

L-Arginine이 허혈후 심근 기절 및 미세혈관 기절현상에 미치는 효과에 관한 실험적 연구*

고려대학교 의과대학 내과학교실

박창규 · 김영훈 · 박희남 · 이상철 · 임도선 · 한승환
서홍석 · 심완주 · 오동주 · 노영무

= Abstract =

Effect of L-Arginine on Post-Ischemic Myocardial and Vascular Stunning in Open-Chest Dogs

Chang Gyu Park, M.D., Young Hoon Kim, M.D., Hee Nam Park, M.D.,
Sang Chil Lee, M.D., Do Sun Yim, M.D., Seong Whan Han, M.D.,
Hong Seog Seo, M.D., Wan Ju Shim, M.D.,
Dong Ju Oh, M.D., Young Moo Ro, M.D.

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : Although recent studies have demonstrated that infusion of L-arginine reduces myocardial necrotic area during prolonged ischemia, its effects on transient postischemic myocardial dysfunction(myocardial stunning) and microvascular dysfunction(vascular stunning) are not well known. To investigate whether intravenous administration of L-arginine, physiological nitric oxide(NO) precursor, during reperfusion would attenuate postischemic myocardial dysfunction and microvascular dysfunction, 15 open-chest dogs were studied.

Methods : In 15 pentobarbital anesthetized open-chest dogs, left circumflex coronary artery was occluded for 20 minutes and was followed by a reperfusion for 60 minutes. L-Arginine (30mg/kg)(L-arginine group, n=8) or saline(control group, n=7) was given intravenously by a bolus 1 minute before reperfusion and was followed by a continuous infusion(10mg/kg/min) for 30 minutes during reperfusion. Before coronary occlusion and 60 minutes after reperfusion, coronary blood flow(CBF) and coronary vascular resistance(CVR) were measured after intracoronary injection of each of acetylcholine(0.01µg/kg) and adenosine(1.5µg/kg), and reactive hyperemia with coronary occlusion(RH₂₀) for 20 seconds was measured. Myocardial segment thickening in the area of ischemia-reperfusion was measured using 2D-echocardiography. The echocardiographic images were digitized and analyzed by cardiac image analyzer.

Results : The results obtained 60 minutes after reperfusion were as follows.

1) CBF was decreased by 41% in L-arginine group vs 30.1% in control group($p < 0.05$) and CVR was increased by 83.9% in L-arginine group vs 19.3% in control group after 60 minutes of reperfusion, compared with pre-occlusion baseline values.

*본 연구는 고려대학교 생명과학연구소 임상연구비 일부보조로 이루어진 것임.

2) Percent change of CBF was decreased in control group(acetylcholine by 25.8%, adenosine by 29.2%, RH₂₀ by 39.8%), while it was increased in L-arginine group(acetylcholine by 60%, adenosine by 22%, RH₂₀ by 26.7%). Percent change of CVR was increased in control group (acetylcholine by 10.5%, adenosine by 6.9%, RH₂₀ by 21%), but it was decreased in L-arginine group(acetylcholine by 10%, adenosine by 6.6%, RH₂₀ by 1.6%).

Increase of CBF and decrease of CVR were significant on acetylcholine and RH₂₀ between control group and L-arginine group.

3) Fraction of myocardial segment thickening was significantly decreased in L-arginine group (by 80%) compared with control group(by 61.7%, $p < 0.05$).

Results : The finding that L-arginine depressed post-ischemic myocardial contractile function suggests that systemic infusion of L-arginine has an unfavorable effect on myocardial stunning. In contrast, the finding that L-arginine improved CBF and CVR with acetylcholine and adenosine and reactive hyperemia indicates that L-arginine may exert a beneficial effect on vascular stunning. These results suggest that L-arginine may have independent effects on myocardial stunning and vascular stunning.

KEY WORDS : Stunning · L-arginine · Nitric oxide.

서 론

단시간의 심근허혈후 재관류시 심근세포의 손상없이 가역적인 심근의 수축기능장애가 일과성으로 지속되는 심근 기절현상(myocardial stunning)이 유발되는 것은 잘 알려진 사실이나 기절심근을 일으키는 정확한 기전에 대해서는 규명되어야 할 것이 적지않다¹⁻⁶⁾. 지금까지 알려진 심근 기절현상의 기전은 크게 대사적인 요인과 조직학적인 요인 두가지로 대별할 수 있다. 대사적인 요인들로 인한 기전으로는 첫째, 기절심근의 ATP 및 ATP의 전구체인 ADP 감소에 의해 심근섬유가 수축을 하는데 필요한 에너지의 부족에 의한 것^{7,8)}과 둘째, 근형질 내세망(sarcoplasmic reticulum) 장애로 인해 근형질 내세망에 칼슘 유입이 잘 안되어 수축 단백질에 칼슘의 전달장애가 생기고⁹⁻¹¹⁾ 세포내 칼슘의 과축적 및 칼슘에 대한 심근섬유의 감수성 감소로 인해 심근 기절현상이 초래된다는 가설¹²⁻¹⁵⁾과 세째, 재관류시 발생하는 O₂, H₂O₂, OH등의 산소유리기들이 세포막등의 단백질, 지질등을 산화시켜 수축장애를 일으킨다는 것으로 현재 가장 유력하게 제시되고 있는 가설이다¹⁶⁻¹⁹⁾. 또한 심근 기절현상의 기전중 조직학적 요인으로 인한 기전에는 15분간 관동맥 폐쇄후 10분간 재관류를 12회 반복했을 때 세포의 교원조직층(collagen matrix)의 손상과 소실

을 관찰하여 Eng등^{20,21)}은 이러한 구조적인 세포지지 조직의 파손을 심근 기절현상의 기전으로 제시했다. 그러나 관동맥을 15분간 한번 폐쇄하면 교원조직의 손상이 관찰되지 않는다는 점과 일반적으로 심근 기절현상이 회복되는 3~4시간은 교원조직이 복구되거나 재생성 되기에는 너무 짧은 시간이라는 이유로 널리 받아들여지지 못하고 있다.

관동맥을 10분~15분간 단시간 폐쇄 및 재관류시키면 정상 내지 경미한 국소 심근혈류의 감소와 adenosine, acetylcholine, bradykinin등과 같은 혈관확장물질에 대해 기절심근내 혈류증가 예비력이 감소되는 것이 심근 기절현상의 한 원인이라는 가설이 제안되고 있는데^{23,24)} 아직까지 기절심근의 병인론에서 관동맥 혈류 예비력의 역할은 증명되지 않고 있다. 15분이상의 단시간 허혈후 재관류시킬때 심근 기절현상은 물론 심근의 미세혈관기능에도 변화가 일어나 심근내 혈류가 정상의 65%정도로 감소되는 저혈류(low reflow)현상과^{25,26)} 혈관확장제에 의한 혈류증가나 반동성 혈류증가가 감소되는 혈관 기절현상(vascular stunning)이 일어난다고 보고되었으며^{27,28,29)} 최근의 연구들은 심근 허혈 및 재관류시에 관동맥과 관동맥 세분지의 내피세포 의존성 혈관확장능이 손상되는 현상이 주로 재관류 초기에 일어나 심근 괴사 전에 종결되는 것을 관찰했으며^{30,31)} 혈관 평활근에 직접 작용하여 혈관을 확장시키는 혈관 내피세포 비의존성 혈

