

## 과산화지질에 대한 재고찰 : 지방산 산화물은 고등생물이 만들어내는 칼슘-수송체인가?

송 영 순

캐나다 마니토바대학교  
의과대학 약리학과

(Received January 5, 1991)

### Lipid Peroxidation Revisited : Are Oxidized Fatty Acids Cell's Own Calcium-Specific Ionophores Produced by Higher Organisms ?

Ryungsoon Song Kim

*Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Manitoba, Faculty of Medicine  
770 Bannatyne Avenue Winnipeg, Manitoba, Canada R3E 0W3*

**Abstract**—Ionophores, uniquely, create specific pathways of ion permeability in model and cell membranes. Calcium-transporting ionophores of microbiological origin, such as A23187 and ionomycin, have been used as experimental tools to elucidate the physiological role of calcium as a second messenger in many cell types. These ionophores are believed to bypass the initial ligand-receptor step in the activation of cells by increasing membrane permeability to calcium. In this report, we shall discuss several naturally occurring substances that share some properties of calcium-ionophores, primarily concentrating on oxidized fatty acids. We have previously demonstrated that oxidized linoleic and arachidonic acids, obtained either by lipoxygenase catalysis or nonenzymatic processes, significantly promote calcium translocation in a two-phase partition model and modulate calcium-transporting function in the isolated sarcoplasmic reticulum vesicles obtained from mammalian hearts. We have also confirmed that calcium-ionophoric properties are due not to their general amphiphilic nature of certain lipids, but to distinct structural characteristics. Although there are some skeptical views on the occurrence of ionophores in higher organisms, increasing evidence suggests that membrane lipids or their derivatives may serve as physiological calcium-ionophores. Abnormal accumulation of lipid peroxidation products (particularly end products), however, may be associated with the general oxidative damages as seen in many pathological conditions.

**Keywords** □ calcium-specific ionophores, lipid peroxidation, oxidized fatty acids, lipoxygenase metabolites.

미생물로부터 유래된 물질 중에는 유용하면서도 흥미를 자아내는 것들이 많은데, 그 중의 하나가 “ionophores”라고 알려진 化合物이다. ionophore라는 용어는 1967년에 Pressman<sup>1)</sup>이 알칼리성 양이온과 지용성 복합체(lipid-soluble complexes)를 형성하므로써 양이온을 지질장벽(lipid barrier)을 통과시킬 수 있는 특성을 가진 수송체(mobile carrier)를 묘사하기 위하여 고안했었다. 그러나 때로는 channel을

형성할 수 있는 물질(quasi-ionophore)을 지칭할 때도 사용된다. 이들 ionophore는 다양한 구조를 갖고 있음에도 불구하고 한 가지 공통점이 있다. 즉, 이들 모두가 非 水溶性 phase를 통과하거나 그 内部로 이온을 수송할 수 있는 능력을 가졌다는 점이다.

ionophore가 특히 흥미를 끌게된 이유는 많은 생물學的 과정, 예를 들어서 신경매개체(neurotransmitter)가 흥분의 방출(release), 근육의 excitation-con-

traction coupling 과정 등에서 主역할을 하는 칼슘 이온( $\text{Ca}^{2+}$ )의 중요성을 입증하는데 A23187과 같은 二價(divalent) ionophore가 크게 도움이 되었기 때문이었다. 따라서 이온-ionophore로 이루어진 복합체의 본질 규명이나, 人工合成膜, 혹은 자연生體膜과 ionophore와의 상호작용에 대한 연구가 과거 수십년간 활발하게 진행되었다. 이 중설에서 저자는 ionophore에 관하여 알려진 것들은 종합적으로 간단히 기술하고, 미생물 이외의 고등생물에도 이와 유사한 성질을 가진 물질이 존재하는지, 특히 지방산 유도체를 그 한 예로 들어 저자 실험실에서 연구한 것들을 소개해 볼까 한다.

### Ionophore의 화학적 구조

polyene이라는 一群의 化合物에 속하는 ionophore 중에는 음이온만을 수송하는 것(anion-specific)들도 있으나<sup>2)</sup> 대개의 ionophore들은 무기성양이온의 수송을 촉진한다. ionophore가 自然膜 또는 人工膜 내에서 효율적인 기능을 발휘하기 위해서는 다음과 같은 몇 가지의 기능적이며 구조적인 특성을 지녀야 한다.<sup>3)</sup>

(1) polar group과 nonpolar group을 다같이 구비해야 된다. polar group은 복합체를 이룬 이온의 一次的 용매球(primary solvation sphere)에서 용매 분자를 대치시키는 ligand 역할을 하는데 보통 5~8개의 liganding polar group이 가장 이상적이다. nonpolar group은 생체막의 소수성 환경을 통과하는데 필요하다.

(2) 안정된 conformation을 가지므로써 polar group이 양이온을 둘러싸기에 적합하도록 유도해야 한다. 이 때 alkyl group은 ionophore의 主軸을 이루면서 밖을 向하게 된다. 공동(cavity)주위를 경직된 배열을 만들어 coordination site를 고정시키므로써 高度의 선택성을 갖게 된다. 다시말하면 제한된 유연성의 정도에 따라서 공동의 크기가 결정되고, 거기에 맞는 특정 반경을 가진 이온과의 상호작용 선호도에 따라 수송될 이온이 결정되기 때문이다.

(3) ionophore가 성능이 좋은 수송체로 작용하기 위해서는 상당히 빠른 속도로 complexation-decomplexation 작용이 진행되어야 한다. 이 때에 이온을 둘러싼 용매분자와 동시치환을 하는 것 보다는 단

계적 대치를 할 수 있도록 충분한 유연성을 갖고 있어야 한다. complexation 친화도가 너무 낮아서 복합체를 이루기 힘들어도 안되지만, 친화도가 너무 높아서 수송된 이온들을 방출시키는데 지장을 초래해서도 안된다. 다시말하여 이온친화도와 이온교환力學 사이에 알맞은 절충이 있어야만 최적의 이온 수송을 할 수 있게 된다.

다양한 구조를 가진 100여개의 자연적 ionophore가 현재까지 발견되었는데, 그 중 대표적인 것들을 Fig. 1에 열거해 본다. X-線 결정학적 연구로 ligand 형성에 참여하는 것으로 알려진 heteroatom들(主로 산소)은 까맣게 칠해 놓았다. 먼저 미생물에서 유래한 것들로 valinomycin(A)을 들 수 있다. valinomycin은 hydroxy acid와 amino acid가 하나씩 교대로 연결하여 환상의 구조를 이루고 있는 peptide인데 36개의 원자들이 covalent bond로 주축에 결합하여 4Å의 높이와 10Å의 넓이를 가진 목걸이 모양을 이룬다. ligand를 형성하는 산소원자들이 立體的인 공동을 만들어  $\text{K}^+$ 을  $\text{Na}^+$ 보다 더 알맞게 수용할 수 있기 때문에 10,000 : 1의 비율로  $\text{K}^+$ 을 선호하여 운반한다.<sup>1,4)</sup>

enniatin(B)은 valinomycin 크기의 절반쯤되는 고리모양이지만 너무 작아서 팔찌 모양도 만들 수 없으며, 不安定한 형태의 평면을 이룰 수 있을 뿐이다. complex를 형성할 구조(cage)도 valinomycin보다 명확하지 못하므로  $\text{K}^+$ 의  $\text{Na}^+$ 에 대한 선택도가 valinomycin에서 보다 훨씬 감소되어 3 : 1( $\text{K} : \text{Na}$ ) 정도이다.<sup>5)</sup>

nactins(C)은 4개의 tetrahydrofuranyl hydroxy acids가 ester bond로써 서로 연결되었으며, ligand를 형성하는 산소들이 立方體의 정점에 각기 위치하고 있다.<sup>6)</sup> 32개의 원자들이 covalent bond로 주축에 결합되어 마치 정구공의 이온선 같은 4분된 구조를 갖고 있다.<sup>7)</sup> 치환기 R(ethyl기)의 수에 따라 monactin, dinactin, trinactin, tetranactin 등으로 명명하며,  $\text{K}^+ : \text{Na}^+$ 의 선택도는 valinomycin보다 적다.

crown polyethers(D)는 合成 ionophore로써 예(dicyclohexyl-18-crown-6)에서 보는 바와 같이 benzyl, cyclohexyl, naphthyl기 등을 함유한 다양한 크기의 crown ring을 갖고 있으며, 모두 ether 결합으로 되어 있다.<sup>8)</sup> 일반적으로 자연산 ionophore 보다 양이온과의 친화성이 부족하고, 이온 운송능력이나 선택도가 떨어지나<sup>9)</sup> alkali 또는 alkali earth 化合物과

