

## 신장 허혈 재관류 손상에 미치는 Ethyl Pyruvate 의 효과

이화여자대학교 <sup>1</sup>의과대학 외과학교실 및 <sup>2</sup>대학원 나노과학부, <sup>3</sup>한솔병원, <sup>4</sup>연세대학교 의과대학 외과학교실  
정구용<sup>1</sup> · 정규영<sup>3</sup> · 안형준<sup>4</sup> · 주만기<sup>4</sup> · 장혜경<sup>4</sup> · 이우정<sup>4</sup> · 한평림<sup>2</sup> · 김유선<sup>4</sup>

### Ethyl Pyruvate Ameliorates Renal Ischemia-reperfusion Injury

Ku-Yong Chung, M.D.<sup>1</sup>, Gyu Young Jeong, M.D.<sup>3</sup>, Hyung Joon Ahn, M.D.<sup>4</sup>, Man Ki Ju, M.D.<sup>4</sup>, Hye Kyung Chang, M.D.<sup>4</sup>, Woo Jung Lee, M.D.<sup>4</sup>, Pyung-Lim Han, Ph.D.<sup>2</sup> and Yu Seun Kim, M.D., Ph.D.<sup>4</sup>

**Purpose:** Reactive oxygen species (ROS) significantly contribute to ischemia-reperfusion injury, and are also associated with the gradual loss of renal function and renal failure following renal transplantation. Pyruvate is an endogenous antioxidant, but its use as a therapeutic agent for treating conditions mediated by oxidative stress is limited due to its poor stability in solution. However, ethyl pyruvate (EP), a soluble pyruvate derivative, has far greater stability than pyruvate; thus, may serve as a practical pyruvate precursor. Therefore, the ability of EP in the prevention of renal ischemia-reperfusion injury was assessed.

**Methods:** Sprague-Dawley rats (n=54) were subjected to 40 minutes of renal warm ischemia. The animals were divided into three groups: the sham group without warm ischemia (n=18), the EP group (n=18, EP given before ischemia), and the ischemic control (n=18). The serum levels of creatinine and TNF- $\alpha$  were measured 1, 3 and 5 days after induction of ischemia. The expression of high mobility group box-1 (HMGB-1), a delayed inflammatory mediator, was also assessed by Western blot of renal specimens.

**Results:** In the EP group, late improvements in the serum levels of creatinine and TNF- $\alpha$  were observed in comparison with the ischemic control. Based on this delayed effect, the expression of HMGB-1 was assessed in renal tissue. The HMGB-1 expression increased over time during the ischemia process, but EP suppressed this expression 3 and 5 days after renal ischemia-reperfusion injury.

**Conclusion:** These results have demonstrated, for the first time, that EP ameliorates renal ischemia-reperfusion injury. EP attenuates the renal ischemia-reperfusion injury, at least in part, by suppressing the expression of HMGB-1, a late mediator of delayed inflammation. (J Korean Surg Soc 2007;72: 345-350)

**Key Words:** Ethyl pyruvate, High mobility group box-1, Renal ischemia-reperfusion

**중심 단어:** 신장, 에틸 피루베이트, 허혈 재관류 손상

<sup>1</sup>Department of Surgery, Ewha Womans University College of Medicine, <sup>2</sup>Ewha Institute of Neuroscience, Ewha Womans University, <sup>3</sup>Hansol Hospital, <sup>4</sup>Department of Surgery, Yonsei University College Medicine, Seoul, Korea

### 서 론

이식수술의 과정은 장기의 구득과 저장을 포함하며, 이러한 이식수술의 과정에서 발생하는 허혈 재관류 손상은 후에 이식 신장의 점진적 기능 상실 및 기능 부전과 연관되어 있다.(1) 또한 초기의 허혈 재관류 손상과 급성 거부반응 그리고 이에 따른 이식신의 장기적인 예후가 서로 연관되어 있음이 임상적으로 밝혀지고 있다.(2) 허혈 재관류 손상을 일으키는 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나, 허혈 재관류에 의한 산소자유기의 생성이 중요한 요인 중 하나인 것으로 보고되어 왔다.(3)

