

허혈심근 재관류손상에 있어서 유리 Catecholamine의 역할 : 흰쥐 심근의 Xanthine Oxidase 전환에 미치는 영향*

서울대학교 의과대학 약리학교실

김명석 · 유호진** · 정명희 · 임정규 · 이영석

= Abstract =

A Study on the Role of Catecholamine in Reperfusion Damage of Ischemic Heart in Rat : Effect on Xanthine Oxidase Conversion

Myung-Suk Kim, M.D., Ho-Jin Yoo, M.D., Myung-Hee Chung, M.D.,

Jung-Kyoo Lim, M.D., Young-Suk Lee, M.D.

Department of Pharmacology, Seoul National University College of Medicine

The present study was performed to investigate the role of catecholamine in the genesis of reperfusion injury of ischemic heart. The possible involvement of catecholamine in the xanthine oxidase-linked production of oxygen free radicals was studied. Langendorff preparations of rat hearts were made ischemic for 60 min followed by reperfusion. Upon reperfusion norepinephrine(NE) was significantly released into the coronary effluent regardless of oxygenation of the perfusing solution. Both the increased releases of creatine phosphokinase(CPK) and malondialdehyde(MDA) and the production of superoxide anion in the ischemic-reperfused hearts were significantly reduced by the treatment with either reserpine, a catecholamine depletor, or propranolol, a β -adrenergic receptor blocker. In the reserpinized hearts, infusion of exogenous NE reversed the releases of CPK and MDA and the superoxide anion production to the original higher levels. The releases of CPK and MDA as well as the production of superoxide anion induced by NE in the reserpinized hearts were significantly depressed either by allopurinol, a specific competitive inhibitor of xanthine oxidase(XOD), or by the calcium removal from the perfusing solution. Compared with the XOD activity of control ischemic hearts, that of the hearts treated with reserpine or propranolol showed lower activity in the oxygen radical producing O-form and higher activity in D/O-form. In the reserpinized ischemic hearts, infusion of exogenous NE increased O-form, but decreased D/O-form of XOD. The changes in XOD activities induced by exogenous NE was prevented by phenylmethylsulfonylf-

*이 연구는 1989년 한국과학재단 연구비 및 1989년도 서울대학교 의과대학 기초의학진흥연구비 보조로 이루어졌음.

**조선대학교 의과대학 약리학교실

luoride(a serine protease inhibitor) and pimozone(a calmodulin inhibitor) as well as by calcium removal from the perfusing solution.

It is suggested from the results that in the inchemic-reperfused hearts of rat catecholamine participates in D/O to O-form conversion of XOD by promoting the calcium-calmodulin-dependent proteolysis and plays a contributing role in the production of oxygen free radical.

KEY WORD : Catecholamine · Ischemic heart · Oxygen free radical · Reperfusion injury · Xanthine oxidase.

서 론

허혈 심근의 재관류에 따르는 비가역적인 심근 세포손상 즉 재관류손상은 여러 인자들의 복합적인 작용에 의하여 나타날것으로 여겨지고 있으며 아직도 그 명확한 기전은 규명되지 않았다. 현재 까지 이러한 재관류 손상에 관여할 것으로 주장되고 있는 설로는 ATP, creatine phosphate등 고 에너지 phosphate 고갈¹⁾, 세포내의 과다한 칼슘 유입 및 축적^{2,3)}, lysosome효소들의 활성화⁴⁾ 등이 있지만 일관된 설은 없는 형편이다. 한편 최근에 허혈심근의 재관류손상은 관상혈류재개와 더불어 이루어지는 산소재공급과 관련이 있으며, 특히 이때 발생하는 유독성 산소대사물질인 산소라디칼이 세포손상을 이끄는 직접적인 인자가 될 것으로 보고되어 많은 관심을 끌고있다⁵⁻⁷⁾.

저산소 상태의 세포에는 각종대사산물들이 환원형으로 존재할 것이기 때문에 만일 이러한 상태에서 다량의 산소가 재공급 된다면 산소의 부분 환원 대사물질인 반응성 산소라디칼의 생성이 증가될수 있고, 따라서 이로인한 세포손상이 야기될수 있으리라 추정된다. 실험적으로 산소라디칼 제거 물질들이 in vitro 및 in vivo의 허혈성 병변 및 재관류 손상 또는 산소 재공급 손상에 있어서 심근 보호 효과를 나타냄이 보고 되므로써 이러한 추정을 뒷받침 하고 있다⁸⁻¹⁰⁾. 그러나 이와 같이 허혈심근의 재관류 손상이 산소라디칼이 관여 할것으로 인정은 되지만 아직까지도 이 라디칼의 발생기전 및 출처에 관하여는 명확히 밝혀져 있지 못하다. 지금까지 in vitro 실험 및 여러조직에서의 연구결과를 종합해 보면 xanthine oxidase^{11,12)}, leukocyte⁷⁾, mitochondria¹³⁻¹⁶⁾, catecholamine¹⁷⁻¹⁹⁾

및 아라키돈산 대사²⁰⁾ 등이 산소라디칼의 발생과 관계가 있으리라고 거론되고 있다.

Catecholamine은 허혈심근에서 상당량 유리되며^{21,22)}, in vivo 및 in vitro 적출심장에서 다량의 catecholamine 투여는 심기능 악화와 대사이상을 초래하고 궁극적으로는 심근 괴사를 일으킨다²³⁻²⁶⁾. Catecholamine에 의한 심근손상은 β -아드레날린 수용체 흥분에 따른 세포내로의 과다한 칼슘 유입 증가와 이에 따른 심근운동증가 및 고 에너지 phosphate 감소등과 관련이 있을것으로 보고되어 왔으며^{23,27,28)}, 근자에는 catecholamine 자체뿐 아니라 그의 산화 산물 및 산화 과정에서 발생하는 산소라디칼 들이 심근손상에 또한 중요한 역할을 할 것이라는 주장이 있었다^{19,26,29,30)}. 그러나, 이러한 주장들에도 불구하고 catecholamine에 의한 심근손상, 특히 허혈심근의 재관류 손상에 있어서 catecholamine의 관련성에 관하여는 아직 논란이 되고 있는 점이 많다. 즉, catecholamine의 유리 양상 및 그 기전은 어떠한지, catecholamine에 의한 산소라디칼의 생성기전 및 산소라디칼의 생성이 양적으로 심근손상을 일으킬 정도로 충분할 것인지, 다른 가능한 산소라디칼 생성기전 및 출처들과 catecholamine의 상호 연관성은 어떠한지, 아드레날린 수용체를 통한 catecholamine의 작용들이 심근손상 발생에 어떻게 기여하는지 하는것들이다.

허혈심근 재관류시 산소라디칼을 생성하는 가능한 생성원의 하나로 환취, 개등을 포함한 많은 동물의 심장에서 xanthine oxidase(XOD)의 중요성이 인정되고 있다^{12,31)}. XOD는 purine 대사의 최종단계에서 hypoxanthine, xanthine을 uric acid로 산화하는 효소로써 동물생체의 여러조직에 다양하게 분포하고 있으며, 심근에서는 주로 관상

혈관내피세포에 존재한다³²⁾. XOD는 촉매 반응시 전자 수용체로서 NAD^+ 를 이용하는 dehydrogenase형(D형), O_2 를 전자수용체로 하여 산소라디칼을 생성하는 oxidase형(O형) 그리고 O_2 및 NAD^+ 를 다같이 이용할수 있는 중간형인 D/O형이 있으며^{33,34)}, 정상적인 생체조직에서 XOD는 산소라디칼 생성과는 무관한 D형으로 대부분 존재한다³⁵⁾. 그러나 허혈조직에서는 D형의 상당량이 산소라디칼을 생성하는 O형으로 전환되며 이러한 D→O형 전환은 calcium, calmodulin-의존적인 단백질 분해 작용에 의하여 일어남이 알려져 있다^{36,38)}.