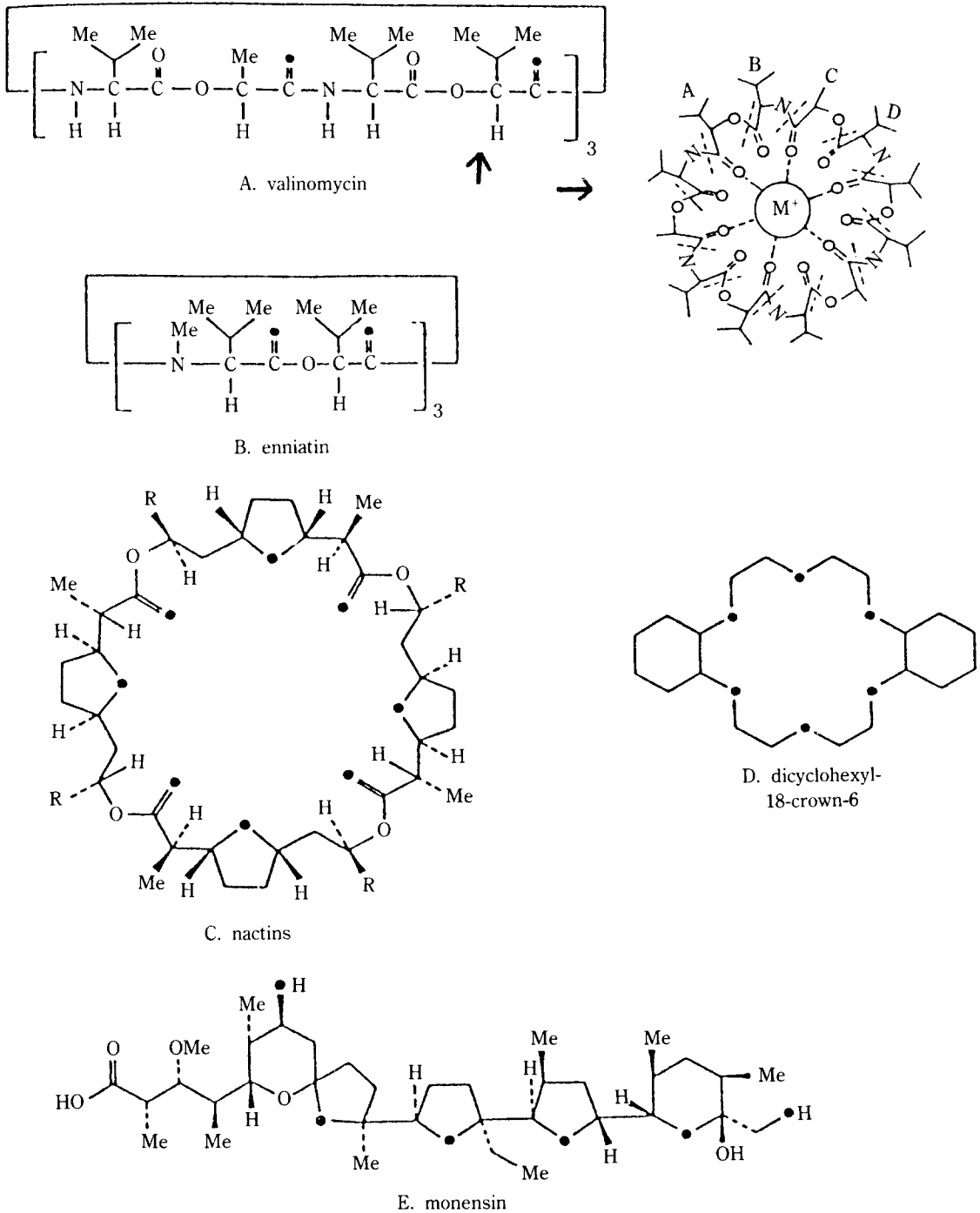


Fig. 1—Structures of representative ionophores.

For valinomycin, the residues between dashed lines are (A) D- $\alpha$ -hydroxyisovaleric acid, (B) L-valine, (C) L-lactic acid and (D) D-valine. For lasalocid, (a) is referred to as “unprimed” and represents the first of two ionophores to ligand to  $Ba^{2+}$ ; (b) is the second ionophore and is referred to as “primed”. Structure (a) of lasalocid also represents the complex formed with monovalent cations.<sup>17)</sup>

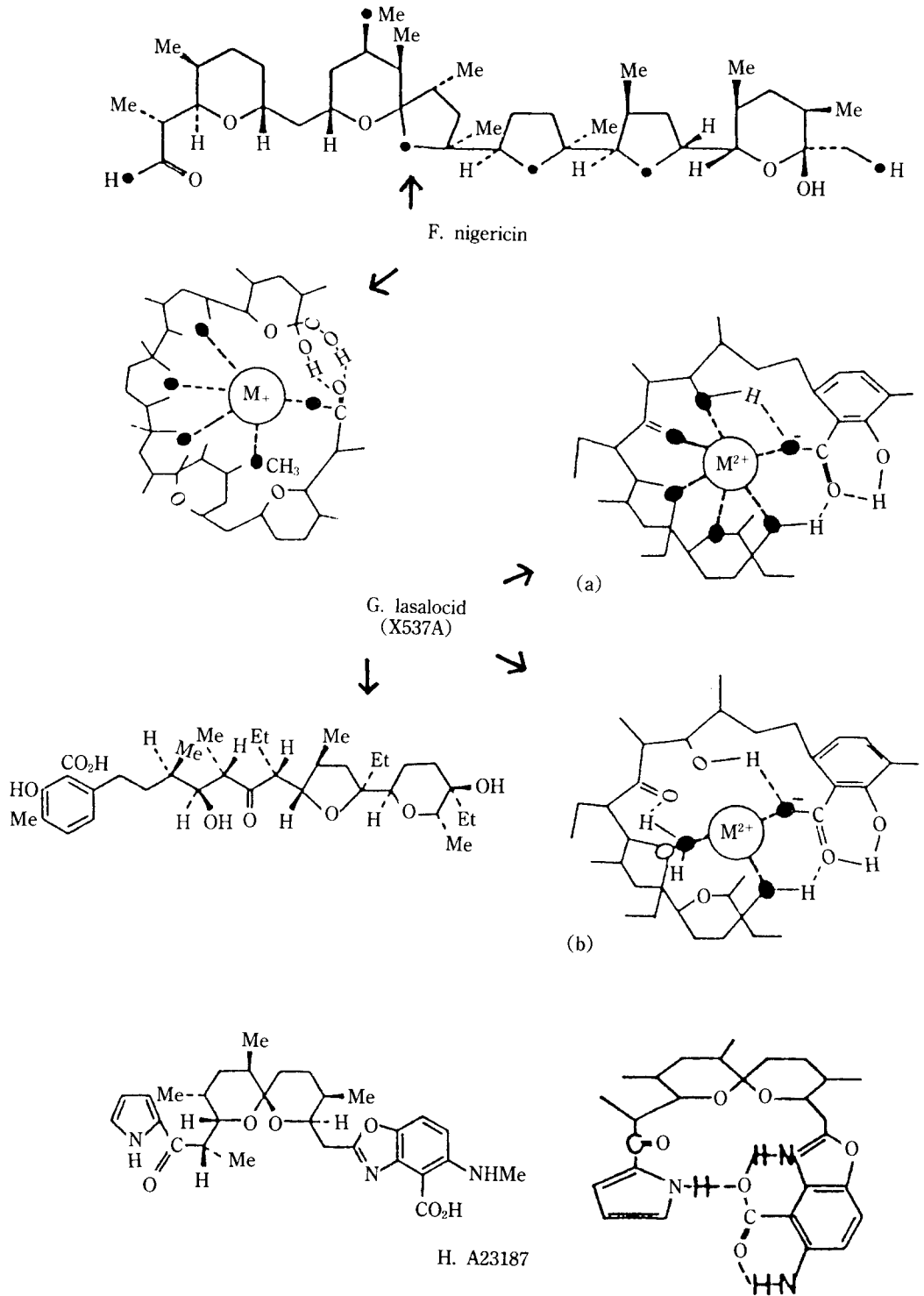


Fig. 1-(continued)

안정된 complex를 형성할 수 있다.

生體에 대한 영향력 보다는 유기合成에서 촉매로 더 많이 이용된다.

이상 열거한 ionophore들은 이온化 할 수 있는 기가 없기 때문에 총괄적으로 neutral ionophore라고 부른다.<sup>10)</sup> 이들 中性 ionophore는 양이온과 복합체를 이룬 후 電荷를 갖게되며 electrochemical gradient를 따라 이온을 운송하는 역할을 한다.

生理的 pH에서 이온化 할 수 있는 말단 carboxyl기를 갖는 一群의 化合物을 carboxylic ionophore라고 분류한다.<sup>9)</sup> 이들은 양이온과 전기적으로 中性인 zwitterionic complex를 형성하여 한 종류의 이온을 다른 종류의 이온으로 교환함과 동시에 확산(exchange diffusion)시키는 作用을 증진하는 역할을 한다.

carboxylic ionophore는 monensin(E)에서 보는 바와 같이 neutral ionophore와 같은 반복된 구조를 갖고 있지 않다.<sup>11,12)</sup> 곁보기에는 tetrahydrofuran과 tetrahydropyran ring이 일직선을 이룬 것 같으나 ring에서 기인한 molecular chirality와 주축을 따라 산재한 asymmetric carbon들 때문에 quasi-cyclic configuration을 선호한다.

