

시안산이 Superoxide Dismutase의 Carbamylation과 활성에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실*, 신장연구소

서상혁 · 문교철* · 박성배 · 김현철

〈요 약〉

말기신부전 환자의 혈액 중에서 superoxide dismutase(SOD)의 활성을 측정하여 말기신부전 환자에서 SOD의 활성이 감소되어 있음을 확인하고, 요소가 SOD에 대한 활성 변화에 어떤 역할을 할 수 있는지를 검토하기 위하여, 시안산과 SOD를 반응시켜 보았다. 또한 알부민을 첨가하여 시안산에 의한 SOD의 활성 변화에 대한 영향을 관찰하였다. 말기신부전 환자의 혈장 및 적혈구의 SOD의 활성은 정상인에 비해 감소되어 있었다. 500mM 시안산과 SOD를 채운인 37℃에서 반응시키고 0시간에서 72시간 까지 시간을 경과 시켰을 때, SOD의 활성은 시간이 지남에 따라 감소되었고 유리 아미노기를 소실하였다. 또한 20mM, 200mM, 500mM 및 1M 시안산과 SOD를 반응시키고 48시간을 경과 시켰을 때 그 활성도 시안산의 농도가 증가함에 따라 그 활성이 감소하였고 유리 아미노기는 감소하였다. 알부민을 SOD와 시안산의 반응액에 첨가하였을 때 SOD의 활성 감소가 방지되었다.

따라서 이 연구의 결과 말기신부전 환자에서 시안산은 SOD의 활성을 감소시키는 하나의 요인으로 작용하리라 생각되며, 말기신부전 환자에서 시안산의 농도가 증가되면 증가될수록, 또한 시안산의 체내 제거가 늦어져 시안산과 반응 시간이 길면 길수록 SOD는 carbamylation 되어 그 활성은 더욱 더 감소하리라 생각된다. 또한 알부민은 그 작용 기전이 확실치 않지만 SOD의 carbamylation에 영향을 주는 것으로 생각되며 이에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

서 론

활성 산소(oxygen free radical)는 쌍을 이루지 않는 전자를 가진 분자로 우리 몸은 에너지 생성 과정, 정상적인 신진 대사 과정 및 면역 체계를 통해 끊임 없이 활성 산소를 생성한다^{1, 2)}. 그러므로 이들 없이는 에너지를 생성하지도 감염원과 싸우지도 못할 뿐만 아니라 신체에 필요한 화학 물질도 생성하지 못한다. 그러나 과잉의 통제되지 않는 활성 산소는 세포에 손상을 주며 각종 질병을 일으키는 원인으로 작용한다. 이러한 유해 산소의 세포 손상 작용이 축적되어 동맥

경화, 심장 질환, 암, 노화, 간 등의 소화기계 질환 및 신장질환 등을 유발하는 것으로 알려져 있다³⁻⁷⁾. 특히 말기신부전 환자에서 흔히 합병되는 동맥경화증, 빈혈, 염증 등에 활성 산소가 관여함이 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾. 신체내에는 여러 종류의 항산화제가 존재하지만 가장 강력하고 일차적인 것으로는 항산화 효소계를 이야기할 수 있으며 여기에는 superoxide dismutase(이하 SOD로 약함), glutathione peroxidase 및 catalase가 있다¹¹⁻¹³⁾. 이들 효소 중 SOD는 산소가 전자를 받아 생성되는 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키는 효소이다¹¹⁻¹³⁾. 이 효소의 작용 후 생성되는 과산화수소는 glutathione peroxidase나 catalase에 의해 인체에 무해하게 바뀌게 되어 활성산소의 제거 반응의 시작은 SOD의 작용과 더불어 시작된다고 할 수 있다¹¹⁻¹³⁾. 이렇게 SOD는 superoxide anion을 과산화수소

책임저자: 박성배 대구시 중구 동산동 194
계명의대 동산의료원 신장내과
Tel : 053)250-7398, 7399
Fax : 053)254-8168, 250-7434
E-mail : sbpark@dsmc.or.kr

로 바뀌어 증으로써 활성산소의 처리에 가장 먼저 작용하고 중요한 역할을 하는 효소이다. 또한 일부 연구자들의 보고 따르면 SOD의 활성이 말기신부전 환자에서 감소되어 있으며 이러한 SOD의 활성 저하는 활성 산소에 의한 손상을 용이하게 함으로써 각종 합병증을 유발할 것으로 생각되고 있다^{9, 10, 14}.