Xanthine oxidase의 D→O형 전환이 칼슘 의존적이라는 사실은 허혈심근에서와 같이 catecholamine 유리가 증가되는 경우 세포내 칼슘농도 증가로 인하여 XOD의 D→O형 전환이 촉진되고, 따라서 허혈심근의 재관류시 산소공급이 재개된다면 O형의 XOD를 통한 산소라디칼의 생성이 또한 촉진될수도 있을 것으로 여겨진다.

본연구에서는 이와같은 가능성을 검토하기 위하여 흰쥐 적출심장의 실험적 허혈-재관류에서 catecholamine의 유리양상 및 산소라디칼 생성에 있어서 catecholamine과 XOD의 관계를 검토하고자 하였다.

연구재료 및 방법

1. 실험적 허혈-재관류 손상

성구별 없이 체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐에 헤파린(100i.u.)을 복강 주사하고 45분후 경추탈골로 치사 시킨후 양측폐장과 함께 심장을 즉시 적출하였다. 냉생리 식염수 속에서 주위의 결체조직 및 지방을 제거한후 Langendorff 심장관류장치에 대동맥을 연결하여 역방향 관류를 실시하였다. 폐동맥을 절개하여 관상 관류액이 잘 배출될 수 있도록 한후 폐정맥을 결찰하고, 양쪽 폐를 제거하였다. 관류액은 95% O_2 -5% CO_2 혼합가스로 산소를 포화시킨 Krebs-Henseleit(K-H) 완충용액(NaCl 118mM, NaHCO_3 27.2mM, KCl 4.8mM, MgSO_4 1.2mM, KH_2PO_4 1mM, CaCl_2 1.25mM, glucose 11.1mM, pH 7.4)을 100Cm H_2O 의 압력으로 관류하였고, 심장온도가 37°C로

유지되도록 관류액의 온도를 일정하게 유지하였다. 산소로 포화된 K-H용액으로 15분동안 관류하여 잔류혈액을 완전히 세척하고 관상관류량 및 심박동이 일정해진 후 3분동안 95% N_2 -5% CO_2 로 포화된 저산소 K-H 용액으로 관류한 다음 60분동안 Langendorff 관류장치의 대동맥 카놀라를 막아 total global ischemia를 유도하였다. 허혈상태 동안에는 95% N_2 -5% CO_2 로 포화시키고, glucose를 제거한 저산소 K-H용액(37°C)에 심장을 담가 외부산소와의 접촉을 피하고 심장의 건조를 방지하였다. 60분동안 허혈후 심장이 담겨있는 저산소 용액을 뽑아내고 산소와 glucose가 포함된 K-H용액으로 20분간 재관류하여 심근손상을 유도하였다. 칼슘이 없는 상태에서의 재관류 손상을 관찰한 실험에서는 정상 K-H용액 및 저산소 K-H 용액에서 칼슘을 제거하고 0.1mM EDTA를 첨가하였다.

2. Norepinephrine(NE) 측정

허혈후 재관류시 처음 5분동안의 관류액을 받아 Anton & Sayre³⁹⁾의 방법을 이용하여 NE의 농도를 측정하였다. 시료관류액 25ml에 0.4N이 되도록 perchloric acid를 넣고 활성 aluminum oxide 400mg과 EDTA 200mg을 넣은후 NaOH로 pH를 8.6으로 적정하고 5분동안 세차게 진탕하였다. 상층액 제거후 10ml 증류수를 첨가하여 다시 혼든후 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 10ml 증류수로 위와 같은 방법으로 4번 반복하여 세척후 0.05N perchloric acid 3ml를 첨가하여 15분동안 혼든다음 10분간 30,000g(10°C)로 원심분리하여 상층액을 얻어 NE 측정에 이용하였다. 상층액 0.4ml에 phosphate buffer(0.5M, pH7.0) 0.2ml와 0.25% potassium ferricyanide 0.04ml를 넣고 혼든다음, 1분후 0.4ml alkaline ascorbate 용액과 1ml 증류수를 넣고 excitation : 409nm, emission : 519nm에서 fluorospectrometer(Perkin-Elmer, Model 1000)를 이용하여 형광도를 측정하였고 blank로서는 potassium ferricyanide 대신에 동량의 buffer를 넣었다.

3. Creatine phosphokinase 및 malondialdehyde 측정

재관류 기간중 처음 5분간의 관상관류액을 받아

양을 측정 한 후, 세포 질효소인 creatine phosphokinase(CPK)와 지질과산화 산물의 하나인 malondialdehyde(MDA)를 측정함으로써 재관류 심근 손상의 지표로 삼았다.

CPK 활성은 25°C, 3ml 반응계(imidazole 100mM, glucose 20mM, MgCl₂ 10mM, ADP 1mM, AMP 10mM, creatine phosphate 20mM, NADP 0.7mM, cysteine 10mM, hexokinase 0.94U/ml, G-6-PDH 0.48 U/ml, pH 6.9)에서 NADP가 NADPH로 환원되는 것을 340nm에서 UV-Spectrophotometer(Hitachi, Model 139)로 흡광도 변화를 기록하여 측정하였다⁴⁰⁾.

MDA는 thiobarbituric acid방법으로 측정하였다⁴¹⁾. 2.4ml 시료 관류액에 0.67% thiobarbituric acid와 glacial acetic acid 1:1 혼합액 0.6ml를 넣고 100°C 수욕조에서 60분동안 반응시킨 다음 실온으로 냉각하고 532nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 흡광계수 $E = 1.52 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 를 이용하여 계산하였다⁴²⁾.

4. Superoxide anion(O₂⁻)의 측정

허혈심근의 재관류 손상시 산소라디칼의 생성을 직접 관찰하기 위한 방법의 하나로 관류심장에서 O₂⁻에 의한 ferricytochrome C 환원 반응을 이용하였다⁴³⁾.

재관류시 대동맥 카눌라에 연결한 주입펌프를 통하여 ferricytochrome C(100μM)를 0.5ml/min의 속도로 주입하면서 30초 간격으로 관상관류액을 받아 즉시 418nm에서 spectrophotometer(Cam Spec. M301)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 계속해서 그 나머지 시료에 소량의 sodium dithionite 결정을 첨가하여 남아있는 ferricytochrome C를 완전히 환원시킨 후 흡광도를 측정함으로써 시료중의 총 cytochrome C의 농도를 측정하였다. 환원형인 ferrocytochrome C의 흡광계수($1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)와 산화형인 ferricytochrome C의 흡광계수($6.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 관상관류중에 환원된 ferricytochrome C의 양을 계산하였다.

