

저산소 모델에 따른 간장 기능 손상에 관한 연구

윤기욱 · 이상호 · 이선미*

성균관대학교 약학대학

Hepatic Injury Studied in Two Different Hypoxic Models

Ki-Wook YOON, Sang-Ho LEE and Sun-Mee LEE*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Kyunggi-do 440-746

(Received February 21, 2000; accepted May 2, 2000)

Abstract – We hypothesized that the extent of hypoxic injury would be involved in reduction of oxygen delivery to the tissue. Livers isolated from 18 hr-fasted rats were subjected to N₂-induced hypoxia or low flow hypoxia. Livers were perfused with nitrogen/carbon dioxide gas for 45min or perfused with normoxic Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KHBB) at low flow rates around 1 ml/g liver/min for 45min, which caused cells to become hypoxic because of insufficient delivery of oxygen. When normal flow rates(4 ml/g liver/min) of KHBB (pH 7.4, 37°C, oxygen/carbon dioxide gas) were restored for 30min reoxygenation injury occurred. Lactate dehydrogenase release gradually increased in N₂-induced hypoxia, whereas it rapidly increased in low flow hypoxia. Total glutathione in liver tissue was not changed but oxidized glutathione markedly increased after hypoxia and reoxygenation, especially in N₂-induced hypoxia. Similarly, lipid peroxidation in liver tissue significantly increased after hypoxia and reoxygenation in low flow hypoxia. Hepatic drug metabolizing functions (phase I, II) were suppressed during hypoxia, especially in N₂-induced hypoxia but improved by reoxygenation in both models. Our findings suggest that hypoxia results in abnormalities in drug metabolizing function caused by oxidative stress and that this injury is dependent on hypoxic conditions.

Keywords □ N₂-induced hypoxia, low flow hypoxia, reoxygenation, drug metabolizing function

최근 간경화 말기환자와 간암환자의 유일한 수술요법으로 수행되고 있는 간 이식의 시행에 있어 수술과정시 수반되는 허혈 및 재관류로 인한 간세포 기능변화와 이를 조절하는 약물개발에 관심이 모아지고 있다.

허혈이란 장기가 미관류(underperfusion)되어 산소가 모자라고 에너지 생산이 감소되어 장기의 기능이 저하된 상태를 말한다. 이러한 허혈은 크게 두가지 종류로 나뉘어 지는데 그중 하나는 뇌졸중, 심근경색, 속과 같은 인체내 심각한 질병과 관련된 허혈상태와 수술시 과다 출혈방지 및 간이식후 수여자에게 문합을 만드는 동안 인위적으로 발생하는 허혈상태로 이들 모두 정상체온에서 일어나므로 'warm ischemia'라하며 또 다른 형태는 장기이식시 떼어낸 장기를 보존하기 위해 저온상태에서 보관하게 되는데 이때 발생하는 허혈상태를 'cold ischemia'라 한다. 이러한 warm 및 cold ischemia 모두에서 완전히 혈액이 공급되지 않은 경우 'global (no flow) ischemia'라하며 혈전등에 의하여 혈액의 공급이 일부 되지 않은 경우 'focal ischemia'

라하며 양자 모두 임상에서 매우 중요하다. 최근 Lee등(2000)에 따르면 재관류뿐 아니라 허혈기간 자체도 장기손상에 큰 영향을 미친다고 한다. 그러나 유감스럽게도 이들 허혈로 인한 장기손상 발생기전은 매우 불분명한 채로 남아있다.

간은 생체내 산소 소모율의 20%를 차지하므로 산소량에 매우 민감하며 영양상태에 따라 그 손상정도도 상이하다. 즉 당분해 작용이 일어나 에너지가 공급되는한 저산소상태에서도 잘 견디지만, glycogen이 고갈된 경우 저산소 자체 혹은 저산소 및 산소재도입으로 인한 조직손상에 더욱 민감하다(Bradford등, 1985; Le Couteur등, 1994; Younes등, 1989). 또한 간은 인체내 가장 큰 선(gland)으로서 담즙분비, 약물대사, 합성, 저장등 그 기능이 매우 다양하므로 세 포손상시 간기능의 비일률적(non-uniform) 변화가 예측된다.

