

## 중이 저류액의 발생기전에서의 활성산소와 항산화계의 역할

계명대학교 의과대학 이비인후과학교실

김덕준 · 남성일

### Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in the Pathogenesis of Otitis Media with Effusion

Deok Jun Kim, M.D., Sung Il Nam, M.D.

*Department of Otolaryngology, Keimyung University School of Medicine,  
Daegu, Korea*

**Abstract :** Reactive Oxygen Species (ROS) are oxygen free radicals and oxygen derivatives that are very unstable and highly chemically reactive due to the presence of a single unpaired electron at the outer most orbit of the oxygen. Despite reports on the significance of ROS and antioxidant enzymes in otitis media, a comprehensive study on the use of total antioxidant status (TAS) in an animal model of otitis media with effusion (OME) has not been reported. Evidence of free radical-induced cellular injury may be gleaned from an assay of by-products, such as malondialdehyde (MDA), as the half-lives of free radicals are extremely brief. In this study, animals were randomly divided into 3 groups: OME (O), Allopurinol (A), and control (C). The O group contained Eustachian tube obstruction (ETO) only. The A group contained ETO and intraperitoneal injection of allopurinol. The C group contained unoperated middle ear disease-free animals. The mean level of MDA, activities of xanthine oxidase (XO), catalase (CAT), and TAS were evaluated by biochemical assays of middle ear mucosa in experimental OME. Expression of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) was evaluated by semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction. Effect of allopurinol, an inhibitor of XO, was also evaluated. The values of MDA, XO, SOD, and GSH-Px exhibited a similar pattern across groups, and were highest in O, and lowest in A. The value of GSH-Px in A did not decrease more than C. However, the values of CAT and TAS exhibited a different pattern across

groups, and were highest in C, but not significantly different in O and A. These results suggest 1) oxidative stress status (OSS) plays a role in the pathogenesis of OME 2) Allopurinol can reduce ROS production and oxidative tissue damage in OME 3) CAT and TAS may be predisposing factors in the pathogenesis of OME. Further study is needed to determine the molecular mechanism of ROS in OME.

**Key Words :** antioxidant system, Otitis media, Reactive oxygen species

## 서론

활성 산소(Reactive oxygen species, ROS)는 산소분자의 최외각에 쌍을 이루고 있지 않은 전자(free radical)를 가지기 때문에 화학적으로 매우 반응성이 높고 불안정하며 세포 독성도 가지고 있는 물질로 신체내의 정상적인 신진대사 과정을 통해 끊임없이 생성되는 산소 유도체이다. 호기성 유기체(Aerobic organism)는 산소를 환원하여 에너지를 얻는데 ROS의 작용에 의한 손상에 민감하다. ROS는 유산소 대사과정에서 불가피하게 생성되며 특히 미토콘드리아의 전자이동계에 의한 산소 환원시에 생성된다[1]. 그러나 인체에서는 활성산소를 해독시키는 항산화계를 지니고 있기 때문에 소량의 활성산소는 보통 별 문제를 일으키지 않지만[2] Radical 생성계와 radical 제거계의 불균형으로 생성된 활성산소는 산화 손상(oxidative stress status, OSS)을 일으키며 이는 많은 질병과 관련이 있다. 몇몇 연구자들은 중이염에서 활성산소에 의한 세포손상의 중요성에 대해 보고해 왔다[3]. 그러나 전항산화상태(Total antioxidant status, TAS)를 포함한 삼출성중이염(Otitis media with effusion, OME)에 대한 포괄적인 연구는 아직 보고되지 않았다. Free radical의 반감기는 극히 짧고 생체조직에서의 농도가 아주 낮기 때문에 생체에서 free radical의 생성을 직접 정량하기는 어렵다. Free radical에 의한 세포손상은 Malondialdehyde (MDA)같은 free radical의 부산물을 조사함으로써 알 수 있다. 저자들은 실험적 OME 모델의 중이점막에서 생화학적 분석을 통해 MDA level, xanthine oxidase (XO), catalase (CAT), total antioxidant status (TAS)를 측정

하였고, Superoxide dismutase (SOD)와 glutathione peroxidase (GSH-Px)는 반정량적 역전사중합효소연쇄반응(semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction)으로 측정하였다. 이 실험에서 저자들은 다음의 3가지 질문에 대답하고자 노력하였다. 1) 활성 산소와 항산화계의 불균형 또는 OSS(oxidant stress status)가 OME의 발생기전에 역할을 담당 하는가? 2) XO의 억제제인 allopurinol이 OME에서 OSS를 감소시킬 수 있는가? 3) OME에서 OSS를 유도 또는 억제하는 주요 항산화효소는 무엇인가?

