

선택적 iNOS 억제에 의한 골격근 재관류 손상의 감소

고려대학교 의과대학 정형외과학교실

박종웅* · 이광석 · 김성곤 · 박정호 · 왕준호 · 전우주 · 이정일

— Abstract —

Selective iNOS Inhibition Attenuates Skeletal Muscle Reperfusion Injury

Jong Woong Park, M.D.*, Kwang Suk Lee, M.D., Sung Kon Kim, M.D., Jung Ho Park, M.D.,
Joon Ho Wang, M.D., Woo Joo Jeon, M.D., Jeong Il Lee, M.D.

Department of Orthopedic Surgery, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

The purpose of this study is to determine the effects of selective inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor N-[3-aminomethyl]benzyl]acetamidine (1400W) on the reperfused cremaster muscle. The extracellular superoxide dismutase knockout (EC-SOD^{-/-}) mice was used to make the experimental window for ischemia-reperfusion injury. The muscle was exposed to 4.5 h of ischemia followed by 90 min of reperfusion and the mice received either 3 mg/kg of 1400W or the same amount of phosphate buffered saline (PBS) subcutaneously at 10 min before the start of reperfusion. The results showed that 1400W treatment markedly improved the recovery of the vessel diameter and blood flow in the reperfused cremaster muscle compared to that of PBS group. Histological examination showed reduced edema in the interstitium and muscle fiber, and reduced nitrotyrosine formation (a marker of total peroxynitrite (ONOO⁻)) in 1400W-treated muscle compared to PBS. Our results suggest that iNOS and ONOO⁻ products are involved in skeletal muscle I/R injury. Reduced I/R injury by using selective inhibition of iNOS is perhaps via limiting cytotoxic ONOO⁻ generation, a reaction product of nitric oxide (NO) and superoxide anion (O₂⁻). Thus, inhibition of iNOS appears to be a good treatment strategy in reducing clinical I/R injury.

Key Words: iNOS inhibitor, Extracellular SOD, Reperfusion, Muscle, Mouse

※통신저자: 박 종 웅

경기도 안산시 단원구 고잔동 516

고려대학교 의료원 안산병원 정형외과

Tel: 82-31-412-6583, Fax: 82-31-487-9502, E-mail: ospark@korea.ac.kr

I. 서 론

허혈/재관류 (ischemia/reperfusion: I/R) 손상은 다양한 원인에 의해 발생하며, 이로 인한 병리적, 물리적 변화는 궁극적으로 조직의 기능을 손상시킨다. I/R 손상의 정확한 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않지만, 활성 산화물(reactive oxygen species: ROS)과 활성 질화물(reactive nitrogen species: RNS)은 I/R 손상에 밀접하게 관련되어 있다.

산화질소(nitric oxide:NO)는 세가지 산화질소 합성효소 (nitric oxide synthase: NOS) 에 의하여 생성되며, nNOS, iNOS, eNOS가 있다.¹ 세가지 NOS 모두 정상 및 재관류 골격근에 존재한다.^{2,3} 국소적 반응의 매개체로서 NO는 I/R 손상에서 조직을 보호하는 효과와 조직 손상을 심하게 하는 두 가지 효과를 모두 가지고 있다.^{4,6} 보고에 의하면 I/R은 골격근과 말초신경에서 iNOS 생성을 급격히 증가시키고 iNOS^{-/-} 쥐에서는 I/R 손상이 감소된다고 하였으며^{7,9}, iNOS로 부터 생성된 과량의 NO는 세포독성을 일으키는 원인이 된다.^{1,10} 텍사메타손을 사용한 iNOS 억제 시 재관류 근육의 수축 기능 저하를 줄이고, iNOS 억제제인 N-(2-(aminomethyl) benzyl) acetamidine (1400W)이 골격근에서 초기 재관류 손상을 감소시킨다는 보고⁷는 iNOS 발현 억제가 초기 재관류 손상에 도움이 됨을 시사하는 결과이나 그 작용 기전이 정확히 밝혀지지 않아 더 연구가 필요한 부분이다.

I/R 손상에는 NOS와 더불어 ROS에 의한 산화 손상이 관련되어 있으며 항산화 방어 기전이 깊이 연관되어 있다. 정상적인 상황에서는 superoxide dismutase (SOD)가 과량의 O₂⁻를 H₂O₂ 와 O₂로 변환시킨다.¹¹ 세포 내 SOD인 CuZn-SOD와 Mn-SOD¹² 는 각 각 세포질과 미토콘드리아에 존재한다. 세포 외 SOD인 EC-SOD¹³ 는 세포 외 간질에 존재하며^{14,15} 주로 세포 외에서 생성되는 ROS로부터 조직을 보호하는 역할을 한다. 특히 혈관에서 EC-SOD는 전체 SOD 역할의 45~70% 를 차지하며¹⁶⁻¹⁸, 혈관 세포벽에 고르게 분포된다.^{17,19,20} 최근 까지도 EC-SOD의 생리적 중요성은 완전히 이해되지 않고 있지만 EC-SOD가 세포막과 제1형 교원질에 결합하고 O₂ 공격에 대하여 세포와 교원질 섬유를

보호한다는 증거가 제시되고 있다.^{21,22}

저자의 최근 연구에서 EC-SOD knockout 생쥐 (EC-SOD^{-/-})는 골격근 I/R 손상에 취약하고 EC-SOD^{-/-} 생쥐는 O₂⁻생성이 증가되어 있음을 알 수 있다.²³ 그러나 EC-SOD^{-/-} 생쥐에서 비정상적으로 증가된 O₂⁻생성이 심한 I/R 손상을 일으키는 기전은 아직 명확하지 않다.

