

관상동맥우회술시 심근허혈후 재관류에 의한 활성산소 방어효소계의 변화

김응중* · 김기봉** · 박종원*** · 김명석*** · 노준량**

=Abstract=

Changes in the Myocardial Antioxidant Enzyme System by Post-Ischemic Reperfusion During Coronary Artery Bypass Operations

Eung-Joong Kim, M.D.* , Ki-Bong Kim, M.D.** , Jong-Wan Park, M.D.***
Myung-Suk Kim, M.D.***, Joon-Ryang Roh, M.D.**

Oxygen free radicals and their metabolites have been implicated as possible causes of reperfusion injury in animal models. Their role in the clinical setting is still controversial. The aim of this study was to evaluate the degree of tissue damage, oxidative stress, and changes in the antioxidant enzyme system in patients undergoing coronary artery bypass graft operations(CABG) with myocardial protection by cold blood cardioplegia.

In patients undergoing CABG(n=10), the levels of lactate dehydrogenase(LDH), creatine phosphokinase MB fraction(CK-MB), and malondialdehyde(MDA) were measured in the coronary sinus effluent before aortic cross clamping and 20 minutes after reperfusion. At the same time, the myocardial tissue activities of superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GSHPx), glutathione reductase (GSSGRd), and glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH) were determined in the right atrial auricle excised before aortic cross clamping and in the left atrial auricle excised 20 minutes after reperfusion.

The levels of LDH(268 ± 40.3 to 448 ± 84.9 U/ml plasma), CK-MB(4.50 ± 2.33 to 27.1 ± 13.5 U/ml plasma), MDA(5.87 ± 2.02 to 10.5 ± 2.23 nmol/ml plasma), SOD(13.5 ± 4.04 to 20.7 ± 8.56 U/mg protein), GSHPx(279 ± 37.2 to 325 ± 51.4 U/mg protein) and GSSGRd(97.2 ± 15.9 to 122 ± 25.1 mU/mg protein) increased significantly after reperfusion($p < 0.05$). There were no significant changes in CAT and G6PDH levels. Western blot analysis was performed to study the induction of antioxidant enzyme and demonstrated increased amount of Cu,Zn-SOD.

* 한림대학교 의과대학 흉부외과학교실

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

** 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실

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

*** 서울대학교 의과대학 약리학교실

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

@ 본 논문은 1995년 제 27차 대한흉부외과학회에서 구연되었음.

@ 본 논문은 1994년도 한국학술진흥재단 자유공모과제 지원사업의 일부지원에 의하여 이루어졌음.

논문접수일: 96년 3월 22일 심사통과일: 96년 5월 7일

책임저자: 김응중, (134-701) 서울시 강동구 길동 445 한림대학교 강동성심병원 흉부외과, Tel.(02) 224-2243, FAX.(02) 488-0114

These data suggest that even though myocardial oxidative stress and tissue damage occur during reperfusion, the endogenous antioxidant enzyme system is also activated to protect the myocardium against the oxidative stress.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996;29:850-60)

Key words: 1. Coronary Artery Bypass
2. Myocardial reperfusion injury
3. Free radical
4. Antioxidant

서 론

심장수술시 상행대동맥차단에 의하여 관상동맥혈류가 차단되는 경우 심근은 비록 여러가지 보호법에 의하여 절대적인 허혈상태에 빠지지는 않지만 산소공급량과 소모량의 차이로 인하여 상대적인 허혈상태에 빠지게 되며 이로 인한 심근손상은 허혈시간의 경과에 따라 역동적으로 진행된다. 따라서 이러한 허혈성 심근손상을 줄이고 심실기능의 회복을 위해서는 가능한 한 빠른 시간내에 심근의 재관류를 시켜야 한다. 그러나 심근의 재관류는 허혈상태가 장시간 진행된 후에는 유효한 효과를 가져오지 못할뿐 아니라 오히려 허혈심근의 생화학적, 구조적 변화를 악화시킴으로써 부정맥을 유발하거나 심실의 기능부전을 초래할수 있고 경우에 따라서는 심근세포에 비가역적인 손상을 유발하여 심실기능의 회복에 악영향을 미칠수도 있다¹⁻³⁾. 이러한 심장의 재관류손상은 물론 허혈 그 자체와도 밀접한 연관이 있지만 재관류에 의하여 유발되는 다른 요인이 더욱 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있으며⁴⁾ 이의 병태생리 기전에 대해서는 몇가지 가설들이 제시되고 있으나 아직 완전히 이해되고 있지는 못한 상황이다. 현재까지 제시되고 있는 재관류손상의 병태생리 기전으로는 칼슘의 과다한 세포내 유입, 활성산소에 의한 산화반응, Prostaglandin의 생합성 증가, 혈관내피 손상에 따른 혈류저하, 백혈구의 활성화 증가에 따른 염증반응 등이 있는데 이러한 것들은 각자 단독으로 작용하기보다는 상호작용함으로써 심근의 재관류손상을 야기하는 것으로 추정되고 있다⁵⁾.

심근조직의 허혈로 인하여 세포내에 각종 환원물질이 축적된 상태에서 재관류에 의하여 산소가 재공급될 경우 superoxide anion 등 활성산소의 발생이 증가하며 이러한 활성산소의 증가는 재관류손상을 일으키는 중요한 요소로 알려져 있다. 활성산소(superoxide anion, O₂⁻, hydrogen peroxide, H₂O₂; hydroxyl radical, OH·; singlet oxy-

gen, ¹O₂, etc.)란 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 지닌 산소 free radical 및 이것으로부터 유래된 일군의 산소대사물을 일컬으며 이들은 모두 높은 반응성으로 인해 세포막지질의 과산화반응을 일으켜 세포막을 파괴하고 단백질과 핵산의 산화성 변성을 초래하는 등 세포독성을 지니고 있다.

이러한 활성산소는 정상에서도 세포내의 xanthine oxidase system, mitochondria의 전자전달체계, 활성화된 호중구, arachidonic acid 대사경로 등 여러 곳에서 소량이나마 생성되는데 이러한 소량의 활성산소는 내인성으로 존재하는 항산화효소인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 및 reductase 등에 의하여 제거되거나 vitamin C, vitamin E 및 glutathione 등의 저분자량 항산화제에 의하여 그 산화반응이 방지되므로 큰 독작용을 나타내지 못한다. 그러나 허혈심장의 재관류에서와 같이 활성산소의 발생이 방어체계를 능가할 정도로 증가하는 상황에서는 활성산소에 의한 산화반응이 심각한 세포독작용을 나타낼 수 있다^{6,7)}.

허혈성 심근의 재관류손상에 있어서 활성산소의 역할은 동물심장을 이용한 재관류 모델에서 allopurinol과 같은 xanthine oxidase 억제제, superoxide dismutase, catalase 등과 같은 활성산소 제거제 또는 hydroxyl radical 생성을 억제하는 deferoxamine과 같은 철이온 제거제가 세포막지질의 과산화반응을 억제하고 심근보호효과를 나타낸다는 실험적 증거들에 의하여 뒷받침되고 있다^{8,9)}.

