum iskemik dönemin kendisinden çok yeniden oksijenlenmesinin bir sonucudur [24]. Hayvan deneyleri, hücre ve doku kültürü ile biyokimyasal alanda yapılmış olan birçok çalışma, yeniden oksijenlenmenin zararlı etkileri sonucunda meydana gelen SOR miktarının aşırı derecede artış gösterdiğini, bu durum karşısında da vücutta yer alan SOR tutucu antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kaldığını ve sadece reperfüze olan dokunun yanında tüm vücut organlarını da etkileyebileceğini göstermiştir [1,25,26].

Serbest radikallerin zararlı etkileri eksojen kaynaklı antioksidan özelliği olan bazı maddeler tarafından azaltılır veya tamamen ortadan kaldırılır. Flavanoidler de bitkilerde yaygın olarak görülen ve antioksidan özellik taşıyan polifenolik bileşiklerdir [27]. Silimarin, içerdiği flavano-lignanlar ve diğer polifenolik bileşikler ile antioksidan özellik gösteren ve buna bağlı olarak serbest radikal tutucu işlevi bulunan bir maddedir [6]. Bu özelliğinden dolayı silimarin ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Silimarinin hücre redükte glutatyon (GSH) seviyesinde artışa neden olduğu [7], SOD aktivitesini arttırdığı [8] ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini [9] ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır.

Böbrek iskemi/reperfüzyonunun neden olduğu oksidatif stres hasarına karşı eksojen antioksidan etkili silimarinin, iskemi reperfüzyon ile birlikte uygulanmasının; histolojik olarak, serum biyokimya ve böbrek homojenat örneklerinde lipid peroksidasyonun

bir göstergesi olan MDA ve GSH düzeyine etkileri ile endojen antioksidan enzimler olarak bilinen katalaz ve SOD aktiviteleri ölçülerek açıklanmaya çalışılmıştır.

Dokuda meydana gelen iskemi, yüksek miktarda SOR oluşumuna neden olmasının yanında, lokal ve sistemik böbrek yetmezliğine de neden olur. İskemi sonrasında dokuda nötrofil göçünün artması ve aktive olan nötrofillerin, dokuda oluşan SOR'un temel kaynağı olduğu yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir [28,29].

Silimarin kullanarak yapılan bu çalışmada böbrek dokusu histopatolojik açıdan incelendiğinde, kontrol grubu sıçanlarına ait doku örneklerinde böbrek tübül hücrelerinin normal görünümünde olduğu, tübüller içerisinde ve tübüller arasında herhangi bir hasarın olmadığı görülmektedir. IR gruplarında %60 oranında çok önemli düzeyde tübüller hasar meydana gelmiştir. Bu hasarda tübüller dejenerasyon hücreler arası kanlanma ve tübüllerde hücre kaybı ile tübül içerisinde sıvı birikimi olarak gözlenmiştir. Silimarinin 50 ve 100 mg/kg uygulanan dozlarında kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edilmesi silimarinin ROS etkisini önleyebileceğinin göstergesidir. Silimarinin renal-IR öncesi 7 günlük 50 ve 100 mg/kg oral dozu kullanılarak yapılan bir çalışmada, elde edilen bulgular IR ile meydana gelen hasarın silimarinin uygulanan dozları ile önemli ölçüde azalmış olması bizim bulgularımızla paralellik göstermektedir [30].

Renal fonksiyon bozukluğu sonucunda meydana gelen plazma kreatinin, üre seviyelerindeki ve serum AST aktivitesindeki artış, böbrek IR hasarının biyokimyasal sonuçlarından biridir. Serum üre ve kreatinin seviyesindeki artış tübüller nekroz gelişmeden önceki aşamada yükselme gösterir ve glomerüler filtrasyon oranının bir göstergesidir. Tam olarak açıklığa kavuşmamış olsa da serumda üre ve kreatinin seviyelerindeki artışın sebebinin tübüller engellenme ya da tübüllerde geriye sızdırmadan kaynaklandığı düşünülmektedir [31]. Çalışmamızda IR gruplarında üre miktarında artış saptanmıştır. Bu durum böbrek işlevinde bir düzensizliğin oluştuğunu göstermektedir.