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 검체

118마리의 SPF Sprague-Dawley rats (280-300 g, any sex)는 현미경으로 귀 질환을 검사 받았다. 4일간의 관찰 후 실험동물은 Entoba (pentobarbital 1 cc/kg)를 복강내 주사로 마취를 하였고 아래와 같은 방법으로 이관을 인위적으로 막아 삼출성 중이염(OME)을 유발시켰다. 눕힌 자세에서 이관의 인두개구부를 전기소작술하는 동안 기도를 유지시키고 구인두와 비인두를 노출시킬 수 있게 특수 제작된 mouth gag를 실험동물의 입에 설치했다. Pterygoid plate의 바로 뒤쪽에 위치한 전기소작술 부위를 확인하기 위해 microscope을 사용하였다. 실험동물이 움직여 이관 근처의 주요 혈관이 손상되는 것을 막기 위해 시술하는 동안 마취를 깊게 유지하였다. 술중에 흡인기를 사용하였

고 술 후 분비물과 전기소작술시 발생한 연기로 인해 생길 수 있는 질식을 방지하기 위해 머리부위를 낮은 자세를 취하였다. 이 연구에서는 적어도 하나 이상의 OME 징후(retraction of TM, air bubble, air fluid level)을 보이는 동물만을 실험하였다. 118마리중 9마리는 불충분한 점막으로 제외되었고, 5마리는 술후 관찰기간 동안의 사망으로, 4마리는 급성중이염이 나타나서 제외하였다.

## 2. Grouping

실험동물은 무작위로 3 group으로 나뉘었다(Fig. 1). 정상군은 45마리의 이상이 없는 rats로 구성되었고(C group). OME를 유발하기 위해 27마리의 양측 ET에 전기소작술을 시행하였다(O group). 나머지 28마리에는 ET obstruction에 더불어 전기소작 순간과 전기소작 4일후 두 번에 걸쳐, 유리산소기 형성을 차단하는 작용을 가진 allopurinol (30 mg)을 intraperitoneal injection 시행하였다(A group). 각 group은 전기소작술 시행 2,4,7일째 전신 마취하에 고막검사를 시행하였다. 마지막으로 모든 실험동물을 barbiturate overdose (Entobar 100 mg/kg, IP)를 사용해서 전기소작 시행 7일째(O,A group), 시행 11일째(C group)에 희생시켜 실험에 사용하였다.

## 3. 화학 약품

Allopurinol, xanthine sodium salt, tris (hydroxymethyl) aminomethane, reduced glutathione, glutathione reductase, dimethylsulfoxide, NADH, NADPH, thiobarbituric acid, dytochrome c, catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, trichloroacetic acid, uric acid and bovine albumin은 Sigma (USA) 제품이었고, 다른 모든 화학약품은 상업적으로 높은 순수성이 인정되는 제품이었다.

## 4.점막 조직 추출

실험동물은 빠른 시간내에 해부되었고 bullae는 모아서 heavy scissors로 조각내었다. Dissecting microscope으로 보면서 중이로부터 점막을 forceps로 벗겨내었다. Mucosa specimen은 dissection직후 액체 질소로 즉시 냉동하여 사용할 때 까지 영하 70도에 보관하였다. MDA, XO, CAT, TAS의 biochemical analysis를 위해 mucosa를 녹인후 0.1 M의 300  $\mu$ L TRIS-buffered saline (TBS), 0.15 M sodium chloride with 0.1% Triton-X, 0.005% deoxycholate에 놓았다. Specimen은 기계적, 초음파적으로 균질화시키고, 5분동안 3000 g에서 원심분리 하였다. 다시 이 상층액을 채집하여 분석하였다. 단백 침전은 method of smith 등의 방법[4]으로 bovine serum albumin protein assay (Pierce, Rockford, III)를 사용하여 비색정량적으로 측정하였다.

## 5. MDA 측정

각 시료의 MDA의 양은 thiobarbituric acid (TBA) assay로 측정하였으며 이는 MDA와 TBA가 반응하여 535 nm에서 최대 흡광력을 보이는 red species를 나타내는 원리에 기초하였다. 각 시료들을 0.375% TBA, 0.25N hydrochloric acid, 및 15% trichloroacetic acid로 구성된 TBA reagent와 섞었다. 반응 혼합물을 15분 동안 boiling water bath에 넣어둔 후 5분동안 3000 g에서 원심분리하고 상층액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 농도는 흡광계수  $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 를 사용하여 계산하였다.

## 6. XO 측정

XO activity는 xanthine을 기질로 한 Rowe와 Wyngaarden method[5]에 따라 분광광도계(DU 650, Beckman)로 측정하였다. XO activity는 1분당 단백 1 mg당 형성된 uric acid의 양으로 표현하였다.

