

Miyokardiyal İskemi-Reperfüzyonun Neden Olduğu Histolojik Değişiklikler Üzerine Caffeic Acid Phenethyl Ester'in Koruyucu Etkileri

PROTECTIVE EFFECT OF CAFFEIC ACID PHENETHYL ESTER ON MYOCARDIAL ISCHEMIA/REPERFUSION-INDUCED HISTOLOGICAL ALTERATIONS

Dr.Nigar VARDI,^a Dr.Hakan PARLAKPINAR,^b Dr.Mukaddes EŞREFOĞLU,^a Dr.Muharrem UÇAR^c

^aHistoloji-Embriyoloji AD, ^bFarmakoloji AD, ^cAnesteziyoloji ve Reanimasyon AD, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, ELAZIĞ

Özet

Amaç: Bu çalışmada, sıçanlardaki miyokardiyal iskem/reperfüzyon hasarına karşı caffeic acid phenethyl ester (CAPE)'in koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntemler: Yirmi dört adet Wistar sıçan rastgele 3 gruba ayrıldı: Sham, iskem/reperfüzyon (I/R) ve I/R + CAPE grubu. I/R için sol ana koroner arter 30 dakika oklüze ardından 120 dk reperfüze edildi. Kalp dokusunda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan doku malondialdehit (MDA) düzeyinin tesbiti için tiobarbitürik asit metodu kullanıldı. Histolojik bulgular ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Bulgular: I/R grubunda miyokardiyal dokuda MDA seviyesi yükselirken, CAPE verilen grupta önemli derecede azaldı. I/R'nun neden olduğu histopatolojik değişiklikler, intrasellüler vakuolizasyon, sitoplazmik glikojen içeriğinin azalması, damar endoteline nötrofil adhezyonu, mast hücre degranülasyonu ve koagülasyon nekrozu olarak belirlendi. I/R'la meydana gelen bu değişiklikler CAPE'le hafifledi.

Sonuç: Bu çalışma, CAPE'nin I/R'nun neden olduğu miyokardiyal hasara karşı koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: İskemi, reperfüzyon, miyokard, mikroskop

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24:469-475

Abstract

Objective: To aim of this study was to investigate the purported protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against myocardial ischemia/reperfusion.

Material and Methods: Twenty-four Wistar rats were randomly divided into three groups: Sham operation, ischemia/reperfusion (I/R) and I/R + CAPE. To produce I/R, the left main coronary artery was occluded for 30 minute, followed by 120 minute reperfusion. The tiobarbituric acid method was used to determine tissue malondialdehyde (MDA) levels as an indicator of lipid peroxidation in the heart. Histological changes were evaluated with light microscopy.

Results: I/R was accompanied by a significant increase tissue MDA whereas CAPE administration significantly reduced this substrate. I/R induced myocardial damage, which manifested by histopathological evidence of intracellular vacuolization, reduction in cytoplasmic glycogen granules, neutrophil adhesion to endothelium, mast cell degranulation and coagulation necrosis. These changes induced by I/R were ameliorated with CAPE.

Conclusion: This study shows that CAPE can be regarded as a protective agent action against I/R-induced myocardial damage.

Key Words: Ischemia, reperfusion, myocardium, microscopy

Miyokardiyal iskemisi oksijen ihtiyacının yeterince karşılanamadığı durumlarda oluşmaktadır. İskemi sonrası reperfüz-

yonla hücrelere oksijen ve besleyici maddeler sağlanmasına rağmen, bu dönemde miyokardiyal hasar artmaktadır. İskemi-reperfüzyonun kalbte neden olduğu doku hasarı üzerine koruyucu ya da hasarı azaltıcı etkisi olduğu düşünülen relaksin, Lazaroid, M40403 ve xanthones gibi kimyasal maddeler kullanılmıştır.¹⁻⁵ Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) uzun zamandır geleneksel tıpta kullanılan, arıbalının aktif bir bileşenidir. Yapılan çalışmalar CAPE'nin antiviral, antibakteriyel ve antioksidan özellikleri olduğunu göstermiştir.⁶

Geliş Tarihi/Received: 07.06.2004

Kabul Tarihi/Accepted: 07.09.2004

Bu çalışma 18-21 Mayıs tarihleri arasında Mersin'de yapılan VII. Ulusal Histoloji-Embriyoloji kongresinde tebliğ edilmiştir.