한편 실제의 임상상황에서는 실험동물에서와 같이 절대적인 허혈상태가 장시간 유지되는 것이 아니기 때문에 다양한 연구결과들이 나오고 있지만 심장수술시 심근에서의 conjugated diene 등 지질과산화반응 산물의 증가, α-tocopherol 등 활성산소 방어물질의 소모, 그리고 xanthine oxidase 억제제나 hydroxyl radical 제거물질의 심근보호효과 등이 보고됨으로써 활성산소에 의한 산화성 손상의 가능성이 역시 제시되고 있다^{8,9)}. 또한 이와 같은 산화성 손상에 대한 생체의 반응에 있어서도 내인성 항산화제의 감

소 등 항산화 방어능력이 저하한다거나¹⁰⁾, 반대로 활성산소 방어효소의 활성도가 변하지 않거나¹¹⁾ 오히려 증가한다는¹²⁻¹⁴⁾ 다양한 보고들이 있다. 심마비액으로 심근보호를 받는 심장수술의 경우 활성산소 방어효소의 활성도가 증가한다는 보고가 우세한데 이들은 대부분 심마비액으로 결정성 심마비액을 사용하였고 상행대동맥 차단시간 즉 심근허혈시간도 90분 미만의 짧은 시간이었다. 이에 본 연구에서는 결정성 심마비액 대신 혈액 심마비액을 사용한 관상동맥우회술에서 비교적 장시간의 대동맥차단후 재관류에 의한 활성산소 방어효소계의 변화를 관찰하고자 하였다. 먼저 허혈 및 재관류 전후에 관상정맥동으로 환류되는 혈액에서 lactate dehydrogenase(LDH)와 creatine phosphokinase MB 분획(CK-MB)의 활성도를 측정함으로써 허혈후 재관류로 인한 심근손상 정도를 관찰하였고 동시에 지질과산화산물인 malondialdehyde(MDA)의 농도를 역시 재관류 전후의 관상정맥동혈에서 측정하여 활성산소에 의한 산화성 심근손상을 관찰하였다. 또한 재관류 전후에 우심방이와 좌심방이의 일부분을 절제하여 각각에서 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GSHPx), glutathione reductase(GSSGRd), 그리고 glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)의 활성도를 측정 비교하고, 경우에 따라서는 immunoblotting을 시행하여 이들 효소단백의 생성을 측정함으로써 심근허혈후 재관류시 활성산소 방어효소계의 변화를 검토하였다.

연구대상 및 방법

서울대학교병원 흉부외과에서 관상동맥협착증으로 인하여 관상동맥우회술을 시행받는 환자 10례를 대상으로 하였으며 우심방이와 좌심방이의 항산화효소의 활성도가 동일한지를 확인하기 위하여 심방중격결손증과 동맥관개존증으로 개심술을 시행받는 환자 5례를 대조군으로 하였고 모든 대상환자로부터 수술전 혈액 및 심근의 채취에 관한 동의를 얻었다. 대조군 5례의 남녀비는 2:3이었고 연령은 27.5 ± 12.0 세(19~46세)이었으며 관상동맥우회술군 10례의 남녀비는 5:5이었으며 연령은 58.0 ± 6.70 세(48~65세)이었다. 관상동맥우회술군 환자들의 원위부위 문합수는 3.9 ± 0.7 개(3~5개)이었으며 근위부위 및 원위부위 문합에 필요한 상행대동맥 차단시간은 112 ± 27 분(76~151분)이었다.

대조군 5례에서는 체외순환을 시작하기 전에 우심방이와 좌심방이의 일부를 절제한 후 즉시 생리식염수로 혈액 성분을 씻어내고 액화질소탱크에 넣어 추후 분석할 때까지

-196℃에서 냉동보관하였다. 관상동맥우회술 환자들에서의 수술시 체외순환은 중등도 저체온법과 박성산화기를 이용하여 실시하였으며 심근보호법은 순행성 냉각 혈액 심마비액 주입에 의한 심정지유도와 역행성 냉각 혈액 심마비액 계속주입에 의한 심정지유지의 방법을 사용하였다. 수술시 상행대동맥차단 전에 우심방이를 절제하여 즉시 생리식염수로 혈액성분을 씻어내고 액화질소탱크에 넣어서 추후 분석할 때까지 -196℃에서 냉동보관하였다. 관상동맥우회술시 원위부위문합과 근위부위문합은 모두 상행대동맥차단하에서 실시하였으며 모든 문합이 끝난 후 상행대동맥차단을 풀어 심근의 재관류를 시작하였고 재관류 시작 20분 후에 좌심방이를 절제하여 같은 방법으로 분석할 때까지 냉동보관하였다. 또 상행대동맥차단 전과 심근의 재관류 시작 20분 후에 관상정맥동으로 환류되는 정맥혈을 채취하여 4℃에서 1.000g로 10분간 원심분리한 후 혈장을 추후 분석할 때까지 -70℃에서 냉동보관하였다.

전체적 심근손상의 지표로는 관상정맥동혈로 유출되는 심근내 세포질효소인 lactate dehydrogenase(LDH)와 creatine phosphokinase MB 분획(CK-MB)의 양을 측정하였다. LDH 활성도는 NADH의 산화로 인한 흡광도 감소로 측정하였다. 0.27 mM의 NADH가 포함된 Tris buffer solution(10 mM, pH 9.0) 320 μ l에 혈장 10 μ l를 넣고, pyruvic acid(4 mM)를 포함한 phosphate buffer solution(250 mM, pH 7.1) 80 μ l를 첨가한 후 37℃에서 NADH가 NAD로 산화되는 양을 340nm에서의 흡광도변화로 측정하였으며 1분동안에 NADH가 감소하는 양(μ mol)을 LDH 활성도(U/ml)로 계산하였다. CK-MB의 측정은 NADPH의 생성으로 인한 흡광도의 변화를 측정하여 CK 전체 활성도를 계산한후 전기영동법을 이용하여 CK-MB 분획의 양을 계산하였다. ADP(2.0 mM), AMP(5.0 mM), hexokinase(>2.5 U/ml), glucose(20 mM), G-6-PDH(>2.5 U/ml), NADP(2.0 mM), N-acetyl-L-cysteine(20 mM), di(adenosine-5-) penta-phosphate(10 M), magnesium acetate(10 mM)가 포함된 imidazole-acetate buffer solution(102 mM, pH 6.7) 300 μ l에 혈장 8 μ l를 넣고 creatine phosphate(30 mM), glucose(20 mM), magnesium acetate(10 mM)가 포함된 imidazole-acetate buffer solution 75 μ l를 첨가한후 37℃에서 NADP가 NADPH로 환원되는 양을 340nm에서의 흡광도변화로 측정하였으며 1분동안에 NADPH가 생성되는 양(μ mol)을 CK-MB의 활성도(U/ml)로 계산하였다. 그후 동일한 혈장을 agarose gel을 이용한 전기영동을 실시하여(90V, 20분) isoenzyme을 분리한 후에 CK-MB 분획을 계산하였다.

활성산소로 인한 산화성 심근손상의 지표로 심근조직에

서 관상정맥동혈로 유리되는 지질과산화산물 malondialdehyde(MDA)를 thiobarbituric acid(TBA) 반응법으로 측정하였다. 20% acetic acid 용액(pH 3.5) 0.8ml, 0.6% TBA 용액 1.0ml, 8.1% sodium dodecyl sulfate(SDS) 용액 0.1ml에 혈장 0.1ml를 첨가하여 100°C 수욕조에서 60분간 반응시킨 후 상온에서 식혔다. 그 용액 1ml를 취하여 n-butanol과 pyridine 혼합액(15:1, v/v) 5ml를 첨가하여 4.000 g에서 10분간 원심분리한 후 상층액 1ml를 cuvette에 넣고 532nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 농도(nmol/ml plasma)는 흡광계수 $\epsilon=1.52 \times 10^5 \text{ M/cm}$ 을 이용하여 계산하였다.