## 7. CAT 측정

Catalase activity는 method of Nilson and Kiesow(1972) [6]에 따라 hydrogen peroxide을 기질로 이용하여 분석하였고, hydrogen peroxide degradation의 양은 240 nm에서 분광광도계로 측정하였다.

## 8. TAS 측정

중이 점막 현탁액의 전체 항산화 상태는 2,2-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate (ABTS, Randox Lab. UK)를 기질로 사용하였고 milligram당 micromodel로 표현하였다. 실험의 원리는 ABTS와 peroxidase (metamyoglobin), hydrogen peroxidase의 반응에 의해 생성되는 radical cation (ABTS)이 600 nm에 검출되는 것이며, 검체의 antioxidant는 이 농도에 비례하여 위 반응을 억제하였다.

## 9. Protein 측정

Lowry method[7]는 각 검체의 전체 단백 농도를 계산하는데 이용된다. Spectrophotometric assay kit (Sigma diagnostic)을 사용하면 기준농도와 물질의 흡광도 nm의 그래프 좌표로 단백 농도를 알 수 있다.

## 10. Semiquantitative RT-PCR에 의한 SOD와 GSH-PR 유전자 발현

### 1) mRNA 분리

LiCl buffer [100 mM Tris-HCl (pH8.0), 500 mM]를 사용하여 specimen을 균질화 한 후 First-strand cDNA를 합성하여 PCR을 시행하였다. PCR에 의해 증폭된 산물을 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 SOD, GSH-Px, GAPDH bands를 절단하여, 1 mL QX1 solution (Qiagen)에 분리 용해한 후 10 mL scintillation 용액에 혼합하여 1분간 liquid scintillation counter

(Packard 1600CA, USA)에서 측정하였다. 그리고 각 실험군에서 SOD/ GAPDH와 GSH/ GAPDH의 비율을로 계산하였다.

저자들은 gel documentation system을 사용하여 SOD/GAPDH와 비교하여 각 substance (SOD, GSH-Px)의 유전자 발현을 정량하였다.

## 11. 통계처리

각 실험군의 평균값의 표준 편차를  $\text{mean} \pm \text{SD}$ 로 기술하였으며, 통계학적 평가는 Student's t test을 사용하였다.

## 결 과

중이 mucosa specimen의 양이 각각의 물질을 검사하기에 불충분하여 6개의 specimen을 각 subgroup으로 하여 측정하였으며 같은 subgroup으로 여러가지 검사를 했기 때문에 각 실험군의 subgroup의 전체 수는 각 subgroup의 합보다 많았다. 이 연구의 결과는 Table 1에 요약하였다. MDA값은 N,O군과 A군에서 각각 55.62, 81.88, 40.09 nmol/g였다(Fig. 1). XO값은 N,O군과 A군에서 각각 1.93, 3.03, 1.04 nmol/g였다(Fig. 2). SOD값은 N,O군과 A군에서 각각 3.64, 4.38, 2.98 nmol/g였다(Fig. 3). 그리고 GSH-Px값은 N,O군과 A군에서 각각 0.65, 1.07, 0.98 nmol/g였다(Fig. 4). Catalase activity값은 N,O군과 A군에서 각각 8.15, 3.31, 3.39 nmol/g였다( $p < 0.05$ ) (Fig. 5). TAS 값은 N,O군과 A군에서 각각 1.22, 0.44, 0.44 nmol/g였다(Fig. 6). O군 수치는 CAT와 TAS를 제외하고는 정상군보다 높은 값을 보였다.(Fig. 5,6). A 군은 GSH-Px에서만 정상군보다 높은 값을 보였고 나머지는 정상군보다 낮은 값을 보였다. 449쌍의 base pair band가 RT-PCR of SOD의 RT-PCR후에 모든 subgroup(각 group중 3개의 subgroup)에서 발현되었다(Fig. 3A). 각 실험군에서의 SOD의 gene expression을 반정량하였다(Fig. 3B). GSH-Px 489 base pair bands

**Table 1.** MDA,XO,SOD/GAPDH,GSH-Px/GAPDH,CAT,TAS from middle ear mucosa of otitis media with effusion among noraml, OME and allopurinol group

