

Alberto Bindoli, Maria Pia Rigobello, Lucia Cavallini,
Mariagrazia Coassin, Fabio Di Lisa

*Centro Studio Fisiologia Mitocondriale del CNR, Istituto di Chimica Biologica,
Università degli Studi, Padova*

**Ruolo della trasformazione reversibile e irreversibile
della xantina deidrogenasi in xantina ossidasi
nel danno ischemico del cuore di ratto isolato e perfuso**

Estratto da:

CARDIOLOGIA

Organo Ufficiale della Società Italiana di Cardiologia

Vol 32 - N 1 - Gennaio 1987

**A CURA DELLA SEGRETERIA DELLA SOCIETA'
ROMA**

Ruolo della trasformazione reversibile e irreversibile della xantina deidrogenasi in xantina ossidasi nel danno ischemico del cuore di ratto isolato e perfuso

Alberto Bindoli, Maria Pia Rigobello, Lucia Cavallini, Mariagrazia Coassin, Fabio Di Lisa

Centro Studio Fisiologia Mitochondriale del CNR, Istituto di Chimica Biologica, Università degli Studi, Padova

THE ROLE OF REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE CONVERSION OF XANTHINE DEHYDROGENASE TO XANTHINE OXIDASE IN ISCHEMIC/REPERFUSION DAMAGE OF ISOLATED AND PERFUSED RAT HEART

Summary. Xanthine dehydrogenase, after its conversion to xanthine oxidase, is considered to be one of the main responsible of the damage to the ischemic/reperfused myocardium because of the production of superoxide anion and hydrogen peroxide. In this paper the extent of reversibility of the conversion xanthine dehydrogenase \rightarrow xanthine oxidase has been studied and the effect of the latter form(s) was correlated to the production of malondialdehyde and to the decrease of sulphhydryl groups.

After normoxic perfusion performed for times ranging from 15 minutes to 3 hours the amount of the oxidase form was around 20%, further divided in about 7% of irreversible xanthine oxidase and 13% of reversible xanthine oxidase. After 1 or 2 hours of ischemia the irreversible xanthine oxidase increases to about 15% of the total while during normoxic reperfusion only the reversible form increases, reaching values corresponding to the 20% of the total. Consequently after 2 hours of ischemia, followed by 1 hour of reperfusion, the total oxidase activity is about 35% of the total enzyme activity. Concomitantly, with the conversion xanthine dehydrogenase \rightarrow xanthine oxidase there is a decrease of the total sulphhydryl groups which is of about 10% after ischemia and of 30% when ischemia is followed by 1 hour of reperfusion. Malondialdehyde, measured with a procedure that improves the selectivity of the determination in tissue homogenates, slightly increases when 2 hours of ischemia are followed by 1 hour of reperfusion. From the reported data appears that the oxidative stress in isolated and perfused rat heart can be partly mediated by superoxide and hydrogen peroxide produced by the reversible and irreversible form of xanthine oxidase. Hydrogen peroxide, through a reaction mediated by glutathione peroxidase causes a depletion of glutathione and, secondarily, a decrease of protein sulphhydryl groups. The depletion of glutathione could result in a decrease of protection against lipoperoxidation determined by the continuous production of superoxide and hydrogen peroxide.

(CARDIOLOGIA 1987; 32 (1): 89-94)

Key words: Xanthine oxidase; Myocardial ischemia; Malondialdehyde; Sulphydryl groups.

