

# Ischemic Preconditioning의 심근보호 효과에 관한 연구 : 좌심실기능, 심근경색부위, Protein Kinase C 등에 대한 영향\*

중앙대학교 의과대학 조직학교실 및 내과학교실\*\*

류호준\*\* · 박준수 · 김 현 · 유언호\*\* · 라봉진 · 김호덕

## = Abstract =

### Ischemic Preconditioning in Isolated Rabbit Heart : Effect on Left Ventricular Function, Infarct Size, and Protein Kinase C\*

Ho-Jun Yoo, M.D.,\*\* Jun-Soo Park, M.D., Hyun Kim,  
Un-Ho Ryoo, M.D.,\*\* Bong-Jin Rah, M.D., Ho-Dirk Kim, M.D.

*Departments of Histology and Internal Medicine,\*\* College of Medicine,  
Chung-Ang University, Seoul, Korea*

**Background :** It has been demonstrated that ischemic preconditioning(IP, repetitive brief period of ischemia and reperfusion) enhances recovery of post-ischemic contractile dysfunction and reduces incidences of reperfusion-arrhythmia and infarct size after a prolonged ischemia. A lot of mechanisms have been proposed, however, controversies still remain. Recent studies suggested that IP could activate protein kinase C(PKC). Therefore, we measured left ventricular function, myocardial creatine kinase(CK) and PKC activities, and infarct size to assess whether IP's cardioprotective effect is related to PKC activation using isolated rabbit hearts.

**Methods and Results :** Hearts isolated from New Zealand White rabbits(1.5-2.0kg body weight) were perfused with Tyrode solution by Langendorff technique. After stabilization of baseline hemodynamics, the hearts were subjected to 60-min ischemia followed by 120-min reperfusion with IP(IP group, n=15) or without IP(control group, n=14). IP was induced by 4 cycles of 5-min global ischemia and 5-min reperfusion. Left ventricular function including developed pressure(LVDP), dP/dt, heart rate(HR), and coronary flow(CF) was measured to determine the recovery of LVDP, RPP(rate-pressure product, HR $\times$ LVDP) and CF to baseline measurement. Frequency of arrhythmia was counted on reperfusion. Myocardial CK-MB, myocardial cytosolic and membrane PKC were measured and the infarct size was determined by staining with tetrazolium salt and planimetry. Data were analyzed by one-way ANOVA, Tukey's post-hoc test and t-test. There was no significant differences in the recovery of LVDP, +dP/dt, RPP, and CF and frequency of arrhythmia during reperfusion between the control and the IP groups. In comparison with the control group, however, CK-MB was significantly

---

\*본 연구의 일부는 1995년도 교육부조성 기초의학 학술연구비 지원에 의하여 이루어짐.

lowered in the IP group( $p < 0.05$ ). Cytosolic PKC was significantly decreased but membrane PKC was increased( $p < 0.05$ ). These findings indicate that PKC was translocated and activated by IP. Furthermore infarct size was smaller and limited to the antero-lateral or posterior wall and papillary muscle in the IP group( $p < 0.05$ ).

**Conclusion** : These results indicate that IP does not improve post-ischemic contractile dysfunction after a prolonged ischemia of 60 minutes but has an infarct-limiting effect. This cardioprotective effect of IP may be related to PKC activation.

**KEY WORDS** : Infarct size · Ischemia and reperfusion · Ischemic preconditioning · LV function · Protein kinase C.

## 서 론

심근은 호기성(aerobic) 조직으로 동맥경화나 혈전 등이 원인이 되어 이에 공급되는 혈류가 차단되면 심근 세포는 20분이내에 괴사를 일으키기 시작하며 3시간정도 허혈이 계속되면 심근의 대부분은 경색을 일으키게 된다<sup>1)</sup>. 혈전 등에 의하여 차단된 혈류는 혈전용해제의 투여로 재소통될 수는 있으나 실제에 있어서 심근경색을 일으키기 전에 혈류재전을 시행한다는 것은 매우 어렵다. 따라서 허혈로 야기된 심근세포의 기능적 또는 형태학적 변화는 치명적임은 주지의 사실이나 Murry 등<sup>2)</sup>은 허혈발생후 5분이내에 혈류를 재건한 실험에서 후속된 보다 긴 기간동안의 허혈에도 불구하고 심근세포는 역설적으로 허혈에 대하여 저항성이 있음을 관찰하고 짧은 기간동안 반복된 허혈로 나타나는 심근보호 효과를 ischemic preconditioning(이하 IP로 약함)이라고 하였다. 이와 같은 IP의 심근보호 효과는 약물투여에 의하여 나타나는 것과는 달리 내재적으로 발생하는 것으로 간헐적으로 일어나는 허혈상태로부터 시작하여 심근경색으로 발전되기까지의 세포생물학적인 전개과정이나 발생기전을 이해하며 개입술시 심장기능 회복증진이나 후유증의 최소화를 위한 방법의 모색이 가능하다는 점 때문에 많은 심장연구자들의 관심의 대상이 되고 있으며 IP에 의한 심근보호 효과는 잠종개, 돼지, 토끼, 흰쥐 등을 이용한 실험에서 증명되고 있다<sup>3-12)</sup>.

잠종개나 토끼를 이용한 실험결과 IP의 심근보호 효과를 볼 수 있는 허혈의 한계는 60분이내일 것으로 추측되고 있으나<sup>5,12)</sup> 흰쥐를 이용한 실험에서는 IP를 실시하면 후속된 허혈기간이 160분에 이르더라도 재관류시 심장기능의 회복이 증진되었다는 실험결과로<sup>10)</sup> IP효과를

나타내는 허혈기간(time window of sustained ischemia)이나 허혈기간과 IP효과 사이의 양-반응관계에 대해서는 아직도 이론이 많다. 이와 더불어 IP효과에 대한 발생기전으로 adenosine<sup>13,14)</sup>, stress protein mRNA발현<sup>15,16)</sup> 등이 가설로 제시되고 있으나 adenosine억제제를 사용하거나<sup>11)</sup> stress protein생성을 차단하더라도<sup>7,17)</sup> IP효과는 소실되지 않았으며 여러 연구자들<sup>18-21)</sup>은 IP효과가  $\alpha 1$ -아드레날린성 기제로부터 나타날 것으로 추측하여 이론이 많다. 최근에는 adenosine과 관련하여 protein kinase C(PKC)의 활성화<sup>22,23)</sup>, 칼슘항상성<sup>24,25)</sup> 등이 IP효과와 밀접한 관계가 있을 것이라는 실험결과들이 보고되고 있다. 그러나 이러한 결과들은 실험동물에 따라 다른점이 많으므로 IP와 관계있는 공통적 발생기전(universal mechanism)에 대하여는 논란이 많다.