5. Xanthine oxidase 활성 측정

심장을 Langendorff 관류장치에서 떼어낸 즉시 액체 질소에 넣어 급속동결하여 분말화하였다. 5ml

완충액(Tris/HCl 100mM, DTT 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)을 첨가하여 어느정도 녹은 후 polytron(Brinkmann, U.S.A.)으로 균질화시킨 다음 1000g에서 20분동안 원심분리하여 상등액을 취하였다. 30,000g에서 1시간 동안 원심분리 한 후 그 상등액에 3.8m ammonium sulfate 용액을 서서히 첨가하여 1.6M~2.4M 농도에서 염석시키고, 20,000g에서 10분동안 다시 원심분리하여 XOD를 부분정제 하였다. 이 XOD 침전물을 50mM Tris-HCl 용액(pH 8.0)에 용해시켜 효소활성을 측정하였다. 이상의 모든 조작은 4°C 이하에서 시행하였다. XOD 활성 측정은 2ml 반응계(Tris/HCl 50mM, xanthine 60μM, XOD시료 0.8ml, pH 8.0)에 NAD⁺(167.5μM)를 첨가하거나 또는 첨가하지 않은 조건에서 xanthine이 uric acid로 산화되는 것을 UV-spectrophotometer를 이용하여 290nm에서 측정하였고, 한편으로는 NADH 생성을 340nm에서 UV-Spectrophotometer(Hitachi, Model 139)로 또한 측정하였다. NAD⁺ 존재하에서 uric acid 생성을 측정할 때에는 경우에 따라서 0.5mM pyruvate, 1.2U/ml LDH를 첨가하므로써 NADH를 다시 산화시켜 NADH에 의한 D-형 XOD의 억제를 방지하도록 하였다. XOD 활성도의 계산은 xanthine이 uric acid로 전환될 때 290nm에서의 흡광계수($8.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)와 NADH의 340nm에서의 흡광계수($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하였으며, 25°C에서 1mole의 uric acid 또는 NADH가 생성되게 하는 효소활성을 1 unit로 하였다. NAD⁺가 존재하고 pyruvate와 lactic dehydrogenase는 첨가하지 않은 조건에서 uric acid의 생성을 측정한 경우에는 290nm에서 NADH에 의한 흡광도($2.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 빼주므로써 uric acid에 의한 흡광도 증가만을 산출하였다. 시료의 단백질농도는 Lowry등⁴⁴⁾의 방법으로 측정하였다. XOD의 D형, O형 및 D/O형의 구별은 Kaminski와 Jezewska⁴⁵⁾의 방법에 준하여 다음과 같이 하였다.

(1) NAD⁺를 첨가하지 않은 반응조건에서 용존 O₂만을 전자 수용체로 하여 290nm에서 측정 한 활성도 : O형 + D/O형

(2) O₂ 및 NAD⁺가 함께 존재 할 때 290nm에서 측정 한 활성도 : O형 + NADH에 의하여 부분억제

된(D형+D/O형)

(3) O₂, NAD⁺ 및 pyruvate와 LDH가 존재시 290 nm에서 측정 한 활성도 : O형+D/O형+D형

(4) O₂와 NAD⁺ 존재시 340nm에서 측정 한 활성도 : NADH에 의해 부분억제된(D/O형+D형)라는 가정하에

D형=(3)-(1), O형=(2)-(4), D/O형=(1)-[(2)-(4)]로 각각 계산하였다.

연구성적

1. Norepinephrine 유리

정상 K-H 용액을 60분이상 계속 관류시킨 대조심장에서 NE 유리는 4.38nmole/5min/g wet wt.로 매우 낮았으나 60분동안의 허혈에 이은 산소공급 재관류시에는 NE 유리가 26.11nmole/5min/g wet wt.로 대조심장에 비해서 약 6배 증가하였다. 한편 허혈에 이어 95% N₂+5% CO₂로 질소를 포화시킨 저산소조건을 유지한 K-H용액으로 재관류를 시행할때도 NE의 유리는 산소포화용액으로 재관류시킬때와 차이가 없는 24.98nmole/5min/g wet wt.로 크게 증가하였다. 산소라디칼 제거 효소인 SOD와 catalase는 허혈에 이은 재관류시 NE 유리증가에 전혀 영향을 미치지 않았으며 Ca⁺⁺-free 조건의 재관류시에는 NE 유리가 약간 증가하는 경향을 보였다(Table 1).

이상의 결과에서 허혈에 이은 재관류시 NE의 유리 증가는 산소공급에 따라 있을수 있는 재관류 손상에 의한 이차적인 유리가 아니라 허혈동안에 유리된후 재관류시에 씻겨져 나온 것이며 이러한 NE 유리는 Ca⁺⁺에 의존적인 아닌것으로 사료되었다.

2. 허혈심근 재관류 손상에 대한 catecholamine의 관여

1) Creatine phosphokinase 유리

관상 관류액으로 유출되어 나오는 세포질 효소인 creatine phosphokinase(CPK)을 측정하므로써 허혈심근의 재관류시 세포손상을 관찰하고 이때 catecholamine과 세포손상의 관련 여부 및 그 작

Table 1. Release of endogenous norepinephrine from ischemic myocardium of isolated rat hearts

Condition	No. of Animal	Norepinephrine ¹ (n mole/5 min/g wet wt)
Control ²	8	4.38 ± 0.71
Reperfusion ³		
Oxygenated	7	26.11 ± 0.62
Oxygenated, SOD+CAT ⁴	6	22.49 ± 0.50
Oxygenated, Ca ⁺⁺ -free	6	37.40 ± 0.59
Hypoxic	6	24.98 ± 0.68

1 : Mean ± S.E.M.

2 : Non-ischemia and non-reperfusion

3 : Ischemia-reperfusion was induced by total obstruction of coronary flow for 1 hr and then followed by reperfusion of normal oxygenated or hypoxic K-H solution for 20 min.

4 : SOD(1250 U/ml) and catalase(3000 U/ml) were infused during reperfusion period by using infusion pump at a rate of 0.5 ml/min.

용기전을 일차적으로 검토하였다. 60분간의 허혈에 이은 재관류시 CPK 유리는 급격히 증가하여 30.82U/5min/g wet wt.를 보였고 산소라디칼 제거 물질인 SOD, catalase 투여에 의하여 9.34U/5min/g wet wt.로 현저히 억제되었다. Reserpine을 전처치(1mg/kg, 실험 24hr 및 48hr 전 복강주사)하여 catecholamine을 고갈시킨 심장의 허혈에 이은 재관류시에는 CPK 유리가 11.9U/5min/g wet wt.로 대조심장에 비해 현저히 억제되었으며 β-adrenergic 수용체 길항약물인 propranolol을 처리한 심장의 경우에도 6.48nmole/5min/g wet wt.로 대조군에 비해 약 1/4 이하로 감소하였다(Fig. 1). 한편 catecholamine을 고갈시킨 reserpine 전처치 심장에 허혈 및 재관류시 NE을 외부로 부터 재투여할 경우에는 CPK 유리가 다시 현저히 증가하여 27.6 nmole/5min/g wet wt를 보였다(Fig. 2).

2) Malondialdehyde 생성

지질과산화 산물의 하나로 생성되는 malondialdehyde(MDA)를 측정하므로써 재관류시 산화성 심근 손상과 catecholamine의 관계를 관찰하였다.

Fig. 3에서와 같이 허혈후 재관류시 MDA 생성은 $14.17\text{nmole}/5\text{min}/\text{g wet wt}$ 이었으며, SOD, catalase 투여에 의해 산소라디칼을 제거한 경우에는 CPK 유리에서와 마찬가지로 현저히 억제되었다. 또한 reserpine과 propranolol을 처치한 군에서도 허혈후 재관류시 MDA유리는 각각 $1.67\text{nmole}/5\text{min}/\text{g wet wt}$, $6.48\text{nmole}/5\text{min}/\text{g wet wt}$ 로 대조군에 비하여 현저히 억제되었다(Fig. 3). 한편 reserpine을 처치한 군에 NE를 재투여 하였을때는 허혈에 이은 재관류시 MDA가 $17.58\text{nmole}/5\text{min}/\text{g wet wt}$ 로 다시 현저히 증가하였다(Fig. 4).