Substances	Normal group (n=45)	OME group (n=27)	Allopurinol group (n=28)	Unit
Malonedialdehyde (MDA)	55.62 ± 33.54 (n=18)	81.88 ± 37.83 (n=15)	40.09 ± 23.76 (n=13)	nmol/g tissue
Xanthine Oxidase (XO)	1.93 ± 0.98 (n=3 subgr.*)	3.03 ± 1.56 (n=3 subgr.*)	1.04 ± 0.54 (n=2 subgr.*)	nmol/mg protein/min
SOD/GAPDH	3.64 ± 1.92 (n=3 subgr.*)	4.38 ± 1.48 (n=3 subgr.*)	2.98 ± 0.58 (n=3 subgr.*)	Arbitrary Unit
GSH-Px/GAPDH	0.65 ± 0.25 (n=3 subgr.*)	1.07 ± 0.27 (n=4 subgr.*)	0.98 ± 0.42 (n=4 subgr.*)	Arbitrary Unit
Catalase (CAT)	8.15 ± 1.19 (n=3 subgr.*)	3.31 ± 0.83 (n=2 subgr.*)	3.39 ± 1.06 (n=2 subgr.*)	μmol/mg protein/min
Total Antioxidant Status (TAS)	1.22 ± 0.26 (n=4 subgr.*)	0.44 ± 0.35 (n=4 subgr.*)	0.44 ± 0.19 (n=4 subgr.*)	mmol/g protein

Average ± SD, OME; otitis media with effusion, SOD; superoxide dismutase, GSH-Px; Glutathione peroxidase, GAPDH; Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, \*;each subgroup contains 6 specimens (ears), a;p<0.05 vs normal group, b;p<0.01 vs normal group , c;p<0.001 vs normal group.

의 RT-PCR 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 흥미롭게도 CAT, TAS의 값이 다른것과 비교해서 다른 양상을 보이고 실제로 정상군과 비교해 볼 때 O, A 실험군에서 감소하였다(Fig. 5,6). Control값으로 차감 계산된 각 substance의 결과 비교는 Fig. 7에 요약하였다.

### 고 찰

삼출성중이염(OME)은 유소아에서 발생빈도가 아주 높은 질환중 하나이지만 수많은 연구에도 불구하고 OME의 명확한 원인은 아직 규명되지 않고 있다. ROS와 같은 free radical이 1990년대 초반 부터 중이염의 동물실험이나 사람을 대상으로 한

실험에서 밝혀지고 있다[8-12]. Parks 등[8]은 AOM의 감염된 중이점막에서 MDA와 lipid hydroperoxide가 증가함으로써 중이염은 oxygen radical 손상에 의한다고 보고하였다. 동물 실험 연구에서는 급성 중이염을 유발하는데 *Streptococcus pneumoniae*의 고실내 주입을 많이 사용하고 있는데[9-11], 삼출성 중이염의 중요한 병인중의 하나인 이관 기능을 반영하지는 못하기 때문에 본 연구에서는 이관의 전기소작을 통해 삼출성 중이염을 유발시켰으며, 급성 중이염을 보인 경우는 본 연구에서 제외시켰다. Free radical은 쌍을 이루고 있지 않은 전자를 가진 매우 반응성이 높은 분자로서 세포 단백질, 탄수화물, 핵산, 지질의 화학적 변화에 의하여 조직 손상을 야기한다. ROS는 superoxide free radical (O<sub>2</sub>•), hydroxyl

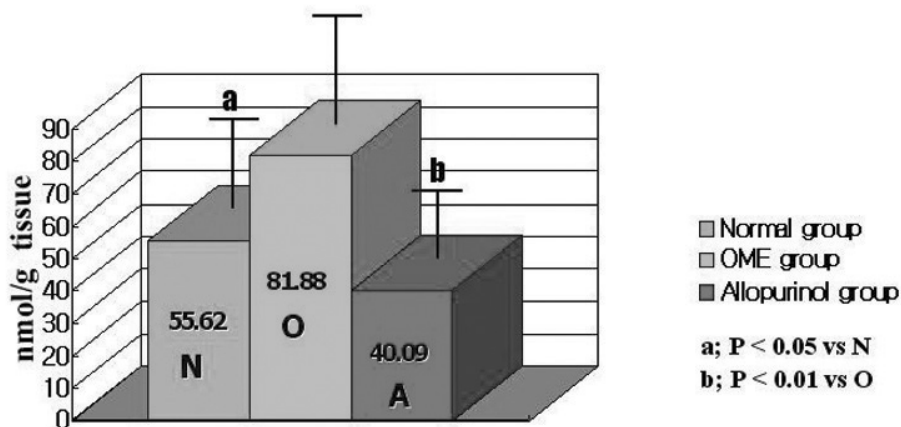


Fig. 1. Malondialdehyde (MDA) level in rats with OME. OME :otitis media with effusion, N : normal group, O : OME group, A : allopurinol group.