머리부분과 꼬리부분을 잇는 수소결합으로 말미암아 안정성이 증가되며, K<sup>+</sup>보다 Na<sup>+</sup>과의 친화도가 10배 가량 높다.<sup>9)</sup>

nigericin(F)은 monensin과 그 구조가 비슷하나 tetrahydropyran ring이 한 개 더 있으므로 carboxyl기를, complex를 이루는 공동안 쪽으로 더 견고하게 밀어넣을 수 있기 때문에 양이온과 이온결합을 할 수 있다.<sup>13,14)</sup> monensin과 비슷한 구조에도 불구하고 Na<sup>+</sup>보다 K<sup>+</sup>를 100배나 선호한다.

lasalocid(X-537A)(G)는 monensin이나 nigericin보다 작으며, 20개의 원자들로 주축을 이루고 있다.<sup>15,16)</sup> 쉽게 dimer를 이루려는 특성 때문에<sup>15)</sup> Ca이나 Mg과 같은 生物學的으로 중요한 二價 이온들과 2 : 1(2 X-537A : 1 M<sup>2+</sup>)로 결합하여 전기적으로 中性인 complex를 형성한다(X-537A/Ca의 비율이 낮을 때에는 Ca과 1 : 1로도 결합한다).<sup>19)</sup> 다른 ionophore보다 구조상의 유연성이 크므로 광범위한 이온들(一價, 二價, 三價)과 결합할 수 있을 뿐만 아니라<sup>17)</sup> catecholamine과 같은 primary amine과도 1 : 1로 복합체를 이루기 때문에 生體內에 많은 영향을 줄 수 있다.<sup>18)</sup>

A23187(H)는 질소를 함유한 heterocyclic ring을 가진 특이한 化合物로 X-537A와 마찬가지로 aromatic ring을 갖고있다. 다른 ionophore에 비하여 결정구조학적 연구가 난해한 점이 있으나<sup>20)</sup> Na<sup>+</sup>이나 K<sup>+</sup>보다는 Ca<sup>2+</sup>을 훨씬 효과적으로 수송하며, 2 : 1(2 A23187 : 1 Ca<sup>2+</sup>)의 비율로 결합한다는 의견이 지배적이다.<sup>19,21,22)</sup> 이와같이 A23187가 生體의 대사작용에서 큰 역할을 하는 Ca이온을 선택적으로 통과시켜 세포내의 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시킬 수 있는 능력을 갖기 때문에 각종의 生物學的 과정을 연구하는 데에 널리 사용되었다. 이 밖에도 Ca<sup>2+</sup>-selective ionophore로 최근에 소개된 ionomycin이 있는데, 이 化合物은 carboxyl기 이외에 또 하나의 음이온을 가진 enol group이 있어서 Ca과 1 : 1로 결합한다.<sup>23)</sup>

中性 ionophore는 이온 뿐만 아니라 電荷도 세포막을 통과하여 함께 운반하기 때문에 이온농도의 gradient와 동시에 전위차에도 변화를 초래한다. 따라서 membrane potential이 중요통제역할을 갖는 신경, 근육, 내분비선 세포들과 같은 excitable cells에서 대사적 교란상태(metabolic chaos)를 야기시킬 수 있기 때문에 intact 동물이나 장기 세포에 매우 유독하다. 이와 반대로 carboxylic ionophore는 세포막의 전위차를 교란시키지 않고 막을 통과하여 전기적으로 中性인 zwitterionic complex 형태로 양이온을 교환하는 역할을 하므로 intact 동물에 부담을 적게하여 치료제로서도 보다 큰 가치를 갖고있다.<sup>3)</sup> 실제로 carboxylic ionophore가 어떤 특수한 cardiovascular effects를 갖고 있음이 증명되었으며,<sup>24)</sup> 특히 가축의 사료에 첨가제로 광범위하게 사용되고 있다.<sup>25,26)</sup>

### Ionophore의 약리학적 성질

이들 두 종류의 ionophore가 다같이 生物學界의 *in vitro* 연구에 다방면으로 사용되어 왔으나, carboxylic ionophore만이 前述한 바와 같이 동물에 대한 有毒性이 적기 때문에 동물실험에서 확실한 약리효과를 나타내게 된다. 二價 ionophore를 이용한 대부분의 연구가 mitochondria의 기능, stimulus-contraction coupling, stimulus-secretion coupling에 관한 것이거나 多數의 특정한 세포기능(예를 들어 oocyte activation, platelet fusion, lymphocyte activation 등)

또는 대사과정 등  $Ca^{2+}$ 의 역할을 규명하려는 데에 목적을 둔 것들이 대부분이었다. 이 중에서도  $Ca^{2+}$ 에 의존하는 평활근, 골격근, 심장근의 수축과정 연구에 A23187과 X537A가 맨 먼저 사용되었다.

A23187<sup>27,28)</sup>이나 X537A가 다같이 적출된 sarcoplasmic reticulum(SR)으로부터  $Ca^{2+}$ 을 방출시키며<sup>27, 33)</sup> 쥐,<sup>34)</sup> guinea pig,<sup>30,34,35)</sup> 토끼<sup>17,30)</sup>와 개<sup>33,36)</sup>의 심근이나 평활근<sup>37, 40)</sup> 또는 골격근<sup>42)</sup>의 수축을 증가시킨다. 따라서 이들 ionophore가 임상적 가치가 있는 신종의 inotropic agent로 인정을 받게되었다.

그러나 X537A의 작용은 그 일부가 직접적인  $Ca^{2+}$ 수송에 기인된 것이라기 보다는  $Na^+$ 의 증가에 따른 간접적인  $Ca^{2+}$ 의 증가에 의한 것<sup>10,41)</sup>과 ionophore의 catecholamine을 운송할 수 있는 기능, 즉 심장내의 neurotransmitter release에 의한 것이라고 추정된다.<sup>17,34,42)</sup> Ca-specific ionophore인 A23187에 관한 실험에서는 기대한 만큼의 강심효과를 항상 얻은 것은 아니다. Holland 등<sup>35)</sup>이 농도에 비례하는 심근 수축력의 증가를 보고한 반면, Schwartz<sup>33)</sup> 연구팀은 같은 동물(guinea pig)의 심방에서도 아무런 반응을 얻지 못했다. 이와 같은 A23187에 관한 모순된 결과는 심장혈관의 기능을 연구한 실험에서도 보고된 바 있다. 여하간 직접(divalent-specific ionophore의 경우) 또는 간접(monovalent-specific ionophore의 경우)으로 세포내의  $Ca^{2+}$  농도를 증가시킬 수 있는 ionophore와 양이온 뿐만 아니라 catecholamine을 수송할 수 있는 X537A(nonspecific ionophore)가 모두 cardiovascular system에 지대한 영향을 주는 것만은 틀림없다.

### Ionophore의 用途

多量の 出血로 인한 쇼크(hemorrhagic shock) 상태에서 수혈할 때 까지의 임시적 치료수단으로, 그리고 울혈성心不全症의 급성 代償不全에 임상적 가치가 있다고 알려진 이외에<sup>17,36,43)</sup> 가축사료의 첨가제로 monensin, narasin, salinomycin, X537A 등이 사용된다.<sup>44)</sup> 이들 ionophore가 양계업에서 강력한 구충제(anticoccidial agents)로 이용될 뿐만 아니라<sup>45)</sup> 가축사료에 첨가시에 고기생산(feed comersion to meat)을 증가시키므로 경제的 효율성을 높여준다.<sup>46,47)</sup> 그러나 강한 약리작용을 가진 항생제를 사람의 식품에 투입하게 되므로 큰 논란이 되고있다.<sup>43)</sup>

ionophore는 생화학자들에 의해서 양이온의 수송을 연구하는데 중요한 도구로 이용되며, 生物學的 과정에서 특정이온의 역할과 lipid bilayer와 세포막의 電化學的 성질을 규명하는데, 그리고 membrane-bound carrier의 연구에 귀중한 모델로 사용되고 있다. 이 외에도 合成 ionophore는 유기화학에서 racemic cation을 분해하거나(optically active cram polyethers의 경우),<sup>48,49)</sup> 反應力이 높은 無機化合物(KOH,  $KMnO_4$ ,  $KBH_4$  등)과 complex를 형성하는 능력을 이용하여(cryptates, crown polyether 등) 이들을 유기용매에 용해시킬 수 있기 때문에 촉매제로 사용되며,<sup>5)</sup> ion-selective electrode의 제작에도 사용된다.<sup>10)</sup>

### 高等生物에도 Ionophore가 存在하는가?

高等生物에도 미생물에서 얻어진 ionophore와 마찬가지로  $Ca^{2+}$ 을 세포(내)막을 통과시켜 막의 内外로 운송하거나 수용액으로부터 nonpolar-용매( $CHCl_3$ ,  $CCl_4$  등)로 운송할 수 있는 능력을 가진 ionophore의 유사체가 存在하는지를 검토해 보기 전에 어떠한 경로로 이러한 물질을 색출할 수 있는지를 알아보겠다. ionophore의 성능을 측정하는 데는 몇가지의 方法이 이용되고 있다. 특정의 化合物이 이온을 aqueous phase에서 nonpolar phase로 추출할 수 있는 능력을 직접 측정하는 것도 그 한 方法인데, 이 때 이온의 분포는 radioactive tracer(例:  $^{45}Ca$  등)를 이용하거나 이온-complex에 의한 자외선 또는 형광의 분광도의 변화정도로 측정하게 된다. 合成 또는 자연生體膜을 통과하여 이온을 수송할 수 있는 능력을 측정하는 최종적인 方法은 특정이온을 장벽의 어느 한 쪽에서 검출하거나, 혹은 전기적성질, 삼투효과, 대사반응 등의 변화를 관찰하는 등과 같은 간접적인 方法에 의해서 결정할 수 있다. 이 때 사용하는 측정 조건에 따라 주어진 이온-ionophore 복합체의 flux rate가 크게 좌우되며, 어떤 경우에는 용매의 상대적 polarity 또는 지용성 음이온의 共存 등과 같은 실험 조건이 이온선택성에 영향을 줄 수도 있다는 것을 명심할 필요가 있다.