본 연구는 재관류 시 생성되는 O₂⁻와 NO의 결합체인 peroxynitrite (ONOO⁻)가 EC-SOD^{-/-} 생쥐에서 골격근 I/R 손상을 일으키는 주된 원인이며, 따라서 선택적으로 iNOS의 생성을 억제하면 궁극적으로 ONOO⁻ 생성을 감소시켜 골격근의 I/R 손상을 줄일 수 있다고 가정하였다. 가설의 입증을 위해 EC-SOD^{-/-} 생쥐의 거고근을 이용하여 I/R 손상을 유도하였으며, 선택적 iNOS 억제제인 1400 W의 효과를 관찰하였다.

II. 대상 및 방법

25~30 g의 수컷 EC-SOD^{-/-} 생쥐를 두 그룹으로 나누고 재관류 10분전에 피하로 1400W (3 mg/kg; n=16)를 주거나 같은 양의 PBS (n=16)를 투여하였다. I/R 전, 후 양쪽 군의 모든 생쥐에서 거고근 혈관의 직경변화와 총 혈류량을 측정하였다.

1400W가 미치는 전신적인 영향을 알아보기 위해 비 침습적 혈압기 (Hatteras, SC-1000, Cary, NC)를 이용하여 4마리 생쥐의 꼬리에서 평균 동맥압 (MAP)과 평균 심박동(MHR)을 측정하였다.

거고근 유경 피판의 준비: 생쥐의 복강내에 Nembutal (50 mg/kg; Abbott Laboratories, North Chicago, IL) 을 주사하여 전신마취를 유도하였다. 거고근의 앞벽을 종을 가른 후 고환을 제거하였다. 거고근을 지배하는 pudic-epigastric 동맥과 정맥을 박리하여 이 혈관들로만 연결된 거고근 유경 피판을 거상하고 신경은 절단하였다. 준비된 거고근 유경 피판을 투명한 아크릴판에 펼쳐놓고 사방으로 봉합사를 이용하여 견인함으로써 거고근이 얇고 넓게 퍼진 채로 유지되게 하였다. 주위의 산소와 다른 기체들이 근육으로 확산되는 것을 막기 위하여 산소 불투과 플라스틱 막 (Saran Wrap, Dow Chemical Co, Indianapolis, IN)으로 거고근 피판을 덮었다. 허혈 유도 전 거고근 혈관 지도

를 작성하고 혈관 직경을 측정하였으며, 레이저 도플러를 이용하여 총 혈류량을 기록하였다. 비 외상성 미세혈관 결자 (ST-B-1 VB, ASSI, Westbury, NY)로 주된 혈관경을 압박함으로써 4.5시간 동안 거고근의 완전 허혈을 유발시켰다. 4.5시간 후 결자를 풀어 90분간 재관류 시키면서 혈관 내경의 변화와 혈류량의 변화를 10분 간격으로 기록하였다.

혈관 직경의 측정: 비디오 측정 장비가 장착된 현미경 (Super-Lux 40, Carl Zeis, Oberkochen, Germany) 하에서 거고근 혈관변화를 평가하였다. 허혈 전 거고근 혈관 지도에서 직경 10~70 μm 의 동맥들을 10~20 μm , 21~40 μm , 41~70 μm 세 군으로 나누고 각 군에 해당하는 혈관을 5군데씩 설정하여 혈관내경을 비디오 측정기 (FOR/AIV-560, Sony)로 측정 후 기록하였다. 4.5시간의 허혈 후 90분간의 재관류 기간 중 10분 간격으로 동일 지점의 혈관 내경 변화를 연속하여 측정하였다.

혈류 측정: 근육의 총 혈류 변화는 레이저 도플러 (Moor Instrument, Devon, UK)를 이용하여 측정하였다. 도플러에 연결된 1 mm 직경의 probe를 혈관경 바로 위에 위치시키고 허혈 유도 전에 총 혈류량을 측정한 후 재관류 90분 동안 지속적으로 혈류의 변화를 기록하여 매 10분마다 허혈전 값과 비교하였다.