Karimi ve arkadaşlarının (2005) yapmış olduğu, sisplatin ile meydana getirilen nefrotoksisite üzerine silimarinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada, silimarinin 50 mg/kg'lık metanol ve saf ekstraktlarının sisplatin enjeksiyonundan 2 saat önce ve iki saat sonra intraperitoneal enjeksiyon sonrasındaki etkileri 5 gün sonrasında incelenmiştir [31]. Bunun sonucunda, silimarin uygulanan tüm gruplarda serum üre ve kreatinin değerlerinde olumlu yönde bir azalma olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz silimarin uygulama gruplarındaki IR ile artan üre değerlerindeki azalma bu çalışma ile uyumluluk göstermektedir.

Serum kreatinin seviyesi renal (glomerular) fonksiyonun bir belirleyicisidir. IR hasarı sonrasında serum kreatinin seviyesinde gözlenen yükselme, böbrek proksimal tübül hücrelerinde meydana gelen fonksiyon bozukluğunu işaret eden bir durumdur [32]. Çalışmamızdan elde ettiğimiz serum kreatinin değerlerinin IR gruplarında artış göstermesi IR'nin oluşturduğu etkiden kaynaklanmaktadır ve bu durum incelenen kaynaklarla uyumludur. Çalışmamızdaki elde ettiğimiz kreatinin değerleri 50 mg/kg silimarin uygulanan grupta bir miktar düşüş gösterse de 100 mg/kg silimarin gruplarında IR grubundan farklılık göstermemesi de silimarin molekülünün yüksek dozlarının IR hasarında etkili bir koruma sağlayamayacağını göstermektedir.

Serum ya da plazmada yükselen AST enzim aktivitesi genel olarak canlıda karaciğer dokusunda meydana gelen hasarı işaret etse de, bu enzim sadece karaciğer için spesifik bir enzim değildir, aynı zamanda düz kas ve böbrek gibi diğer organlarda da bulunmaktadır [32]. Aspartat amino transferaz enzimi (AST) böbrek proksimal tübül hücrelerinde lokalize olan bir enzimdir. Böbrek IR hasarı sonrasında serum AST aktivitesinin artışı bildirilmektedir [33]. Her ne kadar insanlar üzerinde yapılan akut böbrek yetmezliği çalışmaları sonucunda serum AST aktivitesinde bir değişim gözlenemese de sıçanlar üzerine yapılan böbrek IR çalışmalarında miktarının arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur [34].

Çalışmamızda IR grubu serum AST aktivitesinde meydana gelen artış mevcut çalışmalarla da uyumluluk göstermektedir. Silimarinin 50 ve 100 mg/kg uygulandığı gruplarda AST aktivitesinin kontrol grubu değerlerine yakın bulunması silimarinin AST düzenleyici etkinliğinin fazla olduğunu göstermektedir.

Laktat dehidroenaz (LDH) enzimi, tüm hücrelerde bulunan ve hipoksik hücresel hasar kaynaklı hastalıkların tespitinde kullanılan güvenilir sitoplazmik bir enzimdir. Yapılan deneysel çalışmalarda, serum ve idrarda LDH aktivitesinde meydana gelen yükselme, renal doku uyuşmazlığı sırasında görülen akut renal bozukluk, hematüri ve toksik kaynaklı renal hasar durumlarında ortaya çıkmaktadır [35]. Çalışmamızda IR grubundan elde ettiğimiz bulgular da mevcut bu bilgileri destekler nitelikte sonuçlardır. Uygulama grupları ile IR grubu arasında ise LDH aktivitesi açısından kayda değer bir azalma gözlenememiştir.

IR hasarı sonrasında serumda miktarı yükselen bir diğer parametre de ürik asittir. Değişik nedenlerden böbreklerde meydana gelen hasardan birinin de, tübüller içerisinde kalsiyum, ksantin ve ürik asit birikimi olduğu düşünülmektedir. Serum ürik asit miktarındaki artışın akut böbrek yetmezliğine sebep olduğunu destekleyen

pek çok çalışma bulunmaktadır [36]. Bununla birlikte, ürik asidin bağışıklık sisteminde yer alan hücreleri aktive ettiği (monositlerin kimyasal uyarıcılarını stimüle ederek) ve vasküler hücrelerde pro-oksidan olarak işlev gördüğüne ilişkin çalışmalar da bulunmaktadır [37]. Ürik asit miktarı bizim çalışmamızda da mevcut epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar ile uyumlu olacak şekilde IR grubunda kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir. Uygulama gruplarından elde edilen sonuçlar ise meydana gelen hasarın silimarin ile kontrol gruplarında ölçülen değerlere yaklaştığını göstermiştir. Bu bulgular da IR ile oluşan akut böbrek yetmezliğini önleyebileceğini göstermektedir.