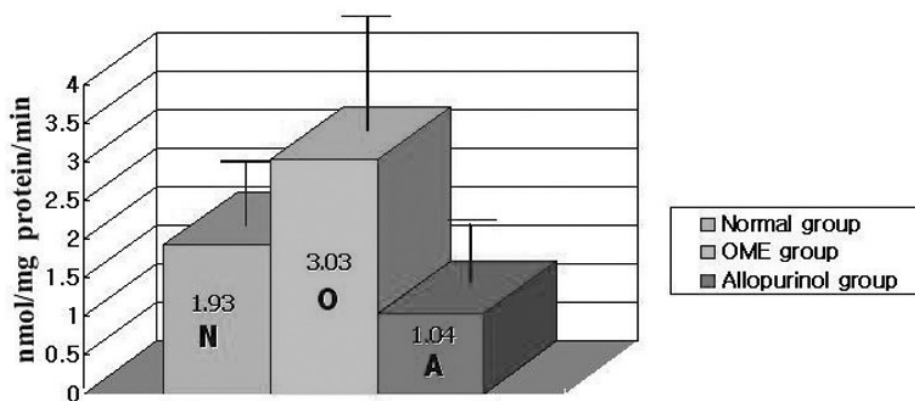


Fig. 2. Xanthine Oxidase level in rats with OME.

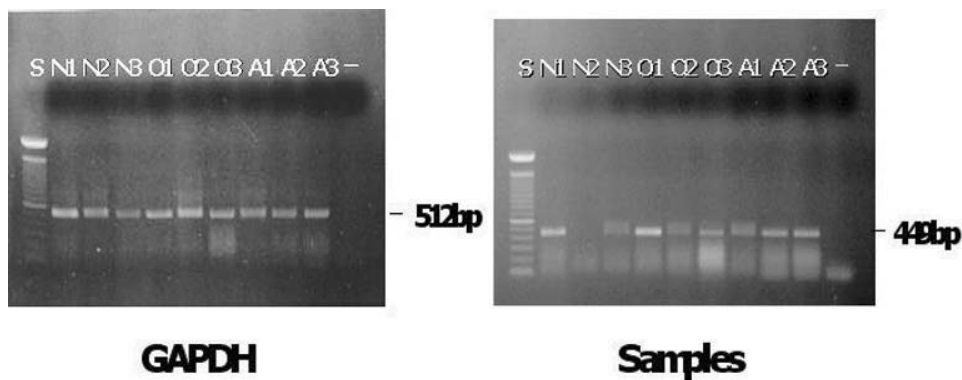


Fig. 3A. Detection of the expression for SOD mRNA by RT-PCR.

radical (OH•), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), hypochloride (OCL<sup>-</sup>),

ozone (O<sub>3</sub>)의 집합체이다. ROS는 모든 살아있는 호기성 유기체의 에너지 대사 동안에 부산물로서

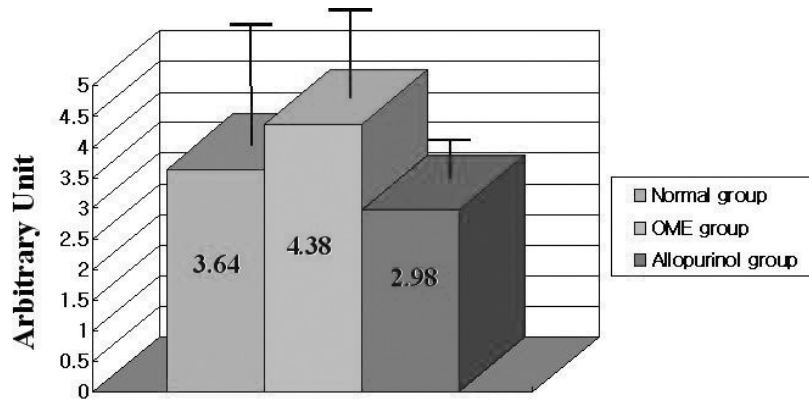


Fig. 3B. Superoxide dismutase (SOD) level in rats with OME.

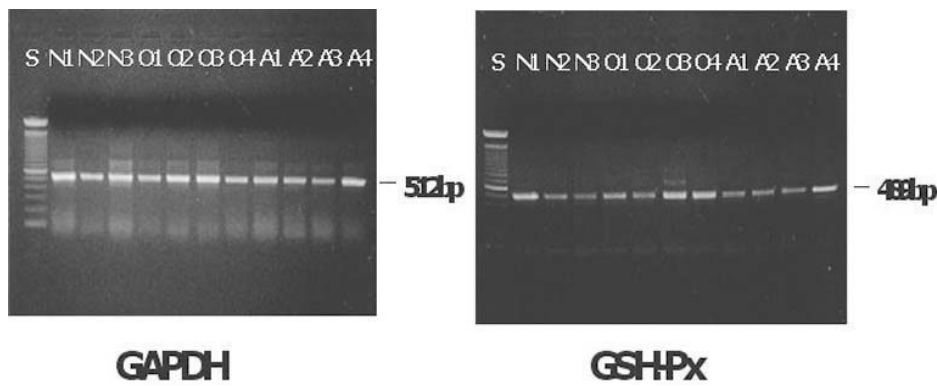


Fig. 4A. Detection of the expression for Glutathione Peroxide (GSH-Px) mRNA by RT-PCR.