한편, 말기신부전 환자에서는 신장의 배설, 분비, 조절 기능의 장애로 인해 식욕부진, 오심, 구토, 쇠약감, 소양증, 근 경련, 빈혈 및 출혈 경향 등의 요독증이 초래되는데¹⁵, 이러한 요독증의 원인 중 제일 중요한 원인 중의 하나가 요소로 생각되고 있다⁹. 따라서 혈중의 요소의 농도는 요독증의 중증도와 치료 반응에 유용한 임상 지표로 사용되고 있다¹⁵. 요소의 0.8%는 사람의 체내에서 자연적으로 시안산으로 바뀌어져 요소와 시안산은 체내에서 평형 상태를 유지한다¹⁶. 이러한 시안산은 단백질을 비롯한 각종 생체 물질을 변화시키는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻¹⁸. 시안산은 생체 활성 물질, 특히 단백질에 결합함으로써 단백질을 carbamylation 시키며, 단백질의 여러 잔기들 중에서는 유리 아미노기와 가장 쉽게 반응하여 carbamylation시키는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻²⁰. 말기신부전 환자는 요소의 혈중 농도가 정상인 보다 높으며 따라서 혈중 시안산의 농도도 정상인에 비해 높은 것으로 알려져 있다²¹. 현재는 이로 인한 각종 합병증이 연구의 대상이 되고 있다^{17, 23, 24}.

본 실험에서는 말기신부전 환자의 혈액 중에서 SOD의 활성을 측정하여 말기신부전 환자에서 SOD의 활성이 감소되어 있음을 확인하고, 요소가 SOD에 대한 활성 변화에 어떤 역할을 할 수 있는지를 검토하기 위하여, 시안산과 SOD를 반응시켜 보았다. 또한 말기신부전 환자의 사망과 저알부민혈증이 관련이 있는 것으로 알려져 있어서, 혈청 알부민을 첨가하여 시안산에 의한 SOD의 활성 변화에 대한 영향을 관찰하였다.

대상 및 방법

혈액 투석을 하는 말기신부전 환자 중 14명의 환자를 대상으로 평균 나이는 43 ± 14 세였으며 남자가 9명, 여자가 5명이었다. 대조군은 신기능 및 신체 검사 소견상 정상 소견을 보인 13명으로 이들의 평균 나이는 43 ± 12 세였으며 남자가 10명, 여자가 3명이었다.

환자군과 정상 대조군 모두에서 활성 산소에 영향을 미치는 vitamin C와 E를 최근 1개월 이내 사용한 경험이 있는 환자와, 최근 1개월 이내에 수혈을 받은 경험이 있는 환자는 실험군에서 제외하였다. 혈액투석은 polymethyl methacrylate dialyzer(Filtrizer; Toray, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

SOD 표품, xanthine oxidase, xanthine, nitroblue tetrazolium, ammonium sulfate, nitroblue tetrazolium-albumin, EDTA, cytochrome c, albumin, dimethylsulfoxide, trinitrobenzenesulfonic acid 등은 미국 Sigma사의 제품을 구입하여 사용하였으며 그 외 일반 시약은 특급 또는 일급품을 사용하였다.

말기신부전 환자에서 혈액의 채취는 혈액 투석 전에 동맥혈 line으로 부터 혈액을 채취하여 헤파린이 함유된 시험관에 담고 잘 혼합한 후 3,000rpm으로 10분간 원심 하여 혈청과 적혈구를 얻고 혈장은 그대로 혈장 SOD치를 측정하는 시료로 사용하였으며 적혈구는 인산완충 생리식염수로 3회 세척한 후 차가운 증류수를 사용하여 용혈 시킨 후 Drabkin's 시약을 첨가하여 hemoglobin을 cyanmethemoglobin으로 전환시킨 후 사용하였다.

SOD 효소 표품과 시안산의 반응은 Hörkkö 등의 방법²⁵에 따라 37℃ 수용액에서 실시하며 0.75 단위의 SOD를 시안산과 반응시키되 시안산의 농도를 20mM에서 2M까지 변화시키고 0시간부터 72시간까지 경과시키면서 SOD의 활성과 carbamylation 정도를 2회 측정하여 그 평균치를 취하였다.

SOD를 단백질량으로 50 µg이 되게 녹이고 이를 37℃ 수용액 중에서 시안산과 반응시키되 시안산의 농도를 20mM에서 2M까지 변화시키고 0시간부터 72시간까지 경과시키면서 SOD를 carbamylation 시킨 후, 이를 4% sodium hydrogen carbonate(pH 8.4) 존재 하에서 0.1% trinitrobenzenesulphonic acid와 반응하는 정도를 340nm에서 측정하였으며 SOD의 carbamylation 정도는 시안산과 반응시키지 않은 SOD에 대한 비를 구하여 %로 나타내었다.

