

허혈심근 Xanthine Oxidase의 전환에 관한 연구

박 창 권* · 이 영** · 박 종 완*** · 김 명 석***

- Abstract -

Conversion of Myocardial Xanthine Oxidase in Ischemic Heart of Rat

Chang-kwon Park, M.D.* , Young Lee, M.D.**
Jong-wan Park, M.D.*** , Myung-suk Kim, M.D.***

The present experiments were performed to confirm the hypothesis that xanthine oxidase(X-OD), as a source and mechanism of oxygen radical production, plays an important role in the genesis of the reperfusion injury of ischemic myocardium. The experimental ischemic-reperfusion injury was induced in isolated, Langendorff preparations of rat hearts by 60 min. Of global ischemia with aortic clamping followed by 20 min. of reperfusion with oxygenated Krebs-Henseleit solution(pH 7.4, 37°C).

The results were as follows:

1. The releases of creatine phosphokinase and a lipid peroxidation product, malondialdehyde(MDA) into the coronary effluent were abruptly increased upon reperfusion of ischemic hearts. The increases of the enzyme and MDA were suppressed significantly in the hearts removed from rats pretreated with allopurinol, a specific XOD inhibitor(20mg/kg, oral, 24 hrs and 2 hrs before study). This effect of allopurinol was comparable to that of oxygen radical scavengers, superoxide dismutase(5,000U) and catalase(12,500 U).
2. The increased SOD-inhibitable reduction of ferricytochrome C, which was infused to the hearts starting with reperfusion, was significantly suppressed in allopurinol pretreated hearts.
3. Activities of myocardial XOD were compared in the normal control hearts and the ischemic ones. Total enzyme activities were not different in both hearts. However, comparing with the control, the ischemic ones showed higher activity in O-form and lower activities in D-form and D/O-form.
4. In the ischemic hearts, phenylmethylsulfonyl fluoride, a serine protease inhibitor, prevented significantly the increase of O-form and the decreases of D and D/O-form, while thiol reagents did not affect the changes of the enzyme.
5. The increase of O-form and the decreases of D and D/O-form were not significant in both

* 계명대학교 의과대학 흉부외과학교실

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Keimyung University

** 충남대학교 의과대학 흉부외과학교실

** Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chungnam National University

*** 서울대학교 의과대학 약리학교실

*** Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University

1988년 9월 28일 접수

calcium-free perfused and pimizide, a calmodulin inhibitor, treated ischemic hearts.

6. The SOD-inhibitable reduction of ferricytochrome C were suppressed by PMSF and pimizide treatment as well as by calcium-free perfusion.

It is suggested from these results that in the ischemic rat myocardium, xanthine oxidase is converted to oxygen radical producing O-form by calcium, calmodulin-dependent proteolysis and plays a contributing role in the genesis of ischemic-reperfusion injury by producing oxygen free radicals.

I. 서 론

관상동맥 폐쇄에 따른 허혈성 심장병에서 심근 손상이 가역적인 초기에는 Streptokinase, urokinase 등 혈전용해 약물의 투여와 경피적 관상동맥 확장술(PTCA) 또는 관상동맥 우회술 등 내과적 혹은 외과적 방법으로 관상혈류를 재개시켜 주므로써 심근세포의 대사 이상 및 기계적 수축 능력의 저하를 거의 정상으로 회복시킬 수 있다. 그러나 허혈상태가 진행되어 심근세포들이 어느정도 비가역적으로 손상되기 시작하는 경우에는 관상혈류의 재개에도 불구하고 심근 손상이 회복되기보다는 오히려 악화되므로써 임상적으로는 치명적인 부정맥 등 심한 세포손상을 보이는 소위 재관류손상이 유발되는 경우가 많다¹⁾. 이와같은 허혈심근의 재관류손상은 여러인자들의 복합적인 작용에 의하여 나타날 것으로 여겨지고 있으나 아직도 그 정확한 기전에 관하여는 알려져 있지 못하다. 지금까지 거론되어 온 심근세포 손상에 관여할 것으로 주장되고 있는 설로는 ATP, Creatine phosphate 등 고에너지 Phosphate의 고갈^{2,3)} 및 세포내의 과다한 칼슘축적^{4,5)}, 라이소좀 효소들의 활성화⁶⁾, 인지질분해 효소 활성화⁷⁾ 등이 있지만 일관된 설은 없는 형편이다. 그러나 최근에 허혈심근의 재관류 손상은 혈류재개와 더불어 이루어지는 산소재공급과 관련이 있으며, 특히 반응성 산소 대사물질인 산소라디칼이 세포손상을 야기하는 직접적인 인자가 될것으로 보고되어 많은 관심을 끌고 있다^{8,9)}.

허혈 심근의 재관류 손상에 있어서 산소라디칼이 중요한 역할을 할 것이라는 주장은 최근의 여러 연구들에서 보고되었다. 즉 동물의 in vivo 또는 직출심장을 이용한 실험적 허혈 병변에서 재관류에 따른 심근의 기계적 기능 악화 및 세포질 효소들의 유출 증가가 산소라디칼 제거물질인 Superoxide dismutase(SOD), Catalase 등에 의하여 억제되고^{22~24)}, Na⁺, K⁺, -

ATPase 활성억제 및 지질과산화 산물의 증가 또한 SOD, catalase, dimethylsulfoxide(DMSO) 및 histidine 등 각종 산소라디칼 제거 물질들에 의하여 억제됨이 관찰되었다²⁵⁾. 그러나 이와같이 허혈심근의 재관류 손상시 산소라디칼이 관여할 것으로 인정은 되지만 아직까지도 산소라디칼의 생성을 심근에서 직접적으로는 측정하지 못하였을 뿐 아니라, 어디에서 어떠한 기전으로 산소라디칼이 생성되는 것인지에 대하여도 분명히 밝혀져 있지 못하다. 지금까지 in vitro 실험이나 여러 장기, 조직들에서의 연구 결과를 종합해 보면 생체에서의 가능한 산소라디칼 발생기전 및 출처로서 xanthine oxidase를 위시하여 미토콘드리아^{26,27)}, 백혈구^{28,29)}, catecholamine^{30,31)}, prostaglandin 등이 거론되고 있으며 이중 특히 xanthine oxidase는 허혈조직의 재관류 손상에서 많은 관심을 끌고 있다.

Xanthine oxidase(XOD)는 purine 대사의 최종 단계에서 hypoxanthine, xanthine을 uric acid로 산화하는 효소로써 동물 생체의 여러조직에 다양하게 분포하며 심근에서는 주로 관상혈관의 내피세포에 존재하고 있다³³⁾. XOD는 분자량이 약 150,000이고, 촉매활성 부분으로 molybdenum, flavin adenine nucleotide(FAD) 및 non-heme iron-sulfur를 갖고 있는 산화 환원반응효소로^{34~36)} 촉매 반응시 전자 수용체로서 (NAD)⁺를 이용하는 dehydrogenase형(D형)(Hypoxanthine 또는 xanthine + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{XOD}}$ urate + NADH + H⁺, 활성에너지 14,000cal/mol)과 O₂를 전자 수용체로 하여 산소라디칼을 생성하는 oxidase형(O형)(Hypoxanthine 또는 xanthine + O₂ + H₂O $\xrightarrow{\text{XOD}}$ urate + O₂⁻ + H₂O₂, 활성에너지 13,500cal/mol), 그리고 NAD⁺와 O₂를 다같이 이용할 수 있는 중간형인 D/O 형이 있다^{34~37)}.