관확장제인 nitroprusside를 투여하면 정상반응을 보여 혈류가 증가되나 혈관 내피세포 의존성 혈관확장제인 acetylcholine에는 혈류 증가에 장애가 발생하는 것으로 보아 이는 혈관 내피세포 손상에 기인하는 것으로 생각되고 있다.³²⁻²⁴⁾

최근 일산화질소(nitric oxide)의 합성 전구체인 L-arginine투여가 심근경색을 감소시키는 효과가 있다는 보고와^{35,36)} 일산화질소 길항제인 N^G-nitro-L-arginine을 투여하여 Endothelium Derived Relaxing Factor(EDRF)를 차단하면 심근 기절현상이 악화된다는 보고가 있어 간접적으로 일산화질소투여가 심근 기절현상에 도움이 될 가능성도 있으나³⁷⁾ 심근허혈후 재관류 시 세포내에서 발생하는 O₂와 일산화질소가 작용하여 세포에 독성이 있는 peroxynitrite(ONOO⁻)와 OH를 형성하여 세포에 손상을 준다는 상반된 보고도 있어^{38,39)} 아직까지 심근기절에 대한 L-arginine의 효과에 대하여 규명되어야 할 점이 적지 않다. 이에 본 연구는 일산화질소 전구체인 L-arginine의 투여가 단시간의 심근 허혈과 재관류후 심근 기절현상(myocardial stunning)의 회복과 미세 혈관기능에 어떤 효과가 있는 지를 구명하기 위해 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 실험동물의 준비

총 15마리의 잡종견(15~25kg)에 sodium pentobarbital을 체중 kg당 30mg 정맥주사하여 마취를 유도하고 기관지관을 삽관후 Harvard 호흡기(tidal volume : 20ml/kg, 분당 12회)로 인공호흡을 시켰다. 실험도중 마취상태를 유지하기 위하여 체중 kg당 5~10mg의 sodium pentobarbital을 마취의 정도가 낮아지는 소견이 있을때 추가로 정맥 주사하여 마취상태를 유지하였다. 동맥 절개법에 의해 우고동맥에 유도삽입관을 넣은후 혈압을 VR-12 multichannel recorder(Honeywell)로 측정하였고 심전도는 lead II를 기록하고 심박수를 구하였다. 오른쪽으로 개를 눕히고 좌측 제5늑간부를 개흉한 뒤 심낭을 열고 심장을 노출시킨후 심장을 지탱하는 심낭요람을 만든 다음 좌회선지 동맥의 기시부를 2~3cm 박리하여 이곳에 전자 혈류 탐침(electromagnetic flow probe, Carolina Medical Electronics)을 넣고 혈류 측정기(Cliniflow II Model FM 701D)를 이용하여 관상혈류를

측정하였다. 전자 혈류 탐침의 바로 근위부에 임파선 조영용 30 gauge 주사 바늘을 삽입하고 주입용 펌프(infusion pump)에 연결하여 분당 0.5cc의 속도로 heparin을 혼합한 생리 식염수가 주입되도록 하였고 원위부에는 기계적 관동맥 폐쇄를 위한 명주실 올가미(snare)를 위치시켰다.

2. 관동맥 폐쇄 및 재관류

좌회선지에 장착한 전자 혈류 탐침 원위부에 명주실 올가미를 이용하여 20분간 관동맥 폐쇄를 한 뒤 올가미를 풀고 60분간 재관류하였다. 올가미를 풀고 재관류시 발생하는 심실성 부정맥을 예방하기 위해 10% lidocaine 2ml IV로 전처치 한후에 올가미를 풀었다.

3. L-arginine의 투여

1) 대조군(n=7)에서는 20분간 좌회선지 동맥을 폐쇄시키고 재관류 1분전에 생리 식염수를 정맥내로 주입을 시작하여 재관류후 30분간 계속하였으며 재관류후 60분까지 관찰하였다.

2) L-Arginine군(n=8)에서는 L-arginine(Sigma chemical Co.)을 생리 식염수에 녹여 10% L-arginine 용액으로 상온에서 보관하여 사용하였다. L-Arginine은 관동맥 폐쇄 20분후 재관류 1분전에 30mg/kg을 bolus로 정맥투여한후 분당 10mg/kg로 재관류 30분까지 정맥내로 투여하고 재관류 60분까지 관찰하였다.

4. Acetylcholine과 adenosine의 투여

1) Acetylcholine

좌회선지 동맥의 근위부에 삽입된 임파선 조영용 30G 바늘을 통하여 0.01µg/kg의 acetylcholine을 생리 식염수에 희석시킨 다음 1ml 주사기를 이용하여 손으로 30초동안 일정한 속도로 주입한뒤 관동맥 혈류를 기록하고 관동맥 혈류의 변화를 관찰하였다.

2) Adenosine

Acetylcholine 투여후 관동맥 혈류, 혈압 및 맥박의 변화가 소실된뒤 적어도 5분 경과후 1.5µg/kg의 adenosine을 acetylcholine과 같은 방법으로 투여한 다음 관동맥 혈류를 기록하고 관동맥 혈류의 변화를 관찰하였다.

5. 혈액학적 측정

동맥압과 심박수의 측정은 폐쇄전, 폐쇄후 즉시, 재관류 직전 그리고 재관류 60분에 기록하였고 폐쇄전과 재관류 60분에는 약물 투여전후 및 반동성 혈류측정 전후에 기록하였다.

6. 관동맥 혈류와 반동성 혈류증가의 측정(Fig. 1)

관동맥 혈류는 관동맥 폐쇄 전후, 재관류 60분간 연속적으로 측정 모니터 하였으며 폐쇄전과 재관류 60분의 기저치 및 acetylcholine과 adenosine 각각의 약물투여시에 측정하였다.

반동성 혈류증가(reactive hyperemia)의 측정은 각각 acetylcholine과 adenosine 투여 뒤 명주실 올가미로 20초간 관동맥을 폐쇄한후 풀어주고 1) 최고 혈류치, 2) 기저상태의 혈류치와 최고 혈류치와의 비(ratio of peak flow to baseline flow), 3) 최저 관동맥 저항치(ratio between mean aortic pressure and peak flow)를 측정하였다.

기저상태와 재관류 60분에 acetylcholine과 adenosine 투여 및 반동성 혈류변화에 따른 관동맥 저항(평균 혈압/평균 관동맥 혈류)을 구하였다.