이와 같은 方法을 사용하여 고등생물에도 ionophore와 유사한 성능을 가진 물질들이 存在한다고 보는 견해가 문헌에 종종 보고되어 왔다. 例를 들어 生體膜을 구성하는 지질,<sup>50)</sup> 단백질,<sup>51)</sup> 담즙산(bile

acids)<sup>52)</sup>과 prostanoids<sup>53,54)</sup>들이 이른 바 “endogenous ionophores”로 지칭될 수 있다. 이 중에서도 특히 자연적으로 존재하는 PGB<sub>1</sub>에서 유도된 수용성 polymer인 PGB<sub>x</sub>가 가장 강력한 Ca-specific ionophore로 알려졌다.<sup>55-57)</sup> PGB<sub>x</sub>는 심장의 mitochondria나 sarcoplasmic reticulum의 소포체로부터 Ca<sup>2+</sup>을 방출시키며,<sup>55)</sup> 人體의 polymorphonuclear leukocytes에서 일련의 분비(secretion) 과정에 관여하는 등, 그 특성이 A23187과 매우 흡사하다.<sup>56)</sup> Hokin<sup>58)</sup>이 맨 먼저 시사한 것처럼 인지질, 특히 glycerolipid, phosphadate가 실제로 生體막을 통과시켜 Ca<sup>2+</sup>의 수송을 증개할 수 있다는 보고가 발표되었다.<sup>59,60)</sup> phosphatidylinositol(PI)의 분해로 인해서 새로 生成된 phosphatidic acid(PA)는 neurohumoral control 하에서 endogenous Ca-ionophore로 작용할 가능성이 높다.<sup>61)</sup> 한편 second messenger로 Ca<sup>2+</sup>을 이용하는 hormone이나 neurotransmitter들은 세포막의 PI를, receptor를 매개로 삼아 가수분해하여 diacylglycerol<sup>62)</sup>과 inositol triphosphate<sup>63)</sup>를 生成하는데, 前者는 세포막의 面内에서 C-kinase의 활성을 통하여 단백질의 phosphorylation을 촉진시키며, 後者は 세포内 저장소로부터 Ca<sup>2+</sup>을 cytosol로 방출시키는 second messenger의 기능을 발휘한다.<sup>64)</sup> 이와 같이 inositol triphosphate가 Ca<sup>2+</sup>을 동원시키는 주요한 内因性物質로 간주되고 있지만, 이와는 별개의 혹은 대역의 메카니즘을 가진 다른 물질들이 存在할 가능성을 배제할 수 없다. arachidonic acid(AA)의 대사물이 여러 종류의 세포内에서 Ca<sup>2+</sup>을 동원하며, 세포기능을 조절하는 역할을 한다고 알려져 있다. 예를 들면 AA나 그 metabolites(lipoxygenase의 대사경로로 얻어진)가 neutrophil의 plasma막의 Ca<sup>2+</sup>에 대한 침투력을 증가시킨다는 것이 증명되었으며,<sup>65)</sup> 이러한 작용이 Ca<sup>2+</sup>에만 특유하고 lipoxygenase 대사경로에 대한 억제제에 민감하다. mono- 또는 dihydroxy 유도체는 chemotactic 활성과 secretory 활성을 갖고 있고, AA의 유도체인 leukotriene B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)는 가장 강력한 chemotactic agent이다.<sup>66,67)</sup> LTB<sub>4</sub>는, 토끼의 neutrophil에서 PI의 분해나 PA 生成없이도 즉 그 자체가 Ca<sup>2+</sup>을 동원할 수 있다. AA를 LTB<sub>4</sub>로 전환시키는 lipoxygenase와 peroxidase의 두 효소가 혈소판 등 동물의 여러 조직중에 존재한다고 알려졌다. 또한 AA의 대사물이 gonadotropin releasing hormone의

작용에 매개체의 역할을 한다는 실험<sup>69)</sup> insulin의 분비메카니즘에도 관여한다고 보고되었다.<sup>70)</sup> 최근에는 새로 발견된 hydroxyepoxide의 일종인 hepoxilin A라는 AA의 대사물이 적출된 pancreatic islet에서 glucose-dependent insulin release를 촉진한다고 알려졌다<sup>71)</sup>이며, guinea pig의 visceral yolk sac를 통과하여 <sup>45</sup>Ca의 수송을 촉진한다고 발표되었다.<sup>71)</sup> hormone 통제에 중요한 生理的 역할의 가능성을 가진 신종의 lipidic ionophore를 대표할 수 있는 한 例라고 할 수 있겠다.<sup>71)</sup>

### 과산화지질의 Ca<sup>2+</sup> 운송작용

골격근, 특히 심근의 SR막은 다른 조직보다 예외적으로 불포화지방산이 많이 함유되어 있다. 불포화지방산의 산화물이 양이온투과성을 조절하는 기능을 갖고 있다는 직접적인 증거가 여러 실험실에서 증명되었다.<sup>72-74)</sup> pyridine nucleotide에 의존하는 membrane-bound enzyme에 의해서 生成된 과산화지질(lipid peroxide)이 근육세포内에서 매우 효율적인 Ca<sup>2+</sup> 수송의 modifier 역할을 한다고 알려진 바 있다. 이같은 NAD(P)H에 의존하는 과산화지질(lipid peroxidation)활동이 Ca-pump ATPase를 함유하고 있는 SR막에 최대로 존재하며, 이 활동의 자연적 억제제인 α-tocopherol도 SR막에 집중적으로 분포되어 있다는 사실을 볼 때, α-tocopherol이 지질과산화 작용의 조절에 큰 역할을 하고 있음을 암시한다.<sup>74)</sup>

불포화지방산의 산화물이 divalent-specific ionophore와 비슷한 성질을 가졌다는 사실은 1975년 Blondin이<sup>75)</sup> 소의 심장에서 적출한 mitochondria에서 18개 혹은 20개의 탄소를 가진 keto-와 hydroxy-dienoic acids를 추출하여 그 ionophoric activity를 측정함으로써 처음 알려졌다.

이 무렵에 저자팀실험실에서는 자연적으로 고등동물이나 人體内에 존재할 것이라고 추정되는 digitalis(강심제)유사물을 여러 동물의 장기에서 추출해 보려는 과정이었다. 불포화지방산이 digitalis receptor에 ligand로 결합할 수 있다는 것을 저자들이 증명했기 때문에<sup>76,77)</sup> 이와 같은 지방산 유도체에 큰 관심을 갖게되어, 여러 종류의 포화 및 불포화지방산과 그 유도체들을 Pressman이 고안한<sup>1)</sup> 2-phase system을 사용하여 Ca<sup>2+</sup> 수송능력을 조사하였다. 실제로 endo-

genous Ca-ionophore가 존재한다면, 심장 세포내의  $\text{Ca}^{2+}$  농도를 증가시키므로써 심수축력을 증가시킬 수 있을 것이며, 어느 면에서 강심제 역할을 할 수 있을 것이라는 추정에서 시작된 것이었다.

한편 New York의 Weissmann 실험실에서는 liposome 내에  $\text{Ca}^{2+}$ 에 민감하게 반응하는 arsenazo III라는 염료를 주입시켜서  $\text{Ca}^{2+}$  flux나 membrane perturbation을 연구할 수 있는 매우 간단하면서도 정확한 방법을 고안해 냈다.<sup>57,78)</sup> 그 후 이 연구진들이 이 방법을 이용하여 자연적으로 존재하는 인지질, 지방산, prostaglandin 유사물, retinoids 등 많은 물질들을 조사한 바 이 중에서  $\text{PGB}_x$ 와 di- 또는 trienoic acid의 산화물(AA의 산화물은 포함되지 않음)만이 Ca-ionophore의 역할을 한다고 발표했다.<sup>79)</sup> 이들 물질은 classic ionophore인 A23187이나 ionomycin과 마찬가지로 생물학적으로 중요한  $\text{Ca}^{2+}$ 을 우선적으로 수송하고,  $\text{Mg}^{2+}$ 에 대해서는 활성이 없었다( $\text{Mn} > \text{Ca} > \text{Sr} \gg \text{Mg}$ ). 이 실험으로 PA와  $\text{LTB}_4$ 가 강력한 Ca-ionophore라는 것이 입증되었음은 前述한 바와 같다. 또한 생물학의 활성이 있는 cis- $\text{LTB}_4$ 만이 효과적인데,<sup>80)</sup> 이것은 cis- $\text{LTB}_4$ 가  $\text{Ca}^{2+}$ 과 complex를 형성하여  $\text{Ca}^{2+}$ 을 운송할 수 있는 ionophoretic cage를 만들 수 있는데 반하여, 생물학의 활성이 없는 trans-isomer는 극히 상이한 conformation 때문에 이것이 불가능하기 때문이다. 즉, 이들 isomer가 前者[(5S, 12R)-dihydroxy-6-cis-8,10-trans-14-cis-eicosatetraenoic acid]는 지질막을 통과하고 membrane receptor와 작용하는데 최적인 공모양(globular shape)인데 반하여 後者[(5S, 12R)-dihydroxy-6,8,10-trans-14-cis-eicosatetraenoic acid]는 쪽 펼쳐진 모양을 취하기 때문이라는 것이 conformational analysis에 의해서 증명되었으며, 이 때문에 cis-isomer만이 이온수송능력과 생물학적 활성이 있다는 것이다.<sup>81)</sup>

#### 지방산유도체의 구조와 $\text{Ca}^{2+}$ 수송력과의 관계

저자 실험실에서는 필수지방산 중에서도 가장 보편적이며, 그 구조가 단순한 linoleic acid(18:2)와 lipoxygenase의 작용으로 얻은 linoleic acid의 대사물(metabolites), 그리고 autoxidation으로 얻은 산화물을 연구대상으로 하여  $\text{Ca}^{2+}$ 의 수송에 미치는 영향을 조사하였다.  $^{45}\text{Ca}$ 이 aqueous phase에서 지방산 유도