따라서 본 연구에서는 간장구조를 그대로 유지하여 간장 기능 변화만을 살펴볼 수 있는 적출관류간 모델에 대표적인 저산소 모델로 사용되고 있는 N₂ 유도 저산소 모델과 low flow 저산소 모델을 적용하여 이로 유도된 저산소 및 산소재도입시 간조직 손상정도와 간장기능 중 약물대사효소의 변동을 비교해 보고자 하였다.

*To whom correspondence should be addressed.

실험방법

실험동물

체중 250 g 내외의 음성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 제 일상사로 부터 공급받아 항온, 항습이 유지되는 본 대학 동물 사육실에서 일주일 이상 적응시킨 후, 일반상태를 관찰하여 외관상 건강한 동물을 선별하여 실험에 사용하였다. 모든 실험 동물은 실험 18시간 전에 절식시켰으며 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시약

LDH(lactate dehydrogenase) kit, 7-ethoxycoumarin, β -glucuronidase, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADPH) sodium salt 및 sulfatase는 Sigma-Aldrich사로부터 구입하여 사용하였으며, 그 외는 국내 일급시약을 사용하였다.

적출 관류간

18시간 절식시킨 흰쥐에 pentobarbital sodium(40 mg/kg)을 복강내로 주사하여 마취시킨 후, 개복하여 관상정맥을 묶고 간문맥에 polyethylene catheter(PE-190)를 삽입한 후 일정속도(4 ml/g liver/min)로 관류시켰다. 이어 즉시 하대정맥을 잘라주고, 신장 윗부분의 하대정맥을 결찰한 뒤 간을 적출하여 perfusion block에 옮겼다. 이때 관류액은 약물대사효소계 측정을 위해서 7-ethoxycoumarin(EC) 50 μ M의 기질이 함유된 Krebs Henseleit bicarbonate buffer(KHBB, mmol/L, NaCl, 118; KCl, 4.6; CaCl₂, 2.5; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄, 1.2; NaHCO₃, 25; glucose, 5; pH 7.4, 37°C)액을 사용하였다. 관류하는 동안 산소 혼합 가스(O₂: 95%, CO₂: 5%)를 KHBB액에 지속적으로 주입하여 간세포에 산소를 공급하였고 모든 관류액은 37°C로 유지시켰다. 적출한 간조직은 안정된 생리적 조건을 유지하기 위해 perfusion block에 옮긴 다음 처음 20분간은 KHBB액을 관류시켜 간을 평형화시켰다.

저산소 유도

N₂ 유도 저산소는 간장에 nitrogen-carbon dioxide mixture(95:5) 가스를 산소 혼합 가스 대신 주입하여 관류시킴으로써 유발하였으며, 45분간의 저산소 상태 후 정상 관류속도로 KHBB액에 산소 혼합 가스를 30분간 재도입하여 관류실험을 마쳤다. Low flow 저산소는 관류액의 속도를 4 ml/g liver/min에서 1 ml/g liver/min으로 감소시킴으로써 유발하였으며, 45분간의 저산소 상태 후 정상 관류속도로 30분간 재관류하여 관류실험을 마쳤다. N₂ 유도 저산소 모델과 low flow 저산소 모델 모두에서 평형기간

과 저산소 및 산소재도입기간에 일정시간마다 관류액을 받아 이화학적 검사를 실시하였고 관류를 마친 간을 균질화하여 분석에 이용하였다.

관류액내 LDH 활성도

관류액내 lactic acid dehydrogenase(LDH)는 Sigma kit(Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)를 사용하여 각각 표준 흡광법으로 측정하였다.

간조직내 총 glutathione(GSH) 및 GSSG량

총 glutathione 은 Brehe와 Burch(1978)의 방법으로 GSH에 의해서 생성된 TNB의 양을 412 nm에서 흡광도를 측정하였고, glutathione disulfide(GSSG)는 2-vinyl pyridine으로 reduced glutathione 을 먼저 차단 시킨후 위와 동일한 방법으로 측정하였다(Griffith, 1980).

간장내 지질 과산화

간장내 지질 과산화는 Masugi와 Nakamura(1978)법에 준하여 thiobarbituric acid(TBA) assay를 사용하여 생성된 malondialdehyde의 양을 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준액으로는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 사용하였다. 단백질 함량은 Bradford(1976)법에 따라 bovine serum albumin을 표준용액으로 사용하여 정량하였다.