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr.Nigar VARDI
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji AD, MALATYA
nvardi@inonu.edu.tr

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2004, 24

469

Bu çalışmanın amacı; sıçanlarda oluşturulan miyokardiyal iskemi-reperfüzyona bağlı, histolojik değişiklikler üzerine CAPE'nin koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntemler

Deney Grupları: Bu çalışmada 250-300 gr ağırlığında 24 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar üç gruba ayrıldı. I. grup sham operasyon (n= 8) kontrol, II. grup (n= 8) iskemi-reperfüzyon (I/R) ve III. grup I/R + CAPE. Çalışmadaki bütün deneyler İnönü Üniversitesi Hayvan Araştırma Etik Komitesinin izni ile gerçekleştirildi.

İskemi Reperfüzyon İşlemi: Sıçanlara intraperitoneal urethan (1.2-2.4 g/kg) ile anestezi uygulandı. Jugular ven ve trakea ilaç uygulamaları ve suni solunum için kanule edildi. Sistemik kan basıncı Harvard Model 50-8952 transdüser ve recorder (Harvard Apparatus, Inc., Shrewsbury, MA, USA) kullanılarak carotid arterden monitörize edildi. Sıçanların göğüs boşlukları sol torakotomi ile açıldı. Sternumun 2 mm solundan 4. ve 5. kostalar kesildi. Pozitif basınçlı suni solunum 1.5 mL/100 g, 60 kez/dk ayarlanarak normal PCO₂, PO₂ ve pH parametrelerini oluşturacak şekilde başlatıldı. Perikard kesildikten sonra göğüs kafesinin sağ tarafından hafif bir basınç uygulanarak kalp dışarı çıkartıldı. Sol ana koroner artere 6/0 ipekle sutur atıldı. Daha sonra kalp dikkatlice göğüs kafesi içine yerleştirildi. Bu şekilde 20 dk bekletildi. Bu işlem sırasında aritmi gelişen veya kan basıncı 70 mmHg'nın altına düşen hayvanlar deney grubundan çıkarıldı. Suturen ucu plastik bir tüpten geçirildikten sonra, ip gerilerek oklüzyon sağlandı. 30 dk sonra serbest bırakılarak 120 dk reperfüzyon dönemi başlatıldı.⁷

İlaç Uygulamaları: CAPE (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA) (50 µmol/kg) etanolde çözüldükten sonra dilüe edilerek (%0.09 NaCl) %1 konsantrasyona getirildi. Oklüzyondan 10 dk önce başlanarak, iskemi süresince iv olarak uygulandı. Kontrol grubuna ise diğer gruplara uygulanan operasyon, oklüzyon oluşturulmadan gerçekleştirildi.⁷

MDA (malondialdehit) Ölçümü: Kalp dokuları 150 mm soğuk KCl içinde homojenize edildi. Homojenize edilen dokuların MDA içerikleri, spektrofotometre kullanılarak tiyobarbitürük asit reaktif maddelerinin mevcudiyetinin ölçümü ile tesbit edildi. Sonuçlar nmol/g doku olarak açıklandı.

Histolojik Değerlendirme: Deney sonunda, sol ventriküller %10 nötral tamponlanmış formol solüsyonu içine alındı. Doku takibi işlemlerinden sonra elde edilen parafin bloklardan, 5 µ kalınlığında alınan kesitler Haematoxylen-Eosin, Crossman'ın üçlü boyası, Periodic acid Schiff ve Toluidin blue boyama metodları ile boyandı. Kesitler; hücre dejenerasyonu, intrasitoplazmik vakuolizasyon, sitoplazmik glikojen içeriği, interstisyel hücre infiltrasyonu, hemoraji ve mast hücre degranülasyonu yönünden incelendi. Kesitler değişikliklerin histopatolojik ciddiyetine göre; hafif (1), orta (2) ve şiddetli (3) olarak değerlendirildi. Maksimum skor 21 olarak belirlendi. Her bir preparatın skorlaması yapıldı ve her grup için ortalama değerler saptandı.