Introduzione

Numerosi studi indicano i prodotti di riduzione dell'ossigeno e la conseguente lipoperossidazione come responsabili del danno ischemico del miocardio particolarmente durante la riperfusione normossica¹. Tra le possibili sorgenti di superossido ed acqua ossigenata viene incluso l'enzima xantina ossidasi². "In vivo" questo enzima è presente prevalentemente o esclusivamente come deidrogenasi e la sua funzione appare essere quella di catalizzare l'ossidazione di ipoxantina in xantina e di quest'ultima in acido urico riducendo parallelamente il NAD⁺ a NADH(H⁺). "In vitro" tuttavia la xantina deidrogenasi (XD) può essere trasfor-

mata, in opportune condizioni, in ossidasi (XO) vera e propria che utilizza l'ossigeno al posto del NAD⁺ trasformandolo in superossido (O₂⁻) e acqua ossigenata (H₂O₂). La conversione XD \rightarrow XO appare verificarsi in numerosi organi durante i periodi di ischemia, parallelamente ad un notevole aumento dei livelli di ipoxantina e xantina causati dal catabolismo dei nucleotidi adenilici; quindi l'introduzione di ossigeno con la riperfusione causa una forte produzione di forme ridotte di ossigeno (O₂⁻ e H₂O₂) capaci di causare danni di vario tipo alle strutture biologiche. La conversione XD \rightarrow XO può essere irreversibile o reversibile³; nel primo caso la trasformazione è, con ogni probabilità, causata da un attacco proteolitico, mentre nel secondo l'effetto è mediato dalla ossidazione dei gruppi sulfidrilici (SH). Nel presente lavoro, in cui è stato utilizzato un modello costituito da cuore di ratto isolato e perfuso, si è inteso valutare quantitativamente la conversione XD \rightarrow XO dopo periodi di ischemia di differente durata, seguiti o meno da riperfusione normossica. Il possibile danno cellulare prodotto dalla trasformazione XD \rightarrow XO è stato valutato in termini di diminuzione dei gruppi sulfi-

Lavoro presentato alla Riunione del Gruppo di Studio della Società Italiana di Cardiologia "Cardiologia Sperimentale", Gardone Riviera, 16-18 Aprile 1986.

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott Alberto Bindoli

Istituto di Chimica Biologica

Via F. Marzolo, 3 - 35137 Padova

drilici totali e di aumento di formazione di malondialdeide (MDA), indice di fenomeni lipoperossidativi.

Materiali e metodi

I cuori di ratto sono stati perfusi a 37°C con la tecnica di Langendorff⁴ utilizzando un medium costituito da NaCl 0.115 M, NaHCO₃ 0.025 M, KCl 0.004 M, KH₂PO₄ 2.0 mM, MgSO₄ 1.1 mM, CaCl₂ 1.5 mM e glucosio 11 mM a pH 7.4 e aerato con una miscela formata da 95% O₂ e 5% CO₂. Il flusso in condizioni normossiche e di riperfusione era di 12 ml/min, nell'ischemia a basso flusso veniva ridotto a 0.4 ml/min ed infine nell'ischemia globale veniva completamente bloccato. Alla fine della perfusione il cuore veniva staccato e omogenizzato con Polytron in 10 ml di tampone formato da Tris 0.1 M, EDTA 1 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) 1 mM a pH 8.1. Una frazione dell'omogenato (1 ml) è stata utilizzata per la determinazione dei gruppi sulfidrilici totali e della malondialdeide mentre i rimanenti 9 ml sono stati centrifugati a 27.000 × g per 20 minuti dopodiché il soprannatante viene eluito su Sephadex G-50. La frazione così ottenuta viene utilizzata per le determinazioni enzimatiche della "xantina ossidasi", seguendo la formazione di acido urico a 295 nm ($\epsilon_M = 9.600$) e a 37°C in un medium costituito da tampone fosfato 0.1 M, pH 7.8, xantina 80 μ M e, quando presenti, NAD⁺ 0.3 mM e DTE 10 mM. In presenza di NAD⁺ si misura l'attività totale dell'enzima (XD + XO totale) mentre in assenza di NAD⁺ si misura l'attività xantina ossidasica totale (XO reversibile + XO irreversibile); l'attività XO irreversibile si determina in assenza di NAD⁺ dopo aver preincubato la preparazione enzimatica in 10 mM DTE per 15 minuti a 37°C.