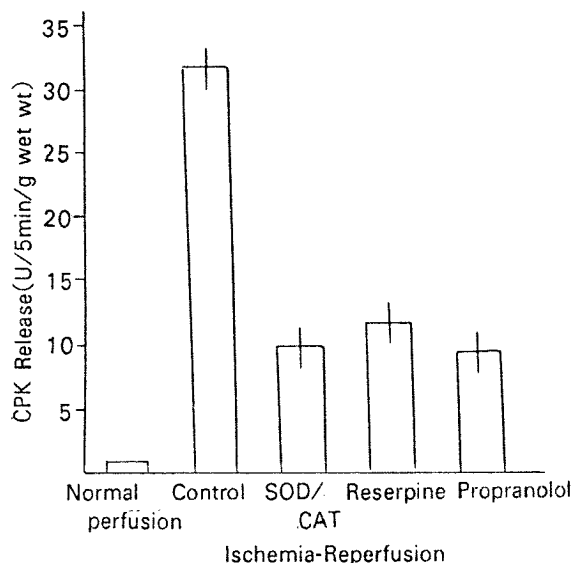


Fig. 1. Release of creatine phosphokinase(CPK) in ischemic-reperfused rat hearts. Isolated rat hearts were subjected to 60 min of global ischemia followed by reperfusion with oxygenated K-H solution. Normal heart was perfused continuously with oxygenated K-H solution for 60 min. SOD(1250 U/ml) and catalase(3000 U/ml) were infused at a rate of 0.5 ml/min during reperfusion. Reserpine was administered intraperitoneally at a dose of 1 mg/kg two times at 24 hr and 48 hr before the experiment. Propranolol($10\text{ }\mu\text{M}$) was infused at a rate of 0.5 ml/min from 5 min before global ischemia and throughout the reperfusion period. CPK activity was measured in the coronary effluents collected during the first 5 min of reperfusion. Mean value \pm SEM. $n=6$ (* $p<0.01$)

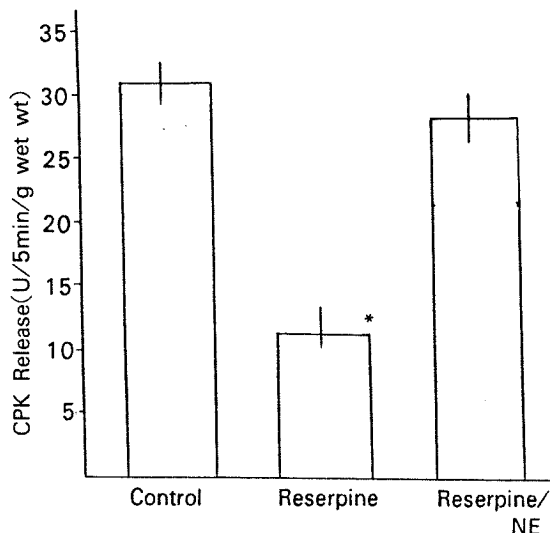


Fig. 2. Effects of exogenous norepinephrine on creatine phosphokinase release during reperfusion of ischemic myocardium of reserpinized rat. Method and condition of ischemia-reperfusion were the same as in Fig. 1. NE($100\text{ }\mu\text{M}$) was infused at a rate of 0.5 ml/min from 5 min before global ischemia and throughout the reperfusion period in reserpine-pretreated heart. CPK activity was measured in the coronary effluents collected during the first 5 min of reperfusion. Mean value \pm SEM. $n=6$ (* $p<0.01$)

3. Superoxide anion 생성에 대한 catecholamine의 관여

앞에서의 실험결과는 허혈심장의 재관류시 NE 과 관련된 산소라디칼의 생성이 재관류 손상에 있어서 모종의 역할을 할수도 있다는 것을 시사하므로 재관류 심장에서 산소라디칼의 하나인 superoxide anion(O_2^-) 생성에 있어서 NE의 관여를 확인코저 하였다. Fig. 5에서와 같이 SOD 억제성-ferricytochrome C 환원이 대조 재관류 심장에서는 2분에 최고치인 $6.63\text{nmole}/30\text{sec}/\text{g wet wt}$ 를 보이고 그이후는 점차 감소하였으나 지속적인 환원을 보임으로서 재관류시 superoxide anion의 생성을 확인하였다. 이와같은 ferricytochrome C의 재관류에 따르는 급격한 환원증가는 reserpine을 투여하여 NE을 고갈시킨 군과 propranolol을 처

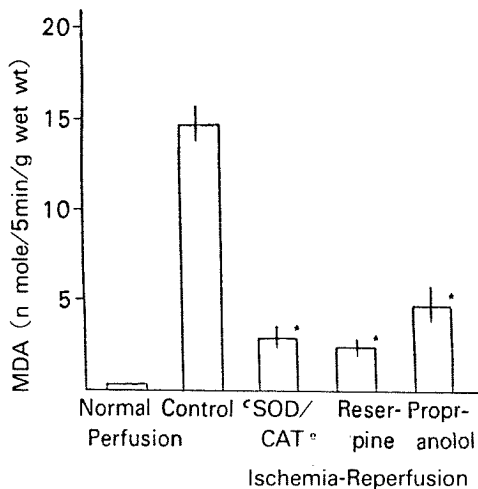


Fig. 3. Lipid peroxidation in ischemic-reperfused rat hearts. Method and conditions of ischemia-reperfusion were the same as in Fig. 1. Lipid peroxidation of myocardial tissue was estimated from malondialdehyde(MDA) released into the coronary effluent collected during the first 5 min of the reperfusion period. MDA was assayed by thiobarbituric acid as described in the method. Methods of drug administration are the same as in Fig. 1. Mean value \pm SEM. $n=6$ (* $p<0.01$)

치하여 β -adrenergic 수용체를 차단한 군에서는 거의 나타나지 않았고 시간에 따른 증가의 양상도 없었다. 한편 reserpine 처리 심장에 NE를 직접 투여한 경우에는 ferricytochrome C 환원이 재관류에 따라 다시 급격히 증가하여 2분에 최고치인 3.69nmole/30sec./g wet wt를 보였고 그 이후도 계속해서 약 1.27nmole/30sec/g wet wt를 유지하였다. 그러나 칼슘이 없는 상태에서는 NE의 투여에 관계없이 superoxide anion의 생성 없었으며(Fig. 6), 이는 NE에 의한 산소라디칼의 생성에 칼슘이 필수적임을 시사하는 바로 여겨졌다.

4. 허혈심근 xanthine oxidase 활성화에 대한 catecholamine의 영향

앞에서의 실험결과는 허혈심근이 재관류 손상시 산소라디칼의 생성과 catecholamine이 관련 있음을 시사하는 바이기 때문에 그기전을 규명하기 위한

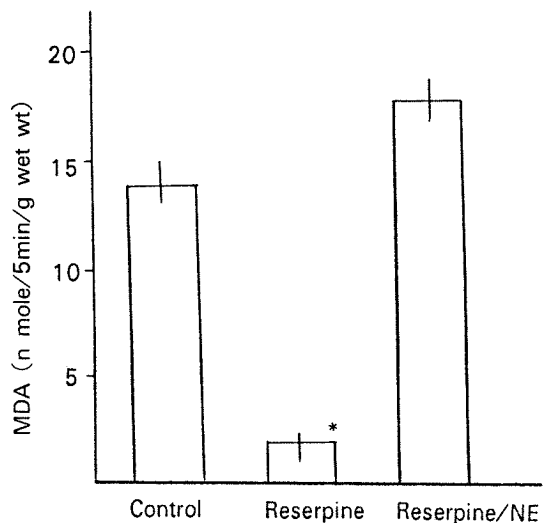


Fig. 4. Effects of exogenous norepinephrine on lipid peroxidation during reperfusion of ischemic myocardium of reserpinized rat. Methods of treatment of reserpine and administration of NE were the same as in Fig. 1. and Fig. 2. Mean value \pm SEM. $n=6$ (* $p<0.01$)

연구의 하나로 흰쥐 심근에서 산소라디칼의 생성 원으로써 가장 중요한 역할을 하는것으로 알려진 xanthine oxidase(XOD)에 대한 catecholamine의 영향을 관찰하였다.