약물대사효소계

저산소 및 산소재도입군에 대한 phase I 및 II 대사기능 변동을 관류액내 7-ethoxycoumarin 대사체 분석을 통해 평가하였다. EC의 대사산물은 Cha등(1987)의 방법에 따라 측정하였다. 관류시킨 EC는 phase I 대사효소인 cytochrome P-450에 의하여 O-deethylation되어 hydroxycoumarin(HC)으로 산화된 후 곧이어 phase II 대사효소인 UDP glucu-ronyltransferase(UDPGT)나 sulfotransferase에 의하여 glucu-ronide나 sulfate ester 포함체를 형성한다. 이때 HC는 강한 형광을 나타내나, 포함체를 이룬 HC-glucuronide 및 HC-sulfate ester 포함체들은 형광을 잃는다. 그러나 이들 포함체를 가수분해 시키면 다시 HC가 유리되어 HC의 형광이 다시 나타난다. 이러한 HC의 특성을 이용하여 EC의 각 대사산물의 농도를 측정하여 간세포내의 phase I 약물대사효소의 mixed function oxidase (MFO) system과 phase II 약물포함체 중 glucuromidation 과 sulfation의 변화를 관찰하였다.

통계처리

각 실험군에 대한 실험결과는 평균±표준오차로 나타내었으며 자료 분석은 one-way ANOVA를 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

실험결과

관류액내 LDH 활성도

간장 손상의 지표로 측정된 관류액내 LDH치는 대조군의 경우 실험기간 동안 관류액내 일정한 LDH치를 유지하였다. 저산소 유발군 모두에서 저산소 상태 전기간에 걸쳐 대조군에 비해 유의성 있는 LDH치 증가를 나타내었으나, N₂ 유도 저산소 및 산소재도입군의 경우는 저산소 후기에 급격한 LDH치의 증가를, low flow 저산소 및 산소재도입군의 경우는 저산소 초기에 현저한 수치 증가를 나타내었다. 그러나 산소재도입으로 인해 N₂ 유도 저산소군은 빠르게 대조군 수준으로 회복되었으나, low flow 저산소군은 저산소 초기의 증가가 서서히 감소되었으며 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 1).

간조직내 총 GSH 및 GSSG량

간조직내 총 GSH의 양은 모든 저산소 및 산소재도입 실험군에서 대조군과 차이가 없었으나, N₂ 유도 저산소군에서 저산소 및 산소재도입 후 간조직내 GSSG양이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Table I).

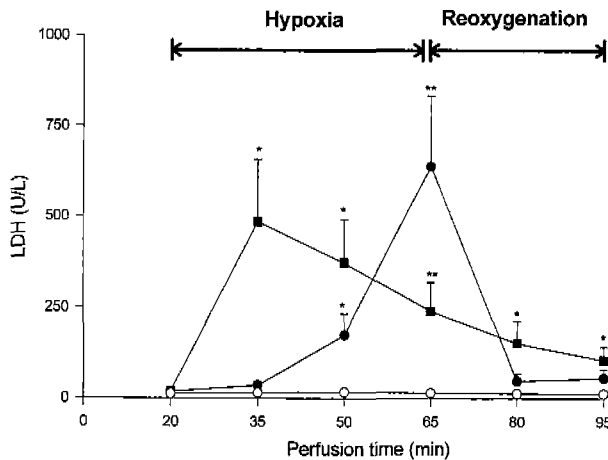


Fig. 1. Time-dependent release of LDH in N₂-induced and low flow hypoxia. Values are mean ± S.E.M. for 7 to 10 rats per group. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group. ○, control; ●, N₂-induced hypoxia/reoxygenation; ■, Low flow hypoxia/reoxygenation.

간장내 지질과산화

간조직내 지질과산화는 N₂ 유도 또는 low flow 저산소군 모두에서 저산소 및 산소재도입 후 대조군에 비해 지질과산화 산물인 MDA치가 유의성 있게 증가하였으며, 이러한 증가는 low flow 저산소군에서 더욱 현저하였다 (Table I).

