岡山医誌（1991）103, 1225～1235

体外循環下における心筋の虚血再灌流に関する検討
—h-SOD の効果と至適投与量—

岡山大学医学部第二外科学教室（指導：寺本　滋教授）

山　田　幸　夫

（平成3年8月27日受稿）

Key words：体外循環，心筋保護，再灌流障害，
free radicals, superoxide dismutase

緒　　言

近年，開心術における心筋保護法は，hypothermic cardioplegia の導入により著しく向上し，安全性も確立されてきた．

しかし，高度の心筋肥大や心筋障害を伴う心臓予備能の低下した症例や術中に長時間の大動脈遮断を要する症例では術後の一時的な心筋の機能不全（stunned myocardium[1]）や低心拍出量症候群（LOS）を来すことがある．

この stunned myocardium や LOS の原因として，大動脈遮断にともなう虚血心停止による心筋障害の影響と同時に，大動脈遮断解除後の再灌流（reperfusion）により心筋代謝や収縮能が低下する再灌流障害の影響も大きいと考えられている[2)3)]．この再灌流障害を軽減する方法として再灌流時の灌流圧や灌流液温度および至適 PH の検討，また灌流液の酸素化や基質の添加による効果が検討されてきた．

さらに近年，再灌流時に発生する活性酸素（free radical）による心筋細胞障害がより根本的問題として注目されはじめた．この心筋障害を活性酸素消去剤（free radical scavengers）の投与により軽減が可能であるか検討した報告[4)~6)]が多くみられるようになったが，開心術時の再灌流への応用に関する報告は数少ない[7)]．

著者は開心術における体外循環モデル（hypothermic global cardioplegic ischemia reperfusion）を作成し，再灌流障害の程度と superoxide anion（O_2-）の消去剤の一つである recombinant human superoxide dismutase（h-SOD）による心筋保護上の有効性とその至適投与量を実験的に検討した．

対象と方法

雑種成犬64頭（体重13～24kg）を用い pentobarbital（30mg/kg）を静注麻酔し気管内挿管後，従量式人工呼吸器により動脈血 PH 7.4±0.05, $PaCO_2$35～45mmHg に維持した。心電図をモニターし左大腿動静脈からそれぞれ圧測定用カテーテルを挿入留置した．右外頸静脈より 5 Fr. Swan-Ganz カテーテルを挿入した．

右第4肋間開胸の後，右肺静脈より Millar microtip catheter pressure transducer を左室へ挿入し，左房圧測定用カテーテルを左心耳より留置した．冠静脈血を採取するため右房より冠静脈洞にカテーテルを留置した．

heparin sodium（3 mg/kg）を静注し右大腿動脈より送血用カニューレを挿入し，上大静脈と下大静脈に脱血用カニューレを留置した．送血はローラポンプ，人工肺は気泡型（Shiley 070 S）を用い，同種血液と Ringer 液にて20%希釈充塡とした．送血量は 2 L/min/m²とし，平均動脈圧を50～80mmHg に維持した．完全体外循環（total CPB）とした後に大動脈遮断を行った．心筋保護は大動脈基部の cardioplegia（CP）line より冷却した modified St. Thomas 液（Table 1）を初回20mℓ/kgを注入して心停止を得た後，30分間隔で10mℓ/kgを追加注入し，ice slush による局所冷却を併用して，術中心筋温を20℃以

Table 1 Components of cardioplegic solution

Sodium chloride	(mmol/ℓ)	154
Potassium chloride	(mmol/ℓ)	20
Magnesium sulphate	(mmol/ℓ)	16
Calcium gluconate	(mmol/ℓ)	1
Sodium bicarbonate	(mmol/ℓ)	2
Procaine hyirochloride	(mmol/ℓ)	1
Glucose	(g/ℓ)	2

下に保った.120分間の心停止維持ののち大動脈遮断を解除し，心筋に再灌流を行い心拍の再開を得た．除細動が必要な場合は解除後3分で行った．体外循環からの離脱は，遮断解除後10分で部分体外循環とし15分にて離脱した．

実験群は体外循環下の再灌流障害の影響とこの障害に対する h-SOD の効果と至適投与量を検討するために以下の8群を設定した．

I群（n＝8）は，130分間の完全体外循環を行い大動脈遮断は行われなかった群で，完全体外循環後5分で体外循環を離脱し45分間経過を観察した．

II-a群（n＝8）は，体外循環下に120分間の大動脈遮断を行い大動脈遮断解除後に60分経過を観察し，II-b群（n＝8）は大動脈遮断前と解除直前および解除5分後に左室心尖部心筋を一部採取した群である．

