

KR-30816이 심근 세포에서 활동 전위 및 ATP-Sensitive Potassium Channel에 미치는 효과

전북대학교 의과대학 내과학교실, 약리학교실*
이경석 · 고재기 · 박용근* · 채수완*

= Abstract =

Activation of the Cardiac ATP-Sensitive K^+ Channel by KR-30816,
a Newly Synthesized Potassium Channel Opener

Kyoung Suk Rhee, M.D., Jae Ki Ko, M.D.,
Yong Geun Kwak, M.D.,* Soo Wan Chae, M.D.*

Department of Internal Medicine and Pharmacology, Chonbuk National University College of Medicine,
Chonju, Korea*

Background : The effects of a newly synthesized potassium channel opener, KR-30816((−)-(nitro-2-hydroxymethyl-2-methyl-2H-1-benzopyran-4-yl) pyridine oxide) on the action potential of papillary muscles of guinea pigs and the ATP-sensitive potassium channel current($I_{K_{ATP}}$) of single ventricular muscle cells of rats were examined to make clear its action mechanism on the K_{ATP} channel.

Methods : We used the conventional microelectrode and the excised inside-out patch configuration.

Results : KR-30816 caused a shortening of the action potential duration in dose-dependent manner, which was inhibited by glibenclamide($3\mu M$). Before run-down of the K^+ channel, KR-30816 activated the cardiac ATP-sensitive K^+ channel only in the presence of ATP and shifted the dose-response relation curve between $[ATP]_i$ and the channel activity to the right in parallel. After run-down of the K_{ATP} channel, KR-30816 did not affect the channel opening either in the absence or in the presence of UDP.

Conclusion : These results suggest that KR-30816 antagonizes the inhibitory effect of ATP on the K_{ATP} channel in a competitive manner, thereby enhancing the channel openings.

KEY WORDS : KR-30816 · Potassium channel opener · ATP-sensitive K^+ channel · Action potential · Patch clamp technique · Heart.

서 론

Potassium 통로는 생체내에 널리 분포하고 있을 뿐만 아니라 이온통로중 가장 다양한 종류로 분류되고

있으며 대부분의 세포에서 활동전위의 재분극기 및 정상적인 안정막전위의 유지등 생체내 중요한 기능을 담당하고 있다¹⁾. 1986년 Hamillton²⁾등과 Weir와 Weir³⁾이 몇 종의 평활근 이완제가 K^+ 통로를 개구

함으로써 근이완작용을 나타냄을 보고한 이래 그 역할을 하는 K^+ 통로에 대해 관심이 집중되었다. 한편, 1983년 Noma⁴⁾가 심근세포에서 ATP에 의해 억제되는 ATP-sensitive K^+ 통로(이하 " K_{ATP} "라 칭함)가 존재함을 최초로 보고한 이래 K_{ATP} 통로는 pancreatic β -cell⁵⁾, 골격근세포⁶⁾, 평활근세포⁷⁾, 및 뇌⁸⁾ 등의 다른 조직에도 존재함이 알려져 있는데, 이러한 K_{ATP} 통로는 tolbutamide와 glibenclamide 같은 sulfonylurea 유도체들에 의해 선택적으로 차단^{9,10)}되고, minoxidil¹¹⁾, cromakalim¹²⁾, pinacidil¹³⁾, lemakalim¹⁴⁾ 그리고 nicorandil¹⁵⁾과 같은 K^+ 통로개구제에 의해 선택적으로 활성화된다. 이러한 K^+ 통로개구제에 의한 K^+ 통로의 활성화는 세포를 과분극시킴으로써 혈관이완 및 심근의 활동전위기간 단축과 수축력 감소와 같은 작용을 유발하게 된다^{16,17,18,19)}. 특히, 심혈관계에서 K^+ 통로개구제는 허혈성질환, 부정맥, 고혈압 및 울혈성 심부전 등의 질환에 치료효과가 클 것으로 기대되고 있으나^{19,20)} 이러한 약물을 임상에 적용시 가장 큰 단점은 조직에 따라 선택적 작용이 적다는 것이다²¹⁾.

한편, 저자들은 최근 lemakalim의 구조를 변형시켜 개발된 KR-30816((-)-(nitro-2-hydroxymethyl-2-methyl-2H-1-benzopyran-4-yl) pyridine oxide)(Fig. 1)이 lemakalim보다 100배 정도 강력하게 혈관을 이완시키고 이러한 효과가 ATP-sensitive K^+ 통로의 선택적인 차단제인 glibenclamide에 의해 현저히 억제됨을 관찰한 바 있다(미발표결과). 따라서 저자들은 새로 합성된 K^+ 통로개구제인 KR-30816이 기니픽 유두근 및 흰쥐 단일 심실근세포에서 활동전위와 단일통로전류에 미치는 효과를 검토하고 그 작용기전을 추구하고자 본 실험을 시행하였다.

실험 방법

1. 실험동물

활동전위의 측정에는 300g 내외의 건강한 기니픽을 사용하였고, 단일통로전류의 기록을 위한 단일심근 세포분리에는 체중 250g 내외의 수컷 흰쥐(Sprague Dawley rat)를 사용하였다.

2. 활동전위의 측정

체중 300g 내외의 기니픽을 두부타격으로 치사시킨후 경동맥을 절단하여 방혈시킨뒤 심장을 적출하여

실온에서 97% O_2 + 5% CO_2 로 포화시킨 Tyrode 용액(조성: 137mM NaCl, 5.4mM KCl, 1.05mM $MgCl_2$, 0.45mM NaH_2PO_4 , 11.9mM $NaHCO_3$, 1.8mM $CaCl_2$ 및 5mM dextrose)에 넣어 혈액을 제거하였다. 심장을 고정판에 고정한 후, 우측심실벽으로부터 유두근을 적출하여 tissue chamber에 현수하고 Tyrode 용액을 일정한 속도로 관류시켰다. 한편, 전기자극은 1Hz로 하였고, 3M KCl로 채워진 일반유리전극을 근육내에 삽입하여 활동전위를 측정하였다.

