

흰쥐 심장의 허혈손상에 대한 Calcium 통로 봉쇄제와 Calmodulin 억제제의 예방효과에 대한 연구

성 시 찬*

— Abstract —

Prevention of Ischemic Damage in Working Rat Hearts by Calcium Channel Blocker and Calmodulin Inhibitors

Sung Si Chan, M.D.*

This study was investigated under the postulation that activation of intracellular calcium-calmodulin complex during ischemia-reperfusion leads to myocardial injury. The protective effects of calcium channel blocker, diltiazem and calmodulin inhibitors, trifluoperazine, flunarizine and calmidazolium from ischemic injury in rat hearts were observed by using Langendorff apparatus when the antagonists were infused for 3 min in the beginning of ischemia. Thereby, an increase in resting tension developed during 30-min ischemia was analyzed with regard to (1) the degree of cardiac functional recovery following 60-min reperfusion, (2) changes in biochemical variables evoked during 30-min ischemia.

The results obtained were as follows:

1. In the ischemic group, the resting tension was increased by 4.1 ± 0.2 g at 30-min ischemia. However, the increase in resting tension was markedly reduced not only by pretreatment with diltiazem ($3.3 \mu\text{M}$) but also with calmodulin inhibitors, trifluoperazine ($3.3 \mu\text{M}$), flunarizine ($0.5 \mu\text{M}$) and calmidazolium ($0.5 \mu\text{M}$), respectively.
2. Recovery of myocardial contractility, $\pm dF/dt$ and coronary flow were much reduced when evoked by reperfusion in the ischemic group. These variables were significantly improved either by pretreatment with diltiazem or with calmodulin inhibitors.
3. The resting tension increment evoked during ischemia was significantly inversely correlated with the degree of cardiac function recovered during reperfusion.
4. Following 30-min ischemia, the production of malondialdehyde and release of lysosomal enzyme were much increased in association with a decrease in creatine kinase activity.
5. The increases in malondialdehyde production and release of free lysosomal enzyme were suppressed by pretreatment with calmodulin inhibitors as well as diltiazem. Likewise, the decrease of creatine kinase activities was prevented by these calcium antagonists.

With these results, it is indicated that a increase in resting tension observed during ischemia has an inverse relationship to the cardiac function recovered following reperfusion, and

* 부산대학교 의과대학 흉부외과학교실

• Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Pusan National University.
1989년 11월 19일 접수

further, the latter may be significantly dependent on the degree of biochemical alterations occurred during ischemia such as decrease in creatine kinase activity, increased production of malondialdehyde and increased release of free lysosomal enzyme. Thus it is concluded that calmodulin plays a pivotal role in the process of ischemic injury.

서 론

허혈 심근의 손상 과정에 있어서 세포내 calcium의 축적이 중요한 역할을 한다고 Fleckenstein 등¹⁾이 처음으로 보고한 이래 calcium의 역할이 많은 관심을 끌고 있다^{2,3)} 세포내에 calcium이 축적되므로써 에너지를 소모하는 과정들이 활성화되고 그 결과 세포내의 ATP가 저하된다고 알려져 있다⁴⁾.

허혈시 세포내 유리 calcium 농도가 증가하는 원인으로서는 sarcoplasmic reticulum과 mitochondria로부터 calcium의 대량유리^{5,6)} phospholipase A2의 활성화 증가로 인한 막손상^{7,8)}, 그리고 calcium pump와 Na-Ca 교환기전의 이상⁹⁾ 등으로 설명되고 있다. 최근에는 재관류시 급격히 생성되는 반응성 산소대사물인 oxygen free radical이 세포손상에 더욱 중요한 역할을 할 것이라는 주장이 크게 주목되고 있다^{10,11)}.

한편, calcium 의존 조절 단백질인 calmodulin이 최근에 많은 관심을 모으고 있다. Calmodulin은 심장에서 cyclic AMP 대사, glycogen 분해대사, 양이온 수송 및 myosin light chain kinase 등의 효소활성화에 있어서 calcium의 감지기의 기능을 하는 중요한 단백질로서 알려져 있으며^{12,13)} 막 calcium pump^{14,15)}와 Na-Ca 교환기전에서 phosphorylation과 dephosphorylation 과정에 작용을 하여¹⁶⁾ 세포내 유리 calcium의 농도를 일정하게 유지하는 작용을 가지고 있다. 즉 Ca-calmodulin complex의 생성과 이의 활성이 생리학적으로는 Na-Ca 교환기전과 sarcolemma에서 calcium pump의 기능을 유지하나, 과량의 세포내 calcium에 의하여 Ca-calmodulin complex의 활성이 증가될 경우는 세포내 ATP의 손실과 병행하여 Na-Ca 교환과 sarcolemma의 calcium pump의 손상으로 세포내 유리 calcium량이 더욱 증가되어 불가역성 세포손상을 초래하게 된다는 것이 증명되고 있다¹⁷⁻²⁰⁾.

그 동안의 많은 보고들은 허혈-재관류에 의한 심근 손상에 있어서 주원인을 재관류에 돌리고 있으나 본 실험에서는 허혈시의 조직손상에 대한 calcium-calmodulin의 역할을 구명하였다. 이러한 목적

하에 적출 흰쥐 심장을 Langendorff기구 걸고 허혈 30분에 야기되는 긴장도(resting tension)증가를 손상의 지표로 삼고 이 때 심근에 초래된 생화학적 변화, 즉 lysosome 효소, 지질 과산화 및 creatine kinase의 변동을 측정하여 이들을 비교하고, 나아가 재관류시의 기능적 회복과의 상관관계를 검토하고, 이에 대하여 화학적 구조가 서로 다른 calmodulin 억제제인 trifluoperazine(TFP), flunarizine 및 calmidazolium 등의 효과를 검토하고 이들 성적을 calcium 통로 봉쇄제 중 심장 선택성이 가장 높은 diltiazem의 효과와 비교하였다. 그 결과 허혈시에 야기되는 과량의 세포내 calcium의 동원과 이에 동반하여 calcium-calmodulin의 복합체가 조직 손상에 어떻게 관여하는가를 검토하였다.

실험방법 및 재료

체중 300-350 g의 Sprague Dawley 중 수컷 흰쥐를 사용하였다. 흰쥐의 복강내에 heparin (200 IU/kg)을 주사하고 30분 후 secobarbital(30 mg/kg)로 마취한 다음 심장을 즉시 적출하여 냉 Krebs-Henseleit 용액(4℃)에 넣어 심장운동을 정지시켰다. 지방 및 결체 조직을 제거하고 대동맥을 Langendorff 심장관류 장치에 연결하여 역방향으로 관상동맥 관류를 실시하였다. Krebs-Henseleit 용액(KHS)의 조성(mM)은 NaCl, 120; KCl, 4.63; KH₂PO₄, 1.17; MgCl₂, 1.20; NaHCO₃, 20; CaCl₂, 1.25 및 glucose, 8 이었다. 관상동맥 관류시 양측 폐정맥 및 상하 대정맥을 결찰함으로써 모든 관류액이 관상혈관을 통하게 하고, 폐동맥을 절개함으로써 심장관류액이 외부로 쉽게 흘러 나올 수 있도록 하였다. 95% O₂-5% CO₂를 포화시킨 KH-S을 65 mmHg의 압력으로 관류하였고, 심장온도는 36℃로 유지시켰다. 심근의 수축력은 심장의 첨부를 Myograph (F-2000, Narco Bio-System Inc)에 연결하여 근긴장도를 측정하였고 이를 Differentiator coupler로써 $\pm dF/dt$ 를 측정하였다. 자발적으로 나타나는 심박동수는 심근 수축력을 이용하여 감지하고 측정하였다. 관상동맥 관류량은 폐동맥을 통하여 유출되

는 관류량은 자동계측천평(Mettler PC 440)을 사용하여 측정하였다. 기저긴장도는 2g으로 하여 20분간 방치하고 안정상태에 도달되었을 때(평균 15~20분) 실험을 시작하였다. 실험을 시작하기 전에 약 10분간 기저 측정치를 확인한 다음 Langendorff 관류장치의 대동맥 카뉴라를 차단하여 30분간 심장전체를 허혈 상태로 유지하였다. 허혈 기간동안에도 온도를 36℃로 유지하였다. 허혈이 끝남과 동시에 대동맥 카뉴라를 열어줌으로써 재관류에 의한 심기능 회복을 관찰하였다(그림 1, 2).