1) Allopurinol의 효과

XOD의 특이 억제 약물인 allopurinol(20mg/kg, 실험 24hr 및 2hr 전 구강투여)을 전처리한 후 재관류손상과 산소라디칼 생성에 대한 catecholamine의 영향을 검토하였다. Table 2와 앞의 실험 결과에서와 같이 reserpine을 처리하여 catecholamine을 고갈시킨 심장에 NE를 재 투여할 경우 CPK 및 MDA 유리와 superoxide anion 생성은 다시 증가되었다. 그러나 이러한 reserpine 처리 심장에 allopurinol을 전처리하여 XOD를 억제한 후에는 NE를 투여하여도 재관류손상 및 산소라디칼의 생성이 거의 관찰되지 않았다.

2) 허혈심근의 xanthine oxidase 활성화

허혈 심근조직의 총 XOD 활성은 $6.2 \pm 0.3U/g$ prot으로 정상대조심근과 차이가 없었으나 각형의 활성도는 차이가 있었다. 대조심근의 경우 전체

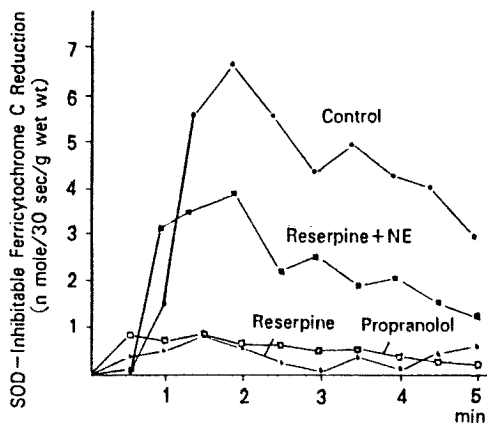


Fig. 5. Effect of reserpine and propranolol on SOD-inhibitable ferricytochrome C reduction in ischemic-reperfused rat hearts. Langendorff preparation of isolated rat hearts was subjected to 60 min of ischemia followed by reperfusion. During reperfusion, ferricytochrome C (100 μ M) was infused to the heart through the aortic cannula at a rate of 0.5 ml/min. SOD (100 U/ml) was mixed with ferricytochrome C and infused at the same rate. Methods of treatment of NE and allopurinol were the same as in Fig. 2. Methods of administration of reserpine and propranolol were the same as in Fig. 1.

XOD중 D형이 85.4%로 대부분을 차지하고, D/O형은 14.3%를 차지한 반면 O형은 거의 없었으나, 허혈심근의 경우에는 D형 80.7%, D/O형 2.6%로

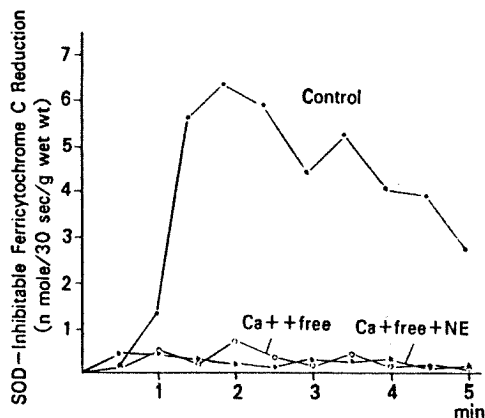


Fig. 6. Effect of calcium on SOD-inhibitable ferricytochrome C reduction in ischemic-reperfused rat hearts. SOD-inhibitable ferricytochrome C reduction was measured as same as in Fig. 5. Method of treatment of NE was the same as in Fig. 2. To observe the effect of calcium, the heart was perfused with calcium-free Krebs-Henseleit solution and made ischemic (60 min) under the absence of calcium

대조심근에 비하여 감소하였지만, O형은 16.7%로 의미있는 증가를 보였다.

한편 reserpine을 전처치한 허혈심근에서는 D형 84%, D/O형 16%, O형 0%로 reserpine을 처치하지 않은 허혈심근에 비해 D형, D/O형은 증가하였고 O형은 현저히 감소하여 대조심장에서와 유사하였다. 또한 propranolol을 처치한 허혈심근에서도

Table 2. Effect of allopurinol on CPK and MDA releases and superoxide anion production in the ischemic-reperfused hearts

Treatment	CPK ¹ (U/5 min/g wet wt)	MDA ¹ (n mole/5 min/g wet wt)	Superoxide anion ² (n mole/5 min/g wet wt)
None	30.82 \pm 2.8	14.17 \pm 2.6	18.18
Reserpine	9.2 \pm 1.8	1.67 \pm 1.1	1.73
Reserpine + NE ³	27.6 \pm 2.4	17.58 \pm 2.1	11.03
Allopurinol + Reserpine + NE ⁴	3.43 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2	1.09

1: Mean \pm SEM of six experiments.

2: Production of superoxide anion was estimated by SOD-inhibitable ferricytochrome C reduction as same as in Fig. 5.

3: Reserpine pretreatment and norepinephrine administration were as same as in Fig. 2.

4: Allopurinol (20 mg/kg) was administered orally two times at 24 hrs and 2 hrs before the study.

Table 3. Effects of reserpine, propranolol and calcium on xanthine oxidase activity of ischemic rat hearts

Treatment		XOD			
		Total(U/g protein) ¹	D(%)	D/O(%)	O(%)
Normal Control	None	6.2± 0.4	85.4	14.3	0.3
Ischemia	None	6.2± 0.3	80.7	2.6	16.7
	Reserpine ²	6.3± 0.2	84	16	0
	Propranolol ²	6.2± 0.5	83.7	14.8	1.5
	Ca ⁺⁺ -free ³	6.1± 0.5	84.4	14.5	0.1

1 : Mean± SEM of six experiments.

2 : Reserpine and propranolol were administered as same as in Fig. 1.

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

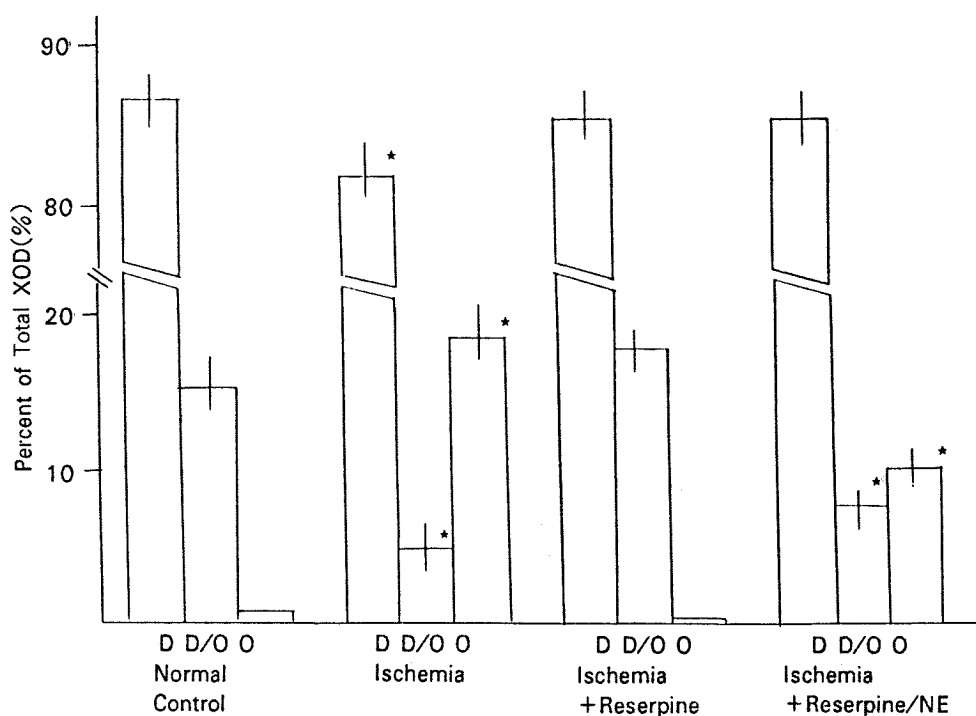


Fig. 7. Xanthine oxidase activity in ischemic myocardium. The tissue preparation for measuring xanthine oxidase activity in ischemic myocardium was done immediately after 60 min of global ischemia produced under the condition of reserpine or reserpine + NE treatment. NAD⁺-dependent dehydrogenase form(D), O₂ dependent oxygen radical producing oxidase form(O) and intermediate D/O-form of the enzyme were determined separately by the method of Kaminski & Jezewska(1979) as described in the Method and Material. Method of treatment of NE and reserpine was the same as in Fig. 1. and Fig. 2. Values are mean+SEM of six experiments. (*p<0.05)