조직검사: 90분의 재관류 후 거고근을 떼어내어 10% 포르말린에 담근 후 H&E 염색하였다. O_2 와 NO의 결합에 의해 생성되는 ONOO의 양을 측정하기 위하여, 면역조직염색을 시행하여 조직과 peroxynitrite의 결합에 의한 nitrotyrosine 발현을 검출하였다. 거고근 채취 후 isopantane 으로 처리된 냉동 절편 근육 표본들을 5 μm 두께로 잘랐으며 poly-L-lysine이 코팅된 슬라이드에 놓고 10분간 아세톤으로 고정하였다. 슬라이드는 내부에서 생성되는 과산화 효소의 작용을 막기위해 30분간 메탄올에서 0.3% 과산화수소로 처리하였고, 상온에서 1시간동안 10% goat serum / 0.3% Triton X-100로 처리 하였다. 2시간 동안 monoclonal mouse anti-nitrotyrosine antibody (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)로 incubation 후 0.3% Triton X-100로 씻어냈다. 이후 biotinylated goat anti-rabbit antibody 로 1시

간 동안 incubation 후 avidin/biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC, Vector Lab, Burlingame, CA)로 처리하였다. 항체 결합부는 DAB substrate kit를 이용하여 시각화 하였다. 슬라이드는 hematoxyline으로 대조 염색을 하였으며, 음성 대조군은 1차 항체 대신 불특정 serum rabbit IgG 로 incubation하였다.

통계분석: 재관류 동안 혈관 직경과 혈류의 변화는 허혈 전 측정치와 비교한 백분율로 표시하였다. 모든 값들은 평균 \pm 표준편차(SEM)로 나타내었다. 결과는 이원분산분석법(two-way ANOVA)으로 분석하였다. 각 시점에서의 결과분석은 일원분산분석법(one-way ANOVA)을 이용하였다. $p < 0.05$ 의 경우 통계적으로 유의하게 정의하였다.

III. 결 과

1400W의 전신적 영향: 허혈전 MAP 와 MHR 은 EC-SOD^{-/-} 생쥐에서 실험군 간 유의한 차이를 보이지 않았다. 약제 투여 후 1400W 군은 MAP가 투여 전의 104.9 \pm 8.5%에서 117.7 \pm 6.1%로 변화를 보였고, PBS군은 97.0 \pm 6.1%에서 101.9 \pm 4.1로 변화를 보였다. MAP는 1400W 군이 PBS 군보다 약간 더 증가하였지만 각 시간에서 두 군간의 유의한 차이는 없었다(Fig. 1A). 1400W 투여에 의해 MHR가 약간 낮아 졌으나 각 시점에서 두 군에 유의한 차이는 없었다(Fig. 1B).

재관류 거고근에서 혈관 직경의 측정: 1400W 군의 10~20 μm 세동맥의 평균 직경은 재관류 10분 허혈전의 86.2 \pm 2.5%였고, 점점 증가하여 90분에는 115.1 \pm 2.6%의 최고치를 보였다. PBS군에서는 각각 53 \pm 4.5% 와 85.7 \pm 1.0%를 보였다. 1400W 처리 EC-SOD^{-/-} 생쥐에서는 PBS군 보다 조기에 그리고 완벽하게 회복됨을 알 수 있었다 ($p < 0.001$) (Fig. 2A).

21~40 μm 세동맥에서도 비슷한 결과를 보였다 ($p < 0.001$) (Fig. 2B). 41~70 μm 동맥에서는 30분 지점을 제외하고는 빠른 회복을 보였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2C).

재관류 거고근에서 혈류 측정: 재관류 10분에 근육의 평균 혈류량은 1400W군에서는 허혈전의 65.8% \pm 4.5%로, PBS군에서는 16.4 \pm 3.4%로 측

정되었다. 재관류 90분에 1400 W군에서는 허혈전의 100.5±1.6%로 회복된 반면 PBS군에서는 71.5±3.3%를 보였다. PBS 군보다 1400 W 군에서 유의하게 빠른 회복(p<0.001)을 보였다(Fig. 3).

조직소견: PBS군에서는 간질과 근섬유의 부종이 더 쉽게 관찰되었다. PBS군에서는 확연한 근섬유 손상과 간질 출혈이 나타났다. PBS군에서의 I/R에 의한 확연한 조직 손상 소견은 1400W 투여로 인하여

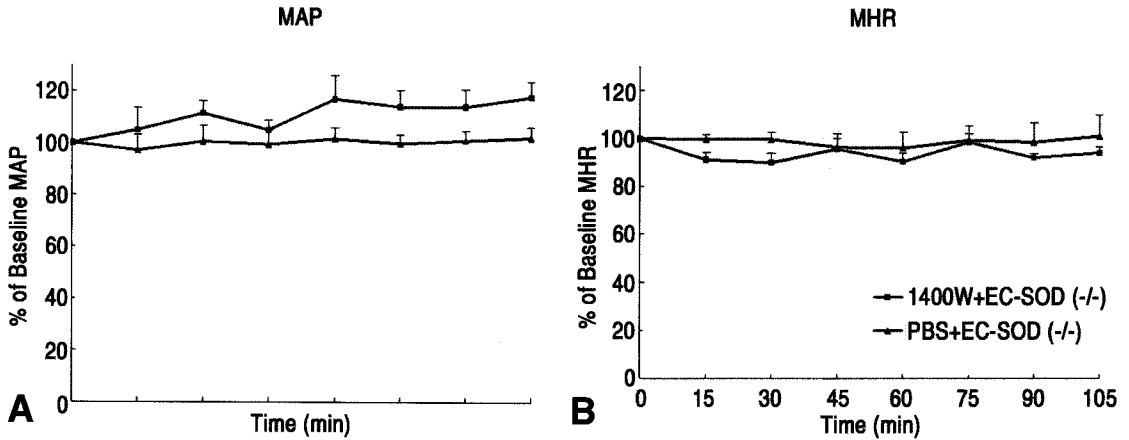


Fig. 1. Systemic effect of 1400W administration to EC-SOD^{-/-} mice. Changes in mean arterial blood pressure (MAP; A) and mean heart rate (MHR; B) during 115 min of observation.