따라서 저자들은 IP후 허혈-재관류시 심실기능 증가나 재관류유발성 부정맥 발생빈도, 심근경색범위, creatine kinase(CK)유출 감소 등의 심근보호 효과의 발생유무를 우선적으로 관찰하고 IP에 의한 심근보호 효과들이 확인된다면 이상의 효과들이 PKC 활성화와 관계있는가를 알아 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 재료

일정한 환경조건하에서 복합사료와 물을 제한없이 주어 사육한 New Zealand White종 토끼(체중 1.5~2.0kg)를 암수 구별없이 실험동물로 사용하였다. 실험동물에게는 도살 24시간 전부터는 물만 주었으며 무작위로 선택하여 허혈대조군(대조군,  $n=14$ ), IP군( $n=15$ ) 및 baseline PKC활성도 측정을 위한 실험군( $n=5$ )으

로 나누어 사용하였다.

본 실험에서 사용한 화학약품은 PKC assay kit (Promega, Madison, WI, USA)를 제외하고는 모두 Sigma Chemical(St Louis, Mo, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

## 2. 실험동물의 처치

모든 실험은 미국생리학회에서 추천하는 실험동물 사용지침(Guidelines for the Use of Laboratory Animals, American Physiological Society, 1985)에 따라 실시하였다. Heparin(300IU/kg)을 복강내로 투여하고 30분이 경과한 후 실험동물의 후두부를 강타하여 실신시켜 즉시 흉부를 절개하고 심장을 적출하였다. 적출한 심장을 미리 냉각시켜둔 생리식염수에 담구어 대동맥에 카눌라를 삽관하고 견봉합사로 묶은 후 심장관류장치(Size No.5, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany)에 고정하여 non-recirculating Langendorff방법에 따라 산소로 포화된 Tyro-de용액(containing in mM: NaCl 140, KCl 4.4, CaCl<sub>2</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.0, HEPES buffer 3.0, and glucose 10.0; pH 7.4)으로 관류하였다. 실험중 관류액의 온도와 심장을 매다는 방(water-jacketed heart chamber)의 온도는 37℃로, 관류압과 관류량은 각각 60mmHg, 35ml/min으로 유지하였다.

## 3. 실험 protocol

전체적인 실험 protocol은 Fig. 1과 같다. 심장을 Tyrode용액으로 15~20분동안 관류하여 심박동이 비교적 일정히 유지되기 시작하면 suction electrode를 우심방 외벽에 2~3mm 간격으로 붙이고 이에 연결된 전기자극기(Advanced Stimulator, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK)를 통하여 1분당 심박동수

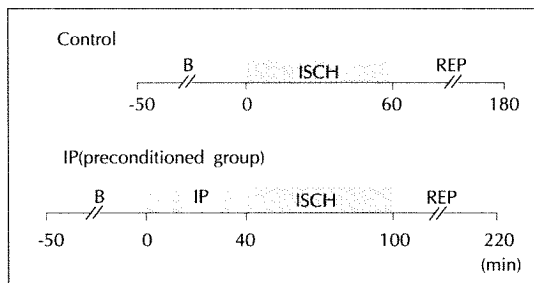


Fig. 1. Schematic illustration of experimental protocol. B, baseline; IP, ischemic preconditioning; ISCH, ischemia; REP, reperfusion.

가 150이 되도록 조정하여(4V, 0.5msec interval) 30분동안 관류하여 심장기능이 일정히 유지되도록한 후 (이 기간을 baseline hemodynamics로 설정하였다) 실험을 실시하였다. IP후 심근보호 효과를 볼 수 있는 후속되는 허혈기간은 60분이내라는 실험결과(Kim 등 1995)에 기초하여 대조군에서는 IP없이 60분동안 관류를 차단하여 전체허혈(global ischemia by no-flow) 후 120분동안 재관류하였으며 IP군에서는 5분동안의 전체허혈과 5분동안의 재관류를 연속적으로 4회 반복하여 IP를 유도한 후 대조군에서와 같이 60분동안 전체허혈, 120분동안 재관류를 실시하였다.

## 4. 좌심실기능의 측정

Baseline hemodynamics가 유지되면 카눌라에 연결된 latex balloon(size 10, Hugo Sachs Elektronik)을 폐정맥을 통하여 좌심실에 삽입하고 압력전달장치(pressure transducer, Harvard Apparatus)에 연결하였다. Screw-driven precision syringe를 이용하여 latex balloon에 생리식염수를 넣어 좌심실 이완말기압(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)이 8~10mmHg가 되도록 조정한 후 baseline 및 재관류 시작후 실험 protocol에 따라 좌심실압(left ventricular pressure), 좌심실압의 미분값(dP/dt), 심박동수 등 좌심실의 기능적 척도들을 4-channel curvilinear polygraph(Harvard Apparatus)에 각각 기록하였다. 좌심실의 일량(work)은 좌심실내압(left ventricular developed pressure, LVDP)에 심박동수를 곱하여 산출하였으며 60분동안 허혈후 재관류시 재관류시작점으로 부터 규칙적인 박동(regular rhythm)이 나타나기 시작하는 점까지의 시간을 측정하였고 재관류동안 나타나는 부정맥(ventricular tachycardia and/or ventricular premature contraction)의 발생 빈도를 측정하였다.

## 5. 관혈류(coronary flow, CF)의 측정

관류를 시작하여 심장기능이 일정히 유지되게한 후 관류액의 누출을 방지하기 위하여 폐동맥과 대정맥을 견봉합사로 묶은 후 우심방을 통하여 우심실내로 카눌라를 삽관하고 관류액이 잘 흐르도록 고정하여 관혈류를 측정하였다. CF는 관류량을 심장의 wet weight로 나누어 ml/min/g wet weight로 표기하고 그 회복율을 구하였다.

## 6. 심근내 CK-MB분획 활성도 측정

각 실험종료후 좌심실의 일부(1g정도)를 취하여 PBS(phosphate-buffered saline, pH 7.4)에서 균질화하고(Ultra-Turax T-25, Germany) 균질액을 원심 분리하여(15,000g, 30minutes) 상청액을 total CK 및 CK-MB활성도 측정에 사용하였다. CK-MB활성도는 진단용 시약 kit를 사용하여 분광광도계(340nm, Pharmacia-LKB Ultrospec III, Cambridge, UK)로 측정하였다.

## 7. Protein kinase C(PKC) 활성도 측정

PKC활성도는 Takai 등<sup>20)</sup>의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 실험종료후 좌심실을 분리하여 20mM Tris-HCl, 250mM sucrose, 1.0mM iodoacetic acid, 1.0mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 1.0mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 1.0mM EGTA(ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)N, N, N', N'-tetraacetic acid), 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol(pH 7.4, 4°C)을 함유한 용액을 첨가하여 균질화한 후(Ultra-Turax T-25, Germany) 4°C 하에서 100,000g로 1시간동안 원심분리하여 상청액을 세포질분획(cytosol fraction)으로 사용하였다. 침전물을 다시 위의 용액에 Triton X-100(0.3 vol%)을 첨가한 용액으로 녹여 4°C하에서 1시간동안 교반하고 원심 분리하여 상청액을 세포막분획(membrane fraction)으로 사용하였다. 각 분획의 PKC 활성도는 비동위원소 정량(non-radioactive assay)kit(Promega, USA)를 사용하여 5 $\mu$ g의 phosphatidylserine을 첨가하지 않았을 때와 첨가하였을 때의 활성도의 차이로 계산하였으며 1nmol의 phosphate를 기질에 옮기는데 필요한 ki-

nase의 양을 1단위(unit, U)로 하였다. Baseline PKC활성도는 허혈이나 IP없이 관류시작후 50분동안 baseline hemodynamics가 일정히 유지되게 하여 위와같은 방법으로 측정하였다.