Pyruvate는 세포 내외에 광범위하게 존재하며 glycolysis에서 tricarboxylic acid cycle (TCA) 순환에 이르는 과정의 중요한 매개물질이다. 또한 내인성 항산화물질로서의 역할을 수행한다.(4) Salahudeen 등은 쥐실험을 통해 reactive oxygen species (ROS) 매개성 급성신부전에서 sodium pyruvate가 신기능을 보존할 수 있음을 보고하였다.(5) 또 다른 보고에서는 sodium pyruvate 투여 시 심근, 소장, 간 허혈 재관류 손상에서 장기 손상이 경감되는 것을 확인하였다.(6-8) 또한 뇌출혈 및 출혈성 쇼크의 경우도 동물실험에서 손상을 경감시키는 것으로 보고되었다.(9,10) 그러나 sodium pyru-

책임저자 : 김유선, 서울시 서대문구 신촌동 134번지  
☎ 120-752, 연세대학교 의과대학 외과학교실  
Tel: 02-2228-2115, Fax: 02-313-8289  
E-mail: yukim@yumc.yonsei.ac.kr

접수일 : 2006년 12월 9일, 게재승인일 : 2007년 2월 12일  
본 논문은 연세대학교 의과대학 장기이식연구소 2005~2006년도 연구비 지원으로 이루어졌음.

vate는 생체 내에서 aldole like condensation reaction에 의해 미토콘드리아의 TCA 순환을 억제하는 parapyruvate (2-hydroxy-2-methyl-4-ketoglutarate)로 빠르게 변환되기 때문에 항산화 효과를 충분히 나타낼 수 없다.(11)

Ethyl pyruvate (EP)는 pyruvate와 ethanol로부터 합성되었으며,(12) Ringer's ethyl pyruvate solution (REPS)의 형태에서 EP와 칼슘 및 포타슘 이온이 결합함으로써 안정성을 유지시킬 수 있다.(13) EP를 소장의 허혈 재관류 손상 시 투여한 결과 같은 몰농도의 sodium pyruvate를 투여한 경우보다 손상을 더욱 경감시킬 수 있었다.(13,14) Tsung 등은 간의 허혈 재관류 손상 모델을 실험하였으며 REPS를 투여한 결과 혈청 transaminases 및 간괴사 정도, 중성구 침윤이 상당히 감소하였음을 보고하였다.(15) 또한 심장 허혈 재관류 손상 시에도 EP를 투여하여, 심장 손상을 경감시킨 바 있다.(16)

ROS 매개성 급성신부전에서 sodium pyruvate를 투여함으로써 신기능을 보존할 수 있음은 보고된 바 있으나,(5) 신장의 허혈 재관류 손상 시 sodium pyruvate 혹은 EP의 효과에 대해서는 아직 알려진 바 없다. EP는 소장이나 간 또는 심장의 허혈 재관류 시 손상을 상당히 경감시키는 효과가 있었으며,(15) 이는 소장 실험에서 sodium pyruvate에 비해 상대적으로 우수한 효과를 나타내었다.(13) 이러한 유익한 효과가 신장 허혈 재관류 손상 시에도 동일하게 나타날 수 있을 것으로 가정하였으며, 이러한 효과가 EP의 항산화기전 및 그에 따른 항염증반응과 연관성이 있을 것으로 생각하였다. 또한 신장 허혈 재관류 손상 시 증가하는 ROS는 백혈구의 활성성을 증가시키는 사이토카인이 포함된 일련의 매개체를 통해 염증성 사구체 병변을 일으키며,(17) 말초 단핵백혈구는 신장 TNF- $\alpha$ 의 일차적 공급원이다.(18) 반면 ROS가 TNF- $\alpha$ 의 표현에 관여하는 전사요소를 직접 자극하기도 한다.(18) 따라서 저자는 EP의 효과를 확인하기 위해 혈청 TNF- $\alpha$  및 신기능의 지표인 혈청 크레아티닌을 측정함으로써 신장 허혈 재관류 손상 정도를 알아보고자 하였다. 이와 같이 본 연구에서는 EP의 신장 허혈 재관류 손상에 대한 효과를 밝히고 기전을 분석함으로써, 신장이식 시 발생할 수 있는 만성거부반응에 대한 EP의 임상적 적용 가능성을 높일 수 있을 것으로 생각하였다.