3. 단일심실근세포의 분리

동물을 두부타격으로 치사 시킨후 1분 30초 내에 심장을 적출하여 Langendorff 장치에 현수하고 Krebs-Henseleit 용액(조성: 118mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM $MgSO_4$, 1.2mM KH_2PO_4 , 10mM HEPES, 25mM $NaHCO_3$, 10mM pyruvate, 11mM dextrose 및 1mM $CaCl_2$)을 관상동맥을 통해 분당 4ml의 속도로 5분간 관류시켰다. 그런 다음 심장박동이 멈출 때까지 Ca^{2+} -free Krebs-Henseleit 용액으로 관류시킨 후 collagenase(Warthington) 22.5mg/30ml를 함유한 Ca^{2+} -free Krebs-Henseleit 용액으로 약 30분간 관류시켜 소화시켰다. 소화된 심실을 떼어내어 1% albumin을 함유한 Ca^{2+} -free Krebs-Henseleit 영양액에서 가볍게 흔들어 단일심근세포를 분리하고, 분리된 세포들은 1% albumin 함유 ice-cold Ca^{2+} -free Krebs-Henseleit 용액에 보관하여 실험에 사용하였다.

4. 단일통로전류의 기록

단일통로전류는 gigaohm-seal patch clamp 방법중 excised inside-out patch 방법으로 전기적인 signal을 patch clamp 증폭기(Axon Instruments, Axopatch-1D)를 통하여 digital pulse code modulator(Sony, PCM-501ES)를 거쳐 VTR tape(Gold Star, GVH-9000)에 기록하였으며, 단일통로전류를 분석할 때 cut-off frequency는 2KHz로, 생리기록계에 기록할 때에는 전기적인 신호를 400Hz로 filter하여 입력하였다. 그리고, 단일통로전류기록에 사용한 pipette(Kimax-51, 1.5-1.8 \times 100mm)은 2-stage pipette puller(Narishige, PP-83)로 뽑아서 Sylgard로 coat후 tip을 열처리하여 사용하였는데, 이때 저항이 4~5 M Ω 정도 되는 pipette을 사용하였다. 한편, excised inside-out patch에 사용한 pipette은 K-5용액(조성: 118.5mM KCl, 2mM $MgCl_2$, 5mM KOH/EGTA 및 10mM KOH/HE-

PES)으로 채웠으며, bath 용액도 또한 K-5 용액을 사용하였다.

5. 단일통로전류의 자료분석

VTR tape에 저장된 단일통로전류의 신호를 다시 digital pulse code modulator(Sony, PCM-501ES)를 통해 A/D converter(Digidata 1200, Axon Instruments)를 거쳐 pClamp 5.7.2 software를 이용하여 컴퓨터에 저장하고 분석하였다. 단일통로전류의 open probability(P_o)는 Spruce등²²⁾에 의해 유도된 공식을 이용하였다.

$$P_o = \left(\sum_{j=1}^N t_{ij} \right) / (T_d N)$$

즉 이 식에서 t 는 $j=1, 2, 3, \dots, N$ 개의 통로가 열릴때 각각의 전류단계에서의 통로가 열려있는 시간, j 는 각 level에서 열려있는 통로의 수, T_d 는 단일통로 전류를 기록한 시간, N 은 control 상태(ATP-free)에서 최대로 활성화되는 통로의 수를 가리키며 본실험에서 P_o 는 60초 이상의 연속된 단일통로기록들을 사용하여 계산하였다. 한편, relative open probability는 컴퓨터를 이용하여 산출한 각각의 P_o 를 ATP-free 상태의 단일통로전류의 P_o 에 대한 비율을 계산함으로써 산출하였다.

6. 사용약물

본 실험에 사용한 약물은 collagenase(Worthington, CLS2), albumin(Sigma), ATP(Sigma), UDP(Sigma), glibenclamide(Sigma)이고 KR-30816(Fig. 1, 한국 화학연구소) 등이다.

결 과

1. 유두근 활동전위에 미치는 KR-30816의 영향

KR-30816의 이온통로에 대한 전반적인 작용을 검토하고자 기니픽 유두근에서 활동전위에 미치는 KR-30816의 영향을 관찰하였다. 대조군에서 안정막전압은 -70 내지 -80 mV를 나타냈고 전체활동전위기간의 90% 기간(APD_{90})은 216.6 ± 5.6 msec였으며, KR-30816의 농도가 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} M, 및 3×10^{-6} M로 증가함에 따라 각각 대조치의 99 ± 0.6 , 98.3 ± 0.7 , 84 ± 7 , 22.3 ± 3.5 , 7 ± 2.1 %로 KR-30816의 농도에 비례하여 단축되었으나, K_{ATP} channel의 선택적인 차단제로 알려진 glibenclamide 3μ M

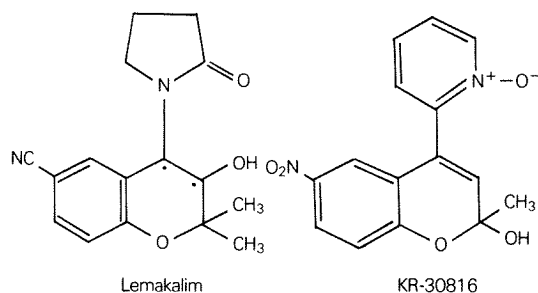


Fig. 1. Chemical structure of a standard potassium channel opener, lemakalim, and a newly synthesized agent, KR-30816.

존재하에서 KR-30816의 활동전위기간 단축효과는 완전히 차단되었다(Fig. 2).