XOD가 허혈심근 재관류시 산소라디칼의 출처로써 역할을 하리라는 것은 XOD억제 약물인 allopurinol이 산소라디칼 제거 물질과 마찬가지로 재관류 손상시 심근보호 효과를 나타내며^{25,38,39)}, 또 정상조직에서의

XOD는 산소 라디칼과는 무관한 D형으로 대부분이 존재하지만⁴⁰⁾ 장관의 허혈 조직에서는 산소라디칼을 생성하는 O형의 비율이 증가한다는 보고⁴¹⁾들로 미루어 볼때 충분히 가능할 것으로 여겨진다. 그러나 이러한 가능성에도 불구하고 현재로서는 허혈 심근의 재관류시 XOD를 통한 산소라디칼의 생성이 직접적으로는 확인되지 않았으며, 또 심근에서도 산소라디칼을 생성할 수 있는 O형의 XOD가 허혈시 과연 증가할 것이며, 그 기전은 무엇인지가 명확히 밝혀져 있지 못하다. 본 연구에서는 이러한 허혈심근 재관류 손상시 XOD의 역할을 밝히기 위한 연구의 일환으로 흰쥐 적출 심장의 실험적 허혈-재관류 모델을 이용하여 XOD에 의한 산소라디칼의 생성과 O형 XOD의 증가 여부 및 그 기전등을 규명하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

Adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), allopurinol, catalase, creatine phosphate, ferricytochrome C (Type VI), dithiothreitol (DTT), glucose-6-phosphate dehydrogenase, hexokinase, lactic dehydrogenase (LDH), 2-mercaptoethanol, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), reduced nicotinamide denine dinucleotide (NADH), sodium pyruvate, superoxide dismutase, thiobarbituric acid, xanthine, xanthine oxidase는 Sigma (St. Louis, Mo., U.S.A.) 제품을 사용하였으며, Pimozide는 보령제약 제품을, 기타 모든 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 실험적 허혈심근-재관류손상

성구별없이 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐에 헤파린(100IU)을 복강 주사하고 45분 후 경부 탈골로 치사시킨 다음 양측 폐장과 함께 심장을 즉시 적출하여 냉(2-4°C) 생리식염수 속에 담갔다. 지방 및 결체 조직을 제거한후 대동맥을 Langendorff 심장 관류 장치에 연결하여 역방향의 관상관류를 실시하였다.

양측 폐정맥 및 상·하 대정맥을 결찰하고 폐장을

예어 냄으로서 모든 관류액이 관상혈관을 통하게 하고, 폐동맥을 절개하여 심장을 통과한 관류액이 자유롭게 흘러 나올수 있도록 하였다. 95% O₂-5% CO₂로 산소를 포함시킨 Krebs-Henseleit(K-H) 완충용액 (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 27.2 mM, KCl 4.8 mM, MgSO₄ 7H₂O 1.2 mM KH₂ PO₄ 1 mM, CaCl₂ 1.25 mM, glucose 11.1 mM, pH 7.4)을 100 Cm H₂O의 압력으로 관류 하였고, 심장온도가 37°C로 유지 되도록 관류액의 온도를 일정하게 유지하였다. K-H 용액으로 15분 동안 관류하여 잔류 혈액을 완전히 세척하고 관상 관류가 일정히 유지된 후 60분동안 Langendorff 관류 장치의 대동맥 카눌라를 차단하여 심장 전체의 허혈 상태를 유지하였다. 허혈기간 동안에는 95% N₂-5%CO₂로 포화시키고, glucose를 제거한 K-H 용액 (pH 7.4, 37°C)에 심장을 담가 외부 산소와의 접촉을 피하고 심장의 건조를 방지 하였다. 60분 동안의 허혈에 이어 계속해서 95% O₂-5% CO₂ 산소를 포화시킨 K-H 용액을 20분 동안 다시 관류하여 재관류 손상을 유도하였다.

심장을 통과하고 나온 관류액을 일정시간 간격으로 받아 세포질 효소의 유리 및 지질 과산화물 측정에 사용하였다. 대조 심장은 95% O₂-5% CO₂를 계속 공급한 K-H 용액 (pH 7.4, 37°C)으로 90분 동안 관류하였으며, 실험이 끝난후 모든 심장은 표면에 묻어있는 수분을 제거하고 무게를 측정하였다.

재관류 손상시 산소라디칼의 관련과 xanthine oxidase(XOD)의 역할을 검토하기 위한 방법의 하나로 산소라디칼 제거 물질과 XOD억제 약물인 allopurinol의 심근 보호 효과를 관찰하였다. Allopurinol은 실험 24hr 및 2hr 전에 체중 kg 당 20 mg을 구강 투여하여 전처리 하였으며, 예비 실험에서 심근 XOD 활성이 완전히 억제됨을 확인하였다. 산소라디칼 제거 물질로는 superoxide anion(O₂⁻)의 제거 효소인 superoxide dismutase(SOD)와 hydrogen peroxide(H₂O₂) 분해 효소인 catalase를 사용하였다. Langendorff 관류 장치의 대동맥 카눌라에 연결된 주입 펌프를 통하여 0.5 ml/min 속도로 재관류 시작과 함께 실험끝까지 20분 동안 주입 하였으며, SOD는 5000U, catalase는 12,500U를 투여하였다.

3. Creatine phosphokinase 및 malondialdehyde 측정

20분의 재관류 기간동안 1분 간격으로 관상동맥액

을 받아 양을 제량한 후, 세포질 효소의 하나인 Creatine phosphokinase(CPK) 활성 및 지질과산화물의 하나인 malondialdehyde(MDA) 농도를 측정하여 심근 세포 손상의 지표로 삼았다.

CPK 활성은 25°C, 3 ml 반응계(imidazole 100 mM, glucose 20 mM, MgCl₂ 10 mM, ADP 1 mM, AMP 10 mM, creatine phosphate 20 mM, NADP 0.7 mM, cysteine 10 mM, hexokinase 0.94U/ml, glucose-6-phosphate dehydrogenase 0.48U/ml, pH 6.9)에서 관류액 시료 0.05 ml에 의하여 NADP가 NADPH로 환원되는 율을 340 nm에서 UV-spectrophotometer로 기록함으로써 측정하였으며, 1분 동안에 1 μmole의 NADP를 NADPH로 환원 시키는 CPK 활성을 1 unit로하여 U/g. wet weight로 계산하였다⁴²⁾.

MDA는 thiobarbituric acid 방법⁴³⁾으로 측정하였다. 2.4 ml 시료 관류액에 0.67% thiobarbituric acid와 glacial acetic acid 1:1 혼합액 0.6 ml를 넣고 60분 동안 100°C 수욕조에서 반응 시킨다음 실온으로 냉각하고 532nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 흡광계수 $\Sigma = 1.52 \times 10^5 / \text{M/cm}$ 를 이용하여 계산하였다⁴⁴⁾.

4. Superoxide anion 측정

허혈심근 재관류 손상시 산소라디칼의 관련을 구체적으로 확인하기 위한 방법의 하나로 O₂에 의한 ferricytochrome C 환원반응⁴⁵⁾을 이용하여 심장 in situ에서 재관류시 O₂의 생성을 보다 직접적으로 측정코저 하였다. 60분간의 허혈에 이은 재관류시 매동맥 카테라에 연결한 주입 펌프를 통하여 ferricytochrome C 용액(100 μM)을 0.5 ml/min 속도로 주입 하면서 30 초 간격으로 관상관류액을 받았다. 즉시 418 nm(Cam Spec Spectrophotometer, M 310)에서 환원형 ferricytochrome C의 흡광도를 기록하고, 계속해서 그 시료에 소량의 sodium dithionite결정을 첨가하여 남아 있는 산화형 ferricytochrome C를 완전히 환원 시킨 후 다시 흡광도를 측정 하였다.

418 nm에서 산화형 ferricytochrome C와 환원형 ferricytochrome C의 흡광 계수의 차이($\Delta \Sigma_{418} = 7.0 \times 10^4 / \text{M/cm}$)를 이용하여 관상관류중에 환원된 ferricytochrome C의 양을 계산하였다.