혈장과 적혈구에서 SOD 활성은 alkaline dimethylsulfoxide를 superoxide anion-generating system으로 사용하여 cytochrome c가 환원되는 양을 측정하는 Hyland 등의 방법²⁶을 사용하였으며, 이 효소 1 unit는 cytochrome c가 50% 환원되는 양으로 하였다. Carbamylation된 SOD 활성 측정은 xanthine

oxidase를 superoxide anion 발생 system으로 사용하여 nitroblue tetrazolium가 환원되는 양을 측정하는 Sun 등의 방법²⁷⁾을 사용하였으며 이 효소 1 unit는 효소액을 넣지 않는 반응액 중의 nitroblue tetrazolium 환원을 50% 억제하는 효소의 양으로 정하였다.

자료는 평균±표준편차로 표시하고, 실험군 사이의 비교는 Student's t-test 혹은 paired t-test로 하였으며, 통계학적 유의수준은 p값이 0.05 미만으로 하였다.

결 과

1. 혈장 superoxide dismutase의 활성도

말기신부전 환자의 혈장 SOD의 활성은 Fig. 1과 같다. 대조군인 정상인 혈장에서 SOD의 활성은 2.67 ± 1.74 unit/mL/min였으며, 말기신부전 환자의 혈장에서는 1.45 ± 1.43 으로 정상 대조군에 비해 46% 유의하게 감소되어 있었다($p < 0.05$).

2. 적혈구 superoxide dismutase의 활성도

말기신부전 환자의 적혈구 SOD의 활성은 Fig. 2와 같다. 대조군인 정상인 적혈구에서 SOD의 활성은 8.42 ± 2.99 였으며, 말기신부전 환자의 적혈구에서는 5.11 ± 4.20 으로 정상에 비해 39%가 유의하게 감소되어 있었다($p < 0.05$).

3. 시안산 농도에 따른 superoxide dismutase의 활성

SOD 표품 0.75 단위와 20mM, 200mM, 500mM 및 1M 시안산을 37℃ 수용액 중에서 48시간 반응시

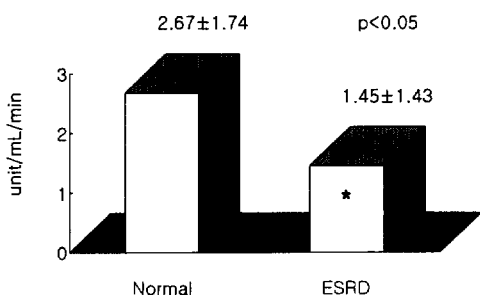


Fig. 1. Superoxide dismutase activity in plasma. ESRD: end-stage renal disease.

킨 후 3회 반복 측정하였을 때 SOD의 활성 변동은 Fig. 3과 같다. 즉, 20mM, 200mM, 500mM 및 1M과 반응시켰을 때 SOD의 활성은 각각 0.72 ± 0.01 , 0.60 ± 0.02 ($p < 0.05$), 0.43 ± 0.06 ($p < 0.01$) 및 0 ($p < 0.001$) 단위였으며 대조군으로 SOD를 시안산과 반응시키지 않고 37℃ 수용액 중에서 48시간 방치만 하였을 때 SOD의 활성은 0.74 ± 0.01 단위였다.

4. 시안산과의 반응 시간에 따른 superoxide dismutase의 활성

SOD 표품 0.75 단위와 500mM 시안산을 37℃ 수용액 중에서 반응시킨 후 0, 24, 48 및 72시간에 각 3회 반복 측정한 SOD의 활성 변동은 Fig. 4와 같다. 즉, 0, 24, 48 및 72시간에 SOD의 활성은 각각 0.75 ± 0.03 , 0.73 ± 0.01 , 0.43 ± 0.06 ($p < 0.05$) 및 0.22 ± 0.03 ($p < 0.01$) 단위였으며, 대조군으로 SOD를 시안산과 반응시키지 않고 37℃ 수용액 중에서 0, 24, 48 및 72시간 동안 방치하였을 때 SOD의 활성은 각각 0.73 ± 0.01 , 0.72 ± 0.01 , 0.74 ± 0.01 및 $0.71 \pm$

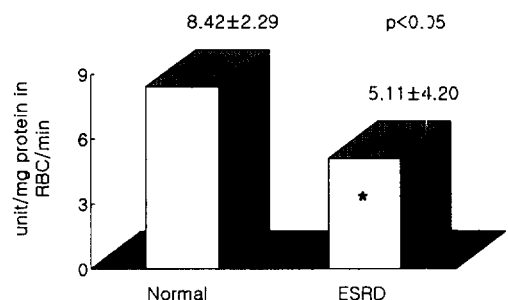


Fig. 2. Superoxide dismutase activity in RBCs.

