

## 허혈/재관류 심장의 산화손상에서 미토콘드리아의 역할

서울대학교 의과대학 약리학교실

박 종 완 · 전 양 숙 · 김 명 석

= Abstract =

### Role of Mitochondria in Oxidative Damage of Post-Ischemic Reperfused Hearts

Jong-Wan Park, Yang-Sook Chun and Myung-Suk Kim

*Department of Pharmacology, College of Medicine,  
Seoul National University, Seoul 110-799, Korea*

Restoration of the blood flow after a period of ischemia is accompanied by generation of toxic oxygen radicals. This phenomenon may account for the occurrence of reperfusion-mediated tissue injury in ischemic hearts. In *in vitro* studies, although oxygen radicals can be generated from a variety of sources, including xanthine oxidase system, activated leucocytes, mitochondria and others, the most important source and mechanism of oxygen radical production in the post-ischemic reperfused hearts is unclear. In the present study, we tested the hypothesis that the respiratory chain of mitochondria might be an important source of oxygen radicals which are responsible for the development of the reperfusion injury of ischemic hearts. Langendorff-perfused, isolated rat hearts were subjected to 30 min of global ischemia at 37°C, followed by reperfusion. Amytal, a reversible inhibitor of mitochondrial respiration, was employed to assess the mitochondrial contributions to the development of the reperfusion injury. Intact mitochondria were isolated from the control and the post-ischemic reperfused hearts. Mitochondrial oxygen radical generation was measured by chemiluminescence method and the oxidative tissue damage was estimated by measuring a lipid peroxidation product, malondialdehyde(MDA). To evaluate the extent of the reperfusion injury, post-ischemic functional recovery and lactate dehydrogenase(LDH) release were assessed and compared in Amytal-treated and -untreated hearts. Upon reperfusion of the ischemic hearts, MDA release into the coronary effluent was markedly increased. MDA content of mitochondria isolated from the post-ischemic reperfused hearts was increased to 152% of preischemic value, whereas minimal change was observed in extramitochondrial fraction. The generation of superoxide anion was increased about twice in mitochondria from the reperfused hearts than in those from the control hearts. Amytal inhibited the mitochondrial superoxide generation significantly and also suppressed MDA production in the reperfused hearts. Additionally, Amytal prevented the contractile dysfunction and the increased release

of LDH observed in the reperfused hearts. In conclusion, these results indicate that the respiratory chain of mitochondria may be an important source of oxygen radical formation in post-ischemic reperfused hearts, and that oxygen radicals originating from the mitochondria may contribute to the development of myocardial reperfusion injury.

**Key Words:** Heart, Reperfusion injury, Oxygen free radical, Mitochondria

## 서 론

관상혈류 차단에 의한 허혈성 심근손상은 시간 경과에 따라 역동적으로 진행되기 때문에 비가역적 괴사를 방지하기 위해서는 가능한 한 빠른 시간 내에 혈류를 재개시켜야 된다. 그러나 허혈심근의 재관류는 허혈기간이 어느 정도 진행된 후에는 임상적으로 유효한 효과를 가져오지 못할 뿐만 아니라 경우에 따라서는 오히려 세포손상이 가속화되는 역설적인 재관류 손상을 일으키기도 한다 (Ganote 등, 1975; Hearse, 1977). 따라서 이러한 문제에 대한 대처방안을 강구하기 위해서는 허혈/재관류 심장의 심근손상기전에 대한 명확한 이해가 있어야 되나 아직 그 기전에 불분명한 점이 많다.

허혈성 심장병변 및 재관류 손상에 있어서 심근 세포 손상은 에너지대사의 이상, 전해질 불균형 등을 위시하여 각종의 생화학적 및 생리학적 요인들의 복합적인 상호작용 결과로 발생하며 근자에는 반응성 산소라디칼( $O_2^{\cdot-}$ , superoxide anion;  $H_2O_2$ , hydrogen peroxide;  $OH^{\cdot}$ , hydroxyl radical)이 세포손상을 야기하는 또 하나의 인자로서 그 중요성이 인정되고 있다(Hess and Manson, 1984; McCord and Roy, 1982). 심근조직이 허혈 또는 저산소 상태에 처해 있을 때에는 각종 환원 물질이 축적되며 이러한 상황에서 산소가 재공급되는 경우 산소 분자의 일가환원 대사산물인 산소라디칼이 생성될 수 있다. 허혈/재관류 심장에서 산소라디칼의 가능한 출처로는 xanthine oxidase(Lim and Kim, 1988), activated leukocyte(Jolly 등, 1986), 그리고 미토콘드리아(Otani 등, 1984)가 거론되고 있으나 이들 각각이 어느 정도

재관류손상에 기여하는지는 불분명하다.