실험군은 다음과 같이 6군으로 하였다. 약물 처치군에 있어서 약물 투여는 허혈 유발과 동시에 한번만 투여하였다.

- I. 대조군 : 허혈을 유발하지 아니한 군(16마리)
- II. 비 처치군 : 허혈을 유발하였으나 약물용액 대신에 생리 식염수를 첨가한 KHS를 관류한 군(16마리)

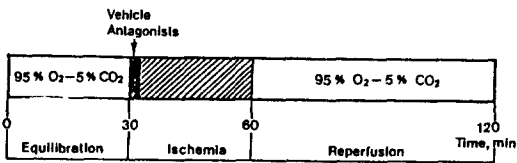


Fig. 1. Schematic diagram of experiment.

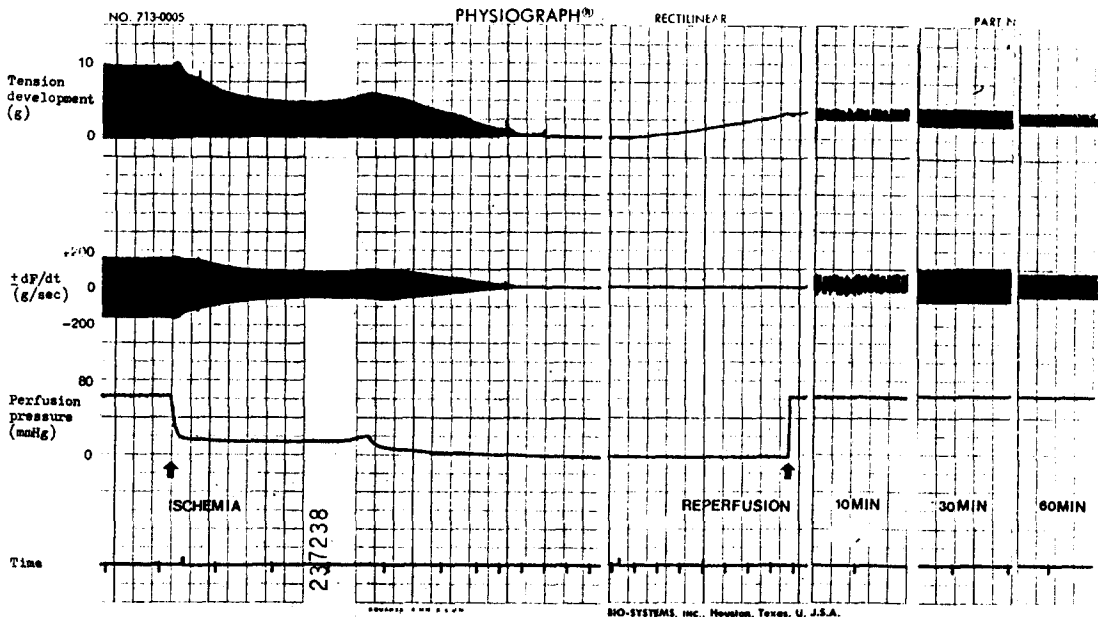


Fig. 2. Effects of 30-min ischemia followed by 60-min reperfusion on resting tension, tension development and dF/dt.

리).

- III. Diltiazem군 : 허혈 유발과 동시에 diltiazem (3.3 μ M, 6 cc/3 min)을 함유한 KHS를 관류한 군(16마리).
- IV. TFP군 : 허혈 유발과 동시에 TFP (3.3 μ M, 6 cc/3 min)을 함유한 KHS를 관류한 군(16마리).
- V. Flunarizine군 : 허혈 유발과 동시에 flunarizine (0.5 μ M, 6 cc/3 min)을 함유한 KHS를 관류한 군(16마리).
- VI. Calmidazolium군 : 허혈 유발과 동시에 calmidazolium (0.5 μ M, 6 cc/3 min)을 함유한 KHS를 관류한 군(16마리).

심근 효소 측정

심근 세포 손상의 지표로서 세포질 효소인 creatine kinase, lysosome 효소인 acid phosphatase와 N-acetyl- β -D-glucosaminidase 및 lipid peroxidation 산물인 malondialdehyde를 측정하였다.

1. Creatine Kinase 측정

심근 creatine kinase의 측정은 Sobel등²¹⁾의 방법에 따라 효소를 추출하였다. Liquid nitrogen을 사용하여 급냉동시킨 심근을 면도칼로 썰고, 20배수의 sucrose(0.25M)-tris(0.1M)용액 (pH 7.4, 4°C)에서 균

질화 하였다(Polytron, Brinkmann). 이 homogenate를 두차례로 원심분리(2,000 g과 10,000 g)하고 그 상등액을 취하였다. Creatine kinase의 활성은 Forster 등²²⁾이 행한 방법대로 creatine phosphate, NADP, hexokinase 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase가 함유된 반응 용액에 상등액을 첨가하고 spectrophotometer(Gilford 2600)를 사용하여 흡광도를 340 nm에서 측정하였다. 효소 활성 측정시 단백질의 측정은 Lowry 방법에 따라 행하였다.

2. Lysosome 효소 측정

심근 조직을 sucrose(0.25M)-tris 완충액(pH 7.4)를 20배량으로 채우고 균질화한 후 350 g으로 5분간 원심분리한 후에 상등액은 40,000 g으로 20분간 원심분리하였다. 그 상등액의 효소활성을 측정하고 이를 유리형의 활성도(N)라 하였고 침전물은 triton X-100(0.1%)로 회석하고 다시 균질화하여 효소활성을 측정하였다. 이를 비 유리형 활성도(S)라고 하였다. Lysosome 효소의 세포하 재분포의 지표는 $\% = N / (N + S)$ 로 하였다. Acid phosphatase는 Barrett과 Heath²³⁾의 방법에 의하여 측정하였다. p-nitrophenyl phosphate와 sodium acetate buffer(pH 5.0)를 함유하고 있는 반응 용액에 상등액을 첨가하여 10분간 반응(37°C)시켰다. 이 때 p-nitrophenol의 흡광도를 spectro-photometer 420 nm에서 측정하였다. N-acetyl- β -D-glucosaminidase(NDGA)는 기질로써 p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamide가 사용된 것 이외에는 acid phosphatase 측정과 동일하였다.

3. Malondialdehyde의 측정

심근에서 지질과산화의 생성을 알기 위해서 thiobarbituric acid방법²⁴⁾에 의해서 malondialdehyde를 측정하였다. 심근을 Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)으로 채우고 homogenates를 만들었다. 이를 spectrophotometer를 사용하여 532 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

사용 약물

본 실험에서는 calcium 통로 봉쇄제로는 diltiazem(Hanil), calmodulin 억제제로서는 trifluoperazine(TFP, Sigma), flunarizine(Janssen Pharmaceutica), calmidazolium(R24571, Janssen Pharmaceutica)을 사용하였다.