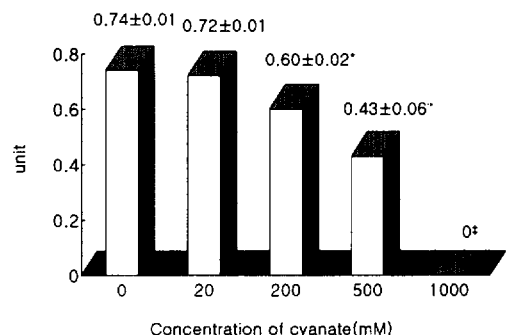


Fig. 3. Relationship between the cyanate concentration and superoxide dismutase activity. * $p < 0.05$ vs 0mM, $^*p < 0.01$ vs 0mM, $^*p < 0.001$ vs 0mM.

0.01 단위였다.

5. 시안산 농도에 따른 carbamylation

SOD 표품 0.75 단위와 20mM, 200mM, 500mM 및 1M 시안산을 37℃ 수용액 중에서 48시간 반응시키고, 4% sodium hydrogen carbonate(pH 8.4) 존재 하에서 0.1% trinitrobenzenesulphonic acid와 반응하는 정도로서 carbamylation 정도를 평가하였을 때, SOD의 유리 아미노기가 소실되는 정도는 Fig. 5와 같다. 즉, 20mM, 200mM, 500mM 및 1M에서 SOD의 유리 아미노기가 소실되는 정도는 각각 38%, 65%, 81% 및 100%였다.

6. 시안산과의 반응 시간에 따른 carbamylation

SOD 표품 0.75 단위와 500mM 시안산을 37℃ 수용액 중에서 반응시키고 0, 24, 48 및 72시간 반응시

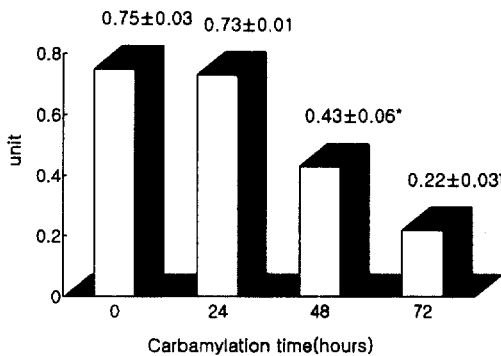


Fig. 4. Relationship between carbamylation time and superoxide dismutase activity. * $p<0.05$ vs 0 time, † $p<0.01$ vs 0 time.

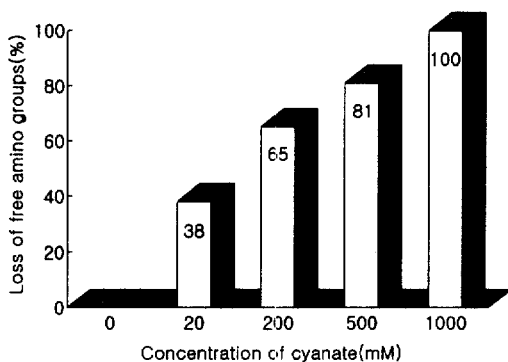


Fig. 5. Loss of free amino groups by carbamylation depend on the concentration of cyanate.

키고, 4% sodium hydrogen carbonate(pH 8.4) 존재 하에서 0.1% trinitrobenzenesulphonic acid와 반응하는 정도로서 carbamylation 정도를 평가하였을 때, SOD의 유리 아미노기가 소실되는 정도는 Fig. 6과 같다. 즉, 0, 24, 48, 및 72시간에 SOD의 유리 아미노기가 소실되는 정도는 각각 0%, 65%, 81% 및 100%였다.

7. 시안산 농도에 따른 알부민의 영향

SOD 표품 0.75 단위와 각각 200mM 및 500mM 시안산을 37℃ 수용액 중에서 48시간 반응시키면서 알부민의 농도를 50 µg/mL이 되도록 혼합하고 3회 반복 측정 한 SOD의 활성은 Table 1과 같다. 즉, 시안산 농도 20mM, 200mM과 500mM에서 알부민을 혼합하지 않았을 때의 활성은 각각 0.71 ± 0.01 , 0.60 ± 0.02 와 0.43 ± 0.06 단위였으나 알부민을 혼합하였을 때는 각각 0.74 ± 0.02 , 0.70 ± 0.02 ($p<0.01$)과 0.65 ± 0.06 ($p<0.01$) 단위로 알부민을 혼합하지 않았을 때에 비해 유의한 증가를 보였다.

