흰쥐에서 허혈조건 부여가 허혈후 심근기능과 관상 혈류에 미치는 영향에 관한 실험적 연구

고려대학교 의과대학 내과학교실
송우혁 · 이승진 · 김병회 · 이은미 · 황교승 · 안정천
임도선 · 박창규 · 서홍석 · 심완주 · 오동주 · 노영무

= Abstract =

Effects of Ischemic Preconditioning on the Post-ischemic Myocardial Dysfunction and Coronary Flow in the Isolated Rat Hearts

Woo Hyuk Song, M.D., Seung Jin Lee, M.D., Byung Hoe Kim, M.D., Eun Mi Lee, M.D., Kyo Seung Hwang, M.D., Jung Chun Ahn, M.D., Do Sun Lim, M.D., Chang Kyu Park, M.D., Hong Seok Seo, M.D., Wan Joo Shim. M.D., Dong Joo Oh, M.D., Young Moo Ro, M.D.
Department of Internal Medicine, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

Background : Brief episodic ischemias prior to subsequent prolonged ischemia limit infarct size and attenuate the reperfusion arrythmia. But the effect of ischemic preconditioning on post-ischemic myocardial dysfunction, coronary flow and nitric oxide(NO) remains unclear.

Method : To investigate the effect of ischemic preconditioning on myocardial function and coronary flow during reperfusion after 15 minutes of global myocardial ischemia, 30 isolated hearts of Sprague-Dowley rats were perfused under constant pressure. Two episodes of three minute global ischemia followed by 12 minutes of reflow were employed to precondition the hearts. The hearts were randomized to one of three groups : group Ⅰ had no preconditioning, group Ⅱ had preconditioning, and group Ⅲ had preconditioning as well as L-arginine pretreatment. Left ventricular developed pressure(LVDP), LV dp/dt, perfused coronary flow, concentration of NO and heart rate were continuously measured.

Result : In preconditioned groups(Group Ⅱ, Group Ⅲ), LVDP decreased during reflow and was lower than that of the control group. LV dp/dt decreased after reflow and gradually recovered with time, but recovery was less in preconditioning groups. Coronary flow increased in the first few minutes after reflow in all groups, but decreased gradually. The decrease of coronary flow was greater in preconditioning groups. NO increased during the first 10 minutes after reflow and then decreased. In preconditioned groups, NO tended to be lower than that in the non-preconditioned group.

교신저자 : 송우혁, 425 - 020 경기도 안산시 고잔동 516번지 전화) (0345) 81 - 4354, 전송) (0345) 84 - 0376

Conclusion：Ischemic preconditioning was not beneficial to post-ischemic myocardial dysfunction, coronary flow and NO concentration in the flow. Cummulative effect of stunning due to repetitive ischemia for preconditioning may be an explanation for worse post-ischemic myocardial dysfunction and coronary flow in preconditioned groups.

KEY WORDS：Isolated rat heart, ischemic preconditioning, myocardial stunning.