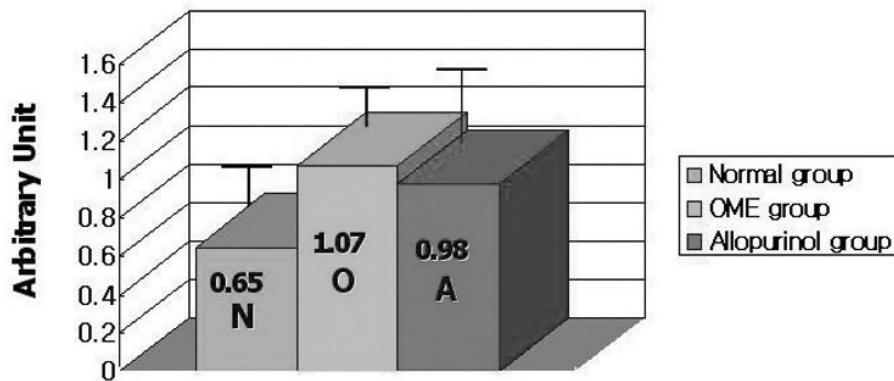


Fig. 4B. Glutathione Peroxidase (GSH-Px) level in rats with OME.

생성되며 mitochondrial respiratory chain의 효소 반응, cytochrome의 P-450 system의 detoxifying reaction, phagocytosis, prostaglandin 생성, signal transduction 등 여러 가

지 생명현상에서 역할을 담당하고 있다[13-14]. 병리생리학적인 관점에서 ROS 생성과 제거의 불균형상태인 OSS 상태는 정상조직에서 심각한 손상을 유발할 수 있으며 노화와 동맥경화, 뇌졸중, 심근경

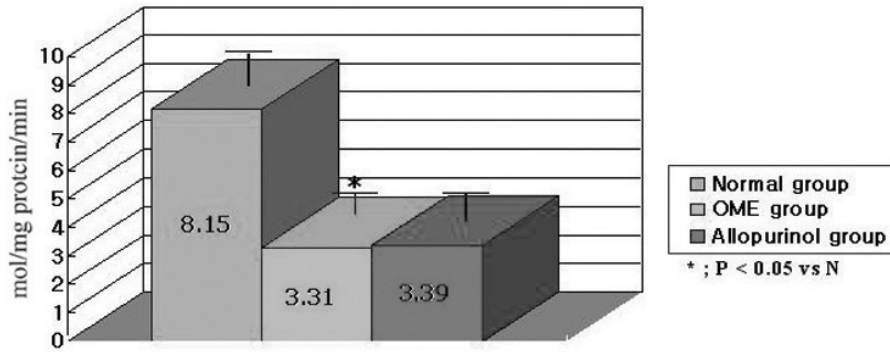


Fig. 5. Catalase activity level in rats with OME.

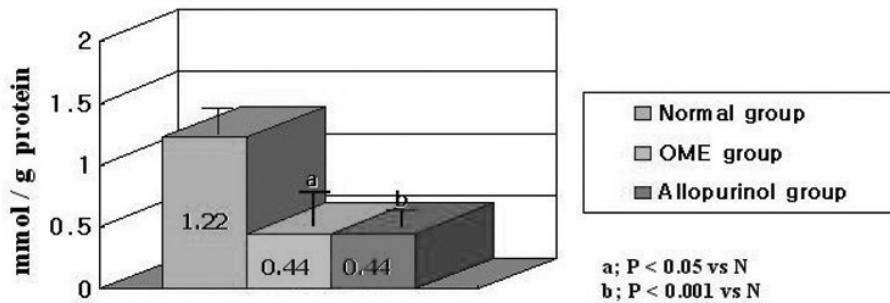


Fig. 6. Total Antioxidant status (TAS) level in rats with OME.