## 8. 좌심실 괴사크기의 추정

각 실험종료후 심장을 관류장치로 부터 분리하여 실온에서 1% tetrazolium chloride(in phosphate buffer, pH 7.4)에 20분동안 침적한 후 10% 중성 포르말린으로 고정하였다. 고정된 심장을 심저부와 평행하는 방향으로 2mm 간격으로 횡절단한 후 심저부를 향하는 횡단면을 Kodak Ektachrome 필름(ISO 100)으로 사진촬영하여 괴사부위 측정에 사용하였다. 횡단필름을 영사막에 투사하고 심실중격을 포함하는 좌심실 횡단면(LV cross sectional area)과 괴사부위의 단면(infarct area)을 추적하여 균질한 무게를 가진 종위위에 복사한 후 cut out-and-weight 방법으로 각각의 면적을 구하고 두께(2mm)를 곱하여 좌심실에 대한 괴사부위의 부피분율(% infarction/left ventricle volume)을 구하여 괴사 크기(infarct size)를 결정하였다.

## 9. 통계처리

모든 통계수치는 평균표준오차(SEM)로 표기하였다. 분산분석을 실시하여 유의성이 있다고 판정되면 Tukey's post-hoc test와 t-test로 검정하여 p값이 0.05 이하인 경우를 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 결 과

### 1. 좌심실의 기능적 척도의 변화

좌심실 수축기최대압(left ventricular peak pres-

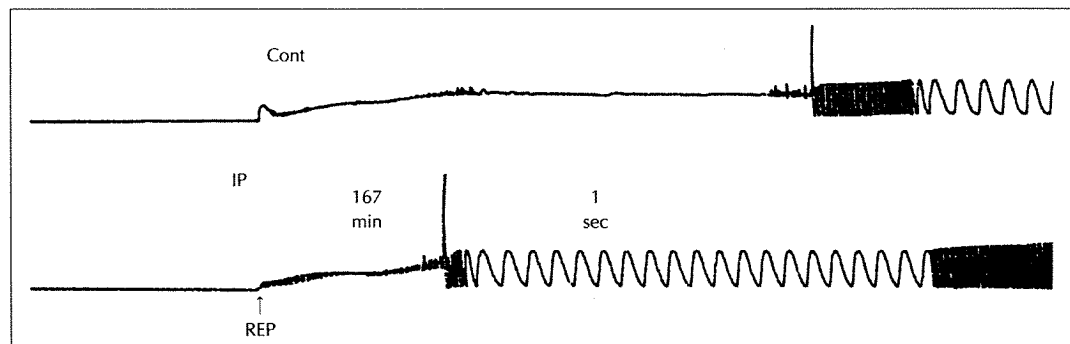


Fig. 2. Polygraph tracing of the left ventricular pressure on reperfusion(REP) after 60 min sustained ischemia. Cont, control ; IP, preconditioned group.

sure)에서 이완말기압(end-diastolic pressure)을 뺀 값인 LV developed pressure(LVDP), LVDP심박동수인 RPP(rate-pressure product) 및 좌심실내압의 최대미분값(+dP/dt)을 구하여 baseline에 대한 회복율을 산출하였다. Baseline의 LVDP, +dP/dt 및 RPP는 각각  $83.7 \pm 2.2$ mmHg,  $1,080 \pm 67$ mmHg/sec,  $12,552 \pm 328$ 이었다.

대조군에서는 재관류시작후  $362 \pm 20$ 초에, IP군에서는  $258 \pm 23$ 초에 규칙적인 박동이 시작되어(Fig. 2) IP군에서 비교적 규칙적인 박동이 시작되는 시간이 빨랐다( $p < 0.01$ ). LVDP는 대조군 및 IP군 모두 재관류 시간 경과에 따라 증가, 재관류후 45분경 부터는 거의 baseline값의 90%까지 도달하였으나 재관류시작점에서만 대조군에 비하여 IP군에서 유의하게 증가하였고( $p < 0.05$ ) 이후에는 두군사이에서 유의한 차이를 볼 수 없었다(Fig. 3). +dP/dt는 대조군이나 IP군에서 모두 LVDP와 유사한 회복경향을 나타내었으나 두군사이에서 재관류 전과정중 유의한 차이는 볼 수 없었다(Fig. 3). RPP 회복율은 대조군이나 IP군에서 모두 LVDP에서와 유사한 회복경향을 나타내었으며 재관류시작점에서는 대조군에 비하여 IP군에서 유의한 증가를 나타내었으나( $p < 0.01$ ) 이후부터는 두군사이에서 유의한 차이를 볼 수 없었다(Fig. 3). 재관류기간중 부정맥 발생빈도에 있어서는 대조군에서 3예(21.4%), IP군에서는 2예(13.3%)에서만 심실세동(ventricular fibrillation)을 나타내어 이는 통계처리에서 제외하였다. 심실빈맥(ventricular tachycardia)이나 조기박동(ventricular premature contraction) 등의 부정맥 발생빈도에 있어서는 대조군에서  $119 \pm 31$ , IP군에서  $94 \pm 12$ 회로 두군사이에서 유의한 차이를 볼 수 없었다(Fig. 4). 이상으로 허혈후 재관류시 대조군과 IP군 사이에서 심장기능회복에 대한 차이는 볼 수 없었다.

## 2. 관혈류(coronary flow, CF) 회복율의 변화

Baseline에서의 심장관류량은  $4.1 \pm 0.1$ ml/min/g wet weight이었다.

CF는 재관류 5분후 부터 거의 baseline값의 85~90%까지에 도달하였으며 대조군에 비하여 IP군에서 대체로 증가율이 컸으나 두군사이에서 유의한 차이는 볼 수 없었다(Fig. 5).