서 론

심근괴사가 일어나지 않을 정도의 일시적 심근 허혈후 심근을 완전히 재관류시키더라도 심근 기능의 저하가 회복되지 않고 지속되는 것이 심근 기절(myocardial stunning)이며 이때 보이는 심근 기능저하는 시간이 경과하면 완전히 회복된다[1,2]. 이러한 심근 기절 현상은 단 시간의 심근 허혈 및 재관류를 반복하는 경우에도 나타나며[3] 실제 임상에서 관상 혈류에 지장을 줄 수 있는 정도의 관상동맥 협착이 있을 때 심근의 대사 수요를 증가시키는 운동을 하면 심근 기능이 저하되며 이같은 심근 기능의 저하는 운동을 중지한 후에도 어느정도 지속되는 것이 밝혀진바 있다[4]. 최근 지속적인 심근의 허혈이 있기 이전에 단시간의 반복적인 심근 허혈이라는 조건을 부여(precon-ditioning)하면 심근 허혈이 지속되어도 심근경색의 정도를 완화시킨다는 보고가 있으며[5] 또한 이러한 허혈조건 부여가 재관류 손상에 의한 부정맥을 감소시키고[6,7] 재관류 손상으로부터 관상동맥 내피세포를 보호한다는 보고가 있다[8,9]. 하지만 허혈조건 부여가 장시간의 심근허혈 후 발생하는 심근경색의 정도와 재관류 손상에 의한 부정맥의 정도는 감소시키지만 비교적 단 시간의 심근허혈 후 발생하는 심근기절에서 보이는 심근 기능저하나 심근 관류의 회복에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여는 논란이 많다. 이에 본 연구는 짧은 시간의 심근 허혈조건 부여(ischemic pre-conditioning)가 비가역적인 심근 손상을 유발하지는 않고 가역성 심근 기능부전(심근기절)만을 일으키는 심근 허혈후 심근기능 부전과 관상관류량에 어떤 효과가 있는지 연구하고 또 심근 기절시에 심근 기능의 회복에 영향을 미치는 일산화 질소가 허혈후 심근 기능부전(심근기절)과 관상관류에는 어떠한 변화를 보이는지 또 일산화 질소 전구 물질인 L-arginine이 허혈조건 부여후 심근 기절과 관상관류에는 어떠한 영향이 있는지를 알아보고자 하였다.

연 구 방 법

본 연구는 260 300gm사이의 Sprague-Dawley계 흰쥐 30마리를 심근 허혈의 유발 방법과 L-arginine의 투여 여부에 따라 1군 : 허혈조건부여 없이 15분간의 허혈을 유발하고 90분간 재관류시킨 군(10마리), 2군 : 매 15분 마다 2회에 걸쳐 3분간 심근 허혈과 12분간의 재관류후 15분간 허혈을 유발하고 90분간 재관류 시킨 군(10마리), 3군 : 2회에 걸쳐 3분간 심근 허혈기와 12분간의 재관류후 15분간 허혈을 유발하고 90분간 재관류 시킨 군으로 1차 3분간의 허혈 직후부터 관류액에 L-arginine를 첨가한 군(10마리)으로 나누어 시행하였다(Fig. 1). Lang-endorff 적출 심장 관류장치(Hugo Sachs Elektronic type 818)를 이용한 등압 관류형 모델(LH-CP Re-trograde Perfusion)로 실험동물을 phenobarbital (10mg/100gm)을 복강내 주사하여 마취하고 heparin (500IU/100g)을 복강내 주사한후 기관 절개를 통한 기관내 삽관술후 100% 산소로 인공호흡을 시행하였다. 복벽과 횡격막을 절개하고 양측 늑골-늑연골 경계부를 따라 절개하여 심장을 노출시킨 후 상행 대동맥에 대동맥관을 삽입하고 심장을 적출하여 Lang-endorff 관류장치에 연결하였다. 항온순환기(Jeio Tech, model WBC 1520a)를 통해 이중 유리로 된 심장 보온실과 산화기에 온수를 순환시켜 온도를 37℃로 일정하게 유지하였고 관류액은 Krebs-Henseleite중화액을 이용하였다. 관류액을 산화기를 통과시키는 과정에서 carbogen(95% 산소, 5% 이산화탄소)을 공급하여 산소 분압을 600mmHg이상 유지하고 90cmH_2O의 일정한 압력으로 관류시켰다. 곤류액의 조성은 NaCl 118.0mMol/L, KCl 4.7mMol/L, $CaCl_2$ 2.52 mMol/L, $MgSO_4$ 1.64mMol/L, $NaHCO_3$ 24.88mMol/L, KH_2PO_4 1.18mMol/L, glucose 5.55mMol/L이었으며 3군에서는 1차 3분 허혈기 직후부터 관류액에 L-arginine 1mMol/L를 첨가하였다. 관류액은 관류전 0.45㎛의