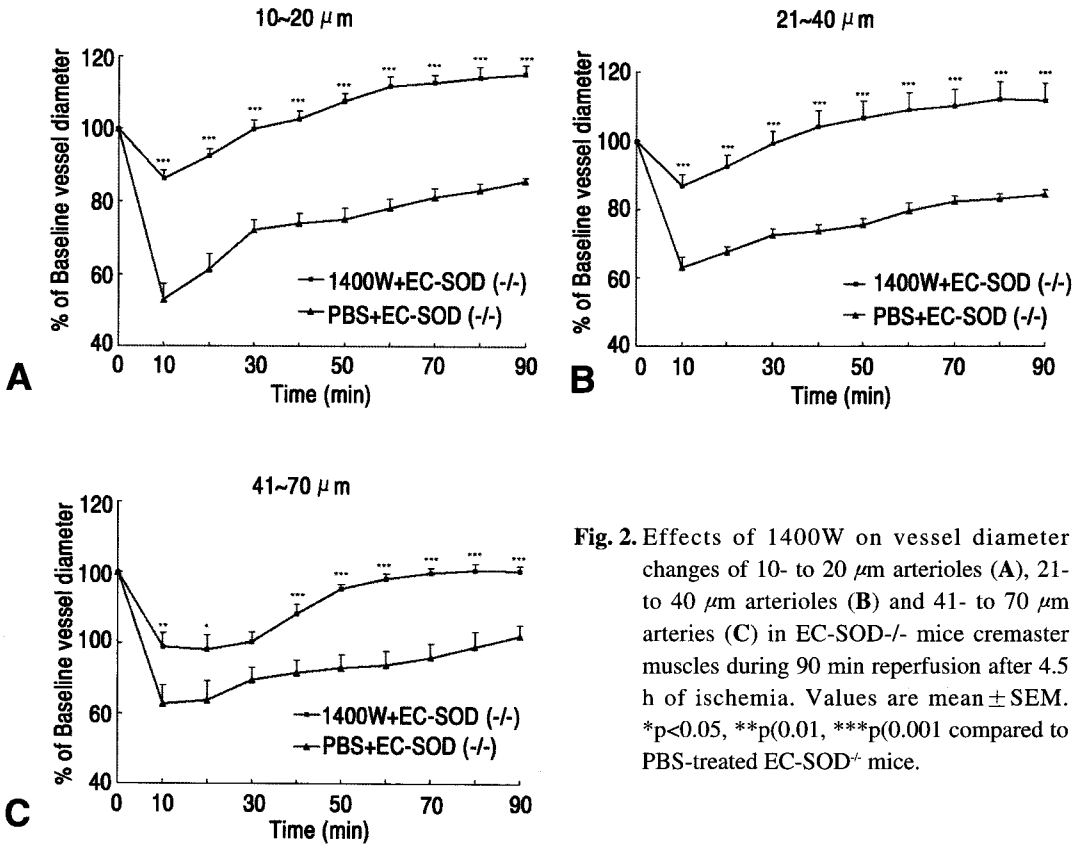


Fig. 2. Effects of 1400W on vessel diameter changes of 10- to 20 μ m arterioles (A), 21- to 40 μ m arterioles (B) and 41- to 70 μ m arteries (C) in EC-SOD^{-/-} mice cremaster muscles during 90 min reperfusion after 4.5 h of ischemia. Values are mean \pm SEM. *p<0.05, **p(0.01, ***p(0.001 compared to PBS-treated EC-SOD^{-/-} mice.

상당부분 감소한 것을 알 수 있었다(Fig. 4A, B).

Nitrotyrosine 면역조직염색: 1400W군과 비교하여 PBS군의 거고근에서 nitrotyrosine residue 발현이 확연히 증가되어 있음을 볼 수 있었다(Fig. 5A, B, C).

IV. 고 찰

실험 결과 두 가지 중요한 소견을 볼 수 있었다. 첫째는 선택적 iNOS 억제제 1400W는 EC-SOD^{-/-}

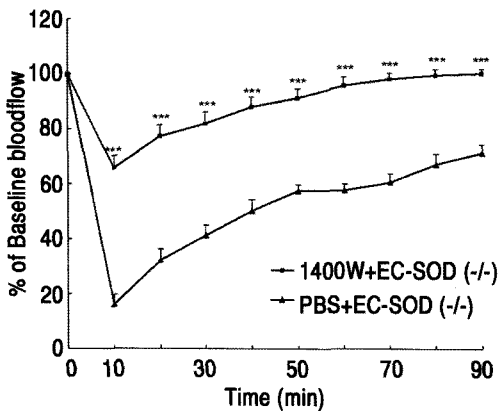


Fig. 3. Effects of 1400W administration on blood flow in mouse cremaster muscle during 90 min reperfusion after 4.5 h of ischemia. Values are mean \pm SEM. * p <0.05, ** p (0.01, *** p (0.001 compared to PBS-treated EC-SOD^{-/-} mice.