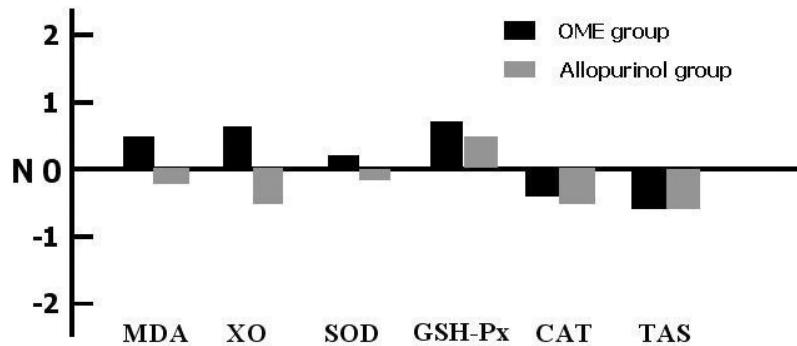


Fig. 7. A comparison of the results for each substance offset by controls value is summarized.

색, 백내장, 관절염과도 관련이 있다[2,15-21]. ROS가 세포막의 polyunsaturated fatty acids와 반응하게 되면, lipid peroxide가 생성되고 membrane fluidity와 barrier function은 감소하게 되어 결국 구조적 분해와 세포사를 초래하게 된다 [8]. MDA같은 lipid peroxide와 lipid hydroperoxide (LPO)는 oxidative cellular

damage를 나타내는 의미있는 표지자이다[2,8]. 복합 항산화 ‘방어’ 체계는 free radical 에 의한 세포손상에 대해 상반된 작용을 하고 있다. TAS는 ROS에 길항하는 개체의 능력을 나타낸다. TAS는 enzymatic과 nonenzymatic을 포함하는 모든 종류의 antioxidant로서 이루어져 있는데 SOD, CAT, GSH-Px는 antioxidant system의 중요한



enzymatic component이다. Vitamin C와 E, beta-carotene, uric acid, bilirubin, albumin, DNA repair enzyme뿐만 아니라 metal binding protein인 ceruloplasmin, transferrin, ferritin, lactoferrin은 nonenzymatic antioxidant system에 포함된다. 정상 생리적 상황에서 건강한 항산화 체계는 ROS의 세포독성을 제거할 수 있다.

ROS는 반감기가 아주 짧기 때문에 확인하기 어렵고 생체내에서 정량화하기 어렵다. 그러나 생체내에서 ROS 생성의 증거는 그들의 부산물의 분석을 통해서 얻어질 수 있다. MDA의 확인과 정량화는 oxidative stress status의 생체 표지자이며, 산화손상의 간접적인 표지자이고 lipid peroxidation 연구에서 쓰이는 가장 흔한 분석법 중 하나이다. Superoxide free radical은 hypoxanthine-XO pathway에서 XO에 의해 생성되는 첫 번째 ROS이다. SOD는 superoxide free radical이 hydrogen peroxide로의 dismutation을 촉매하며, 이는 대부분 CAT와 GSH-Px에 의해 대사되어 non-toxic water나 oxygen으로 될 수 있다. 또는 그렇지 않은 경우 아주 강력한 hydroxyl radical로 변한다.

본 연구의 결과는 OME에서 oxidative tissue damage가 증가하였고, XO의 inhibitor인 allopurinol이 산소조직 손상을 감소시킬 수 있다는 것이다. O 군에서 MDA의 증가는 삼출성 중이염에서 oxidative tissue injury가 있다는 것을 나타내며, O 군에서 XO, SOD의 증가는 OME에서 ROS생성이 증가했음을 의미한다. A 군에서 GSH-Px를 제외한 물질들이 정상치 아래로 감소한 것은 allopurinol이 이 물질들을 정상치 아래로 감소시켰음을 의미한다. Allopurinol이 GSH-Px의 수치를 정상보다 감소시키지 못한 것에 대한 설명으로는 다른 인자들이 GSH-Px의 activity를 증가시켰고 allopurinol을 어느 정도 억제했기 때문이라고 생각된다. 대부분의 효소가 필요량에 비례하여 생성되기 때문에 OME에서 XO기질과 hypoxanthine의 증가와 이에 따른 XO activity의 증가는 xanthine, superoxide free radical, hydrogen peroxide의 증가를 야기한다. 염증 반응은 염증에 의한

nuclear fragment의 산물인 hypoxanthine의 증가를 유발한다고 여겨진다. Allopurinol의 XO에 대한 저해작용은 xanthine, superoxide free radical의 substrate, sequential ROS (hydrogen peroxide, hydroxyl radical)을 감소시킬 수 있다. O 군에서 MDA, XO, SOD, GSH-Px의 증가는 ROS가 oxidative tissue damage를 의미하며 OME의 발생기전에서 중요한 역할을 담당했을 것으로 생각되어진다. CAT을 포함한 TAS는 ROS의 생성과 activity를 감소시킬 수 있기 때문에 OSS에서 중요하다. ROS의 과다한 생성이 antioxidant와 TAS의 생산과 activity를 감소시킬 수 있다는 것은 잘 알려져 있다.