5. Xanthine oxidase 측정

Langendorff 관류 장치에서 심장을 떼어낸 후 즉시 액체 질소로 급속 동결하여 분말화하고 5배량의 균질액(Tris-HCl 100 mM, pH 8.1, EDTA 1 mM, dithiothreitol 10 mM)에 넣어 polytron(Brinkman, U.S.A.)으로 균질화 시켰다. 1000 g, 20분동안 원심분리 하여 상등액을 취한후 다시 27,000 g, 1시간 동안 냉동 원심분리 하였다. 그 상등액에 3.8M ammonium sulfate 용액을 서서히 첨가하여 1.6-2.4 M 농도 범위에서 침전되는 분획을 20,000 g, 10분간 냉동원심분리 하였으며, 그 침전물을 50 mM Tris-HCl 용액(pH 8.0)에 용해하여 XOD 활성 측정 시료로 사용하였다.

50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 60 μM Xanthine과 167.5 μM NAD⁺가 존재하거나 또는 존재하지 않은 반응조건(25°C)에서 시료(0.3~0.5 mg protein/ml) 첨가에 의하여 생성되는 uric acid를 파장 290nm에서 UV-spectrophotometer(Perkin-Elmer, Model 139)로 측정하고, 한편으로는 340 nm에서 NADH 생성을 또한 측정하였다. NAD⁺ 존재하에서 uric acid 생성을 측정할때 경우에 따라서는 0.5 mM pyruvate와 1.2 U/ml dehydrogenase를 첨가하여 NADH를 다시 NAD⁺로 산화 시킴으로써 D형 XOD에 대한 NADH의 억제력을 방지토록 하였다⁴⁶⁾. XOD 활성도의 계산은 xanthine이 uric acid로 전환될때의 흡광계수($\Sigma_{290} = 0.85 \times 10^4 / \text{M/cm}$ 와 340nm에서 NADH의 흡광계수($\Sigma_{340} = 6.22 \times 10^3 / \text{M/cm}$)를 이용하였으며, NAD⁺가 존재하고 pyruvate와 lactic dehydrogenase는 첨가하지 않은 조건에서 uric acid 생성을 측정할 경우에는 290 nm에서 NADH에 의한 흡광도($\Sigma_{290} = 2.10 \times 10^3 / \text{M/cm}$) 변화를 보정하였다. 1분 동안 1 μmole의 uric acid를 생성할 수 있는 XOD 활성을 1 Unit로 하였으며, 시료의 단백질 농도는 Lowry 등⁴⁷⁾의 방법으로 측정하였다.

XOD의 D형, O형 및 D/O형의 구별은 Kaminski 등⁴⁸⁾의 방법에 준하며 다음과 같이 하였다. 즉 (I), NAD⁺가 존재하지 않은 반응조건에서 용존 O₂만을 전자수용체로 하여 290 nm에서 Uric acid 생성을 측정하였을 때는 O형+D/O형의 활성을 나타내며;(II), O₂ 및 NAD⁺가 함께 존재시 uric acid 생성을 측정하였을 때는 D형(NADH에 의하여 부분 억제됨)+O형+D/O형의 활성을;(III), O₂ NAD⁺와 pyruvate 및 LDH가 전부 존재시 uric acid 생성을 측정할 경우에

는 D형(억제되지 않은)+O형+D/O 형의 활성을; 그리고(IV), O₂와 NAD⁺ 존재시 340 nm에서 NADH를 측정함으로써 계산된 XOD는 D형(부분억제된)+D/O 형을 대변할것이라는 가정하에 D형=(III)-(I), O형=(II)-(IV), D/O 형=(I)-[(II)-(IV)]으로 계산하였다.

III. 연구 성적

1. 허혈심근 재관류 손상에 대한 allopurinol의 효과

1) Creatine phosphokinase(CPK) 유리

세포질효소의 하나인 CPK의 관상관류액으로의 유출을 지표로 삼아 허혈심근의 재관류시 세포손상을 관찰하고 이때 XOD와 산소라디칼의 관련 여부를 일차적으로 검토하였다. 60분간의 허혈에 이은 재관류시

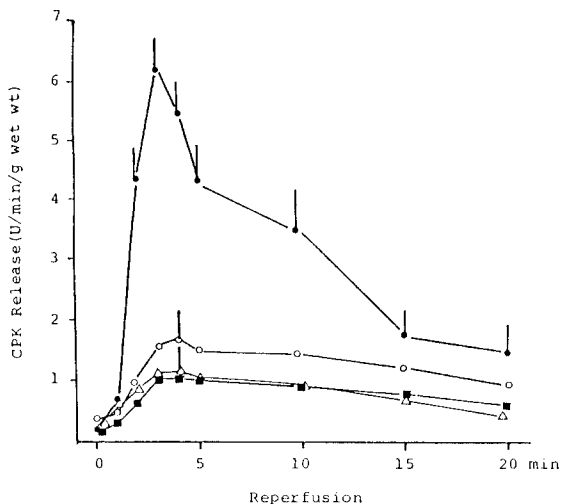


Fig. 1. Effects of allopurinol and oxygen radical scavengers on creatine phosphokinase release in ischemic-reperfused heart of rat. Langendorff preparations of isolated rat heart were subjected to 60 min of global ischemia followed by 20min of reperfusion. Allopurinol(20mg/kg) was administered orally two times at 24hrs and 2hrs before study. Superoxide dismutase(5,000 U) and catalase(12,500 U) were infused to the hearts starting with reperfusion at a rate of .5 ml/min. Control hearts were perfused for 90 min with oxygenated krebs-Henseleit solution at a constant perfusion pressure of 100cmH₂O. Each point represents the mean \pm S.E.M. of six experiments(P<0.05). ●: Control, ○: Allopurinol, ■: Catalase, △: Superoxide dismutase

CPK 유리는 현저히 증가하였다. 그림 1에서와 같이 재관류 시작과 더불어 CPK 유리는 급격히 증가하여 3분에 최고 6.24U/min/g wet wt를 보였고 이후 점차 감소하였으나 20분에도 현저한 유리를 보였다. 그러나 XOD의 특이 억제 약물인 allopurinol을 전처치한 쥐의 적출 심장에서는 재관류시 CPK 유리 증가가 현저히 억제되어 최고치를 보인 4분에서도 1.68 U/min/g. wet wt로 대조 재관류심장 최고 유리의 약 1/4로 감소하였다. 한편 산소 라디칼 제거물질로 O₂ 제거효소인 SOD는 H₂O₂ 분해효소인 Catalase를 재관류와 더불어 투여한 경우에 있어서도 CPK 유리 증가는 현저히 억제되었으며, 이는 allopurinol을 전처치 하였을 경우에서와 거의 동등한 정도였다.

2) Malondialdehyde(MDA) 생성

서론에서 전술한 바와 같이 산소라디칼은 산화 또는 환원 물질로 작용하므로써 생체의 각종 거대 분자에 손상을 입힐 수 있는 바 특히 불포화 지방산, 코레스테롤 등을 많이 함유한 지질 성분은 산소라디칼에 의한 산화 반응이 좋은 표적이 된다⁴⁹⁾. 본 연구에서도 산소라디칼과 관련된 심근 손상을 관찰하기 위하여 지질과산화산물의 하나로 관상 관류액에 유리되어 나온 MDA를 측정 함으로써 지질과산화 정도를 검토하였다.

그림 2에서와 같이 허혈후 재관류시 MDA는 급격히 증가하여 3분에 최고 4.38 nmole/min/g. wet wt를 보였으며, 20분에서도 2.0 nmole로 계속 증가된 상태를 유지하였고, 이는 CPK유리 증가와 같은 양상이었다. 이와같은 재관류에 따른 MDA의 증가는 CPK 유리에서와 마찬가지로 allopurinol에 의하여 현저히 억제되어 최고치를 보인 4분에서도 대조 재관류심장 최고치의 약 1/4에 불과하였으며 SOD, catalase 등 산소라디칼 제거 물질에 의하여서도 거의 동등한 정도로 억제되었다. 산소 공급을 계속한 정상관류(90분) 대조 심장에서는 CPK 유리 및 MDA가 거의 측정되지 않았으며, allopurinol 및 SOD, catalase는 그 자체가 CPK 및 MDA 및 MDA 유리를 유도하지도 않았으며, 각각의 측정 방법이 있어서도 영향을 미치지 않았다.