## 방 법

### 1) 신장 허혈 재관류 손상

Sprague Dawly rat (200~300 g)을 ketamine 복강 내 주사로 마취 후 수술 테이블에 고정하고 우측 늑골하 절개로 우측신장을 적출하였다. 7일 후 같은 방법으로 마취 후 좌측 늑골하에서 절개하여 좌측 신장을 노출시킨 후, 노출된 신장의 신동맥과 신정맥을 혈관검자로 잡아서 혈류를 막고 40분간 허혈을 유도한 후 재관류하였다. 폐복한 후 마취에서 각성시켰다.

### 2) 각 군별 실험 방법

Sprague-Dawly rat 54마리를 Sham 수술군(n=18), EP 투여군(n=18), 허혈대조군(n=18)으로 나누어 실험하였으며, Sham 수술군은 우측신장절제 후 7일 뒤 좌측 늑골하절개를 시행한 후, 폐복하였다. EP는 REPS 상태로 이화여자대학교 뇌신경과학교실 한평림 교수로부터 취득하였다. EP 투여군은 허혈 전 20분에 REPS를 Rat의 kg당 EP 100 mg의 용량으로 복강 내로 주입하고 재관류 직후에도 같은 용량을 투여하였다. 허혈대조군은 허혈 전 20분에 Ringer's lactated solution 1 cc를 투여하고 재관류 직후에도 1 cc를 투여하였다. 각 군별로 각각 6마리씩 1일째, 3일째, 5일째 ketamine을 복강 내 투여하여 마취시킨 후 복부를 정중절개하여 신장조직을 채취하고, 대동맥으로부터 혈액을 충분히 확보하여 회생시켰다.

### 3) 크레아티닌 및 TNF- $\alpha$ 분석

각 군에서 수술 후 날짜별로 채취한 혈액을 원심분리하여 혈청을 채취하였으며, 분리된 혈청으로부터 혈청 크레아티닌을 측정하였다(Vitros<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, USA). 또한 ELISA를 이용하여 TNF- $\alpha$ 의 생성을 정량적으로 측정하였다. 구체적인 실험방법은 ELISA plate 제조사에서 제공한 실험방법을 따랐으며, 대략적인 절차는 아래와 같다. 50  $\mu$ l의 standard diluent buffer를 zero well에 넣고, 50  $\mu$ l의 농도별 표준용액과 시료용액을 각 well에 넣은 다음 anti-TNF- $\alpha$  용액(Bender MedSystem, Vienna, Austria) 50  $\mu$ l를 각 well에 넣어 혼합하고 상온에서 1시간 30분간 반응시켰다. 상층액을 제거한 후 수세 buffer로 3회 세척하였다. 그 후 streptavidin-HRP working solution 100  $\mu$ l를 각 well에 넣고 45분간 상온에서 반응시켰다. 수세 buffer로 다시 3회 세척하고, 100  $\mu$ l의 발색제를 각 well에 넣은 후 어두운 곳에서 30분간 반응시켰다. 최종적으로 100  $\mu$ l의 stop solution을 각 well에 넣고, microplate reader에서(450 nm) 발색도를 측정하여 이를 정량화하였다.