III群（n＝8）は，体外循環下に120分間の大動脈遮断を行った群で，大動脈遮断解除直前に大動脈基部の CP-line より，生食20mℓ（室温）を注入した．

IV群（n＝8）は，同じく大動脈遮断解除直前に CP-line より，生食20mℓ（室温）に溶解した h-SOD（日本化薬社製）1mg/kgを投与した．

V群（n＝8）は同じく h-SOD 3mg/kg,

VI群）n＝8）は同じく h-SOD 10mg/kg,

VII群（n＝8）は同じく h-SOD 20mg/kgを投与した群である．

（Figure 1）

測定は以下の項目について施行した．

1）SOD 活性：血中 h-SOD 活性と血中イヌ SOD 活性は経時的に採血し enzyme immunoassey (EIA) 法により測定した．心筋イヌ SOD 活性は左室自由壁を採取直後に生食で homogenize し EIA 法にて測定した．

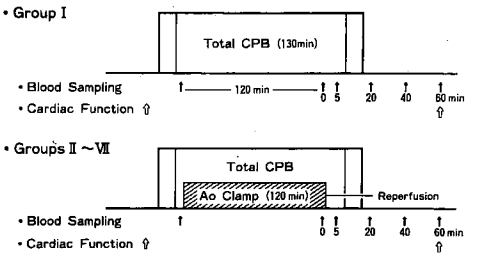

Fig. 1 Experimental Protocol
Blood Sampling : Cardiac enzyme (CK-MB, HBDH) h-SOD concentration
Cardiac Function : Cardiac Index
LV max dp/dt
CPB ; Cardiopulmonary bypass
Ao Clamp ; Aortic cross clamping

2）心筋逸脱酵素：経時的に動脈血を採血し測定項目は creatinine kinase の MB isozyme（CK-MB）と α-hydroxybutyric dehydrogenase（HBDH）であり，CK-MB は UV（NAC）法およびセルロースアセテート膜電気泳動法による蛍光発色法で，HBDH は UV 法（GSCC 準拠）により測定した．

3）心筋水分含有量：左室心尖部自由壁から，400～600mgの切片を8検体採取し，採取直後の湿重量と，それらを80℃で7日間乾燥後の乾燥重量により水分含有量（湿重量と乾燥重量の差を湿重量で除し％表示）を求め，その平均を用いた．

4）心機能：Swan-Ganz カテーテルによる thermodilution 法にて cardiac output（体表面積により補正した cardiac index（C. I.））と，Millar microratip catheter pressure transducer により left ventricular maximum dp/dt（LV max dp/dt）を測定した．

データは，それぞれ mean± standard deviation で表し，統計学的意義については，2群間の平均値の比較には Student's t-test を用いて検定し，3群間以上の平均値の比較は分散分析でF値が有意なものについて最小有意差を用いて検定し，$p<0.05$をもって有意差ありと推定した．

結　　果

I群とII群の比較により得られた再灌流障害の病態は下記のごとくであった.

体外循環下での再灌流後の心筋逸脱酵素の遊出量を比較するのに, I群では完全体外循環終了前10分から60分後の CK-MB および HBDH の値の差を, II-a 群では大動脈遮断解除直前(完全体外循環終了前10分) と解除60分後の値の差をそれぞれ CK-MB release, HBDH release として検討した. I群の CK-MB release 35.1±17.9 IU/ℓ と HBDH release 56.2±17.7に対し, II-a 群は104.3±41.7と120.5±33.7と有意に高値であり, 再灌流により心筋逸脱酵素の遊出は有意に増加した. (Figure 2)

心筋水分含有量は, 正常心筋が78.00±0.53%であるのに対し, I群の完全体外循環終了後50分の水分含有量は78.35±0.45で軽度な増加であったが, II-b 群においては大動脈遮断解除直前に79.04±0.77と虚血により正常心筋に較べ有意に増加し, さらに大動脈遮断解除後5分には81.55±0.94と解除直前に較べても有意に急増した. II-a 群での大動脈遮断解除後60分においても, 81.88±0.90と水分含有量は高く, 解除直前とI群に較べ有意に高値であった. 虚血により心筋水分含有量は増加したが, それ以上に再灌流により急激な増加を示した. (Figure 3)

心機能は, I群では完全体外循環終了後50分の測定値, II-a 群については大動脈遮断解除後60分の測定値を体外循環前の対照測定値に対する百分率で表し回復率 (% recovery) として検討した. I群での C. I. および LV max dp/dt の回復率はそれぞれ98.9±12.2%, 85.9±11.1であるのに対しII-a 群は68.1±16.5, 68.5±12.1と有意に低値であり, 再灌流により心機能の回復率が低下した. (Figure 4)

II-a 群と, 生食および h-SOD 投与のIII～VII群との比較により得られた h-SOD の効果は下記のごとくであった.