2. 단일 통로 전류에 미치는 KR-30816의 영향

KR-30816이 활동전위기간을 단축시키고 이러한 KR-30816의 효과가 glibenclamide에 의해 차단된 점은 KR-30816이 K_{ATP} 를 개구하는 것으로 사료되나 이러한 KR-30816의 효과가 실제로 단일통로수준에서 K_{ATP} 를 개구하는지 그리고 K_{ATP} 통로의 어느 부위에 작용하는지 알아보기위해 K_{ATP} 단일통로전류에 대한 KR-30816의 효과를 inside-out patch방법으로 관찰하였다. K_{ATP} 통로는 inside-out patch 형성시 세포내액에 ATP가 없을 때, 점차 K_{ATP} 통로활성이 감소하게 되는데 이 과정을 run-down이라고 하고 이런 run-down 과정은 통로가 탈인산화 되기 때문이라고 알려져 있으며^{23,24)}, 최근에는 K_{ATP} 통로가 완전히 run-down된 후에도 nucleotide diphosphate(이하 NDP라 칭함)를 첨가하면 통로가 열린다는 보고²⁶⁾가 있다. 따라서, 본 연구에서는 이러한 보고들을 근거로 K_{ATP} 단일통로에 대한 KR-30816의 작용기전에 대한 연구를 1) K_{ATP} 통로가 run-down이 일어나기전 즉 통로가 인산화된 상태, 2) K_{ATP} 통로가 run-down이 일어난 후 NDP가 없을 때 즉 탈인산화된 통로에 NDP가 결합된 상태로 구분하여 실시하였다.

1) Run-down이 일어나기 전 K_{ATP} 통로에 대한 KR-30816의 효과

APT가 존재하지않는 용액에서 inside-out patch를 시행하면, ATP에 의한 통로활성억제가 없기 때문에 최대의 통로활성이 관찰되는데, 이러한 조건에서 투여된 KR-30816 10^{-5} M은 통로활성 및 unitary condu-

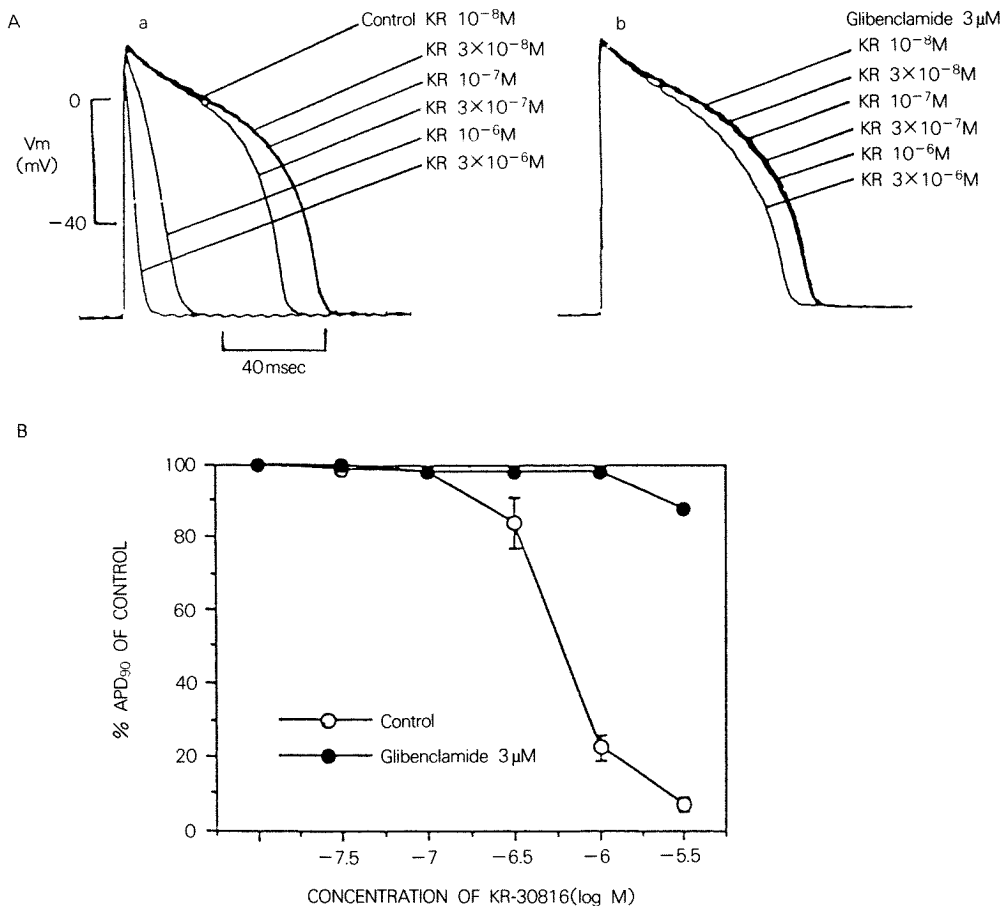


Fig. 2. Effects of KR-30816 on action potentials in isolated papillary muscle of guinea pig. A, A typical representation of action potential in the presence of KR-30816, and in the presence of KR-30816 and glibenclamide ($3 \mu M$). B, Dose-response curve for effects of KR-30816 on action potential duration at 90% repolarization (APD₉₀) of isolated papillary muscles of guinea pig. Each point with vertical bar denotes the mean with SEM from 6 observations.

ctance에 영향을 주지 못하였다 (Fig. 3).

Fig. 4는 ATP $1 mM$ 존재하에서 excised inside-out patch 방법으로 KR-30816의 K_{ATP} 통로 개구효과를 관찰한 결과이다. Excised inside-out patch 형성 후 최대로 활성화된 K_{ATP} 통로는 세포막내 $1 mM$ ATP에 의해 현저히 억제되었고, ATP $1 mM$ 존재하에서 KR-30816을 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} 그리고 $10^{-5} M$ 로 증가시키며 따라 K_{ATP} 통로의 활성을 inside-out patch 시행 후 최대통로개방율 (P_o)에 대한 각각의 개방율 (P_o)의 비(즉 relative channel activity)로 나타냈을 때, ATP $1 mM$ 존재시 KR-30816 농도를 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} 그리고 $10^{-5} M$ 로 증가시키며 따라 각각의 relative channel activity가 0.21 ± 0.08 , 0.43 ± 0.11 , 0.78

± 0.13 , 0.98 ± 0.06 으로 KR-30816 농도에 비례하여 증가되었으나 K_{ATP} 통로의 unitary conductance는 약 $70 pS$ 로 대조군에서나 KR-30816 첨가 후에도 변동이 없었다 (Fig. 4B).