체를 함유하고 있는 혼합 不可한 organic phase로 수송되는 정도를 측정한 결과 산화되지 않은 순수한 linoleic acid는 고농도(>1 mM)에서만 Ca의 수송을 촉진시키는데 반하여 산화된 지방산은 低농도(10  $\mu\text{M}$ )에서도 Ca의 수송을 촉진시킨다는 사실이 증명되었다.<sup>82)</sup> linoleic acid의 대사산물(주로 13-hydroperoxy-linoleic acid)은 또한 심장(Langendorff perfused guinea pig hearts)의 수축력을 잠정적으로 증가시키는데 반해서, 순수한 linoleic acid는 수축력을 감소시켰다.<sup>82)</sup> 이와 같은 실험결과 linoleic acid의 대사물질이 생체 내에서 심장기능에 영향을 줄 수 있는 생리學的으로 중요한 역할을 갖고 있을 가능성을 시사한다. 같은 방법을 사용하여 여러 종류의 지방산 유도체의  $\text{Ca}^{2+}$  수송능력을 체계적으로 조사하였다.<sup>83)</sup> 즉, 포화 및 불포화지방산, 이들의 산화물과 methyl ester, fatty alcohol, 인지질들을 대상으로 structure-activity relationship을 연구한 결과, 산화되지 않은 순수한 지방산은, 그 불포화도에 상관없이 모두 고농도(mM range)에서만  $\text{Ca}^{2+}$ 을 수송하는 능력을 갖고 있으며, methylester나 alcohol은 고농도에서도 활성이 전무하였다. 효소(lipoxygenase)작용이나 비효소적 자동산화작용(autoxidation)으로 얻은 과산화된 불포화지방산은, 母體인 순수지방산에 비해서  $\text{Ca}^{2+}$  수송능력이 현저하게 증가했으며 그 중에서도 linoleic acid와 arachidonic acid(20:4)의 산화물이 가장 활성이 높았다. autoxidation에서 얻은 산화물은 산화기간의 장단과 지방산의 불포화 정도에 따라 그 활성도에 차이가 있었다. 그 예로써, 탄소 18개를 가진 불포화지방산의 유도체를 비교해 볼 때, methyl oleate나 oleyl alcohol 등 18:1 지방산 유도체는 장기간(4 weeks)의 공기접촉 후에도 전혀 활성이 없었으나, methyl linoleate나 linoleyl alcohol 등 18:2 지방산 유도체들은 단기간(1 week)의 산화 후에는 不活性이던 것이 산화기간이 4주로 연장됨에 따라 매우 강한 활성을 나타내었다. 세 개의 이중결합을 가진 linolenic acid(18:3) 유도체들은 단기간 산화 후에도 그 활성이 급증하였다. 이것은 지방산의 구조(불포화정도)에 따른 一次 및 二次 산화물의 형성속도의 차이로 인하여 생성된 산화물의 상대적인 양이 달라지기 때문인 것으로 풀이된다. Table I에서 보는 바와 같이 실제로  $\text{Ca}^{2+}$ 의 수송능력이 polarity가 극히 높은( $R_f=0$ , Fig. 2 참조) 최종산물의 생성과 밀

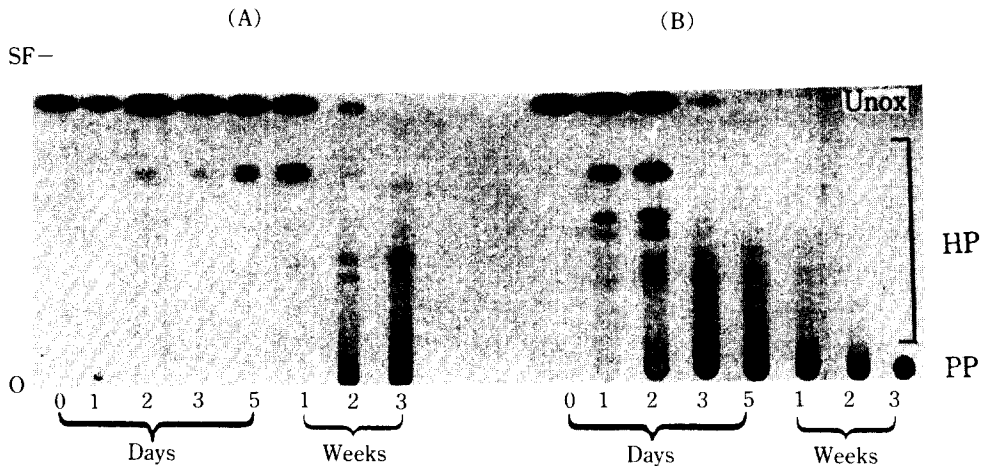


**Table I**—Composition and <sup>45</sup>Ca translocation potency of pure and autoxidized polyunsaturated fatty acids.<sup>83)</sup>

	Fresh	<sup>45</sup> Ca(pg)at :		1 week		4 week		<sup>45</sup> Ca(pg)at :		
		Composition(%) unox/HP/PP	10 mM	1 mM	Composition(%) unox/HP/PP	10 mM	1 mM	Composition(%) unox/HP/PP	10 mM	1 mM
18:2 acid	100/0/0	+	—	4.3/28.7/67.0	+++	++	0/11.8/88.2	+++	++	
ester	100/0/0	—	—	52.9/44.5/2.6	—	—	0/13/87	+++	+	
alcohol	100/0/0	—	—	50.7/49.3/0	—	—	0/0/100	++++	++	
18:3 acid	100/0/0	+	—	0/6.4/93.6	++	+	0/0/100	++	+	
ester	100/0/0	—	—	0/0/100	+++	+	0/0/100	++++	++	
alcohol	100/0/0	—	—	2/98	++	+	0/0/100	+++	+	
20:4 acid	100/0/0	+	—	0/0/100	+++	+	0/0/100	+++	+	
ester	100/0/0	—	—	0/0/100	++++	++	0/0/100	++++	++	

The autoxidized fatty acid derivatives(250 µg each) were separated on high-performance TLC plates(Whatman LHP-KF). The plates were developed once with a solvent system containing n-hexane/diethylether/acetic acid (100 : 100 : 1, v/v) and were sprayed with 4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ethanol followed by heating. The relative amount of each product separated was analyzed by a densitometer and the peak area was calculated by a digitizer.<sup>83)</sup> Calcium transport was measured by a two-phase partition method as described in the reference 83. Amounts of <sup>45</sup>Ca translocated(pg) are presented as follows : —, <10 ; +, 10-100 ; ++, 100-500 ; +++, 500-1000 ; +++++, >1000.

UNOX, unoxidized parent fatty acids ; HP, primary oxidation products containing mainly monomeric hydroperoxy compounds ; PP, highly polar products(R<sub>F</sub>=0, see Fig. 2).



**Fig. 2**—Autoxidized products of methyl linoleate (A) and methyl linolenate (B) separated by TLC.<sup>83)</sup>

The autoxidized esters were separated on TLC as described in Table I. SF, solvent front ; O, origin. For other abbreviations, see Table I.

접한 관계가 있음을 알 수 있다. 이들 불포화지방산의 산화물들을 TLC로 분석해 보면(Fig. 2에 18 : 2와 18 : 3 지방산 ester를 비교한 것을 참조), linolenic acid 유도체는 linoleic acid 유도체에 비해서 polymer로 추정되는 二次의 산화물이 단기간 산화 후에도 다량으로 생성됨을 알 수 있다. autoxidation의 후반기에

生成되는 이들 二次산화물은 一次의으로 형성된 monomer인 hydroperoxide가 분해하여 生成되는 산물(epoxyhydroxides, ketohydroperoxides, dihydroperoxides, cyclic peroxides, bicyclic endoperoxides 등) 외에도 서로 결합하여 高分子化合物으로써 이루어진다고 믿어진다.<sup>84,85)</sup> 따라서 二次산화물의 生成이 급속히

진행되는 세 개 이상의 이중결합을 가진 불포화지방산 유도체들은 증가된 이중결합과 증가된 산소의 도입으로 인해서  $Ca^{2+}$  과 더 쉽게 ligand를 형성할 수 있는 구조를 가질 수 있기 때문에 단기간의 산화로도 活性이 급증한다고 볼 수 있겠다. 실제로 arachidonic acid에서 유도된  $PGB_1$ 의 polymer 유도체 ( $PGB_x$ )가 강한 Ca-ionophore와 유사한 活性을 가졌다는 사실은 이미 上記한 바이다.<sup>57)</sup> 그러나  $Ca^{2+}$ 의 수송력이 전적으로 polymer로 추정되는 物質에만 국한된다고는 생각되지 않는다. 그 이유는 monomer인 hydroperoxide가 주요인 lipoxigenase metabolites도 상당한 活性을 갖고 있기 때문이다. 그럼에도 불구하고  $LTB_4$ 와 같은 metabolite를 다시 산화(autooxidation)시키거나 非活性인 trans- $LTB_4$ 를 산화하면 그 活性이 더욱 증가한다는 보고를 감안할 때 구조미상인 최종산화물이 효소작용으로 얻어진 대사산물보다 그 작용이 더욱 강함을 짐작할 수 있다.  $PGB_x$ 와 같은 polymer가 실제로 고등生物에서 발견되었다는 보고는 아직까지 없다. 이 외에도 18:2 지방산의 ester나 alcohol이 장기간 산화 후에만 活性을 갖게 되는데 反하여, free acid는 단기간 산화 후에도 活性이 높다는 사실을 볼 때, 유리된  $-COOH$ 기가  $Ca^{2+}$ 과의 결합에 중요하다는 것을 암시한다.