大動脈遮断解除後の CK-MB および HBDH release については, III群はそれぞれ101.5±33.0 IU/ℓ と129.2±36.4, IV 群は62.8±17.8と

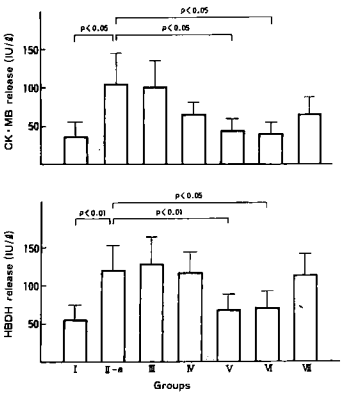

Fig. 2 Cardiac enzyme release after reperfusion
Upper : CK-MB (Creatinine kinase MB isozyme) release
Lower : HBDH (α-hydroxybutyric dehydrogenase) release
Error bars are ± the standard error of the mean.

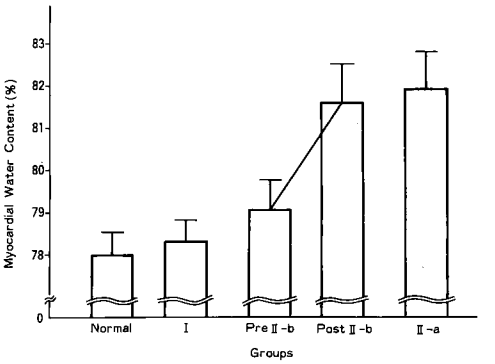

Fig. 3 Myocardial water content during cardiopulmonary bypass
Normal : Normal canine mycardial water content
I : Myocardial water content at 50 minutes after total cardiopulmonary bypass
Pre II-b : Myocardial water content before reperfusion
Post II-b : Myocardial water content at 5 minutes after reperfusion
II-a : Myocardial water content at 60 minutes after reperfusion
Error bars are ± the standard error of the mean.

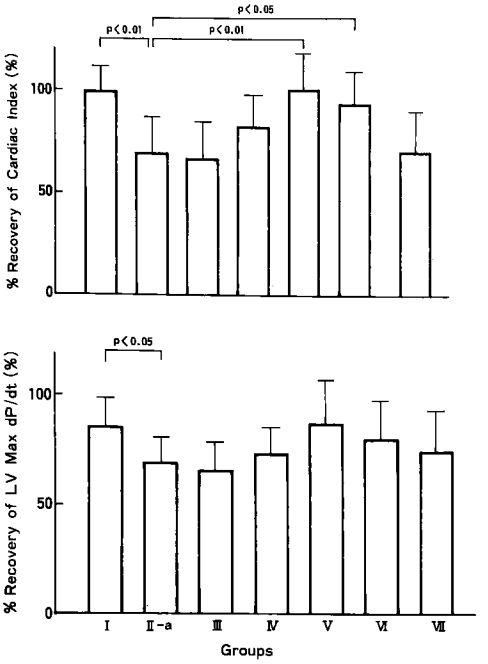

Fig. 4 % Recovery of cardiac function after reperfusion
Upper : % Recovery of C. I. (Cardiac index)
Lower : % Recovery of LV max dp/dt (Left ventricular maximum dp/dt)
Error bars are ± the standard error of the mean.

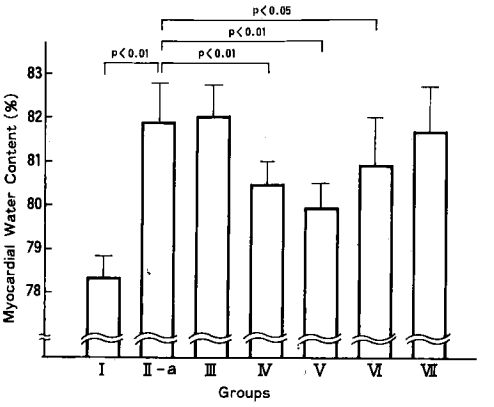

Fig. 5 Myocardial water content after reperfusion
I : at 50 minutes after total cardiopulmonary bypass
II-a～VII : at 60 minutes after reperfusion
Error bars are ± the standard error of the mean.

117.3±28.9, V群は43.8±15.1と67.8±19.5, VI群は39.4±14.4と70.1±25.3, VII群は64.3±22.6と114.3±29.0であり, II-a 群に比しV群とVI群は有意に低値に保たれた. h-SOD 投与により再灌流後の心筋逸脱酵素の遊出が制御された. (Figure 2)

大動脈遮断解除後60分の心筋の水分含有量は, III群は82.01±0.74%, IV群は80.44±0.61, V群は79.88±0.64, VI群は80.91±1.09およびVII群は81.69±1.04であり, II-a 群に較べてIV群とV群およびVI群が有意に低値であり, h-SOD 投与により心筋水分含有量は低値に保たれた。(Figure 5)