Fig. 5A에서, ATP가 없는 고농도 K^+ 용액(즉 K-5 용액)에서 세포막전압을 $-60 mV$ 로 고정하고 inside-out patch 시행시 단일통로가 최대로 활성화되었으며, 이 단일통로전류의 활성은 ATP농도가 0.01 , 0.03 , 0.1 , 0.3 및 $1 mM$ 로 증가됨에 따라 relative channel activity가 0.89 ± 0.08 , 0.74 ± 0.09 , 0.41 ± 0.11 , 0.073 ± 0.12 , 0.001 ± 0.06 으로 ATP 농도에 비례하여 억제되었다 (Fig. 5C). Fig. 5B는 inside-out patch에서 KR-30816에 의한 K_{ATP} 통로활성증가에 대한 ATP의 억제효과를

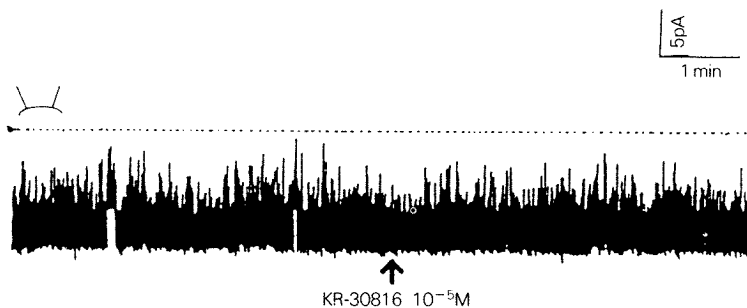


Fig. 3. Effect of KR-30816(10^{-5} M) on the K_{ATP} channel activity in ATP-free internal solution before run-down. The holding potential was -60 mV. Tracing showing effect of KR-30816 on the K_{ATP} channel activity of excised inside-out patch membrane in ATP-free internal solution.

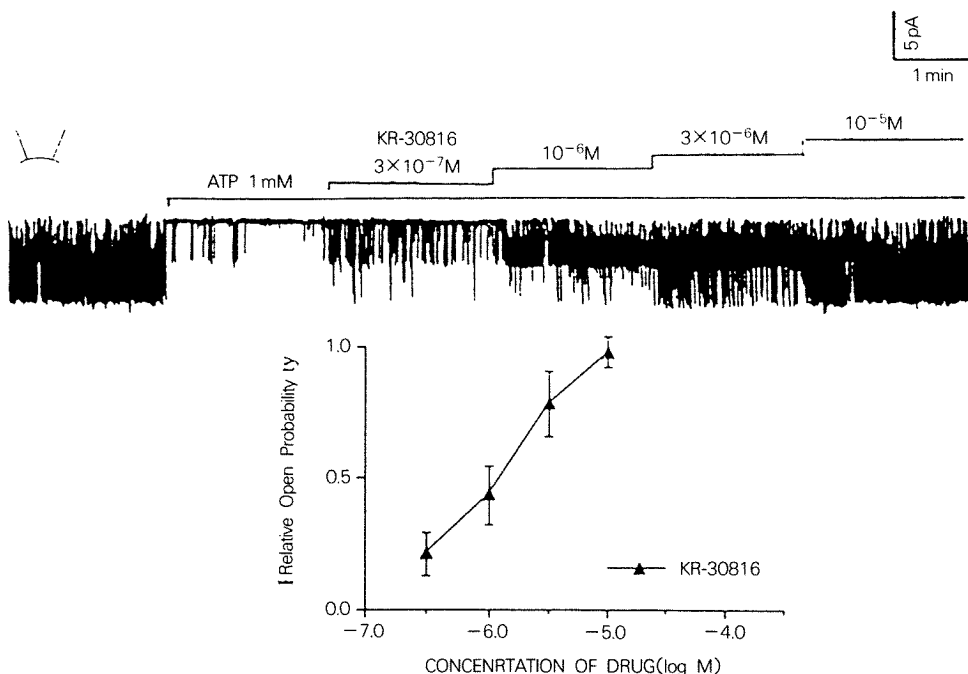


Fig. 4. Effect of KR-30816 on the K_{ATP} channel activity under the presence of ATP(1mM) before run-down. The holding potential was -60 mV. A. Tracing showing effect of KR-30816 on the K_{ATP} channel activity of excised inside-out patch membrane under the presence of ATP(1mM). B. Graph showing dose-response relation between relative channel activity and the concentration of KR-30816 from the same patch in A. Each point with vertical bar denotes the mean with SEM from 8 observations.

관찰한 그림이다. 세포내용액에 ATP 0.3mM 존재하에서 KR-30816 10^{-5} M을 첨가할 때, 통로활성이 현저히 증가되었으며, 이렇게 KR-30816에 의해 증가된 통로활성은 또한 ATP의 농도에 비례하여 억제되었다. 그래서, KR-30816은 ATP에 의한 통로억제 곡선을 우측으로 거의 평행하게 이동시켰다(Fig. 5C). 본 실험성적은 KR-30816이 ATP의 억제효과를 경쟁

적으로 길항함으로써 K_{ATP} 통로를 개구시킴을 시사한다.

