구강내 손상이 부신 Catecholamine 농도에 미치는 영향

서울대학교 대학원 치의학과 구강외과학 전공

(지도교수 이 춘 근)

김 경 욱

— 목 차 —

Ⅰ. 서 론
Ⅱ. 실험재료 및 방법
1) 실험동물
2) 부신준비
3) Catechol-O-methyltransferase
4) Catecholamine 정량
5) Phenylethanolamine-N-methyltransferase 효소활성측정
Ⅲ. 결 과
Ⅳ. 고 찰
Ⅴ. 결 론
참고문헌
영문초록

Ⅰ. 서 론

stress는 sympathoadrenal system의 활성을 증가시켜, 부신수질로 부터 catecholamine의 유리를 증가시키며, 사람과 실험동물에서 여러종류의 stress, 즉 실혈(Fredholm등, 1979 : Pinardi등, 1979), hypoxia(Callingham, 1975), immobilization (Gascon, 1977 : Chiueh & Kopin, 1978), cold(Leduc, 1961 : Gordon등, 1966 : Callingham, 1975), 전기자극Gascon, 1977), handling(Depocas & Behrens, 1977), 저혈당(Phillippe & Kitzmiller, 1981), 외과적 수술(Franksson등, 1954 : Halter등, 1977 : Depocas & Behrens, 1977), 치명적 두부손상(Beckman & Iams, 1979)등에 의하여 혈액이나 오줌에서 다량의 catecholamine이 검출되었음이 보고되었다. 혈중에 유리된 다량의 catecholmine은 cardiovascular risk를 유발할 수 있는 여러 hormone들 중 가장 위험한 인자로서(Christensen & Videbaek, 1974 : Kones, 1979 : Tolas등, 1982), 특히 순환기 이상이 있거나 catecholamine에 대한 sensitivity를 변화시키는 약물을 복용하고 있는 환자의 경우, 더욱 큰 위험을 초래할 수 있다고 알려져 왔다(Tolas등, 1982).

stress에 의해 혈중에 유리된 catecholamine 중, 특히 더 많은 증가를 보이는 epinephrine은, 그 origin이 대부분 부신수질이라는 것이 밝혀졌고 (Wurtman, 1966 : Berkowitz & Head, 1978), 따라서 부신수질내의 catecholamine을 측정함으로서 유리된 catecholamine의 정도를 비교할 수 있다. 또한 stress는 부신피질로부터 glucocorticoid유리를 증가시켜 부신수질에서 epinephrine이 합성되는데 관여하는 phenylethanolamine-N-methyltransferase (P-NMT)의 활성을 증가시키는데 (Wurtman, 1966 : Wurtman & Axelrod, 1966), 여러자극에 의해 부신수질내의 PNMT의 활성이 증가되는 것이 실험적으로 밝혀졌다.

catecholamine에 대한 여러가지 정량법 중에서 (Franksson등, 1954 : El-Rabbat & Oman, 1978), specificity와 sensitivity가 큰 이유로, radioenzymatic assay법이 가장 많이 쓰이고 있으며 (Coyle & Henry, 1973 : Bauce등, 1980 : Womble등, 1980), 이 방법의 원리를 간단히 살피면, methyl기에 동위원소로 표지한 methyl donor를 catecholamine과 함께 배양하면, catechol-O-methyltransferase(COMT)의 존재하에, [H^3]-methylated catecholamine 으로 변환된다. 이때 COMT는 catecholamine만을 specific하게 methylation시키는 효소이다. [H^3]-methylated catecholamine을 유기용매 및 산으로 추출하여, radioactivity를 측정함으로써, catecholamine을 정량하는 법이며, 본 실험도 이 방법을 이용하였다.

외과적 수술에 의한 stress가 유발하는 catecholamine유리의 변화에 관한 보고는 많으나 (Franksson등, 1954 : Halter등, 1977 : Depocas & Behrens, 1977), 치과와 관련된 손상 및 외과적 stress에 관한 연구는 거의 없었으므로, 저자는 이를 관찰하고자 본 실험을 시행하였다.

Ⅱ. 실험재료 및 방법

1. 실험동물

100g내외의 흰쥐 18마리를 대조군, 하악골절후 2시간 경과군(2시간 실험군), 하악골절후 16시간 경과군(16시간 실험군)의 3군으로 각각 6마리씩 나누었으며, 하악골절은 흰쥐를 ether마취시킨후, 2개의 지혈감자를 이용하여 우측 하악의 같은 부위를 골절시키는 방법을 택했다. 골절후 2시간, 16시간이 경과했을 때, 경부골절시켜 희생시킨후, 즉시 양쪽 부신을 떼어 내었다.