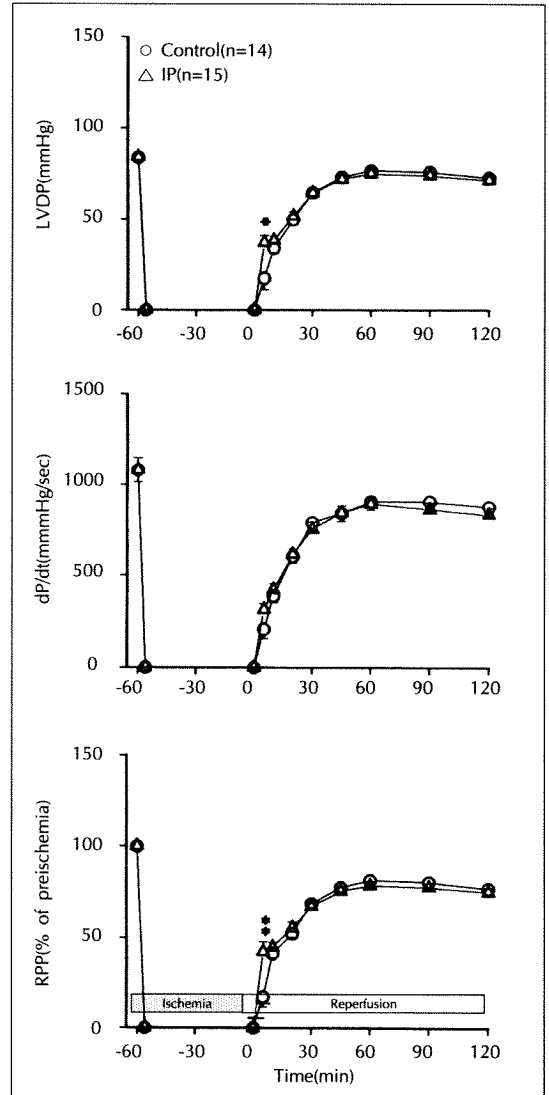
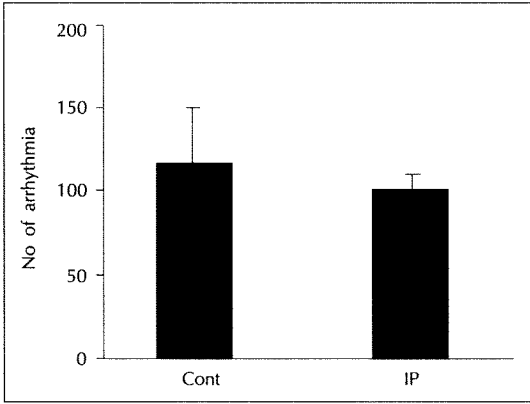


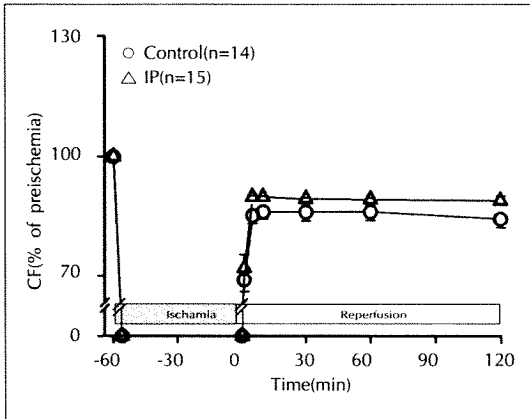
Fig. 3. Changes of the left ventricular developed pressure (LVDP), +dP/dt, and rate-pressure product(RPP) during reperfusion. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , control vs IP group.

## 3. 심근내 CK-MB분획의 활성도 변화

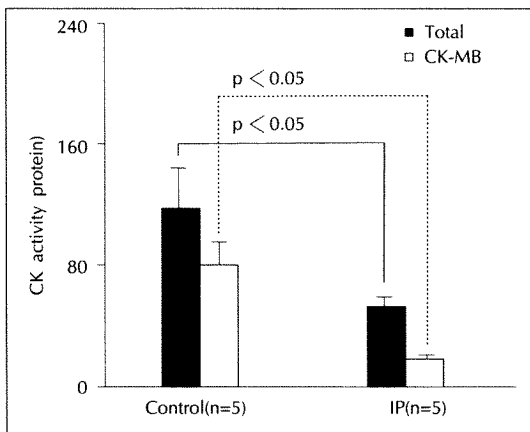
허혈-재관류후 심근내 total CK활성도는 대조군, IP군에서 각각  $118.25 \pm 17.95$ ,  $56.40 \pm 3.51$ U/mg protein으로 대조군에 비하여 IP군에서 현저히 저하되어 있었으며( $p < 0.05$ ) CK-MB분획의 활성도 역시 대조군, IP군에서 각각  $80.97 \pm 17.27$ ,  $18.63 \pm 3.37$ U/mg protein으로 대조군에 비하여 IP군에서 현저히 저하되어 있었다(Fig. 6,  $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Frequency of arrhythmias. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Cont, control ; IP, preconditioned group.



**Fig. 5.** Changes of the coronary flow(CF) recovery during reperfusion. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Cont, control ; IP, preconditioned group.



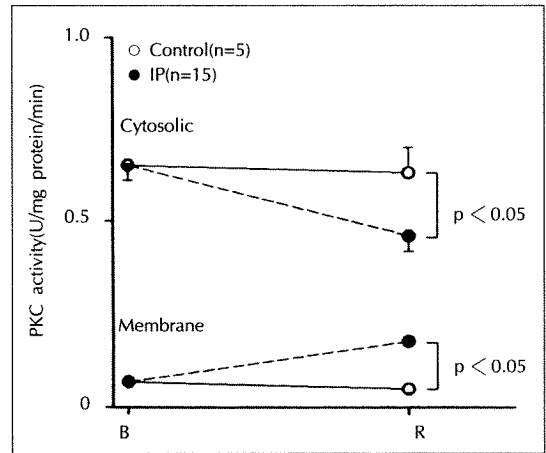
**Fig. 6.** Myocardial total creatine kinase(CK) and MB fraction(CK-MB) activities. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Cont, control ; IP, preconditioned group.

#### 4. Protein kinase C(PKC)의 변화

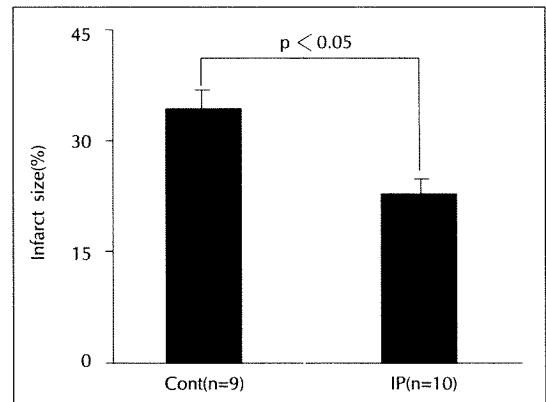
Baseline의 세포질분획 및 세포막분획의 PKC 활성도는 각각  $0.65 \pm 0.041$ ,  $0.07 \pm 0.007$  U/mg protein/min 이었다. 대조군에서 세포질분획 및 세포막분획의 PKC 활성도는 각각  $0.63 \pm 0.068$ ,  $0.05 \pm 0.010$  U/mg protein/min이었으며 IP군에서는  $0.46 \pm 0.041$ ,  $0.18 \pm 0.013$  U/mg protein/min으로 IP군에서는 대조군에 비하여 세포질분획은 감소되어 있었으며( $p < 0.05$ ) 세포막분획은 증가되어 있었다(Fig. 7,  $p < 0.05$ ).