7. 국소적 심근 수축기능의 측정

각 군에서 국소적 심근 수축기능을 평가하기 위하여

관동맥 폐쇄전, 폐쇄후, 재관류 60분후에 심첨부, 유두근 하부 및 후두근 부위의 영상을 각각 Hewlett-Packard사 모델의 77020A 심초음파 기계를 사용하여 기록하였으며 실험 전기간 동안 초음파 영상의 기록조건(gain, reject, brightness)을 일정하게 하였다. 영상은 1/2 inch 비디오 테잎에 기록하여 분리된 화상 밀도분석기구(off-line videodensitometer system, Color Cardiology Workstation, Freeland System)를 이용하여 분석하였다. 심전도의 R파로 심주기를 얻었으며 각 심주기에서 확장기말 영상은 심전도의 R파와 일치하면서 좌심실 내경이 가장 큰 정지영상으로 정하고 수축기말 영상은 좌심실 내경이 가장 작은 정지영상으로 정해 Centerline 방법을 이용하여 심내막과 심외막을 따라 그려 심근면적을 구하고 이를 12분절로 나누었다. 유두근 직하부위 좌회선지 영역 측부심근의 국소적 운동장애 정도는 다음 공식 :

"segmental shortening fraction = $\frac{((\text{End-diastolic length} - \text{End-systolic length}) / \text{End-diastolic length}) \times 100}{\text{End-diastolic length}}$ "에 의해 심내막 수축 %와 총수축 %로 나누어 구하였다.

8. 통계 처리

실험에서 얻은 모든 자료는 평균값과 표준편차를 구하

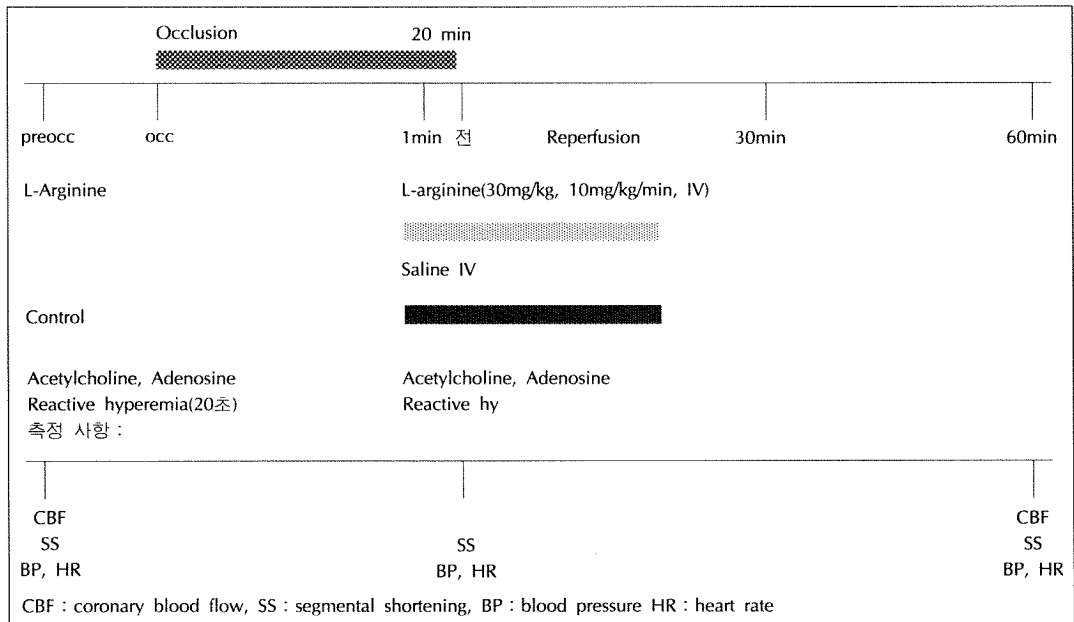


Fig. 1. Experimental protocol.

었다. 자료의 처리는 SAS 통계 프로그램을 이용하였으며 각 자료의 평균값을 student t-test(paired and unpaired t test)를 이용하여 p값이 0.05이하인 경우 통계적으로 의미를 두었고 p값이 0.05~0.1인 경우 경계성의 의미를 두었다.

결 과

1. 혈액학적 변화

대조군과 L-arginine군에서 관동맥 폐쇄전과 재관류 60분에 혈액학적 변화는 Table 1에 요약한 바와 같다. 관동맥 폐쇄전의 혈압과 맥박은 양 군에서 차이가 없었으며 재관류 60분에 혈압은 차이가 없었으나 맥박은 L-arginine군에서 폐쇄전 155 ± 15에 비해 재관류 60분에 105 ± 21로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Table 1).

2. 관동맥 혈류와 관동맥 저항 변화(Table 2)

1) 관동맥 혈류의 변화

관동맥 폐쇄전에 비하여 재관류 60분의 관동맥 혈류는 대조군에서 36 ± 18ml/min에서 27 ± 6ml/min, L-arginine군에서 39 ± 10ml/min에서 23 ± 13ml/min로 모두 감소하였으나 통계학적으로 유의한 감소는 아니었고 특히 L-arginine군에서 폐쇄전에 비해 재관류

Table 1. Hemodynamic data

	Baseline	Reperfusion 60min
HR(bpm)		
Control	143 ± 20	111 ± 25
L-Arginine	155 ± 15	105 ± 21*
MBP(mmHg)		
Control	91 ± 10	87 ± 7
L-Arginine	95 ± 18	88 ± 14

MBP : mean blood pressure, * $p < 0.05$ vs baseline

Table 2. Coronary blood flow(CBF) and coronary vascular resistance(CVR) at baseline and reperfusion 60 minutes

	Baseline	Rep 60	% Change ^{a)}
CBF(ml/min)			
Control	36 ± 18	28 ± 6.0	-30.1 ± 33.8
L-Arginine	39 ± 10	23 ± 13*	-41.0 ± 28.3
CVR			
Control	3.0 ± 1	3.3 ± 1	19.3 ± 81.7
L-Arginine	2.5 ± 1	4.7 ± 2*	83.5 ± 68.5

^{a)} : (Rep60-Base)/Base × 100, * : $p < 0.05$ vs baseline

60분에 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p=0.019$, Fig. 2). 관동맥 혈류의 % 변화 [(재관류 60분 혈류 - 기저혈류)/기저혈류 × 100]도 대조군의 -41 ± 28.3에 비해, L-arginine군에서 -30.1 ± 33.8로 더 감소하였으나 유의한 차이는 없었다($p=0.52$).

2) 관동맥 저항의 변화

재관류 60분의 관동맥 혈류저항(CVR)[평균혈압/관동맥 혈류]은 폐쇄전에 비하여 대조군은 3.0 ± 1에서 3.3 ± 1로 증가하였으나 통계학적으로 유의한 것은 아니었으며, L-arginine군은 2.5 ± 1에서 4.7 ± 2로 증가하였다($p=0.016$). 관동맥 저항의 %변화 [(재관류 60분 저항 - 기저저항)/기저저항 × 100]도 대조군의 19.3 ± 81.7보다 L-arginine군에서 83.5 ± 68.5로 증가되었으나 통계적 의미는 없었다($p=0.138$, Fig. 3).

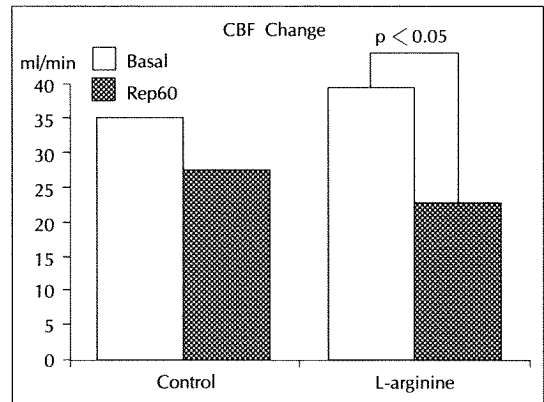


Fig. 2. Change of coronary blood flow(CBF) at baseline and reperfusion 60minutes in control group and L-arginine group.