2. 부신준비

Wurtman(1966)의 방법에 따라 제거된 부신은, 되도록 빠른 시간내에 무게를 측정하여, 1㎖의 isotonic KCl 용액에 넣고 homogenize하였으며 2개의 원심분리용 시험관에 0.4㎖씩 넣어, 하나는 catecholamine 정량을 위해 용액내의 단백질을 침전시키도록 1.25N $HClO_4$ 40㎕를 첨가하였고, 나머지 한 시험관의 것은 그대로 PNMT assay를 위해 사용하였다. 두가지 경우 모두 20,000×g로 10분간 2℃에서 원심분리하여 40㎕의 상청액을 catecholamine 및 PNMT를 정량하는데 사용하였다.

3. Catechol-O-methyltransferase (COMT)의 분리

Axelrod & Tomchick(1958)의 방법에 따라, 흰쥐의 간으로부터 COMT를 분리하였다. 즉 10마리에서 얻은 80g의 간을 4배부피의 isotonic KCl 용액에에 넣고 homogenize하여, 78 000×g로 30분간 원심분리 하였다. 이 상청액을 1M acetic acid로 pH5로 적정하여 20분간 방치한 후, 그 침전물을 10,000×g로 20분간 원심하여 제거하였다. 그 후 상청액을 ammonium sulfate로, 단백질을 fractionation하였는데, 이때 0~30% 포화용액(176g/ℓ)에 의한 침전은 하룻밤을 방치한 후 원심으로 제거하고, 30~55% 포화용액(162g/ℓ)에 의해 얻어진 단백질 침전만을, 1mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 50㎖에 용해시켜, 0.1mM dithiothreitol이 포함된 같은 buffer 50^3배 부피에 대하여 36시간 투석하였으며, 투석이 끝난후, 30,000×g로 30분간 원심분리하여 총 47㎖의 상청액을 얻었다. 이를 실험에 사용할 때까지 1.3㎖씩 나누어 −20℃에서 보관하였으며, 단백질 정량은 Lowry등(1951)의 방법에 따라 시행하였다.

4. Catecholamine 정량

Axelrod(1962)의 방법에 따라 부신으로부터 얻은 상청액 40㎕(산으로 처리된 것)(blank는 40㎕의 0.05 N $HClO_4$, standard는 epinephrine 500 ng/40㎕ of 0.05N $HClO_4$)에, phosphate buffer 7 ㎛moles(pH 7.8), 4배 농축된 COMT용액 15㎕ (약 0.3 unit의 효소활성, 또는 단백질 0.63mg에 해당함), dithiothreitol 125㎍, $MgCl_2$ 0.1 ㎛mole, [^{3}H-methyl] S-adenosylmethionine 1 ㎕Ci (specific radioactivity : 15mCi/㎛mole, The Radiochemical Center, Amersham, England)을 첨가하여 반응혼합액의 총 부피가 100㎕되도록 하였다. 이것을 36℃에서 90분간 shaking water bath로 배양하였고, 90분후 0.5M borate buffer(pH 10) 0.5㎖를 첨가함으로써, 반응을 중단시켰다. 여기에 non-radioactive carrier(methoxytyramine 7㎍, normetanephrine 3㎍, metanephrine 3㎍)를 첨가하여 잘 혼합한 후, [^{3}H]-methylated catecholamine의 추출과정을 사용하였다. 즉 toluene : isoamylalcohol(3 : 2) 5㎖를 첨가하여 vortex로 20초간 격렬하게 혼합한 후, 저속원심분리하여 위에 뜬 유기용매층 중에서 3㎖만을 새로운 시험관에 옮겼다. 여기에 0.5㎖의 0.1 N HCl을 첨가하여, 다시 vortex로 20초간 격렬하게 혼합한 후 원심하여 두층을 분리한 다음, 이번에는 위에 뜬 유기용매층을, aspiration하여 버리고, 남은 acid phase중 0.4㎖만을 scintillation vial에 옮겨 이를 냉동건조 시켰다. 다 마른 다음 vial에 Liquifluor와 toluene이 40㎕ : 9㎖의 비율로 혼합된 용액에, 10㎖ 가해서 격렬하게 흔들어 녹인후, Automatic Spectrometer(Nuclear Enterprise, NE 8312)로, vial내의 동위원소량을 측정하였다.

5. Phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT) 효소활성 측정

Wurtman(1966)의 방법을 따라, 부신으로부터 얻은 상청액 40㎕(산으로 처리되지 않은것)에, 37.5 ng의 normetanephrine, phosphate buffer 7㎛ moles (pH 7.8), dithiothreitol 125㎍, $MgCl_2$ 0.1㎛mole, [^{3}H-methyl] S-adenosylmethionine 1㎕Ci를 첨가하여 반응혼합에의 총 부피가 100㎕되도록 하였다. 이하의 과정은, catecholamine정량과 동일하였다.

Ⅲ. 결　　과

1. COMT 용액내의 단백질 함량 및 효소활성

최종 분리된 partially purified COMT용액내에는 용액 1mℓ당 10.5mg의 단백질이 함유되어 있었으며, 효소활성은 단백질 1mg당 약 0.5unit의 활성을 포함하는 것으로 나타났다. 여기서 1unit라 함은, 본 실험조건에서 배양하였을때, 90분간 1μmole의 catecholamine을 methylation시키는 효소의 활성을 말한다.

2. 부신내에 catecholamine 농도

본 실험방법을 사용하였을때, epinephrine 0~500 ng에 대한 standard curve는 linearity를 나타내었으며(fig. 1), 몇가지 catecholamine 각각을 구별하여 측정하지는 못했으나, 부신수질내의 catecholamine의 대부분을, epinephrine이 차지하고 있으므로(Wurtman, 1966), 큰 문제가 되지는 않는다고 보았다.

부신의 catecholamine농도는, 대조군에서 조직 1g당 954μg으로 나타났으며, 2시간 실험군에서는710 μg으로서, 대조군에 비해 약 25.6% ($P<0.05$)의감소를 나타내었지만, 16시간실험군에서는 842μg 으로서, 다시 증가하는 추세를 보여, 대조군에 비해 11.7%가 적은 값이기는 하나, 통계적 유의성은 없었다(table 1).

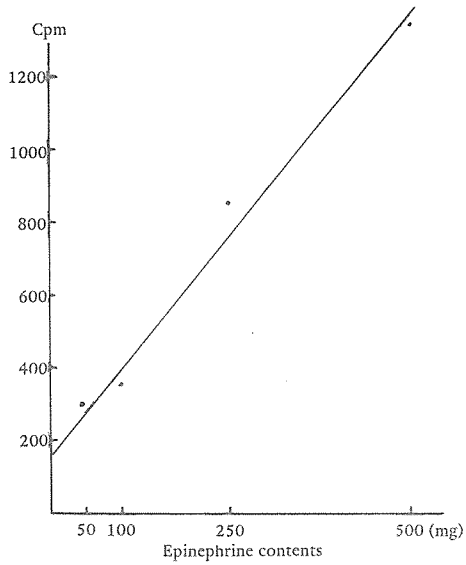

Fig. 1. Various amounts of epinephrine Linearity of assay with amount of epinephrine. (0-500ng of free base) were added to the standard reaction mixture and carried through the assay procedure.

Table 1. Catecholamine levels in rat adrenal gland

	N	adrenal gl. wt. (mg/pair) Mean ± S. E.	catecholamine (ug)/ g of wet tissue Mean ± S. E.	% change	Significance
Control	6	20.4 ± 1.9	954 ± 64	—	—
2-hr Exp. group	6	19.1 ± 0.6	710 ± 68	-25.6	$P<0.05$
16-hr Exp. group	6	26.9 ± 1.7	842 ± 71	-11.7	NS*

NS* : Not Significant

Table 2. Relative PNMT acivity in rat adrenal gland

	N	PNMT activity (cpm*) Mean ± S. E.	% change	Significance
Control	6	4457 ± 63	—	—
2-hr Exp. group	6	4420 ± 232	-0.8	NS
16-hr Exp. group	6	4173 ± 164	-0.4	NS

* cpm : count per minute

3. 부신내의 PNMT 효소활성

PNMT 효소활성에 의해 나타난 radioactivity 의 값을 보면, 대조군이 4457cpm, 2시간실험군과 16시간실험군이 각각 4420, 4173cpm으로서, 대조군에 비해 0.8 및 0.4%정도 약간의 감소추세를 보이긴 했으나, 통계적 유의성은 없었다(table 2).