미토콘드리아의 호흡사슬에는 많은 양의 산소와 전자가 존재하므로 일반적으로 미토콘드리아는 산소라디칼 생성의 중요한 출처의 하나로 여겨진다(Boveris, 1977). 실제로 in vitro 조건에서 미토콘드리아의 호흡과정 중에 상당량의 산소라디칼이 생성되며(Muscari 등, 1990), 미토콘드리아에서 발생한 산소라디칼이 노화를 비롯한 여러 퇴행성 질환의 병인으로 작용한다는 보고들이 많이 있다(Sohal과 Sohal, 1991). 그러나 허혈후 재관류 심장에서 산화성 심근손상을 야기하는 산소라디칼의 출처로서 미토콘드리아의 중요성은 in vitro 실험 결과들로 부터 추론되고 있을 뿐 in vivo나 장기 수준에서는 거의 검증되지 못하고 있다. 따라서 본 연구에서는 미토콘드리아에서 발생된 산소라디칼이 허혈/재관류손상에 있어 주요 독성매개인자로 작용할 가능성을 흰쥐 적출심장과 미토콘드리아 호흡사슬(complex I)의 가역적 차단제인 Amytal을 이용하여 장기수준에서 검토하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1) 연구 재료

실험동물은 체중 200 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. Superoxide dismutase, NADH, antimycin A, BHT, thiobarbituric acid 등은 Sigma사 제품을 사용하였고, MCLA는 Tokyo Kasei사 제품을, amobar-bital sodium은 Lilly사(IP, USA) 제품을 사용하였다. 기타 모든 시약들은 특급시약을 사용하였다.

### 2) 허혈-재관류손상 유도 및 약물처리

흰쥐에 30 mg/kg 용량으로 sodium pentobarbi-

tal을 복강주사하여 마취시킨 후 인공호흡 상태에서 흉부를 절개하였다. 대동맥을 절개하여 삽입관을 삽입한 다음 폐장을 포함한 주위조직을 제거하고 곧이어 Langendorff 관류장치에 대동맥 삽입관을 연결시켜 역방향 관류를 하였다. 관류액은 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>로 포화시킨 Krebs-Henseleit (K-H) 완충용액 (NaCl 118 mM, NaHCO<sub>3</sub> 27.2 mM, KCl 4.8 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.25 mM, Glucose 10 mM, pH 7.4)을 80 cmH<sub>2</sub>O의 일정 압력으로 관류하였고, 심장 온도를 37°C로 일정하게 유지하였다. 충분히 산소가 포화된 K-H용액으로 15분 동안 관류하여 심기능이 안정화된 후, 대동맥 삽입관에 장치된 3-way 코크를 막아 심장 전체허혈(global ischemia)을 유도하였다. 30분 허혈을 지속한 다음 다시 3-way 코크를 열어 20분 동안 재관류시켜 허혈/재관류 손상을 유도하였으며 대조심장은 K-H용액을 65분 동안 계속 관류하였다. 모든 심장은 실험이 끝나면 종축으로 4등분하여 표면에 묻은 물기를 닦아 내고 무게(wet weight)를 측정하였다. 항산화제인 BHT(butylated hydroxytoluene, 5 μM)와 미토콘드리아 호흡사슬 차단제인 Amytal(amobarbital sodium, 5 mM)은 K-H 용액에 녹여 허혈전 1분부터 재관류 5분까지 관류시켰다.

### 3) 미토콘드리아 분리

심장을 가위로 잘게 자른 다음 균질용액(0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4)으로 2내지 3회 조직절편을 세척하였다. 조직절편에 4배 용량의 냉각된 균질용액을 넣고 Potter-Elvehjem homogenizer로 조직을 균질화하였다. 이 균질액을 1,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 10,000 g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액은 비미토콘드리아 분획으로 취하고, 침전물은 동일한 용량의 균질용액으로 부유시킨 후 Potter-Elvehjem homogenizer로 다시 균질화한 다음 10,000 g에서 15분간 원심분리하여 침전된 미토콘드리아 분획을 얻었다. 모든 조작은 4°C 이하에서 시행하였으며 단백질

농도는 Lowry등(1951)의 방법으로 측정하였다.