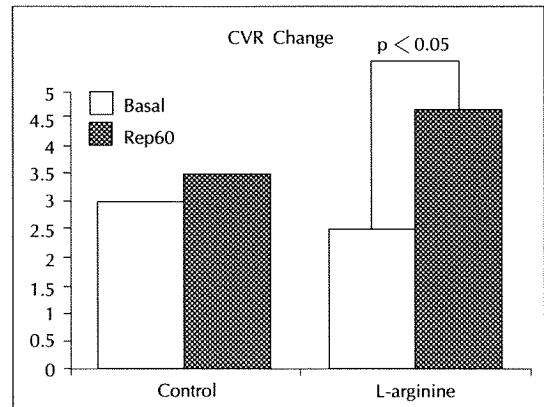


Fig. 3. Change of coronary vascular resistance(CVR) at baseline and reperfusion 60minutes in control group and L-arginine group.

3) Acetylcholine, Adenosine 및 20초 관동맥 폐쇄시 관동맥 혈류와 관동맥 저항의 변화

심근내 미세혈관확장기능 및 혈류 예비력을 알기위한 acetylcholine, adenosine 투여와 반동성 혈류증가 20초에 대한 관동맥 혈류는 관동맥 폐쇄전에 비해 재관류 60분에 대조군에서 모두 감소한 반면(acetylcholine : $159 \pm 105\%$ 에서 $118 \pm 68\%$, adenosine : 165 ± 54 에서 127 ± 60 , 반동성 혈류증가 : $166 \pm 90\%$ 에서 $100 \pm 43\%$), L-arginine군에서는 모두 증가하였다(acetylcholine : $130 \pm 57\%$ 에서 $208 \pm 131\%$, adenosine : $181 \pm 87\%$ 에서 $221 \pm 128\%$, 반동성 혈류증가 : $202 \pm 89\%$ 에서 $256 \pm 194\%$, Table 3, Fig. 4).

관동맥 저항의 변화는 대조군에서는 재관류 60분에 모두 높아진 경향을 보인 반면(acetylcholine : $-57 \pm 13\%$ 에서 $-51 \pm 17\%$, adenosine : $-58 \pm 12\%$ 에서 $-54 \pm 17\%$, 반동성 혈류증가 : $-62 \pm 26\%$ 에서 $-49 \pm 19\%$, $p < 0.05$), L-arginine군에서는 모두 낮아졌으며(acetylcholine : $-52 \pm 11\%$ 에서 $-62 \pm 16\%$ ($p < 0.05$), adenosine : $-61 \pm 12\%$ 에서 $-65 \pm 10\%$, 반동성 혈류증가 : $-64 \pm 11\%$ 에서 $-65 \pm 16\%$), 이러한 변화는 특히 acetylcholine 투여와 반동성 혈류증가 20초에 유의하게 감소된 것을 보였다($p=0.034$, Table 4, Fig. 5).

Table 3. Percent change of peak coronary blood flow at baseline and reperfusion 60 minutes(Rep60)

	Baseline	Rep60	p-value
Acetylcholine			
Control	159 ± 105	118 ± 68	0.24
L-Arginine	130 ± 57	208 ± 131	0.11
Adenosine			
Control	165 ± 54	127 ± 60	0.29
L-Arginine	181 ± 87	221 ± 128	0.11
Reactive Hyperemia			
Control	166 ± 90	100 ± 43	0.06
L-Arginine	202 ± 89	$256 \pm 194^*$	0.51

p-value : vs baseline, * : $p=0.059$ vs control

3. 심근 수축기능의 변화

관동맥 폐쇄 20분뒤 재관류 60분에 관찰한 좌회선지 영역의 국소 벽운동 장애 정도는 Table 5에서 보는 바와 같이 심내막층 수축정도는 대조군에서 $60.8 \pm 19.9\%$, L-arginine군에서 $74.7 \pm 29.8\%$ 감소하여 대조군과 L-arginine군 모두 유의한 차이를 보이지 않았다. 그

Table 4. Percent change of peak coronary vascular resistance at baseline and reperfusion 60 minutes

	Baseline	Rep60	p-value
Acetylcholine			
Control	-57 ± 13	-51 ± 17	0.24
L-Arginine	-52 ± 11	-62 ± 16	0.034
Adenosine			
Control	-58 ± 12	-54 ± 17	0.703
L-Arginine	-61 ± 12	-65 ± 10	0.103
Reactive Hyperemia			
Control	-62 ± 26	-49 ± 19	0.046
L-Arginine	-64 ± 11	$-65 \pm 16^*$	0.846

p-value : vs baseline, * : $p=0.03$ vs control

Rep 60 : reperfusion 60 minutes

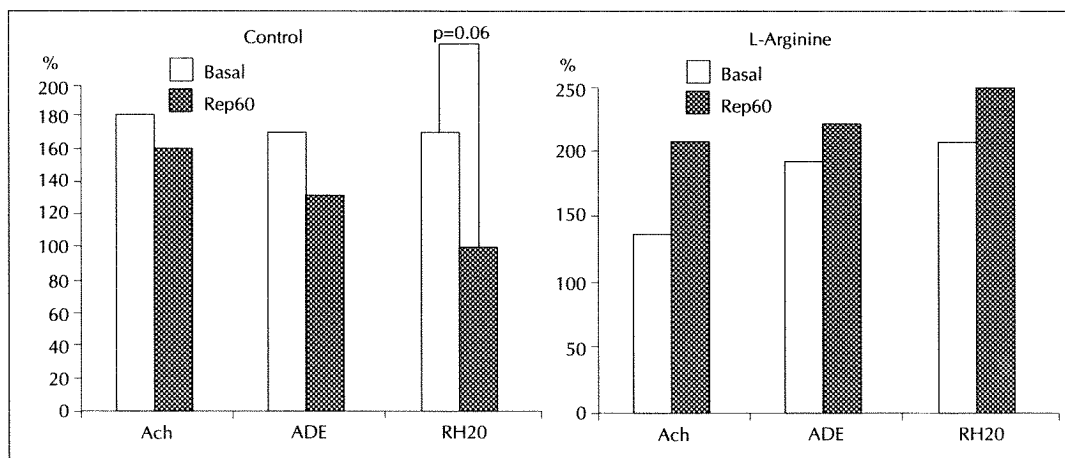


Fig. 4. % change of peak CBF after acetylcholine, adenosine, reactive hyperemia in control group and in L-arginine group.