2. 재관류 심장의 superoxide anion 생성

앞에서의 실험 결과는 허혈 심근의 재관류시 보이는 심근 손상이 XOD 및 산소라디칼과 관련이 있을 것임

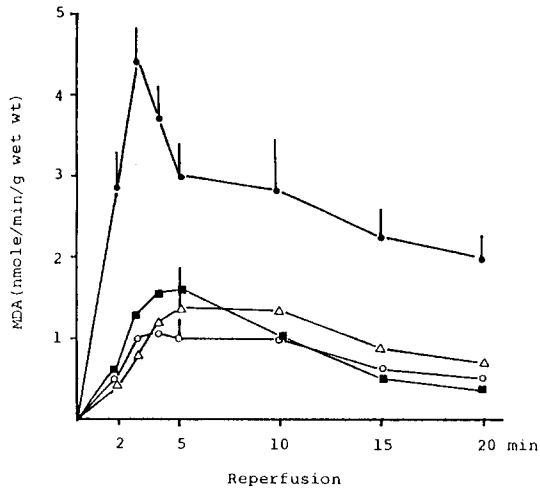


Fig. 2. Effects of allopurinol and oxygen radical scavengers on malondialdehyde production in ischemic-reperfused heart of rat. Lipid peroxidation of myocardial tissue was estimated from malondialdehyde(MDA) released into the coronary effluent during the reperfusion period. MDA was assayed by thiobarbituric method. Perfusion conditions and methods of drug administration are same as in Fig. 1. Each point represents the mean \pm S.E.M. of six experiments ($P < 0.05$). ●: Control; ○: Allopurinol, ■: Catalase, △: Superoxide dismutase

을 시사해주는 바를 여겨지지만 이는 어디까지나 간접적인 증거일 수 밖에 없기 때문에 보다 직접적인 증거를 위하여 산소라디칼의 생성을 *in situ* 심장에서 확인코저 하였다.

실험방법에서와 같이 재관류시 일정량의 ferricytochrome C 용액(100 μ M)을 계속 주입하면서 심장을 통과하고 나온 관류액에서 환원형인 ferricytochrome C를 측정할 경우 $O_2^{\cdot -}$ 이외에 다른 환원 물질들에 의한 비특이적인 환원이 또한 있을 수 있다. 따라서 SOD(10 U/ml)를 동시에 주입하면서 측정된 ferricytochrome C 환원을 SOD가 존재하지 않은 조건에서 측정된 환원양에서 빼주므로써 SOD억제성 즉 $O_2^{\cdot -}$ 에 의해서만 환원된 양을 계산하였다. 그림 3에서와 같이 SOD억제성-ferricytochrome C 환원이 대조 재관류 심장에서는 1분에 최고로 4.7 nmole/30sec/g. wet wt를 보이고 그 이후에는 점차 감소 하였으나 지속적인 환원을 보였다. 그러나 allopurinol을 전처치한 심장

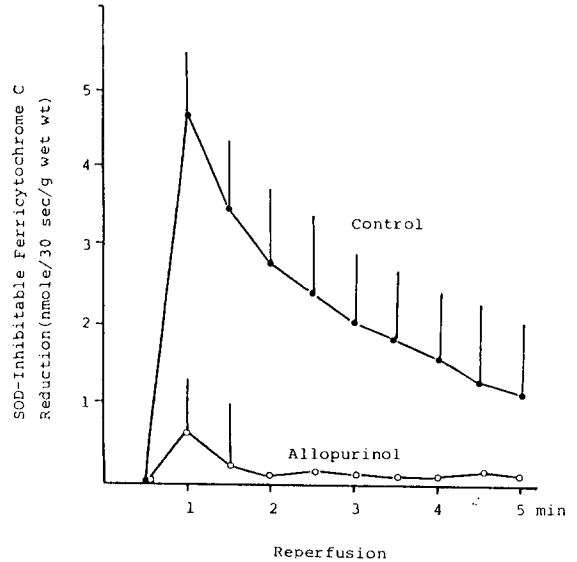


Fig. 3. Effect of allopurinol on ferricytochrome C reduction in ischemic-reperfused heart of rat. Langendorff preparations of isolated rat hearts were subjected to 60 min of global ischemia followed by 20 min of reperfusion. During reperfusion, ferricytochrome C(100 μ M/ml) was infused to the heart through the aortic cannula at a rate of 0.5 ml/min. Concentrations of reduced ferricytochrome C in the coronary effluents were determined by measuring the absorbance at 418 nm. For the estimation of SOD-inhibitable(10 U/ml) was subtracted from the total reduction. Allopurinol was treated as same as in Fig. 1. Each point represents the mean \pm S.E.M. of six experiments ($P < 0.05$).

에서는 재관류시 ferricytochrome C 환원이 최고치를 보인 1분에서도 0.5 nmole/30 sec/g. wet wt를 보였을 뿐 거의 일어나지 않았다. 이러한 결과는 허혈심근 재관류시 $O_2^{\cdot -}$ 이 생성되고 그것은 XOD를 통하여 일어날 것임을 강력히 시사하는 바를 여겨졌다.

3. 허혈 심근의 xanthine oxidase 활성

산소를 계속 공급한 90분간의 정상관류 심장에서 XOD의 총활성도는 5.3 U/g prot. 이었으며, 이 중 D형이 4.5U로 대부분을 차지하고 D/O형은 0.75 U, O형은 0.04 U로 아주 낮았다. 한편 60분 동안의 허혈심근에서는 총활성도는 대조심근과 차이가 없었으나, 각형의 활성도에 있어서는 D형과 D/O형이 각각 4.36 U 0.08 U로 감소한 반면 O형은 0.9 U로 증가 하였으

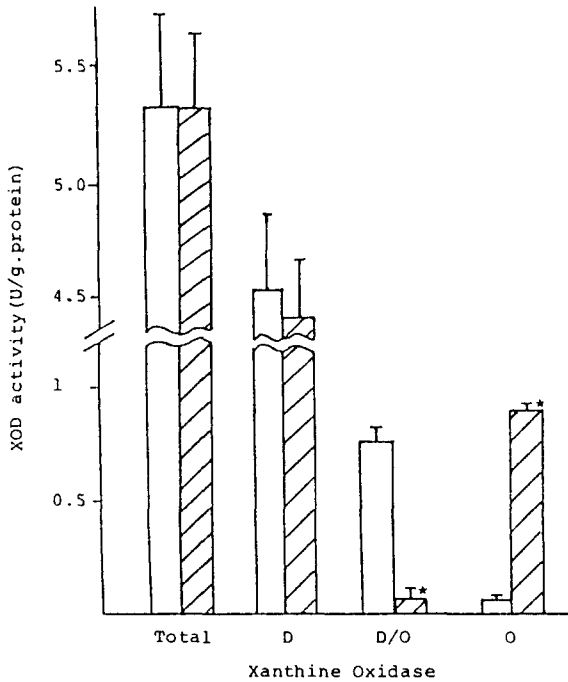


Fig. 4. Xanthine oxidase activity in the ischemic heart of rat. NAD^+ -dependent dehydrogenase form(D), O_2 -dependent oxygen radical producing oxidase form(o) and intermediate D/O form were measured separately by the method as described in the Method and Material. The tissue preparation for measuring the enzyme activity was done immediately after 60min of global ischemia. Results are mean \pm S.E.M. of six experiments. Open bar; control. Hatched bar: Ischemia. * $P < 0.05$.

며, 정상대조와 비교할 때 특히 D/O 형의 감소와 O형의 증가가 현저하였다(그림 4). 이와같은 XOD활성의 변화는 허혈 경과에 따라 비교적 빠른 시간안에 나타나서 30분 허혈에서도 60분 허혈 심근에서와 같은 정도로 D/O형 감소 및 O형의 증가를 나타내었다(그림 5).