### 4) 심기능 지표

심기능의 지표로서 심박수와 좌심실 압력을, 그리고 관상관류량을 측정하였다. 좌심실 압력은 끝에 balloon이 붙은 20G의 plastic 삽입관을 승모관을 통해서 좌심실에 삽입하고 압력변환기에 연결한 후, 생리기록계를 이용해서 측정하였다. 이때 안정화된 심장의 좌심실 이완기말 압력(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)이 5 mmHg가 되도록 balloon을 팽창시켰다. 심박수는 1분간 기록된 수축 횟수로 알 수 있으며 좌심실 압력 중 이완기말 압력은 심근의 contracture 정도를, 수축기말 압력과 이완기말 압력의 차이(developed pressure)는 심장의 수축력을 나타내는 지표로 사용하였다. 또한 심장의 혈액순환 능력(심기능 지수)은 developed pressure에 심박수를 곱하여 산출하였고, 허혈조작전과 허혈후 재관류에서의 이 수치를 비교하여 재관류후 심기능 회복률을 계산하였다.

### 5) 심근세포 손상의 지표

세포질 효소인 lactate dehydrogenase(LDH)의 유출을 심근세포 손상의 지표로 삼았다. 재관류 시작후 5분 동안 관류액을 받아 양을 측정하고 이를 얼음 속에 보관하여 8시간 내에 효소 측정 시료로 사용하였다. LDH 활성은 48 mM phosphate buffer(pH 7.5), 0.6 mM sodium pyruvate, 0.18 mM NADH를 함유한 반응계에 관류액 시료 0.5 ml를 첨가한 후 25°C에서 NADH가 NAD로 산화되는 과정을 340 nm에서의 흡광도 변화로 기록 측정하였다(Bergmeyer과 Bernt, 1974).

### 6) 지질과산화 측정

심근조직의 산화성 손상 척도로 관상관류액으로 유출되는 지질과산화 산물인 malondialdehyde(MDA)를 thiobarbituric acid(TBA)방법(Yagi, 1982)으로 측정하였다. 재관류 20분간 모은 관류

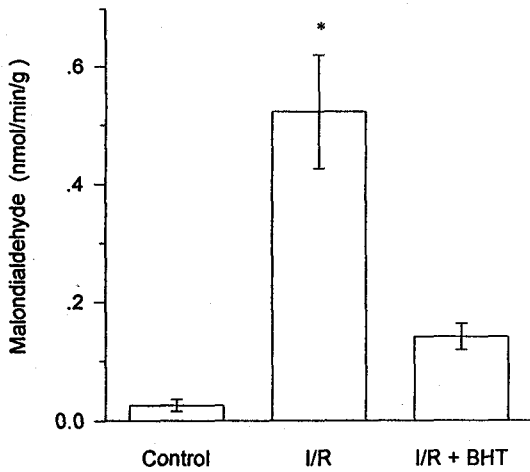
액 시료 2.4 ml에 0.67% TBA와 glacial acetic acid의 1:1 혼합액 0.6 ml를 넣고 60분간 끓는 수욕조에서 반응시킨 후 실온까지 냉각시키고 532 nm의 흡광도를 측정하였다.

심근 미토콘드리아와 비미토콘드리아 분획에서의 MDA 측정은 Ohkawa등(1979)의 방법에 준하여 측정하였다. 각 분획시료 0.2 ml에 0.2 ml의 8.1% SDS와 1.5 ml의 20% acetic acid(pH 3.5 adjusted with NaOH) 그리고 1.5 ml의 0.8% TBA용액을 첨가하였다. 여기에 탈이온수를 첨가하여 전체 용량이 4 ml가 되게 하고 cap-tube에 넣어 60분간 95°C에서 증탕한다. 충분히 식힌 후 1 ml 탈이온수와 5 ml의 n-butanol과 pyridine (15:1, v/v) 혼합액을 넣고 잘 섞었다. 4,000

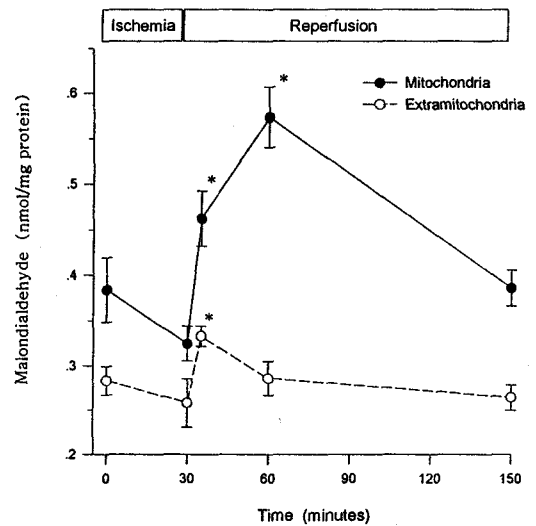
rpm, 10분간 원심분리하여 유기용매층을 취해서 532 nm의 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 흡광계수  $1.52 \times 10^5 / \text{M/cm}$ 를 이용하여 계산하였다.