2) Run-down이 일어난후 K_{ATP} 통로에 대한 KR-30816의 효과

Fig. 5A는 ATP가 없는 세포내액에서 inside-out patch 형성 후 완전히 K_{ATP} 통로의 run-down이 일어난 다음 KR-30816의 효과를 관찰한 그림이다. Run-

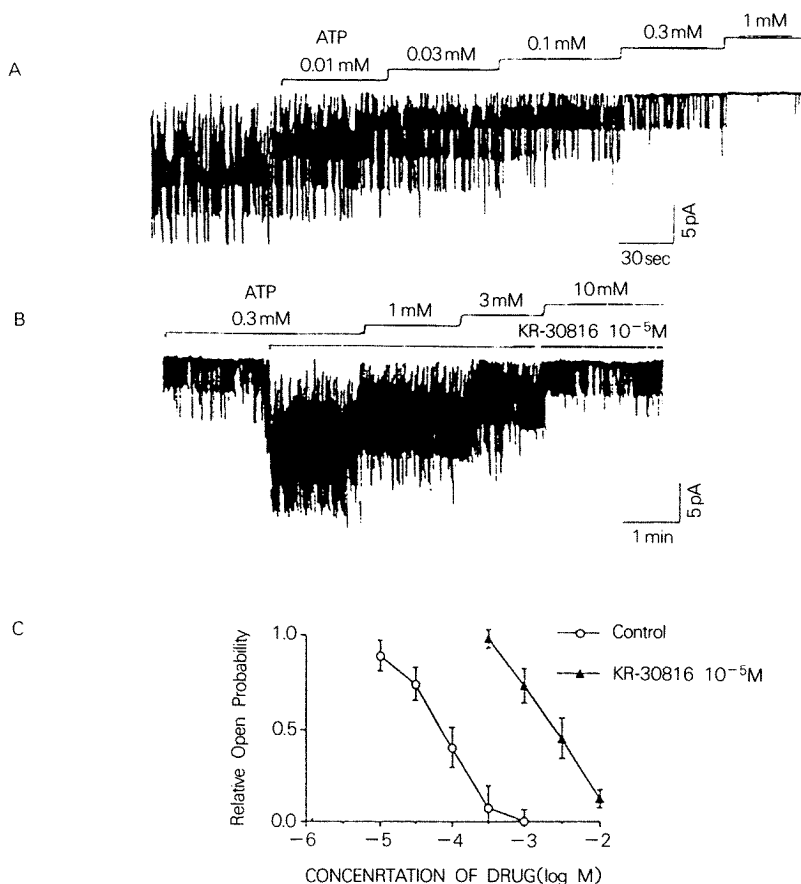


Fig. 5. ATP dependence of the spontaneous and KR-30816-induced K_{ATP} channel activity. The holding potential was -60mV. A. Tracing showing that the inside-out patch configuration exhibited brisk K_{ATP} channel activity in ATP-free solution, which was inhibited by ATP in a concentration-dependent manner. B. tracing showing the inhibitory effect of ATP on the K_{ATP} channel activity in the presence of 10mM KR-30816. C : Graph showing relation between relative channel activity and [ATP]_i from the same patch in A and B. Relative channel activity represents the relative value at zero ATP after inside-out patch.

down후 KR-30816 10⁻⁵ M은 K_{ATP} 통로활성에 전혀 영향을 주지 못했다. 한편, 이렇게 run-down이 일어난 K_{ATP} 통로에 UDP 3mM 첨가시 통로는 재활성화되었다(Fig. 6A). UDP에 의해 재활성화된 K_{ATP} 통로에 대한 KR-30816의 효과를 Fig. 6B에 나타내었는데, KR-30816 10⁻⁵ M은 UDP에 의해 재활성화된 K_{ATP} 통로활성에 영향을 주지 못했다. 이러한 실험결과는 K_{ATP} 통로에 NDP의 결합 여부에 상관없이 KR-30816은 탈인산화된 K_{ATP} 통로에는 영향을 주지않음을 시사한다.

한편, run-down이 일어난 후 UDP 3mM로 재활성화된 통로 활동도가 ATP 1mM에 의해 완전히 억제

되었으며, 이러한 조건에서 투여된 KR-30816 10⁻⁵ M이 통로활성을 증가시켰다(Fig. 7). 이러한 결과는 KR-30816의 통로활성증가효과가 ATP에 의존적임을 더욱 뒷받침한다.

고 안

1. 신약, KR-30816에 의한 심근 K_{ATP} 통로 활성화

활동전위 및 단일통로전류에 대한 실험결과는 KR-30816이 K_{ATP} 통로를 활성화시킴을 시사한다. K_{ATP} 통로의 활성화가 활동전위기간을 단축시킬 수

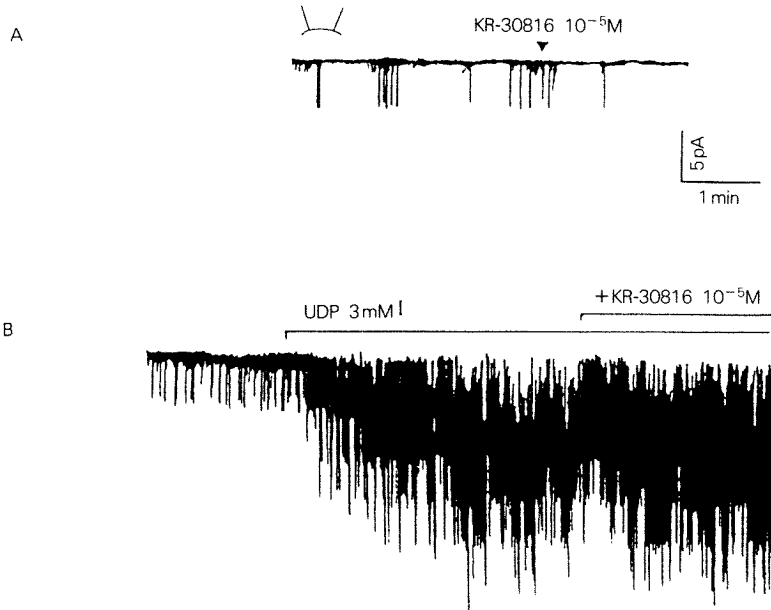


Fig. 6. Effect of KR-30816 in bathing solution on the K_{ATP} channel activity after rundown. The holding potential was -60mV . A, tracing showing effect of the KR-30816 on the K_{ATP} channel activity in ATP-free internal solution after channel run-down. After channel run-down, KR-30816 10mM was added to the bathing solution. B, tracing showing effect of KR-30816 on the UDP-induced K_{ATP} channel activity in ATP-free internal solution after channel run-down. After channel run-down, UDP 3mM was added to the bathing solution. Subsequently, KR-30816 was added to the bathing solution.