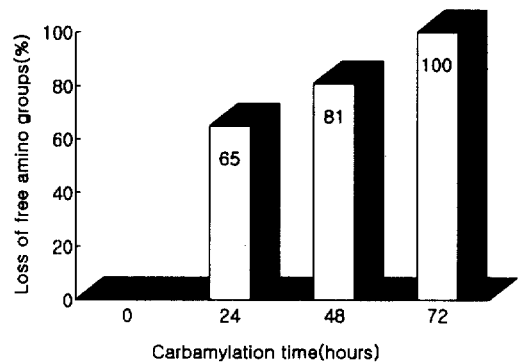


Fig. 6. Loss of free amino groups by carbamylation depend on the carbamylation time.

Table 1. Effect of Albumin on the Carbamylation of Superoxide Dismutase Depend on the Cyanate Concentration

Concentration of cyanate(mM)	SOD activity(unit)		
	Albumin(-)	Albumin(+)	p value
20	0.71 ± 0.01	0.74 ± 0.02	
200	0.60 ± 0.02	0.70 ± 0.02	<0.01
500	0.43 ± 0.06	0.65 ± 0.06	<0.01

Albumin(+): mixed with albumin 50 µg/mL
SOD: superoxide dismutase

Table 2. Effect of Albumin on the Carbamylation of Seroxide Dismutase Depend on the Carbamylation Time

Carbamylation time(hours)	SOD activity(unit)		
	Albumin(-)	Albumin(+)	p value
0	0.75±0.03	0.77±0.02	
24	0.71±0.01	0.75±0.04	
48	0.43±0.01	0.65±0.08	<0.01
72	0.22±0.03	0.54±0.12	<0.05

Albumin(+): mixed with albumin 50 µg/mL

SOD: superoxide dismutase

8. 시안산과의 반응 시간에 따른 알부민의 영향

SOD 표품 0.75 단위와 500mM 시안산을 37℃ 수용액 중에서 48시간 및 72시간 반응시키면서 알부민의 농도를 50 µg/mL이 되도록 혼합한 후 3회 반복 측정된 SOD의 활성은 Table 2와 같다. 즉, 시안산과의 반응 시간이 0, 24, 48 및 72시간에서 알부민을 혼합하지 않았을 때의 활성은 각각 0.75±0.03, 0.73±0.01, 0.43±0.06과 0.22±0.03 단위였으나 알부민을 혼합하였을 때는 각각 0.77±0.02, 0.75±0.04, 0.65±0.06(p<0.01)과 0.54±0.12(p<0.05) 단위로 알부민을 혼합하지 않았을 때에 비해 유의한 증가를 보였다.

고 찰

생체내에서 호흡, 면역 반응 및 각종 산화 환원 반응의 결과로써 활성 산소가 생성되는데^{1, 2)}, 특히 신장도 다른 기관과 같이 정상적인 세포 대사의 결과로 활성 산소를 생성한다⁷⁾. 전자 전달계와 catecholamines 등의 산화, xanthine oxidase와 amino acid oxidases의 활성 및 arachidonic acid 대사 등을 통하여 활성 산소를 생성한다⁷⁾. 그러나, 정상인에서 활성 산소의 생성은 세포내의 항산화계에 의해 평형을 유지하고 있다¹¹⁻¹³⁾. 세포질내의 superoxide는 SOD에 의해 과산화수소로 바뀌어지며, 과산화수소는 catalase와 glutathione peroxidase에 의해 인체에 무해하게 바뀌어진다¹¹⁻¹³⁾. 이렇게 활성 산소의 제거 반응의 시작은 SOD의 작용과 더불어 시작된다고 할 수 있으며 활성 산소의 제거에 가장 중요한 효소가 SOD라 할 수 있을 것이다. 이렇게 SOD는 superoxide