### 7) $\text{O}_2\cdot^-$ 생성 측정

미토콘드리아의  $\text{O}_2\cdot^-$  생성은 MCLA(2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazol[1, 2- $\alpha$ ]pyrazin-3-one)를 이용한 chemiluminescence 방법으로 측정하였다(Minagawa등, 1992). 미토콘드리아(0.1 mg)를 1 ml의 반응액(10 mM Tris, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4, 0.3 M sucrose, 10 mM KCl, 0.05 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 uM antimycin A, and 4 uM MCLA)에 넣고 5분간 chemiluminescence가 안정화되도록 기다린 후 glutamate(2.5 mM)와 malate(2.5 mM)를 첨가하여 미토콘드리아의 호흡을 유도하면서 chemiluminescence의 변화를 관찰하였다. 이상의 반응은 30°C에서 시행하였으



**Fig. 1.** Lipid peroxidation in post-ischemic reperfused rat hearts. Lipid peroxidation was estimated from malondialdehyde in coronary effluent collected during reperfusion. Malondialdehyde was measured by the thiobarbituric acid method. Hearts were subjected to 30 min of global ischemia followed by 20 min of reperfusion(I/R). Control hearts were perfused continuously for 65 min with oxygenated K-H solution(Control). An antioxidant, BHT(5 uM) was treated from 1 min before ischemia to 5 min of reperfusion. Each bar represents mean  $\pm$  SE of six experiments. \*:  $p < 0.05$  vs. Control by unpaired t-test.



**Fig. 2.** Lipid peroxidation in mitochondrial and extramitochondrial fractions from hearts. Lipid peroxidation was estimated from malondialdehyde in each fraction. Malondialdehyde was measured by the thiobarbituric acid method. Each point represents mean  $\pm$  SE of six experiments. \*:  $p < 0.05$  vs. control(0 time) by unpaired t-test.

며, 반응시 증가하였던 chemiluminescence가 superoxide dismutase(50 units)에 의해 완전히 소실됨을 관찰하므로서 superoxide anion의 생성여부를 확인하였다.

## 연구 결과

### 1) 허혈/재관류 심장의 지질과산화

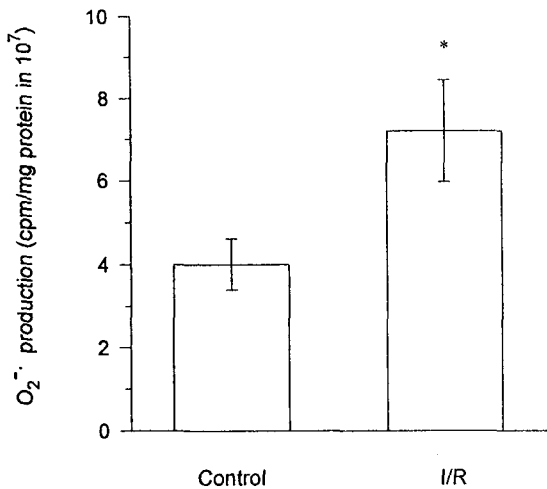
허혈후 재관류 심장에서 산소라디칼에 의한 산화성 손상을 검토하기 위하여 관류액으로 유출되는 지질과산화 산물, MDA를 thiobarbituric acid 방법으로 측정하였다. 허혈심장의 재관류와 더불어 MDA 유출은 급격히 증가하였으며, 이러한 MDA 유출은 항산화제인 BHT에 의하여 현저히 억제되었다(Fig. 1). 이러한 결과는 허혈/재관류시 산화성 조직손상이 급격히 진행되며, 본 연구에서 측정된 MDA는 산화손상의 산물임을 시사한

다.