인지질 중에서는 양(이온)전하를 띠고 있는 phosphatidylcholine과 lysophosphatidylcholine만을 제외한 모든 인지질(phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, phosphatidic acid, cardiolipin 등)이 높은 活性을 보였다. 양이온을 가진 인지질은  $Ca^{2+}$ 과 complex를 형성할 수 없기 때문이었으나, 이들 두 지질만이 불포화지방산을 내포하고 있지 않다는 점은 흥미있는 사실이다(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA의 분석에 의거). 이들 인지질 중에서도 phosphatidic acid와 cardiolipin은 Pressman cell을 사용하여 측정된 보고<sup>50)</sup>에서와 마찬가지로,  $Ca^{2+}$ 의 수송력이 가장 높아 A23187이나 X537A보다 더 높거나 버금가는 活性을 나타내었다.

Pressman과 Fahim<sup>43)</sup>은 고등生物에는 미생물에서 유래한 ionophore와 같은 효력을 갖는 물질들이 존재한다는 데에 회의적인 입장을 보였다. 그것은 대개의 지질이 detergent와 같은 특성(amphiphilic nature) 때문에 양이온과 결합할 수 있으므로  $Ca^{2+}$ 을 운반할 수 있다고 믿기 때문이다. 그러나 저자가 얻은

data 외에도 각종 문헌에 보고된 것들을 종합해 볼 때에 특정한 구조를 갖고 있는 지질만이 저농도에서 Ca-ionophore와 유사한 행동을 할 수 있음을 알 수 있다. 合成 ionophore를 사용한 연구결과 산소(A23187은 질소도 함께) 원자들이  $Ca^{2+}$ 과 결합할 수 있는 최적의 위치에 놓여 있어야 한다는 것이 증명되었다.<sup>86)</sup> A23187, ionomycin 또는 산화된 지방산들을  $SnCl_2$ 에 의해서 환원시켰을 경우에는 그 효력을 상실한다는 사실도 산소의 중요성을 뒷받침해 준다.<sup>80)</sup>

### 지방산 유도체가 심장세포내(SR)막의 $Ca^{2+}$ 수송에 미치는 영향

liposome이나 bulk phase 등을 이용한 方法으로 Ca-ionophore와 유사한 작용을 하는 것으로 알려진 불포화지방산의 유도체들이 실제로 세포내에서 어떠한 역할을 하는가를 규명하기 위하여 심장의 세포 내막에서의  $Ca^{2+}$  수송에 미치는 영향을 조사하였다.  $Ca^{2+}$ 이 심장의 정상적인 기능을 유지하는데 중요하다는 것은 재론의 여지가 없으므로, 그 이동을 주관하며 조정하는 메카니즘을 이해하는 데도 유익할 것이기 때문이다. 심장의 세포막 중에서도 gated(electrically and chemically) Ca-transport system을 갖고 있는 sarcoplasmic reticulum(SR) 막에서의  $Ca^{2+}$  수송이 가장 많은 연구대상이 되어왔다. SR은 Ca-pump인 (Ca+Mg)-ATPase를 통하여 cytoplasm으로부터 그 内部 저장소로  $Ca^{2+}$ 을 능동적으로 운송하지만, SR로부터의 방출메카니즘에 대해서는 아직 정확히 알려지지 않고 있다.

실험동물(例: guinea pigs)의 심장에서 얻은 SR vesicles과  $^{45}Ca$ 을 함유한 medium에 ATP를 加하면,  $^{45}Ca$ 이 SR막을 통하여 vesicles 内로 유입(influx)되는데, 이 때 linoleic 또는 arachidonic acid의 산화물을 反應前에 첨가하면 대조군과 비교해서  $^{45}Ca$ 의 축적이 加해진 지방산의 농도에 비례하여 감소됨을 볼 수 있다.<sup>87)</sup> 이러한 현상은 oxalate와 같은  $Ca^{2+}$ 을 침전시킬 수 있는 음이온이 존재할 때, 더욱 현저히 나타나며 ATP의 不在下(nonspecific  $^{45}Ca$  축적)에서는 전혀 영향이 없다. 그 뿐만 아니라 oxalate의 不在下에서  $^{45}Ca$ 을 최대한으로 축적시킨 SR vesicles에 지방산 유도체를 加할 경우에는 그 투여량에 비례해서 축적된  $^{45}Ca$ 이 방출된다. liposome이나 bulk phase에

서와 마찬가지로, 지방산 유도체가  $^{45}\text{Ca}$  수송에 미치는 영향이 X537A나 A23187 보다는 훨씬 약하지만, autoxidation으로 얻어진 산화물이 lipoxygenase 대사물보다 더욱 강력하며, arachidonic acid의 대사물은 의외로 약함을 발견하였다.

그 뿐만 아니라 SR vesicles을 lipoxygenase와 incubate하여 SR막의 지질을 직접 산화시킨 후에 ATP 존재하에서  $^{45}\text{Ca}$ 의 축적량을 조사해 보면, enzyme과의 접촉시간에 비해서  $^{45}\text{Ca}$ 의 축적되는 양이 현저히 감소한다.<sup>88)</sup> 이 때 lipoxygenase 작용의 억제제인 nordihydroguaiaretic acid를 미리 투입시키면,  $^{45}\text{Ca}$  축적의 감소현상을 막을 수 있다. 따라서 lipoxygenase에 의한 세포막 인지질의 과산화작용이 세포막을 통한  $\text{Ca}^{2+}$ 의 이동에 영향을 준다는 것을 간접적으로 증명할 수 있다. 이 때 medium의  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도에 따라서 과산화작용과  $\text{Ca}^{2+}$ 의 수송량에 변화가 온다는 것을 발견하였다.

즉,  $\text{Ca}^{2+}$ 이  $1\sim 50\ \mu\text{M}$ 일 때는 과산화작용이 촉진된 과 더불어  $\text{Ca}^{2+}$ 의 축적량도 감소되나  $\text{Ca}^{2+}$ 이  $1\ \text{mM}$  이상으로 증가되면 과산화작용이 억제되면서  $\text{Ca}^{2+}$ 의 축적량이 증가됨을 볼 수 있다. 쥐 심장의 microsome이나 mitochondria에서 NAD(P)H에 의존하는 과산화작용을 유발시킬 경우에도  $\text{Ca}^{2+}$ 이 이종으로 영향을 준다고 알려진 바 있다.<sup>74)</sup> 이러한 사실로 미루어 볼 때,  $\text{Ca}^{2+}$ 이 세포의 농도에 달하게 되면 세포막의 과산화작용을 한 세포에만 국한시키므로써 그 피해가 확산됨을 방지하는 역할을 하는 것으로 추정된다.<sup>74)</sup>  $\text{Ca}^{2+}$ 이 세포의 macrophage에서 NADPH에 의존하는 superoxide의 발생을 조정하며,<sup>89)</sup> 뇌 조직의 인지질로 구성된 liposome에서도  $\text{Ca}^{2+}$ 이 농도에 따라 과산화현상을 억제하거나 촉진한다고 보고된 바 있다.<sup>90)</sup> 이상의 *in vitro* 실험결과로 볼 때 불포화지방산의 유도체가 심장세포내의  $\text{Ca}^{2+}$ 량의 증감에 영향을 미치며, 세포막의 인지질이 효소작용에 의해서 과산화되었을 경우에도  $\text{Ca}^{2+}$  수송능력에 변화가 올 뿐더러, 이러한 일련의 변화에  $\text{Ca}^{2+}$  자체가 또한 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 이와 같은 현상의 기전은 규명되지 않았으나, 前者인 경우에는加해진 과산화된 지방산이  $\text{Ca}^{2+}$  수송을 촉진시키는 mobile carrier로 작용하기 때문이며, 後者의 경우에는, 세포막의 지질이 효소에 의한(stereospecific) 과산화 현상으로 인해서 일종의 channel을 형성하여  $\text{Ca}^{2+}$  운

반을 촉진시키기 때문일 수 있다는 것도 한 가능성으로 생각할 수 있다.

## 結 論

각종 生理的현상의 매개체 기능을 갖고 있다고 보고된 AA의 대사물들은 엄격한 stereospecificity가 요구되는 효소작용에 의하여 생성된 것들이라고 알려져 있다. 따라서 Ca-ionophore와 같은 성질을 가진 지방산 유도체도 生體內에서 복잡한 生理的과정(근육 수축 등)에 관여하기 위해서는 효소작용으로 얻어진 것들만이 이러한 기능을 가질 수 있다고 본다. 왜냐하면 이러한 매개체들은 體內에서 신속히 生成되고 또한 제거될 수 있어야 할 것이기 때문이다. 그러므로 非酵素作用으로 생긴 과산화물 보다는 lipoxygenase metabolites인 hydroperoxides나 heptoxilins 또는 이와 유사한 구조를 가진 물질들을 더 적절한 후보로 생각할 수 있다. 실제로 고등동물에 lipoxygenase나 pyridine nucleotide에 의존하는 효소(계) 등과 같이 peroxide를 형성할 수 있는 다량의 enzyme이 존재한다. 또한 세포막의 과산화과정이 여러 단계를 거쳐 진행되며, 각 단계마다  $\alpha$ -tocopherol이나 glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase와 같은 free radical scavengers의 통제를 받는다는 사실이 이를 뒷받침 해준다.