통계 처리

성적은 mean \pm S.E.로 표시하였고 그 결과는 two-way ANOVA test로 편차를 분석 하였고, 대응치의 비교는 student's t-test로써 분석하였다. 이들의 차이는 $p < 0.05$ 이하에서 유의한 것으로 하였다.

실험 결과

I. 심기능에 대한 Diltiazem과 Calmodulin 억제제의 효과

본 실험에서는 심근의 긴장도를 유지하기 위해서 심첨부에 2g을 부하하였다. 이 때 심기능은 표 1에서 보는 바와 같다. 심근 수축력은 각 군에서 평균 7.7-9.4 g이었고 $+dF/dt$ 는 평균 141.4-170.0 g/sec, $-dF/dt$ 는 평균 162.9-183.6 g/sec의 범위를 나타내었다. 관상관류량은 각 군에서 평균 8.8에서 12.8 ml/min의 범위로써 모든 실험군에서 비슷한 정도의 심기능을 나타내었다. 예비실험으로 심장에 대한 서행 calcium 통로 봉쇄제인 diltiazem과 calmodulin 억제제인 TFP, flunarizine 및 calmidazolium의 직접적인 작용을 관찰하였다. Diltiazem을 3.3 μ M 처치시 수축력은 39%, $+dF/dt$ 는 41% 및 $-dF/dt$ 는 45%가 억제되었으며 관상관류량은 33% 증가되었다. Flunarizine과 calmidazolium은 0.5 μ M에서 심근 수축력을 각각 35%와 32%를 억제시켰다. 특징적으로 flunarizine은 관상관류량을 증가(22%)시켰으나, calmidazolium은 이를 오히려 감소(-17%)시켰다. 본 실험에서는 심기능의 억제 정도를 고려하여 diltiazem은 3.3 μ M, flunarizine과 calmidazolium은 0.5 μ M을 사용하였다. TFP는 3.3 μ M에서 심근수축력, $+dF/dt$ 및 $-dF/dt$ 에는 거의 영향을 미치지 아니하였음에도 불구하고 관상동맥 관류량이 44%가 증가되었으므로 이를 참작하여 TFP는 3.3 μ M을 사용하였다. 본 실험에서 사용된 calmodulin 억제제는 일반적으로 낮은 농도에서는 심근 수축력을 증가시켰으나 약물농도를 점진적으로 증가시키에 따라서 수축력은 억제되었다.

II. 기저 긴장도에 대한 Diltiazem과 Calmodulin 억제제의 효과

이 실험에서 허혈시 야기되는 기저 긴장도가 심근순

Table 1. Effects of calcium channel blocker and calmodulin inhibitors on the cardiac functions.

| | Control | Diltiazem (3.3 μ M) | Control | TFP (3.3 μ M) | Control | Flunarizine (3.3 μ M) | Control | CMZ (3.3 μ M) |
|---------------------------|-----------------|----------------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------------------|------------------|----------------------|
| Tension | 8.5 \pm 1.1 | 5.2 \pm 0.6 | 9.0 \pm 0.4 | 9.2 \pm 0.2 | 10.0 \pm 0.4 | 6.5 \pm 0.9 | 8.5 \pm 0.5 | 5.8 \pm 0.6 |
| development(g) | | (-39) | | (+2) | | (-35) | | (-32) |
| +dF/dt(g/sec) | 142.5 \pm 7.5 | 83.5 \pm 9.4 | 162.0 \pm 2.0 | 151.0 \pm 11.8 | 165.0 \pm 11.9 | 110.3 \pm 14.0 | 155.0 \pm 13.2 | 99.5 \pm 14.3 |
| | | (-41) | | (-7) | | (-33) | | (-36) |
| -dF/dt(g/sec) | 168.8 \pm 9.7 | 93.0 \pm 16.3 | 203.0 \pm 13.0 | 178.5 \pm 13.9 | 217.5 \pm 26.6 | 115.5 \pm 21.4 | 172.5 \pm 16.0 | 55.5 \pm 19.6 |
| | | (-45) | | (-12) | | (-47) | | (-68) |
| Coronary flow (ml/min) | 11.4 \pm 0.4 | 15.1 \pm 1.3 | 10.3 \pm 0.1 | 14.8 \pm 0.2 | 11.5 \pm 0.7 | 14.0 \pm 1.4 | 8.4 \pm 0.7 | 7.0 \pm 1.5 |
| | | (+33) | | (+44) | | (+22) | | (-17) |
| Heart Rate (beats/min) | 217.5 \pm 4.8 | 182.5 \pm 13.1 | 235.0 \pm 5.0 | 210.0 \pm 20.0 | 242.5 \pm 6.3 | 195.0 \pm 18.5 | 237.5 \pm 7.5 | 160.0 \pm 16.8 |
| | | (-16) | | (-11) | | (-20) | | (-30) |

Numbers in parentheses represent percent changes in each variable.

The drugs were administered through aortic perfusate by means of infusion pump during cardiac movement in Langendorff apparatus.

CMZ, calmidazolium

상의 지표가 된다는 점을 고려하여 이에 대한 각종 약물의 효과를 비교하였다. Langendorff 관류장치에 연결된 심장을 36°C에서 30분간 허혈을 야기시킨 후에 60분간 재관류하였다. 그림 3에서 보는 바와 같이 허혈 시간이 경과함에 따라 기저 긴장도가 증가하였다.

비처치군에서는 허혈 15분부터 기저 긴장도가 증가하기 시작하였고, 허혈 30분에 4.1 \pm 0.2 g이 증가되었다. 30분간의 허혈에 이어서 재관류시에도 기저 긴장도가 시간이 경과함에 따라 다소 감소되었지만, 재관류 60분후에도 약 4 g 이상으로 높게 유지되었다. Diltiazem군은 기저 긴장도가 증가되기 시작하는 시간이 비처치군에 비하여 약 5분 이상 지연되었으며 허혈

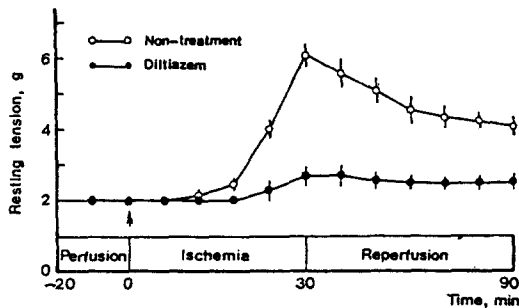


Fig. 3. Time course change in resting tension in non-treatment and diltiazem group. Following diltiazem pretreatment the increase in resting tension was reduced [$F(1, 120)=236.3, p<0.01$] in ANOVA test. At arrow, diltiazem or vehicle was administered.

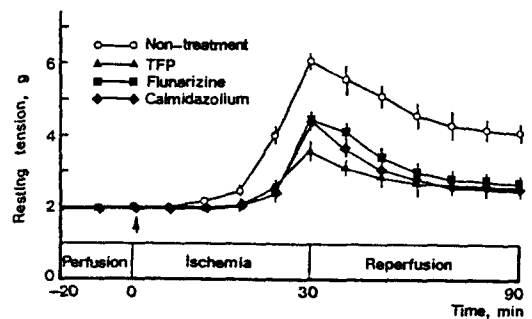


Fig. 4. Time course change in resting tension in the experimental groups treated with calmodulin inhibitors, the increases in resting tension were significantly reduced(ANOVA test). At arrow, calmodulin inhibitors or vehicle was administered.