약물대사효소계 변동

N₂ 유도 또는 low flow 저산소 및 산소재도입시 phase I 대사기능 변화를 관찰한 결과, 두군 모두에서 저산소시에는 7-ethoxycoumarin의 산화가 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였고, 산소재도입으로 그 기능이 다소 회복되는 경향을 나타내었지만 대조군에 비해 낮은 수치를 나타내었다. 이러한 결과는 N₂ 유도 저산소군에서 보다 현저하였다(Fig. 2). Phase II 대사효소에 대한 영향을 알아보기 위해 7-ethoxycoumarin의 sulfation 및 glucuronidation을 측정 한 결과, 이 경우 역시 7-ethoxycoumarin의 산화에서의 결과와 동일한 양상을 나타내었으며, 저산소시에는 역시 N₂ 유도 저산소군이 보다 현저히 감소되었으나, 산소재도입시 두군 모두 동일한 수준으로 회복되는 결과를 나타내었다 (Fig. 3, 4).

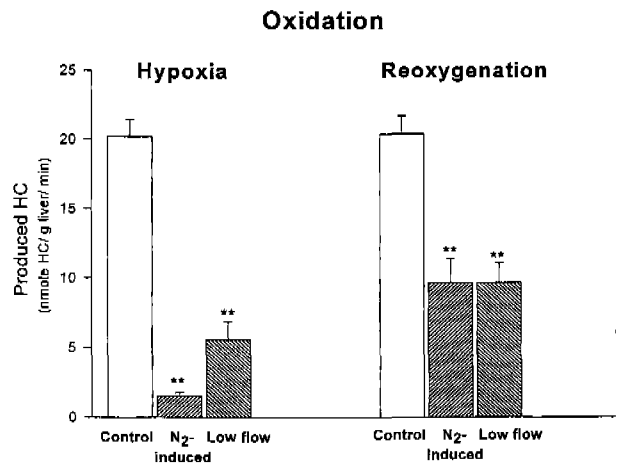


Fig. 2. The rate of oxidation of 7-ethoxycoumarin in N₂-induced and low flow hypoxia. Values are mean ± S.E.M. for 7 to 10 rats per group. **p<0.01 compared with control group. □, control; ▨, N₂-induced hypoxia or N₂-induced hypoxia/reoxygenation; ▩, Low flow hypoxia or low flow hypoxia/reoxygenation.

Table I. Total concentrations of hepatic GSH, GSSG and lipid peroxidation in N₂-induced and low flow hypoxia

	Total GSH (μmole/g liver)	GSSG(μmole/g liver)	MDA (nmole/mg protein)
Control	2.45 ± 0.53	0.20 ± 0.02	0.66 ± 0.03
N ₂ -induced HP/RO	2.40 ± 0.25	0.49 ± 0.07**	0.86 ± 0.07*
Low flow HP/RO	2.51 ± 0.18	0.32 ± 0.06	1.05 ± 0.08**

Values are mean ± S.E.M. for 7 to 10 rats per group. *p<0.05, **p<0.01 compared with control group. HP, hypoxia; RO, reoxygenation.

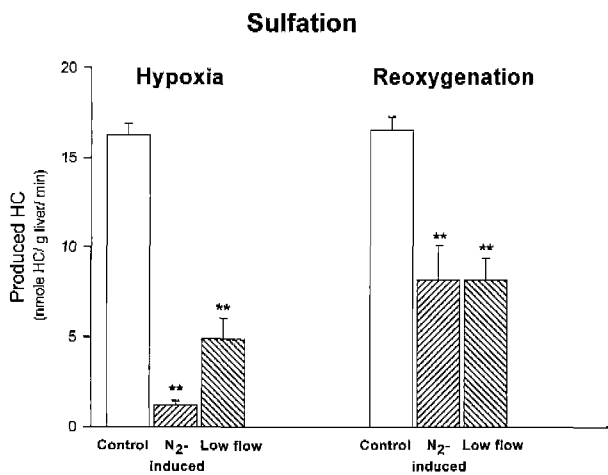


Fig. 3. The rate of sulfation of 7-ethoxycoumarin in N₂-induced and low flow hypoxia. Values are mean \pm S.E.M. for 7 to 10 rats per group. ** $p < 0.01$ compared with control group. □, control; ▨, N₂-induced hypoxia or N₂-induced hypoxia/reoxygenation; ▩, Low flow hypoxia or low flow hypoxia/reoxygenation.