İstatistiksel analiz: Kalp MDA seviyeleri tek yönlü varyans analizi ile incelendi. Farklılığı yaratan grubu belirlemek için de Tukey testi kullanıldı. Histolojik bulgular için ise Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testi uygulandı p< 0.05 değerleri önemli kabul edildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi.

Bulgular

Kan Basıncı Değerleri: Ortalama arteriyel kan basınçları Tablo 1'de gösterilmiştir. Kan basıncı değerleri oklüzyonda azalmış, reperfüzyonda ortalama olarak oklüzyon öncesi değerlerine dönmüştü. I/R ve I/R + CAPE grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

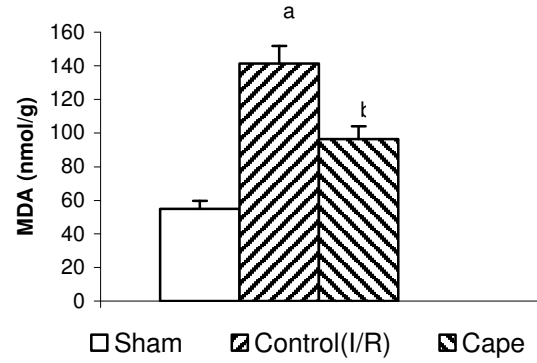
MDA miktarı: Sham grubunda MDA değeri 54.95 ± 4.84 olarak kaydedildi. İ/R, miyokardiyumda MDA içeriğinin önemli derecede artmasına neden olurken (141.36 ± 10.51 nmol/gr) CAPE'yle belirgin olarak düşüş sağlandı (96.42 ± 7.56

Tablo 1. Ortalama arteriyel kan basınçları (mmHg).

Gruplar	Stabilizasyon sonu	İskemi sonu	Reperfüzyon (dk)		
			30	60	120
Kontrol (sham)	88 ±2	86 ±3	86 ±2	85 ±3	86 ±3
I/R	87 ±3	73 ±5	82 ±5	88 ±3	84 ±3
I/R + CAPE (50 µmol/kg)	91 ±5	74 ±5	94 ±4	93 ±3	94 ±3

nmol/gr) (Grafik 1). I/R ve I/R + CAPE grupları arasındaki fark anlamlı olarak bulundu ($p < 0.05$).

Histolojik Değişiklikler: Kontrol grubunda kas lifleri normal histolojik görünümdeydi. I/R grubunda iskemik alan çevresindeki dokudan belirgin olarak ayırt edilmekteydi (Resim 1). İskemik alanda yoğun asidofil sitoplazmalı, piknotik-koyu ya da soluk nukleuslu kas lifleri dikkat çekiciydi (Resim 2). Bu hücrelerde miyofibriller nispeten belirsizdi. Bazı kas liflerinde farklı çaplarda intrasitoplazmik vakuoller izlendi. Kas liflerinin organizasyonu bozulmuş ve yer yer intersellüler ödem nedeniyle birbirlerinden ayrılmışlardı. Hücreler arasında hemoraji belirgindi (Resim 3). Bazı damarların duvarında yoğun olarak endotele yapışmış ya da endoteli aşarak bağ dokuya geçmiş lökosit grupları izlendi (Resim 4). Bu gruptaki kas tellerinin glikojen içeriği belirgin derecede azalmıştı (Resim 5). Bağ dokuda yer alan mast hücrelerinde degranülasyon izlendi (Resim 6). I/R + CAPE grubunda iskemik alan sınırlanmıştı (Resim 7). Bu grupta da yer yer asidofil sitoplazmalı ve piknotik nukleuslu kas liflerine rastlandı. Kas liflerinde miyofibril yapısı belirgindi (Resim 8). Lökosit infiltrasyonu ve hemoraji izlenmedi. Kas liflerinin içerdiği glikojen granüllerinin, iskemi-reperfüzyon grubuna göre daha iyi korunmuş olduğu gözlemlendi (Resim 9). Mast hücrelerinde degranülasyon nadir olarak görüldü (Resim 10). Bulgular Tablo 2'de gösterilmiştir. Histolojik bulguların, her grup için ortalama ± standart hata değerleri; Sham grubu: 0.00 ± 0.0 , I/R grubu: 14.50 ± 0.42 ve CAPE grubu: 2.75 ± 0.25 olarak tesbit edildi. Sham ile I/R grubu ($p = 0.00$) ve I/R ile CAPE grubu arasındaki ($p = 0.01$) fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu.