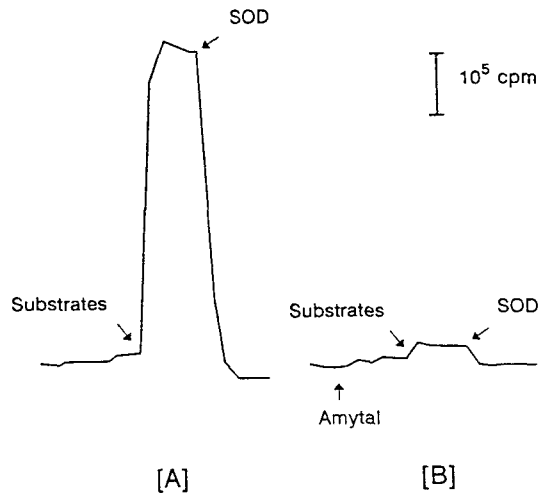
한편 미토콘드리아의 MDA 함량은 재관류초기부터 급격히 증가하기 시작하여 재관류 30분까지 계속 증가하였으며(152% vs. preischemic value), 재관류 2시간에는 다시 허혈전 수치로 내려가는 양상을 보였다. 그러나 비미토콘드리아 분획에서는 재관류 5분에 MDA 함량이 약간 증가하였으나(118% vs. preischemic value) 곧 감소하여 재관류 30분에는 허혈전 수치를 보였다(Fig. 2). 이러한 결과는 허혈/재관류시 미토콘드리아에서 산화반응이 더 많이 일어나며 오래 지속됨을 시사한다.

### 2) 미토콘드리아의 $O_2\cdot^-$ 생성

Glutamate와 malate를 첨가하여 미토콘드리아의 호흡을 유도하였을 때 허혈조작을 가하지 않은 대조 심장 미토콘드리아에서도 상당량의  $O_2\cdot^-$  생



**Fig. 3.** Superoxide radical production in heart mitochondria. The rates of superoxide production were estimated in mitochondria isolated from hearts at 20 min of reperfusion by measuring MCLA-dependent chemiluminescence. Each bar represents mean  $\pm$  SE of six experiments. Control and I/R hearts are as same as in Fig. 1. \*:  $p < 0.05$  vs. Control by unpaired t-test.

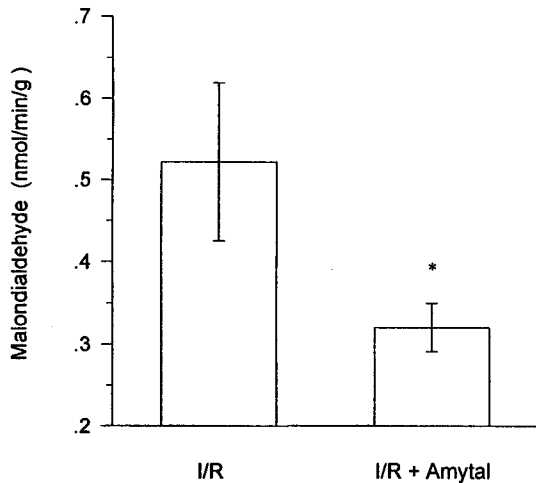


**Fig. 4.** Effect of Amytal on superoxide radical production in heart mitochondria. Mitochondria were isolated from hearts subjected to 20 min of reperfusion. The rates of superoxide production were estimated by measuring MCLA-dependent chemiluminescence. Mitochondrial respiration was initiated by additions of respiratory substrates, glutamate and malate. [A]: in the absence of Amytal; [B]: in the presence of Amytal.

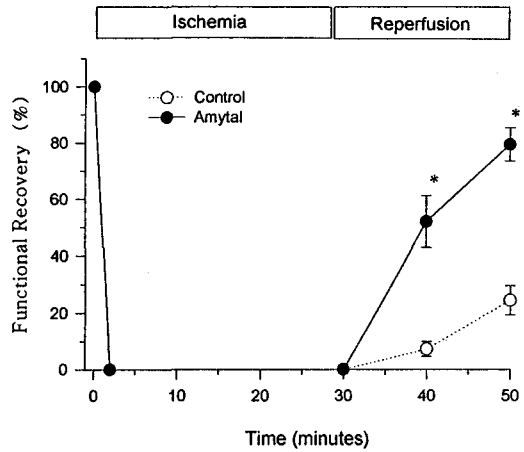
성이 관찰되었다. 그러나 허혈/재관류 심근 미토콘드리아에서의  $O_2\cdot^-$  생성은 더욱 증가되어 대조군의 180%에 달하였다(Fig. 3). 이러한  $O_2\cdot^-$  생성은 미토콘드리아 호흡사슬의 complex I site 차단제인 Amytal에 의해 완전히 억제되었다(Fig. 4).