Ⅳ. 고 찰

stress가 부신내 catecholamine함량에 큰 변화를 가져온다는 것은 이미 알려진 사실이며(Leduc, 1961 : Gordon등, 1966 : Nagura, 1972 : Gascon, 1977), 혈중에 유리된 다량의 catecholamine은 여러가지 hemodynamic change를 유발시킨다고 알려져왔다.

혈중 catecholamine중, epinephrine은 주로 부신으로부터, norepinephrine은 교감신경말단으로 부터 유리된것이며(Cryer, 1976), stress에 의해 sympathoadrenal activity가 증가되게 되면, 두가지의 분비가 모두 증가되지만, 특히 부신수질로부터 epinephrine이 분비되는 것이 더욱 뚜렷하게 증가되며(Halter등, 1977), 이러한 현상은 부신을 미리 떼어내거나(Fredholm등, 1979), 부신으로 가는 신경을 절단시킨(Womble등, 1980) 실험동물에서는, 나타나지 않았다고 보고되었다.

부신은 태생학적으로 origin이 서로 다른 수질과 피질로서 이루어져 있으며, 피질에서는 주로 glucocorticoid 및 aldosterone을 분비하고, 수질에서는 주로 epinephrine이 분비되는 것으로 알려져 있다. 부신피질과 수질은 위치적으로 가까운 만큼 밀접한 생리학적 중요성을 상호 가지고 있어, stress에 의해 glucocorticoid의 분비가 증가되면, 수질내의 phenylethanolamine-N-methyltransferase(PNMT)활성이 증가되어(Wurtman, 1966), 다량의 norepinephrine이 N-methylation되어 epinephrine으로 변화된다. 따라서, 수질이 피질에 의해 완전히 둘러쌓여 있는 동물(쥐, 사람)에서는, 수질이 chromaffin cell 내에 들어있는 catecholamine의 대부분(80% 이상)이, epinephrine이지만(Von Euler, 1956), 수질이 피질에 의해 완전히 둘러쌓여지 않은 동물 (토끼, dogfish)에서는, 주로 norepinephrine으로 이루어져 있음이 밝혀졌다 (Coupland, 1953). 따라서 뇌하수체를 미리 제거한 동물에서 PNMT활성이 현저하게 감소됨과 동시에 catecholamine함량도 감소되는것을 관찰할 수 있으며(Wurtman, 1966 : Wurtman & Axelrod, 1966), 부신내의 catecholamine농도가 stress의 정도를 나타낸다고 한다면, PNMT 활성은 부신수질의 활성도를 나타내는 parameter가 된다고 볼 수 있다.

부신내의 catecholamine함량변화는 합성, 분비 및 파괴과정의 변화에 의해 온것이라 볼 수 있는데(Wurtman, 1966), stress에 의해 부신피질로부터 glucocorticoid분비가 증가되면, 부신피질내의 catecholamine 파괴에 관여하는 효소인 COMT와 monoamine oxidase는 거의 활성의 변화가 일어나지 않으며, catecholamine합성의 rate limiting enzyme인, tyrosine hydroxylase활성, 역시 아무런 영향을 받지않고, specific하게 PNMT만이 활성화되었다는 보고가 있었다(Wurtman & Axelrod, 1966). 따라서 부신에서 catecholamine의 파괴과정은, stress에 의하여 변화가 일어나지 않으므로, 주로 합성및 분비과정의 변화가 부신내 catecholamine농도에 변화를 일으켰을 것으로 보인다. 본 실험의 결과에 의하면, 1시간 실험군의 경우, 대조군에 비하여 catechola-

mine이 25.6%가량 감소를 보인것으로 보아(table 1), 흰쥐에 일으킨 하악골절이 강한 acute stress를 유발시켜, 부신내의 catecholamine이 상당히 감소된 것으로 추측된다. 이 경우 아직 stress를 받은 기간이 짧이므로, PNMT활성의 변화는 기대되어지지 않으므로, 2시간실험군에서는 주로 분비과정이 촉진되어 생긴 변화일것으로 사료된다. 그러나 16시간실험군의 경우 다시 대조군에 유사한 값을 나타내어(table 1), 2시간 이후 16시간 사이에 다량의 epinephrine이 부신에서 합성되었거나 stress의 감소로 인하여 분비가 감소되었을 두가지 가능성을 생각할 수 있지만, 부신내의 epinephrine합성에 결정적인 역활을 하는 효소인 PNMT 활성이 stress를 준지 16시간이 경과하였음에도 불구하고, 대조군에 비해 거의 변화가 없는 점으로 미루어(table 2), 흰쥐에 있어 하악골절은 사람에서 처럼 강하고 지속적인 동통이 유지되지 않고, 오직 짧은기간동안만 강한 stress를 주었다가 점점 소실되는것으로 사료되나, 정확한 기전은 앞으로 더욱 많은 연구를 통해서만 알 수 있을것이다.