#### 5. 심근괴사 부위의 부피분율

심근괴사부위는 심침에서 심저부에 이르기까지 매우 다양한 양상으로 나타났으며 대부분 심침으로부터 두번



**Fig. 7.** Changes of cytosolic and membrane fractions of protein kinase C(PKC) activity. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. B, baseline ; R, after 120 min reperfusion ; IP, preconditioned group.



**Fig. 8.** Infarct size as % of left ventricular volume. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Cont, control ; IP, preconditioned group.

제, 세번째 및 네번째 절편에서 뚜렷하였다. 심근괴사 부위의 부피분율은 대조군에서  $33.2 \pm 1.5\%$ , IP군에서  $21.4 \pm 2.3\%$ 로 대조군에 비하여 IP군에서 유의한 감소를 볼 수 있었다(Fig. 8,  $p < 0.05$ ).

## 고 안

### 1. IP가 재관류시 좌심실기능에 미치는 영향

IP의 심근보호효과와 허혈기간 사이의 양-반응 관계나 IP효과를 볼 수 있는 허혈기간(time window of sustained ischemia)은 확립되어있지 않다. 전신마취하에서 시행되는 생체내 동물실험에서는 IP후 후속되는 허혈기간을 30분에서 60분으로 한정하고 있으나<sup>4,6,21,24,25,27,28</sup> 적출관류 심장을 이용한 실험결과 IP효과를 볼 수 있는 허혈기간의 한계점은 60분정도로 알려지고 있다<sup>12</sup>. 이들의 연구결과에 기초하여 본 연구에서도 적출관류 토끼심장을 이용하여 5분-5분동안의 허혈-재관류를 연속적으로 4회 실시하여 IP를 유도한후 60분동안 허혈후 120분동안 재관류하였다. 재관류 동안 심장기능을 나타내는 대부분의 척도들(LVDP, +dP/dt, RPP, CF회복율 등)은 패지를 이용한 실험결과<sup>29</sup>에서 나타난 것과 같이 두군 모두 재관류 시간경과에 따라 점차 회복되는 경향을 나타내었으며 서로 유의한 차이를 나타내지 않았을 뿐만 아니라 재관류시작후 규칙적인 박동을 회복하는데 걸린 시간은 IP군에서 4분정도로 대조군의 6분에 비하여 현저하게 짧았으나 빈맥 등의 부정맥 발생빈도에 있어서는 90~110회 정도로 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 이와는 대조적으로 흰쥐의 적출심장을 이용한 실험에서 IP후 60분 또는 60분이상의 매우 긴 기간동안의 전체허혈에도 불구하고 관혈류나 심박출량이 증가하는 등의 심장기능 증가가 관찰되었다<sup>10,30</sup>. 이들은 5분-5분 동안의 허혈-재관류를 1회 실시하여 IP를 유도하였는데 잡종개나 토끼와 비교하여 흰쥐는 IP에 대한 역치(threshold)가 높고<sup>31</sup> 생화학적으로도 토끼나 사람과는 차이가 있으며<sup>32</sup> IP자체로 부터 유발될 수 있는 myocardial stunning에서 관찰되는 여러 가지 기능장애가 5분-5분 동안의 허혈-재관류 1회 실시만으로 나타날 수 없기 때문에<sup>33</sup> 5분-5분 동안의 허혈-재관류 1회 실시로 IP가 유도되어 후속된 보다 긴 기간동안의 허혈시 심근괴사범위의 한정 등이 나타날 수 있는가 하는 점에 대하여는 논란의 여지가 없지않다. 따라서 적출

관류 토끼 심장에서는 IP를 실시하더라도 60분이상 허혈시 재관류중 심장기능의 회복증가는 기대 할 수는 없을 것으로 생각된다.

### 2. IP효과와 CK-MB분획 유출, 괴사범위와의 관계

위에서 기술한 바와 같이 본 실험결과 대조군, IP군 모두에서 재관류시 심근수축기능의 회복증가나 부정맥 발생빈도의 감소 등은 볼 수 없었으나 IP군에서는 괴사범위의 감소를 관찰할 수 있었다. 전신마취하에서 잡종개를 대상으로 IP후 60분동안 국소허혈을 실시한 Nao 등<sup>5</sup>의 실험에서도 괴사범위의 감소를 볼 수 있었다. 국소허혈 또는 전체허혈에서 일어나는 심근세포의 생물학적 반응에 대한 차이는 명확치 않으나 국소허혈시 허혈 중심부에서는 혈류가 거의 영(zero)에 가깝게 되고 허혈 주변의 정상부위는 오히려 정상이상으로 혈류가 증가하므로 전체허혈시에는 허혈반응이 비교적 균등하게 일어나는 반면 국소허혈시에는 혈행의 재소통 여부에 따라 지역적으로 차이가 많다<sup>34</sup>. 더우기 토끼심장에는 잡종개와는 달리 부행로(collateral)가 없기 때문에 이상의 결과를 같은 기전에 의하여 나타난 것으로 보는 것은 타당성이 적다. 본 실험결과 심근내 total CK나 CK-MB분획의 활성도는 대조군에 비하여 IP군에서 모두 현저히 저하되어 있었다. 이는 대조군에 비하여 IP군에서 CK (CK-MB분획 포함)가 세포외로 다량 유출되었거나 유출속도가 증가하였음을 간접적으로 시사하는 것이나 IP군에서 심근괴사범위가 축소된 결과로 볼 때 CK유출 정도는 근손상 정도와 비례한다는 사실과는 상반되는 것이다. 그러나 Apple 등<sup>35</sup>은 급성심근경색 환자 27예를 대상으로 혈전용해치료를 시행한 결과 혈행이 유지된 환자군에서 CK-MB분획의 유출이 현저히 증가함을 관찰하였고 Baardmann 등<sup>36</sup>도 GUSTO Enzyme Substudy에서 정맥내로 heparin을 투여하여 신속한 재소통을 수행한 결과 재소통이 되지않은 군에 비하여 심근경색범위가 한정되고 CK-MB분획의 유출속도가 증가함을 관찰하였다. 본 실험결과만으로 CK-MB분획의 유출증가가 IP에 의하여 나타난 것으로 단정지을 수는 없지만 본 실험결과는 이들의 결과를 간접적으로 뒷받침해줄 수 있는 것으로서 토끼 심장에서는 IP로 전처치할 경우 적어도 60분동안 후속된 허혈시 심근괴사 범위가 한정되는 효과가 있음은 부인할 수 없으며 이러한 보호 효과는 아마도 IP를 실시할 경우 허혈후 재관류시 혈행

의 개통(patency)유지로 부터 나타나는 것으로 추측되며 CK-MB분획 유출의 증가도 혈행의 개통정도에 따라 일어나는 것으로 추측된다.