Table 4. Effects of propranolol, calmodulin inhibitor, protease inhibitor and calcium on xanthine oxidase activity of reserpinized ischemic myocardium infused with norepinephrine

Condition	Treatment	XOD			
		Total(U/g protein) ¹	D(%)	D/O(%)	o(%)
Reserpine + NE ²	None	6.3±0.5	84	7	9
	Propranolol ²	6.3±0.4	81	17	2
	Pimozide ³	6.2±0.2	82	18	0
	PMSF ³	6.2±0.3	81.6	18.4	0
	Ca ⁺⁺ -free ⁴	6.1±0.4	82	18	0

1 : Mean±SEM of six experiments.

2 : Methods of treatment of reserpine, norepinephrine and propranolol were as same as in Fig. 1 and Fig. 2.

3 : A serine protease inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride(1 mM) and a calmodulin inhibitor, pimozide (20 μM) were infused for 15 min before the induction of ischemia.

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

D형, D/O형, O형이 각각 83.7%, 14%, 1.5%로 reserpine 처치군과 비슷한 양상을 보였다(Table 3). NE과 XOD의 상호관계를 재확인 하기 위해서 reserpine 처치군에 NE를 재투여한 경우에 있어서는 reserpine만을 처치했던 군에 비해 D형은 거의 변함이 없으나 D/O형이 16%에서 7%로 현격히 줄어들었고 O형은 9%로 현저히 증가하였다(Fig. 7). 이상의 결과는 허혈심근의 각형의 XOD 활성도 변화 특히 O형의 증가에 NE이 관여함을 보여 주었다.

3) Xanthine oxidase 활성의 변화기전

NE에 의한 허혈심근의 XOD 변화기전을 추구 하기 위한 방법의 하나로 reserpine을 처치한 흰쥐 적출심장에 단백분해 효소 억제제인 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) 1mM, 또는 calmodulin 억제제인 pimozide 20μM이 각각 함유된 K-H 용액을 15분동안 미리 관류시킨후 다시 3분동안 이들 약물이 각각 함유된 95% N₂-5% CO₂ 포화 K-H 용액에 NE(100μM)을 첨가하여 관류시킨 다음 허혈을 유도하였다. 60분동안의 허혈기간 중에도 이들 약물이 함유되고 95% N₂-5% CO₂를 포화시킨 K-H 용액에 담갔다.

한편 NE에 의한 XOD의 변화에 칼슘이 미치는 영향을 검토하기 위하여 reserpine 처치 흰쥐 적출심장에 칼슘을 첨가하지 않은 K-H용액으로 일차 관류후 NE이 포함된 허혈용액으로 허혈을 유도

하고 XOD활성을 측정하였고, NE 수용체와의 관계를 보기 위하여 reserpine 처치 적출심장에 NE과 동시에 propranolol(100μM)을 첨가하여 앞의 실험과 동일한 방법으로 관찰하였다.

Table 4에서와 같이 pimozide, PMSF 및 propranolol등 약물은 NE에 의한 O형의 증가를 거의 완전히 억제하였으며 D/O형의 감소 또한 현저히 방지하여 오히려 대조군에 비해 약간 증가된 양상을 보였다. D형의 비율은 약간 감소한 경향을 보이나 뚜렷치 않았고 총활성도도 통계학적으로 의미있는 변화를 보이지 않았다. 이러한 양상은 칼슘을 제거한 상태에서 유도한 허혈심근에서도 동일하였다.

고 찰

허혈심근의 재관류시 내인성 catecholamine의 유리가 증가됨은 많은 연구자들에 의하여 보고^{21, 22)}되었지만 이러한 유리증가가 허혈과정 그 자체의 한가지 현상인지 또는 재관류에 따르는 이차적인 교감신경말단의 손상 결과인지에 대해서는 논란이 있었다. 본 연구에서 허혈에 이은 재관류시 norepinephrine(NE) 유리가 재관류액의 산소공급 유무에 관계없이 동등하게 증가하였고 산소라디칼 제거물질에 의하여도 영향을 받지 않았음은 이러한 NE 유리증가가 재관류와 더불어 있을 수 있는

신경말단의 손상에 의한 결과이기 보다는 허혈과 정 중에 유리되었던 것이 재관류와 더불어 씻겨져 나온 것으로 여겨졌다.

Norepinephrine, epinephrine 등 catecholamine은 중성 pH에서도 비교적 쉽게 산화되며, 그 산화산물인 adrenochrome은 심기능 저하 및 심근괴사를 초래할 뿐 아니라 산화과정중에 반응성이 높은 세포독성 산소라디칼을 발생한다고 보고되었다^{19, 26, 29, 30}). 이와같은 catecholamine에 의한 유독성 산소라디칼의 발생과 함께 허혈심장의 재관류시 NE 유리가 증가된다는 사실은 재관류 손상에 있어서 내인성 catecholamine이 산소라디칼과 관련된 심근세포손상 기전들 중의 하나가 될 수 있는 가능성이 있음을 암시하는 바를 여겨진다. Singal 등^{25, 26}은 β -아드레날린 수용체 작용물질인 isoproterenol을 투여한 흰쥐 심근에서 지질과산화이 증가되며, 이는 항산화제로서 산소라디칼 제거물질인 Vit. E, 그리고 세포막 안정물질인 Zinc에 의하여 억제된다는 실험적 증거로부터 catecholamine에 의한 심독성은 유리라디칼 또는 기타 산화산물에 의한 산화반응과 관련이 있을 것으로 주장하였다. 본 연구에서도 허혈-재관류시 NE의 존재유무에 따라 세포질 효소인 CPK, 지질과산화 산물인 MDA 및 superoxide anion 생성이 증가 또는 감소한 결과는 앞에서의 주장과 같이 catecholamine이 산소라디칼의 생성 및 재관류시의 세포손상에 관여할 것임을 뒷받침하는 바를 사료되었다.