**Grafik 1.** Grupların MDA değerleri.

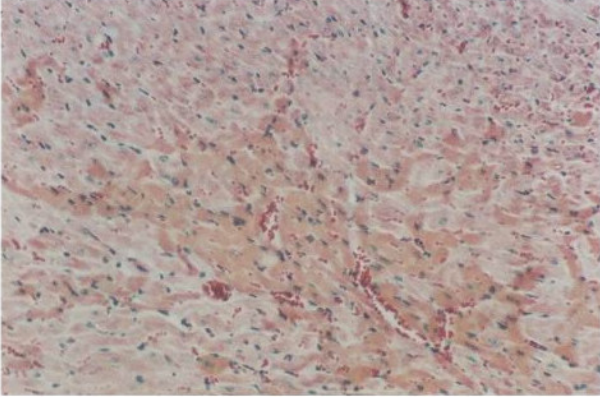
$F = 29,303$. $p < 0.05$ Sham ile I/R grubu arasında, $p < 0.05$ I/R ile CAPE grubu arasında, $p < 0.05$ Sham ile CAPE grubu arasında.

b

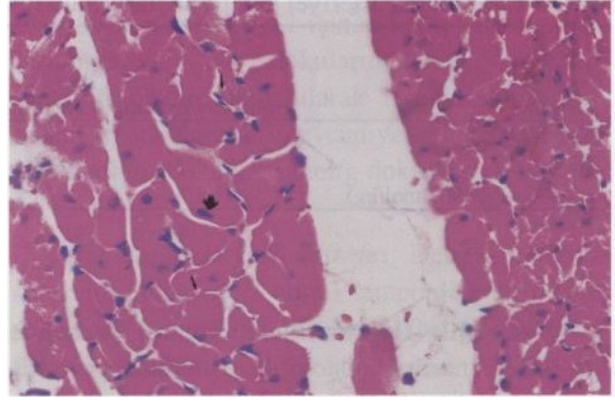
Tartışma

İskemi-reperfüzyona bağlı hasara hidroksil ve süperoksit anyonları gibi serbest oksijen radikallerinin (SOR) DNA, protein ve lipidler ile reaksiyona girip, hücrenin yapısal ve fonksiyonel özelliklerine zarar vererek neden olduğu düşünülmektedir.^{2,4-8} Son yıllarda, iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan miyokardiyal hasara karşı çeşitli antioksidanların ve antioksidatif enzimlerin kullanımının koruyucu olduğunu gösteren çalışmalar yapılmaktadır.^{2-4,5}

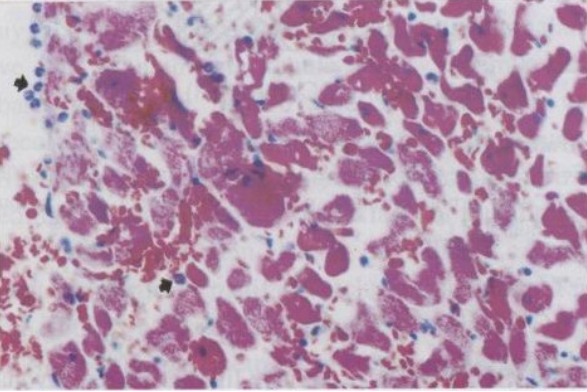
Jiang ve arkadaşları iskemi -reperfüzyonun miyokardiyal dokuda MDA miktarını artırdığını, antioksidant aktiviteye sahip xanthones in MDA'yı belirgin derecede azalttığını rapor etmişlerdir.⁵ MDA, SOR'ların neden olduğu hücre membran lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve miyokardiyal hücre hasarının bir belirleyicisidir. Çalışmamızda, iskemi-reperfüzyon hasarına karşı,