### 3. IP와 protein kinase C(PKC)와의 관계

본 실험결과 심근세포내 PKC 총량은 약간의 차이는 있으나 대조군, IP군에서 0.64U/mg protein/min 정도였으나 120분동안 재관류후 IP군에서는 세포질분획이 0.65에서 0.46U/mg protein/min로 크게 감소한 반면 세포막분획은 0.07에서 0.18U/mg protein/min로 현저히 증가하여 PKC가 세포질에서 세포막으로 전위(translocation)되어 활성화가 일어나고 있음을 보여주고 있다. PKC는 세포외부의 신호를 감지하고 이를 세포내로 수용하도록 하는 신호전달경로(signal transduction pathway)를 구성하는 중요한 요소중의 하나이다. Downey 등<sup>32)</sup> IP중에 A<sub>1</sub> adenosine수용기와 G protein이 결합하여 phospholipase C가 활성화되면 세포막의 인지질이 분해되어 DAG(diacylglycerol)를 형성하며 DAG는 PKC를 활성화하여 아직 밝혀지지 않은 않았으나 어떤 열쇠단백질(key protein)을 인산화하여 심근보호효과가 나타나는 것으로 기술하였다. Bogoyevitch 등<sup>37)</sup>은 흰쥐 심근세포에서 tumor-promoting phobol ester(long-lived DAG analogue)를 사용한바 PKC 동종효소중 epsilon( $\epsilon$ )분획이 세포질에서 세포막으로 빠른 전위가 일어나며 전위된 PKC- $\epsilon$ 은 거의 1시간동안 세포막에서 활성화를 나타냄을 관찰하였다. Ytrehus 등<sup>23)</sup>도 PKC활성억제제인 staurosporine을 투여한 결과 IP효과가 차단되며 PKC활성촉진제인 PMA(4 $\beta$ -phorbol 12-myristate 13-acetate)를 투여할 경우 경색범위가 작아짐을 관찰하고 특히 장시간동안의 허혈시 PKC활성화는 IP효과에 필요한 조건일 것으로 추측하였다. 이들의 가설을 요약하면 IP중에 심근세포에서는 adenosine 수용기점유(receptor occupancy)가 일어나며 이로 부터 PKC가 활성화되면 ion channel, 미세관(microtubule), 대사조절효소 등 단백질효과기(protein effector)들이 인산화로 활성화되어 심근보호효과가 나타난다는 것이다. Armstrong and Ganote<sup>22)</sup>는 인산효소(phosphatase: 이는 serine, threonine 잔류물 등을 탈인산화한다)차단제인 o-kadaic acid를 사용하여 단백질효과기들을 인산화시킴으로서 심근보호 효과가 나타남을 관찰하였고 Dow-

ney 등<sup>32)</sup>은 미세관 활동을 억제하는 colchicine을 사용하여 IP효과가 차단됨을 확인하였다. 최근에는 adenosine 수용기 차단제를 사용하더라도 PKC가 활성화되어 IP효과가 나타남이 흰쥐에서 관찰되었다<sup>38)</sup>. 따라서 adenosine 수용기만이 PKC 활성화에 필요한 중심인자로 보기는 어려우며 이상의 다른 연구결과들과 본 연구결과를 종합하여 보면 IP를 실시할 경우 비활성 PKC가 세포막과 같은 활동성이 큰 세포소기관으로 전위, 활성화되어 세포막에 존재하는 adenosine과는 또 다른 효과기들을 활성화시킴으로서 나타날 수 있을 것으로 믿어진다. Liu 등<sup>39)</sup>과 Thornton 등<sup>40)</sup>도 토끼심장에서 IP효과는 A<sub>1</sub> adenosine수용기에 의하여 매개될 것이라고 하였으나 Li and Kloner<sup>11)</sup>는 흰쥐실험에서 adenosine수용기 길항제인 STP(8-(p-sulfo-phenyl)theophylline)투여시 심근경색의 크기에 변화가 없었으며 다량의 adenosine을 투여하더라도 심근 보호효과는 나타나지 않음을 관찰하고 adenosine 수용기는 IP효과를 나타내는 주요소는 아닐 것임을 시사하였다. 이러한 상반된 결과로 볼 때 IP효과와 PKC 활성화는 밀접한 관계가 있음은 부인할 수 없으나 adenosine이 모든 동물에서 나타나는 공통된 기전은 아닐 것임은 명백하다할 수 있다.

### 4. IP효과의 발생기전에 관한 다른 가설

고에너지인산 고갈속도 지연, myocardial stunning, 산소라디칼, heat shock protein(hsp),  $\alpha_1$ -아드레날린성 수용체 등이 IP의 심근보호효과 발생기전으로 제시되어오고 있으나 universal mechanism에 관하여는 논란이 많다. Murry 등<sup>27)</sup>은 잠종개를 이용한 실험결과 IP로 허혈시 고에너지인산 고갈속도가 지연됨으로서 심근보호효과가 나타날 것이라고 하였으나(허혈기간중 고에너지인산 분해를 나타내는 주원인으로 알려진 oligomycin-sensitive mitochondrial ATPase 억제물질에 의한 것<sup>41)</sup>으로 볼 수 있다) 기능적으로 oligomycin-sensitive mitochondrial ATPase 억제물질이 결여된 흰쥐에서도 IP효과는 나타나고 있다. Shiki and Hearse<sup>42)</sup>, Cohen 등<sup>43)</sup>, Miura 등<sup>44)</sup>은 IP에 의한 myocardial stunning으로부터 에너지보전이 일어나 재관류시 심근수축력을 증진시키는 것으로 보았으나 IP를 실시하더라도 심근수축력에는 큰 변화가 없었으며<sup>29,45)</sup> 본 연구결과에서도 심근수축력은 증가되지 않았다. 따라



서 허혈후의 myocardial stunning은 IP에 의하여 약화되지는 않는 것으로 보인다. 산소라디칼도 IP효과의 요소로 알려져 있으나<sup>46,47)</sup> Iwamoto 등<sup>8)</sup>은 산소라디칼 청소물질(scavenger)을 투여하더라도 IP효과에는 변화가 없음을 관찰하고 산소라디칼도 IP효과의 직접적인 요인은 아님을 증명하였다. Knowlton 등<sup>48)</sup>은 IP시 짧은 기간동안의 허혈로 hsp가 합성되어 이로 부터 보호효과가 나타날 것이라고 하였으나 hsp 합성억제물질을 투여하더라도 IP효과는 나타나며<sup>7)</sup> heat shock후 hsp 발현은 허혈후 8시간이 경과하면 최대치에 도달하나 심근색범위의 한정효과는 없었다는 실험결과<sup>49)</sup> 등으로 볼 때 hsp가 IP효과를 나타내는 주된 요인으로 보기는 어렵다. Banerjee 등<sup>18)</sup>은 흰쥐를 이용한 실험에서  $\alpha_1$ -아드레날린성 수용체 차단제를 사용한 결과 IP효과가 소실되어  $\alpha_1$ -아드레날린성 내인성기전(endogenous mechanism)이 IP효과와 관계있을 것으로 기술하였으나 토끼심장에서는 교감신경절제후에도 심근보호는 관찰되지 않았으며<sup>50)</sup>  $\alpha_1$ -아드레날린성 수용체차단제를 사용했을 때에도 IP효과는 관찰되었다<sup>21)</sup>. 따라서 IP효과는 위에서 언급한 어떤 한가지 기전에 의하여 나타나는 것이 아니라 이들의 복합적 작용하여 나타나는 것으로 보아야 할 것으로 생각된다.