I gruppi SH totali sono stati misurati su campioni di omogenato (0.08-0.15 mg di proteine) con l'acido ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) in un medium costituito da Tris/HCl 0.2 M (pH 8.1) EDTA 5 mM e 0.8% sodiododecilsolfato (SDS). Dopo l'aggiunta di DTNB 1 mM si segue l'aumento di densità ottica a 412 nm ($\epsilon_M = 13.600$) fino a lettura costante (circa 5 min); i valori di densità ottica (DO) ottenuti sono stati corretti sottraendo le rispettive determinazioni ottenute prima dell'aggiunta del DTNB. La misura della MDA mediante reazione con l'acido tiobarbiturico (TBA) è un saggio largamente usato per la sua semplicità, tuttavia quando si cerca di misurare piccole variazioni, particolarmente in omogenati, vi possono essere numerose interferenze da parte di altre sostanze (glucosio, acido sialico, etc) che rendono il saggio poco affidabile. È stato adottato quindi un metodo modificato in cui le frazioni di omogenato vengono trattate con aci-

do fosfotungstico che precipita i lipidi assieme alle proteine; viene così eliminata gran parte delle sostanze interferenti. La determinazione è basata sul metodo di Yagi⁵ comunemente impiegato per la determinazione della MDA plasmatica. Aliquote di 0.3-0.6 mg di omogenato (2-4 mg di proteine) sono state trattate con 3 ml di H₂SO₄ 0.1 N e successivamente con 0.5 ml di acido fosfotungstico al 10%. Si centrifuga a 2500 × g per 10 minuti e il pellet, dopo essere stato smosso, viene trattato come in precedenza. Dopo analogha centrifugazione, il pellet viene risospeso in 3 ml di acqua distillata a cui viene aggiunto 1 ml di TBA 0.67% (in 50% acido acetico glaciale) e idrossitoluene butilato (BHT) alla concentrazione finale di 0.01%. La miscela viene quindi posta a reagire per 1 ora a 95°C e successivamente è raffreddata e centrifugata a 2500 × g per 10 min. L'assorbimento dell'addotto formatosi tra la MDA e il TBA viene quindi letto a 532 nm e la quantità di MDA si determina dopo sottrazione dell'assorbimento aspecifico misurato a 580 nm utilizzando un $\epsilon_M = 156.000$. In figura 1 vengono riportati gli spettri di assorbimento di uno standard di MDA (a) e di 3 campioni ottenuti da un omogenato di cuore trattato secondo le tecniche tradizionali di determinazione della MDA: in presenza di acido tricloroacetico (c), in presenza di acido acetico (d) entrambi senza precipitazione delle lipoproteine e infine con il metodo descritto (b).

La proteine dell'omogenato sono state determinate con il metodo di Gornall⁶, mentre quelle della preparazione enzimatica con il metodo di Lowry⁷.

Risultati

In tabella I vengono riportati i risultati concernenti le determinazioni di XD e XO totale, quest'ultima ulteriormente distinta in XO reversibile e XO irreversibile. Innanzitutto si può osservare che la perfusione normossica condotta per periodi variabili dai 15 minuti alle 3 ore e 15 minuti non modifica il rapporto XD/XO totale poiché la XD si mantiene attorno a valori dell'80% e la xantina ossidasi totale (20%) è ripartibile in un 13% di forma reversibile ed in un 7% di forma irreversibile. Dopo un periodo di ischemia globale di 1 o 2 ore si osserva una consistente diminuzione della attività della xantina deidrogenasi che si accentua qualora l'ischemia sia seguita da un periodo di riperfusione normossica.