Catecholamine에 의한 산소라디칼의 발생기전으로 지금까지는 catecholamine이 자가 산화되거나 monoamine oxidase에 의하여 효소적으로 산화될 때 발생하는 것으로 보고되었다^{17, 18, 31}). 그러나 본 연구에서 propranolol을 투여하여 아드레날린 수용체를 차단한 경우 superoxide anion 생성 및 CPK유리가 현저히 억제된 것을 볼때 허혈-재관류시 유리된 내인성 catecholamine이 세포외액에서 자가산화되는 과정에서 발생한 산소라디칼은 세포손상을 일으키기에는 충분하지 못할 것으로 여겨지며, 또한 monoamine oxidase를 통한 산소라디칼의 발생도 이 효소가 세포내 기구인 mitochondria 결합효소임을 감안한다면 세포외액으로 유

리되어 나온 NE이 monoamine oxidase와 접할 기회는 희박하기 때문에 그 가능성 또한 배제할 수 있겠다. 한편 이와는 달리 허혈심근 병변이 β -아드레날린 수용체 차단제에 의하여 보호⁴⁷)될 뿐 아니라 본 실험에서와 같이 propranolol이 재관류 손상 및 산소라디칼 생성을 억제한 결과는 유리된 내인성 catecholamine이 수용체를 통한 작용에 의하여 산소라디칼 생성에 관여할 것임을 시사하는 바를 여겨진다. 즉 유리 catecholamine이 수용체를 경유한 모종의 작용에 의하여 직접 또는 간접적으로 세포내의 산소라디칼 생성기전에 영향을 미칠 수 있으리라 여겨지며, 특히 흰쥐 심장의 경우에는 가장 중요한 산소라디칼 생성기전 및 출처로 알려진 xanthine oxidase(XOD)^{12, 31, 36, 37})에 영향을 미치므로서 산소라디칼 생성에 관여할 가능성도 있을 것으로 여겨진다. 본 실험에서 reserpine을 전처치하여 NE을 고갈시키고 동시에 allopurinol을 투여하여 XOD를 억제한 심장의 경우 NE 재투여에 의한 CPK, MDA 유리 및 superoxide anion생성의 증가가 억제된 것은 NE에 의한 세포손상 및 산소라디칼의 생성이 XOD와 관련이 있음을 시사하는 결과로 여겨지며 앞의 가능성을 뒷받침하는 바를 하겠다.

XOD는 정상심장 조직의 경우 80% 이상이 산소라디칼 생성과는 무관한 D형으로 존재하지만 허혈병변 조직에서는 상당량이 O형으로 존재함이 보고되어 있으며³⁵⁻³⁸), 본 연구에서도 정상대조심장과 허혈심장의 총 XOD활성에는 차이가 없었으나 허혈심장의 경우 대조심장에 비해 D형 및 D/O형은 감소한 반면 O형은 의미있는 증가를 보였다. 이와같은 허혈심장에서 XOD 각 형의 변화는 NE 유무 및 아드레날린 수용체 차단여부에 따라 또한 영향을 받았다. 즉 reserpine 전처치로 NE을 고갈시킨 허혈심장에서는 대조허혈 심장에 비해 O형의 증가는 거의 없는 반면에 D 및 D/O형은 증가하였으나 NE을 재투여한 경우에는 대조허혈심장과 유사하게 다시 O형이 증가하고 D 및 D/O형은 감소를 보였다. 한편 대조허혈심장 및 reserpine 처치후 NE재투여 심장에서 propranolol은 NE 고갈심장과서와 마찬가지로 D, D/O형은 증가하나

O형의 증가는 억제하였다. 이러한 결과는 NE이 허혈심근에서 XOD의 D형에서 O형으로의 전환을 촉진하며 그 기전으로는 수용체를 통한 작용이 관여할 것임을 강력히 시사해주는 바를 사료되었다.

Catecholamine은 β -아드레날린 수용체 매개작용으로 세포내 cAMP를 증가시키고 이로 인해 세포내로의 칼슘유입을 촉진⁴⁸⁾함은 잘 알려진 사실로서 본 연구에서 칼슘을 제거한 경우에는 NE에 의한 D, D/O형 감소 및 O형 증가가 관찰되지 않음은 세포내 칼슘이 또한 NE에 의한 XOD의 D→O형 전환에 관여할 것으로 여겨진다. In vitro에서 XOD는 pH, 온도변화, metal이온, SH기 변화약물에 의하여 D→O형의 전환이 영향을 받으며^{33,49)}, 허혈장관 및 심장에서는 D→O형 전환이 calcium, calmodulin-의존적 단백질 분해 효소작용에 의하여 촉진됨이 보고되었다³⁵⁻³⁸⁾. 본 연구에서도 단백질 분해 효소 억제제인 phenylmethylsulfonyl fluoride와 calmodulin 억제제인 pimozide가 reserpine 처리후 NE 재투여 허혈심장에서 칼슘제거시와 마찬가지로 XOD의 D→O형 전환을 억제하였다. 이와같은 결과들을 종합해 볼때 흰쥐의 허혈심근 병변에서는 증가된 내인성 catecholamine유리가 수용체를 경유하여 세포내 칼슘농도를 증가하고, 따라서 calcium-calmodulin 의존적인 단백질 분해 효소작용에 의한 XOD의 D→O형 전환을 촉진함으로써 재관류시 산소공급과 더불어 산소라디칼 생성에 기여할 수 있으리라 사료되었다.

결 론

허혈심근 재관류시 NE 유리증가는 재관류시 산소유무에 관계없이 동등하였으며 산소라디칼 제거물질인 SOD+catalase처리에서도 변화가 없었다. 흰쥐 적출심장을 사용한 허혈심근 재관류 손상에서 세포질 효소인 CPK, 지질과산화 산물인 MDA의 유출 및 SOD-억제성 ferricytochrome C환원의 증가는 NE고갈제인 reserpine, β -adrenergic 수용체 길항약물인 propranolol 및 산소라디칼 제거물질인 SOD+catalase에 의하여 현저히 억제되었다. Reserpine 전처리 심장에서 CPK,

MDA 및 SOD-억제성 ferricytochrome C환원의 감소는 NE을 재투여 함으로써 다시 현저한 증가를 보였다. 그러나 이러한 NE 투여시 관찰된 증가양상은 XOD의 억제약물인 allopurinol에 의하여 억제되었다. 허혈심근에서는 XOD중 D형과 D/O형은 감소한 반면에 산소라디칼을 생성할 수 있는 O형의 비율은 증가하였으며, reserpine, propranolol 투여 및 칼슘이 없는 상황에서는 O형의 증가는 거의 없었고 D형 및 D/O형의 감소도 관찰되지 않았다. NE고갈에 따른 허혈심근 XOD의 D형, D/O형 증가 및 O형 감소가 NE을 재투여시에는 D/O형의 감소 및 O형의 증가를 보였고, 이와같은 NE 재투여에 의한 변화는 β -adrenergic 수용체 차단제인 propranolol, 단백질 분해 효소 억제제인 PMSF calmodulin 억제제인 pimozide, 그리고 칼슘이 없는 상황에서는 관찰되지 않았다.

이상의 결과에서 허혈기간에 분비된 NE은 그 수용체를 통한 세포내 칼슘의 증가를 통하여 칼슘의존적인 단백질 분해 효소를 활성화 시키고 이로 인한 XOD의 D→O형의 전환을 촉진시켜 허혈심근 재관류 손상시 산소라디칼을 생성하는데 일부 기여할 수 있을 것으로 사료되었다.

References

- 1) Jennings RB, Reimer KA : *Lethal myocardial ischemic injury*. *Am J Pathol* 102 : 204-255, 1981
- 2) Katz AM, Reuter H : *Cellular calcium and cardiac cell death*. *Am J Cardiol* 44 : 188-190, 1979
- 3) Nayler WG : *The role of calcium in the ischemic myocardium*. *Am J Pathol* 102 : 262-270, 1981
- 4) Wildenthal K : *Lysosomal alterations in ischemic myocardium : results or cause of myocellular damage*. *J Mol Cell Cardiol* 10 : 595-603, 1978
- 5) Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera CM : *Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart*. *J Mol Cell Cardiol* 12 : 797-808, 1980
- 6) Jolly SR, Kane WJ, Bailie GD : *Canine myocardial reperfusion injury : its reduction by the combined administration*. *Cir Res* 54 : 277-285, 1984