활성산소 방어효소계의 측정을 위한 조직균질액의 추출은 다음과 같이 하였다. 먼저 액화질소탱크에 보관한 심방이를 상온에서 녹인 후 조직의 무게(wet weight)를 측정하고 그 4배 용량의 균질화 완충액(0.25M sucrose, 1mM EDTA, 10mM potassium phosphate, pH 7.4)에 넣어 잘게 자른 후 polytron으로 균질화하였다. 그후 균질액을 다시 초음파 조직분쇄기(Sonicator; Heat systems -Ultrasonics Inc., model W-385, output control #4, 10초×5회)로 분쇄하고 10,000g에서 30분간 원심분리한 후 그 상층액을 취하여 각 효소의 활성도를 측정하였다. 위의 모든 조작은 4°C에서 시행하였으며 조직균질액의 단백질농도는 소혈청알부민(bovine serum albumin)을 표준으로 하여 측정하였다.

SOD의 활성도는 SOD에 의해 epinephrine의 자가산화가 억제되는 정도로서 측정하였다. 검체시료 10 μ l와 10mM epinephrine 및 0.1mM EDTA가 포함된 50mM sodium carbonate buffer(pH 10.2, 30°C, 3ml)에서 epinephrine이 adrenochrome으로 자가산화되는 반응이 억제되는 정도를 325nm에서 spectrophotometer로 측정하였으며 epinephrine의 자가산화율을 50% 억제하는 SOD의 활성도를 1 unit로 하여 U/mg protein으로 계산하였다. Mn-SOD 활성도는 반응계에 2mM KCN을 첨가한 상태에서 측정하였고 전체 활성도에서 Mn-SOD 활성도를 뺀 값을 Cu, Zn-SOD 활성도로 계산하였다.

Catalase의 활성도는 과산화수소(H₂O₂)의 소모율을 측정하는 Claiborne의 방법을 변형하여 측정하였다. 검체시료 10 μ l와 30mM 과산화수소가 포함된 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.2, 20°C, 3ml) 반응계에서 catalase에 의하여 과산화수소가 분해되어 흡광도가 감소되는 정도를 240nm에서 spectrophotometer로 측정하였으며 1분 동안에 1 μ mole의 과산화수소를 제거할수 있는 catalase의 활성도를 1 unit로 계산하였다.

GSHPx의 활성도는 tertiary butyl hydroperoxide (t-BOOH)를 기질로 사용한 Del Maestro와 McDonald의 방법으로 측정하였다. 0.5mM EDTA를 포함한 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.2, 37°C, 3ml)에 3mM reduced glutathione, 0.72 unit glutathione reductase, 0.45mM NADPH, 검체시료 5 μ l를 넣고 3.6mM t-BOOH를 추가한 반응계에서 NADPH 산화율의 변화를 340nm에서 spectrophotometer로 측정하였으며 1 μ mole의 NADPH를 1분 동안에 산화시키는 GSHPx의 활성도를 1 unit로 계산하였다.

GSSGRd의 활성도는 Goldberg와 Spooner의 방법을 이용하여 측정하였다. 1mM EDTA가 포함된 50mM sodium phosphate buffer(pH 7.2, 37°C, 3ml)에 0.45mM NADPH, 2.0mM oxidized glutathione(GSSG), 검체시료 100 μ l를 넣고 반응시키면서 340nm에서의 흡광도변화를 관찰하였으며 1분 동안에 NADPH 0.5 μ mole을 소모하는데 필요한 효소의 활성도를 1 unit로 계산하였다.

G6PDH의 활성도는 Deutsch의 방법에 따라 50mM Tris/HCl(pH 7.2), 0.38mM NADP, 6.3mM MgSO₄, 3.3mM glucose 6-phosphate의 3ml 반응계에 검체시료 100 μ l를 넣고 37°C에서의 NADPH 생성량을 340nm에서의 흡광도변화로 측정하였으며 1분 동안에 1 μ mole의 NADPH를 생성할수 있는 효소의 활성도를 1unit로 계산하였다.

Cu, Zn-SOD의 Western blot을 위한 심근의 처리는 다음과 같이 하였다. 심근조직을 SDS 시료용액(2% SDS, 5% mercaptoethanol, 0.125M Tris/HCl, pH 6.8)에 넣고 polytron으로 균질화하였다. 균질액을 100°C에서 5분간 증탕하고 상온에서 100,000g로 1시간 원심분리한 후 상층액을 취하여 BCA 방법으로 단백양을 측정하였다. 10g의 시료단백을 8% discontinuous SDS polyacrylamide gel에 loading하고 bromophenol blue가 gel 하단에 올 때까지 10mA로 전기영동하였다. 전기영동 gel상의 단백질을 nitrocellulose paper(NC)에 10 watts로 6시간 동안 옮긴 다음 5% 소혈청알부민(bovine serum albumin)으로 비특이적 단백질결합을 방지하였다. NC를 primary antibody (sheep anti-human Cu, Zn-SOD Ab)에 2시간 반응시키고 secondary antibody(alkaline phosphatase conjugated anti-sheep IgG antibody)에 1시간 반응시켰다. Alkaline phosphatase는 Bio-Rad사의 premixed substrate kit(5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and nitro blue tetrazolium, # 170-6432)로 발색시켰다.

모든 데이터는 평균±표준편차로 표시하였으며 유의성 검정은 Student's t-test로 실시하여 p값 0.05 미만을 유의성의 한계로 간주하였다.

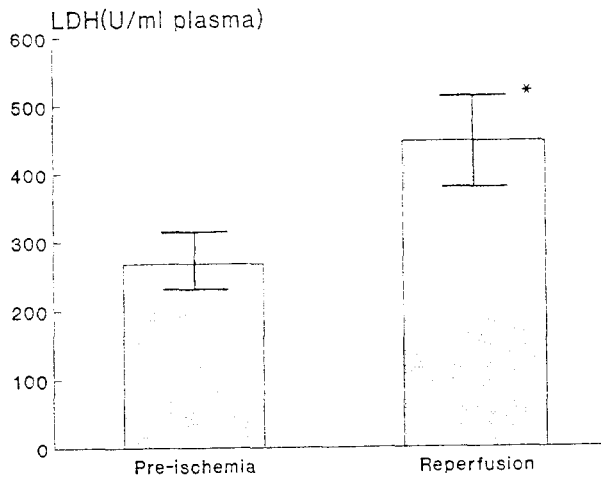


Fig. 1. Change in lactate dehydrogenase(LDH) activity by post-ischemic reperfusion. The activity was measured in the coronary sinus effluent before myocardial ischemia and 20 minutes after myocardial reperfusion. Values are expressed as mean ± standard deviation(n=10).

* p<0.05 versus pre-ischemia

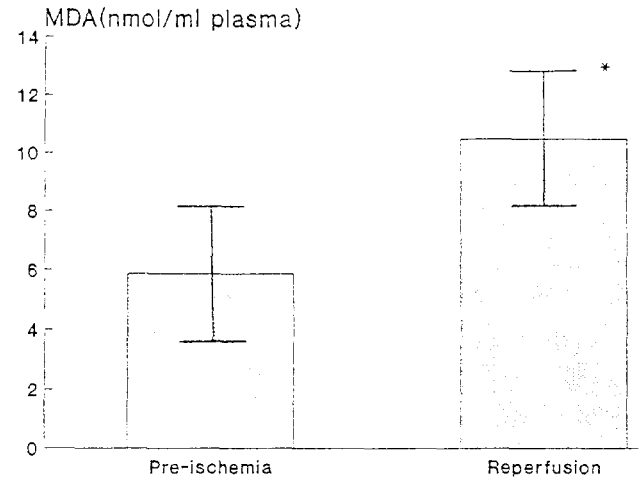


Fig. 3. Change in malondialdehyde(MDA) level by post-ischemic reperfusion. The level was measured in the coronary sinus effluent before myocardial ischemia and 20 minutes after myocardial reperfusion. Values are expressed as mean ± standard deviation(n=10).