anion을 과산화수소로 바꾸어 줌으로써 활성 산소의 처리에 가장 먼저 작용하고 중요한 역할을 하는 효소이다¹¹⁻¹³⁾. 또한 Ichikawa 등²⁸⁾에 따르면 SOD의 활성 저하는 superoxide 음이온의 과량 생성을 야기한다고 한다. 본 연구에서는 혈액 투석을 시행중인 말기신부전 환자의 혈장 및 적혈구의 SOD의 활성은 정상인에 비해 유의하게 감소되어 있었다. 이 결과는 몇몇 연구자들의 연구와도 일치한다^{9, 10, 14)}. 따라서 본 연구의 결과는 이들 연구자들의 주장처럼 말기신부전 환자는 과량의 superoxide 음이온에 노출되어 있으며 이로 인해 말기신부전 환자가 활성 산소에 의한 손상에 노출되어 있음을 시사한다고 생각된다. 말기신부전 환자에서 SOD의 활성 저하와 그 원인에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있는데 이들에 따르면 모두 SOD의 조효소인 구리와 아연 이온의 농도의 저하가 하나의 원인으로 보고되고 있으며, 이외에도 요독이 이 효소의 활성에 영향을 미칠 것이라고 보고하고 있다^{29, 30)}.

본 연구에서는 SOD의 활성 저하에 영향을 미치는 요독 물질의 하나인 요소에서 유도되는 시안산이 작용할 수 있는지를 검토하였다. 왜냐하면 말기신부전 환자는 요소의 혈중 농도가 정상인 보다 높으며, 요소의 0.8%는 사람의 체내에서 자연적으로 시안산으로 바뀌어져 요소와 시안산은 체내에서 평형 상태를 유지하기 때문에¹⁶⁾ 혈중 시안산의 농도도 정상인에 비해 높은 것²²⁾으로 알려져 있기 때문이다. 또한 이러한 시안산은 단백질을 비롯한 각종 생체 물질을 변화시키는 것으로 알려져 있으며¹⁶⁻¹⁸⁾, 생체 활성 물질, 특히 단백질에 결합함으로써 단백질을 carbamylation 시키며, 단백질의 여러 잔기들 중에서는 유리 아미노기와 가장 쉽게 반응하여 carbamylation 시키는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻²¹⁾. 따라서 SOD도 일종의 단백질인 만큼 시안산이 증가에 의해 carbamylation 되어 그 활성이 저해될 수 있을 것이다.

본 실험에서 500mM 시안산과 SOD를 체온인 37℃에서 반응시키고 0시간에서 72시간까지 시간을 경과 시켰을 때, SOD의 활성은 시간이 지남에 따라 감소되었다. 또한 20mM, 200mM, 500mM 및 1M 시안산과 SOD를 반응시키고 48시간을 경과시켰을 때 SOD의 활성은 시안산의 농도가 증가함에 따라 그 활성이 감소되었다. 즉, SOD는 시안산의 농도가 증가함에 따라 그리고 시안산과 반응 시간이 증가함에 따라 그 활성이 감소되었다. 이는 말기신부전 환자에서 시

안산은 SOD의 활성을 감소시키는 하나의 요독 물질로 생각된다. 또한 이 실험의 결과로 볼 때 말기신부전 환자에서 시안산의 농도가 증가되면 증가될수록, 또한 시안산의 체내 제거가 늦어져 시안산과 반응 시간이 길면 길수록 superoxide의 활성은 더욱 더 감소하리라 생각된다.

또한 본 실험에서 500mM 시안산과 SOD를 채운 인 37℃에서 반응시키고 0시간에서 72시간까지 시간을 경과시키고 SOD의 유리 아미노기가 carbamylation 되는 정도를 측정하였을 때, 유리 아미노기가 carbamylation 되어 감소되는 정도는 시간이 지남에 따라 증가되었다. 또한 20mM, 200mM, 500mM 및 1M 시안산과 SOD를 반응시키고 48시간을 경과 시켰을 때 SOD의 유리 아미노기가 carbamylation 되어 감소되는 정도도 시간이 지남에 따라 증가되었다. 즉, SOD는 시안산의 농도가 증가함에 따라 그리고 시안산과 반응 시간이 증가함에 따라 더욱 더 carbamylation 되어 유리 아미노기가 감소되었다. 즉, 이 실험의 결과로 볼 때 말기신부전 환자에서 시안산의 농도가 증가되면 증가될수록, 또한 시안산의 체내 제거가 늦어져 시안산과 반응 시간이 길면 길수록 SOD는 carbamylation 되어 유리 아미노기가 감소되리라 생각된다. 한편, 50 µg/mL의 알부민을 SOD와 시안산의 반응액에 첨가하였을 때 SOD의 활성 감소 폭이 감소하였다. 이는 그 작용 기전은 확실치 않지만 알부민이 SOD의 carbamylation을 방지함으로써 나타난 결과가 아닌가 생각된다.