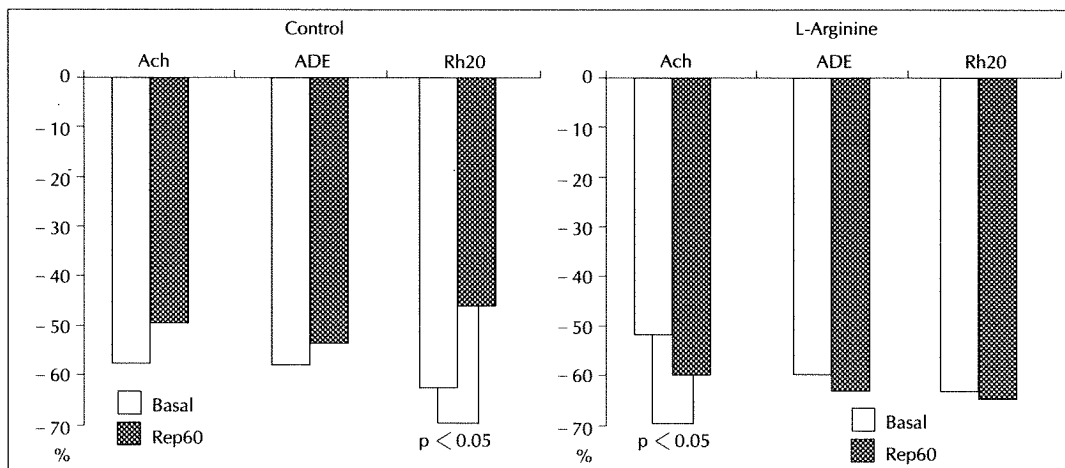


Fig. 5 % change of peak CVR after acetylcholine, adenosine, reactive hyperemia in control group and in L-arginine group.

Table 5. Systolic thickening fraction in the ischemic/reperfused region 20 minutes after coronary occlusion and 60 minutes after reperfusion

	Basal	Rep60	% Change ^①
% Endocardial thickening			
Control	6.9 ± 1.9	2.6 ± 1.1	60.8 ± 19.9
L-Arginine	16.1 ± 2.4	4.8 ± 8.4	74.7 ± 29.8
% Total myocardial thickening			
Control	91.3 ± 14.9	35.4 ± 20.9	61.7 ± 19.8
L-Arginine	81.5 ± 33.1	16.6 ± 11**	80.0 ± 13.5*

* : p=0.052, ** : p < 0.01, vs control

① : (Basal-Rep60)/Basal × 100

그러나 총 심근수축정도는 대조군에서 관동맥 폐쇄시 91.3 ± 14.9%에서 재관류 60분에 35.4 ± 20.9%로 감소한 반면 L-arginine군은 폐쇄전 81.5 ± 33.1에서 재관류

60분에 16.6 ± 11%로 유의하게 감소되었으며(p < 0.05, Fig. 6a). 재관류 60분의 총 심근수축 감소정도(% Δbaseline)도 대조군의 61.7 ± 19.8%에 비해 L-arginine군에서 80 ± 13.5%로 감소되었다(p=0.052, Fig. 6b).

고 안

단시간의 심근허혈후 심근에 혈류가 정상적으로 유입되어도 심근의 수축기능이 서서히 회복되는(post-ischemic myocardial dysfunction) 현상은 1975년 Heyndrickx²³⁾에 의하여 처음 관찰되었는데 개를 이용한 동물실험에서 5분 관동맥 폐쇄후 재관류시 3시간 이

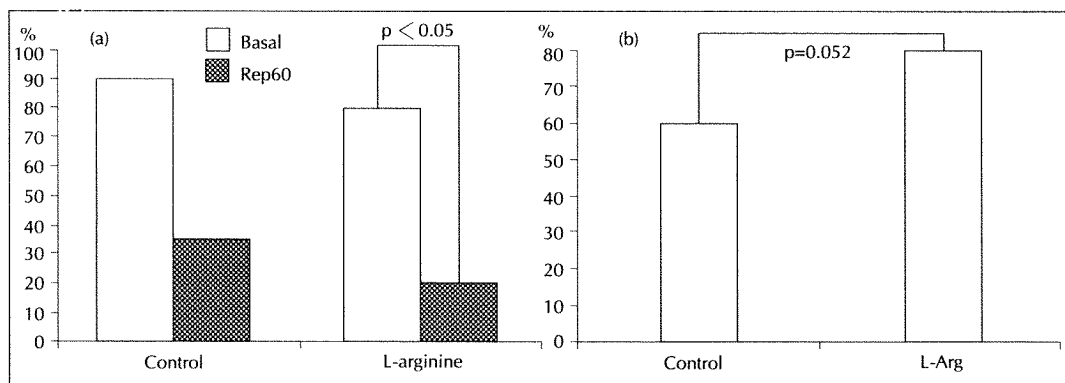


Fig. 6. (a) : The change of myocardial thickening fraction, (b) : The degree of % decrease myocardial thickening fraction in control group and L-arginine group after reperfusion 60minutes.

상, 15분 폐쇄시 6시간 이상 심근벽의 국소적 기능장애가 지속되고 있음을 보고하였다. 그후 Weiner²⁹⁾, Kloner⁴⁰⁾, Bolli등⁶⁾이 20분 이내의 짧은 관동맥 폐쇄후에 심근의 괴사를 동반하지 않으며 심근수축기능의 회복이 지연되는 현상을 관찰하였고, Thereoux⁴⁰⁾, Jennings등⁴¹⁾은 심내막 경색(subendocardial infarction)에서도 살아있는 심외막 심근(subepicardial myocardium)의 기능회복이 수일에서 수주까지 지연된다는 것을 보고하여 이와같이 허혈후 재관류에 의해 심근 손상이 없어도 구조된 심근조직의 기능이 회복되는데 수시간 내지 수일 또는 수주간 지연되는 현상을 1982년 Braunwald등은 심근 기절(myocardial stunning)이라고 처음 명명한 바 있다³⁾.

Kloner등⁶⁾이 실험적으로 3시간의 관동맥 폐쇄와 재관류후 3시간까지 관찰한 모델에서 경색주위에 생존해 있는 심근내 혈류가 정상 65%정도로 감소되어 있다고 하여 이를 저혈류 현상(low reflow phenomenon)이라 명명하였고 그이후 Heyndrickx²³⁾, Bolli등²⁶⁾은 15분간의 단시간 허혈후 재관류에서도 이러한 저혈류 현상을 관찰하여 기절된 심근에서 동반된 혈관기능의 변화를 보고하였다. Nicklas와 Glips등²⁷⁾은 관동맥 15분 폐쇄-1시간 재관류 모델에서 혈관확장제에 의한 혈류 증가나 반동성 혈류증가가 20~24%까지 감소되는 혈관 기절현상을 관찰하였으나 이러한 혈관의 기능적 변화의 기전에 대해서는 많은 논란이 계속되고 있어서 Heyndrickx등²³⁾은 혈류의 감소가 심근 수축력의 감소정도에 정비례하는 것을 관찰하여 수축기능이 저하된 기절된 심근은 산소 소모가 적으므로 혈류가 이에 따라 감소된 이차적 현상이라고 주장한 반면 Bolli²⁶⁾등은 저혈류 현상의 정도가 수축기능의 감소정도와 연관이 없는 것을 관찰하여 이와같은 단기간의 심근허혈 및 재관류는 심근기절뿐만 아니라 심근내 미세혈관에도 독립적으로 미세혈관의 기절현상(microvascular stunning)이 나타남을 보고하였다.