## 5. 본 실험의 한계

본 실험에서는 토끼의 적출심장을 이용하여 정상온도 범위(normothermia)에서 허혈이나 재관류를 시행하였다. 따라서 임상적으로 자주 사용되는 저온의 고농도 포타슘(K)용액을 사용하는 저온심정지(hypothermic cardioplegia)나 전신마취하에서 생체를 대상으로 한 실험시 심근세포에서 나타나는 반응들과는 차이가 있을 수 있음은 사실이다. 흰쥐를 이용한 실험에서는 저온상태와 비교하여 정상 온도범위에서 IP유도 및 허혈-재관류를 실시했을 때 좌심실의 기능회복이 보다 더 증가된 것으로 관찰되었으나<sup>10)</sup> 재관류기간을 120분이상으로 증가시킬 경우 허혈심근세포에서 일어나는 반응은 실험동물의 종에 따라 다르게 나타날 수 있으므로 본 실험에서 사용한 것과 유사한 조건을 임상에 적용하기에는 아직도 해결해야 할 문제들이 많다. 이와 더불어 본 실험에서는 혈액이 아닌 생리적 용액(physiological solution, Tyrode용액)으로 관류하였기 때문에 재관류유발성 심근손상과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 혈구(특히

백혈구) - 관상혈관 내피세포 또는 혈구 - 심근세포 사이에서 나타나는 생물학적 반응들을 관찰할 수 없었다. 그러나 토끼는 흰쥐와는 달리 생화학적으로 사람의 모델이 될 수 있고<sup>32)</sup> 사람과 같이 심장에는 부행로가 없으므로 예비실험에서 괴사부위 분석시 부행로에 의한 공변동(covariation)을 배제할 수 있었기 때문에 본 실험에서는 토끼를 실험동물로 선택하였다.

이상으로 적출심장에서 IP를 실시할 경우 60분동안의 허혈후 재관류시 심장기능의 회복증가는 나타나지 않았으나 심근괴사범위를 한정지어주는 보호효과를 관찰할 수 있었으며 이러한 심근보호효과는 PKC 활성화와 밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

### 연구배경 :

짧은 기간동안 허혈 - 재관류를 반복(ischemic preconditioning, IP)할 경우 후속되는 보다 긴 기간동안의 허혈에도 불구하고 재관류시 심근의 수축기능이 증가되며 심근괴사범위도 한정되는 등의 심근보호효과가 있는 것으로 알려져 있으나 발생기전에 대하여는 논란이 많다. 최근에는 재관류시 심근세포내 protein kinase C(PKC)의 활성화로 IP효과가 나타날 것이라는 실험결과들이 보고되고 있으나 논란이 많다. 따라서 본 연구에서는 적출 토끼심장을 이용하여 IP후 허혈 - 재관류시 심근보호효과가 나타나는지를 관찰하고 IP효과가 나타난다면 심근세포내의 PKC 활성도를 측정하여 IP효과가 PKC활성과 관계있는가를 알아보고자 하였다.

### 연구방법 및 결과 :

적출관류 흰토끼 심장을 이용하여 관류를 차단하는 방법으로 전체허혈을 유도하였으며 전체허혈(5분), 재관류(5분)를 4회 반복하여 IP를 유도하고 60분동안 전체허혈후 120분동안 재관류를 실시하였다(IP군, n=15). 대조군(n=14)에서는 IP없이 60분동안 전체허혈후 120분동안 재관류를 실시하였다. 허혈후 재관류기간동안 좌심실기능(LVDP; +dP/dt; RPP; LVEDP; CF), 부정맥 발생빈도와 각 실험종료후 심근세포내 creatine kinase(CK)-MB분획과 PKC의 활성도를 측정하였고 심근괴사 범위를 결정하기위하여 1% tetrazolium salt로 염색하여 형태계측하였다. LVDP, +dP/dt, HR, CF회복율, 부정맥 발생빈도 등은 대조군,

IP군 사이에서 유의한 차이를 볼 수 없었으나 심근내 CK-MB분획의 활성도는 IP군에서 현저히 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). 심근세포내 PKC중 세포질분획의 활성도는 IP군에서 현저히 감소된 반면( $p < 0.05$ ) 세포막분획은 IP군에서 현저히 증가되어 있어( $p < 0.05$ ) PKC가 IP로 세포질에서 세포막으로 전위, 활성화되고 있음을 나타내었다. 심근괴사부위도 대조군에 비하여 IP군에서 현저히 감소되어 있었다( $p < 0.05$ ).

#### 결 론 :

이상으로 적출관류 토끼심장에서 IP후 60분 허혈-120분 재관류시 좌심실기능 회복은 증가되지 않으나 심근괴사범위를 한정시켜주는 보호효과가 있으며 이와 같은 IP의 심근보호효과는 PKC활성화로부터 나타나는 것으로 생각된다.

#### References

- Downey JM : Ischemic preconditioning. *Nature's own cardioprotective intervention. Trends Cardiovasc Med* 2 : 170, 1992
- Murry CE, Jennings RB, Kloner RA : Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 : 1124, 1986
- 김호덕 · 김대중 · 이재경 · 심태섭 · 라봉진 : Preconditioning이 허혈-재관류 토끼심장에 미치는 영향에 관한 연구. *순환기* 22 : 418, 1992
- Li Y, Vasquez J, Gallagher K, Lucchesi B : Myocardial protection with preconditioning. *Circulation* 82 : 609, 1990
- Nao B, McClanahan T, Groh M, Schott R, Gallagher K : The time limit of effective ischemic preconditioning in dogs(abstract). *Circulation* 82(Suppl III) : III-271, 1990
- Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W : Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 66 : 1133, 1990
- Thornton JD, Striplin S, Liu GS, Swafford A, Stanley AWH, Van Winkle DM, Downey JM : Inhibition of protein synthesis does not block protection afforded by preconditioning. *Am J Physiol* 259 : H1822, 1990
- Iwamoto T, Miura T, Adachi T, Noto T, Ogawa T, Tsuchida A, Iimura O : Myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning was not attenuated by oxygen-free radical scavengers in the rabbit. *Circulation* 83 : 1015, 1991
- Kitakaze M, Hori M, Takashima S, Sato H, Kamada T : Augmentation of adenosine production during ischemia as a possible mechanism of myocardial protection in ischemic preconditioning(abstract). *Circulation* 84(Suppl II) : II-306, 1991
- Cave AC, Hearse DJ : Ischemic preconditioning and contractile function : Studies with normothermic and hypothermic global ischaemia. *J Mol Cell Cardiol* 24 : 1113, 1992
- Li Y, Kloner RA : The cardioprotective effects of ischemic 'preconditioning' are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. *Circulation* 87 : 1642, 1993
- Kim DJ, Kim H, Park JI, Shim TS, Rah BJ, Kim HD : Relation between ischemic preconditioning and the duration of sustained ischemia. *J Korean Med Sci* 10 : 121, 1995
- Thornton JD, Van Winkle DM, Downey JM : Preconditioning protection is mediated through adenosine receptors(abstract). *Circulation* 82(Suppl III) : III-464, 1990
- Downey JM : The role of adenosine in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 23(Suppl III) : S.28, 1991
- Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K : Heat-shock response is associated with enhanced post-ischemic ventricular recovery. *Circ Res* 63 : 543, 1988
- Knowlton AA, Brecher P, Ngoy S, Apstein CS : Brief cardiac ischemia induces expression of heat shock protein 70(abstract). *Circulation* 80(Suppl II) : II-237, 1989
- Downey JM, Thornton JD, Liu GS, Stanley AWH : Preconditioning does not involve synthesis of a protective protein(abstract). *Circulation* 82(Suppl III) : III-271, 1990
- Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Cairns CB, Bensard DD, Harken AH : Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an  $\alpha$ 1-adrenergic mechanism. *Circ Res* 73 : 656, 1993
- Kitakaze M, Hori M, Takashima S, Sato H, Inoue M, Kamada T : Ischemic preconditioning increases adenosine release and 5' nucleotidase activity during