30분에도 긴장도 증가는 훨씬 약하였다 (0.7 \pm 0.2 g). 재관류시에도 비처치군에 비하여 현저히 낮게 유지되었다 [그림 3, $F(1, 120)=236.3, p<0.01$]. TFP군, flunarizine군 및 calmidazolium군은 허혈 30분에 기저 긴장도 증가가 각각 1.7 \pm 0.3, 2.5 \pm 0.3 및 2.5 \pm 0.3 g 이었고 재관류시에도 비처치군에 비하여 훨씬 낮게 유지되었다. [그림 4, $F(1, 120)=188.8, F(1, 120)=138.3$ 및 $F(1, 120)=214.7, p<0.01$].

III. 재관류에 의한 심기능의 회복

허혈 후 재관류에 의한 심기능은 재관류에 30분에

Table 2. Recovery(%) of cardiac functions upon 30-min reperfusion after 30 min ischemia.

| | Non-Tx | Diltiazem | TFP | Flunarizine | CMZ |
|---------------------|----------|------------|-------------|-------------|------------|
| Tension development | 14.9±4.5 | 59.6±4.2** | 52.0±3.7** | 43.5±3.3** | 43.5±5.6** |
| +dF/dt | 18.3±4.2 | 60.3±3.6** | 50.0±3.9** | 46.7±4.1** | 46.7±6.9** |
| -dF/dt | 17.9±4.5 | 65.0±5.7** | 56.6±3.7** | 55.5±4.2** | 56.0±6.1** |
| Coronary flow | 84.5±8.9 | 112.9±4.5* | 114.6±12.7* | 125.4±11.3* | 124.3±4.5* |

*, p<0.05; **, p<0.001: Significantly different from Non-Tx group.
Non-Tx, non-treatment; CMZ, calmidazolium.

최대의 회복을 보였다. 따라서 본 성적에는 재관류 30분에 회복되는 기능을 검토하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 비처치군에서는 30분간의 허혈 후 재관류시의 심기능은 현저히 저하되었다. 심근 수축력은 허혈 전 기능의 14.9%, +dF/dt와 -dF/dt는 각각 18.3%, 17.9%의 회복률을 나타내었을 뿐이었다. Diltiazem군에서 재관류시의 심근 수축력은 정상 기능의 59.6%, +dF/dt와 -dF/dt는 각각 60.3%와 65.0%의 회복률을 나타내었다. 비처치군에서 재관류 30분의 관상동맥 관류량은 허혈 전 관류량의 84%에 불과하였고 시간이 경과함에 따라 서서히 감소하였다. Diltiazem군에서는 재관류 30분에 허혈 전 관류량의 112%로 관류량이 증가되었고 시간이 경과함에 따른 감소도 현저히 저하되었다 [그림 5, F(1, 84)=50.6, p<0.01]. Calmodulin 억제제를 투여한 군에서는 diltiazem 투여시와 유사하게 심근 수축력, +dF/dt 및 -dF/dt의 회복률을 비처치군에 비해 현저히 증가시켰

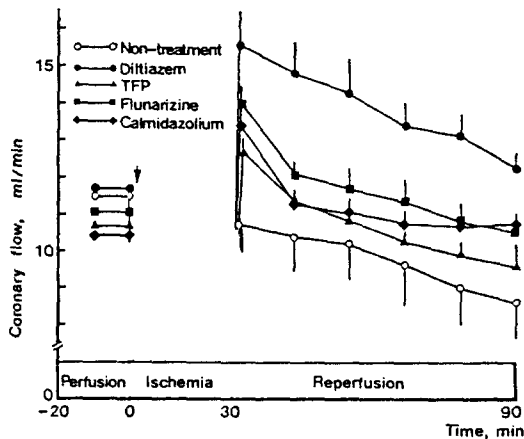


Fig. 5. Effects of diltiazem and calmodulin inhibitors on the coronary flow recovered upon reperfusion. At arrow, diltiazem or calmodulin inhibitors were administered.

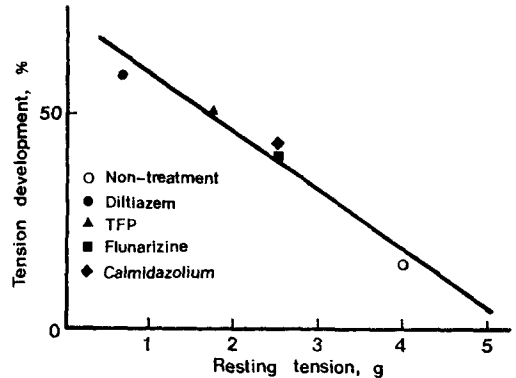


Fig. 6. Tension development by reperfusion was plotted against resting tension developed after 30-min ischemia. Resting tension increment was inversely correlated with the tension development by reperfusion(p<0.01).

으며(p<0.01) 관상 관류량도 역시 증가시켰다. 이들 약물을 사용하였을 때 허혈시에 야기되는 기저 긴장도 증가와 재관류시의 기능적 회복에 대한 상관관계를 검토하였다. 그림 6에서 보는 바와 같이 직선회귀선은 $y = -13.3X + 72.8$ 로서 상관계수는 $r = -0.98$ 로 이들 간에서 유의있는 역 상관 관계를 나타내었다(p<0.01). 뿐만 아니라 허혈시에 야기되는 긴장도의 증가는 표 3에서 보는 바와 같이 재관류시의 +dF/dt와 -dF/dt와도 역 상관 관계가 있음이 밝혀졌다 (p<0.05).

IV. 생화학적 검사

IV-1. Creatine kinase에 대한 효과

심근 세포의 활동 기능을 측정하는 방법으로써 심근 조직의 creatine kinase를 측정하였다. 그림 7에서 보는 바와 같이 대조군에서는 creatine kinase가 3.1 ± 0.4 unit/mg protein이었으나 허혈 30분에는 효소 활

Table 3. Functional recovery following 30-min reperfusion was plotted against resting tension developed after 30-min of ischemia

| | Regression Line | Correlation coefficients | Significance |
|---------------------|---------------------|--------------------------|--------------|
| Tension development | $Y = -13.2X + 72.7$ | $r = -0.98$ | $p < 0.01$ |
| +dF/dt | $Y = -12.2X + 70.9$ | $r = -0.99$ | $p < 0.01$ |
| -dF/dt | $Y = -13.3X + 80.9$ | $r = -0.91$ | $p < 0.05$ |

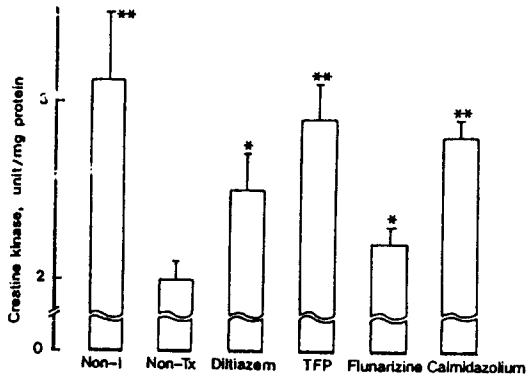


Fig. 7. Activities of creatine kinase in the myocardium. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$: Significantly different from non-treatment(Non-Tx). Non-I: non-ischemia.

성이 2.0 ± 0.1 unit/mg protein으로 현저히 저하되었다($p < 0.01$). Diltiazem군에서는 2.5 ± 0.2 unit/mg protein으로써 creatine kinase의 저하가 감소되었고($p < 0.01$), calmodulin 억제제 사용시는 creatine kinase의 저하를 방지하는 효과는 TFP(2.9 ± 0.2 unit/mg protein), calmidazolium(2.8 ± 0.1 unit/mg protein) 그리고 flunarizine(2.2 ± 0.1 unit/mg protein) 순이었다.