心機能では, C. I. の回復率がIII群67.0±14.9%, IV群82.6±14.3, V群103.0±16.9, VI群94.4±14.7, VII群71.6±19.5と, II-a 群に比しV群とVI群が, 有意に高値であった。LV max dp/dt の回復率もIII群66.3±11.9, IV群72.8±11.7, V群87.0±19.9, VI群78.8±17.7, VII群73.7±19.3と, C. I. と同様の傾向を示したが有意差はみられなかった. h-SOD 投与により心機能の回復が良好であった. (Figure 4)

また以上すべてのパラメーターにおいて, II-a 群と生食投与群であるIII群の間に有意差はみられなかった。

II-b 群における心筋内イヌ SOD 活性は, 体外循環開始後は785.4±79.5 units/g wet weight であるのに対し, 大動脈遮断解除直前には617.0±58.1と有意に低下し, 大動脈遮断解除後5分においても606.8±59.4と有意の低下がみられた. 一方, 動脈血中イヌ SOD 活性は, 体外循環開始後が9.75±2.49 units/mℓ, 大動脈遮断解除直前は11.48±2.40, 大動脈遮断解除後5分も11.24±2.37と有意な変化はみられなかった. (Figure 6)

h-SOD 投与群における動脈血中 h-SOD 濃度と3 mg/kg投与群の冠静脈血中 h-SOD 濃度の経時的変化を測定したが, 動脈血中 h-SOD 濃度は投与 (遮断解除) 後5分で peak に達し, そ

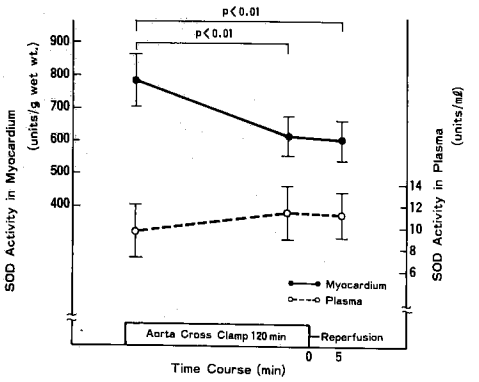

Fig. 6　Time course of canine myocardial SOD activity and plasma SOD activity
Closed circle : myocardial SOD activity
Opened circle : plasma SOD activity
Error bars are ± the standard error of the mean.

の濃度はⅣ群8.6±2.1mg/ℓ，Ⅴ群26.1±7.7，Ⅵ群105.5±17.3，Ⅶ群179.1±23.3であり，各々の半減期は98分，69分，96分，132分であった．健常イヌでの半減期25分に較べ延長が著明であった．一方，冠静脈血における h-SOD 濃度は投与（遮断解除）直後が最も高く，Ⅴ群110.5±42.7，Ⅵ群480.7±172.8と上記の投与5分後の動脈血 peak 濃度の約5倍に達し，投与後5分で26.6±7.6，83.0±25.8と動脈血のレベルに戻り，以後は動脈血と同様の減少曲線を示した．（Figure 7）

考　　察

心臓外科手術きおける心停止中の心筋保護の手段として，種々の冷却心筋保護液（crystalloid cardioplegia，blood cardioplegia など）や ice slush を用いた局所冷却などが導入され手術成績の向上をみてきたが，より安全でより長時間の心停止を目標に，幾多の研究が成されている．

さらにこの心停止中の心筋保護に加えて，大動脈遮断を解除し再灌流した後の心筋障害も注目され，再灌流障害の病態生理と対策が研究され解明されてきた．それには再灌流時の Ca-paradox に対する Ca 拮抗剤の投与[8)9)]や浮腫に対する mannitol の投与[10)]などが試みられ効果

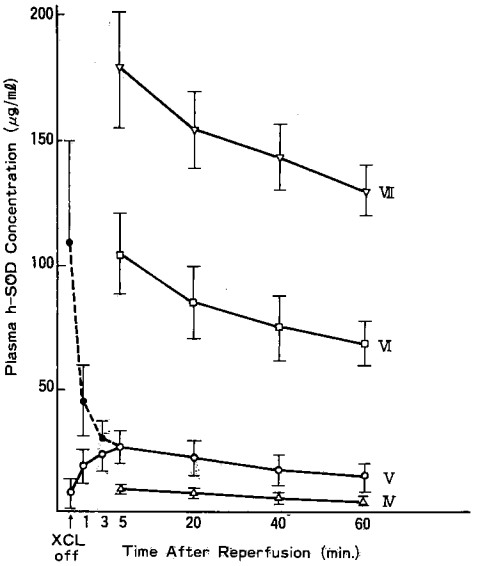

Fig. 7　Time course of recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) concentrations after reperfusion
Plots were for doses of h-SOD 1mg/kg (△), 3mg/kg(○), 10mg/kg(□), 20mg/kg(▽) and h-SOD 3mg/kg coronary effluent (●)
XCL ; Aortic cross clamping
Error bars are ± the standard error of the mean.