Süperoksit radikallerinin yol açtığı oksidatif hasara karşı antioksidan savunmada görev alan ilk enzim, SOD'dur. SOD, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür [38]. CAT ya da GP<sub>x</sub> ise hidrojen peroksidi zararsız yan ürünlere dönüştürür. Bu yüzden hücrel hasarın şiddetinde önemli rol oynarlar. Hidrojen peroksitin zararsız hale getirilmesinde, glutatyon, glutatyon peroksidaz ile okside glutatyonla dönüştürülür. Glutatyon okside glutatyonla katalizlenirken glutatyon reduktaz kullanılarak NADPH üretilir [39]. CAT bir hemoproteindir ve aktif formda olabilmesi için NADPH'ye ihtiyaç duyar. Bu yüzden NADPH SOD ve CAT'ın iş görebilmesinde önemli bir role sahiptir. NADPH seviyesi, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesine bağlıdır. Glutatyon reduktaz/gulutatyon peroksidaz hücre sitoplazmasında aktifken, CAT başlıca peroksidazlarda aktiftir. Glutatyon ve katalazın üretimi için gerekli olan NADPH pentoz fosfat yolunda üretilmektedir [40]. Çalışmamızda silimarin uygulama gruplarının GSH düzeylerinde IR sonrasında herhangi bir değişiklik saptanmamakla birlikte IR grubu böbrek dokularının homojenatından elde ettiğimiz katalaz ve SOD aktivitelerinin, kontrol grubuna göre yüksek tespit edilmesi mevcut çalışmalar ile uyumluluk göstermemektedir. Bu durumun IR sırasında katalaz ve SOD enzimlerinin indüklenmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz ancak konu ile ilgili detaylı bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Lipitler, oksidasyon belirleyicisi olarak en çok çalışılan ve SOR'ların reksiyona girebildiği ortak bir substrattır. Oksidasyon sonrası özellikle hücrel zararın lipitlerinde meydana gelen peroksidasyon sonucunda son ürün olarak malondialdehit (MDA), konjuge dienler, kısa zincirli akenler ve lipid hidroperoksitleri meydana gelir. Endoperoksitler doymamış yağ asitleri ve serbest demir atomları ile birleştiğinde MDA meydana gelir. Tiobarbütarik asit reaktif bileşenleri (TBARS) testi, MDA miktarını belirlemede yaygın olarak kullanılan bir testtir. Renal iskemi reperfüzyon

sonrasında oluşan son ürün olan MDA miktarı doymamış yağ asitlerinin oksidasyonundan dolayı artar [13].

Ginko biloba ekstratı kullanılarak yapılmış olan bir çalışmada, 45 dakika iskemiye takiben 6 saat reperfüzyon sonrasında böbrek homojenatlarından elde edilen MDA bulguları incelendiğinde, IR grubunda kontrol grubuna göre MDA miktarı artmıştır, IR ile birlikte ginko biloba ekstratının 50 mg/kg lık dozu iskemiden 15 dakika önce verilerek aynı sürelerde IR hasarı oluşturulan grupta ise MDA miktarının düştüğü saptanmıştır [13].

Yapmış olduğumuz bu çalışmada doku homojenatından elde edilen lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA değerleri, IR grubunda mevcut çalışmalara uygun bir şekilde yükseldiği saptanmıştır. Silimarin uygulama gruplarından elde edilen değerlerin, kontrol grubundan oldukça yüksek bulunması lipid peroksidasyonu önlemede daha yüksek dozda silimarinin olumsuz etkisi olacağını düşündürmektedir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmadan elde edilen veriler değerlendirildiğinde eksojen kaynaklı antioksidan bileşiklerin olumlu etkilerinin görülmesi için silimarin gibi antioksidan özellikli bileşiklerde etkili dozun uygulama yolu ve dozun saf ya da doğal hali ile kullanılmasının son derece önemli olduğu anlaşılmaktadır.