생쥐에서 골격근 I/R 손상을 감소시킨다. 둘째는 iNOS발현을 억제함으로써 O₂와 NO의 반응 물질인 ONOO⁻이 감소되는 것을 고려 할 때 ONOO⁻이 골격근 I/R 손상의 중요한 원인의 하나임을 알 수 있다.

NO는 조직의 병태생리학적 변화에 있어 매우 중요한 매개체이다. 생리적 조건 하에서 NO는 혈관 긴장을 유지시켜주고, 중성구와 혈소판이 내피에 응집, 부착하는 것을 억제하는 유익한기능을 가지고 있다.²⁴ 하지만 I/R 손상에서와 같은 급성 염증반응 시 과도하게 생성되는 NO는 조직 손상의 원인이 될 수 있다. 보고에 의하면 iNOS mRNA의 활성화가 부분적 허혈이 있는 쥐의 뇌에서 증가되고,^{25,26} iNOS 유전자가 결여된 쥐에서는 허혈로 인한 손상이 줄어들음을 알 수 있다.²⁷ 또한 iNOS 억제는 쥐의 뇌²⁸와 장관²⁹에서 I/R 손상을 줄인다는 보고가 있으며, iNOS가 허혈후 심장 기능 장애³⁰, 신장 I/R 손상³¹과 I/R 손상 유도 채장염³²에도 영향을 미치는 것을 볼 수 있다. 이런 실험 결과들은 iNOS로부터 생성되는 NO는 I/R 손상에 해로운 역할을 담당하는 것을 알 수 있다.

반면 endogenous ROS의 제거에 기여하는 SOD는 ROS에 의해 유발 되는 조직 손상에 대하여 조직을 보호하는 역할을 한다. SOD는 O₂를 H₂O와 H₂O₂로 전환시킨다.¹¹ 최근 유전자 조절 기술이 발달함에 따라 EC-SOD를 과다 발현하거나 결손되

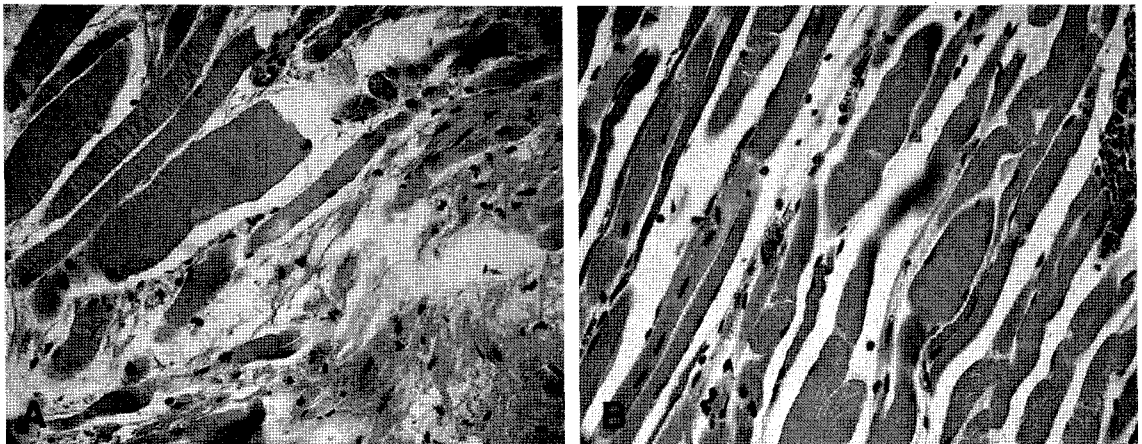


Fig. 4. Photomicrograph of longitudinal section of mouse cremaster muscle after 4.5 hr ischemia and 90 min reperfusion. Inflammatory reaction and edema are more severe in PBS-treated EC-SOD^{-/-} mice (A) than 1400W-treated EC-SOD^{-/-} mice (B). Hematoxylin and Eosin stain, \times 400

게 한 유전자 조작 생쥐들이 병적 환경 하에서 심장 근과 폐에서 EC-SOD의 역할을 밝히는 실험에 사용되고 있다. 재조합 EC-SOD가 투여 된 돼지에서 심근 경색의 크기가 줄어드는 것을 볼 수 있으며³³ EC-SOD 유전자 과다발현은 광범위한 I/R 후 심장 기능을 현저하게 유지시킬 수 있음이 알려져 있고,^{34,35} 저산소증에 의한 폐독성을 감소시킨다.³⁶⁻³⁸ EC-SOD가 결여된 생쥐들은 정상 생쥐 보다 골격근 I/R 손상에 좀 더 취약하며, 이는 EC-SOD가 결여됨으로써 증가된 O₂⁻ 생성물이 I/R 손상에 직접적인 역할을 한다는 것을 제시하고 있다. 이런 개념은 EC-SOD^{-/-} 생쥐에서 혈관내 O₂⁻ 생성이 증가되어 있다는 소견이 이론적 뒷받침이 된다. 하지만 EC-SOD^{-/-} 생쥐에서 증가된 O₂⁻가 어떻게 I/R 손상을 유발하는지는 명확하지 않았다.