がみられている．

また最近，虚血臓器における虚血再灌流障害の重要な要因の一つとして活性酸素の関与が注目されてきた[11)12)]．虚血中には活生化された xanthine oxidase-hypoxanthine 系が再灌流時の酸素に作用して，まず最初に酸素の1電子還元による superoxide anion (O_2^-)，さらに2電子還元とプロトン付加による hydrogen peroxide (H_2O_2)，この H_2O_2 の1電子還元で生じる hydroxyl radical（・OH）および高エネルギー酸素である一重項酸素（$_1O^2$）の4種類の狭義の活性酸素が産生されると考えられている．この superoxide anion と hydroxyl radical は非常に反応生が高く寿命が短い（10^{-3}～10^{-6}秒）が物理的に Electron spin resonance や Electron paramagnetic resonance を用いて，再灌流直後に活性酸素が産生（burst）されることが証明された[13)-15)]．

1969年に McCord と Fridovich[16]が生体内において$2\,O_2^- + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$の反応を触媒し，$O_2^-$を消去する酵素である SOD の存在を発見して以来，活性酸素とその消去剤に関する多くの研究と開発がなされてきた．生体内には活性酸素に対する防御機構として主に細胞質（ミトコンドリアや細胞液）この SOD や $2\,H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\,H_2O$ の反応を触媒する catalase, glutatione peroxide などの消去剤が存在しているが，再灌流時には活性酸素が急増するために生体内の消去剤による防御機構だけでは対応できなくなり重大な細胞障害を引き起こすのではないかと考えられている[17]．

心臓においても区域あるいは全体の虚血再灌流に対して，種々の消去剤を投与して再灌流障害を軽減しようとする実験とその効果の有無に関する報告が数多く[18)-28)]みられる．

開心術でも心筋保護下の心停止後の再灌流は不可避であり，この障害を抑制することが重要な心筋保護の問題となっているが，臨床の開心術と同様の体外循環モデルでの検討は少ない．著者はこのモデルを作製し，体外循環下の再灌流障害の病態と活性酸素のうち最初に発生する superoxide anion の消去剤である h-SOD を局所投与しての効果と至適量を検討した．

体外循環下における再灌流障害の病態としてイヌ SOD 活性と心筋逸脱酵素と心筋浮腫と心機能の4項目から検討した．

心筋内イヌ SOD活性は虚血120分および再灌流後5分においても有意に低下がみられ，動脈血中にもイヌ SOD 活性の有意の上昇はみられなかった．Guarnieri ら[29]もラットの Langedorff モデルを用いて虚血および再灌流時に心筋内 SOD および glutatione 活性が低下していると報告しているが，このことは再灌流時に発生する活性酸素に対して心筋の防御機能の低下を示唆していると考えられる．

大動脈遮断解除により再灌流後の心筋逸脱酵素（CK-MB, HBDH）の遊出は増加したが，これは他の報告[30)-32)]にもある様に虚血時の膜構造の破綻や流動性や透過性の変化に加えて再灌流による細胞膜リン脂質の過酸化変性も影響していると考えられる．

心筋水分含有量の増加は心筋浮腫の増大を意味すると考えられるが，再灌流直後に起きた心筋水分含有量の急激な増加が60分後にも依然として存在したことは，再灌流直後より心筋浮腫が発生し持続することを示唆している．この心筋浮腫の機序に関しては，

1）血管内皮細胞にある xanthine oxidase 系が活性酸素の発生源[33)34)]であるため，直接に内皮細胞が障害を受けて血管透過性が亢進し浮腫をきたす[12)17)]，2）抹消血管床に付着した activated neutrophil が活性酸素を発生[35)~37)]し，また plug 形成などによる no-reflow 現象[38]を起こすことにより，内皮細胞障害を引き起こし浮腫をきたす，3）虚血にさらされた心筋細胞の細胞膜は脆弱化しており，ここに活性酸素が作用し H_2O や C_a^{2+}などが流入し細胞の膨化をきたす[39]などが考えられるが，電子顕微鏡による微細構造の変化からも，再灌流後の血管内皮細胞の膨化，裂孔，空胞形成や心筋細胞の浮腫，ミトコンドリアの破壊と膨化，収縮帯の形成などがみられている[31)40)41)]．体外循環における心筋浮腫の発生は cardioplegic solution の浸透圧や灌流圧などの関連もあるが，今回みられた再灌流直後から急激に発生した心筋浮腫は再灌流障害の重要な病態の一つと考えられ，同時期に burst する活性酸素[13)~15)]との関連が大きいのではないかと推測された．

再灌流により心機能の回復は遅延したが，これは以上に述べた細胞膜障害と心筋浮腫や Ca の異常な細胞内流入[42)43)]や高エネルギー燐酸化合物の欠乏[44]などを統合的に反映したものであると考えられた．