### 4) High mobility group box 1 (HMGB1) 측정

HMGB1의 분석은 이전에 기술되었던 방법대로 Western immunoblotting을 시행하였다.(17) 냉동 신장 조직을 균질화한 후 lysis buffer (0.5% Nonidet P-40, 20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, 100  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 50  $\mu$ g/ml PMSF)를 투여하고 4°C에서 30분간 보관하였다. 그 후 4°C 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 단백질을 분리하였고, Bradford methods를 이용하여 정량하였다. 분리된 단백질은 12% SDS-PAGE gel을 사용하여 전기영동을 실시하였고, nitrocellulose transfer membrane으로 옮긴 후 비특이적인 반응을 억제하기 위하여 3% skim milk로 blocking을 실시하였다. 1차항체로는 anti-HMGB-1 antibody (Novus, Littleton,

Colorado, USA)를 nitrocellulose transfer membrane에 처리하였고, 10분씩 3번 수세 buffer로 세척하였다. Peroxidase와 2차항체(Novus, Littleton, Colorado, USA)가 결합된 용액으로 처리하여 ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 단백질의 band를 확인하였다. 각 optical density는 GS-690 densitometer (Bio-rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 결정하였다.

### 5) 통계분석

각 군별 표본의 크기가 정규분포를 가정할 만큼 크지 않았기 때문에, 수술 후 경과시간에 따른 군별 크레아티닌 검사와 TNF- $\alpha$ 의 차이를 분석하기 위해, 비모수 검정인 Mann-Whitney test를 이용하여 분석하였으며, 유의 수준은  $P < 0.05$ 로 하였다.

## 결 과

### 1) 혈청 크레아티닌 측정

허혈 대조군에서는 허혈 재관류 손상 3일 후 혈청 크레아티닌 수준이 1일째에 비해 증가하는 경향을 보였으며, EP 투여군에서는 허혈 재관류 손상 후 혈청 크레아티닌 수준이 1일째보다 3일째 감소하는 경향을 보임으로써, 허혈 대조군과 EP 투여군 사이의 허혈 재관류 손상 3일 후 혈청 크레아티닌 수준은 유의한 차이를 나타내었다. 5일째 혈청 크레아티닌 수준은 허혈 대조군과 EP 투여군 둘 다 3일째 크레아티닌 수준에 비해 유의하게 감소하였으며, EP 투여군이 허혈 대조군에 비해 비교적 낮은 수치를 보였으나, 유의한 차이를 보이지는 않았다. 이러한 결과는 혈청 크레아티닌이 3일째 정점을 이루고 이후 감소하는 경향이 있으므로 5일째의 시점에서는 두 군 간의 차이가 좁혀진 것으로 생각된다. EP 투여군의 혈청 크레아티닌 수준은 허혈 재관류 손상 이후 계속 감소하였으나, 3일째, 5일째 모두 Sham 수술군에 비해서는 유의하게 높았다(Fig. 1).

### 2) 혈청 TNF- $\alpha$ 측정

허혈 대조군에서는 허혈 재관류 손상 3일 후 혈청 TNF- $\alpha$  수준이 1일째에 비해 증가하는 경향을 보였으며, EP 투여군에서는 허혈 재관류 손상 후 혈청 TNF- $\alpha$  수준이 1일째보다 3일째 감소하는 경향을 보였으나, 허혈 대조군과 EP 투여군 사이의 허혈 재관류 손상 3일 후 혈청 TNF- $\alpha$  수준은 유의한 차이를 나타내지 않았다. 5일째 혈청 TNF- $\alpha$  수준은 허혈 대조군에서는 증가하고 EP 투여군에서는 감소하는 경향을 보임으로써 EP 투여군이 허혈 대조군에 비해 유의하게 낮은 수치를 나타내었다. EP 투여군의 혈청 TNF- $\alpha$  수준은 허혈 재관류 손상 이후 계속 감소하였으나, 3일째, 5일째 모두 Sham 수술군에 비해서는 유의하게 높았다(Fig. 2).