혈관기절을 초래하는 정확한 기전은 아직 알려지지 않았으나 VanBenthuyssen등³³⁾은 혈관 내피세포 비의존성 혈관확장제인 nitroprusside에는 반응이 없이 혈관 내피세포 의존성 혈관확장제인 acetylcholine에만 혈류 증가의 장애가 초래되는 것을 관찰하여 혈관 내피세포 장애의 가능성을 시사하였고 Tsao등³⁴⁾과 VanBenthuyssen등³³⁾도 고양이와 개에서 관동맥 폐쇄와 재관류

시 혈관벽중 내피세포층에만 선택적으로 기능적 변화가 발생되며 전자 현미경상에서도 내피세포층에 국한된 손상을 확인하여 허혈-재관류에서 심외막 혈관의 기능적 변화 뿐만 아니라 이와 일치되는 형태학적 손상을 증명하였다. 이와같이 심근허혈-재관류로 인해 혈관내피세포의 손상이 초래되면 내피세포에서 유리되는 혈관 확장인자인 일산화질소가 감소하므로 단시간의 심근허혈후 재관류로 혈관내피세포의 손상이 동반될때 일산화질소 합성 전구체인 L-arginine의 투여가 심근수축력 회복 지연(stunning) 및 혈관 기절현상에 어떤 효과가 있는지 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

금번 실험에서 L-arginine은 재관류 1분전에 bolus로 주사하여 재관류 30분까지 정주했는데 그 이유는 L-arginine이 투여시 바로 작용하여 그 효과를 나타내기 때문에 재관류 초기에 방출되는 산소유리기등(oxygen-derived radicals) 손상인자에 즉시 작용할 수 있도록 재관류 1분전에 투여하였고 L-arginine의 최대효과는 투여 20~30분에 나타나 1시간정도 지속하기 때문에 재관류 60분에 최대효과를 볼 수 있도록 재관류 30분까지 투여하였다⁴²⁾. 또한 심근허혈-재관류 손상시 저혈류 현상은 대개 15분이상의 관동맥 폐쇄시 나타난다고 보고되었는데 금번 실험에서 20분 관동맥 폐쇄모델을 선택한 이유는 일반적으로 20분이내의 관동맥 폐쇄시는 심근괴사를 동반하지 않기때문에 심근괴사를 동반하지 않으며 확실한 저혈류 현상을 얻기 위해 20분 모델을 선택하였다.

최근에 주목받고 있는 일산화탄소는 혈관 내피세포에서 생성되어 혈관을 확장시키는 기능 이외에도 혈소판 응집과 백혈구의 활성화를 억제하고, 평활근의 증식을 감소시키는 기능이 있어서 국소 미세혈관의 기능에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다⁴³⁻⁴⁵⁾. L-Arginine은 일산화질소의 전구물질로서 일산화질소 합성효소(NO synthase)에 의하여 일산화질소로 전환되므로^{46,47)} L-arginine을 투여하면 일산화질소의 생성물이 증가되고 국소 미세혈관의 기능이 개선되어 심근의 기능이 향상되어 심근 허혈 및 재관류에 의한 심근의 손상을 억제하는데 효과가 있는 것으로 알려지고 있다^{48,49)}. Nakanich등³⁵⁾과 Weyrich등³⁶⁾은 각각 개와 고양이를 이용한 재관류 모델에서 L-arginine의 투여로 심근경색 부위를 감소시킴을 관찰하여 L-arginine이 심근허혈 및 재관류 손상에 효과가 있음을 제시하였다. 또한 Hasebe등은 10분 관동맥 폐쇄 모델에서 일산화질소 합성 억제제인 N^G-

nitro-L-arginine를 관동맥내로 투여하였을 때 심근 기절현상의 회복이 더 지연되는 것을 관찰하였다³⁷⁾. 그러나 일산화질소는 패혈증시 대식세포에 의해 다량으로 생성될 수 있으며 이 경우에는 바이러스 및 세균감염에 따른 병리학적 증상을 악화시켜서 오히려 인체에 유해한 요소로 작용하여 피해를 줄 수 있으며, 또한 일산화질소는 허혈-재관류시 세포내에서 발생한 superoxide와 작용하여 세포에 독성이 있는 peroxynitrite(ONOO)와 OH을 형성하여 세포에 손상을 줄 수 있어, L-arginine-NO 경로가 심근 재산산화 손상(reoxygenation injury)을 초래하여 심근수축력을 오히려 감소시킬 수 있다는 보고도 있어^{38,39)} 심근기절에 미치는 일산화질소의 영향에 대해서도 서로 상반되는 의견이 대두되고 있다.

본 연구에서는 L-arginine을 투여한 군에서 재관류 60분에 심근 수축기능이 더 저하된 경향을 보였으며 이는 5분폐쇄와 5분재관류 4차례 반복후 60분 재관류 모델에서 L-arginine 투여군에서 심근 기절현상이 악화되었다는 Morishima등⁵⁰⁾의 보고와 같아서 재관류시 일산화질소의 생성이 증가되면 결국 기절심근에 좋지않은 영향을 미칠수 있는 가능성을 제시하였다. 그러나 이같은 현상이 L-arginine 투여에 따른 일산화질소 생성 증가가 심근에 미치는 효과인지 또는 L-arginine 자체의 효과에 의한 것인지는 금번 연구로 구명할수 없었다.

Hasebe등³⁷⁾의 연구에서 N^G-nitro-L-arginine로 일산화질소 생성을 억제시켰을때 심근 기절현상의 회복이 지연되는데 반해 본 연구에서 일산화질소 전구체인 L-arginine의 투여로 심근 기절현상이 악화된 것은 일산화질소 생성증가외에 다른 요인에 의해 심근 기절현상이 악화되었을 가능성도 생각해 볼 수 있다. 또한 L-arginine의 투여가 L-arginine-NO 경로가 아닌 다른 경로로 작용하여 일산화질소가 합성되지 못하고 그외 세포에 유해한 물질을 생성시킬 가능성도 배제할 수 없을 것으로 보인다. L-arginine은 인체에 투여할 때 염화수소를 붙인 형태로 주사되므로 혈액내로 들어간 염화수소가 심근기능 저하제로 작용할 가능성이 있다. 따라서 이 염화수소의 효과 여부를 확인하기 위해서는 L-arginine의 이형체인 D-arginine을 투여한 대조군과 비교하는 것이 필요한데 금번 연구에서는 D-arginine군은 실험하지 못했다.

L-arginine투여가 심근 기절현상의 회복에 좋지않은 영향을 미치는데 반하여 혈관확장 예비능을 보여준 최대 혈류증가량에 있어서는 L-arginine투여군이 대조군에

비해 높은 혈류증가와 혈관저항 감소를 나타내어 혈관기절 개선효과를 보였다. 본 연구에서 특히 혈관내피세포 비의존성 확장제인 adenosine에 비해 혈관내피세포 의존성 확장제인 acetylcholine을 투여하였을 때 관동맥 혈류의 증가와 관동맥 저항의 감소정도가 증가하였으며 또한 혈류증가 예비력을 잘 반영하는 반동성 혈류증가에서 기저치에 대한 최대 혈류증가의 백분율이 L-arginine군에서 유의하게 증가함을 보여주어 L-arginine의 투여가 허혈후 혈관 확장기능장애를 호전시킬 수 있음을 즉, 혈관 기절현상에 유익한 효과를 나타낼 수 있음을 보여주었다. 금번 연구에서 시행한 20분간의 관상동맥 폐쇄로 미세 저항혈관의 내피세포에도 손상이 왔을 가능성이 있고 또한 NO-synthetase 같은 효소등의 활성도 저하되었을 것으로 보여 어떤 기전으로 L-arginine의 투여가 허혈후 혈관확장 예비력을 호전시켰는지 알 수 없다. 그러나 혈관 기절현상을 호전시킨 결과로 유추해 볼 때 20분간의 허혈후 내피세포의 손상정도가 별로 심하지 않아 L-arginine의 투여로 인한 일산화질소의 합성증가가 어느정도 가능하여 이같은 유익한 효과를 나타내었거나 또는 L-arginine의 혈관에 대한 직접효과로 이러한 효과를 나타내었을 것으로 추측할 수 있으나 정확한 기전은 계획된 연구를 통해 앞으로 구명되어야 할 것이다.