여과공을 가진 여과필터로 여과한후 관류시켰다. 좌심방을 통하여 latex balloon을 좌심실에 삽입하고 latex balloon에 연결된 금속 카뉼라를 Polygraph(Glass, model 79)에 연결하여 심박동수(heart rate, HR), 좌심실 상승압(left ventricular developed pressure, LVDP), 좌심실압 순간변화율(LV dp/dt)을 압력 조절 주사기로 이완기말 압력을 10mmHg로 조절한 후 측정하였다. 개방된 상하 대정맥과 폐동맥을 통해 흘러나오는 관류액을 모아 관상 관류량(perfused coronary flow)을 측정하였다. 관류액내 일산화 질소(NO)의 측정을 위하여 일산화 질소 계측기(World Precision Instruments, ISO-NO-type C)를 이용하였으며 우심방 후면을 절개한후 일산화 질소 계측기의 탐침을 정맥동 입구에 위치시키고 고정한후 측정하였다. 심근 허혈은 Langendorff 적출 심장 관류장치에서 적출심장의 대동맥으로 유입되는 관류액을 완전히 차단하여 유발하는 전심장허혈(global ischemia) 방법을 사용하였으며 실험계획에 따라 일정 시간의 심근 허혈후 관류를 재개하였다. 각 군에서 심박동수, 좌심실 상승압, 좌심실압 순간 변화율, 1분 관상 관류량, 일산화 질소 농도를 심근 허혈기 전에 측정하고 1군에서는 15분간의 허혈후에 재관류시, 재관류 직후부터 5분후까지 1분마다 측정하였고 재관류 10분후부터 10분마다 90분까지 측정하였다. 2군 및 3군에서는 1차 및 2차 3분 심근허혈후 1분 5분 10분에 측정하였고 15분간의 허혈후에 재관류시, 재관류 직후부터 5분후까지 1분마다 재관류후 10분후부터 10분마다 90분까지 측정하였다. 각 군에서의 재관류 부정맥의 지표로서 재관류후 심박동이 정상적으로 회복되기까지의 시간과 정상 심박동으로 회복된 후로부터 5분까지의 전체 심박동에 대한 조기 심박동의 백분율을 구하였다. 적출 심장의 상행 대동맥을 Langendorff 적출 심장 관류장치에 연결한 후 안정기에 측정한 값을 기본값으로 하여 재관류후 측정한 값을 기본값에 대한 백분율로 환산하여 재관류 후 회복율로 나타내었으며 각 측정한 값은 평균±표준편차로 표시하였다. 재관류후 시간 경과에 따른 회복율의 변화를 확인하기 위하여 One way repeated measure AVONA를 적용하였고 각 군간의 차이를 확인하기 위하여 재관류후 시간 경과에 따라 같은 시간대의 측정 값끼리 One way AVONA를 적용하였다. 유의 수준은 p-값을 0.05로 하여 p-값이 0.05이하인 경우에 통계적인 유의성을 두었으며 p-값이 0.06 0.09일때 경계성 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

1. 각 군의 몸무게 및 기본 측정치

각 군간에서 실험 대상의 몸무게 및 심근 허혈전 측정한 심박동수, 좌심실 상승압, 좌심실압 순간 변화율, 1분 관상 관류량 및 일산화 질소 농도등은 유의한 차이가 없었다(Table 1).

2. 각 군간의 좌심실 수축기능 지표, 관상관류량, 관류액내 일산화 질소 농도, 심박동수 및 재관류 부정맥의 비교

1) 좌심 수축기능 지표의 비교

좌심실 상승압은 허혈조건을 부여하지 않은 1군에서는 재관류 직후 상승하였다가 시간 경과에 따라 감소하는 결과를 보였으나 허혈조건을 부여한 2군과 3군에서는 재관류 직후 허혈전 측정치보다 감소되어 있는 상태가 유지되었다(Table 2, Fig. 2). 이같은 소견은 허혈조건부여는 재관류후 좌심실 상승압의 회복을 방해하거나 지연시키는 것을 보여주는 것으로 생각된다.