O 와 A 군에서 CAT의 감소원인은 OME에서 ROS의 과잉생산 또는 다른 조건들이 CAT, TAS의 activity를 감소시켰기 때문이라고 생각한다. 다른 문헌에 따르면 급성중이염의 SOD 농도가 비교군보다 높았다고 보고하였다[22]. 이는 급성 중이염 모델에서는 조직의 부종이 삼출액의 농도를 희석 하는 효과가 있기 때문에 이 실험의 결과와 급성 중이염 모델을 비교하기는 어렵다. 이 연구에서 OME의 병리기전에서 OSS와 OSS에 영향을 주는 항산화효소의 중요성에 대해 기술하였다. ROS의 생성을 감소시킬 수 있는 allopurinol이 MDA, XO, SOD값을 감소시켰으며 ROS가 OME의 병리기전에 중요한 역할을 하였다.

## 요 약

100마리의 SPF Sprague-Dawley rats (280-300 g, any sex)의 이관을 전기소작술로 인위적으로 막아 삼출성 중이염(OME)를 유발시켜 실험한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. OSS는 삼출성중이염의 발생기전에서 중요한 역할을 담당한다.
2. Allopurinol은 삼출성중이염에서 활성산소의 생산과 oxidative tissue damage를 감소시킨다.
3. SOD와 GSH-Px는 삼출성 중이염의 oxidative tissue damage를 증가 또는 감소시키는

활성산소 대사의 주요한 항 산화효소로 여겨진다.

4. CAT와 TAS는 삼출성중이염의 발병기전에 있어서 선행인자로 여겨진다.

### 참 고 문 헌

1. Ates B, Abraham L, Ercal N. Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radic Res* 2008;**42**:372-7.
2. Haddad J Jr. Lipoperoxidation as a measure of free radical injury in otitis media. *Laryngoscope* 1998;**108**:524-30.
3. Kim DJ. Expression of Superoxide dismutase in otitis media with effusion. *Korea J Otolaryngol* 1999;**42**:284-9.
4. Stoscheck CM. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology* 1990;**182**:50-69.
5. Rowe PB, Wyngaarden JB. The mechanism of dietary alterations in rat hepatic xanthine oxidase levels. *J Biol Chem* 1966;**241**:5571-6.
6. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972;**49**:474.
7. Lowry OH, Rosenbrough AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-PHENOL reagents. *J Biol Chem* 1951;**193**:265-75.
8. Parks RR, Huang CC, Haddad Jr J. Evidence of Oxygen radical injury in experimental otitis media. *Laryngoscope* 1994;**104**:1389-92.
9. Haddad J Jr, Egusa K, Takoudes TG. Effects of 21-amonosteroid U-74389G on acute otitis media in a guinea pig model. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;**118**:44-8.
10. Takoudes TG, Haddad J Jr. Hydrogen peroxide in acute otitis media in guinea pigs. *Laryngoscope* 1997;**107**:206-10.
11. Parks RR, Huang CC, Haddad J Jr. Middle ear catalase distribution in an animal model of otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996;**253**:445-9.
12. Gakoudes T, Haddad J Jr. Evidence of oxygen free radical damage in human otitis media. *Otolaryngology Head and Neck Surg* 1999;**120**:638-42.
13. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Bioch J* 1984;**222**:1-15.
14. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cell components. *Federation Proceedings* 1973;**32**(8):1870-4.
15. Dashti HM, Al-Sayer H, Behbehani A, Madda J, Christenson JT. Liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride and the effect of superoxide dismutase and xanthine oxidase inhibitor treatment. *J R Coll Surg Edinb* 1992;**37**:23-8.
16. Kakimoto K, Kojima Y, Ishii K, Onoue K, Maeda H. The suppressive effect of gelatin-conjugated superoxide dismutase on disease development and severity of collagen-induced arthritis in mice. *Clin Exp Immuno* 1993;**94**(2):241-6.
17. Kyo-Cheol Mun. Correlation between superoxide radical production and hepatic damage induced by bile duct ligation. *Korean Biochem J* 1994;**27**:346-9.
18. McCord JM, Roy RS. The pathophysiology of superoxide: roles in inflammation and ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 1982;**60**:1346-51.
19. McCord JM. The superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 1983;**94**(3):412-4.
20. Myoung-Cheol Kim, Byoung-Rai Lee, Kwang-Sam Koh. Calcium and NADH potentiate the superoxide radical production in renal ischemia/reflow of rats. *Korean J Biochem* 1993;**25**:1-8.
21. Park DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen-derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983;**94**(3):415-22.
22. Parks RR, Huang CC, Haddad J Jr. Superoxide dismutase in an animal model of otitis media. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995;**252**:153-8.