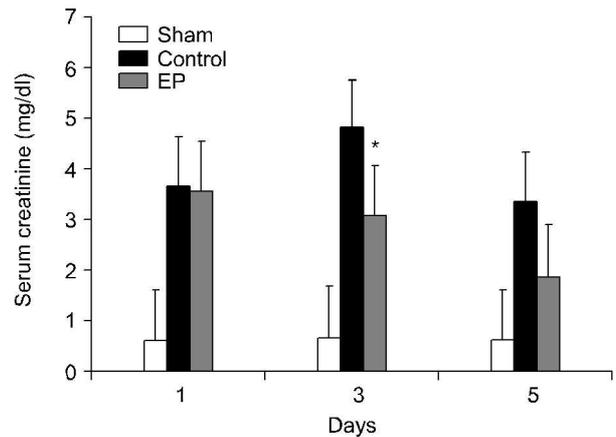


Fig. 1. Serum creatinine after renal ischemia-reperfusion injury. There was no difference between the EP group and the control group at 1 day after reperfusion. But delayed improvement was noted in EP group compared to the control group after reperfusion. Statistical significance was achieved only 3 days after reperfusion (\* $P < 0.05$ ).

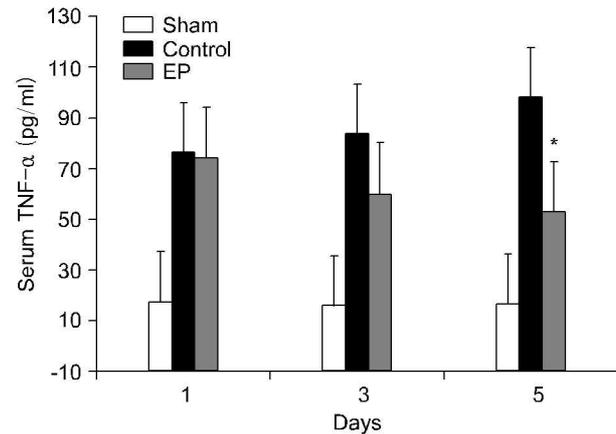
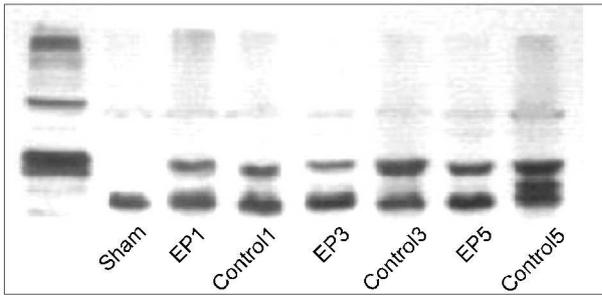


Fig. 2. Serum TNF- $\alpha$  after renal ischemia-reperfusion injury. There was no difference between the EP group and the control group 1 day after reperfusion. But delayed improvement was noted in EP group compared to the control group after reperfusion. Statistical significance was achieved only at 5 days after reperfusion (\* $P < 0.05$ ).

### 3) HMGB1의 표현

신장 허혈 재관류 손상에 대한 EP의 효과가 재관류 1일째보다 재관류 3일째에 뚜렷하게 혈청 크레아티닌 및 TNF- $\alpha$ 의 감소로 나타남으로써, 대표적인 지연성 염증매개체인 HMGB1과의 연관성을 확인하기 위해 Western blot analysis를 신장조직으로부터 시행하였다. HMGB1은 신장 허혈 재관류 손상 시 증가하였으며, 이는 재관류 초기부터 증가하지만 시간이 지나면서 더욱 상승하는 경향을 나타내었다.