ONOO⁻는 세포 단백질에서 지질 과산화와 tyrosine 질화를 일으키며 내막 세포 의존, 비의존 혈관

확장제의 분비를 손상시키는 강력한 세포 독성 ROS 이다.³⁹ O₂와 NO가 증가된 결과로 ONOO⁻의 즉각적인 증가가 발생하는데, 이는 조직 내에서 O₂⁻와 NO가 비효소적 반응에 의해 빠른 속도로 (K=6.7×10⁹/ms)⁴⁰ 생성되기 때문이다. 이 반응은 O₂와 SOD의 반응 (K=2.0×10⁹/ms)⁴¹ 보다 세배 빠르고, 잘 알려진 강력한 산화제인 수산화기를 생성하는 O₂유도 펜톤 반응보다 백만배 빠르기 때문에 O₂⁻와 NO의 반응이 조직 독성을 가진 ONOO⁻ 증가의 주요 경로로 생각된다.⁴² ROS와 함께 증가된 RNS의 생성은 세포 산화 작용에 관여 함으로써 상승적인 독성을 발휘한다. 이번 연구에서 EC-SOD^{-/-} 생쥐는 EC-SOD 유전자 결여에 의해 O₂⁻ 제거 능력이 저하되기 때문에 I/R에 의해 증가된 O₂⁻ 생성은 EC-SOD^{-/-} 생쥐에서 거고근의 I/R 손상을 상승시킨다. EC-SOD^{-/-} 생쥐의 재관류 거고근에서 nitrotyrosine 염색 밀도가 높은 것은 EC-SOD^{-/-}

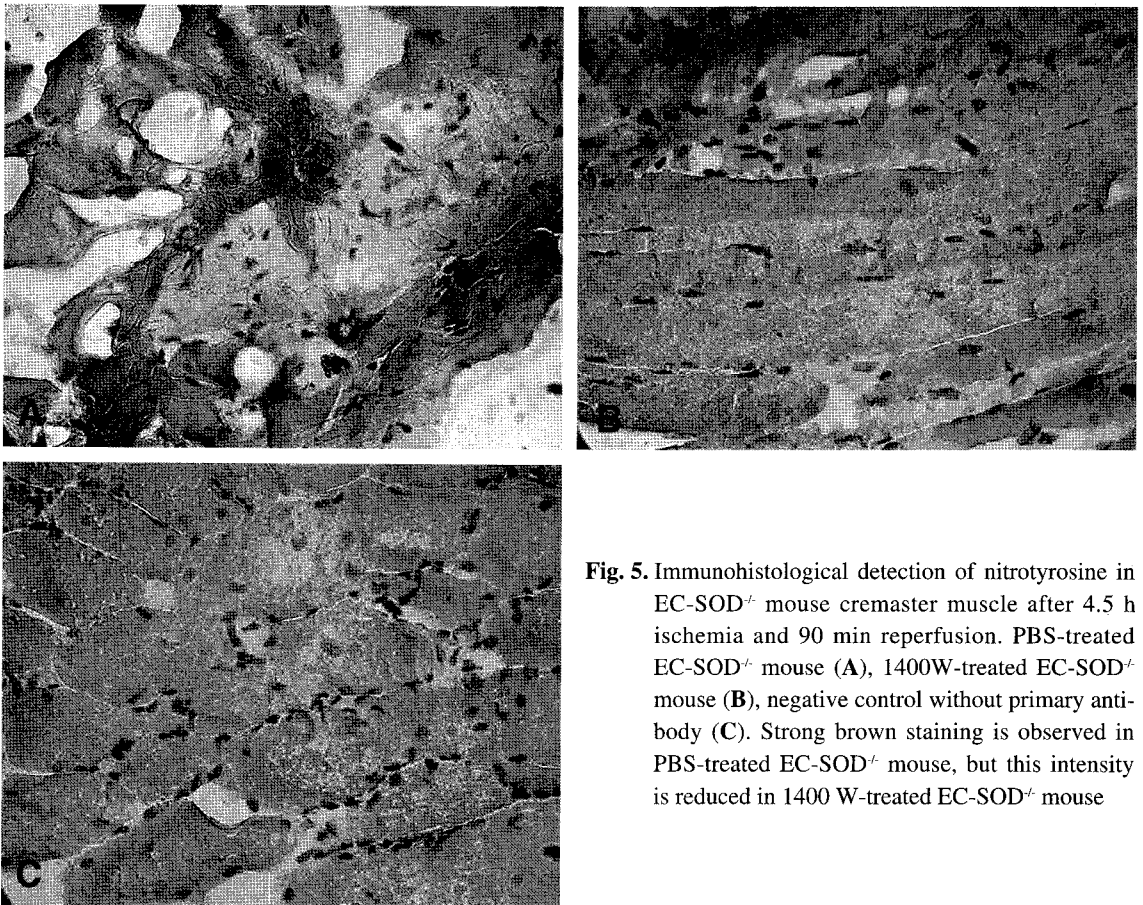


Fig. 5. Immunohistological detection of nitrotyrosine in EC-SOD^{-/-} mouse cremaster muscle after 4.5 h ischemia and 90 min reperfusion. PBS-treated EC-SOD^{-/-} mouse (A), 1400W-treated EC-SOD^{-/-} mouse (B), negative control without primary antibody (C). Strong brown staining is observed in PBS-treated EC-SOD^{-/-} mouse, but this intensity is reduced in 1400 W-treated EC-SOD^{-/-} mouse