IV-2. 지질과산화에 대한 효과

심근에서 지질 과산화의 정도를 알기 위해서 그 생성물인 malondialdehyde를 측정하였다. 그림 8에서 보이는 바와 같이 비허혈군 조직에서는 malondialdehyde의 함유량이 15.1 ± 0.5 nmole/mg protein이었으며, 허혈 30분의 조직에서는 25.6 ± 3.1 nmole/mg protein으로써 허혈에 의하여 지질 과산화 반응이 항진되었다($p < 0.01$). Diltiazem군에서 15.9 ± 0.6 , flunarizine군, 14.1 ± 0.4 그리고 calmidazolium군에서는 18.3 ± 0.8 nmole/mg protein으로써 비허혈군에 비하여 이들 약물 모두에 의하여 malondialdehyde 생성이 현저히 억제되었다($p < 0.01$). TFP군에서도

malondialdehyde 생성이 억제되었으나 약하였다.

IV-3. Lysosome 효소에 대한 효과

허혈에 의하여 lysosome 효소가 세포하 재분포된다는 사실²⁵⁾에 근거하여 본 실험에서는 lysosome 효소를 유리형 활성도와 비 유리형 활성도를 구별하여 측정하고 전체 lysosome 효소에 대한 유리형 lysosome 효소의 비를 계산하였다. 표 4와 5에서 보는 바와 같이 비허혈군 조직에서의 acid phosphatase와 NDGA의 유리형 lysosome 효소의 비율은 각각 66.2 ± 0.7 와 52.8 ± 2.5 %이었다. 허혈을 일으킨 군에서는 acid phosphatase와 NDGA의 유리형의 비율은 각각 73.7 ± 1.4 , 70.2 ± 3.5 %로 증가되었다($p < 0.01$). Diltiazem군에서는 acid phosphatase와 NDGA의 유리형 비율이 각각 65.6 ± 1.2 %와 43.5 ± 0.7 %로 현저히 저하되었다. TFP, flunarizine 및 calmidazolium군들에서도 diltiazem군과 유사하게 acid phosphatase와 NDGA의 유리형 효소 활성의 증가가 억제되었다.

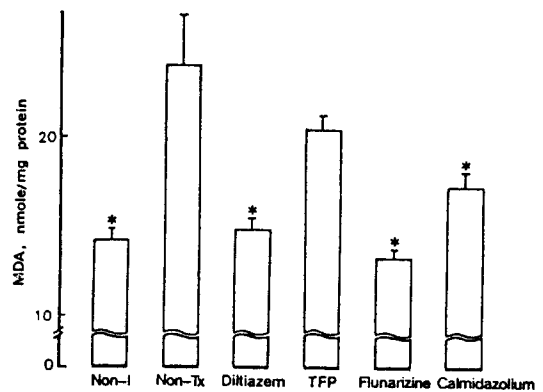


Fig. 8. Production of lipid peroxide in non-treatment(Non-Tx) group subjected to 30-min ischemia and its prevention by calcium channel blocker and calmodulin inhibitors. *, $p < 0.01$: Significantly different from Non-Tx group. Non-I: non-ischemia.

Table 4. Activities of acid phosphatase in the myocardium

| | Acid Phosphatase(units/mg protein) | | |
|---------------|------------------------------------|----------|------------|
| | N | S | N/N+S(%) |
| Non-I | 20.0±1.6 | 10.1±0.7 | 66.2±0.7** |
| Non-Tx | 23.1±1.2 | 8.5±0.9 | 73.7±1.4 |
| Diltiazem | 18.2±0.8 | 9.5±0.4 | 65.6±1.2** |
| TFP | 16.9±0.6 | 9.5±0.5 | 64.1±1.3** |
| Flunarizine | 19.8±1.2 | 10.7±0.4 | 64.6±1.5** |
| Calmidazolium | 22.1±0.8 | 10.2±0.5 | 67.5±1.3** |

Values are means±S.E.M. of eight experiments.

***p*<0.01: Significantly different from Non-Tx group.

Non-I, non-ischemia; Non-Tx, non-treatment.

N: non-sedimentable enzyme activity, S: Sedimentable enzyme activity.

Table 5. Activities of N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NDGA) in the myocardium

| | NDGA (units/mg protein) | | |
|---------------|-------------------------|---------|------------|
| | N | S | N/N+S(%) |
| Non-I | 4.9±0.4 | 4.4±0.3 | 52.8±2.5** |
| Non-Tx | 12.2±1.4 | 5.1±0.7 | 70.2±3.5 |
| Diltiazem | 5.7±0.2 | 7.4±0.1 | 43.5±0.7** |
| TFP | 7.0±0.1 | 8.7±0.4 | 44.8±1.3** |
| Flunarizine | 9.3±0.6 | 5.7±0.9 | 63.4±3.4* |
| Calmidazolium | 7.6±0.6 | 7.2±0.5 | 51.2±2.2** |

***p*<0.01: Significantly different from Non-Tx group.

Others are the same as in Table 4.

고 찰

Cheung²⁶⁾과 Kakiuchi^등²⁷⁾에 의하여 세포내 cyclic nucleotide phosphodiesterase의 활성을 매개하는 calcium 감지기구로서 calcium에 친화성이 높은 calmodulin이 발견된 이래, adenylate cyclase^{28,29)}, Ca⁺⁺-ATPase^{30,31)}, myosin light chain kinase³²⁾ 뿐만 아니라 골격근 phosphorylase kinase³³⁾나 sarcoplasmic reticulum의 calcium이동³⁴⁾과 막 인산화 등 세포내의 각종 효소작용에 있어서 calcium의 작용을 매개하는 calcium 수용체 단백질¹⁵⁾으로써 많은 관심을 모으고 있다.

세포막을 통한 calcium의 배출은 주로 Na-Ca 교환과 calcium-pump를 통하여 이루어지고 있고¹⁶⁾, calmodulin은 심근세포막의 phosphorylation-dephosphorylation 과정을 조절함으로써 Na-Ca 교환기전과 calcium-pump의 작용에 관여를 하고 있다^{14,15)}.

본 실험에서는 허혈-재관류에 의한 손상의 기전을 밝히는 실험으로써 재관류에 의한 손상보다 허혈에 의한 손상의 중요성을 확인하고자 하였다. 따라서 허혈 30분의 기저 긴장도 증가를 손상의 지표로 삼았다. 이 때 비치치군에서는 약 4.1 g의 긴장도가 증가한데 반하여 diltiazem군은 0.7 g이 증가하였다. 흥미있는 것은 세 종류의 calmodulin 억제제의 전처치가 모두 1.7-2.5 g의 기저긴장도를 증가시킴으로써 diltiazem에 비하여서는 약하나 비치치군에 비하여서는 현저한 억제효과를 나타내었다.

Diltiazem은 benzothiazepine 유도체로서 다른 서행 calcium 통로 봉쇄제보다 심장에 선택성이 높은 반면에, calmodulin에 대해서는 친화성이 거의 없다는 특징을 가지고 있다³⁵⁾. TFP은 calcium-calmodulin complex에 결합능력이 크나 이 약물은 비특이적인 작용, 즉 appha-수용체 봉쇄작용, 막 안정화 작용 및 심근세포에서 흥분-수축 연결장애 및 약한 calcium 통로 봉쇄작용 등이 있는 점이 특성이라 할 수 있다^{36,37)}.