* p<0.05 versus pre-ischemia

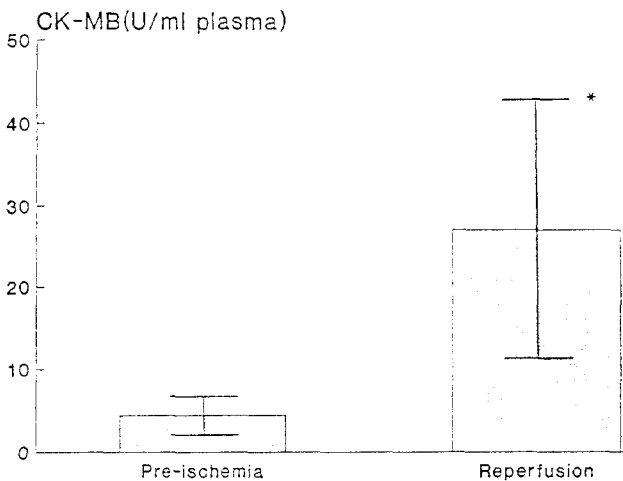


Fig. 2. Change in creatine phosphokinase MB fraction (CK-MB) activity by post-ischemic reperfusion. The activity was measured in the coronary sinus effluent before myocardial ischemia and 20 minutes after myocardial reperfusion. Values are expressed as mean ± standard deviation(n=10).

* p<0.05 versus pre-ischemia

결 과

1. 관상정맥동혈에서 LDH와 CK-MB 활성도의 변화

수술중 심장의 조작으로 인한 심근의 손상 및 허혈성

손상과 재관류에 의한 산화성 손상에 의한 전체적 심근손상의 지표로서 관상정맥동혈 LDH와 CK-MB의 활성도를 측정 비교하였다. LDH의 활성도는 허혈전 268 ± 40.3 U/ml plasma에서 재관류후 448 ± 84.9 U/ml plasma로 유의한(p<0.05) 증가가 있었으며(Fig. 1) CK-MB의 활성도도 허혈전 4.50 ± 2.33 U/ml plasma에서 재관류후 27.1 ± 13.5 U/ml plasma로 유의한(p<0.05) 증가가 있었다(Fig. 2). 따라서 위와 같은 수술조작에 의하여 전체적으로 상당한 정도의 심근손상이 발생했음을 추정할 수 있었다.

2. 관상정맥동혈에서 MDA 농도의 변화

활성산소에 의한 산화성 손상의 정도를 파악하기 위해 관상정맥동혈에서 MDA의 농도를 측정 비교 하였는데 이는 허혈전 5.87 ± 2.02 nmol/ml plasma에서 재관류후 10.6 ± 2.23 nmol/ml plasma로 유의한(p<0.05) 증가가 있었다(Fig. 3). 따라서 전체적 심근손상중 상당한 부분이 산화성 손상이었음을 추정할 수 있었다.

3. 활성산소 방어효소계의 변화

1) 대조군 우심방이와 좌심방이의 효소활성도 비교

심근내 활성산소 방어효소의 허혈 및 재관류에 의한 변화를 측정하기 전에 대조군에서 허혈전 우심방이와 좌심

Table 1. Comparison of antioxidant enzyme activities in the control myocardium of right(RA) and left(LA) auricles before ischemia

		Mean	S.D.	N	P-value
SOD (U/mg prot.)	RA	15.08	1.965	5	n.s.
	LA	15.08	2.982	5	
CAT (U/mg prot.)	RA	23.82	6.483	5	n.s.
	LA	23.40	5.438	5	
GSHPx (mU/mg prot.)	RA	231.3	67.78	5	n.s.
	LA	255.1	54.65	5	
GSSGRd (mU/mg prot.)	RA	91.81	23.13	5	n.s.
	LA	92.07	15.43	5	
G6PDH (mU/mg prot.)	RA	17.33	4.202	5	n.s.
	LA	18.48	5.743	5	

* SOD : superoxide dismutase
 * CAT : catalase
 * GSHPx : glutathione peroxidase
 * GSSGRd : glutathione reductase
 * G6PDH : glucose 6-phosphate dehydrogenase
 * n.s. : not significant

방이의 일부를 절제하여 각 효소의 활성도를 비교한 결과 양심방이 조직에서 모든 활성산소 방어효소의 활성도가 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 1). 따라서 관상동맥 우회술 환자에서 허혈전 우심방이와 재관류후 좌심방이의 효소의 활성도를 비교하여도 큰 무리는 없을 것으로 판단하였다.

2) SOD 활성도의 변화

SOD 활성도는 허혈전 13.5 ± 4.04 U/mg protein에서 재관류후 20.7 ± 8.55 U/mg protein으로 유의한($p < 0.05$) 증가가 있었다(Fig. 4). 그후 남아있는 여분의 심근을 이용하여 Mn-SOD와 Cu, Zn-SOD의 활성도를 각각 측정된 결과 Cu, Zn-SOD 활성도는 허혈전 10.5 ± 1.78 U/mg protein에서 재관류후 14.8 ± 4.55 U/mg protein으로 유의한($p < 0.05$) 증가를 보였으나 Mn-SOD 활성도는 허혈전 1.75 ± 0.90 U/mg protein에서 재관류후 2.14 ± 0.88 U/mg protein으로 유의한 증가를 보이지 않아 SOD 활성도의 증가는 주로 Cu,Zn-SOD 활성도의 증가로 인한 것임을 알수 있었다(Fig. 5).

3) Catalase 활성도의 변화

Catalase 활성도는 허혈전(23.1 ± 5.67 U/mg protein)과 재관류후(23.5 ± 8.96 U/mg protein)에 유의한 차이가 없었

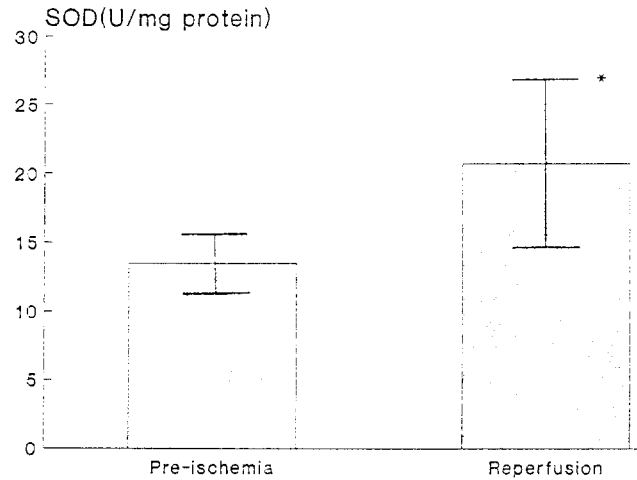


Fig. 4. Change in superoxide dismutase(SOD) activity by post-ischemic reperfusion. The activity of SOD was measured in the right atrial auricle excised before myocardial ischemia and in the left atrial auricle excised 20 minutes after myocardial reperfusion. Values are expressed as mean \pm standard deviation(n=10).