4. 허혈심근 xanthine oxidase에 대한 thiol약물, 단백분해 효소 억제제, calmodulin 억제제 및 칼슘의 영향

In vitro 실험에서 흰쥐 간 XOD는 SH기의 변화약물 또는 단백분해 작용에 의하여 D형에서 O형으로 전환됨이 알려져 있다⁴⁶⁾. 본 실험에서는 심근 XOD의 허혈에 의한 변화 기전을 추구하기 위한 방법의 하나

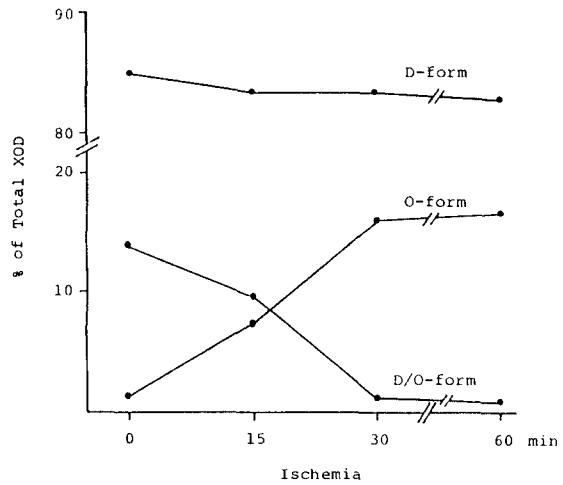


Fig. 5. Effect of duration of ischemia on xanthine oxidase activity of rat heart. D, D/O and O form of the enzyme were measured separately at the indicated time of ischemia. Method of the enzyme activity measurement is as same as in Fig. 4.

로 흰쥐 적출심장을 thiol약물인 dithiothreitol(DTT) 10 mM과 2-mercaptoethanol 10 mM, 단백분해효소 억제제인 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) 1 mM, 그리고 Calmodulin 억제제인 pimoizide 20 μM 이 각각 함유된 K-H 용액으로 15분동안 미리 관류하고 허혈을 유도하였으며, 60분 동안의 허혈 기간중에도 이들 약물이 함유되고 95% N_2 -5% CO_2 를 포화시킨 K-H용액에 담갔다. 또한 칼슘이 XOD의 변화에 미치는 영향을 검토하기 위하여 칼슘을 첨가하지 않은 K-H 용액으로 일차 관류한 후 허혈을 유도하고 XOD 활성을 측정하였다.

도표 1에서와 같이 DTT 및 2-mercaptoethanol 등 thiol 약물은 허혈에 따른 O형의 증가나 D/O형의 감소에 영향을 미치지 않았으며, D형의 비율은 약간 증가 양상을 보이나 뚜렷치 않았고, 총활성도도 통계학적으로 의미있는 변화를 보이지는 않았다. 한편 PMSF 및 Pimoizide 총활성도와 D형에는 변화를 보이지 않았으나 O형의 증가 및 D/O형의 감소는 현저히 방지하였으며, 이는 칼슘을 제거한 상태에서 유도한 허혈심근에서도 동일한 결과를 보였다(도표 2).

Table 1. Effects of thiol reagents on xanthine oxidase activity of ischemic rat heart

	Treatment	XOD			
		Total(U g prot) [*]	D(%)	D/O(%)	O(%)
Control	None	5.3±0.4	85	14	1
Ischemia	None	5.3±0.3	82	1	17
	DTT ^{**}	4.9±0.5	87	1	12
	2-Mercapto ^{**}	4.3±0.6	83	1	16
	ethanol				

*: Mean±S.E.M. of six experiments.

** : Dithiothreitol(DTT)(10mM) and 2-mercaptoethanol(10 mM) were infused for 15 min just before the induction of ischemia.

Table 2. Effects of protease inhibitor, calmodulin inhibitor and calcium on xanthine oxidase activity of ischemic rat heart.

	Treatment	XOD			
		Total(U g prot) [*]	D(%)	D/O(%)	O(%)
Control	None	5.3±0.4	85	14	1
Ischemia	None	5.3±0.3	82	1	17
	PMSF ^{**}	4.9±0.5	85	10	5
	-Ca ⁺ + ^{***}	5.2±0.4	80	17	3
	Pimozide ^{**}	5.2±0.2	84	12	4

*: Mean±S.E.M. of six experiments.

** : Phenylmethylsulfony fluoride(PMSF), a serine protease inhibitor(1 mM) and Pimozide, a calmodulin inhibitor(20 μM) were infused before induction of ischemia as same as in Fig. 6.

***: Heart was made ischemic under the absence of calcium as same as in Fig. 6.

5. 재관류시 Superoxide anion 생성에 미치는 thiol 약물, 단백분해효소 억제제, calmodulin 억제제 및 칼슘의 영향

앞의 실험 결과에서처럼 XOD에 영향을 미치는 약물들이 O₂⁻ 생성에는 어떠한 영향을 미치는가를 관찰하느라 허혈심근 재관류시 XOD를 통한 산소라디칼의 발생 기전을 검토하고자 하였다. 그림 6에서와 같이 PMSF 및 pimozide를 전처치 하거나, 칼슘이 존재하지 않는 상황에서 유도한 허혈 심근에 재관류를 실시하였을 경우 SOD-억제성 ferricytochrome C환원은 다같이 현저히 억제되었다. 한편 thiol 약물들은 그 자체가 화학적으로 ferricytochrome C를 환원시키기 때문에 이 방법에 의한 O₂⁻ 생성을 검토할 수가 없었다.

IV. 고찰

호기성 대사를 영위하는 생체 세포에서 산소분자는 4개의 전자를 받아들임으로써 최종적으로는 H₂O로 환원되지만 그 중간 과정에서는 1-3개의 전자를 갖는 부분적으로 환원된 산소라디칼(O₂⁻, superoxide anion; H₂O, hydrogen peroxide; OH₂[·], hydroxyl radical)들이 생길 수 있다. 일반적으로 라디칼은 전자들이 쌍을 이루지 못한 불안정한 분자로서 이들은 또다른 전자를 받아들이거나, 반대로 공여하여 전자들이 쌍을 이룬 보다 안정된 상태로 돌아가려하기 때문에 화학적으로 반응성이 높다. 산소라디칼들도 다른 분자로 부터 전자를 받아내거나 공여 하므로써 반응성이 높은 산화, 또는 환원 물질로 작용하며, 생체에서는 각종 단백 및 불포화 지방을 산화하고^{10,11)}, 핵산에 손상을 주며¹²⁾, 다당류의 분해¹³⁾ 하는 등 여러개대 분자를 손상시켜

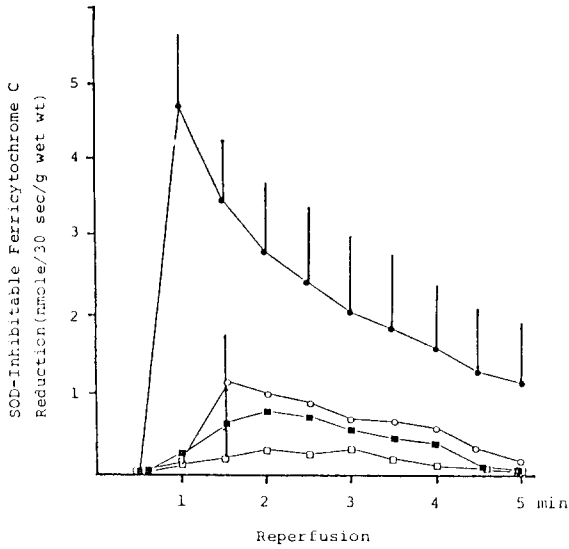


Fig. 6. Effects of a protease inhibitor, a calmodulin inhibitor and calcium on ferricytochrome C reduction in ischemic reperfused heart of rat. SOD-inhibitable ferricytochrome C reduction was measured as same as in Fig. 3. A serine protease inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride(1mM) and a calmodulin inhibitor, pimozide(20 uM) were infused for 15 min just before the injection of 60 min ischemia. To observe the effect of calcium, the heart was perfused with calcium free Krebs-Henseleit solution and made ischemic(60 min) under the absence of calcium. Each point represents the mean \pm S.E.M. of six experiments ($P < 0.05$). ●: Control, ○: Allopurinol, ■: Catalase.