### 3) 허혈/재관류손상에 대한 Amytal의 효과

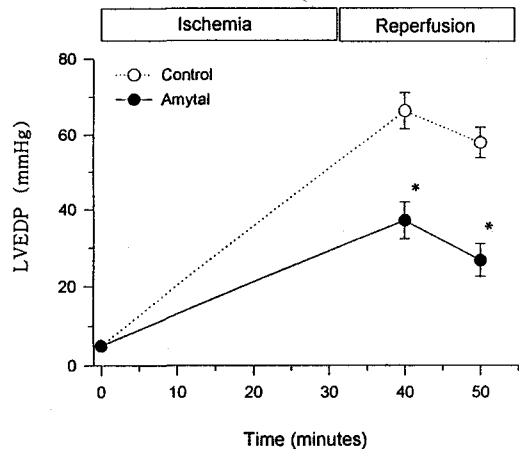
미토콘드리아에서 생성되는 산소라디칼이 허혈/재관류손상에 기여하는 정도를 평가하기 위하여 Amytal로 미토콘드리아 산소라디칼의 생성을 차단시킨 상태에서 허혈/재관류손상의 변화를 관찰하였다. Amytal은 허혈/재관류 심장의 MDA 유출을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 5). 또한 Amytal은 재관류시 심기능 회복을 현저히 촉진하여 재관류 20분에는 심기능이 대조군의 약 300%에 이르렀고(Fig. 6), 재관류시 이완기말압력의



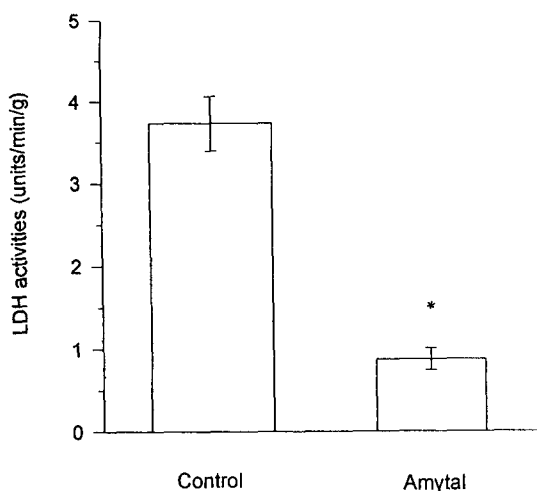
**Fig. 5.** Effect of Amytal on lipid peroxidation in post-ischemic reperfused rat hearts. Lipid peroxidation was estimated from malondialdehyde in coronary effluent collected during reperfusion. Amytal(5 mM) was treated from 1 min before ischemia to 5 min of reperfusion. Each bar represents mean $\pm$ SE of six experiments. \*:  $p < 0.05$  vs. I/R by unpaired t-test.



**Fig. 6.** Effect of Amytal on functional recovery in post-ischemic reperfused rat hearts. Functional index(left ventricular developed pressure x heart rate) was calculated at 10 min and 20 minutes of reperfusion and expressed as percent of preischemic value. Each point represents mean $\pm$ SE of six experiments. Amytal was treated as same as in Fig.5. \*:  $p < 0.05$  vs. Control by unpaired t-test.



**Fig. 7.** Effect of Amytal on left ventricular end-diastolic pressure in post-ischemic reperfused rat hearts. LVEDP was calculated at 10 min and 20 minutes of reperfusion. Each point represents mean $\pm$ SE of six experiments. Amytal was treated as same as in Fig. 5. \*:  $p < 0.05$  vs. Control by unpaired t-test.



**Fig. 8.** Effect of Amytal on the release of lactic dehydrogenase in post-ischemic reperfused rat hearts. LDH activities were assayed in coronary effluent collected during reperfusion. Each bar represents mean  $\pm$  SE of six experiments. Amytal was treated as same as in Fig. 5. \*:  $p < 0.05$  vs. Control by unpaired t-test.

증가를 대조군의 50% 수준으로 낮추었다(Fig. 7). 뿐만 아니라 Amytal은 허혈/재관류에 따른 LDH 유출 증가를 현저히 감소시켰다(Fig. 8).

## 고 찰

본 연구는 허혈/재관류 심근손상의 발생에 있어서 미토콘드리아에서 생성된 산소라디칼이 독성매개인자로 작용할 가능성을 검토하고자 미토콘드리아의 산소라디칼 생성과 산화손상을 측정하고 미토콘드리아 호흡사슬 억제제인 Amytal의 허혈/재관류손상 방지효과를 관찰하였다. 허혈/재관류 심근 미토콘드리아에서는  $O_2\cdot$  생성과 MDA 생성이 증가하였으며, 이는 Amytal에 의하여 억제되었다. 또한 Amytal은 재관류 심근의 MDA 유출을 억제함과 더불어 재관류 심장의 심기능 저하와 세포손상을 현저히 방지하였다. 이러한 결과는 미토콘드리아에서 발생된 산소라디칼이 허혈/재관류

심근손상에 있어 주요 독성매개인자로 작용할 가능성을 시사하는 바라고 여겨진다.