L'aumento di attività xantina ossidasica, corrispondente alla diminuzione di attività xantina deidrogenasica è a carico prevalentemente della forma irreversibile durante l'ischemia (15%) e della forma reversibile durante la riperfusione (20%). Conseguente che, dopo 2 ore

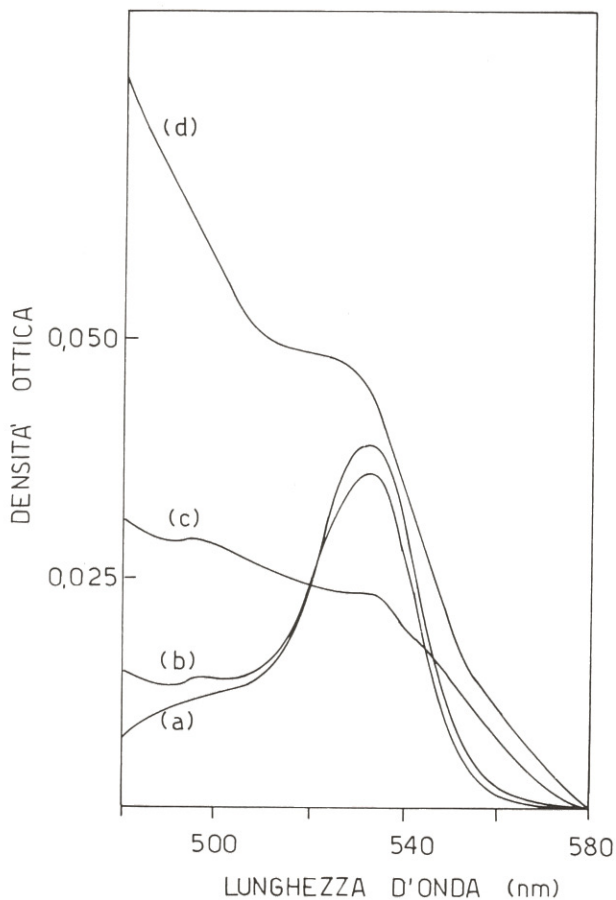


Figura 1. - Spettri di assorbimento dei prodotti di reazione di omogenati di cuore con l'acido tiobarbiturico in differenti condizioni sperimentali. Standard di MDA (a). Incubazione per 1 ora a 95°C di un omogenato preliminarmente precipitato con H₂SO₄/acido fosforungstico e successivamente trattato con acido acetico (procedura riportata in esteso nei Materiali e metodi) (b). Incubazione condotta per 15 min a 95°C di un omogenato direttamente trattato con TBA in acido tricloroacetico al 12% (c). Incubazione condotta per 1 ora a 95°C di un omogenato direttamente trattato con TBA in acido acetico (d).

di ischemia seguite da 1 ora di riperfusione, l'attività ossidasica totale raggiunge il 35%. Risultati simili si ottengono qualora invece di un'ischemia globale venga condotta un'ischemia a basso flusso (0.4 ml/min).

In tabella II vengono riportati i risultati relativi alla formazione di MDA e alla diminuzione dei gruppi sulfidrilici totali ottenuti nelle stesse condizioni sperimentali in cui è stata misurata l'attività XD→XO. La MDA, misurata con un metodo modificato (descritto nella sezione Materiali e metodi) che consente l'eliminazione di gran parte delle sostanze interferenti, presenta nei controlli (perfusi normossiche variabili da 15 minuti a 3 ore e 15 minuti) un valore medio aggirante-