**Teşekkür.** Bu çalışma H. Şentürk'ün doktora tezinin bir parçasıdır.

## Kaynaklar

- [1] O. Aruoma, H. Kaur, and B. Halliwell, Oxygen free radicals and human diseases, *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health* **111** (1991), 172–177.
- [2] N. A. Porter, Chemistry of lipid peroxidation, *Methods in Enzymology* **105** (1984), 273–282.
- [3] P. A. Southorn and G. Powis, Free radicals in medicine. I, Chemical nature and biologic reactions, *Mayo Clin. Proc.* **63** (1988), 381–389.
- [4] T. Ding, S. Tian, Z. Zhang, D. Gu, Y. Chen, Y. Shi, and Z. Sun, Determination of active component in silymarin by RP-LC and LC/MS, *J. Pharmacol. Biomed. Anal.* **26** (2001), 155–161.
- [5] C. Nencini, G. Giorgi, and L. Micheli, Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain, *Phytomedicine* **14** (2007), 129–135.
- [6] H. De Groot and U. Rauen, Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effect of flavanoids, *Fundam. Clin. Pharmacol.* **12** (1998), 249–255.
- [7] A. Valenzuela, M. Aspillaga, S. Vial, and R. Guerra, Selectivity of silymarin on the increase of the glutathione content in different tissues of the rat, *Planta Med.* **55** (1989), 420–422.
- [8] J. Zhao, M. Lahiri-Chatterjee, Y. Sharma, and R. Agarwal, Inhibitory effect of a flavonoid antioxidant silymarin on benzoyl peroxide-induced tumor promotion, oxidative stress and inflammatory responses in SENCAR Mouse skin, *Carcinogenesis* **21** (2000), 811–816.

- [9] E. Bosisio, C. Benelli, and O. Pirola, Effect of flavanoligans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes, *Pharmacol. Res.* **25** (1992), 147–154.
- [10] V. Křen and D. Walterová, Silybin and silymarin-new effects and new applications, *Biomedical* **149** (2005), 29–41.
- [11] J. Sonnenbichler, F. Sacelera, I. Sonnenbichler, and R. Weyhenmeyer, Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *Silybum marianum* on kidney cells, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **290** (1999), 1375–1383.
- [12] H. B. Waynforth and P. A. Flecknell, *Experimental and surgical technique in the rat*, 2<sup>nd</sup> ed., Academic Press Limited, London 1994.
- [13] G. Şener, E. Şener, Ö. Şehirli, A. V. Öğünç, Ş. Çetinel, N. Gedik and A. Sakarcın, Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia-reperfusion-induced injury in rats, *Pharmacological Research* **52** (2005), 216–222.
- [14] Y. Kaya, E. Aral, T. Coşkun, N. Erkasap, and A. Var, Increased intraabdominal pressure impairs liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *Journal of Surgical Research* **108** (2002), 250–257.
- [15] N. Sanz, C. D. Fernandez, L. F. Simon, A. Alvez, and M. Cascalez, Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a subnetal dose of thioacetamid, *Biochimica et Biophysica Acta* **1384** (1998), 66–78.
- [16] G. Aktay, D. Deliorman, E. Ergun, F. Ergun, E. Yeşilada, and C. Çevik, Hepatoprotective effects of Turkish folk remedies on experimental liver injury, *Journal of Ethnopharmacology* **73** (2000), 121–129.
- [17] K. Fruta, A. Kakita, T. Takahashi, T. Tomiya and K. Fujiwara, Experimental study on liver regeneration after simltenous partial hepatectomy and pancreatectomy, *Hepatology Research* **17** (2000), 223–236.
- [18] H. Okhawa, N. Ohishi, and K. Yagi, Assay for lipid peroxides by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.* **95** (1979), 351–358.
- [19] J. Sedlack and H. R. Lindsay, Estimation of total, Protein- Bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent, *Anal. Biocem.* **25** (1968), 192–205.
- [20] O .H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, Protein Measurementwith the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry* **193** (1951), 265–275.
- [21] E. Beutler, *Red cell metabolism, A Manual of Biochemical Methods*, 3<sup>rd</sup> ed., NY: Grune & Stratton, Inc., New York, 1985.
- [22] C. C. Winterborn, R. E. Hawkins, M. Brain, and R. W. Carrell, The estimation of red cell superoxide dismutase activity, *J. Lab. Clin. Med.* **85** (1975), 337–341.
- [23] J. M. Thurman, Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion, *Clinical Immunology* **123** (2007), 7–13.
- [24] S. Başay, Ö. Adsan, G. İnal, ve M. Çetinkaya, Verapamil ve alfa-tokoferolün rat böbreğindeki deneysel reperfüzyon hasarı üzerine karşılaştırmalı etkileri, *Türk Üroloji Dergisi* **29** (2003), 11–15.