본 연구의 의의

관동맥 폐쇄 및 재관류시 혈관 내피세포 손상이 초래되며 따라서 일산화질소를 투여하는 것이 심근경색의 크기를 감소시켰다는 몇몇 연구가 있었으나 지금까지 심근 기절현상과 일산화질소에 대한 연구는 Hasebe등³⁷⁾이 NO합성효소 억제제인 N^G-nitro-L-arginine을 투여하여 심근 기절현상이 더 심해졌다는 보고외에는 없다.

본 연구는 혈관 기절현상에서 L-arginine의 효과를 관찰한 처음 연구로 생각되며 심근 기절현상에 일산화질소 전구체인 L-arginine을 직접 투여하여 심근 기절현상과 혈관기절의 관계를 동시에 비교 연구한데 그 의의가 있다 하겠다.

요 약

연구배경 :

20분이하의 단시간 심근허혈후 재관류시 심근의 수축

기능 장애가 일과성으로 지속되는 심근 기절현상(stunning)과 심근의 미세혈관 변화로 인한 저혈류 현상 및 혈관 확장제에 의한 혈류증가와 반동성 혈류증가가 감소되는 혈관 기절현상에 일산화질소 합성 전구체인 L-arginine 투여가 어떤 효과가 있는지 알아보려고 하였다.

방 법 :

개흉견(대조군=7, L-arginine군=8)에서 좌회선지 동맥에 자장 혈류탐침기로 혈류를 측정하면서 관동맥 폐쇄전과 20분 폐쇄후 재관류 60분에 혈관 내피세포 의존성 혈관확장제인 acetylcholine 0.01 μ g/kg, 비의존성 확장제인 adenosine 1.5 μ g/kg을 투여하고 혈압, 심박수 및 관동맥 혈류(CBF), 저항(CVR)변화를 관찰하였으며 좌회선지를 20초 폐쇄후 반동성 혈류증가(RH₂₀)의 정도를 관찰하였다. L-Arginine은 재관류 1분전 30mg/kg을 IV bolus로 투여후 재관류 30분까지 분당 10mg/kg로 IV투여하였으며 심근 벽운동장애는 심장초음파를 이용하여 관동맥 폐쇄전과 재관류 60분에 유두근 직하부위의 국소벽 심근수축정도를 측정, 분석하였다.

결 과 :

1) 관동맥 혈류는 L-arginine 투여군에서 관동맥 폐쇄전 39 \pm 10ml/min에서 재관류 60분에 23 \pm 13ml/min로 유의하게 감소하였으며($p < 0.05$), 대조군에서는 36 \pm 18ml/min에서 27 \pm 6ml/min로 혈류가 감소되는 경향을 보였다.

관동맥 저항은 L-arginine군에서는 2.5 \pm 1에서 4.7 \pm 2로 유의하게 증가하여 대조군의 3.0 \pm 1에서 3.3 \pm 1보다 재관류 60분의 저항이 높아진 것을 보였다($p < 0.05$).

2) 심근혈관 확장 예비능을 알기위한 acetylcholine, adenosine의 투여와 반동성 혈류증가 20초에 대한 관동맥 혈류의 % 변화는 재관류 60분후 대조군에서 각각 25.8%, 29.2%, 39.8% 감소한 반면 L-arginine군에서는 각각 60%, 22%, 26.7% 증가하였고 관동맥 저항의 % 변화도 대조군에서 10.5%, 6.9%, 21% 증가한 반면 L-arginine군에서는 10%, 6.6%, 1.6% 감소하였다. 관동맥 혈류증가와 관동맥 혈관저항감소는 acetylcholine과 반동성 혈류증가에 유의한 효과를 보였다($p < 0.05$).

3) 관동맥 폐쇄 20분후 재관류 60분의 심근수축 정도(%)는 L-arginine군에서 81.5 \pm 33.1에서 16.6 \pm 11로 80% 감소하여 대조군의 91.3 \pm 14.9에서 35.4 \pm 20.9의

61.7%에 비해 유의하게 감소했다($p < 0.05$).

결 론 :

이상의 소견은 단시간 심근허혈후 재관류시 L-arginine 투여는 심근 기절현상의 회복을 악화시키는 것으로 보여주었다. 그러나 acetylcholine, adenosine 투여 및 반동성 혈류증가에 대한 관동맥 혈류는 증가하고 관동맥 저항은 감소하여 혈관 기절현상에는 유의한 효과를 보여주었다. 따라서 L-arginine은 심근 기절현상에는 효과가 없으나 혈관기절의 회복에는 효과를 보여주는 독립적인 효과를 나타내는 것으로 보인다.

Reference

- Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF : Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 56 : 978, 1975
- Weiner JM, Apstein CS, Arthur JH, Pizada FA, Hood WB Jr : Persistence of myocardial injury following brief periods of coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 10 : 678, 1976
- Thereoux P, Ross J Jr, Franklin D, Kemper WS, Sasayama S : Coronary arterial reperfusion. III. Early and late effects on regional myocardial function and dimensions in conscious dogs. *Am J Cardiol* 38 : 599, 1976
- Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E : Studies of experimental coronary artery reperfusion : effects on infarct size, myocardial function in biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 68(suppl 1) : 1-8, 1983
- Braunwald E, Kloner RA : The effects of stunned myocardium : prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 66 : 1148, 1982
- Bolli R, Zhu WX : Thomby JI, O'Neill PG, Roberts R : Time course and determinants of recovery of function after reversible ischemia in conscious dogs. *Am J Physiol* 254 : 254 : H102, 1988
- Ellis SG, Henschke CI, Sandor T, Wynne J, Braunwald E, Kloner RA : Time course of functional and biochemical recovery of myocardium salvaged by reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1 : 1047-1055, 1983
- Neely JR, Grottyhann LW : Role of glycolytic pro-