以上の結果から体外循環下でも120分間の虚血再灌流後の心筋は stunning の状態にあり，この状態が再灌流時の活性酸素との関連が大とすれば，至適な h-SOD の投与により遷延した機能低下が改善する可能性があると考えて，最初に h-SOD の溶解液である生理食塩水20mℓ投与が影響のないことを確認した後，h-SOD 1，3，10，20mg/kgを生理食塩水20mℓに溶解し再灌流直前に大動脈基部より局所投与し検討した．

再灌流後の心筋逸脱酵素（CK-MB, HBDH）の有意の増大が h-SOD 3 mg/kgおよび10mg/kg

投与により抑制されたことは，虚血時にある程度可逆性障害を受けていた細胞が再灌流により細胞膜の破綻をきたし不可逆性障害へ進展する過程を阻止したためと考えられた．

また，再灌流後の心筋浮腫が h-SOD 1 mg/kg および 3 mg/kg投与で抑制されたことは，再灌流時に冠動脈血管床で h-SOD が burst する superoxide anion を消去することにより血管内皮細胞や心筋細胞の障害を軽減し cell swelling や間質浮腫が抑制されたと考えられた．

再灌流後の心機能は，h-SOD 3 mg/kg投与により心筋の統合性が最も良好に温存され，再灌流60分後に100%に近い収縮能の回復が得られた．

以上の3項目とも，h-SOD 3 mg/kg投与群が最も良好であったことから，今回の投与方法における h-SOD の至適量は 3 mg/kgと考えた．

この h-SOD 単独投与に関しては，SOD により superoxide anion は hydrogen peroxide に変換され，$H_2O_2+Fe^{2+}\rightarrow\cdot OH+OH^-+Fe^{3+}$（Fenton 反応）および$O_2^-+H_2O_2\rightarrow\cdot OH+OH^-+O_2$（Haber-Weiss 反応）により最も活性の大きい hydroxyl radical の発生を促進することになり，hydrogen peroxide scavenger である catalase や glutathione peroxidase を添加することでより有効な結果が得られるとの報告[4)6)18)20)24)~26)]がある一方，h-SOD 単独投与でも catalase や glutathione peroxidase の添加と同様の効果が得られた報告[17)19)22)23)]もみられる．Ambrosio ら[17)]は外因性の SOD が superoxide anion が発生するや否や hydrogen peroxide に変換し，内因性の catalase や glutathione peroxidase により充分に消去されると推察している．この検討でも h-SOD 3 mg/kg投与で十分な心筋保護結果が得られたが20mg/kg投与では効果が認められなかったことから，内因性 catalase や glutathione peroxidase が処理し得る量の hydrogen peroxide であれば，h-SOD 単独投与でも十分ではないかと考えた．しかし20mg/kg投与で効果が認められなかった原因については不明であるが，その一つの機序として上記の過量の h-SOD 単独投与は生体内の処理力を越える hydroxyl radical の増生につながり，これが細胞障害を引き起こす可能性も考えられる．その原因については今後さらに検討が必要である．

この 3 mg/kg投与における血中 h-SOD 濃度をみると，冠静脈血において再灌流時に約110mg/ℓであった．Lee[7)]は，イヌを用いた低温体外循環下の虚血再灌流モデルにおいて再灌流5分前に人工心肺に h-SOD を投与しその血中 h-SOD 濃度と心機能の面から検討を行った結果，16mg/kg投与が至適量で，その血中 peak h-SOD 濃度は再灌流時に一致し120～140mg/ℓであり，左室収縮能は90～100%の回復が得られたと報告している．著者の結果からも再灌流直後に冠動静脈に100～150mg/ℓ程度の h-SOD が供給されることにより h-SOD の効果が最も発現すると考えられ，最小の投与量で最大の効果を得るには，大動脈基部からの局所投与は有効であると考えた．

この h-SOD 3 mg/kg投与での動脈血 peak 濃度は約25mg/ℓであり，この濃度は h-SOD 全身投与ならばイヌには0.5mg/kg，ヒトには1.5mg/kgの血中 peak 濃度に相当する．このことは腎障害などの副作用の面からしても安全な投与量であり，臨床応用の可能性が示唆された．

結　　論

開心術における体外循環モデルを作製し，低温虚血心筋の再灌流障害の病態と活性酸素消去剤である h-SOD の効果と至適量を実験的に検討し，以下の結論を得た．

1）体外循環下の120分間の心停止後にみられた再灌流障害として，心筋逸脱酵素の増加および急激な心筋浮腫と心機能の回復不全がみられた．

2）再灌流直前に大動脈基部から h-SOD を投与することにより，上記の再灌流障害の軽減がみられた．

3）この投与方法における至適量は 3 mg/kgであり，h-SOD の血中濃度からみて臨床応用の可能性が示唆された．

本論文の要旨は第19回日本心臓血管外科学会総会において発表した．

稿を終えるに臨み，終始御懇篤なる御指導，御校閲を賜りました恩師，寺本滋教授に深甚なる謝意を捧げます．また，本研究に御助言，御指導をいただ

きました，妹尾嘉昌教授，中山頼和講師に心から感　　謝致します．

文　　献

1) Braunwald E, Kloner RA : The Stunned Myocardium : Prolonged, Postischemic ventricular Dysfunction. Circulation (1982) **66**, 1146—1149.