- [25] D. K. Das, and N. Maulik, Antioksidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury, *Methods in Enzymology*, **233** (1994), 601–611.
- [26] I. T. Mark and W. B. Weglicki, Antioksidan activity of calcium channel blocking drugs, *Methods in Enzymology* **234** (1994), 620–630.
- [27] E. L. Da Silva, M. Piskula, and J. Terao, Enhancement of antioxidative ability of rat plasma by oral administration of (-)- epicatechin, *Free Radical Biology & Medicine* **24** (1998), 1209–1216.
- [28] D. N. Granger, and R. J. Korthuis, Physiological mechanisms of postischemic tissue injury, *Annu. Rev. Physiol.* **57** (1995), 311–332.
- [29] B. J. Zimmerman, M. B. Grisham, and D. N. Granger, Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration, *Am. J. Physiol.* **258** (1990), 185–190.
- [30] H. Senturk, S. Kabay, G. Bayramoglu, H. Ozden, F. Yaylak, M. Yucel, E. Gurlek Olgun, and A. Kutlu, Silymarin attenuates the Renal Ischemia/Reperfusion Injury-Induced Morphological Changes in the Rat Kidney, *World Journal of Urology* **26** (2008), 401–407.
- [31] G. Karimi, M. Ramezani, and Z. Tahoonian, Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2** (2005), 383–386.
- [32] C. Thiernemann, S. A. Patel, E. O. Kvale, G. W. Cockerill, A. J. Brown, K. N. Stewart, S. Cuzzocrea, D. Britti, and H. Mota-Filipe, P. K. Chatterjee, High Density Lipoprotein (HDL) reduces renal ischemia/reperfusion injury, *J. Am. Soc. Nephrol.* **14** (2003), 1833–1843.
- [33] P. K. Chatterjee, S. Cuzzocrea, P. A. J. Brown, K. Zacharowski, K. N. Stewart, H. Mota-Filipe, and C. Thiernemann, Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat, *Kidney Int.* **58** (2000), 658–673.
- [34] S. Feilleux-Duche, M. Garlatti, M. Aggerbeck, M. Poyard, J. Bouguet, J. Hanoune, and R. Barouki, Cell specific regulation of cytosolic aspartate aminotransferase by glucocorticoids in the rat kidney, *Am. J. Physiol.* **265** (1993), C1298–C1305.
- [35] O. Kwon, B. A. Molitoris, M. Pescovits, and J. K. Kelly, Urinary actin, interleukin-6, and interleukin-8 may predict sustained arf after ischemic injury in renal allografts, *American Journal of Kidney Diseases* **41** (2003), 1074–1087.
- [36] C. A. Roncal, W. Mu, B. Croker, S. Reungjui, X. Ouyang, I. Tabah-Fisch, J. R. Johnson, A. A. Ejaz, Effect of elevated serum uric acid on cisplatin-induced acute renal failure, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **292** (2006), 116–122.
- [37] J. Kanellis, S. Watanabe, J. H. Li, D. H. Kang, P. Li, T. Nakagawa, A. Wamsley, D. Sheikh-Hamad, H. Y. Lan, L. Feng, and R. J. Johnson, Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase- 2, *Hypertension* **41** (2003), 1287–1293.
- [38] J. M. Mccord and I. Fridovich, The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen, *J. Biol. Chem.* **244** (1969), 6056–6063.
- [39] A. Meister and M. E. Anderson, Glutathione, *Annu. Rev. Biochem.* **52** (1983), 711–760.
- [40] G. F. Gaetani, S. Galiano, L. Canepa, A. M. Ferraris and H. N. Kirkman, Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes, *Blood* **73** (1989), 334–339.