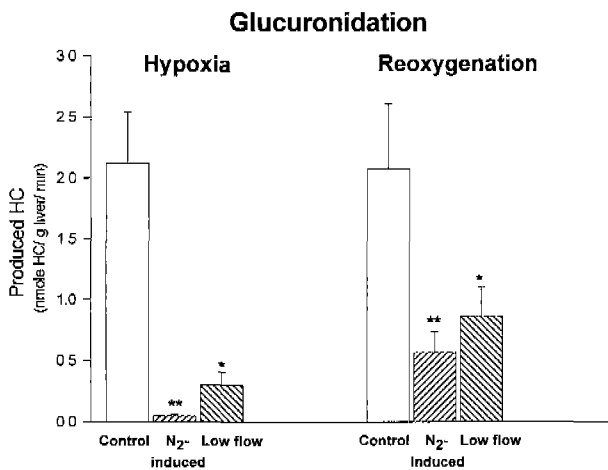


Fig. 4. The rate of glucuronidation of 7-ethoxycoumarin in N₂-induced and low flow hypoxia. Values are mean \pm S.E.M. for 7 to 10 rats per group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control group. □, control; ▨, N₂-induced hypoxia or N₂-induced hypoxia/reoxygenation; ▩, Low flow hypoxia or low flow hypoxia/reoxygenation.

고찰

저산소상태란 생체의 산소요구량에 비하여 산소공급량이 부족한 상태를 말하며 이로 인해 해당장기는 조직 손상과 기능저하가 유발된다. 이때 산소를 공급하게 되면 장기의 기능이 회복되리라고 예상되지만 실제로는 그 기능이 더 악화되는 현상을 볼 수 있는데 이를 산소역설이라 한다. 저산소 상태에서는 에너지 불균형상태가 일어나 고에너지물질인 ATP가 AMP, adenosine, inosine, hypoxanthine 등으로

이화되며, 동시에 xanthine dehydrogenase도 xanthine oxidase로 전환된다(Anundi등, 1987; Brass등, 1991; Granger, 1988). 이때 산소를 재도입 시키게 되면 xanthine oxidase에 의해 hypoxanthine이 xanthine으로 변하게 되며 도입된 산소도 superoxide anion으로 전환된다(Jaeschke등, 1988b). Superoxide anion은 그 자체로서도 조직손상을 일으키기도 하나, 철이나 구리이온 존재하에서는 hydroxyl radical로 전환되어 조직손상을 가중시킨다(Mayumi등, 1993). 이렇게 생성된 활성산소들은 지방, 단백질, 핵산, 다당류등과 같은 생체내 여러 거대분자들을 공격하여 세포독성을 나타내며, 특히 지질과산화물을 일으켜 세포막의 변성 및 파괴를 일으키고 이로 인해 세포통합성(cell integrity)에 영향을 주어 세포의 비가역적인 손상을 초래한다.

최근 여러 생체내 및 생체외 실험에서 허혈 및 재관류와 관련된 간장의 여러 기능 변동을 보고한바 있으나, 그중 간장주요 기능중 하나인 약물대사의 변동에 관한 연구가 현재까지 거의 보고된바 없으므로 본 실험에서 두가지 저산소 모델을 이용하여 이들 모델에 따른 간장기능 변동 특히 약물대사 변동을 비교해보고자 하였다. 적출관류간 실험을 이용한 N₂ 유도 저산소 모델에서 Jaeschke등(1988a)과 Tan등(1998)은 60분 또는 120분간의 저산소상태에서는 세포내의 LDH가 관류액내로의 유출이 급격히 증가하지만, 산소재도입으로 LDH가 감소한다고 하며 다른 저산소 모델과는 달리 N₂ 유도 저산소는 그 자체가 매우 심한 세포 손상을 야기시키며 오히려 산소재도입시 세포기능이 일부 회복된다고 한다. 본 실험에서도 이와 유사한 실험 결과를 나타내었다. 그러나 본 실험에서 low flow 저산소의 경우 저산소 초기에서부터 LDH의 증가가 관찰되었고 이러한 증가 현상은 재관류시까지도 일부 지속되는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 연구결과로 보아 N₂ 유도 저산소 모델이 저산소시에 보다 급격한 간손상을 유발하며, low flow 저산소 모델은 손상 정도는 다소 덜하나 산소재도입시까지도 손상이 지속되는 것을 알 수 있다.