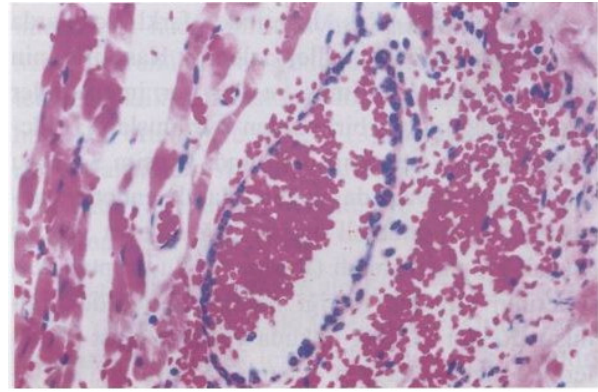
Resim 1. İ/R grubu. İskemik alan çevresindeki sağlam dokudan belirgin olarak ayırt edilmekte. Crossman'ın üçlü boyası X 33.



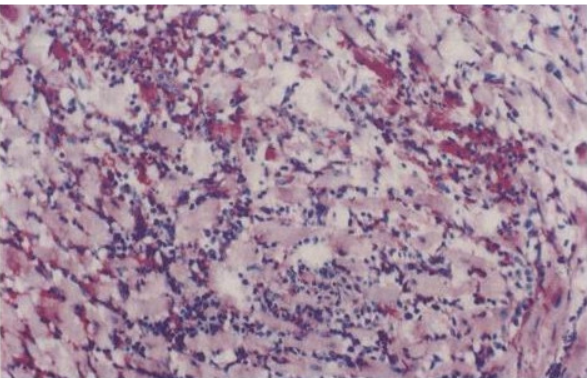
Resim 2. İ/R grubu. Koyu nükleuslu (kalın ok) ve yer yer vakuol içeren asidofil sitoplazmalı miyofibriller (ince ok). H-E X 66.



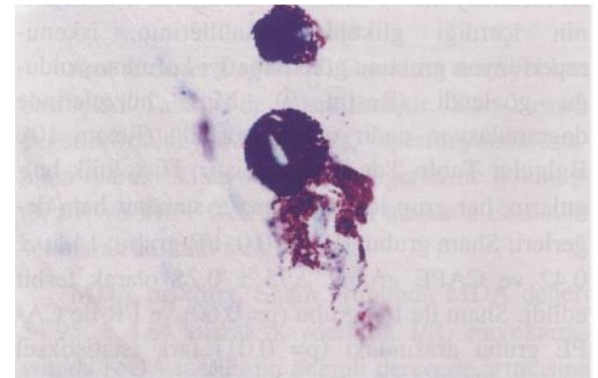
Resim 3. İ/R grubu. İnterstitiyel ödem ve hemoraji. Miyofibriller arasında gözlenen nötrofil ve monositler (ok). Crossman'ın üçlü boyası X 66.



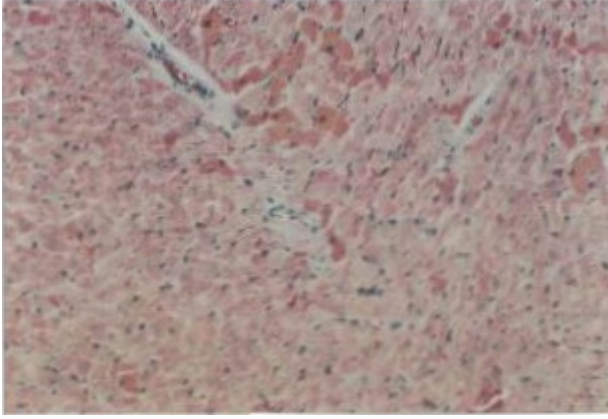
Resim 4. İ/R grubu. Damar endoteline yapışmış lökositler. H-E X 66.