si sulle 0.25 nmoli/mg di proteina. Si osserva un debole aumento nella formazione di MDA dopo 2 ore di ischemia globale o a basso flusso e soprattutto quando le 2 ore di ischemia globale sono seguite da un'ora di riperfusione normossica. A fronte del debole aumento di MDA che si osserva nelle condizioni più drastiche di perfusione, fa riscontro una marcata diminuzione dei gruppi sulfidrilici totali particolarmente dopo il periodo di riperfusione normossica. Parallelamente alla diminuzione dei gruppi SH si è osservata una forte diminuzione (circa il 90%) del glutatione cellulare totale (risultati non riportati). L'enzima xantina ossidasi formatosi per conversione dalla deidrogenasi viene ad essere una delle sorgenti delle forme ridotte di ossigeno che si attivano durante il periodo ischemico; si è voluto quindi vedere se l'anione superossido, uno dei prodotti formati dalla XO è sufficientemente rimosso dalla superossido dismutasi (SOD) endogena presente dopo ischemia e riperfusione. Come si può vedere in figura 2a, l'aggiunta di xantina ad un medium contenente xantina ossidasi del latte (in cui non è presente xantina deidrogenasi) determina una veloce riduzione del citocromo c che tuttavia è completamente inibita o dall'aggiunta di SOD commerciale oppure da aliquote di soprannatante ottenuto da omogenati di cuori resi ischemici per 2 ore e riperfusi per 1 ora. Analogamente (Fig 2b), se lo stesso soprannatante viene trattato con xantina non si nota nessuna riduzione del citocromo c nonostante la presenza di circa 2,5 mU di xantina ossidasi, indice questo che la SOD presente (dopo ischemia e riperfusione) è in grado di dismutare completamente l'anione superossido prodotto; quando si aggiunge KCN, un inibitore della SOD citoplasmatica, si nota una riduzione del citocromo c la cui velocità aumenta ulteriormente dopo aggiunta di xantina ossidasi del latte.

Discussione

Dai dati riportati emerge che già nel cuore normale è presente una quota di xantina ossidasi prevalentemente in forma reversibile. Durante il periodo di ischemia si ha una trasformazione della XD in XO irreversibile, fenomeno che presuppone l'attivazione di una qualche attività proteasica durante la fase ischemica, probabilmente mediata da un aumento della concentrazione citosolica di ioni calcio; durante la riperfusione invece appare prevalere la conversione XD→XO reversibile. Dal momento che la forma reversibile della xantina ossidasi è caratterizzata dalla ossidazione di alcuni gruppi tiolici nei corrispondenti disolfuri (infatti il DTE è in grado di ripristinare l'enzima nella sua forma nativa), è presumibile che le specie ridotte di ossigeno, che si formano durante la riperfusione, siano in grado di

Tabella I. - Determinazione dell'attività di xantina deidrogenasi (XD), xantina ossidasi totale (XO tot), xantina ossidasi reversibile (XO rev) e xantina ossidasi irreversibile (XO irrev) in cuore di ratto isolato e perfuso. Le attività enzimatiche sono state misurate come descritto nella sezione Materiali e metodi. I valori sono espressi come % dell'attività totale (XD + XO totale) che variano attorno a valori di 5-10 nanomoli di acido urico prodotto per min per mg proteina. Vengono riportati i valori medi \pm la deviazione standard e le cifre in parentesi indicano il numero di esperimenti.

	% XD	% XO totale	% XO reversibile	% XO irreversibile
Perfusione normossica				
15 min	80 \pm 2(4)	20 \pm 2(4)	13 \pm 4(4)	7 \pm 6(4)
1 ora 15 min	81 \pm 3(3)	19 \pm 3(3)	11 \pm 4(3)	8 \pm 5(3)
2 ore 15 min	80 \pm 2(3)	20 \pm 3(3)	15 \pm 5(3)	5 \pm 4(3)
3 ore 15 min	82 \pm 3(3)	18 \pm 3(3)	11 \pm 4(3)	7 \pm 4(3)
Ischemia globale				
1 ora	69 \pm 4(3)	31 \pm 4(3)	16 \pm 2(3)	15 \pm 4(3)
2 ore	70 \pm 2(4)	30 \pm 2(4)	17 \pm 4(3)	13 \pm 5(3)
Ischemia globale				
1 ora + 1 ora riperfusione	65 \pm 4(4)	35 \pm 4(4)	21 \pm 5(4)	14 \pm 4(4)
2 ore + 1 ora riperfusione	66 \pm 4(3)	34 \pm 2(3)	21 \pm 4(3)	13 \pm 5(3)
Ischemia a basso flusso				
1 ora	69 \pm 3(5)	31 \pm 3(5)	14 \pm 3(3)	16 \pm 6(4)
1 ora + 1 ora riperfusione	71 \pm 2(3)	29 \pm 2(3)	16 \pm 2(3)	13 \pm 2(3)