V. 결 론

흰쥐의 간으로부터 얻은 catechol-O-methyl-transferase(COMT)와, 방사능 동위원소로 표지된 methyl donor를 이용한 radioenzymatic assay 방법으로, 구강내 손상이 부신내 catecholamine 농도에 미치는 영향에 관한 실험을 하여, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. partially purified COMT용액은, 1mℓ당 10.5 mg의 단백질을 함유하고 있었으며, 이 단백질 1mg당 약 0.5unit의 효소활성이 관찰되었다.

2. 부신내의 catecholamine농도는, 대조군에서 조직 1g당 954±64μg이었으며, 2시간과 16시간 실험군에서는 710±68, 842±71μg으로서, 대조군에 비해 각각 25.6% 및 11.7% 낮은 값을 보였으나, 2시간 실험군만이 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

3. phenylethanolamine-N-methyltransferase(PNMT) 효소활성은, 두 실험군 모두 대조군에 비해 별차이가 없는 것으로 나타났다.

(本 論文을 完成함에 있어 始終 指導校閲하여 주신 李春根 교수님께 深甚한 感謝를 드리며, 助言과 協助하여 주신 口腔外科學教室 여러 教授님과 醫局員여러분께 깊은 謝意를 表하는 바입니다.)

— REFERENCES —

1. Axelrod, J. & R. Tomchick: Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. J. Biol. Chem. 233:702-705, 1958.
2. Axelrod, J.: Catechol-O-methyltransferase from rat liver, In Methods in Enzymology, vol. V, Colowick, S.P. & N.O. Kaplan (eds.), Academic Press, 1962, 748-751.
3. Bauce, L., J.A. Thornhill, K.E. Cooper, & W.L. Veale: A radioenzymatic assay for femtomole determination of catecholamines using alphamethyldopamine as an internal standard. Life Sci. 27:1921-1928, 1980.
4. Beckman, D.L. & S.G. Iams: Circulating catecholamines in cats before and after lethal head injury. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160:200-202, 1979.
5. Berkowitz, B.A. & R.J. Head: Adrenal origin of plasma catecholamines after decapitation: A study in normal and diabetic rats. Br. J. Pharmacol. 64:3-5, 1978.
6. Callingham, B.A.: Catecholamine in blood, In Handbook of Physiology, Section 7; Endocrinology, vol. 6, Adrenal gland, Baschko, H., G. Sayers, & A.D. Smith (eds.), American Physiological Society. Washington, D.C., 1975, p. 427.
7. de Champlain, J., L. Farley, D.Cousineau, & M-R, van Ameringen: Circulating catecholamine levels in human and experimental hypertension. Circ. Res. 38:109-114, 1976.
8. Christensen, N.J. & J. Videbaek: Plasma catecholamines and carbohydrates metabolism in patients with acute myocardial infarction. J. Clin. Invest. 54:278-286, 1974.
9. Chiueh, C.C. & I.J. Kopin: Hyperresponsivity of spontaneously hypertensive rat to indirect measurement of blood pressure. Am. J. Physiol. 234:H690-H695, 1978.