2) Ellis SG, Henschke CI, Sandor T, Wynne J, Braunwald E, Kloner RA : Time course of functional and biochemical recovery of myocardium salvaged by reperfusion. J Am Coll Cardiol (1983) **1**, 1047—1055.

3) Buckberg GD : Studies of Controlled Reperfusion After Ischemia. When is cardiac muscle damaged irreversibly? J Thorac Cardiovasc Surg (1986) **92**, 483—487.

4) Shlafer M, Kane PF, Krish MM : Superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic reperfused heart. J Thorac Cardiovasc Surg (1982) **83**, 830—839.

5) Stewart JR, Crute SL, Louihlin VL, Hess ML, Greenfield LJ : Prevention of free radical-induced myocardial reperfusion injury with allopurinol. J Thorac Cariovash Surg (1985) **90**, 68—72.

6) Myers CL, weiss SJ, Kirsh MM, Shepard BM, Shlafer M : Effets of supplementing hypothermic crystalloid cardiplegic solution with catalase, superoxide dismutase, allopurinol, or deferoxamine on fumctional recovery of globally ischemic and reperfused isolated hearts. J Thorac Cardiovasc Surg (1986) **91**, 281—289.

7) Lee RB, Stewart JR, Merrill WH, Frist WH, Hammon JW Jr, Bender HW Jr : Pharmaccokinetics of superoxide dismutase during hypothemic cardiokulmonary bypass. Circulation 80 (suppl. III) (1989), 25—29.

8) Clark RE, Christlieb IY, Ferguson TB, Weldom CS, Marbarger JP, Biello DR, Roerts R, Ludbrook PA, Sobel BE : The first American clinical trial of nifedipine in casdioplegia. A report of tfe first 12 month experience. J Thorac Cardiovasc Surg (1981) **82**, 848—859.

9) Balderman SC, Chan AK, Gage AA : Verapamil cardioplegia : Improved mycardial preservation during global ischemia. J Thorac Cardiovasc Surg (1984) **88**, 57—66.

10) Hutton I, Marymick SP, Fixler DE, Templeton GH, Willerson JT : Changes in regional cornary blood flow with hypertonic mannitol in coscious dogs. Cardiovasc Res (1975) **9**, 47—55.

11) Braunwald E, Kloner R : Myocardial reperfusion : A double-edged sword? J Clin Invest (1985) **76**, 1713—1719.

12) Werns SW, Shea MJ, Lucchesi BR : Free radicals and myocardial injury : Pharmacologic implications. Circulation (1986) **74**, 1—5.

13) Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML : Dimect measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocarium. Proc Natl Acad Sci (1987) **84**, 1404—1407.

14) Kramer JH, Arroyo CM, Dickens BF, Weglicki WB : Spin-trapping evidence that graded myocardial ischemia alters post-ischemic superoxide, production. Free Radical Biol & Med (1987) **3**, 153—159.

15) Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF : Direct detection of free radicals in the perfused rat heart usig electron spin resonance spectroscopy. Circ Res (1987) **61**, 757—760.

16) McCord JM, Fridovich I : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem (1969) **244**, 6049—6055.

17) Ambrosio G, Weisfeldt ML, Jacobus WE, Flaherty JT : Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury : reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. Circulation (1987) **75**, 282—291.

18) Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR : Canine myocardial reperfusion injury : its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. Circ Res (1984) **54**, 277—285.

19) Werns SW, Shea MJ, Driscoll EM : The indepedent effects of oxygen radical scavengers on canine infarct size. Reduction by superoxide dismutase and not catalase. Circ Res (1985) **56**, 895—898.

20) Przyklenk K, Kloner RA : Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the "stunned mycardium." Circ Res (1986) **58**, 148—156.

21) Uraizee A, Reimer KA, Murry CE, Jennings RB : Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of iscehemia and 4 days of reperfusion in dogs. Circulation (1987) **75**, 1237—1248.

22) Gardner TJ, Stewart JR, Casele AS, Downey JW, Chambers DE : Reduction of myocardial ishemic injury with oxygen-derived free radical scavengers. Surgery (1983) **94**, 423—427.

23) Burton KP : Superoxide dismutase enhances recovery follwing myocardial ischemia. Am J Physiol (1985) **248**, 637—643.

24) Das DK, Engelman RM, Rousou JA, Breyer RH, Otani H, Lemeshow S : Pathophysiology of superoxide radicals as a potential mediator of reperfusion injury in pig heat. Basic Res Cardiol (1986) **81**, 155—166.