* $p < 0.05$ versus pre-ischemia

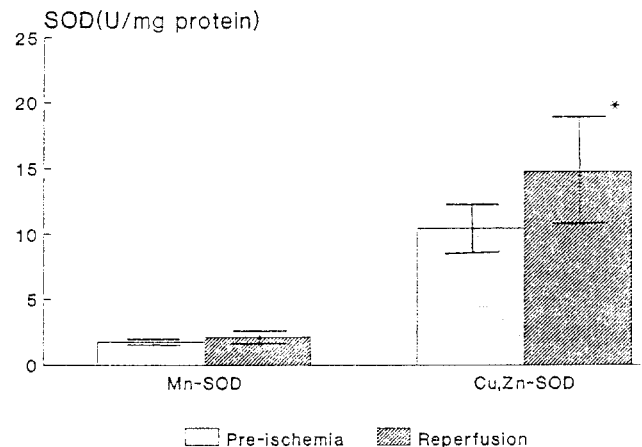


Fig. 5. Change in manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) and copper-zinc superoxide dismutase(Cu, Zn-SOD) activities by post-ischemic reperfusion. The activities were measured in the right atrial auricle excised before myocardial ischemia and in the left atrial auricle excised 20 minutes after myocardial reperfusion. Values are expressed as mean \pm standard deviation(n=10).

* $p < 0.05$ versus pre-ischemia

다(Fig. 6).

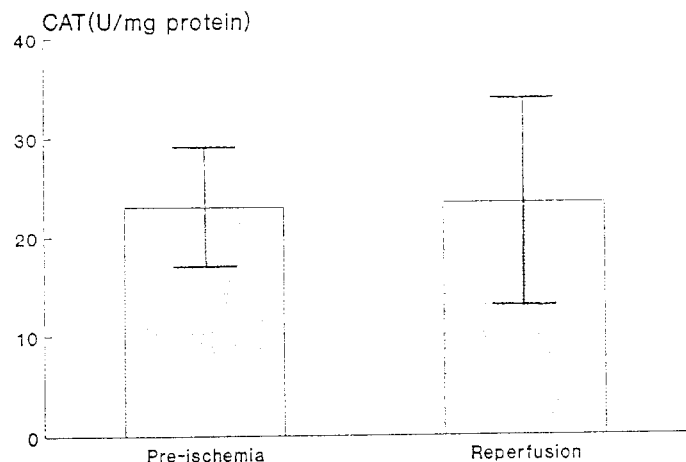


Fig. 6. Change in catalase(CAT) activity by post-ischemic reperfusion. The activity of CAT was measured in the right atrial auricle excised before myocardial ischemia and in the left atrial auricle excised 20 minutes after myocardial reperfusion. Values are expressed as mean \pm standard deviation(n=10).
* p<0.05 versus pre-ischemia

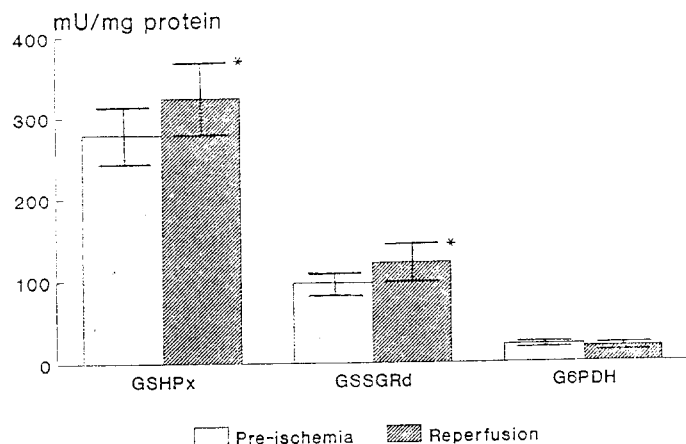


Fig. 7. Changes in glutathione peroxidase(GSHPx), glutathione reductase(GSSGRd) and glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH) activities by post-ischemic reperfusion. The activities were measured in the right atrial auricle excised before myocardial ischemia and in left atrial auricle excised 20 minutes after myocardial reperfusion. Values are expressed as mean \pm standard deviation(n=10).
* p<0.05 versus pre-ischemia

4) GSHPx, GSSGRd, G6PDH 활성도의 변화

GSHPx와 GSSGRd의 활성도는 각각 허혈전 279 ± 37.2 mU/mg protein과 97.2 ± 15.9 mU/mg protein에서 재관류

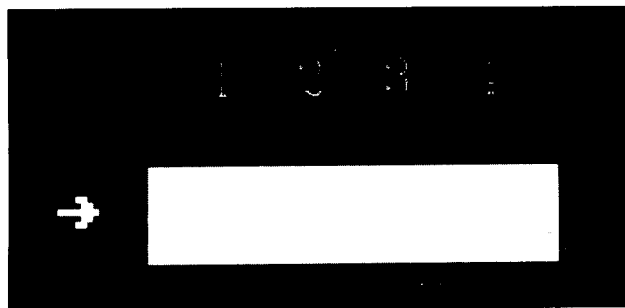


Fig. 8. Western blot analysis for copper-zinc superoxide dismutase(Cu, Zn-SOD).
Lane 1, 3 = Right atrial auricle excised before ischemia
Lane 2, 4 = Left atrial auricle excised 20 minutes after reperfusion

후 325 ± 51.4 mU/mg protein과 122 ± 25.1 mU/mg protein으로 유의한(p<0.05) 증가가 있었으나 G6PDH의 활성도는 허혈전(21.8 ± 4.92 mU/mg protein)과 재관류후(18.6 ± 5.17 mU/mg protein)에 유의한 차이가 없었다(Fig. 7).

5) SOD의 Western blot

활성산소의 제거에 일차적으로 작용하며 허혈후 재관류에 의하여 활성도의 유의한 증가를 보인 Cu, Zn-SOD에 대한 Western blot을 실시하였는데 그 결과 허혈 및 재관류 후의 좌심방이 조직에서 Cu, Zn-SOD의 단백질발현이 증가하였다(Fig. 8). 따라서 효소의 활성도 증가는 비활성 효소의 활성화가 아닌 새로운 효소단백질의 생성에 의한 것임을 알수 있었다.

고 찰

활성산소(Reactive oxygen species)란 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 지닌 산소 free radical 및 이것으로부터 유래된 일군의 산소대사물을 일컬으며 이들은 모두 반응성이 높다는 것이 공통적인 특징이다. Free radical은 화학적으로 불안정하여 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 잃거나 혹은 주위로부터 전자 하나를 더 얻어 보다 안정된 상태로 가려는 성질을 가지고 있는데 이때 주위의 화합물로부터 쉽게 전자의 수수가 일어나기 때문에 이들은 높은 반응성을 나타내는 것이다. 산소분자는 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 2개나 지니고 있음에도 불구하고 "spin restriction"이라는 현상에 의하여 안정상태를 유지하며 정상상태에서는 미토콘드리아 전자전달체계의 최종단계에서 전자수용체로서 4개의 전자를 동시에 받아들여 2분자의 물로 4가환원

(tetravalent reduction)된다. 그러나 정상이 아닌 상태에서는 여러 원인에 의하여 산소분자가 4가환원 대신 전자 하나를 받아들여 일가환원(univalent reduction)이 됨으로써 활성산소의 생성이 증가하는데 대표적인 활성산소로는 superoxide anion($O_2^{\cdot-}$), perhydroxy radical(HO_2^{\cdot}), 과산화수소(H_2O_2), hydroxyl radical(HO^{\cdot}) 등이 있다.