**Fig. 3.** HMGB1 expression after renal ischemia reperfusion injury. There was no difference in HMGB1 expression between the EP group and the control group 1 day after ischemia. Expression of HMGB1 was decreased in EP group compared to the control group 3 and 5 days after reperfusion. EP 1, 3, 5 respectively = EP group at 1, 3, 5 days after ischemia, Control 1, 3, 5 respectively = control group 1, 3, 5 days after ischemia.

EP 투여 시에는 이러한 상승이 둔화되는 경향을 보였다 (Fig. 3).

고 찰

Pyruvate는 포도당 대사의 중요한 매개체일 뿐만 아니라 pyruvate의 a-keto carboxylate 구조는 peroxides와 peroxynitrite를 직접적으로 중화시킬 수 있다.(20) 그러나 sodium pyruvate는 생체 내에서 aldole like condensation reaction에 의해 미토콘드리아의 TCA 순환을 억제하는 parapyruvate (2-hydroxy-2-methyl-4-ketoglutarate)로 빠르게 변환되기 때문에 항산화 효과를 충분히 나타낼 수 없다.(11) EP는 pyruvate와 ethanol로부터 합성되었으며,(12) REPS의 형태에서 EP와 칼슘 및 포타슘 이온이 결합함으로써 안정성을 유지시킬 수 있다.(13) EP를 소장의 허혈 재관류 손상 시 투여한 결과 같은 몰농도의 sodium pyruvate를 투여한 경우보다 손상을 더욱 경감시킬 수 있었다.(13)

Tsung 등은 간의 허혈 재관류 손상 모델, 즉 Lewis rats의 간을 60분간 허혈시키고, EP와 lactated Ringer's solution을 각각 정맥 주사하였다. 혈청 transaminase 및 간괴사 정도, 중성구 침윤은 EP를 투여한 경우 상당히 감소하였다. 간의 지방 수산화도 EP를 투여한 경우 매우 감소하였다. EP를 투여한 군에서 염증성 cytokine 또한 감소하였다. 뿐만 아니라 cytokine 분비에 관여하는 NFkB 활성화가 억제되었으며, EP가 간의 세포사멸을 억제함을 보고하였다.(15) Uchiyama 등은 C57BL/6 mice로 시행한 실험에서 소장 장관막의 허혈 재관류 손상 시 회장 점막의 hydrophilic macromolecule 및 fluorescein isothiocyanate dextran (molecular mass 4,000 Da)에 대한 투과율이 현저히 증가함을 보고하였다. 낮은 농도(17 mg/kg)의 EP를 투여한 경우는 장관막 투과율에 변화가 없

었으나, 높은 농도(50 and 150 mg/kg)의 EP를 투여한 경우에는 허혈 재관류 손상에 의한 장투과성이 현저히 감소하였다. 또한 높은 농도의 EP를 투여한 경우 회장 점막 및 장관 그리고 간 표면의 미세 혈관 관류가 개선되었다.(14) 이와 같이 간 혹은 소장의 허혈 재관류 손상에 대한 EP의 효과는 보고된 바 있으나,(14,15) 현재까지 신장 허혈 재관류 손상 시 EP에 의한 효과는 알려져 있지 않으며, 본 연구는 EP에 의해 신장 허혈 재관류 손상을 경감시킨 최초의 보고이다.

HMGB1은 이전에 HMG1 혹은 amphoterin으로 불렸으며,(21) 전기영동상 빠른 이동이 관찰되어 이와 같이 불리게 되었다. HMGB1은 216개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 설치류와 인간 사이에 아미노산 염기서열 일치율이 98%에 이를 정도로 종 간 차이가 거의 없다.(22) HMGB1은 모든 포유동물 조직에 광범위하게 분포하는 매우 풍부한 단백질이며, HMGB1 유사 단백질은 이스트, 박테리아, 식물에서도 발견되었다.(23) Wang 및 Andersson 등은 HMGB1이 물질대사 및 면역반응을 매개하는 단백질인 사이토카인의 일종임을 보여주었다.(19,25) HMGB1은 대식세포를 포함한 다양한 세포에서 활발하게 분비되며,(19) 뇌하수체 세포,(25) 인간 말초혈액의 단핵구 세포에서도 관찰된다.(24) 일단 분비된 HMGB1은 Toll-like receptor2, Toll-like receptor4와 같은 세포표면의 수용체에 결합할 수 있으며, 여기서 변환된 신호는 발열, 상피벽 기능장애, 주화성 세포 이동, 전염증성 사이토카인(tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ ) 등의 분비를 유발시킨다.(24,26)