Glutathione은 세포의 산화적 손상에 대해 방어역할을 하는 중요한 비단백성물질로서, 세포가 산화적 손상을 받으면 GSH가 GSSG로 산화됨으로써 활성산소를 무독화시키며, 허혈 및 재관류에 의한 세포손상시 관류액내로 다량 유출되므로 간장 손상지표로 널리 활용된다(Borg와 Schaich, 1989). 본 실험에서 저산소 및 산소재도입 후 간 조직에 남아있는 GSH 및 GSSG의 양은 대조군에 비해 GSH량은 변화가 없었으나, GSSG량은 유의성 있게 증가하였다. 이는 저산소 후 산소재도입시 산화적손상에 의해 GSH가 GSSG로 산화되었으며, GSH 합성 및 교체율(turnover rate)은 저산소 및 산소재도입시 정상보다 오히려 증가되었고, 산화적 손상은 N₂ 유도 저산소 모델에서 보다 심함을 알 수 있었다.

지질과산화는 활성산소가 세포막의 불포화지방산을 공격함으로써 일어나며 이로 인해 세포막뿐 아니라 세포막으로 둘러싸인 소기관 즉 미토콘드리아, 소포체막 등에도 기능 손상을 유발한다. 관류를 마친 간조직내에서 지질과산화를 측정할 본 실험에서 저산소 및 산소재도입군에서 지질과산화의 함량이 증가하였고, 이러한 증가는 low flow 저산소 모델에서 보다 높은 지질과산화 수치를 나타내었다. 이상의 세포 손상의 결과로 보아 N_2 유도 저산소 모델은 저산소시 급격한 간손상을 유발하였으나, 산소 재도입시 빠른 회복을 나타내는 것으로 사료된다. 이에 반해 low flow 저산소 모델은 간손상의 정도는 심하게 유발되지는 않으나, 저산소 및 산소재도입 기간 동안 지속적인 간손상을 나타내는 것으로 여겨진다.

간의 가장 대표적인 기능인 생체 이물질의 생체내전환 (biotransformation)은 phase I 및 phase II 약물대사 효소계의 작용에 의해 이루어지며, 독성물질들은 이들 대사효소들에 의해 극성을 띤 수용성 대사체로 대사되어 체외로 배설된다. Phase I 대사효소계는 세포내 소포체에 다량 존재하고 주로 cytochrome P-450의 작용에 의해 산화 또는 환원이 일어나며 phase II 대사효소계는 주로 UDP-glucuronyltransferase나 sulfotransferase와 같은 대사효소에 의해 포합 또는 가수분해 반응등이 일어난다. 한편 본 연구실의 이전 연구결과에 따르면 간장소포체막에 결합되어 있는 MFO의 활성은 그 주위의 지질 분포 및 종류에 의해 영향을 받는다고 한다(Lee와 Clemens, 1992). 소포체를 구성하는 인지질인 phosphatidyl choline은 cytochrome P-450의 활성에 직접적 영향은 없으나, cytochrome과 약물을 포함한 기질의 결합과 reductase와 cytochrome의 coupling에 관여한다고 한다. 본 실험에서도 두저산소군 모두에서 저산소시 산화능의 급격한 기능저하가 나타났으며, 산소재도입시에도 기능이 일부 회복되었지만 여전히 대조군과는 유의성 있는 차이를 나타내었다. 이는 MFO system에 의한 산화과정이 산소의존적 반응으로 산소의 양에 매우 민감하기 때문으로 여겨지며, 산소재도입시에는 일부 그 기능이 호전되거나 활성산소의 생성에 의한 cytochrome P-450의 기능저하로 인해 대조군 수치에는 못미친다고 생각된다.

Phase I 대사 산물인 7-HC는 주로 phase II enzyme에 의해 sulfation과 glucuronidation 과정을 거치며 이때 sulfation의 경우 사용되는 기질이 3'-phospho adenosine-5'-phosphosulfate로서 이의 형성에 ATP가 소모되므로 저산소시와 산소재도입시 다른 포합반응보다 이의 급격한 변화가 예상된다(Simon 등, 1995). 본 실험에서도 phase I 대사효소에서의 결과와 마찬가지로 저산소시 sulfation의 급격한 대사 기능저하가 일어났으며 산소재도입시 기능이 다소 회복되었다. Glucuronidation은 sulfation보다 약물 포합능에 low affinity를 나타냄을 알 수 있었고, 산소재도입시 산화

나 sulfation에 비해 일부 기능만이 회복되었다. 여기서 특이한 점은 저산소시 phase I, II 모두에서 약물대사능 저하가 N_2 유도 저산소 모델에서 low flow 저산소 모델에 비해 더욱 현저함을 알 수 있었으며, 이는 아마도 간장 약물 대사효소가 문맥부위(periportal) 세포보다 중심정맥부위(pericentral)세포에 주로 분포하므로 low flow 저산소시와 N_2 유도 저산소시 간 세포 부위에 따른 산소공급량 차이 때문으로 생각된다.