심근 허혈후 재관류시 활성산소의 발생이 증가하는 기전으로는 허혈에 의한 xanthine oxidase system의 활성화, mitochondria의 전자전달체계로부터 전자의 누출, 호중구의 활성화, arachidonic acid 대사의 cyclooxygenase pathway 등을 들 수 있다. 인공심폐기를 이용한 심장수술시에는 이러한 심근의 허혈후 재관류 뿐만 아니라 인공심폐기 자체에 의해서도 호중구의 활성화 등을 통하여 활성산소가 생성되는 것으로 알려져 있다^{8,15}.

활성산소는 높은 반응성으로 인해 또다른 활성산소의 생성을 촉진하고 세포막지질의 과산화반응을 일으켜 세포막에 손상을 주고 단백질이나 핵산의 변형을 초래할 뿐 아니라 칼슘전달체계의 방해, complement와 호중구의 활성화 등을 통하여 세포독성을 나타낸다. 활성산소에 의한 세포손상의 기본 병태생리 가운데 가장 중요한 것은 지질과산화반응으로 활성산소에 의한 세포손상의 정도를 판단하기 위해서는 지질과산화반응의 산물인 diene conjugate, malondialdehyde(MDA), fluorescent chromolipid 등을 측정하는 것이 보통이다. 이들중 어떤 것을 측정할 것인가는 각각의 상황에 따라 다르겠지만 그중 conjugated diene은 재관류의 초기상태를 대변하며 지질과산화물을 직접 측정한다는 장점이 있고 fluorescent chromolipid는 재관류의 만기상태를 대변하는 물질로 혈액 외에 소변에서도 측정할 수 있다¹⁶. 한편 MDA는 활성산소에 의한 지질과산화반응의 특이산물은 아니지만 측정이 비교적 쉽고 민감하므로 전통적으로 가장 많이 이용되며 본 연구에서와 같이 thiobarbituric acid(TBA)와의 반응으로 측정할 수도 있고 high pressure liquid chromatography(HPLC) 방법으로 측정할 수도 있다¹⁷. MDA는 조직 및 혈액이나 기타 체액에서 측정이 가능한데 본 연구에서와 같은 심장수술의 경우 만일 전신순환혈액에서 MDA 농도를 측정한다면 인공심폐기 자체에 의한 산화반응으로 심근 이외의 여러 곳에서 유리된 MDA까지 같이 측정될 수 있기 때문에 심근의 산화성 손상을 보기 위해서는 꼭 심근을 관류한 관상정맥동혈에서 측정하든지 관상정맥동혈과 기타 다른 곳에서의 측정치를 비교하여야 한다^{16,18}. 본 연구에서 관상정맥동으로 환류되는 혈액에서의 재관류후 MDA 농도가 허혈전에 비하여 현저하게 증가한 사실은 심장내에서 허혈후 재관

류에 의해서 활성산소에 의한 지질과산화반응이 현저하게 발생했음을 대변한다고 할 수 있다.

생체에는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GSHPx) 등 활성산소를 제거하는 항산화효소계, glutathione, vitamin C, vitamin E 등의 비효소 항산화물질, 그리고 활성산소에 의해 손상된 생체조직을 수리하는 체계 등 여러가지 항산화 방어기전이 내인성으로 존재하는데 그중 활성산소를 제거하는 항산화효소들이 가장 중요한 방어계라 할 수 있다. SOD는 각종 세포에 널리 존재하는 효소로서 산소의 일가환원에 의하여 생성된 superoxide anion($O_2^{\cdot-}$)을 과산화수소(H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하며 이때 생성된 과산화수소는 catalase 및 GSHPx에 의하여 제거된다. Catalase는 과산화수소를 물과 산소로 분해하며 GSHPx는 환원형 glutathione(GSH)을 전자의 근원지로 사용하여 과산화수소를 물로 변화시킨다($2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$). GSHPx는 과산화수소 외에도 지질의 과산화반응으로 생성되는 유독성 지질과산화물(lipid peroxide, LOOH)같은 유기과산화물을 알콜로 환원시켜 무독화한다($2GSH + LOOH \rightarrow GSSG + LOH + H_2O$). 한편 GSH는 전자공급원으로서 GSHPx의 기질이 될뿐 아니라 electrophilic 독성물질과 비효소적으로 쉽게 반응하여 주요 단백질 및 핵산에 대한 이들의 산화성 공격을 막아주는 역할도 하는 중요한 저분자량 항산화물질의 하나이다. 이러한 GSH는 산화형 glutathione(GSSG)이 NADPH와 glutathione reductase(GSSGRd)에 의하여 환원되므로써 재공급되며($GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$) 이때 NADPH는 glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH) system에 의하여 제공된다.

실험동물에서는 허혈 및 재관류후 활성산소 방어효소의 활성도가 감소하거나^{19,20} 의미있는 변화가 없다는²¹ 보고들이 대부분이다. 그러나 실제 임상에서의 연구결과들은 다양한 결과를 보여주고 있다. Ferreira 등¹⁰은 관상동맥우회술을 시행받는 환자에서 심근재관류 초기 10분에 심근의 항산화 능력이 떨어지는 것을 보고하였으며, Weisel 등¹¹은 관상동맥우회술을 시행받는 환자에서 재관류후에 심근내의 주요 항산화제인 α -tocopherol의 농도가 감소하는 것을 관찰하였고, Coghlan 등²²도 심근재관류 후에 vitamin E가 심근에서 혈액으로 유출되는 것을 관찰함으로써 심근의 항산화능력 감소와 이로 인한 심근손상의 가능성을 추정하였다. 한편 Teoh 등¹¹은 활로써 4징증 교정수술 및 관상동맥우회술을 시행받는 환자들에서 SOD, catalase, GSHPx 등의 활성도 변화를 관찰한 결과 재관류

전후에 이러한 활성산소 방어효소들의 활성도 변화가 없다고 보고하였다. 그러나 이들은 청색증이 있는 활로씨 4징증 환자와 관상동맥질환 환자간에는 활성산소 방어효소의 활성도와 재관류손상의 민감도에 차이가 있음을 강조하고 있는데 이는 청색증이 있는 활로씨 4징증 환자의 심근이 활성산소에 의한 재관류손상에 더욱 민감할 것이라는 다른 연구결과들^{8, 23)}과도 일치하는 주장이다. 따라서 정상상태 심장에서의 활성산소의 역할과 활성산소 방어효소의 변화 등을 분석하기 위해서는 청색증으로 인하여 근본적인 차이가 있는 심장보다는 그러한 기형이 없는 심장을 택하는 것이 더욱 타당할 것이다. 한편 Aceto 등¹²⁾은 개심술을 시행받는 환자의 우심방이에서 재관류 전후의 효소 활성을 비교한 결과 심근내 GSHPx의 활성도는 증가하지 않으나 GSSGRd나 glutathione transferase의 활성도는 변화가 없다고 보고하였으며, Kim 등¹⁴⁾은 활로씨 4징증을 대상으로 한 연구에서 약 70분간의 허혈후 재관류를 시켰을 경우 심근세포의 세포질 및 미토콘드리아의 SOD, catalase, GSHPx의 활성도가 모두 현저하게 증가함을 관찰하고 이러한 항산화효소계의 활성증가는 심근손상의 감소에 기여할 것이라고 주장하였다. 한편 Mezzetti 등¹³⁾은 결정성 심마비액을 사용한 심근보호법을 이용하여 관상동맥우회술을 시행받는 환자의 경우 대동맥차단시간이 40분 이하일 경우에는 SOD, catalase, GSHPx 등의 활성도에 변화가 없으나 대동맥차단시간이 40분 이상일 경우에는 의미있게 증가한다고 보고하였다.