독작용을 나타낸다. 산소라디칼은 정상세포의 대사과정 중에도 어느정도 발생되지만 정상 세포에는 peroxidase/reductase 및 reduced glutathione 등 라디칼에 대한 방어기전이 존재하기 때문에 독작용을 나타내지 못한다. 그러나 생체가 정상과는 다른 모종의 병리상태 하에서는 이들 방어기전이 저하 되거나 또는 산소 라디칼의 생성이 방어기전을 능가할 정도로 증가되므로써 세포 독작용을 나타낼 수 있을 것으로 여겨지는 바, 임상적으로 뇌¹⁴⁾, 간¹⁵⁾, 장관¹⁶⁾ 등의 허혈병변 및 재관류 손상, 기타 paraquat, nitrofurantoin 등 산화-환원 대사상 약물의 세포 독작용¹⁷⁾ 및 노화, 염증반응, 산소중독 등 많은 질병에서 산소라디칼이 관련된 것으로 알려져 있다¹⁸⁻²¹⁾.

Xanthine oxidase가 허혈 심근의 재관류 손상시 산소라디칼의 생성출처 및 그 기전으로써 역할을 할 것

이라는 주장은 첫째, 조직이 허혈 상태에 있을때는 ATP 등 adenine nucleotide의 분해가 증가 되므로 종국에는 XOD의 기질인 purine기들(hypoxanthine, xanthine)이 세포내에 축적되며^{2,3)}, 둘째, XOD중 정상 조직에서 대부분을 차지하고, 산소라디칼과는 무관한 D형이 허혈장관⁴¹⁾ 또는 허혈 상황과 유사한 in vitro의 저 산소조건⁵⁰⁾에서는 O₂-의존성이고 산소라디칼을 생성하는 O형으로 전환되며, 셋째, 만일 이러한 조건의 허혈 조직에 재관류와 더불어 산소가 제공된다면 상당량의 산소라디칼이 생성될 수 있으리라는 이론적인 가설에 그 근거를 두고 있다.

본 연구에서 XOD의 특이 억제약물인 allopurinol이 SOD, catalase 등 산소라디칼계거 물질과 동등한 정도로 재관류시 세포질 효소의 유리증가(그림 1)와 지질과산화물의 생성을 억제(그림 2)할뿐 아니라, O₂에 의한 SOD-억제성 ferricytochrome C 환원 또한 allopurinol에 의하여 현저히 억제된 결과는 허혈 심근의 재관류시 XOD를 통한 산소라디칼의 생성이 세포 손상에 중요한 역할을 하리라는 가설을 강력히 뒷받침하는 바를 여겨진다. 한편 이와는 달리 Reimer와⁵¹⁾ Jennings는 실험적으로 개의 관상동맥을 차단하기 30분전부터 allopurinol을 투여하고 허혈상태(40분)가 끝난후 재관류시에 계속 allopurinol을 투여 하더라도 심근괴사 부위의 축소가 없었다는 점에서 재관류 손상에 있어서 XOD의 역할에 의문을 제기하였다. 그러나 생체에 투여된 allopurinol의 XOD억제 작용은 allopurinol 그 자체보다는 이의 대사 산물으로써 XOD에 대한 친화성이 훨씬 강한 oxypurinol에 의하여 나타난다는^{52,53)} 점을 감안할때 이들의 결과는 본 연구에서와 같이 실험 24시간전에 투여하여 oxypurinol로의 충분한 대사가 일어날 수 있는 상황이 아닌 실험 도중에 allopurinol을 투여했기 때문에 XOD의 억제가 나타나지 않았을 것으로 여겨지며, 또 allopurinol은 XOD에 대한 경쟁성 억제이므로 허혈 조직에서와 같이 XOD의 기질인 hypoxanthine, xanthine 등이 많이 축적될 수 있는 상황에서는 충분한 억제 효과를 나타내지 못했을 가능성도 배제 할 수는 없다⁵⁴⁾.

정상 대조 관류심근에서는 총 XOD 활성의 약 1%에 불과하던 O형이 60분 허혈 심근에서는 약 20%로 크게 증가하여(그림 4,5 및 도표 1,2) 흰쥐 심근에서도 허혈에 의하여 O형이 증가함을 확인하였다. 이러한 O형의 증가는 대조 심근과 비교할때 총활성도에는 차이가 없이 D형 및 D/O형의 감소와 병행하여 나타

나므로써 D형 및 D/O형에서 O형으로의 전환에 의한 것임을 추측케 하였다. 그러나 D형과 D/O형의 감소를 비교 할때는 D형보다 D/O형의 감소 비율이 훨씬 큰 것으로 봐 주로 D/O형에서의 전환이 있을 것으로 여겨졌다. 한편 Chambers 등⁵⁵⁾도 개심근의 허혈 병변에서 XOD의 전환을 관찰 하였으나 이들은 D/O형은 측정하지 않고 D형에서 O형으로의 전환이 있다고 하였다. D/O형의 XOD는 NAD^+ 및 O_2 를 다같이 전자 수용체로 이용할 수 있지만 양자는 서로 경쟁적이며⁴⁸⁾, XOD에 대한 친화성이 O_2 ($\text{Km}=50\mu\text{M}$) 보다는 NAD^+ ($\text{Km}=15\mu\text{M}$)가 훨씬 크다는⁵⁶⁾ 점을 감안한다면 NAD^+ 감소가 아주 많지 않은 경우에는 D/O형과 마찬가지로 작용할 것으로 여겨지기 때문에 이들의 D형은 D/O형을 포함한 것으로 보여진다⁴⁸⁻⁵⁶⁾.

D와 O형의 XOD는 in vitro에서 pH, 온도, 중금속 이온, SH-modifying 약물 및 단백질 분해 효소 등 각종 물리적 및 화학적 조건의 변화에 따라 상호전환됨이 알려져 있다⁴⁶⁾. D형 XOD는 약 14개 SH기를 갖고 있으며, 거의 모든 조직에서 추출된 D형은 in vitro에서 disulfiram, dithiobisnitrobenzoic acid 등 SH modifying⁵⁷⁾ 약물에 의하여 가역적으로 O형으로 전환된다. 이러한 D→O형 전환은 SH기가 disulfide 결합으로 산화되기 때문에 일어나는 것이므로 dithioerythritol, dithiothreitol(DTT) 등 thiol물질에 의하여 그 질환이 다시 역전되거나 또는 전환 그 자체가 억제된다⁴⁶⁾. 한편 trypsin, chymotrypsin 등 단백질 분해 효소는 분자량이 약 13,000 정도로 감소되는 비가역적인 D→O형 전환을 일으키며⁵⁷⁾, 장관 XOD의 D→O형 전환은 thiol 물질에 의하여는 역전되지 않으나 soy-bean trypsin inhibitor에 의하여는 완전히 억제됨이 보고되었다^{41,56)}. 본 연구에서 thiol물질인 DTT 및 2-mercaptoethanol은 D 및 D/O형의 감소나 O형의 증가에 거의 영향을 미치지 않으므로써(도표 1) 흰쥐 심근의 60분 허혈시에 나타나는 XOD전환에는 SH기의 변화가 중요한 인자는 아닐 것으로 여겨졌다. 본 실험에서는 XOD추출 및 측정 중에도 가능한 SH기의 산화를 방지하기 위하여 추출용액 및 측정 반응계에 미리 DTT를 첨가 하였기 때문에 허혈중에 SH기의 가역적인 변화가 있었다라도 다시 역전 되었을 가능성도 배제 할 수는 없다. 그러나 도표 2에서와 같이 serine protease억제제인 phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF)가 허혈 심근에서 O형 증가 및 D/O형

감소를 거의 완전히 억제하여 정상 대조 심근에서와 비슷한 활성도를 보였다는 사실은 SH기의 변화보다는 XOD에 대한 비가역적인 단백질 분해 작용이 보다 중요한 것으로 사료되었다. 허혈 심근의 재관류시 비가역적으로 손상된 심근 세포는 과다한 칼슘 축적을 보이며^{4,5,58)}, 논란의 여지는 있으나 칼슘길항제 투여⁵⁹⁻⁶¹⁾ 및 저칼슘 재관류시에는^{5,62-63)} 심근 손상이 방지된다는 보고들에서 볼때 칼슘은 허혈 심근의 재관류 손상 발생과 관련이 있을 것으로 여겨지지만 아직 근본적인 기전에 관해서는 명확히 밝혀져 있지 못하다.