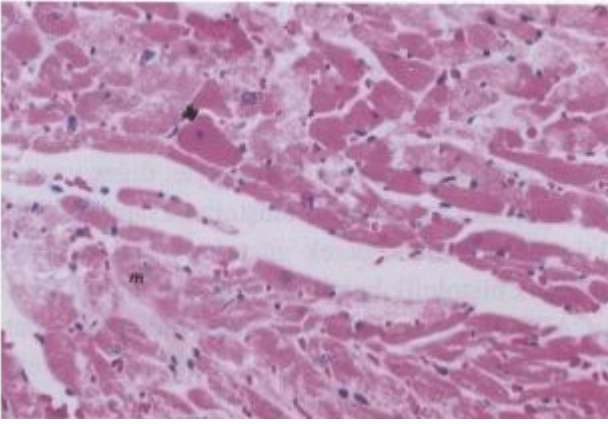
Resim 5. İ/R grubu. Miyofibril sitoplazmasında glikojen içeriğinin belirgin olarak azalması ve intersitiyel lökosit infiltrasyonu. PAS X 33.



Resim 6. İ/R grubu. Mast hücre degranülasyonu. Toluidin blue X 330.



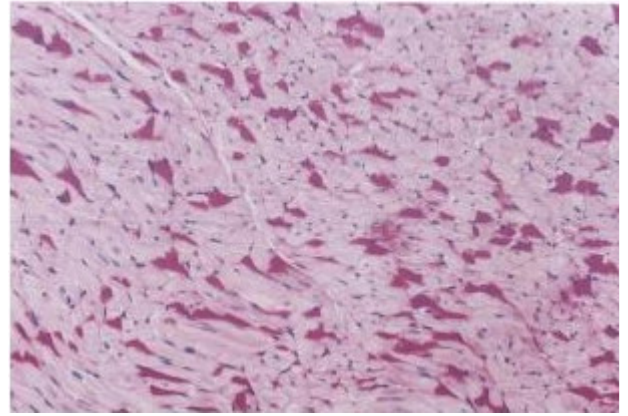
Resim 7. İ/R + CAPE grubu. İskemik alanın belirgin derecede daralması. Crosmann'ın üçlü boyası X 33.



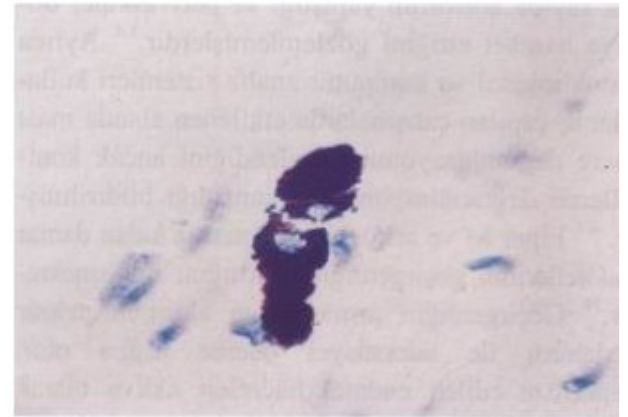
Resim 8. İ/R + CAPE grubu. Nadiren izlenen asidofil sitoplazmalı miyofibriller (ok) etrafında sağlam miyofibriller (m). H-E X 66.