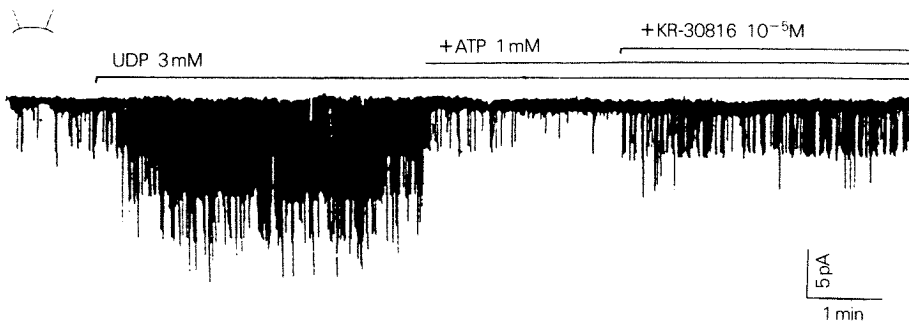


Fig. 7. Influence of KR-30816 on the inhibitory effect of ATP on the UDP-induced K_{ATP} channel activity after run-down. After channel run-down, UDP 3mM was added to the bathing solution. Subsequently, respective ATP and KR-30816 were added to the bathing solution. The holding potential was -60mV .

있다는 Trube와 Heschler²⁶⁾, Noma와 Shibasaki²⁷⁾, Fosset²⁸⁾, Sanguinetti¹²⁾ 그리고, Friedrich²⁹⁾의 보고와 더불어, 본 실험에서 KR-30816이 용량에 비례하여 활동전위를 단축시켰고, 이러한 KR-30816의 효과가 ATP-sensitive K^+ 통로의 선택적인 차단제로 알려진 glibenclamide^{11,12,13,14,15,30)}에 의해 완전히 차단된 점은 신약, KR-30816이 K_{ATP} 통로를 활성화시

킴을 시사한다. 더구나, 단일통로에 대한 실험에서 기록한 단일통로전류가 세포내 ATP 농도에 비례하여 억제된 점과 KR-30816에 의한 단일통로전류가 약 70pS 의 unitary conductance를 나타냈을 뿐만 아니라 세포내 ATP에 의해 억제된 점은 여러 학자들에 의해^{25, 27,31,32,33)} 심근세포 및 췌장 β -cell에서 관찰된 K_{ATP} 통로의 일반적인 특성과 일치한다. 이러한 실험 결과

및 보고들은 KR-30816의 target이 다른 K^+ 통로 개구제들처럼^{11,12,13,14,15)} K_{ATP} 통로임을 시사한다.

2. KR-30816에 의한 K_{ATP} 통로 활성화에 대한 분자생물학적인 기전

KR-30816에 의한 K_{ATP} 통로 활성화에 대한 분자생물학적인 기전을 명확히하기 위하여, 이미 보고된 것처럼^{14,25,34)} K_{ATP} 단일 통로를 세가지 상태(즉 a. K_{ATP} 통로가 run-down이 일어나기전 즉 인산화된 상태, b. K_{ATP} 통로가 run-down이 일어난후 nucleotide diphosphate가 없을 때, 즉 탈인산화된 통로에 NDP가 없을 때, 그리고 c. K_{ATP} 통로가 run-down이 일어난후 NDP가 존재할 때, 즉 탈인산화된 통로에 NDP가 결합된 상태)로 분류하여 KR-30816의 효과를 관찰하였다. 또한, 이렇게 본 실험에서 얻은 단일통로전류에 대한 기록은 ATP와 K_{ATP} 통로와의 상호작용 및 ATP가 있을 때와 없을 때 KR-30816과 K_{ATP} 통로와의 상호작용을 Tung과 Gurachi의 모델에 근거하여 분석하였다. 그 모델에서, Tung과 Gurachi²⁴⁾는 K_{ATP} 통로가 ATP 결합부위(ATP-binding site)와 통로관문(channel gate), 그리고 ATP 결합부위의 신호를 통로관문에 전달해주는 transducer unit로 구성되어 있다고 가정하였고, 통로의 transducer unit가 인산화되어 있거나 NDP가 결합되어 있을때 ATP 결합부위로부터의 신호가 transducer unit를 경유하여 channel gate에 전달 될 수 있어서, ATP가 결합되지 않은 ATP 결합부위는 channel gate에 통로를 개방하라는 신호를 보낸다고 하였다. 이와는 반대로 transducer unit가 탈인산화되어 있거나 NDP가 결합되어있지 않을 때 ATP 결합부위로부터의 신호가 channel gate에 전달될 수 없어서, 통로는 폐쇄될 것이라고 하였다.

이와같은 모델에 근거하면, KR-30816은 K_{ATP} 통로의 세개의 기능적단위(ATP-binding site, transducer unit 및 channel gate) 중 한 부위 또는 여러부위에 작용할 수 있다. 본 실험에서 K_{ATP} 통로의 unitary conductance가 KR-30816에 의해 영향받지 않았을 뿐만 아니라 run-down후 KR-30816이 통로활성에 변동을 일으키지 못한점은 KR-30816에 의한 K_{ATP} 통로개구 효과가 적어도 channel gate 그 자체에 대한 작용이 아님을 시사한다. 또한, KR-30816이 rundown후의 통로활성 및 UDP에 의해 재활성화된 통로활성에 영향을 주지 못한점은 KR-30816에 의한 K_{ATP} 통로

활성증가효과가 transducer unit에 대한 작용이 아님을 시사한다. 그런데, 본실험에서 KR-30816에 의한 K_{ATP} 통로활성증가효과가 run-down 전에 ATP가 존재할 때만 관찰된점과, KR-30816이 세포내 ATP의 K_{ATP} 통로활성억제곡선을 평행하게 우측으로 이동시킨점, 그리고 run-down후 UDP로 재활성화된 통로에서도 KR-30816의 통로활성증가효과가 ATP가 존재할 때만 관찰되었음은 KR-30816이 ATP-결합부위에 대하여 ATP와 경쟁적으로 작용하여 ATP의 억제효과를 길항함으로써 K_{ATP} 통로를 개구시킴을 시사한다. 그러나, ATP 결합부위와의 반응은 KR-30816이 K_{ATP} 통로의 다른 부위와의 상호작용으로 ATP에 대한 sensitivity를 변화시킬 수 있다는 가능성을 배제할 수 없다. K_{ATP} 통로에 대한 KR-30816의 작용을 명확히 구명하기 위해서는 K_{ATP} 통로의 정확한 분자구조의 동정이 선행되어야만 하며, 본 연구에 덧붙여 IK1, IK 및 L-type Ca^{2+} current에 대한 KR-30816의 효과에 대한 연구가 검토되어야 한다.