한편 최근에 박⁶⁴⁾ 등은 흰쥐 적출 심장을 이용한 실험에서 칼슘이 없는 상태로 허혈을 유도 하였을 때는 O형 XOD의 증가가 없을 뿐 아니라 재관류를 실시 하였을 경우에도 allopurinol이 심근 손상을 방지하지 못했다는 결과에서 칼슘은 허혈심근 재관류시 XOD를 통한 산소라디칼의 생성에도 관여할 것임을 시사한 바가 있으며, McCord 등⁴¹⁾은 허혈장관 조직에서 D→O형의 전환이 calmodulin 억제제인 stelazine 및 trypsin inhibitor 등에 의하여 방지됨을 관찰하고 허혈 장관에서의 D→O형 전환은 calmodulin에 의하여 활성화되는 단백질 분해효소의 작용에 의한 것으로 주장하였다.

본 연구에서 역시 단백질 분해 효소 억제제인 PMSF와 calmodulin 억제제인 pimozide의 전처리, 그리고 Ca^{++} 없는 상태에서의 허혈시 O형 증가 및 D/O형 감소가 없다는 사실은 심근 세포에도 calcium, calmodulin-의존성 단백질 분해효소가 존재하는 보고들을^{65,66)} 감안할때 흰쥐 허혈 심근에서도 Calcium, calmodulin-의존성 단백질 분해효소 작용에 의한 XOD의 전환이 있음을 시사하는 바를 여겨지며 이는 재관류시 SOD-억제성 ferricytochrome C 환원 또한 PMSF, pimozide 및 Ca^{++} 없는 상황에서 현저히 억제됨으로서 강력히 뒷받침 된다고 사료되었다.

V. 결 론

흰쥐 적출 심장을 사용한 실험적 허혈-재관류손상 모델에서, 1) xanthine oxidase억제 약물인 allopurinol이 산소라디칼 제거 물질인 superoxide dismutase 및 catalase와 동등하게 심근보호효과를 나타내고, 2) 허혈 심근에서 XOD의 O형으로의 증가 및 3) 재관류시 O_2^- 에 의한 SOD-억제성 ferricytochrome C 환원이 단백질 분해효소 억제제인 pimozide 그리고 calcium이 없는 상황에서는 방지됨으로써 허혈심근 재관류 손

상은 calcium, calmodulin-의존성 단백분해효소 작용에 의한 XOD의 O형으로서 전환과 그로인한 재관류시 산소라디칼의 생성증가가 관련이 있을 것으로 결론지었다.

참고 문헌

- Hearse, D.J.: *Reperfusion of ischemic myocardium. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 9:605-616, 1977.
- Jennings, R.B., Reimer, K.A.: *Lethal myocardial ischemic injury. Am. J. Pathol.*, 102:241-255, 1981.
- Jennings, R.B., Reimer, K.A., Hill, M.L., Mayer, S.E.: *Total ischemia in dog hearts, in vitro. I. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro VS severe ischemia in vivo. Cir. Res.*, 49:892-900, 1981.
- Katz, A.M., Reuter, H.: *Cellular calcium and cardiac cell death. Am. J. Cardiol.* 44:188-190, 1979.
- Nayler, W.G.: *The role of calcium in the ischemic myocardium. Am. J. Pathol.*, 102:262-270, 1981.
- Wildenthal, K.: *Lysosomal alterations in ischemic myocardium: results or cause of myocellular damage? J. Mol. Cell. Cardiol.*, 10:595-603, 1978.
- Chien, K.R., Reeves, J.P., Buja, L.M., Bonte, E., Parkey, R.W., Willerson, J.T.: *Phospholipid alterations in canine ischemic myocardium. Temporary and topographical correlations with Tc-99 on PPI accumulation and an in vitro sarcolemmal Ca⁺⁺ permeability defect. Cir. Res.*, 48:711-719, 1981.
- Hess, N.L., Manson, N.H.: *Molecular oxygen: Friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 16:969-985, 1984.
- Simpson, P.J., Lucchesi, B.R.: *Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. J. Lab. Clin. Med.*, 110:13-30, 1987.
- Kellog, E.W., Fridovich, I.: *Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide hydrogen peroxide. J. Biol. Chem.*, 252:6721-6728, 1977.
- Kim, H.W., Chung, M.H., Kim, M.S., Park, C.W.: *A study on the mechanism of calcium binding inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum by oxygen free radicals. Korean. J. Pharmacol.*, 21:79-89, 1985.
- Levelle, F., Michelson, A.M., Dimitrijevic, L.: *Biological protection by superoxide deismutase. Biochem. Biophys. Res. Comm.* 55:350-357, 1973.
- McCord, J.M.: *Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. Science.*, 185:529-531, 1994
- Demopoulos, H.B., Flamm, E.S., Pietronigro, D.D., Seligman, M.L.: *The Free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. Acta physiol. scand.* 492(suppl): 91-120, 1980.
- Adkison, D., Hollwarth, M.E., Benoit, J.N., Parks, D.A., McCord, J.M., Granger, D.N.: *Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. Acta. Physiol. Scand.*, 548:9-37, 1986.
- Granger, D.N., Parks, D.A.: *Role of oxygen radicals in the pathogenesis of intestinal ischemia. The physiologist.*, 26:159-164, 1983.
- Trush, M.A., Mimnaugh, E.G., Gram, T.E.: *Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. Biochem. Pharmacol.* 31:3335-3346, 1982.
- McCord, J.M., Wong, K.: *Phagocyte-produced free radicals: roles in cytotoxicity and inflammation. Ciba foundation symposium 65(new series).*, 1979.
- McCord, J.M., Wong, K.: *Phagocyte-produced free radicals: roles in cytotoxicity and inflammation. Ciba foundation symposium 65(new series).*, 1979.
- Smith, L., Rose, M.S., Wyatt, I.: *The pathology and biochemistry of paraquat. Ciba foundation symposium 65(new series).*, 321-341, 1979.
- Sohal, R.S.: *Metabolic rate, free radicals, and aging. Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease. Ed. D. Armstrong et al., Raven Press, New York.*, pp.119-127, 1984.
- Gaudel, Y., Duvelleroy, M.A.: *Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 16:459-470, 1984.
- Guarnieri, C., Flamigni, F., Calderera, L.M.: *Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12:797-808, 1980.
- Shlafer, M., Kane, P.F., Wiggins, V.Y., Kirsh, M.M.: *Possible role of cytotoxic oxygen metabo-*