İskemi reperfüzyon grubundaki histolojik değişiklikler literatür bilgileriyle uyumluydu. Takahashi ve ark ve Zacharowski ve ark İ/R grubunda miyokardiyal liflerin daha asidofilik boyandığını bildirmişlerdir.^{2,3,10} Bizim de tesbit ettiğimiz asidofilik boyanma, iskeminin neden olduğu hücre içi pH seviyesinin düşmesiyle açıklanabilir. Hücre içi asidozun artması RNAaz gibi çeşitli enzimleri aktive etmektedir. Aktive edilen enzimlerin RNA, yapısal ve enzimatik sitoplazma proteinlerini denatüre etmesi sonucu, ortama verilen bazik gruplar asit boyalara (eosin, fuksin gibi) affinite göstererek sitoplazmanın eozinofilik boyanmasına neden olurlar.¹¹

Çalışmamızda dikkat çeken diğer bulgu İ/R grubunda miyokardiyal fibrillerin glikojen içeriğinin azalmasıydı. Takahashi ve ark.'da deney grubunda miyokardiyal fibrillerin glikojen içeriğinin kontrollere göre belirgin derecede azalmış olduğunu bildirmiştir.²⁻⁹ İskemi, bölgedeki kalp kasına kasılmayı sağlayacak yeterlilikte ATP temin edilememesine bağlıdır. Oksijen desteği ortadan kalktıktan sonra mitokondride yağ asitlerinde ATP üretimini sağlayan fosforilasyon hızla azalır. ATP düzeyindeki azalma fosfofrüktokinaz aktivitesini uyarır. Aneorob glikolizisi artırır. Oksijen basıncının azaldığı durumlarda glikojenden yararlanarak ATP yapımını sağlayan bu düzenlenme mekanizması, kalp kasındaki glikojen depolarını tüketene kadar çalışır. Bu yüzden iskemi süresince glikojen depoları azalmaktadır.^{12,13}



Resim 9. İ/R + CAPE grubu. Glikojen içeriği korunmuş miyofibriller. PAS X 33.



Resim 10. İ/R + CAPE grubu. Mast hücreleri. Toluidin blue X 330.

Tablo 2. Işık mikroskopik bulgular.

Bulgular	Kontrol (n= 8)	İ/R (n= 8)	İ/R+CAPE (n= 8)
Sitoplazmik eozinofili			
Hafif (1)	–	–	3
Orta (2)	–	3	3
Şiddetli (3)	–	5	2
Piknotik nukleus			
Hafif (1)	–	1	3
Orta (2)	–	2	3
Şiddetli (3)	–	5	2
İnterstisyel hemoraji			
Hafif (1)	–	2	–
Orta (2)	–	3	–
Şiddetli (3)	–	3	–
Lökosit infiltrasyonu			
Hafif (1)	–	3	–
Orta (2)	–	3	–
Şiddetli (3)	–	2	–
İntrasitoplazmik vakuolizasyon			
Hafif (1)	–	–	–
Orta (2)	–	7	–
Şiddetli (3)	–	1	–
Glikojen içeriğinin azalması			
Hafif (1)	–	2	2
Orta (2)	–	3	1
Şiddetli (3)	–	3	–
Mast hücre degranülasyonu			
Hafif (1)	–	4	3
Orta (2)	–	2	–
Şiddetli (3)	–	2	–

Çalışmamızda İ/R grubunda damar duvarı boyunca dizilmiş lökosit gruplarına rastladık. Bani ve ark ve Massini ve ark iskemi-reperfüzyon uygulanmış kalpte infarkt alanındaki damar endoteline çok sayıda nötrofilin yapıştığı ve perivasküler dokuya hareket ettiğini gözlemlemişlerdir.^{1,4} Ayrıca histokimyasal ve kompüter analiz sistemleri kullanılarak yapılan çalışmalarda etkilenen alanda mast hücre degranülasyonunun izlendiğini ancak kontrollerde degranülasyona rastlanmadığı bildirilmiştir.⁴⁻⁸ Piper M ve ark iskemiye maruz kalan damar endotellerinin geçirgenliğinin arttığını bildirmektedir.¹⁴ Geçirgenliğin artması kan akımının tekrar başlaması ile interstisyel ödeme neden olur. Reperfüze edilen endotel hücreleri aktive olarak adhezyon moleküllerini, sitokinleri ortama salar ve NO üretimini düşürür. Bu durum iskemi reperfüze dokuda monosit ve nötröfillerin aktivasyonunu ve