대부분의 심장수술에서는 수술도중 허혈 및 재관류가 시행되므로 활성산소의 생성이 증가되고 따라서 활성산소 방어계의 변동이 있을 것으로 유추되며 또한 인공심폐기를 이용한 체외순환 자체로 인하여 보체 중개성 호중구의 활성화로 활성산소가 생성되고 lactoferrin의 유리로 hydroxyl radical 생성을 촉매하는 철성분이 증가하기도 한다²⁴⁾. 또한 대부분의 심장수술에서 상행대동맥차단으로 심근의 허혈상태가 유도된 상태에서도 noncoronary collateral에 의한 심근관류와 심마비액의 주입 등에 의하여 소량이거나 지속적인 산소공급이 이루어지므로 활성산소의 생성이 일어날 수도 있다. 본 연구에서는 상행대동맥차단기간 도중에 심근보호를 위하여 혈액심마비액을 계속 주입하고 있었으므로 허혈손상은 극소화할 수 있었지만 활성산소의 발생은 계속되었을 것으로 유추할 수 있다. 이러한 본 연구와 같은 상황에서 상행대동맥차단에 따른 허혈시에 생긴 변화와 허혈후 재관류시에 생긴 변화를 구별하기 위해서는 혈액 및 심근의 채취를 허혈전, 허혈후 재관류 직전, 그리고 재관류후에 각각 시행하여야겠지한 허혈후 재관류

직전에는 관상정맥동으로의 혈액환류가 존재하지 않으므로 이론상 불가능하며 또한 이 시기는 수술조작상이나 심근채취부위의 제한성 등으로 인하여 심근채취가 어렵기 때문에 혈액 및 심근의 채취를 시행하지 않았다.

본 연구에서 평균 110분 정도(76~151분)의 상행대동맥차단후 재관류를 시행한 결과 catalase를 제외한 SOD, GSHPx와 GSSGRd의 활성도 증가가 관찰되었는데 이는 Mezzetti 등의 결과와 유사한 소견으로서 본 연구에서도 심근허혈이 장시간에 걸쳐 지속되었기 때문이라 여겨진다. 또한 본 연구에서는 허혈후 재관류시 심근조직의 SOD 중 Mn-SOD에 비하여 Cu, Zn-SOD의 증가가 더욱 현저하였는데 이 역시 Mezzetti 등의 연구에서와 유사한 결과이다. 그러나 Mezzetti 등의 연구결과와는 달리 catalase의 활성증가는 없었는데 catalase의 심장분포가 높지 않을뿐 아니라 이 효소의 대부분이 peroxisome 내에 존재한다는 사실을 고려한다면 catalase는 심장의 산화성 손상에 대한 방어작용에 있어서 큰 역할을 하지 않을 것으로 추정할 수도 있겠으나 단언을 내릴 수는 없겠다. 이와 같은 활성산소 방어효소의 활성증가에도 불구하고 CK-MB, LDH, MDA의 농도가 증가한 것으로 보아 심근손상의 정도가 약화될 수는 있었겠지만 활성산소에 의한 심근손상이 완전히 방지될 수는 없었던 것으로 추정된다.

이와 같은 활성산소 방어효소 활성도의 증가가 어떤 기전에 의해서 나타났는지는 아직 확실치 않다. 효소가 어떤 자극에 의해서 새로이 생성이 되었는지, 효소단백의 구조적 변형에 의하여 활성화되었는지, 효소의 내인성 억제제 제거됨으로써 활성화되었는지, 또는 기타 어떤 알려지지 않은 다른 기전이 작용했는지는 아직 밝혀진 바가 없다. 본 연구에서는 허혈후 재관류시 그 활성증가가 가장 현저한 Cu, Zn-SOD에 대한 immunoblotting을 실시하여 단백질 생성의 발현여부를 검토한 결과 이 효소의 단백질량이 증가하여 있음을 관찰하였다. 따라서 허혈 및 재관류에 의하여 생성된 활성산소 등의 자극에 의하여 효소단백질이 새로이 생성되었다는 것은 추정할 수 있지만 과연 어떤 신호전달 과정을 경유하여 2시간 정도의 비교적 짧은 시간에 효소단백질의 생성이 유도되었는지는 확실치 않다. 외부로부터 투여된 과산화수소에 의하여 GSHPx 등이 in vivo에서 유도된다는 것²⁵⁾, E. coli 등의 박테리아에서 60분 정도의 시간에 항산화단백질의 생성이 증가될 수 있다는 보고는 있지만^{26, 27)} 동물세포에서 그렇게 짧은 시간에 효소단백질의 생성이 유도되는지는 확실치 않으며 Li 등²⁸⁾은 활로씨 4징증 환자의 심근세포를 고압산소하에서 배양한 후 최소한 7일이 지나서야 SOD, catalase, GSHPx 등의 활성

도가 증가하는 것을 관찰하고 이러한 효소의 조절은 DNA-RNA 수준에서 알려지지 않은 기전에 의한 것이라고 추정하였다. 한편 격렬한 운동시 심장내에서 활성산소의 생성이 증가하며 그 자극으로 인하여 SOD의 생성이 유도된다는 보고는 있지만^{28,29)} 이러한 증가는 Mn-SOD에 의한 것으로 생각되며 Cu, Zn-SOD는 일반적으로 유도가 되지 않는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 이러한 보고들은 본 연구에서의 2시간이라는 비교적 짧은 시간에 사람의 심장세포 안에서 Cu, Zn-SOD가 유도되었다는 결과와는 일치하지 않는 것으로 이의 정확한 규명을 위해서는 앞으로 계속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구에서는 관상동맥우회술을 시행받는 환자들을 대상으로 하여 심근허혈후 재관류가 일어났을 때 활성산소에 의한 심근손상이 어느 정도 발생하며 또 심근내의 활성산소 방어효소계가 어떠한 변화를 일으키는지를 관찰함으로써 심근허혈후 재관류의 상황에서 활성산소 방어효소계의 역할을 규명하고자 하였다.

심근허혈후 재관류시 CK-MB, LDH, MDA가 현저한 증가하였음을 관찰하여 활성산소에 의한 심근손상이 일어났음을 유추하였다. 그러나 동시에 SOD, GSHPx, GSSGRd 등의 활성산소 방어효소의 활성도가 현저히 증가되어 있음을 관찰하여 비록 활성산소에 의한 심근 재관류손상이 어느 정도 발생하였지만 활성산소 방어효소계의 활성증가에 의하여 상당히 방지되었을 가능성을 추정하였다.

또한 효소단백질의 Western blot에서 Cu, Zn-SOD의 단백질양이 증가한 것으로 볼때 이러한 효소의 활성도 증가가 새로운 효소의 생성에 의한 것임을 추정할수 있지만 활성산소 방어효소 활성도 증가의 확실한 기전에 관해서는 아직 밝혀져 있지 못한 것이 대부분이기 때문에 계속적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Hearse DJ. *Reperfusion of ischemic myocardium*. J Mol Cell Cardiol. 1977, 9: 695-16.
2. Kloner RA. *Does reperfusion injury exist in humans?* J Am Coll Cardiol. 1993, 21: 537-45.
3. Abd-Elfattah AS, Wechsler AS. *Separation between ischemic and reperfusion injury by site specific entrapment of endogenous adenosine and inosine using NBMPR and EHNA*. J Card Surg. 1994, 9(Suppl): 387-96.

4. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. *Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion: Resolved and unresolved issues*. Circulation. 1989, 80: 1115-27.
5. Freeman BA, Crapo JD. *Free radicals and tissue injury*. Lab Invest. 1982, 47: 412-26.
6. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. *Canine myocardial injury: Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase*. Circ Res. 1984, 54: 277-85.
7. Romaschin AD, Rebeyka I, Wilson GJ, Mickle DAG. *Conjugated dienes in ischemic and reperfused myocardium: An in vivo chemical signature of oxygen free radical mediated injury*. J Mol Cell Cardiol. 1987, 19: 289-302.
8. del Nido PJ, Mickle DAG, Wilson GJ, et al. *Evidence of myocardial free radical injury during elective repair of tetralogy of Fallot*. Circulation. 1987, 76(suppl V): V174-9.
9. Weisel RD, Mickle DAG, Finkle CD, et al. *Myocardial free-radical injury after cardioplegia*. Circulation. 1989, 80 (Suppl III) III14-8.
10. Ferreira R, Llesuy S, Milei J, et al. *Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization*. Am Heart J. 1988, 115: 307-12.
11. Teoh KH, Mickle DAG, Weisel RD, et al. *Effect of oxygen tension and cardiovascular operations on the myocardial antioxidant enzyme activities in patients with tetralogy of Fallot and aorta-coronary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1992, 104: 159-64.
12. Aceto A, Mezzetti A, Di Ilio C, et al. *Effect of ischemia-reperfusion on glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione transferase activities in human heart protected by hypothermic cardioplegia*. Free Rad Res Comms. 1990, 8: 85-91.
13. Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico SD, et al. *Myocardial antioxidant defenses during cardiopulmonary bypass*. J Card Surg. 1993, 8: 167-71.
14. Kim KB, Chung HH, Kim MS, Rho JR. *Changes in the antioxidative defensive system during open heart operations in humans*. Ann Thorac Surg. 1994, 58: 170-5.
15. Prasad K, Kalra J, Bharadwaj B, Chaudhary AK. *Increased oxygen free radical activity in patients on cardiopulmonary bypass undergoing aortocoronary bypass surgery*. Am Heart J. 1992, 123: 37-45.
16. Toivonen HJ, Ahotupa M. *Free radical reaction products and antioxidant capacity in arterial plasma during coronary artery bypass grafting*. J Thorac Cardiovasc Surg. 1994, 108: 140-7.
17. Di Pierro D, Tavazzi B, Lazzarino G, Giardina B. *Malondialdehyde is a biochemical marker of peroxidative damage in the isolated reperfused rat heart*. Mol Cell. Biochem. 1992, 116: 193-6.
18. Davies SW, Underwood SM, Wickens DG, Feneck RO, Dormandy TL, Walesby RK. *Systemic pattern of free radical generation during coronary bypass surgery*. Br Heart J. 1990, 64: 236-40.
19. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, et al. *Oxygen-Mediated myo-*

- cardial damage during ischemia and reperfusion: Role of the cellular defences against oxygen toxicity.* J Mol Cell Cardiol. 1985, 17:937-45.
20. Shlafer M, Myers C, Adkins S. *Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia.* J Mol Cell Cardiol. 1987, 19:1195-206.
 21. Subramanian R, Volovsek A, Ho YS. *Lack of change in MnSOD during ischemia/reperfusion of isolated rat heart.* J Mol Cell Cardiol. 1993, 25:1179-86.
 22. Coghlan JG, Flitter WD, Clutton SM, Ilsley CDJ, Rees A, Slater TF. *Lipid peroxidation and changes in vitamin E levels during coronary artery bypass grafting.* J Thorac Cardiovasc Surg. 1993, 106:268-74.
 23. Li RK, Mickle DAG, Weisel RD, et al. *Effect of oxygen tension on the anti-oxidant enzyme activities of tetralogy of Fallot ventricular myocytes.* J Mol Cell Cardiol. 1989, 21:567-75.
 24. Menasche P, Piwinca A. *Free radicals and myocardial protection: A surgical viewpoint.* Ann Thorac Surg. 1989, 47:939-45.
 25. Chaudiere J, Gerard D. *Induction of selenium-glutathione peroxidase by stimulation of metabolic hydrogen peroxide production in vivo.* Bioelectrochem Bioenerget. 1987, 18:247-56.
 26. Christman MF, Morgan RW, Jacobson FS, Ames BN. *Positive control of a regulation for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in Salmonella typhimurium.* Cell. 1985, 41:753-62.
 27. Greenberg JT, Monach P, Chou JH, Josephy D, Demple B. *Positive control of a global antioxidant defense regulation activated by superoxide-generating agents in Escherichia coli.* Proc Natl Acad Sci USA. 1990, 87:6181-5.
 28. Boveris A, Chance B. *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.* Biochem J. 1973, 134:707-16.
 29. Powers SK, Criswell D, Lawler J, et al. *Rigorous exercise training increases superoxide dismutase activity in ventricular myocardium.* Am J Physiol. 1993, 34:H2094-8.
 30. Ji LL, Stratman F, Lardy H. *Antioxidant enzyme system in rat liver and skeletal muscle: Influence of selenium deficiency, acute exercise and chronic training.* Arch Biochem Biophys. 1988, 263:150-60.

=국문초록=

활성산소는 동물실험에서 심근 재관류손상의 중요기전으로 알려져 있으나 실제 임상상황에서의 역할은 아직도 논란이 많다. 본 연구에서는 냉혈 심마비액을 사용한 심근보호법을 이용하여 관상동맥우회술을 시행받는 환자들을 대상으로 하여 심근허혈후 재관류시 활성산소에 의한 심근의 손상 정도 및 활성산소 방어효소계의 변동과 그 기전을 규명하고자 하였다.

관상동맥우회술을 받는 환자(n=10)를 대상으로 하여 관상정맥동 환류혈액에서 상행대동맥차단 전과 재관류 20분 후에 lactate dehydrogenase(LDH), creatine phosphokinase MB 분획(CK-MB)과 malondialdehyde(MDA)의 농도를 측정하였으며 또한 같은 시각에 심근의 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GSHPx), glutathione reductase(GSSGRd) 그리고 glucose 6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)의 활성도를 측정하였다.

관상정맥동혈에서의 LDH(268±40.3 to 448±84.9 U/ml plasma)와 CK-MB(4.50±2.33 to 27.1±13.5 U/ml plasma)의 활성도 그리고 MDA(5.87±2.02 to 10.5±2.23 nmol/ml plasma)의 양은 상행대동맥차단 전에 비하여 재관류 후에 현저히 증가하였으며 심근의 SOD(13.5±4.04 to 20.7±8.56 U/mg protein), GSHPx(279±37.2 to 325±51.4 mU/mg protein) 그리고 GSSGRd(97.2±15.9 to 122±25.1 mU/mg protein)의 활성도도 재관류 후에 현저히 증가하였다. 반면 심근의 catalase와 G6PDH의 활성도는 의미있는 변화가 없었다. 한편 SOD에 대한 Western blot 결과 Cu, Zn-SOD의 양이 현저하게 증가되었음을 관찰하였다.

이상의 결과들로 관상동맥우회술시 상행대동맥차단에 따른 심근허혈후 재관류에 의하여 활성산소에 의한 산화성 심근손상이 일어나지만 동시에 활성산소 방어효소계의 활성 또한 증가됨으로써 심근손상의 정도가 약화되었을 가능성을 추정할 수 있으며 이러한 활성산소 방어효소의 활성증가는 효소단백의 생합성 증가에 의한 것으로 여겨진다.

- 중심단어:**
1. 관상동맥우회술
 2. 심근 재관류손상
 3. 활성산소
 4. 활성산소 방어효소