25) Otani H, Engelman RM, Rousou JA, Breyer RH, Lemeshow S, Das DK : Cardiac performance during reperfusion improved by pretreatment with oxygen free-radical scavengers. J Thorac Cardiovasc Surg (1986) **91**, 290—295.

26) Ytrehus K, Gunnes S, Myklebust R, Mjos OD : Protection by superoxide dismutase and catalase in the isolated rat heart reperfused after prolonged cardioplegia : A combined study of metabolic, functional, and morphometric ultrastructural variables. Cardiovasc Res (1987) **21**, 492—499.

27) Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB : arked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Circ Res (1989) **65**, 607—622.

28) Nejima J, Knight DR, Fallon JT, Uemura N, Manders WT, Canfield DR, Cohen MV, Vatner SF : Superoxide dismutase reduces reperfusion arrhymias but fails to salvage regionalfunction or myocardium at risk in conscious dogs. Circulation (1989) **79**, 143—153.

29) Guarnieri C, Flamignj F, Caldarera CM : Role of xygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. J Mol Cell Cardiol (1980) **12**, 797—808.

30) Gonate CE : Oxygen-induced Enzyme Release : Early Events and a Proposed Mechanism. J Mol Cell Cardiol (1979) **11**, 389—406.

31) Gaudue 1 Y, Dunelleroy MA : Role of oxygen radiac injury due to reoxygenation. J Mol Cell Cardiol (1984) **16**, 459—470.

32) Keller AM, Clncy RM, Barr ML, Marboe CC, Cannon PJ : Acute reoxygenation injury in the isolated rat heart : Role of resident cerdiac mast cells. Circ Res (1988) **63**, 1044—1052.

33) Mcord JM : Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med (1985) **312**, 150—163.

34) Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM :

Xanthine oxidase as a source of free raical damage in myocardial ischemia. J Mol Cell Cardiol (1985) **17**, 145—152.

35) Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR : Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in dog. Circulation (1983) **67**. 1016—1023.

36) Lucchesi BR : Leukocytes and ishemia-induced myocardial injury. Ann Rev Pharmacol Toxicol (1986) **26**, 201—224.

37) Breda MA, Drinkwater DC, Laks H, Bhuta S, Corno AF, Davtyan HG, Chang P : Zrevention of reperfusion injury in the neonatal heart with leukocyte-depleted blood. J Thorac Cardiovasc Surg (1989) **97**, 654—665.

38) Schmid-Schonbein GW : Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. Fed Proc (1987) **46**, 2937—2401.

39) McCord JM : Free Radicals and myocardial ischemia : Overview and Outlook. Free Radical Biol & Med (1988) **4**, 9 —14.

40) Hearse DJ, Stewart DA, Brainbridge MV : Cellular protection during myocardial ischemia. The development and characterization of a procedure for the induction of reversible ischemic arrest. Circulation (1976) **54**, 193—202.

41) Schaper J, Schaper W : Reperfusion of ischemic myocardium : Ultrantructural and histochemical aspects. J Am Coll Cardiol (1983) **1**, 1037—1046.

42) Ashraf M : Oxygen drived radicals related ineury in the heart during calcium paradox. Virchows Arch B Cell Pathol (1987) **54**, 27—37.

43) Herse DJ, Humphrey SM, Bullock GR : The oxygbn paradox and the calcium paradox : two facets of the same problem? J Mol Cell Cardiol (1978) **10**, 641—68.

44) Jennings RB, Reimer KA, Rill ML, MayerSE : Total ischemia in dog hearts in vitro : 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization and depletion, and of adenine nucleotide cataboilismin total ischemia in vitro vs severe ischemia in vivo. Circ Res (1981) **49**, 892—900.

The effects and optimal dose of recombinant human superoxide dismutase during cardiopulmonary bypass

Yukio YAMADA
Second Department of Surgery,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. S. Teramoto)

The efficacy of recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) was examined and its optimal dose when given before reperfusion in an experimental canine cardiopulmonary bypass (CPB) model was determined. Mongrel dogs were placed on total CPB for 130 minutes without aortic cross clamping (Group I). Others were placed on CPB for 120 minutes aortic cross clamping with intermittent administration of cardioplegic solution and core cooling (Group II). Before reperfusion, saline, and 1 mg, 3 mg, 10 mg and 20 mg h-SOD per kilogram were administered via the aortic root as a bolus injection (Group III, IV, V, VI, VII). Reperfusion after hypothermic global ischemia with aortic cross clamping deteriorated cardiac function (cardiac index, left ventricular maximum dp/dt), increased myocardial water content and increased cardiac enzyme release (creatinine kinase MB isozyme, α-hydroxybutyric dehydrogenase). Administration of 3 mg/kg h-SOD significantly ameliorated this reperfusion injury, protected myocardial function early after CPB and gave a desirable peak serum h-SOD concentration.