birikimini hızlandırır. Hasar için diğer bir etken de, iskemiden sonra kalbin tekrar oksijenlenmesi boyunca muhtemelen superoksit anyonlarının neden olduğu mast hücrelerinin degranülasyona uğraması olabilir. Histamin, serotonin ve lökotrien gibi güçlü mediatörlerin ortama salınması koroner vasküler direnci ve permeabiliteyi etkileyebilir. Mast hücrelerinden histamin ve lökotrien salınmasının endotelyuma nötrofil adhezyonunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir.¹⁻⁸ Ayrıca damar duvarına yapışan ya da miyokarda infiltre olan nötrofiller de serbest radikallerin, proteolitik enzimlerin (elastaz, katepsin G ve proteinaz) ve diğer lökositlerin toplanmasını sağlayan sitokin salınımını aktive ederek miyokardiyal hasarı arttırabilir.¹⁵

CAPE'nin iskemi reperfüzyon sonunda oluşan miyokardiyal hasara karşı koruyucu olduğu sonucuna varıldı. CAPE koruyucu etkisini bir yandan serbest radikalleri süpürücü etkisiyle, diğer yandan ise süperoksit anyonlarını oluşturan ksantin-okidaz aktivitesini inhibe ederek göstermiş olabilir. Elde ettiğimiz histolojik bulgularda, İR grubuna göre İR + CAPE grubunda hafif değişiklikler olduğunu ispatlamaktadır. Bu nedenle CAPE'nin iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olarak kullanılabileceği düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Bani D, Masini E, Bello MG, Bigazzi M, Sacchi TB. Relaxin protects against myocardial injury caused by ischemia and reperfusion in rat heart. *Am J Pathol* 1998; 152(5):1367-76.
2. Takahashi T, Takeyoshi I, Hasegawa Y, et al. Cardioprotective effects of lazoroid U-74389G on ischemia-reperfusion injury in canine hearts. *J Heart Lung Transplant* 1999;18(4):285-91.
3. Koyano T, Takeyoshi I, Takahashi T, et al. Effects of FR167653 on ischemia-reperfusion injury of the canine heart: Ultrastructural study. *Transplantation Proc* 1998; 30:3370-1.
4. Masini E, Cuzzocrea S, Mazzon E, Marzocca C, Mannaioni PF, Salvemini. Protective effects of M40403, a selective superoxide dismutase mimetic, in myocardial ischemia and reperfusion injury in vivo. *Br J Pharmacol* 2002;136:905-17.
5. Jiang DJ, Tan GS, Ye F, Du YH, XU KP, Li YJ. Protective effects of xanthenes against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24(2):175-80.

6. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: Role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 2002;73(Suppl 1):21-9.
7. Ozer MK, Parlakpınar H, Acet A. Reduction of ischemia-reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Clin Biochem* 2004;37: 702-5.
8. Frangogiannis NG, Smith WC, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research* 2003;53:31-47.
9. Takahashi T, Takeyoshi I, Hasegawa Y, et al. Lazaroid U-74389G ameliorates ischemia-reperfusion injury in canine hearts: A histological study. *Transplantation Proc* 1998; 30:3334-6.
10. Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Chatterjee PK, Thiemeermann C. Endotoxin induces a second window of protection in the rat heart as determined by using p-nitro-blue tetrazolium staining, cardiac troponin T release, and histology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2276-80.
11. Cotran RS, Kumar V, Collins T, ed. *Cellular Pathology I: Cell Injury and Cell Death*. In: *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders 1999. p.16-7.
12. Sambandam N, Lopasschuk GD. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in ischemic heart. *Progress in Lipid Research* 2003; 42:238-56.
13. Kissane JM. Cell injury and errors of metabolism. In: *Anderson's Pathology*. 9th ed. Mosby Company; 1990. p.20.
14. Piper HM, Meuter K, Scchafer C. Cellular mechanism of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003;75: 644-8.
15. La M, D'amico M, Bandiera S, et al. Annexin 1 peptides protect against experimental myocardial ischemia-reperfusion: Analysis of their mechanism of action. *The FASEB Journal* 2001;15:2247-56.