생쥐에서 ONOO⁻의 생성이 증가 하는 것을 나타낸다. 조직의 nitrotyrosine은 O₂와 NO가 반응하여 생성되는 ONOO⁻이 tyrosine 잔여물과 반응하여 나타나는 것이기 때문이다.⁴² 최근 보고에 의하면 ONOO⁻이 폐의 I/R 손상과 관련되어 있으며, 이 손상은 ONOO⁻ 분해 촉매제인 FP-15에 의해 감소된다고 하였다.⁴³ 따라서 저자의 실험결과는 골격근 I/R 손상에서 NO-O₂-ONOO⁻ 경로를 설명해 준다 하겠다.

본 연구에서 iNOS 억제제 1400W는 미세혈관 순환의 회복을 현저하게 증가시키고 ONOO⁻ 생산을 줄여주며, 이는 EC-SOD⁺ 생쥐의 거고근에서 감소된 nitrotyrosine염색을 보이는 것으로써 증명된다. 저자의 실험 결과는 ONOO⁻생성이 재관류 심장에서 증가하며, NOS 억제제 L-NAME에 의해 쥐 심장의 재관류 후 기능이 향상되며,⁴⁴ 쥐 심장 I/R 모델에서 O₂⁻, NO, ONOO⁻의 생성이 증가되었다⁴⁵는 다른 보고들과 일치하는 결과이다.

저자들의 결과를 종합하면, ONOO⁻가 골격근 I/R 손상을 일으키는 주요 원인이며, ONOO⁻의 생성을 감소시키는 것이 I/R 손상을 줄이는 iNOS 억제제의 주요 작용 기전이 된다. 사용 가능한 iNOS 억제제들 중, 1400W는 강력하고 매우 선택적인 iNOS 억제제이다.⁴⁶ 1400W는 iNOS에 대해서는 거의 불가역적인 억제제이나 nNOS와 eNOS 억제에는 매우 약하고 빠른 가역성을 가지고 있다. 따라서 1400W는 골격근 I/R 손상의 감소에 유용하게 사용될 가능성을 가지고 있다고 하겠다.

V. 결 론

본 연구는 ONOO⁻가 골격근 I/R 손상의 주요 원인 중의 하나이며 선택적 iNOS 억제제 의 투여가 골격근 재관류 손상을 감소 시킴을 보여 준다. iNOS에 의해 생성되는 NO가 감소하는 것이 O₂와 NO의 반응 물질인 세포 독성 ONOO⁻의 생성을 감소 시킬 수 있다.

REFERENCE

- 1) Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH.: Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 120:227-37,1994.

- 2) Stamler JS, Meissner G.: Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev*, 81:209-37,2001.
- 3) Yan Z, Chen Z.: Modulation of nitric oxide synthase isoenzymes in reperfused skeletal muscle. *Chin J Traumatol*, 3:76-80,2000.
- 4) Naseem SA, Kontos MC, Rao PS, Jesse RL, Hess ML, Kukreja RC.: Sustained inhibition of nitric oxide by NG-nitro-L-arginine improves myocardial function following ischemia/reperfusion in isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol*, 27:419-26,1995.
- 5) Patel VC, Yellon DM, Singh KJ, Neild GH, Woolfson RG.: Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 194:234-8,1993.
- 6) Woolfson RG, Patel VC, Neild GH, Yellon DM.: Inhibition of nitric oxide synthesis reduces infarct size by an adenosine-dependent mechanism. *Circulation*, 91:1545-51,1995.
- 7) Zhang L, Looney CG, Qi WN, Chen LE, Seaber AV, Stamler JS, Urbaniak JR.: Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Appl Physiol*, 94:1473-8,2003.
- 8) Qi WN, Yan ZQ, Whang PG, Zhou Q, Chen LE, Seaber AV, Stamler JS, Urbaniak JR.: Gene and protein expressions of nitric oxide synthases in ischemia-reperfused peripheral nerve of the rat. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281:C849-56,2001.
- 9) Qi WN, Chen LE, Zhang L, Eu JP, Seaber AV, Urbaniak JR.: Reperfusion injury in skeletal muscle is reduced in inducible nitric oxide synthase knock-out mice. *J Appl Physiol*, 2004.
- 10) Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS.: An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry*, 39:1040-7,2000.
- 11) Suzuki S, Yoshioka N, Isshiki N, Hamanaka H, Miyachi Y.: Involvement of reactive oxygen species in post-ischaemic flap necrosis and its prevention by antioxidants. *Br J Plast Surg*, 44:130-4,1991.
- 12) Weisiger RA, Fridovich I.: Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*, 248:4793-6,1973.
- 13) Marklund SL, Holme E, Hellner L.: Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin Chim Acta*, 126:41-51,1982.
- 14) Marklund SL, Bjelle A, Elmqvist LG.: Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in