이상의 실험 결과와 문헌상의 고찰로 볼 때 말기신부전 환자에서 시안산은 SOD의 활성을 감소시키는 하나의 요독 물질로 작용하리라 생각되며, 말기신부전 환자에서 시안산의 농도가 증가되면 증가될수록, 또한 시안산의 체내 제거가 늦어져 시안산과 반응 시간이 길면 길수록 SOD는 carbamylation 되어 그 활성은 더욱 더 감소하리라 생각된다. 또한 알부민은 그 작용 기전이 확실치 않지만 SOD의 carbamylation을 방지하는 것으로 생각된다. 앞으로 이 문제에 대해서는 보다 체계적인 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

= Abstract =

Effect of Cyanate on the Carbamylation and Biological Activity of Superoxide Dismutase

Sang Hyuck Seo, M.D., Kyo Cheol Mun, M.D.*
Sung Bae Park, M.D. and Hyun Chul Kim, M.D.

*Department of Internal Medicine,
Department of Biochemistry* and Kidney Institute,
Keimyung University School of Medicine,
Taegu, Korea*

The patients with end stage renal disease show several complications such as atherosclerosis, anemia and increased susceptibility to infection by damage due to oxygen free radicals. Superoxide dismutase(SOD) is directly linked to the fate of the highly reactive oxygen metabolites. If there is an alteration in the activity of SOD, this alteration may contribute to the complications by reactive oxygen species in patients with end stage renal disease. In this experiment, SOD activity and the effect of cyanate on the activity of SOD was studied to understand the mechanism of several complications mediated by oxygen free radicals in patients with end stage renal disease. SOD activity in the plasma and erythrocytes from patients with end stage renal disease was significantly lower than those from healthy controls. It is known that underproduction of SOD leads to excess production of superoxide and reduced iron favoring hydroxyl radical formation. The results in this experiment suggest that there is an overproduction of superoxide anion in patients with end stage renal disease. The overproduction of superoxide anion may contribute the patients with end stage renal disease susceptible to oxidant damages. To evaluate if cyanate could carbamylate SOD, SOD was incubated with cyanate.

The level of carbamylated SOD increased as the time of exposure to cyanate increased from 0 hour to 72 hours. Furthermore, the degree of carbamylation of SOD increased as cyanate concentration in the incubation media rose from 20mM to 1M. There appears to be a maximum degree of carbamylation at a concentration of 1,000mM cyanate. To test the hypothesis that in vitro carbamylation of SOD alters its biological activity, SOD activity was measured after incubation with cyanate. The activity of carbamylated SOD decreased as the time of exposure to cyanate increased from 0 hour to 72 hours. Furthermore, the activity of carbamylated SOD decreased

as cyanate concentration in the incubation media rose from 20mM to 1M and when albumin was added to the reaction mixture, the loss of SOD activity was prevented. These results are consistent with the hypothesis that SOD is also carbamylated and lost biological activity in end stage renal disease patients by cyanate, and that the degree of carbamylation depends on both the concentration of cyanate and the length of exposure. Also, these suggest that albumin may prevent carbamylation of SOD at least in vitro condition.