Tabella II. - Formazione di malondialdeide e diminuzione dei gruppi sulfidrilici totali in cuore di ratto isolato e perfuso in differenti condizioni. La malondialdeide e i gruppi SH sono stati determinati come descritto nella sezione Materiali e metodi. I valori sono espressi in nanomoli/mg di proteina di omogenato e ciascuno di essi rappresenta la media dei valori ottenuti in almeno 3 esperimenti \pm la deviazione standard.

	Malondialdeide (nmoli/mg proteine)	Gruppi SH totali (nmoli/mg proteine)
Perfusione normossica		
15 min	0.25 \pm 0.02(3)	122 \pm 5(3)
1 ora 15 min	0.24 \pm 0.03(3)	126 \pm 4(3)
2 ore 15 min	0.21 \pm 0.01(3)	120 \pm 6(3)
3 ore 15 min	0.28 \pm 0.02(3)	125 \pm 3(3)
Ischemia globale		
1 ora	0.24 \pm 0.02(3)	110 \pm 4(3)
2 ore	0.30 \pm 0.04(3)	109 \pm 4(3)
Ischemia globale		
1 ora + 1 ora riperfusione	0.22 \pm 0.01(3)	88 \pm 9(3)
2 ore + 1 ora riperfusione	0.34 \pm 0.03(3)	85 \pm 3(3)
Ischemia a basso flusso		
1 ora	0.24 \pm 0.02(3)	114 \pm 7(3)
2 ore	0.30 \pm 0.03(3)	118 \pm 7(3)
Ischemia a basso flusso		
1 ora + 1 ora riperfusione	0.24 \pm 0.02(3)	101 \pm 5(3)
2 ore + 1 ora riperfusione	0.29 \pm 0.03(3)	82 \pm 6(3)

ossidare i gruppi SH dell'enzima o direttamente o indirettamente tramite il glutatione ossidato (GSSG) che si accumula in seguito alla continua produzione di H_2O_2 ; quest'ultima infatti, tramite l'enzima glutatione perossidasi, ossida il glutatione ridotto (GSH) a GSSG. La ossidazione a disolfuro dei gruppi sulfidrilici della XO reversibile sembra un caso particolare di un fenomeno generalizzato che si verifica durante la riperfusione; è infatti proprio quest'ultima condizione che determina una marcata diminuzione dei gruppi

SH totali (di circa il 30%) riguardante sia gli SH proteici che il glutatione. Da risultati non riportati si è infatti osservato che il glutatione totale cardiaco si riduce a circa il 10% della quota presente inizialmente dopo 2 ore di ischemia seguite da 1 ora di riperfusione.

Uno dei principali agenti responsabili del danno ossidativo che si manifesta durante la riperfusione appare essere l'acqua ossigenata prodotta, almeno in parte, sia dalla xantina ossidasi naturalmente presente nel tessuto miocardico, che dalla XO irreversibile formatasi