Flunarizine은 calmodulin 억제작용외에도 calcium 통로 봉쇄작용을 가지고 있으며 다른 calcium 통로 봉쇄제 보다는 작용 발현 시간이 늦고 작용시간이 길다는 특성이 있다^{38,39}. Calmidazolium은 특징적으로 calmodulin에 가장 선택적이고 친화성이 높은 반면 해리상수 ($1 \mu\text{mole}/\ell$) 세포투과력이 약하다는 결점이 있다⁴⁰). 이러한 점들을 감안하여, 뚜렷이 약물의 농도를 결정하는 데는 심근수축력에 대하여 약 30-40% 억제효과를 나타내는 농도를 선택하였다. 예외로는 심근 수축력에 거의 영향을 미치지 아니하는 TFP 3.3 μM 용량에서도 이 약물이 관류량을 44% 증가시켰다는 점을 감안하여 본 실험에서는 이 용량을 그대로 사용하였다. 이와 같은 TFP에 의한 관류량의 증가는 TFP이 관상동맥 평활근의 확장에 기인한 것이 아닌가 추측된다. 그러나 calmidazolium은 32%의 심근 수축력을 억제시키는 용량임에도 불구하고 관상동맥 관류량이 TFP와는 달리 오히려 감소(17%)되었다는 사실은 실험적으로나 문헌상으로 설명하기가 어렵다. 이에 대하여는 앞으로 더욱 연구할 과제라고 생각된다.

재관류가 동반되지 아니한 단순 허혈에 의하여 기저 긴장도가 왜 증가하는가에 대하여는 명백하게 설명하기가 어렵다. 그러나 첫째는 심근세포의 에너지 생성과 이용이라는 관점에서 볼때 ATP의 소실과 Na^+ , K^+ -ATPase와 Ca^{++} -ATPase의 활성 억제등으로 세포내 calcium의 축적이 관여하고, 이에 부수하여 효소(phospholipase A2, protease)의 활성화 증가에 의하여 막 인지질의 붕괴와 막 단백질의 소실등⁴¹⁻⁴³)이 야기된다고 알려지고 있다. 둘째는 calcium의 투과를 조절하는 여러 막 기능의 손상이라는 관점에서 세포내 calcium 조절기능이 소실됨으로써⁴⁴) 세포내 calcium의 과잉 축적으로 인하여 긴장도의 증가가 야기되었을 것이라는 점 등이 주목되고 있다. 본 연구에서 허혈후 재관류시 심기능 회복 (tension development, $\pm dF/dt$) 등을 관찰하였을 때 diltiazem 뿐만 아니라 calmodulin 억제제 투여군에서 모두 기능이 회복되었다. 이와 같이 사실을 더욱 확실하게 하기 위해서 기저 긴장도와 이들 약물에 의한 심기능 회복에 대한 상관관계를 보았을 때, 이들 사이에는 유의한 역상관계가 성립되었다 ($r = -0.98$, $p < 0.01$). Diltiazem뿐만 아니라 이 실험에서 사용한 calmodulin 억제제 모두가 재관류시 비처치군에 비하여 관상관류량을 현저히 증가시켰다는 점도 특징적이다. 이러한 심보호작용에 대하여

Higgins와 Blackburn⁴⁵)은 diltiazem의 세포 보호작용으로 설명하였다. 왜냐하면 diltiazem을 재관류와 동시에 처치하였을 때는 허혈에 의한 손상을 예방하지 못하였기 때문이다. 본 실험에서도 재관류 10분에서 관상관류량의 회복을 보면 diltiazem과 calmodulin 억제제 모두 관상관류량과 심기능 회복을 증진시켰다는 점은 diltiazem이나 calmodulin 억제제 모두 허혈성 손상을 방지하였다는 사실이다. 본 실험에서는 세포내 calcium을 측정하지는 아니하였으나 Henry등⁴⁶)이 기저긴장도의 증가는 세포내 calcium의 증가와 밀접한 관련이 있다고 시사한 점을 참조할 때 이들 약물에 의하여 재관류에 의한 기능이 회복된 점은 이들 약물에 의하여 세포질 유리 calcium의 증가 뿐만 아니라 calmodulin 의존과 정의 매개와 관련된 기전들의 억제가 관여하였다고 암시된다. 나아가 허혈 30분에 기저 긴장도의 변동과 동반하여 어떠한 생화학적 변동이 초래되었는가를 검색한 결과, 심근세포의 기능적 활동의 지표가 되는 creatine kinase는 비허혈군에 ($3.1 \pm 0.4 \text{ units/mg protein}$)비하여 허혈 30분에는 ($2.0 \pm 0.1 \text{ units/mg protein}$) 현저히 저하되었고 이들 저하가 diltiazem 뿐만 아니라 calmodulin 억제약물에 의하여 모두 방지되었다. 어떠한 기전에 의하여 허혈시 creatine kinase 활성이 감소되었는가에 대하여는 아직까지는 잘 알려져 있지는 않으나 허혈에 의한 막손상으로 creatine kinase가 세포밖으로 유리 소실되었다고 한다면 diltiazem과 calmodulin 억제제가 creatine kinase 활성을 회복시켜 주었다는 사실은 이들의 막 보호 효과와 관련이 있을 것으로 추정된다. 허혈 30분에 심근세포에 함유되어 있는 malondialdehyde치는 비허혈 대조군에 비하여 허혈 비처치군에서는 현저히 증가되었고 이는 diltiazem 뿐만 아니라 calmodulin 억제제에 의하여 억제되었다는 것은 흥미있는 사실이다. 허혈심근에서는 catecholamines의 자가산화, 세포내 pH의 감소, ATP가 분해되어 hypoxanthine과 xanthine이 형성되고, 이러한 모든 과정은 유리기 형성을 용이하게 하여줌으로써^{10,47-49}) 결과적으로 과산화지질의 형성이 항진되었을 것으로 추측된다. 산소 분압이 낮은 상태에서도 산소 유리기가 생성된다는 점¹⁰)에서 허혈시에도 지질과산화는 가능하다는 것을 암시한다. 나아가 허혈 심근에서 세포내 scavengers가 감소하여⁵⁰) 산소 유리기가 증가하게 됨으로써 더욱 지질과산화 반응이 가속화 할 수 있을 것으로 간주된다¹⁰). 이런 점에서 볼때 심근에서 유리기의 생성은

반드시 재관류에 동반된 것이 아님을 알수 있고, 허혈 시에도 세포막의 지질과산화가 현저히 야기되고, 그 결과 막투과도 증가되어 creatine kinase가 유출되고, 세포손상이 초래된다고 암시되는 바이다^{51,52} 다시 말하면, 재관류에 의한 손상은 허혈시에 이미 야기되고 있다는 것을 사시하고 있다. 한편, lysosome 효소인 acid phosphatase와 NDGA의 전체 함량에서 전 군에서 차이가 없었음에도 불구하고, Ichihara 등²⁵의 방법에 따라 전체 함량에 대한 세포질내에 유리된 유리형의 비를 측정하였을 때는 diltiazem 뿐만 아니라 calmodulin 억제 약물 모두가 허혈시 유리형 lysosome 효소의 비율의 증가를 현저히 억제시켰다는 사실은 lysosome의 막이 허혈에 의하여 손상되었다는 사실을 시사하는 것으로 추측된다. 그럼에도 diltiazem과 calmodulin 억제제 모두가 lysosome 효소의 유리를 방지하였다는 사실은 lysosome 막에 대한 보호효과에 기인한 것인지 또는 효소활성에 관련된 calmodulin에 대한 억제에 기인한 것인지는 이 실험으로서는 확실하지 않다. Diltiazem 뿐만 아니라 calmodulin 억제제에 의하여 심근 creatine kinase의 저하, 유리형 lysosome 효소의 비율의 증가가 방지되고 이에 동반하여 malondialdehyde의 증가도 방지되었다는 사실에 비추어 단정짓기는 어려우나 막지질과산화와 이에 따른 막손상과 일련의 관계가 있을 것이라 암시된다. 본 실험에서 사용된 calmodulin 억제제 중 TFP는 alpha-adrenoceptor 봉쇄작용, 막안정화 작용, 심근세포에서 흥분-수축 연결장애 및 calcium 서행통로 봉쇄작용 등과 같은 비특이적인 작용을 가지고 있다고 보고되고 있으며 flunarizine은 calmodulin 억제작용 외에도 혈관 평활근에서 calcium의 유입을 억제함으로써 각종 수축성 약물에 의한 수축반응을 억제한다고 알려져 있다³⁸. Calmidazolium은 본 실험에서 사용된 다른 calmodulin 억제제보다 calmodulin에 선택성이 높은 약물로 알려져 있으나 calmodulin 억제용량 이상의 고농도에서는 세포의 calcium uptake를 억제한다고 보고되고 있다⁵³. Diltiazem 뿐만 아니라 TFP와 flunarizine은 본 실험에서 사용된 각 용량에서 관상관류량을 현저히 증가 시켰으나 calmidazolium은 이들 약물과는 달리 오히려 관상관류량을 감소시키는 용량을 사용하였다는 점에서 볼 때 calmodulin에 의한 심보호 작용 기전은 calmodulin에 의한 세포과정을 억제함에 의한 것으로 사료되나 이에 대하여는 아직 보고된 바를 접할 수 없을 뿐 아니라 좀 더 많은 연구가 기