- myocardial ischemia and reperfusion in dogs : implications for myocardial salvage. *Circulation* 87 : 208, 1993
- 20) Thornton JD, Daly JF, Cohen MV, Yang X-M, Downey JM : Catecholamines can induce adenosine receptor-mediated protection of the myocardium but do not participate in ischemic preconditioning in the rabbit. *Circ Res* 73 : 649, 1993
  - 21) Toombs CF, Wiltse AL, Shebuski RJ : Ischemic preconditioning fails to limit infarct size in reserpinized rabbit myocardium. Implication of norepinephrine release in the preconditioning effect. *Circulation* 88[part 1] : 2351, 1993
  - 22) Armstrong SC, Ganote CE : Effects of protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A on metabolically inhibited and ischaemic isolated myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 24 : 869, 1992
  - 23) Ytrehus K, Liu Y, Downey JM : Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 266 : H1145, 1994
  - 24) Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E : Mechanism of preconditioning. Ionic alterations. *Circ Res* 72 : 112, 1993
  - 25) Kim HD, Kim H, Rah BJ : Ischemic preconditioning does not attenuate post-ischaemic reperfusion dysfunction but has an infarct-limiting effect(abstract). *Eur Heart J* 15(Suppl) : 143, 1994
  - 26) Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y : Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissue : I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* 252 : 7603, 1977
  - 27) Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB : Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during sustained ischemia. *Circ Res* 66 : 913, 1990
  - 28) Liu GS, Stanley AW, Downey JM : Ischemic preconditioning is not dependent on neutrophils or glycolytic substrate at reperfusion in rabbit heart. *Cardiovasc Res* 26 : 1195, 1992
  - 29) Miyamae M, Fujiwara H, Kida M, Yokota R, Tanaka M, Katsuragawa M, Hasegawa K, Ohura M, Koga K, Yabuuchi Y, Sasayama S : Preconditioning improves energy metabolism during reperfusion but does not attenuate myocardial stunning in porcine hearts. *Circulation* 88 : 223, 1993
  - 30) Zhai X, Lawson CS, Cave AC, Hearse DJ : Preconditioning and post-ischaemic contractile dysfunction : the role of impaired oxygen delivery vs extracellular metabolite accumulation. *J Mol Cell Cardiol* 25 : 847, 1993
  - 31) Liu Y, Downey JM : Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* 263 : H1107, 1992
  - 32) Downey JM, Liu Y, Ytrehus K : Adenosine and the antiinfarct effects of preconditioning. In : *Ischemic Preconditioning. The Concept of Endogenous Cardioprotection*, Przyklenk K, Kloner RA, Yellon DM, eds, Boston, Kluwer, 1994, pp 137-152
  - 33) Rah B-j, Kim H-d, Park Y-W : Effect of pretreatment with diltiazem on left ventricular function and intracellular calcium distribution in postischemic reperfused guinea-pig hearts. *Coronary Artery Dis* 5 : 415, 1994
  - 34) Hearse DJ, Braimbridge MV, Jynge P : Ischemia and reperfusion : The progression and prevention of tissue injury. In : *Protection of the Ischemic Myocardium : Cardioplegia*, Raven, New York, 1981, pp 21-49
  - 35) Apple PS, Henry TD, Berger CR, Landt YA : Serum cardiac troponin I, CK-MB, and myoglobin in early detection of coronary reperfusion following thrombolytic therapy(abstract). *Circulation* 88(4) : 1 - 151, 1993
  - 36) Baardmann T, Hermens WT, Lenderink T, Molhoek GP, Simoons ML : Rapid reperfusion by t-PA reduces infarct size compared to streptokinase : the GUSTO enzyme substudy. *Circulation* 88(4) : 1 - 151, 1993
  - 37) Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH : Characterization of protein kinase C expression in adult rat heart. *Circ Res* 72 : 757, 1993
  - 38) Bugge E, Ytrehus K : Ischaemic preconditioning is protein kinase C dependent but not through stimulation of a adrenergic or adenosine receptors in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 29 : 401, 1995
  - 39) Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, Downey JM : Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84 : 350, 1991

- 40) Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM : *Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. Circulation* 85 : 659, 1992
- 41) Rouslin W, Erickson JL, Solaro RJ : *Effect of oligomycin and acidosis on rates of ATP depletion in ischemic heart muscle. Am J Physiol* 250 : H503, 1986
- 42) Shiki K, Hearse DJ : *Preconditioning of ischemic myocardium : Reperfusion-induced arrhythmias. Am J Physiol* 253 : H1470, 1987
- 43) Cohen MV, Liu GS, Downey JM : *Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. Circulation* 84 : 341, 1991
- 44) Miura T, Goto M, Urabe K, Endoh A, Shimamoto K, Iimura O : *Does myocardial stunning contribute to infarct size limitation by ischemic preconditioning? Circulation* 84 : 2504, 1991
- 45) Ovize M, Przyklenk K, Hale S, Kloner RA : *Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. Circulation* 85 : 2247, 1992
- 46) Uraizee A, Reimer KA, Murry CE, Jennings RB : *Failure of superoxide dismutase to limit infarct size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs. Circulation* 75 : 1237, 1987
- 47) Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA : *Preconditioning with ischemia : is the protective effect mediated by free radical-induced myocardial stunning? (abstract). Circulation* 78(Suppl II) : II-77, 1988
- 48) Knowlton AA, Brecher P, Apstein CS : *Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia. J Clin Invest* 87 : 139, 1991
- 49) Donnelly TJ, Sievers RE, Vissern FLJ, Welch WJ, Wolfe CL : *Heat shock protein induction in rat hearts : a role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion. Circulation* 85 : 769, 1992
- 50) Matsuki T, Cohen MV, Holt G, Ayling J, Hearse DJ, Downey JM : *Chronic whole body sympathectomy fails to protect ischemic rabbit hearts. Am J Physiol* 256 : H1322, 1989