대표적인 지연성 염증매개체 중 하나인 HMGB1은 주로 패혈증 및 내독소증 발생 시 지연성 매개체의 역할을 수행한다. HMGB1은 동물 혹은 인간에서 패혈증이나 내독소증이 발생한 경우 전신적으로 분비된다.(19,27) HMGB1은 맹장 천공에 의해 유도된 패혈증의 동물 모델에서 지연성 증가가 관찰되었으며, 이는 다른 사이토카인과 비교할 때 매우 특징적이라 할 수 있다.(19) 또한 최근에는 Goldstein 등이 심근경색 시 HMGB1이 증가됨을 보고하였다.(28) Ulloa 등은 mouse 실험에서 맹장천공 24시간 뒤에 EP를 투여한 경우에도 생존율이 향상됨을 보고하였고, LPS 투여 시 EP에 의해 혈청 HMGB1이 감소됨을 확인하였다.(29) Miyaji 등은 쥐의 맹장천공으로 복막염에 의한 다발성 장기부전을 일으켜, 실험 후 6시간 내지 12시간 뒤에 EP를 투여하여 간, 췌장, 신장 기능을 상당히 호전되었음을 보고하였다.(30) 이와 같이 HMGB-1은 치명적인 전신적 염증손상의 매개체로 보고되고 있으나, 아직까지 허혈 재관류 손상 시 기전은 정확히 밝혀져 있지 않다. 또한 신장 허혈재관류 손상 시 HMGB1의 발현은 아직 보고된 바 없으며, 본 연구 결과에서는 신장 허혈 재관류 손상 시 HMGB1은 초기부터 증가하지만 지연성으로 시간이 지날수록 더욱 증가함을 보이고 있다.

본 실험은 신장허혈 재관류 손상에 대한 EP의 효과가 주로 허혈 재관류 손상 후 3일 이후 발생함을 보여주었다. 간

혹은 소장의 허혈 재관류 손상에 대한 EP의 효과는 보고된 바 있으나,<sup>(14,15)</sup> EP의 신장 허혈 재관류 손상에 대한 효과 또한 아직까지는 알려진 바가 없었다. 또한 신장 허혈 재관류 손상 시 HMGB1은 초기부터 증가하지만, 지연성으로 더욱 증가함을 보여 주었다. EP 투여군에서 HMGB1은 허혈 재관류 손상 3일 이후 대조군에 비해 억제되는 경향을 보였으며, 혈청 크레아티닌 및 TNF- $\alpha$ 도 함께 감소되었다. 그러므로 HMGB1에 대한 EP의 억제 작용에 의해 신기능에 대한 유익한 효과 또한 지연성으로 발생하였을 가능성이 있다.

## 결 론

본 연구 결과는 신장 허혈 재관류 손상 시 신장 기능에 대한 EP의 유익한 효과가 지연성으로 발생함을 보여주었으며, 이는 지연성 염증매개체인 HMGB-1의 지연성 발현증가를 EP가 억제함에 의해 발생하였을 가능성이 있음을 시사하였다. 향후 EP의 신장조직 등에 대한 임상적 적용을 위해서는 HMGB-1과의 연관 기전을 밝히고, EP의 효과에 대한 장기적인 분석 및 가능성 있는 기전에 대한 포괄적인 분석이 필요할 것으로 생각한다.