대되는 바이다.

이상의 결과를 종합하여 보면 허혈 30분에 야기되는 기저 긴장도의 증가는 재관류시의 심기능회복과 밀접한 관계가 있고, 이 재관류시의 기능 회복은 허혈 30분에 초래되는 creatine kinase 저하, malondialdehyde 증가와, 유리형 lysosome 효소 비율의 증가와 직접적인 또는 간접으로 관련이 있을 것이라고 추측되며 calmodulin 억제제가 calcium 통로를 경유해서 간접적으로 이러한 효과를 나타낼 것인지, 아니면 calmodulin 억제제가 직접적으로 여러 효소의 작용에 관여하여 야기된 것인지는 확실하지 않으나 심근의 허혈 손상 과정에 calmodulin이 중요한 역할을 한다고 사료되는 바이다.

요 약

허혈-재관류시의 세포내 calcium-calmodulin 복합체의 활성으로 심근손상이 초래될 것이라는 가정 아래 실험을 행하였다. 본 실험에서는 적출 흰쥐 심장을 Langendoff 관류 장치에 연결하고 30분간의 허혈 후 60분간의 재관류에 의하여 야기되는 손상에 대하여 calcium 통로 봉쇄제(diltiazem, $3.3 \mu\text{M}$)와 calmodulin 억제제(TFP, $3.3 \mu\text{M}$; flunarizine, $0.5 \mu\text{M}$; calmidazolium, $0.5 \mu\text{M}$)의 심보호 효과를 관찰하고 이를 기초로하여 허혈 30분에 발생하는 기저 긴장도의 증가에 대한 재관류시의 심기능 회복과 허혈 30분에 일어나는 생화학적 변동과 관련하여 허혈 손상의 기전에 있어서 calcium과 calmodulin의 중요성을 밝혔다.

1. 허혈군에서 기저긴장도가 허혈 30분에 4.1 ± 0.2 g 증가되었으나 이는 diltiazem 뿐만 아니라 calmodulin 억제제의 전처치에 의하여 감소하였다.

2. 허혈군에서 재관류에 의한 심근 수축력, $\pm dF/dt$ 및 관상관류량이 크게 저하되었으며 이는 diltiazem과 calmodulin 억제제에 의하여 방지되었다.

3. 이들 약물들에 의한 기저 긴장도 증가의 억제와 재관류시의 심기능 회복 사이에는 밀접한 상관관계가 있었다.

4. 30분간의 허혈에 의하여 malondialdehyde의 생성과 lysosome 효소의 유리가 현저히 증가되었고 creatine kinase의 활성은 저하되었다.

5. 허혈에 의한 생화학적 변동은 diltiazem 뿐만 아니라 calmodulin 억제제 모두에 의하여 현저히 방지되었다.

이상의 결과로서 허혈 30분에 야기된 기저 긴장도의 증가는 재관류시의 심기능 회복과 밀접한 관계가 있고, 재관류시의 심기능 회복은 허혈 30분에 초래되는 creatine kinase 저하, malondialdehyde 증가, 유리형 lysosome 효소 비율의 증가와 크게 관련이 있을 것이라고 추측되며, 이는 calmodulin 억제제에 의하여 방지되었다.

* 본 실험을 적극 도와 주신 부산대학교 약리학 교실의 홍기환 교수님과 교실원들에게 깊은 사의를 표합니다.

REFERENCES

1. Fleckenstein, A., Janke, J., Doring, H.J. and Leber O.: Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload-a new principle in cardiac pathophysiology. In *Myocardial Biology*, edited by N. S. Dhalla and G. Rona. Baltimore, MD: Univ. Park, pp. 563, (1974).
2. Nayler, W.G., Pool-Wilson, P.A. and William, A.: Hypoxia and calcium. *J. Moll. Cell Cardiol.*, 11:683, (1979).
3. Katz, A.M. and Reuter, H.: Cellular calcium and cardiac cell death. *Am. J. Cardiol.*, 11: 188, (1979).
4. Cheung, J.Y., Bonventre, J.V., Malis, C.D. and Leaf, A.: Calcium and ischemic injury. *N. Engl. J. Med.*, 314:1670,(1986).
5. Sugano, T., Oshino, N. and Chance, B.: Mitochondrial function under hypoxic conditions. The steady states of cytochrome c reduction and of energy metabolism. *Biochem. Biophysic. Acta*, 347:340, (1974).
6. Tomlinson, C.W. and Dhalla, N.: Excitation-contraction coupling in heart. IX. Changes in intracellular stores of calcium in failing hearts due to lack of substrate and oxygen. *Cardiovasc. Res.*, 7:470, (1973).
7. Chien, K.P., Sen, A., Reynolds, R., Chang, A., Kim, Y., Gunn, M.D., Buja, L.M. and Willerson, J.T.: Release of arachidonate from membrane phospholipids in cultured neonatal rat myocardial cells during adenosine triphosphate depletion. Correlation with the progression of cell injury. *J. Clin. Invest.*, 75:1770, (1985).
8. Franson, R.C., Pang, D.C., Towle, D.W. and Weglicki, W.G.: Phospholipase A2 activity of highly enriched preparations of cardiac sarcolemma from hamster and dog. *J.Moll. Cell Cardiol.*, 10:921, (1978).
9. Kim, M.S. and Akera, T.: O₂ free radicals: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺ -K⁺ -ATPase. *Am.J. Physiol.*, 252: H 252,(1987).
10. Hess, N.L., Manson, N.H.: 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.*, 16:969, (1984).
11. Simpson, P.J., Lucchesi, B.R.: Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury. *J. Lab. Clin. Med.*, 110:13, (1987).
12. Cheung, W.Y.: Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science*, 207:19, (1980).
13. Walsh, M.P., Lepeuch, C.J., Vallet, B., Cavdore, J. and Demaille, J.: Cardiac calmodulin and its role in the regulation of metabolism and contraction. *J. Moll. Cell Cardiol.*, 12:1091, (1980).
14. Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. and Shuman, H.: Electron probe analysis of vascular smooth muscle. Composition of mitochondria, nuclei and cytoplasm. *J. Cell Biol.*, 81:316, (1979).
15. James-Kracke, M.R., Sloane, B.F., Shuman, H., Karp, R. and Somlyo, A.P.: Electron probe analysis of cultured vascular smooth muscle. *J Cell physiol.*, 103:313, (1980).
16. Carafoli, P.: Calmodulin in the regulation of calcium fluxes in cardiac sarcolemma. *Adv. Myocardiology*, 5:97, (1985).
17. Liu, Y.P. and Cheung, W.Y.: Cyclic 3', 5'-nucleotide phosphodiesterase: Ca²⁺ confers more herical conformation to the protein activator. *J. Biol. chem.*, 251:4193, (1976).
18. LaPorte, D.C., Wierman, B.M. and Storm, D.R.: Calcium-induced exposure of a hydrophobic surface on calmodulin. *Biochemistry*, 19:3814, (1980).
19. Schaffer, S.W., Roy, R.S., M Cord, J.M.: Possible role for calmodulin in calcium paradox-induced heart failure. *Eur. Heart J.*, 4(Suppl H): 81, (1983).
20. Moskowitz, N. Andres, A., Silva, W., Shapiro, L., Schook, W. and Puskin, S.: Calcium-dependent binding of calmodulin to phospholipase A2 subunits induces enzymatic activation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 241:413, (1985).
21. Sobel, B.E., Shell, B.E., Shell, W.E. and Klein,