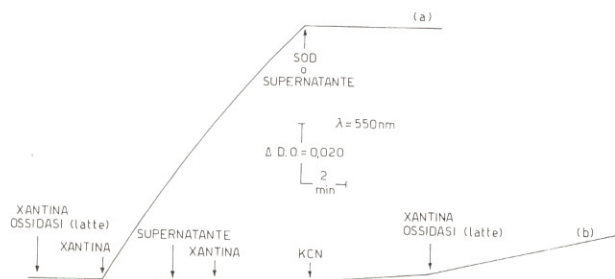


Figura 2. - Produzione di superossido da parte della xantina ossidasi e protezione da superossido dismutasi. La formazione di superossido prodotto dalla xantina ossidasi ottenuta dal latte e da quella formata nel cuore ischemico e ripperfuso è stata seguita spettrofotometricamente come riduzione del citocromo c ($13 \mu\text{M}$) a 550 nm , ($\epsilon_M = 28.000$) in un medium costituito da tampone fosfato 0.1 M , $\text{pH } 7.8$ contenente EDTA 1 mM . Il supernatante aggiunto (0.5 ml corrispondenti a 0.4 mg di proteine) era ottenuto da cuore reso ischemico per 2 ore e quindi ripperfuso per 1 ora e trattato come descritto nei Materiali e metodi. La concentrazione di XO di latte è di 20 mg/ml mentre le concentrazioni di xantina e KCN sono rispettivamente $80 \mu\text{M}$ e 4 mM .

durante l'ischemia. La produzione di specie ridotte di ossigeno da parte della XO che avviene durante la ripperfusione normossica, è favorita dall'accumulo di ipoxantina che si verifica durante il periodo di ischemia a causa della degradazione delle basi puriniche⁸. L'anione superossido, un'altra delle forme ridotte di ossigeno prodotte dalla XO, viene completamente rimosso dalla SOD endogena; bisogna infatti tener presente che la XO a $\text{pH } 7$ (e presumibilmente anche a pH inferiori) produce prevalentemente H_2O_2 ⁹. La produzione di quest'ultima determina, tramite la glutazione perossidasi, una ossidazione del glutatione che a sua volta si riflette sullo stato ossidoriduttivo degli SH proteici. La diminuzione del rapporto GSH/GSSG si verifica qualora non vi sia un immediato ripristino di NADPH che agisce come substrato della glutazione reductasi. Il NADPH viene mantenuto nella sua forma ridotta dalla glucosio-6-fosfato deidrogenasi che è noto essere poco attiva nel muscolo cardiaco¹⁰. L'acqua ossigenata che si accumula quando il glutatione ridotto non è più disponibile per rimuoverla, interagendo con ioni ferrosi o con la mioglobina può dar luogo alla formazione di specie attivate dell'ossigeno o di radicali liberi capaci sia di inattivare enzimi che di innescare il processo di perossidazione lipidica, di cui la formazione di MDA ne è l'espressione diretta.

La formazione di MDA non mostra nessuna variazione dopo 1 ora di ischemia globale seguita da ripperfusione. La debole formazione di MDA, conseguente a condizioni piuttosto drastiche di ischemia/riperfusione, indica che la perossidazione lipidica potrebbe esse-

re un fenomeno che comincia a verificarsi dopo che si è avuta una forte perdita di GSH endogeno, per cui la cellula non è più in grado di eliminare l'acqua ossigenata continuamente prodotta.

Numerose ricerche indicano un effetto protettivo da parte di antiossidanti, SOD, catalasi e GSH in cuori di ratto resi ischemici e ripperfusi^{1, 11, 12}. Nel presente lavoro si dimostra che una quota di xantina deidrogenasi si trasforma in xantina ossidasi di tipo reversibile per cui si può ritenere che l'intervento con sostanze tioliche durante la ripperfusione normossica, mediante la riduzione del GSSG e dei disolfuri proteici, tra cui la riconversione della XO a XD, possa contenere la produzione di forme ridotte di ossigeno limitando quindi il potenziale danno del miocardio.

Riassunto

L'enzima che converte ipoxantina in xantina e xantina in acido urico ("xantina ossidasi") è presente in vivo prevalentemente come deidrogenasi; si ritiene tuttavia che, durante l'ischemia, questo enzima si trasformi in xantina ossidasi vera e propria, che, utilizzando l'ossigeno al posto del NAD^+ e trasformandolo in superossido e acqua ossigenata, costituisce uno dei principali responsabili del danno ischemico del miocardio. Nel presente lavoro è stata studiata la reversibilità o meno della trasformazione xantina deidrogenasi → xantina ossidasi e si è cercato di collegare gli effetti dei prodotti di riduzione dell'ossigeno con la formazione di malondialdeide e la diminuzione dei gruppi sulfidrilici totali.