지방산과산화의 최종산물은 Ca-ionophore로써의 효능이 너무 강하여, 세포내의 정상적인  $\text{Ca}^{2+}$  수송에 오히려 손상을 가져올지도 모른다. 이와 같은 물질들이 oxidative stress나 vitamin E의 결핍증에서 보는 것처럼 병적상태에서 축적되며, 일반적으로 과도한 과산화지질현상이 많은 종류의 질병을 유발한다는 것은 널리 알려진 사실이다. 그러나 자연적으로 일어나는 정상적 과산화작용은 암과 같은 특종 질병의 예방 등, 生存에 필요한 유익한 현상이라고 보는 견해도 있다.<sup>91)</sup>

지방산이나 그 유도체의 생리학적 혹은 약리학적 역할이 아직까지 명확히 규명되지 않고 있다. 자연적으로 生成되는 이들 物質들이 저농도에서 세포내의  $\text{Ca}^{2+}$ 을 동원할 수 있다는 사실로 미루어 볼 때, 그 中에는 신체기능의 정상유지나 저하된 기능을 회복시킬 수 있는 유익한 물질도 발견되리라 전망인데, 이는 앞으로의 연구과제로 남아있다.

### 감사의 말씀

저자는 본 論文에 기술한 연구를 할 수 있도록 지원해 준 캐나다 정부의 Medical Research Council의 好意에 감사를 표하는 바이다.

### 문 헌

- 1) Pressman, B.C., Harris, E.J., Jagger, W.S. and Johnson, J.H. : Antibiotic-mediated transport of alkali ions across lipid barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **58**, 1949(1967).
- 2) Cass, A., Finkelstein, A. and Crespi, V. : The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* **56**, 100(1970).
- 3) Painter, G.R. and Pressman, B.C. : Dynamic aspects of ionophore mediated membrane transport. In *Topics in Current Chemistry*, (Ed. F.L. Boschke), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **101**, 83-110(1982).
- 4) Lardy, H.A., Graven, S.N. and Estrada, O.S. : Specific induction and inhibition of cation and anion transport in mitochondria. *Fed. Proc.* **26**, 1355 (1967).
- 5) Ouchinnikov, Yu. A., Ivanov, V.T. and Shkrob, A. M. : *Membrane active complexes*. B.B.A. Library, Vol.12, Elsevier, New York (1974).
- 6) Dobler, M., Dunitz, J.D. and Kilbourn, B.T. : Die Struktur des KNCS-Komplexes von Nonactin. *Helv. Chim. Acta.* **52**, 2573(1969).
- 7) Kilbourn, D.T., Dunitz, J.K., Pioda, L.A.R. and Simon, W. : Structure of the K<sup>+</sup> complex with nonactin, a macrotetrolide antibiotic possessing highly specific K<sup>+</sup> transport properties. *J. Mol. Biol.* **30**, 559(1967).
- 8) Pederson, C.J. : Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 7017 (1967).
- 9) Pressman, B.C. : Ionophorous antibiotics as models for biological transport. *Fed. Proc.* **27**, 1283 (1968).
- 10) Pressman, B.C. : Biological applications of ionophores. *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 501(1976).
- 11) Agtarap, A., Chamberlin, J.W., Pinkerton, M. and Steinrauf, L. : The structure of monensic acid, a new biologically active compound. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5737(1967).
- 12) Pinkerton, M. and Steinrauf, L.K. : Molecular structure of monovalent metal cation complexes of monensin. *J. Mol. Biol.* **49**, 533(1970).
- 13) Steinrauf, L.K., Pinkerton, M. and Chamberlin, J. W. : The structure of nigericin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **33**, 29(1968).
- 14) Kubota, T., Matsutani, S., Shiro, M. and Koyama, H. : The structure of polyerythrin A. *Chem. Comm.* **23**, 1541(1968).
- 15) Johnson, S.M., Herrin, J., Liu, S.J. and Paul, I.C. : The crystal and molecular structure of the barium salt of an antibiotic containing a high proportion of oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 4428(1970).
- 16) Westley, J.W., Evans, R.H., Williams, T. and Stempel, A. : Structure of antibiotic X-537A. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* D, pp.71 (1970).
- 17) Pressman, B.C. : Properties of ionophores with broad range cation selectivity. *Fed. Proc.* **32**, 1696 (1973).
- 18) Kafka, M.S. and Holz, R.W. : Ionophores X-537A and A23187 : Effects on the permeability of lipid bimolecular membranes to dopamine and calcium. *Biochem. Biophys. Acta.* **426**, 31(1976).
- 19) Hyono, A., Hendriks, T., Daemen, F.J.M. and Bonting, S.L. : Movement of calcium through artificial lipid membranes and the effects of ionophores. *Biochem. Biophys. Acta.* **389**, 34(1975).
- 20) Chaney, M.O., Demario, P.V., Jones, N.D. and Ocolowitz, J.L. : The structure of A23187, a divalent cation ionophore. *J. Am. Chem. Soc.* **96**, 1932(1974).
- 21) Pfeiffer, D.R., Reed, P.W. and Lardy, H.A. : Ultra-violet and fluorescent spectral properties of the divalent cation ionophore A23187 and its metal ion complexes. *Biochem.* **13**, 4007(1974).
- 22) Reed, P.W. and Lardy, H.A. : A23187 ; a divalent cation ionophore. *Fed. Proc.*, **31**, 432(1972).
- 23) Liu, W., Slusarchyk, D.S., Astle, G., Trejo, W.H., Brown, W.E. and Meyers, E. : Ionomycin, a new polyether antibiotic. *J. Antibiot.* **31**, 815(1978).

- 24) Pressman, B.C. and de Guzman, N.T. : Biological applications of ionophores : theory and practice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **264**, 373(1975).
- 25) Richardson, L.F., Raun, A.P., Potter, E.L., Cooley, C.O. and Rathmacher R.P. : Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *J. Anim. Sci.* **43**, 657(1976).
- 26) Feinman, S.E. and Matheson, J.C. : Draft environmental impact statement : Subtherapeutic antibacterial agents in animal feed. Available from Hearing Clerk, Food Drug Adm. rm. 4-65, 5600 Fishers Lane, Rockville, Md. USA, 20857 pp. A100-8 (1978).
- 27) Caswell, A.H. and Pressman, B.C. : Kinetics of transport of divalent cations across sarcoplasmic reticulum vesicles induced by ionophores. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **49**, 292(1972).
- 28) Entman, M.L., Allen, J.C., Bornet, E.P., Gillette, P.C., Wallick, E.T. and Schwartz, A. : Mechanism of calcium accumulation and transport in cardiac relaxing system(sarcoplasmic reticulum membranes) : Effects of verapamil, D-600, X537A and A 23187. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **4**, 681(1972).
- 29) Entman, M.L., Gillette, P.C., Wallick, E.T., Pressman, B.C. and Schwartz, A. : A study of calcium binding and uptake by isolated cardiac sarcoplasmic reticulum-The use of a new ionophore(X537A). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **48**, 847(1972).
- 30) Levy, J.V., Cohen, J.A. and Inesi, G. : Contractile effects of a calcium ionophore. *Nature*. **242**, 461 (1973).
- 31) Scarpa, A., Baldassare, J. and Inesi, G. : The effect of calcium ionophores on fragmented sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* **60**, 735(1972).
- 32) Scarpa, A. and Inesi, G. : Ionophore mediated equilibration of calcium ion gradients in fragmented sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **22**, 273 (1972).
- 33) Schwartz, A., Lewis, R.M., Hanley, H.G., Munson, R.G., Dial, F.D. and Ray, M.V. : Hemodynamic and biochemical effects of a new positive inotropic agent, antibiotic ionophore RO-2-2985. *Circ. Res.* **34**, 102(1974).
- 34) Schaffer, S.W., Safer, B., Scarpa, A. and Williamson, J.R. : Mode of action of the calcium ionophores X-537A and A23187 on cardiac contractility. *Biochem. Pharm.* **23**, 1609(1974).
- 35) Holland, D.R., Steinberg, M.L. and Armstrong, W. McD : A23187 : A calcium ionophore that directly increases cardiac contractility. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **148**, 1141(1975).
- 36) Pressman, B.C. and de Guzman, N.T. : New ionophores for old organs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **227**, 380(1974).
- 37) Clyman, R.I., Blacksins, A.S., Sandler, J.A., Manganiello, V.C. and Vaughan, M. : Role of calcium in regulation of cyclic nucleotide content in human umbilical artery. *J. Biol. Chem.* **250**, 4718(1975).
- 38) Hainaut, K. and Desmedt, J.E. : Calcium ionophore A23187 potentiates twitch and intracellular calcium release in single muscle fibers. *Nature*. **252**, 407 (1974).
- 39) Murray, J.J., Reed, P.W. and Fay, F.S. : Contraction of isolated smooth muscle cells by ionophore A23187. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **72**, 4459(1975).
- 40) Swamy, V.C., Ticku, M., Triggler, C.R. and Triggler, D.J. : The action of the ionophores, X537A and A23187, on smooth muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **53**, 1108(1975).
- 41) Devore, D.L. and Nastuk, W.L. : Effects of calcium ionophore X537A on frog skeletal muscle. *Nature*. **253**, 644(1975).
- 42) Schadt, M. and Haeusler, G. : Permeability of lipid bilayer membranes to biogenic amines and cations : changes induced by ionophores and correlations with biological activities. *J. Memb. Biol.* **18**, 277(1974).
- 43) Pressman, B.C. and Fahim, M. : Pharmacology and toxicology of the monovalent carboxylic ionophores. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22**, 465(1982).
- 44) Bergen, W.G. and Bates, D.B. : Ionophores : Their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* **58**, 1465(1984).
- 45) Schumard, R.F. and Callender, M.E. : Monensin, a new biologically active compound. VI. Anticoccidial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**, 369 (1968).
- 46) Raun, A.P., Cooley, C.O., Potter, E.L., Rathmacker,