- lites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury. Circul., 66:185-192, 1982.*
25. Kim, M.S., Akera, T.: *O₂ free radicals: Cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺, K⁺ – ATPase. Am. J. Physiol., 252:H252-H257, 1987.*
 26. Bovaris, A., Chance, B.: *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide, Biochem. J., 134:707-716, 1973.*
 27. Otani, J., Tanaka, H., Inoue, T.: *In vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury. Cir. Res., 55:168-175, 1984.*
 28. Jolly, S.R., Kane, W.J., Hook, B.G., Abrams, G.D., Kunkel, S.L., Lucchesi, B.R.: *Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. Am. Heart. J., 112:682-690, 1986.*
 29. Romson, J.L., Hook, B.G., Kunkel, S.L., Abrams, G.D., Schork, M.A., Lucchesi, B.R.: *Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. Circulation., 67:1016-1023, 1983.*
 30. Rao, P.S., Cohen, M.V., Mueller, H.S.: *Sequential transcatheter changes in free radicals, catecholamines and lipid peroxides in early experimental myocardial ischemia. In Oxy Radicals and Their Scavenger Systems. Vol II. edited by Greenwald RA and Cohen G. Elsevier., pp.357-360, 1983.*
 31. Singal, P.K., Beamish, R.E., Dhalla, N.S.: *Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. In Myocardial Injury, edited by Spitzer JJ, Plenum Publishing Co., N.Y., pp.391-401, 1983.*
 32. Egan, L.R., Gale, P.H., Kuehl, F.A.: *Reduction of hydroperoxides in the prostaglandin biosynthetic pathway by a microsomal peroxidase. J. Biol. Chem., 254:3295-3302, 1974.*
 33. Jarasch, E.D., Grund, C., Bruder, G., Heid, H.W., Keenan, T.W., Franke, W.W.: *Localization of xanthine oxidase in mammary gland epithelium and capillary endothelium. Cell., 25:67-82, 1981.*
 34. Hille, R., Massey, V.: *Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase. J. Biol. Chem., 256:9090-9095, 1981.*
 35. Krenitsky, T.A., Tuttle, J.V.: *Xanthine oxidase activities: Evidence for two catalytically different types. Arch. Biochem. Biophys., 185:370-375, 1978.*
 36. Waud, W.R., Brady, F.O., Wiley, R.D.: *Rajagopalan, R.D. A new purification procedure for bovine milk xanthine oxidase: effect of proteolysis on the subunit structure. Arch. Biochem. Biophys., 169:695-701, 1975.*
 37. Kaminski, Z.W., Pohorecki, R., Ballast, L.L., Domino, Z.F.: *Three forms of xanthine: acceptor oxidoreductase in rat heart. Cir. Res., 59:628-632, 1986.*
 38. Hearse, D.J., Manning, A.S.: *Downey, J.M., Yellon, D.M.: Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion? Acta. Physiol. Scand., 548(suppl):65-78, 1986.*
 39. Myers, C.L., Weiss, S.J., Kirsh, M.M., Shlafer, M.: *Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the oxygen paradox: Reduction of creatine kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine, but not by superoxide dismutase. J. Mol. Cell. Cardiol., 17:675-684, 1985.*
 40. Battelli, M.G., Dellacorte, E., Stripe, F.: *Xanthine oxidase type D(Dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat. Biochem. J., 126:747-749, 1972.*
 41. McCord, J.M., Roy, R.S.: *The pathophysiology of superoxide: role in inflammation and ischemia. Can. J. Physiol. Pharmacol., 60:1346-1352, 1982.*
 42. Forster, G., Bernt, E., Bergmeyer, H.U.: *Creatine phosphokinase determination with creatine phosphate as substrate. In Methods Enzymatic Analysis. Vol. II, 2nd Ed, Edited by H.U. Bergmeyer, Academic Press, New York, pp.789-793, 1974.*
 43. Yagi, K.: *Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In Lipid peroxides in Biology and Medicine. Academic Press, New York, pp.223-242, 1982.*
 44. Placer, Z.A., Cushman, L.L., Johnson, B.C.: *Estimation of product of lipid peroxidation(malonyl dialdehyde) in biochemical system. Anal. Biochem., 16:359-364, 1966.*
 45. Salin, M.L., McCord, J.M.: *Superoxide dismutase in polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest., 54:1005-1009, 1974.*
 46. DellaCorte, E., Stirpe, F.: *The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from de-*

- hydrogenase(Type D) into oxidase(Type O) and purification of the enzyme. *Biochem. J.*, 126:739-745, 1972.
47. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: *Protein measurement with Folin phenol reagent.* *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
 48. Kaminski, Z.W., Jezewska, M.M.: *Intermediate dehydrogenase-oxidase from of xanthine oxidoreductase in rat liver.* *Biochem J.*, 181:177-182, 1979.
 49. Meerson, F.Z., Gagan, V.E., Kozlow, Y.P., Belkin, L.M., Arkipenko, Y.V.: *The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart.* *Basic Res. Cardiol.*, 77:465-480, 1982.
 50. Stirpe, F., DellaCorte, E.: *The regulation of rat liver xanthine oxidase.* *J. Biol. Chem.* 244:3855-3863, 1969.
 51. Reimer, K.A., Jennings, R.B.: *Failure of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol to limit infarct size after ischemia and reperfusion in dogs.* *Circulation.*, 71:1069-1075, 1985.
 52. Hille, R., Massey, V.: *Tight-binding inhibitors of xanthine oxidase.* *Pharmac. Ther.*, 14:249-263, 1981a.
 53. Spector, T.J., Johns, D.J.: *Stoichiometric inhibition of reduced xanthine oxidase by hydroxypyrazolo(3,4-d) pyrimidines.* *J. Biol. Chem.*, 245:5079-5085, 1970.
 54. Massey, V., Komai, H., Palmer, G., Elion, G.B.: *On the mechanism by allopurinol and other pyrazolo(3,4-d) pyrimidines.* *J. Biol. Chem.*, 245:2837-2844, 1970.
 55. Chambers, D.E., Parks, D.A., Patterson, G., Roy, R., McCord, J.M., Yoshida, S., Parmley, L.F., Downey, J.M.: *Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia.* *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 17:145-152, 1985.
 56. Battelli, M.G., Lorenzoni, E., Stirpe, F.: *Milk xanthine oxidase type D(Dehydrogenase) and type o(Oxidase). Purification, interconversion and some properties.* *Biochem. J.*, 131:191-198, 1973.
 57. Waud, W.R., Rajagopalan, K.V.: *The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase from an NAD⁺-dependent form(Type D) to an O₂-dependent form(Type O).* *Arch. Biochem. Biophys.*, 172:365-379, 1976.
 58. Schwartz, A., Wood, J.M., Allen, J.C.: *Biochemical and morphological correlates of cardiac ischemia.* *Am. J. Cardiol.*, 32:46-61, 1973.
 59. Ferrari, R., Albertini, A., Curello, S.: *Myocardial recovery during post-ischemic reperfusion: effects of nifedipine, calcium, and magnesium.* *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 18:487-498, 1986.
 60. Nayler, W.G., Gordon, M., Stephens, D.J.: *The protective effect of prazosin on the ischemic and reperfused myocardium.* *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 17:685-699, 1985.
 61. Sashida, H., Abiko, Y.: *protective effect of diltiazem on ultrastructural alterations induced by coronary occlusion and reperfusion in dog hearts.* *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 18:401-411, 1986.
 62. Koomen, J.M., Schevers, A.M., Noordhoek, J.: *Myocardial recovery from global ischemia and reperfusion: effects of pre-and/or post-ischemic perfusion with low Ca⁺⁺.* *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 15:383-392, 1983.
 63. Kuroda, H., Ishiguro, S., Mori, T.: *Optimal calcium concentration in the initial reperfusate for post-ischemic myocardial performance(calcium concentration during reperfusion).* *J. Mol. Cell. Cardiol.* 18:625-633, 1986.
 64. Park, J.W., Kim, M.S., Park, C.W.: *Role of calcium in reperfusion damage of ischemic myocardium: Influence on oxygen radical production.* *Korean J. Toxicol.*, 4:23-35, 1988.
 65. Jones, L.P., Wegener, A.D.: *Characterization of Ca⁺⁺ and calmodulindependent protein kinase activity in sarcoplasmic reticulum.* *Fed. Proc.*, 40:1738(abstract), 1981.
 66. Toyooka, T., Masaki, T.: *Calcium-activated neutral protease from bovine ventricular muscle: Isolation and some of its properties.* *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11:769-786, 1979.