K_{ATP} 통로에 대한 KR-30816의 작용기전이 pinacidil, lemakalim 및 nicorandil과는 전혀 다르나¹⁴⁾ ER-001533과는 일치한다³³⁾. 이들 화합물의 화학구조는 서로 전혀 다른데^{21,34)}(즉 pinacidil은 cyanopropylquinidine계 화합물, lemakalim과 KR-30816은 benzopyran계 화합물, nicorandil은 nicotine 화합물 그리고 ER-001533은 phenethylamine 유도체), 주목할 점은 구조적으로 아주 다른 화합물인 KR-30816과 ER-001533이 K_{ATP} 통로에 대하여 유사한 작용을 갖고, 오히려 유사한 구조를 갖고 있는 KR-30816과 lemakalim의 작용기전이 서로 다른 점은 각 작용부위에 작용하는 화합물들의 active binding site 또는 catalytic site를 찾는데 중요한 증거가 될 수도 있다. 그러나 저자들이 실험해본 결과, K_{ATP} 통로의 탈인산화가 조금 일어났을 때는 KR-30816이 통로활성을 증가시키는 예도 가끔 관찰된 점은, 각 화합물들의 K_{ATP} 통로에 대한 작용의 차이가 여러 학자들이 각 화합물들에 대한 작용기전을 연구할 때 사용한 단일통로의 인산화상태 및 여러 실험조건의 차이 때문에 일어날 수도 있음을 시사하기 때문에, 동일한 실험조건하에서 이런 약물들을 전체적으로 검토해보는 것도 또한 필요하다.

3. KR-30816의 생리적 및 임상적 의의

이론적으로 K^+ 통로개구제는 여러질환, 특히 허

혈성 심질환, 고혈압, 부정맥 등 심혈관계질환에 치료효과가 클 것으로 기대되며^{19,20)}, 최근 K⁺ 통로개구제들이 항허혈효과 뿐만 아니라 허혈전 투약시 용량에 비례하여 관상동맥 재관류후 심근수축력의 증가와 lactate dehydrogenase의 유리가 감소한다는 ('Permissive effect') 보고³⁵⁾가 있어 관심을 모으고 있다.

KR-30816은 작용기전이 pinacidil, lemakalim 및 nicorandil과는 전혀 다르기 때문에 여러 심혈관계질환의 치료 및 연구에 새로운 도구가 될 수 있다. 예를 들면, 다른 K⁺ 통로개구제에 내성이 발생되었을 때, KR-30816을 대용약으로 사용할 수 있으며, K_{ATP} 통로에 대한 ATP의 억제효과를 경쟁적으로 길항하기에 KR-30816의 효과는 NDP결합이나 인산화에는 상관없이 세포내 ATP농도에만 영향을 받으므로 ATP가 감소된 세포 즉 대사가 억제된 세포에서 통로활성을 증가시킨다. 그러나, 임상에 적용하기 위해서는 KR-30816의 조직선택성에 대한 검토가 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

새로 개발된 혈관이완제인 KR-30816이 기니픽 유두근의 활동전위 및 흰쥐 심실근의 단일통로전류에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) KR-30816은 유두근의 활동전위를 농도에 비례하여 단축시켰으며, 이러한 KR-30816의 효과는 glibenclamide 3×10^{-6} M에 의해 거의 차단되었다.

2) Excised inside-out patch에서 run-down전 세포내 ATP 1mM 존재시 세포내 KR-30816은 농도에 비례하여 단일통로활성을 증가시켰다.

3) Run-down전 KR-30816은 세포내 ATP 농도증가에 따른 통로활성억제곡선을 우측으로 평행 이동시켰다.

4) Run-down후 KR-30816은 UDP 존재여부에 관계없이 K_{ATP} 통로활성에 영향을 주지 못하였으나, ATP 1mM에 의해 억제된 통로활성은 증가시켰다.

이상의 실험성적으로, 새로 개발된 K⁺ 통로개구제인 KR-30816은 심근의 ATP-sensitive potassium channel에 대하여 ATP의 억제효과를 경쟁적으로 길항하여 K_{ATP} 통로를 개구시키는 것으로 사료된다.