허혈/재관류 심장에서 산소라디칼의 가능한 출처로는 미토콘드리아를 포함하여 xanthine oxidase, 백혈구등이 있다. 본 연구에서는 순환 백혈구가 없는 적출심장 관류모형을 이용하였기 때문에 산소라디칼 출처로서 백혈구의 가능성은 배제할 수 있으나 xanthine oxidase의 가능성은 남아 있다. Xanthine oxidase는 purine대사에 관여하는 세포질 효소로 간, 장관 등 여러 장기의 허혈/재관류시 중요한 산소라디칼 출처로서 역할함이 알려져 있다(Park 등, 1988; Hearse 등, 1986). 그러나 허혈/재관류 심장의 경우 산화성 손상을 야기하는 산소라디칼의 출처로서 xanthine oxidase가 모든 동물에서 공통적으로 중요한 역할을 할 수 있을지에 대해서는 논란의 여지가 있다. 왜냐하면 이 효소는 다른 장기에 비하여 심장조직에서 그 활성이 낮을 뿐아니라 혈관 내피세포에 국한하여 존재하며(Muxfeldt and Schaper, 1987), 또한 사람 및 토끼 등 동물의 종에 따라서는 이 효소의 심장 분포가 극히 적기 때문이다(Forman 등, 1990). 본 연구에서 허혈후 재관류 심근 미토콘드리아에서 비미토콘드리아 분획에서보다 지질과산화화 더욱 현저한 결과는 xanthine oxidase를 포함한 비미토콘드리아 기전 보다는 미토콘드리아가 산화성 손상을 유발하는데 더 많이 관여할 가능성이 있음을 시사하는 결과라고 여겨진다.

미토콘드리아는 세포가 이용하는 총 산소의 90% 이상을 소모하며 호흡사슬에는 많은 양의 전자가 존재하기 때문에 정상적인 미토콘드리아의 호흡과정에서도 소량이나마 산소분자의 일가환원이 끊임 없이 이루어진다(Turrens and Boveris, 1980). 이와같이 정상적인 미토콘드리아의 호흡사슬에서 끊임 없이 생성되는 산소라디칼은 조직세포의 산화성 변성을 누적시키므로써 노화를 비롯한 퇴행성 만성질환을 이끄는 원인이 되기도 한다(Sohal, 1984). 또한 미토콘드리아의 산소라디칼 생성은 호흡사슬내 전자흐름이 차단되거나 redox cycling 물질에 의해 전자가 호흡사슬에서

분리될 경우에 더욱 증가된다. 실제로 일산화탄소 중독, paraquat 독성, adriamycin 독성 등의 급성 질환에서 미토콘드리아의 산소라디칼 생성이 증가된다는 보고들이 많이 있다(Forman and Boveris, 1982). 한편 미토콘드리아의 산소라디칼 생성 증가는 상기한 바와 같은 급만성 질환들의 직접적인 병인이 될 뿐만 아니라 미토콘드리아 자체의 호흡사슬이나 DNA에 산화성 손상을 또한 유발함으로써 결과적으로 세포의 에너지 이용을 저해하고 조직손상을 촉진할 수도 있다(Forman and Boveris, 1982). 허혈/재관류 조직에서 미토콘드리아의 미세구조 변형(Virmani 등, 1990), 호흡기능 상실(Jones, 1995), ATP 생성 저하(Sano 등, 1995) 등이 있다는 보고들은 이를 뒷받침한다. 본 연구에서도 미토콘드리아의 MDA 함량이 재관류 초기부터 급격히 증가된 사실은 미토콘드리아에서 생성된 산소라디칼이 미토콘드리아 자체의 산화성 손상을 이룰 수 있는 가능성을 시사한다.