Key Words: Cyanate, Carbamylation, Superoxide dismutase, Uremia

참 고 문 헌

- 1) Moslen MT: Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. In Armstrong D(ed): Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York, Plenum Press. 1994, p17-27
- 2) Punchard NA, Kelly FJ: Introduction in Punchard NA, Kelly FJ(eds): Free radicals. Oxford, Oxford University Press. 1996, p1-8
- 3) Reaven PD: Mechanisms of atherosclerosis: Role of LDL oxidation. In Armstrong D(ed): Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York, Plenum Press. 1994, p113-128
- 4) Ferrari R: Oxygen free radicals at myocardial level: Effect of ischemia and reperfusion. In Armstrong D(ed): Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York, Plenum Press. 1994, p99-112
- 5) Ames BN, Shigenaga MK: Oxidants are a major contributor to cancer and aging. In Halliwell B, Aruoma(eds): DNA and free radicals: New York. Ellis Horwood, 1993, p1-15
- 6) Yagi K: Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal and pancreatic disease. In: Armstrong D(eds): Free radicals in diagnostic medicine. a systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York, Plenum Press. 1994, p165-170
- 7) Waz WR, Feld LG: Reactive oxygen molecules in the kidney. In Armstrong D(ed): Free radicals in diagnostic medicine. A systems approach to laboratory technology, clinical correlations, and antioxidant therapy. New York, Plenum Press. 1994, p171-184
- 8) Fiorillo C, Oliviero C, Rizzuti G, Nediani C, Pacini A, Nassi P: Oxidative stress and antioxidant defenses in renal patients receiving regular haemodialysis. *Clin Chem Lab Med* 36:149-153, 1998
- 9) Mun KC, Joo I, Kim YH, Park SB, Kim HC: Effect of hemodialysis on levels of malondialdehyde and antioxidant enzymes in erythrocytes from patients with end stage renal disease. *Korean J Nephrol* 17:591-596, 1998
- 10) Shurtz-Swirski R, Mashiach E, Kristal B, Shkolnik T, Shasha SM: Antioxidant enzymes activity in polymorphonuclear leukocytes in chronic renal failure. *Nephron* 71:176-179, 1995
- 11) Halliwell B, Gutteridge JMC: Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In Halliwell B, Gutteridge JMC(eds): Free radicals in biology and medicine. Oxford: Clarendon Press. 1989, p86-187
- 12) Murray RK: Red and white blood cells. Murray RK, Granner D K, Mayer PA, Rodwell VW: Biochemistry, 24th ed. East Norwalk. Appleton & Lange 1996, p733-749
- 13) Babior BM, Benna JE, Chanock SJ, Smith RM: The NADPH oxidase of leukocytes: The respiratory burst oxidase. Scandalios JG: Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1997, p737-783
- 14) Durak I, Akyol O, Basesme E, Canbolat O, Kavutcu M: Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron* 66:76-80, 1994
- 15) 김현철, 박성배: 만성신부전, in 김현철, 박성배(eds): 임상신장학: 대구, 계명대학교 출판부, 1997, p195-220
- 16) Roxborough HE, Millar CA, McEneny J, Young IS: Carbamylation inhibits the ferroxidase activity of caeruloplasmin. *Biochem Biophys Res Commun* 214:1073-1078, 1995
- 17) Roxborough HE, Young IC: Carbamylation of proteins and atherogenesis in renal failure. *Med Hypothesis* 45:125-128, 1995
- 18) Ganea E, Harding JJ: Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase by carbamylation and protection by α -crystallin, a chaperone-like protein *Biochem Biophys Res Commun* 222:626-631, 1996
- 19) Beswick HT, Harding JJ: Conformational changes induced in bovine lens alpha-crystallin by carbamylation. Relevance to cataract. *Biochem J* 223: 221-227, 1984

- 20) Crompton M, Rixon KC, Harding JJ: Aspirin prevents carbamylation of soluble lens proteins and prevents cyanate-induced phase separation opacities in vitro: A possible mechanism by which aspirin could prevent cataract. *Exp Eye Res* 40: 297-311, 1985
- 21) Beswick HT, Harding JJ: High-molecular-weight crystallin aggregate formation resulting from non-enzymic carbamylation of lens crystallins: Relevance to cataract formation. *Exp Eye Res* 45: 569-578, 1987
- 22) Nilsson L, Lundquist P, Kagedal B, Larsson R: Plasma cyanate concentrations in chronic renal failure. *Clin Chem* 42:482-483, 1996
- 23) Stim J, Shaykh M, Anwar F, Ansari A, Arruda JA, Dunea G: Factors determining hemoglobin carbamylation in renal failure. *Kidney Int* 48: 1605-1610, 1995
- 24) Trepanier DJ, Thibert RJ, Draisey TF, Caines PS: Carbamylation of erythrocyte membrane proteins: an in vitro and in vivo study. *Clin Biochem* 29:347-355, 1996
- 25) Hörmkö S, Savolainen MJ, Kervinen K, Kesäniemi A: Carbamylation-induced alterations in low-density lipoprotein metabolism. *Kidney Int* 41: 1175-1181, 1992
- 26) Hyland K, Voisin E, Banoun H, Auclair C: Superoxide dismutase assay using alkaline dimethylsulfoxide as superoxide anion-generation system. *Anal Biochem* 135:280-287, 1983
- 27) Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34:497-500, 1988
- 28) Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T: Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney Int* 45:1-9, 1994
- 29) Richard MJ, Arnaud J, Jurkovitz C, Hachache T, Meftahi H, Laporte F, Foret M, Favier A, Cor-donnier D: Trace elements and lipid peroxidation abnormalities in patients with chronic renal failure. *Nephron* 57:10-15, 1991
- 30) 문교철, 권진경: 말기신부전 환자에서 구리와 아연이온 농도가 적혈구의 Superoxide Dismutase 활성에 미치는 영향. *대한신장학회지* 18:265-269, 1999