La misura diretta dell'attività delle varie forme di xantina ossidasi dimostra che, dopo periodi di perfusione normossica di diversa durata (da 15 min a 3 ore e 15 min), la xantina deidrogenasi è presente per l'80% del totale, mentre il rimanente 20% di xantina ossidasi è ulteriormente ripartita in un 13% di forma reversibile e in un 7% di forma irreversibile. Dopo 1 ora o 2 ore di ischemia si ha un aumento della xantina ossidasi irreversibile che si porta a valori del 15% del totale, mentre durante la ripperfusione normossica aumenta solo la forma reversibile che raggiunge valori corrispondenti al 20% del totale; quindi dopo 2 ore di ischemia seguite da 1 ora di ripperfusione la xantina ossidasi totale è presente per circa il 35%. La conversione xantina deidrogenasi → xantina ossidasi è accompagnata da una diminuzione dei gruppi sulfidrilici totali che è di circa il 10% dopo ischemia ma che appare molto più marcata (30%) se all'ischemia segue un periodo di ripperfusione. La diminuzione di gruppi SH totali è accompagnata da una forte diminuzione del glutatione totale. La formazione di malondialdeide, espressione di una avvenuta perossidazione degli acidi grassi poliinsaturi, è piuttosto contenuta rispetto ai valori di controllo (0.25 nanomoli/mg di proteina) ed aumenta leggermente (0.35 nanomoli/mg proteina) solo dopo un'ischemia protratta per 2 ore e seguita da 1 ora di ripperfusione.

I risultati riportati indicano che la xantina ossidasi, almeno nel cuore di ratto, è da annoverare tra le sorgenti di forme ridotte di ossigeno nel cuore reso ischemico e successivamente ripperfuso. In particolare l'acqua ossigenata determina una ossidazione del glutatione che causa a sua volta una diminuzione dei gruppi sulfidrilici proteici. L'acqua ossigenata che si accumula a causa della mancanza di glutatione ridotto, interagendo con ioni ferrosi o con la mioglobina, può dar luogo alla formazione di specie attivate o di radicali liberi che esercitano la loro azione tossica inattivando enzimi o innescando il processo di perossidazione lipidica.

Parole chiave: Xantina ossidasi; Ischemia cardiaca; Malondialdeide; Gruppi sulfidrilici.

Bibliografia

1. Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov YP, Belkina LM, Arkhipenko YV: The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. *Basic Res Cardiol* 1982; 77: 465-485.
2. Mc Cord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med* 1985; 312: 159-163.
3. Stirpe F, Della Corte E: The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). *J Biol Chem* 1969; 244: 3855-3863.
4. Langendorff O: Untersuchungen am uber legenden sauge thiertzen. *Pflugers Arch* 1985; 61: 291-304.
5. Yagi K: Lipid peroxidation. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymology* 1984; 105: 328-331.
6. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; 177: 751-766.
7. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-293.
8. Manfredi JP, Holmes EW: Purine salvage pathways in myocardium. *Ann Rev Physiol* 1985; 47: 691-705.
9. Fridovich I: Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1970; 245: 4053-4057.
10. Zimmer HG, Ibel H, Suchner U, Schad H: Ribose intervention in the cardiac pentose phosphate pathway is not species-specific. *Science* 1984; 223: 712-714.
11. Guarnieri C, Ferrari R, Visioli O, Caldarera CM, Nayler WG: Effect of α -tocopherol on hypoxic-perfused and reoxygenated rabbit heart muscle. *J Mol Cell Card* 1978; 10: 893-906.
12. Gaudel Y, Duvelleroy MA: Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation. *J Mol Cell Card* 1984; 16: 459-470.