References

- 1) Hille B : *Ionic channels of excitable membranes*, 2nd ed. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA, 1992
- 2) Hamilton TC, Weir SW and Weston AH : *Comparison of the effects of BRL34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein*. *Br J Pharmac* 88 : 103-111, 1986
- 3) Weir SW and Weston AH : *The effects of BRS34915 and nicorandil on electrical and mechanical activity and on Rb⁺ efflux in rat blood vessels*. *Br J Pharmac* 88 : 121-128, 1986
- 4) Noma A : *ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle*. *Nature* 305 : 147-148, 1983
- 5) Cook DL and Hales CN : *Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic β -cells*. *Nature* 311 : 71-73, 1984
- 6) Spruce AE, Standen NB and Stenfield PR : *Studies of the unitary properties of adenosine-5'-triphosphate-regulated potassium channels of frog skeletal muscle*. *J Physiol(Lond)* 382 : 213-236, 1987
- 7) Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huahg Y and Nelson MT : *Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channel in arterial smooth muscle*. *Science* 245 : 177-180, 1989
- 8) Ashcroft SJH and Ashcroft FM : *Properties and functions of ATP-sensitive K⁺ channels*. *Cell Signalling* 2 : 197-214, 1990
- 9) Ashcroft FM : *Adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels*. *Annu Rev Neurosci* 11 : 97-118, 1988
- 10) Hamda E, Takikawa R, Ito H, Iuchi M, Terano A, Sugimoto T and Gurachi Y : *Glibenclamide specifically blocks ATP-sensitive K⁺ channel current in atrial myocyte of guinea pig heart*. *Jpn J Pharmacol* 54 : 473-477, 1990
- 11) Buhl AE, Waldon DJ, Conrad SJ, Mulholland MJ, Shull KL, Kubicek MF, Johnson GA, Brunden MN, Stefanski KJ, Stehle RG, Gadwood RC, Kamdar BV, Thomasco LM, Schostarez HJ, Schwartz TM and Diani AR : *Potassium channel conductance : A mechanism affecting hair growth both in vitro and in vivo*. *J Invest Dermatol* 98 : 315-319, 1992
- 12) Sanguinetti MC, Scott AL, Zingaro GL and Siegl PK : *BRL 34915(cromakalim) activates ATP-sensitive*

- K⁺ current in cardiac muscle. Proc Natl Acad Sci USA* 85 : 8360-8364, 1988
- 13) Arena JP and Kass RS : *Activation of ATP-sensitive K⁺ channels in heart cells by pinacidil : Dependence on ATP. AM J Physiol* 257 : H2029-2096, 1989
 - 14) Shen WK, Tung RT, Machuda MM and Kurachi Y : *Activation of the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel. A comparison with pinacidil and lemakalim. Cir Res* 69 : 1152-1158, 1991
 - 15) Hiraoka M and Fan Z : *Activation of ATP-sensitive outward K⁺ current by nicorandil(2-nicotinamidoethyl nitrate) in isolated ventricular myocytes. J Pharmacol Exp Ther* 250 : 278-285, 1989
 - 16) Clap LH and Gurney AM : *ATP-sensitive K⁺ channels regulate resting potential of pulmonary arterial smooth muscle cells. Am J Physiol* 262 : H916-H920, 1992
 - 17) Samaha FF, Heienman FW, Ince C, Fleming J and Balaban RS : *ATP-sensitive potassium channel in essential to maintain basal coronary vascular tone in vivo. Am J Physiol* 262 : C1220-C1227, 1992
 - 18) Gross G, Pieper G, Farber NE, Warltier D and Hardman H : *Effects of nicorandil on coronary circulation and myocardial ischemia. Am J Cardiol* 63 : 11J-17J, 1989
 - 19) Anderson KE : *Clinical pharmacology of potassium channel openers. Pharmacol Toxicol* 70 : 244-254, 1992
 - 20) Antzelevitch C and Di Diego JM : *Role of K⁺ channel activators in cardiac electrophysiology and arrhythmias. Circulation* 85 : 1627-1629, 1992
 - 21) Edwards G and Weston AH : *Structure-activity relationships of K⁺ channel openers. TIPS* 11 : 417-422, 1990
 - 22) Spruce AE, Standen NB and Stanfield PR : *Voltage dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. Nature* 316 : 736-738, 1985
 - 23) Ohno-Shosaku T, Zunkler GJ, Trube G : *Dual effects of ATP on K⁺ channels of mouse pancreatic β -cells. Pflugers Arch* 408 : 133-138, 1987
 - 24) Takano M, Qin D, Noma A : *ATP-decay and recovery of K⁺ channels in guinea pig cardiac myocytes. Am J Physiol* 258 : H45-H50, 1990
 - 25) Tung RT and Gurachi Y : *On the mechanism of nucleotide diphosphate activation of ATP-sensitive K⁺ channel in ventricular cell of guinea-pig. J Physiol(Lond)* 437 : 239-256, 1991
 - 26) Trube G and Hescheler J : *Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane : ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. Pflugers Arch* 401 : 178-184, 1984
 - 27) Noma A and shibasaki T : *Membrane through adenosine-triphosphate regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. J Physiol* 363 : 436-480, 1985
 - 28) Fosset M, De Weille JR, Green RD, Schmid-Antor-machi H and Lazdunski M : *Anti-diabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K⁺ channels. J Biol Chem* 263 : 7933-7936, 1988
 - 29) Friedrich M, Bendorf K, Schwab M and Hirche HJ : *Effects of anoxia on K⁺ and Ca²⁺ currents in isolated guinea pig cardiocytes. Pflugers Arch* 416 : 207-209, 1990
 - 30) Belles B Hescheler J and Trube G : *Changes of membrane currents in cardiac cells induced by long whole-cell recordings and tolbutamide. Pflugers Arch* 409 : 582-588, 1987
 - 31) Findlay I and Dunne MJ : *ATP-inhibited K⁺ channels in an operational state. Pflugers Arch* 407 : 238-240, 1986
 - 32) Kakel Mn Noma A and Shibasaki T : *Properties of adenosine-triphosphate regulated potassium channel in guinea-pig ventricular cells. J Physiol* 363 : 441-462, 1985
 - 33) Cameron JS, Kimura S, Jackson-Burns DA, Smith DB and Bassett AL : *ATP-sensitive K⁺ channels are altered in hypertrophied ventricular myocytes. Am J Physiol* 255 : H1254-H1258, 1988
 - 34) Shen WK, Tung RT, Machuda MM and Kurachi Y : *Activation of the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel by ER-0001533, a newly synthesized vasorelaxant. Cir Res* 70 : 1054-1061, 1992
 - 35) Cook NS : *The Pharmacology of potassium channel and their therapeutic potential. Trends Pharmacol Sci* 9 : 21-28, 1988
 - 36) Sargent CA, Sleph PG, Dzwonczyk S, Normandin D, Antoaccio MJ and Grover GJ : *Cardioprotective effects of the cyanoguanidine potassium channel opener P-1075. J Cardiovasc Pharmacol* 22, No 4, 1993