- ducts in damage to ischemic myocardium : Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res* 55 : 816-824, 1984
- 9) Krause SM, Jacobus WE and Becker LC : Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium. *Cir Res* 65 : 536, 1989
 - 10) Kaneko M, Beamish RE and Dhalla NS : Depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} pump activity by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 256 : H368, 1989
 - 11) Ito BR, Tate H, Kobayashi M, Schaper W : Reversibly injured, postischemic canine myocardium retains normal contractile reserve. *Cir Res* 61 : 834, 1987
 - 12) Porterfield JK, Kusuoka H, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E : Ryanodine prevents the changes in myocardial function and morphology induced by reperfusion after brief periods of ischemia. *Clin Res* 35 : 315A(abstr), 1987
 - 13) Kiltakaze M, Weisfeldt ML, Marban E : Acidosis during early reperfusion prevents myocardial stunning in perfused ferret hearts. *J Clin Invest* 82 : 920, 1988
 - 14) Kitakaze M, Weisman HF, Marban E : Contractile dysfunction and ATP depletion after transient calcium overload in perfused ferret hearts. *Circulation* 80(Suppl II) : II-600, 1988
 - 15) Krause SM, Hess ML : Characterization of cardiac sarcoplasmic reticulum dysfunction during short-term normothermic global ischemia. *Cir Res* 55 : 176, 1985
 - 16) Przyklenk K and Kloner RA : Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of "stunned myocardium". *Cir Res* 58 : 148, 1986
 - 17) Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK and McKay PB : Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that "myocardial stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Cir Res* 65 : 607, 1989
 - 18) Bolli R : Oxygen-derived free radicals and postischemic dysfunction("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol* 12 : 239, 1988
 - 19) Myers ML, Bolli R, Leckich RF, Hartley CJ, Roberts R : Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 72 : 915, 1985
 - 20) Zhao M, Zhang H, Robinson TF, Factor SM, Sonnenblick EH, Eng C : Profound structural alterations of the extracellular collagen matrix in postischemic dysfunctional("stunned") but viable myocardium. *J Am Coll Cardiol* 10 : 1322-1334, 1987
 - 21) Charnery RH, Takahashi S, Zhao M, Sonnenblick EH, Factor SM, Eng C : Collagen loss in the stunned myocardium(abstr). *Circulation* 80(suppl II) : II-241, 1989
 - 22) Whittaker P, Przyklenk K, Boughner DR, Kloner RA : Collagen damage in two different models of stunned myocardium(abstr). *J Mol Cell Cardiol* 21(suppl II) : S163, 1989
 - 23) Heyndrickx GR, Baig H, Nellens P, Keusen I, Fishbein MC, Vatner SF : Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusion. *Am J Physiol* 234 : H653, 1978
 - 24) Lange R, Ware J, Kloner RA : Absence of a cumulative deterioration of regional function during three repeated 5-or-15minute coronary occlusions. *Circulation* 69 : 400, 1984
 - 25) Kloner RA, Ellis SG, Lange R : The effect of streptokinase on the intramyocardial hemorrhage, infarct size, and the no-reflow phenomenon during coronary reperfusion. *Circulation* 70 : 513, 1984
 - 26) Bolli R, Triana JF, Jeroudi MO : Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible ischemia. Evidence for microvascular stunning. *Circ Res* 67 : 332, 1990
 - 27) Nicklas JM, Gips SJ : Decreased coronary flow reserve after transient myocardial ischemia in dogs. *J Am Coll Cardiol* 13 : 195, 1989
 - 28) Vanhaecke J, Flameng W, Boregens M, Jang I-K, Van-de-werf F, DeGeest H : Evidence for decreased coronary flow reserve in viable postischemic myocardium. *Cir Res* 67 : 120.1, 1990
 - 29) Bolli R, Triana JF, Jeroudi MO : Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible ischemia : Evidence for microvascular "stunning". *Cir Res* 67 : 332, 1990
 - 30) Ku DD : Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science* 218 : 576, 1982

- 31) Mehta JL, WW Nichols WH, Donnelly DL : *Lawson and T.G.P. Saldeen. Impaired canine coronary vasodilator response to acetylcholine and bradykinin after occlusion-reperfusion. Circ Res* 64 : 43, 1989
- 32) Sobey CG, GJ Dusting, HJ Grossman, and OL Woodman : *Impaired vasodilatation of epicardial coronary arteries and resistance vassels following myocardial ischemia and reperfusion in anesthetized dogs. Cor Art Dis* 1 : 363, 1990
- 33) VanBenthuyssen KM, IF McMurtry, and LD Horwitz : *Reperfusion after acute coronary occlusion in dogs impairs endothelium-dependent relaxation to acetylcholine and augments contractile reactivity in vitro. J Clin Invest* 79 : 265, 1987
- 34) Tsao PS, N Aoki, DJ Lefer, G Johnson III, and AM Lefer : *Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. Circulation* 82 : 1402, 1990
- 35) Nakanishi K, Johansen JV, Lefer DJ, Zhao Z, Fowler III WC, McGee D, Johnston WE : *Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. Am Physiol* 263 : 1650, 1992
- 36) Weyrich AS, Ma X, Lefer AM : *The role of L-Arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. Circulation* 86 : 279, 1992
- 37) Hasebe N, Shen YT, Vantner SF : *Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances myocardial stunning in conscious dogs. Circulation* 88 : 2862, 1993
- 38) Mathesis G, Sherman MP, Buckberg GD, Haybron DM, Young HH, Ignarro LJ : *Role of L-arginine-nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. Am Physiol Soci* H616, 1992
- 39) 김홍균 · 권년수 : *Nitric Oxide의 생성과 그 기능. Med Postgraduates* 21 : 274, 1993
- 40) Theroux P, Ross J Jr, Franklin D, Kemper WS, Sasayama S : *Coronary arterial reperfusion. III. Early and late effects on regional myocardial function and dimensions in conscious dogs. Am J Cardiol* 38 : 599, 1976
- 41) Jennings RB, Reimer KA : *Factors involved in salvaging ischemic myocardium. Effects of reperfusion of arterial blood. Circulation* 68(suppl 1) : 1-25, 1983
- 42) Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF : *Chemistry and Stability : Arginine Hydrochloride. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. J Clin Invest* 56 : 978, 1975
- 43) Moncada S, Higgs A : *The L-arginine-nitric oxide pathway. New Engl J Med* 2022, 1993
- 44) Moncada S, Plamer RMJ, Higgs EA : *Biosynthesis of nitric oxide for L-arginine : A pathway for the regulation of cell function and communication. Biochem Pharmacol* 38 : 1709, 1989
- 45) Furchgott LJ, Buga GM, Byrns RE, Woods KS, Chaudhuri G : *Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J* 3 : 2007, 1989
- 46) RMJ Pamer, DS Ashton, S Moncada : *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine* 333 : 664, 1988
- 47) Marletta MA : *Nitric oxide synthase structure and mechanism. J Biol Chem* 268 : 12231, 1993
- 48) Yao SK, Ober JC, Krishnaswami A, Ferguson JJ, Anderson HV, Golino P, Buja LM, Willerson JT : *Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. Circulation* 86 : 1302, 1992
- 49) Drexler H, Fischell TA, Pinto FJ, Chenzbraun A, Botas J, Cooke JP, Alderman EL : *Effect of L-arginine on coronary endothelial function in cardiac transplant recipients. Circulation* 89 : 1615, 1994
- 50) Morishima N, Matsuura H, Shiode N, Shinohara K, Karakawa S, Yamagata T, Kajiyama G : *L-arginine deteriorates contractile function in repetitively occlude-reperfused myocardium. J Am Coll Cardiol* 263A, 1994