10. Coupland, R.E.: J. Endocrinol. 9:194, 1953.
11. Coyle, J.T. & D. Henry: Catecholamines in fetal and newborn rat brain. J. Neurochem. 21:61-67, 1973.
12. Cryer, P.E.: Isotope-derivative measurements of plasma norepinephrine and epinephrine in man. Diabetes 25:1071, 1976.
13. Depocas, F. & W.A. Behrens: Effects of handling, decapitation, anesthesia, and surgery on plasma noradrenaline levels in the white rat. Can. J. Physiol. Pharmacol. 55: 212-219, 1977.
14. El-Rabbat, N.A. & N.M. Omar: Colorimetric determination of catecholamines by 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride. J. Pharmaceu. Sci. 67:779-781, 1978.
15. Von Euler, U.S.; Noradrenaline, Charles, C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois, 1956, p. 111.
16. Franksson, C., C.A. Gemzell, & U.S. von Euler: Cortical and medullary adrenal activity in surgical and allied conditions. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 14:608-621, 1954.
17. Fredholm, B.B., L.O. Farnebo, & B. Hamberger: Plasma catecholamines, cyclic AMP and metabolic substrates in hemorrhagic shock of the rat. The effect of adrenal demedullation and 6-OH-dopamine treatment. Acta Physiol. Scand. 105:481-495, 1979.
18. Gascon, A.L.: Effect of acute stress and ouabain administration on adrenal catecholamine content and cardiac function of rats pretreated with diazepam. Can. J. Physiol. Pharmacol. 55:65-71, 1977.
19. Gordon, R., S. Spector, A. S. joerdsma, & S. Udenfriend: Increased synthesis of norepinephrine and epinephrine in the intact rat during exercise and exposure to cold. J. Pharmacol. Exp. Ther. 153:440-447, 1966.
20. Halter, J.B., A.E. Pflug, & D. Porte, Jr.: Mechanism of plasma catecholamine increases during surgical stress in man. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 45:936-944, 1977.
21. Kones, R.J.: Emotional stress, plasma catecholamines, cardiac risk factors, and atherosclerosis. Angiology 30:327-336, 1979.
22. Leduc, J.: Excretion of catecholamines in rats exposed to cold. Acta Physiol. Scand. 51:94-99, 1961.
23. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, & R.J. Randall: Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.
24. Nagura, M.: Effect of some psychotropic drugs on catecholamines in brain and adrenal medulla of rats under stress producing peptic ulcer. Jpn. J. Pharmacol. 22:545-549, 1972.
25. Phillippe, M. & J.L. Kitzmiller: The fetal and maternal catecholamine response to insulin-induced hypoglycemia in the rat. Am. J. Obstet. Gynecol. 139:407-415, 1981.
26. Pinardi, G., R.K. Talmaciu, E.Santiago, & L.X. Cubeddu: Contribution of adrenal medulla, spleen and lymph, to the plasma levels of dopamine beta-hydroxylase and catecholamines induced by hemorrhagic hypotension in dogs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 209:176-184, 1979.
27. Tolas, A.G., A.E. Pflug, & J.B. Halter: Arterial plasma epinephrine concentrations and hemodynamic responses after dental injection of local anesthetic with epinephrine. J. Am. Dent. Assoc. 104:41-43, 1982.
28. Womble, J.R., D.F. Larson, J.C. Copeland, B.R. Brown, M.K. Haddox, & D.H. Russell: Adrenal medulla denervation prevents stress-induced epinephrine plasma elevation and cardiac hypertrophy. Life Sci. 27:2417-

2420, 1980.
29. Wurtman, R.J.: Control of epinephrine synthesis in the adrenal medulla by the adrenal cortex: Hormonal specificity and dose-response characteristics. Endocrinol. 79:608-614, 1966.
30. Wurtman, R.J. & J. Axelrod: Control of enzymatic synthesis of adrenaline in the adrenal medulla by adrenal cortical steroids. J. Biol. Chem. 241:2301-2305, 1966.

EFFECTS OF INTRAORAL TRAUMA ON CATECHOLAMINE CONCENTRATION IN RAT ADRENAL GLANDS

Kyung Wook Kim, D.D.S.

Department of Oral Surgery, Graduate School, Seoul National University
(Directed by Prof. Choon Gun Rhee)

≫ Abstract ≪

Stress produces significant alteration of catecholamine content of the adrenal glands and increased activity of the epinephrine synthesizing system, that is phenylethanolamine-N-methyl-transferase(PNMT).

Released catecholamine would appear to be among the most dangerous cardiovascular risk factor of various chemical mediators.

This experiments described were carried out in an attempt to determine the effects of intraoral trauma on adrenal catecholamine and PNMT activity by radioenzymatic assay method. This method is an application of principle that catecholamine can be transformed to its methylated derivative by co-incubation with catechol-0-methyl-transferase (COMT) and isotope-labelled methyl donor.

The results were as follows.

1. Partially purified COMT solution contained 10.5mg of protein per 1ml, and 0.5 unit of enzyme activity per 1mg of protein.
2. Catecholamine concentration of adrenal glands were 954±64 μg per g of tissue in control group, and 710±68, 842±71 μg in 2-hr. group and 16-hr. group after mandible fracture, respectively. And there was statistically significant difference only between control and 2-hr. group.
3. There were no significant differences between control and 2-hr. or 16-hr. group in PNMT activity in adrenal glands.