허혈/재관류시 심근세포의 항상성이 파괴되는 경우 미토콘드리아의 호흡사슬도 손상을 받을 수 있으며, 이와같이 손상된 호흡사슬에서는 전자의 흐름이 정체되어 산소라디칼 생성이 증가될 가능성이 있다. 따라서 허혈/재관류 심장에서 증가되는 미토콘드리아의 산소라디칼 생성이 산화성 조직손상의 일차적 원인인지 아니면 다른 기전에 의한 세포손상의 이차적 결과인지에 관하여 이론이 있을 수 있다. 그러나 본 연구에서 미토콘드리아 호흡사슬중 산소라디칼 발생부위 complex 1의 가역적 차단약물인 Amytal을 처치하여 미토콘드리아의 산소라디칼 생성을 차단한 경우 허혈/재관류 손상이 거의 완전히 방지되는 것으로 볼때 일차적으로 미토콘드리아에서의 산소라디칼 발생 증가가 허혈/재관류손상의 원인으로 작용한다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

Bergmeyer HU and Bernt E: *UV assay of lactate*

*dehydrogenase activity with pyruvate and NADH. In Method of Enzymatic Analysis, vol II, 2nd Ed, (ed. HU Bergmeyer) Academic Press, New York, pp 574-579, 1974*

Boveris A: *Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide. Adv Exp Biol Med 78: 67-72, 1977*

Ferrari R, Pedersini P, Bongrazio M, Gaia G, Bernocchi P, Di-Lisa F and Visioli O: *Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischemia and reperfusion. Basic Res Cardiol 88: 495-512, 1993*

Forman HJ and Boveris A: *Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. In Free radicals in biology, vol 5, (ed. WA Pryor), Academic Press, New York, pp 65-90, 1982*

Forman MB, Virmani R and Puett DW: *Mechanism and therapy of myocardial reperfusion injury. Circulation 81: IV69-IV78, 1990*

Ganote CE, Seabra-Gomes R and Nayler WG: *Irreversible myocardial injury in anoxic perfused rat heart. Am J Pathol 80: 416-450, 1975*

Hearse DJ, Manning AS and Downey JM: *Xanthine oxidase: a critical mediator of myocardial injury during ischemia and reperfusion? Acta Physiol Scand 548(suppl): 65-78, 1986*

Hearse DJ: *Reperfusion of ischemic myocardium. J Mol Cell Cardiol 9: 605-616, 1977*

Hess ML and Manson NH: *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 49: 892-900, 1984*

Jolly SR, Kane WJ, Hook BG, Abrams GD, Kunkel SL and Lucchesi BR: *Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. Am Heart J 112: 682-690, 1986*

Jones DP: *Mitochondrial dysfunction during anoxia and acute cell injury. Biochim Biophys Acta 1271: 29-33, 1995*

Lim Y and Kim MS: *Role of xanthine oxidase in*



- reperfusion injury in ischemic myocardium. Seoul J Med* 29: 131-142, 1988
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: *Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem*, 193: 265-275, 1951
- McCord JM and Roy RS: *The pathophysiology of superoxide: Roles in inflammation and ischemia. Can J Physiol Pharmacol* 60: 1346-1352, 1982
- Minagawa N, Koga S, Nakano M, Sakajo S and Yoshimoto A: *Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in Hansenula anomala. FEBS Lett* 302: 217-219, 1992
- Muscari C, Frascaro M, Guarnieri C and Calderara CM: *Mitochondrial function and superoxide generation from submitochondrial particles of aged rat hearts. Biochim Biophys Acta* 1015: 200-204, 1990
- Muxfeldt M and Schaper W: *The activity of xanthine oxidase in heart and liver of rats, guinea pigs, pigs, rabbits, and human beings. Circulation* 76: IV-198, 1987
- Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K: *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem* 95: 351-358, 1979
- Otani J, Tanaka H and 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
- Park JW, Kim MS and Park CW: *Role of calcium in reperfusion damage of ischemic myocardium: Influence on oxygen radical production. Korean J Toxicol* 4: 23-35, 1988
- Sano W, Watanabe F, Tamai H, Furuya E and Mino M: *Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver. Gastroen-tology* 108: 1785-1792, 1995
- Sohal RS and Sohal BH: *Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. Mech Ageing Dev* 57: 187-202, 1991
- Sohal RS: *Metabolic rate, free radicals, and aging. In Free Radicals in Molecular Biology, Aging, and Disease (eds. D Armstrong, RS Sohal, RG Cutler and TF Slater) Raven Press, New York, pp 119-127, 1984*
- Turrens JF and Boveris A: *Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J* 191: 421-427, 1980
- Virmani R, Forman MB and Kolodgie FD: *Myocardial reperfusion injury. Circulation* 81: IV57-IV68, 1990
- Yagi K: *Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In Lipid peroxide in biology and medicine, Academic Press, New York, pp 223-242, 1982*