- R.P. and Richardson, L.F. : Effect of monensin on feed efficiency of feed lot cattle. *J. Anim. Sci.* **43**, 670(1976).
- 47) Perry, T.W., Beeson, W.M. and Mohler, M.T. : Effect of monensin on beef cattle performance. *J. Anim. Sci.* **42**, 761(1976).
- 48) Helgeson, R.C., Koga, K., Timko, J.M. and Cram, D.J. : Complete optical resolution by differential complexation in solution between a chiral cyclic polyether and an alpha-amino acid. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 3021(1973).
- 49) Kyba, E.P., Koga, K., Sousa, L.R., Siegel, M. and Cram, D.J. : Chiral recognition in molecular complexing. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 2692(1973).
- 50) Tyson, C.A., Van de Zande, H. and Green, D.E. : Phospholipids as ionophores. *J. Biol. Chem.* **251**, 1326(1976).
- 51) Jong, A.Y. and Shamoo, A.E. : The electrophoretic properties of a  $Ca^{2+}$  carrier isolated from calf heart mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **255**, 6904(1980).
- 52) Abramson, J.J. and Shamoo, A.E. : Anionic detergents as divalent cation ionophores across black lipid membranes. *J. Membr. Biol.* **50**, 241(1979).
- 53) Carsten, M. and Miller, J.D. : Comparison of calcium association constants and ionophoretic properties of some prostaglandins and ionophores. *Arch. Biochem. Biophys.* **185**, 282(1978).
- 54) Gerrard, J.M., Butler, A.M., Peterson, D.A. and White, J.G. : Phosphatidic acid releases calcium from a platelet membrane fraction *in vitro*. *Prostaglandins Med.* **1**, 387(1978).
- 55) Ohnishi, S.T. and Devlin, T.M. : Calcium ionophore activity of a prostaglandin  $B_1$  derivative ( $PGB_x$ ). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **89**, 240(1979).
- 56) Serhan, C.N., Korchak, H.M. and Weissmann, G. :  $PGB_x$ , a prostaglandin derivative, mimics the action of the calcium ionophore A23187 on human neutrophils. *J. Immunol.* **125**, 2020(1980).
- 57) Weissmann, G., Anderson, P., Serhan, C., Samuelsson, B. and Goodman, E. : A general method, employing arsenazo III in liposomes, for study of calcium ionophores : Results with A23187 and prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1506(1980).
- 58) Hokin, L.E. : Functional activity in glands and synaptic tissue and the turnover of phosphatidylinositol. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **165**, 695(1969).
- 59) Michell, R.H., Jafferji, S.S. and Jones, L.M. : The possible involvement of phosphatidylinositol breakdown in the mechanism of stimulus-response coupling at receptors which control cell-surface calcium gates. Function and Biosynthesis of Lipids : *Adv. Exp. Biol. Med.* **83**, 447(1977).
- 60) Clark, R.B., Salmon, D.M. and Honeyman, T.W. : Phosphatidic acid inhibition of  $PGE_1$ -stimulated cAMP accumulation in W1-38 fibroblasts : similarities with carbachol inhibition. *J. Cyclic Nucleotide Res.* **6**, 37(1980).
- 61) Putney, J.W. : Recent hypothesis regarding the phosphatidylinositol effect. *Life Sci.* **29**, 1183(1981).
- 62) Nishizuka, Y. : Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science.* **225**, 1365(1984).
- 63) Berridge, M.J. and Irvine, R.F. : Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* **312**, 315(1984).
- 64) Berridge, M.J. : Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* **220**, 345(1984).
- 65) Volpi, M., Naccache, P.H. and Shaafi, R.I. : Arachidonate metabolites increase the permeability of the plasma membrane of the neutrophils to calcium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **92**, 1231(1980).
- 66) Borgeat, P., Hamberg, M. and Samuelsson, B. : Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **251**, 7816(1976).
- 67) Borgeat, P. and Samuelsson, B. : Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **254**, 2643(1979).
- 68) Volpi, M., Yassin, R., Tao, W., Molski, T.F.P., Naccache, R.I. and Shaffi, R.I. : Leukotriene  $B_4$  mobilizes calcium without the breakdown of polyphosphoinositides and the production of phosphatidic acid in rabbit neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- USA **81**, 5966(1984).
- 69) Naor, Z., Vanderhock, J.Y., Lindner, H.R. and Catt, K.J. : Arachidonic acid products as possible mediators of the action of gonadotropin releasing hormone. *Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotriene Res.* **12**, 259(1983).
- 70) Metz, S.A. : Arachidonic acid and its metabolites : Evolving roles as transmembrane signals for insulin release. *Prostaglandins, Leukotrienes, Essential Fatty Acids.* **32**, 187(1988).
- 71) Derewlany, L.O., Pace-Asciak, C.R. and Radde, I.C. : Hepoxilin A, hydroxyepoxide metabolites of arachidonic acid stimulates transport of  $^{45}\text{Ca}$  across the guinea pig visceral yolk sac. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **62**, 1466(1984).
- 72) Lebedev, A.V., Levitsky, D.O., Loginov, V.A. and Smirnov, V.N. : The effect of primary products of lipid peroxidation on the transmembrane transport of calcium ions. *J. Molec. Cell. Cardiol.* **14**, 99 (1982).
- 73) Lebedev, A.V., Levitsky, D.P. and Loginov, V.A. : Oxygen as an inductor of divalent cation permeability through biological and model lipid membranes. In *Advances in Myocardiology*, (Ed. Chazov, E., Smirnov, V. and Dhalla, N.S.), Plenum Med. Book Co., New York, Vol.3, pp.425-437(1984).
- 74) Arkhipenko, Y.V., Pisarev, V.A. and kagan, V.E. : Modification of enzymatic system for  $\text{Ca}^{2+}$  transport in sarcoplasmic reticulum during lipid peroxidation. Systems for generation and regulation of lipid peroxidation in skeletal and heart muscles. *Biokhimiya.* **48**, 1261(1983).
- 75) Blondin, G.A. : Isolation, properties and structural features of divalent cation ionophores derived from beef heart mitochondria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **264**, 98(1975).
- 76) Kim, R.S., Templeton, J.F., Queen, G. and LaBella, F.S. : Lipid fractions from liver inhibit specific binding of  $^3\text{H}$ -ouabain to dog heart. *J. Molec. Cell. Cardiol.* **12**, 835(1980).
- 77) Kim, R.S. and LaBella, F.S. : Specific binding of  $^3\text{H}$ -ouabain to heart is inhibited by long-chain fatty acids and alcohols. *J. Molec. Cell. Cardiol.* **12**, 847 (1980).
- 78) Weissmann, G., Collins, T., Evers, A. and Dunham, P. : Membrane perturbation : Studies employing a calcium-sensitive dye, arsenazo III, in liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 510(1976).
- 79) Serhan, C., Anderson, P., Goodman, E., Dunham, P. and Weissmann, G. : Phosphatidate and oxidized fatty acids are calcium ionophores. *J. Biol. Chem.* **256**, 2736(1981).
- 80) Serhan, C., Fridovich, J., Goetzel, E.J., Dunham, P.B. and Weissmann, G. : Leukotriene  $\text{B}_4$  and phosphatidic acid are calcium ionophores. Studies employing arsenazo III in liposomes. *J. Biol. Chem.* **257**, 4746(1982).
- 81) Brasseur, R. and Deleers, M. : Conformational analysis of 6-cis and 6-trans leukotriene  $\text{B}_4$ -calcium complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3370 (1984).
- 82) Kim, R.S., Bihler, I. and LaBella, F.S. : Calcium-translocating and cardiotonic properties of oxidation products of linoleic acid. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **63**, 1392(1985).
- 83) Kim, R.S. and LaBella, F.S. : Calcium translocation by fatty acid derivatives in a two-phase partition model. Structure-activity relationships. *Biochem. Biophys. Acta.* **833**, 386(1985).
- 84) Artman, N.R. : The chemical and biological properties of heated and oxidized fats. In *Advances in Lipid Research*. (Eds. Paoletti, R. and Kritchevsky, D.), Academic Press, New York, Vol.7, pp.245-330 (1969).
- 85) Frankel, E.N. : Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.* **19**, 1(1980).
- 86) Vuilleumier, P., Gazzotti, P., Carafoli, E. and Simon, W. : The translocation of  $\text{Ca}^{2+}$  across phospholipid bilayers induced by a synthetic neutral  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore. *Biochem. Biophys. Acta.* **467**, 12 (1977).
- 87) Kim, R.S. and LaBella, F.S. : The effect of oxygenated linoleic and arachidonic acid derivatives on calcium transport in vesicles from cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Molec. Cell. Cardiol.* **20**, 119 (1988).
- 88) Kim, R.S., Sukhu, B. and LaBella, F.S. : Lipoxyge-

- nase-induced lipid peroxidation of isolated cardiac microsomes modulates their calcium-transporting function. *Biochem. Biophys. Acta.* **961**, 270(1988).
- 89) Lew, P.D. and Stossel, T.P. : Effect of calcium ion on superoxide production by phagocytic vesicles from rabbit alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* **67**, 1(1981).
- 90) Gutteridge, J.M.C. : The effect of calcium on phospholipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **74**, 529(1977).
- 91) Dormandy, T.L. : In praise of peroxidation. *Lancet.* **ii**, 1126(1988).