- rheumatoid arthritis and in reactive arthritides. Ann Rheum Dis, 45:847-51,1986.*
- 15) Marklund SL.: *Analysis of extracellular superoxide dismutase in tissue homogenates and extracellular fluids. Methods Enzymol, 186:260-5,1990.*
 - 16) Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ.: *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic Biol Med, 33:337-49,2002.*
 - 17) Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL.: *The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 15:2032-6,1995.*
 - 18) Fukai T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG.: *Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. J Clin Invest, 101:2101-11,1998.*
 - 19) Marklund SL.: *Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc Natl Acad Sci U S A, 79:7634-8,1982.*
 - 20) Fattman CL, Schaefer LM, Oury TD.: *Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Radic Biol Med, 35:236-56,2003.*
 - 21) Nelson SK, Gao B, Bose S, Rizeq M, McCord JM.: *A novel heparin-binding, human chimeric, superoxide dismutase improves myocardial preservation and protects from ischemia-reperfusion injury. J Heart Lung Transplant, 21:1296-303,2002.*
 - 22) Petersen SV, Oury TD, Ostergaard L, Valnickova Z, Wegrzyn J, Thogersen IB, Jacobsen C, Bowler RP, Fattman CL, Crapo JP, Enghild JJ.: *Extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) binds to type I collagen and protects against oxidative fragmentation. J Biol Chem, 2004.*
 - 23) Park JW, Qi WN, Cai Y, Zelko I, Liu JQ, Chen LE, Urbaniak JR, Folz RJ.: *Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 289:H181-7,2005.*
 - 24) Moncada S, Higgs A.: *The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med, 329:2002-12,1993.*
 - 25) Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME.: *Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab, 15:378-84,1995.*
 - 26) Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL.: *Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. Stroke, 28:1283-8,1997.*
 - 27) Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME.: *Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. J Neurosci, 17:9157-64,1997.*
 - 28) Zhang F, Iadecola C.: *Temporal characteristics of the protective effect of aminoguanidine on cerebral ischemic damage. Brain Res, 802:104-10,1998.*
 - 29) Naito Y, Takagi T, Ichikawa H, Tomatsuri N, Kuroda M, Isozaki Y, Katada K, Uchiyama K, Kokura S, Yoshida N, Okanoue T, Yoshikawa T.: *A novel potent inhibitor of inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, reduces intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. Nitric Oxide, 10:170-7,2004.*
 - 30) Abe K, Tokumura M, Ito T, Murai T, Takashima A, Ibi N.: *Involvement of iNOS in postischemic heart dysfunction of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 280:H668-73,2001.*
 - 31) Bredt DS, Snyder SH.: *Nitric oxide, a novel neuronal messenger. Neuron, 8:3-11,1992.*
 - 32) Ayub K, Serracino-Inglott F, Williamson RC, Mathie RT.: *Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischaemia and reperfusion. Br J Surg, 88:1189-93,2001.*
 - 33) Hatori N, Sjoquist PO, Marklund SL, Ryden L.: *Effects of recombinant human extracellular-superoxide dismutase type C on myocardial infarct size in pigs. Free Radic Biol Med, 13:221-30,1992.*
 - 34) Chen EP, Bittner HB, Davis RD, Folz RJ, Van Trigt P.: *Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves postischemic myocardial function in isolated murine hearts. Circulation, 94:II412-7,1996.*
 - 35) Chen EP, Bittner HB, Davis RD, Van Trigt P, Folz RJ.: *Physiologic effects of extracellular superoxide dismutase transgene overexpression on myocardial function after ischemia and reperfusion injury. J Thorac Cardiovasc Surg, 115:450-8; discussion 8-9,1998.*
 - 36) Ghio AJ, Suliman HB, Carter JD, Abushamaa AM, Folz RJ.: *Overexpression of extracellular superoxide dismutase decreases lung injury after exposure to oil fly ash. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 283:L211-8,2002.*
 - 37) Suliman HB, Ryan LK, Bishop L, Folz RJ.:

- Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 280:L69-78,2001.
- 38) Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB.: *Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. J Clin Invest*, 103:1055-66,1999.
- 39) Villa LM, Salas E, Darley-Usmar VM, Radomski MW, Moncada S.: *Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. Proc Natl Acad Sci U S A*, 91:12383-7,1994.
- 40) Beckman JS.: *Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. Ann N Y Acad Sci*, 738:69-75,1994.
- 41) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA.: *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Natl Acad Sci U S A*, 87:1620-4,1990.
- 42) Beckman JS, Koppenol WH.: *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am J Physiol*, 271:C1424-37,1996.
- 43) Naidu BV, Fraga C, Salzman AL, Szabo C, Verrier ED, Mulligan MS.: *Critical role of reactive nitrogen species in lung ischemia-reperfusion injury. J Heart Lung Transplant*, 22:784-93,2003.
- 44) Yasmin W, Strynadka KD, Schulz R.: *Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. Cardiovasc Res*, 33:422-32,1997.
- 45) Chabot F, Mitchell JA, Quinlan GJ, Evans TW.: *Characterization of the vasodilator properties of peroxynitrite on rat pulmonary artery: role of poly(adenosine 5'-diphosphoribose) synthase. Br J Pharmacol*, 121:485-90,1997.
- 46) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.: *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J*, 357:593-615,2001.