이상의 결과로 보아 저산소 및 산소재도입은 간장 약물 대사능을 비롯한 간장 기능 저하를 일으키며 이는 아마도 세포의 산화적 손상과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되며, 이러한 손상은 저산소 모델에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학재단 핵심전문연구(981-0714-110-2)의 지원으로 이루어 졌기에 감사드립니다.

참고문헌

- Anundi, I., King, J. Owen, D. A. Schneider, H. Lemasters, J. J. and Thurman, R. G. (1987). Fructose prevents hypoxic cell death in liver. *Am. J. Physiol.* **253**, G390-G396.
- Borg, D. C. and Schaich, K. M. (1989). The physiological functions of glutathione. In *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*(Jaime Miquel, Ed.) Boca Ranton, Florida, 1, 63-77.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bradford, B. U., Marotto, M., Lemasters, J. J. and Thurman, R. G. (1985). New, simple models to evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused rat liver: time course and effect of nutritional state. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **236**, 263-268.
- Brass, C. A., Narciso, J. and Gollan, J. L. (1991). Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver. *J. Clin. Invest.* **87**, 424-431.
- Brehe, J. E. and Burch, H. B. (1978). Enzymatic assay for glutathione. *Anal. Biochem.* **74**, 189-197.
- Cha, Y. N., Dong, M. S. and Hong, S. S. (1987). Functional relationship between initial oxidation of 7-ethoxycoumarin and subsequent conjugation of 7-hydroxycoumarin in isolated perfused rat livers. *Chem. Biol. Interactions* **61**, 125-137.
- Granger, D. N. (1988). Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* **255**, H1269-H1275.
- Griffith, O. W. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl

- pyridine *Anal. Biochem.* **106**, 207-212.
- Jaeschke, H., Smith, C. V. and Mitchell, J. R. (1988a). Hypoxic damage generates reactive oxygen species in isolated perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **150**, 568-574.
- Jaeschke, H., Smith, C. V. and Mitchell, J. R. (1988b). Reactive oxygen species during ischemia-reflow injury in isolated perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* **81**, 1240-1246.
- Le Couteur, D. G., Rivory, L. P. and Pond, S. M. (1994). The effects of aging and nutritional state on hypoxia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *Transplantation* **58**, 531-536.
- Lee, S. M. and Clemens, M. G. (1992). Effect of α -tocopherol on hepatic mixed function oxidase in hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* **15**, 276-281.
- Lee, S. M., Park, M. J., Cho, T. S. and Clemens, M. G. (2000). Hepatic injury and lipid peroxidation during ischemia and reperfusion. *Shock* **13**, 279-284.
- Masugi, F. and Nakamura, T. (1978). Effect of vitamin E deficiency on the level of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **46**, 187-191.
- Mayumi, T., Schiller, H. J. and Bukley, G. B. (1993). Pharmaceutical intervention for the prevention of post-ischemic reperfusion injury. In *Free radicals: from basic science to medicine* (G. Poli, Ed) 438-447.
- Simon, E. B., Victoria, E. T., Cesario, O. T., Lim, H. K. John, K., Samuel, F. S. and Joann, S. (1995). [^{14}C]7-ethoxycoumarin metabolism by precision-cut rat hepatic slices. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 383-389.
- Tan, S., Yokoyama, Y., Wang, Z., Zhou, F., Nielsen, V., Murdoch, A. D., Adams, C. and Parks, D. A. (1998). Hypoxia-reoxygenation is as damaging as ischemia-reperfusion in the rat liver. *Crit. Care Med.* **26**, 1089-1095.
- Younes, M., Wagner, H. and Strubelt, O. (1989). Enhancement of acute ethanol hepatotoxicity under conditions of low oxygen supply and ischemia/reperfusion. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 3573-3581.