- M.S.: *An isoenzyme of creatine phosphokinase associated with rabbit heart mitochondria. J. Mol. Cell Cardiol.*, 4:367, (1972).
22. Forster, G., Gernt, E. and Bergmeyer, H.U.: *Creatine phosphokinase determination with creatine phosphate substrate. In Methods of Enzymatic Analysis Vol II, 2nd Ed., edited by H.U. Bergmeyer, academic Press, New York, pp. 789. (1974).*
 23. Barrett, A.J. and Heath, M.F.: *Lysosomal enzymes. In lysosomes, a Laboratory Handbook, ed. 2, ed. by J.T. Dingle, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 19. (1977).*
 24. Yagi, K.: *Assay for serum lipid peroxide level and its clinical significance. In Lipid Peroxides in Biology and Medicine, Academic Press, NY, pp.223. (1982).*
 25. Ichihara, K., Haneda, T., Onodera, S. and Abiko, Y.: *Inhibition of ischemia-induced subcellular redistribution of lysosomal enzymes in the perfused rat heart by the calcium entry blocker, Diltiazem. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242:1109, (1987).
 26. Cheung, W.Y.: *Cyclic 3, 5-nucleotide phosphodiesterase: demonstration of an activator. Biochem. Biophys. Res. commun.*, 38:533, (1970).
 27. Kakiuchi, S. and Yamazaki, R.: *Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 41:1104, (1970).
 28. Cheung, W.Y., Bradham, L.S., Lynch, T.J., Lin, Y.M. and Tollant, E.A.: *Protein activator of cyclic 3, 5-nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66:1055, (1975).
 29. Brostrom, C.O., Huang, Y.C., Breckenridge, B.M. and Wolff, D.J.: *Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* 72:64, (1975).
 30. Gopinath, R.M. and Vincenzi, F.F.: *Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of (Ca-Mg) ATPase. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77:1203, (1977).
 31. Jarrett, H.W. and Penniston, J.T.: *Partial purification of the $Ca^{++}-Mg^{++}$ ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3, 5-cyclic nucleotide phosphodiesterase. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 77:1210, (1977).
 32. Adelstein, R.S, Sellers, J.R., Conti, M.A., Pato, M.D. and Delamerle, P.: *Regulation of smooth muscle contractile proteins by calmodulin and cyclic AMP. Fed. Proc.*, 41:2873, (1982).
 33. Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J.G., Cohen, P.T.W., Vanaman, T.C. and Nairn, A.C.: *Identification of Ca dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. FEBS Lett.*, 92:287, (1978).
 34. Katz, S. and Remulla, M.A.: *Phosphodiesterase activator stimulates calcium transport in cardiac microsomal preparations enriched in sarcoplasmic reticulum. Biophys. Res. Commun.*, 83:1373, (1978).
 35. Thayer, S.A. and Fairhurst, A.S.: *The interaction of dihydropyridine calcium channel blockers with calmodulin and calmodulin inhibitors. Molec. Pharmacol.*, 24:6, (1983).
 36. Cocks, T.M., Dilger, P. and Jenkinson, D.H.: *The mechanism of the blockade by trifluoperazine of some actions of pheylephrine on liver and smooth muscle. Biochem. Pharmacol.*, 30: 2873, (1981).
 37. Bkaily, C., Sperelakis, N. and Eldefrawi, M.: *Effects of the calmodulin inhibitor, trifluoperazine, on membrane potentials and slow action potentials of cultured heart cells. Eur. J.Pharmacol.*, 105:22, (1984).
 38. Godfraind, T. and Dieu, D.: *The inhibition by flunarizine of the norepinephrine-evoked contraction and calcium-influx in rat aorta and mesenteric arteries. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217: 510, (1981).
 39. Wadsworth, R.M. and Moss, J.P.: *Time course of the effect of flunarizine on rabbit isolated vascular muscle. Eur. J. Pharmacol.* 85:207, (1982).
 40. Van Belle, H.: *R24571: a potent inhibitor of calmodulin activated enzymes. Cell Calcium*, 2:483, (1981).
 41. Chien, K.R., Abrams, J., Serroni, A., Martin, J.T. and Farber, J.L.: *Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible ischemic liver cell injury. J. Biol. Chem.*, 253:4089, (1978).
 42. Glende, E.A. and Pushpendran, C.K.: *Activation of phospholipase A2 by carbon tetrachloride in isolated rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol.*, 35:3301, (1986).

43. Nicotera, P., Hartzell, P., Baldi, C., Svensson, S.A., Bellomo, G. and Orrenius, S.: *Cystamine induces toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca and the stimulation of a nonlysosomal proteolytic system. J. Biol. Chem.*, 261:14628, (1986).
44. Mc allister, L.P., Daiello, L.P., and Tyers, G.F.O.: *Morphometric observations of the effects of normothermic ischemic arrest of dog myocardial ultrastructure. J. Moll. Cell. Cardiol.*, 10:67, (1978).
45. Higgins, A.J. and Blackburn, K.J.: *Prevention of reperfusion damage in working rat hearts by calcium antagonists and calmodulin antagonists. J. Moll. Cell. Cardiol.*, 16:427, (1984).
46. Henry, P.D., Shuchleib, R., Davis, J., Weiss, E.S. and Sobel, B.E.: *Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial calcium in ischemic rabbit heart. Am. J. Physiol.*, 233(6): H677, (1977).
47. Hess, M.L., Manson, N.H., and Okabe, E.: *Involvement of free radicals in the pathophysiology of ischemic heart disease. Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60:1382, (1982).
48. Okabe, E., Tanaka, K. and Ito, H.: *Myocardial ischemia and oxygen free radicals, Free Radicals Clin. Med.*, 1:31, (1987).
49. Peterson, D.A., Asinger, R.W., Elsperger, K.J., Homans, D.C. and Eaton, J.W.: *Reactive oxygen species may cause myocardial reperfusion injury. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 127:87, (1985).
50. Guarnieri, C., Flamigni, F., Caldarella, C.M.: *Role of oxygen in the cellular damage induced by hypoxic heart. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12:797, (1980).
51. Freeman, B.A. and Crapo, J.D.: *Free radicals and tissue injury. Lab. Invest.*, 47:412, (1982).
52. Meerson, F.Z., Kagon V.E., Kozlov, Y.P.: *The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. Basic Res. Cardiol.* 77:465, (1982).
53. Greenberg, D.A., Carpenter, C.L., and Messing, R.O.: *Interaction of calmodulin inhibitors and protein kinase C inhibitors with voltage-dependent calcium channels. Brain Research*, 404:401, (1987).