## REFERENCES

- 1) Azuma H, Nadeau K, Takada M, Tilney NL. Initial ischemia/reperfusion injury influences late functional and structural changes in the kidney. *Transplant Proc* 1997;29:1528-9.
- 2) Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RW, Najarian JS, et al. Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 1995;59:962-8.
- 3) Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* 1993;16:119-26.
- 4) Brand K. Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J Bioenerg Biomembr* 1997;29:355-64.
- 5) Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA. Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 1991;88:1886-93.
- 6) Bunker R, Mallet RT, Hartman DA. Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and post-ischemic isolated working heart. Near-complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur J Biochem* 1989;180:221-33.
- 7) Cicalese L, Lee K, Schraut W, Watkins S, Borle A, Stanko R. Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine. *Am J Surg* 1996;171:97-100.
- 8) Sileri P, Schena S, Morini S, Rastellini C, Pham S, Benedetti E, et al. Pyruvate inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 2001;72:27-30.
- 9) Lee JY, Kim YH, Koh JY. Protection by pyruvate against transient forebrain ischemia in rats. *J Neurosci* 2001;21:RC171.
- 10) Slovin PN, Huang CJ, Cade JR, Wood CE, Nasiroglu O, Privette M, et al. Sodium pyruvate is better than sodium chloride as a resuscitation solution in a rodent model of profound hemorrhagic shock. *Resuscitation* 2001;50:109-15.
- 11) Willems JL, de Kort AF, Vree TB, Trijbels JM, Veerkamp JH, Monnens LA. Non-enzymic conversion of pyruvate in aqueous solution to 2,4-dihydroxy-2-methylglutaric acid. *FEBS Lett* 1978;86:42-4.
- 12) Fink MP. Ringer's ethyl pyruvate solution: a novel resuscitation fluid. *Minerva Anesthesiol* 2001;67:190-2.
- 13) Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Ajami AM, Fink MP. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats. *Crit Care Med* 2001;29:1513-8.
- 14) Uchiyama T, Delude RL, Fink MP. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. *Intensive Care Med* 2003;29:2050-8.
- 15) Tsung A, Kaizu T, Nakao A, Shao L, Bucher B, Fink MP, et al. Ethyl pyruvate ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by decreasing hepatic necrosis and apoptosis. *Transplantation* 2005;79:196-204.
- 16) Woo YJ, Taylor MD, Cohen JE, Jayasankar V, Bish LT, Burdick J, et al. Ethyl pyruvate preserves cardiac function and attenuates oxidative injury after prolonged myocardial ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;127:1262-9.
- 17) Rodrigo R, Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic Biol Med* 2002;33:409-22.
- 18) Li C, Browder W, Kao RL. Early activation of transcription factor NFkappaB during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1999;276:543-52.
- 19) Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248-51.
- 20) Mallet RT, Sun J. Antioxidant properties of myocardial fuels. *Mol Cell Biochem* 2003;253:103-11.
- 21) Bustin M. Chromatin unfolding and activation by HMGN(\*) chromosomal proteins. *Trends Biochem Sci* 2001;26:431-7.
- 22) Yotov WV, St-Arnaud R. Nucleotide sequence of a mouse cDNA encoding the nonhistone chromosomal high mobility group protein-1 (HMG1). *Nucleic Acids Res* 1992;20:3516.
- 23) Bustin M, Reeves R. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996;54:35-100.
- 24) Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000;192:565-70.

- 25) Wang H, Vishnubhakat JM, Bloom O, Zhang M, Ombrellino M, Sama A, et al. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. *Surgery* 1999;126:389-92.
  - 26) Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 2004;255:320-31.
  - 27) Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:296-301.
  - 28) Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Rosas-Ballina M, Huston JM, Czura CJ, et al. Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock* 2006;25:571-4.
  - 29) Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12351-6.
  - 30) Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, et al. Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice. *Kidney Int* 2003;64:1620-31.
-