- 7) Werns SW, Shea MJ, Lucchesi BR : *Free radicals in ischemic myocardial injury. J Free Radicals Biol & Med* 1 : 103-110, 1985
- 8) Meerson FZ, Kagan VE, Korlov YD, Belkina LM, Arkhipenko YV : *The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. Basic Res Cardiol* 77 : 465-485, 1982
- 9) Kim MS and Akera T : *O₂ free radicals : Cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺, K⁺-ATPase. Am J Physiol* 252 : H252-H257, 1987
- 10) Lee SD, Choi CH, Park JW, Kim YS, Kim MS : *Role of oxygen metabolite in the oxygen paradox in hypoxic myocardium. Seoul J Med* 28 : 181-188, 1987
- 11) Bannister JV, Bannister WH, Hill HAO, Thornally PI : *Enhanced production of hydroxy radicals by the xanthine-xanthine oxidase reaction in the presence of lactoferrin. Biochem Biophys Acta* 715 : 116-120, 1982
- 12) Chambers DE, Parks DA, Patterson G : *Xanthine oxidase as a source of free radical damage in the myocardial ischemia. J Mol Cell Cardiol* 17 : 145-152, 1985
- 13) Boveris A, Cademas E, Stoppani AOM : *Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem J* 156 : 435-444, 1976
- 14) Boveris A, Chance B : *the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochemical J* 134 : 707-716, 1973
- 15) Otani H, Tanaka H, Inoue T : *In vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury. Circ Res* 55 : 168-175, 1984
- 16) Turrens JF, Boveris A : *Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine mitochondria. Biochem J* 191 : 421-427, 1980
- 17) Cohen G, Heikkila RE : *The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxy radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents. J Biol Chem* 294 : 2447-2452, 1974
- 18) Graham DG, Tiffany SM, Bell WR, Gutknecht WF : *Autoxidation versus covalent binding of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C 1300 neuroblastoma cells in vitro. Mol Pharmacol* 14 : 644-653, 1978
- 19) Singal PK, Robert E, Beamish RE, Dhalla NS : *Potential oxidative pathway of catecholamine in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. In Myocardial Injury, Edited by Spitzer JJ, 391-401, Plenum, 1983*
- 20) Egan KR, Gale PH, Kuehl FA : *Reduction of hydroperoxides in the prostaglandin biosynthetic pathway by a microsomal peroxidase. J Biol Chem* 254 : 3295-3302, 1974
- 21) Abrahamsson T, Almgren O, Carlsson L : *Ischemia-induced noradrenaline release in the isolated rat heart : influence of perfusion substrate and duration of ischemia. J Mol Cell Cardiol* 15 : 821-830, 1983
- 22) Schömig A, Dart AM, Dietz R, Mayer E, Kübler W : *Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part A : Locally mediated release. Cir Res* 55 : 689-701, 1984
- 23) Chappel CI, Rona G, Balazs T, Gaudry R : *Comparison of cardiotoxic actions of certain sympathomimetic amines. Can J Biochem Physiol* 37 : 35-42, 1959
- 24) Rona G, Chappel CI, Kahn DS : *The significance of factors modifying the development of isoproterenol-induced myocardial necrosis. Am Heart J* 66 : 389-395, 1963
- 25) Singal PK, Dhillon KS, Beamish RE, Dhalla NS : *Protective effect of zinc against catecholamine-induced myocardial changes. Electrocardiographic and ultrastructural studies. Lab Invest* 44 : 426-433, 1981
- 26) Singal PK, Yates JC, Beamish RE, Dhalla NS : *Influence of reducing agents on adrenochrome-induced changes in the heart. Arch Pathol Lab Med* 105 :

- 664-670, 1981
- 27) Bloom S, Davis D : *Isoproterenol myocytolysis and myocardial calcium. Recent Adv Stud Card Struct Metab* 4 : 581, 1974
 - 28) Takenata F, Huguchi M : *High-energy phosphate contents of subendocardium and subepicardium in the rat treated with isoproterenol and some drugs. J Mol Cell Cardiol* 6 : 123-135, 1974
 - 29) Yates JC, Dhalla NS : *Induction of necrosis and failure in the isolated perfused rat heart with oxidized isoproterenol. J Mol Cell Cardiol* 7 : 807-816, 1975
 - 30) Yates JC, Beamish RE, Dhalla NS : *Ventricular dysfunction and necrosis produced by adrenochrome metabolite of epinephrine : relation to pathogenesis of catecholamine cardiomyopathy. Am Heart J* 102 : 210-221, 1981
 - 31) Hearse DJ, Manning AS, Downey JM, Yellon DM : *Xanthine oxidase : A critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion ? Acta Physiol Scand* 548(Suppl) : 65-78, 1986
 - 32) Janasch ED, Grund C, Bruder G, Heid HW, Keenan TW, Franke WW : *Localization of xanthine oxidase in mammary gland epithelium and capillary endothelium. Cell* 25 : 67-82, 1981
 - 33) DellaCorte E, Stripe F : *The regulation of rat xanthine oxidase. Biochem J* 126 : 739-745, 1972
 - 34) Waud WR, Rajagopalan KV : *The mechanism of conversion of rat liver xanthine dehydrogenase form an NAD⁺-dependent form (Type D) to an O₂-dependent form (Type O). Arch Biochem Biophys* 172 : 365-379, 1976
 - 35) Battelli MG, DellaCorte E, Stripe F : *Xanthine oxidase type D (Dehydrogenase) in intestine and other organs of the rat. Biochem J* 1972, 126 : 747-749, 1972
 - 36) Lim Y and Kim MS : *Role of xanthine oxidase in reperfusion injury in ischemic myocardium. Seoul J Med* 29 : 131-142, 1988
 - 37) Park CK, Lee Y, Park JW, Kim MS : *Conversion of myocardial xanthine oxidase in ischemic heart of rat. Korean J Thorac Cardiovasc Surgery* 21 : 803-815, 1988
 - 38) Roy RS and McCord JM : *Superoxide and ischemia. Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In Proceedings of the Third International Conference on Superoxide and Superoxide Dismutase. edited by R. Greenwald and G. Cohen, 145-153 Elsevier/North Holland, New York, 1983*
 - 39) Anton AH, Sayre DF : *A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindol procedure for the analysis of catecholamine. J Pharmacol Exp Ther* 138 : 360-375, 1962
 - 40) Forster G, Bernt E, Bergmeyer HU : *Creatine phosphokinase determination with creatine phosphate as substrate. Methods of Enzymatic Analysis, vol II, 2nd Ed. 789-793, New York, Academic Press, 1974*
 - 41) Yagi K : *Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. Lipid peroxides in Biology and Medicine. 223-242, Academic Press, New York, 1982*
 - 42) Placer ZA, Cushmann LL, Johnsson BC : *Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical system. Anal Biochem* 16 : 359-364, 1966
 - 43) Salin ML, McCord JM : *Superoxide dismutase in polymorphonuclear leukocytes. J Clin Invest* 54 : 1005-1009, 1974
 - 44) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ : *Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
 - 45) Kaminski ZW, Jezewska MM : *Intermediated dehydrogenase-oxidase form of xanthine oxidoreductase in rat liver. Biochem J* 181 : 177-182, 1979
 - 46) Beamish RE, Dhillon KS, Singal PK, Dhalla NS : *Protective effect of sulfinpyrazone against catecholamine metabolite adrenochrome-induced arrhythmia*

- mias. Am Heart J* 102 : 149-152, 1982
- 47) Menken U, Wiegand V, Bucher P, Meesmann W : *Prophylaxis of ventricular fibrillation after acute experimental coronary occlusion by chronic beta-adrenoceptor blockade with atenolol. Cardiovasc Res* 13 : 588-594, 1979
- 48) Rall TW : *Role of adenosine 3', 5'-monophosphate (cyclic AMP) in actions of catecholamines. Pharmacol Rev* 24 : 399-410, 1972
- 49) Stripe F, Dellacorte E : *The regulation of rat liver xanthine oxidase. J Biol Chem* 244 : 3855-3863, 1969