좌심실압 순간 변화율(LV dp/dt)은 재관류 직후 부터 세 군 모두에서 감소된 후 점차 회복되는 경향을 보였다. 그러나 허혈조건을 주지 않은 1군에 비해서 허혈조건을 부여한 2군과 3군에서는 재관류 전기간을 통해 좌심실압 순간변화율이 지속적으로 낮은 것을 보여주고 있어 허혈조건부여가 재관류후 좌심실 기능회

Table 1. 각 군간의 몸무게 및 기본 측정치

	1군	2군	3군
몸무게 (gm)	279.0 ± 12.0	281.0 ± 11.0	279 ± 16.0
심박동수 (beat/min)	247.4 ± 26.2	241.4 ± 23.2	244.8 ± 20.8
좌심실 상승압 (mmHg)	117.8 ± 23.8	122.2 ± 18.9	119.45 ± 18.5
좌심실압 순간변화율 (mmHg/sec)	4525.5 ±712.4	4120.0 ±650.5	4700.0 ±638.5
1분 관상 관류량 (ml/min)	10.5 ± 3.1	11.1 ± 3.7	12.75 ± 2.7
일산화질소 농도 (nM/L)	312.3 ± 60.0	359.5 ±117.5	321.5 ±112.8

Table 2. 기본측정치의 백분율로 표시한 각 군의 좌심실 수축기능 지표의 변화

	좌심실 상승압			좌심실압 순간 변화율		
	1	2군	3군	1	2군	3군
기본 측정치	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
1분	109.3±29.7	86.5±20.6	69.5±17.1*	78.0±21.2	64.2±15.2	55.1±12.0*
2분	106.8±31.3	87.5±19.3	70.8±12.2*	78.9±23.7	71.2±18.9	57.6± 9.0
3분	102.7±28.5	89.5±16.3	68.3±25.8*	82.9±24.3	74.7±17.2	56.8±21.1*
4분	95.9±29.3	91.3±13.7	80.2± 8.5	79.2±26.4	77.2±14.0	67.3± 6.3
5분	95.3±26.9	91.0±13.1	84.4± 8.6	81.5±23.5	76.9± 9.8	72.4± 6.5
10분	96.4±26.2	87.9±10.2	88.2± 7.9	84.6±22.3	77.5± 8.1	79.5± 5.2
20분	101.1±23.3	88.3±13.4	89.5± 6.4	96.1±15.5	83.6±10.7	86.4± 5.4*
30분	97.8±19.9	87.3±12.0	91.9± 4.2	96.5±12.8	84.3±11.8	89.1± 4.5*
40분	98.3±16.7	85.1±14.3	89.1± 6.2	97.6±15.7	85.3±13.4	87.4± 4.8
50분	97.5±18.9	89.6±10.7	88.0± 5.5	95.5±17.6	91.6±17.5	87.2± 4.4
60분	98.1±18.2	84.5±12.2	86.2± 4.6	98.6±14.2	85.4± 9.3	85.7± 4.5
70분	96.0±16.9	84.1±12.1	83.4± 3.6	96.3±13.6	83.4±10.2#	82.5± 4.3*
80분	93.2±14.5	83.5±12.5	81.0± 3.8	94.4±14.3	83.6±12.5#	80.1± 3.3*
90분	91.6±15.6	81.5±13.7	79.3± 4.6	89.3±16.0	88.9±25.5	78.8± 4.0

재관류후 시간 경과에 따라 측정한 값은 심근 허혈기전 안정기에 측정한 기본 측정치에 대한 백분율로 환산하여 평균±표준편차로 표시하였다.
: 1군 대 2군, * : 1군 대 3군, Oneway ANOVA, p-value < 0.05

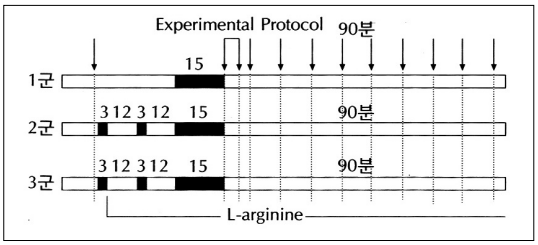

Fig. 1. 각 군의 심근 허혈기 및 재관류기의 모식도. ↓ : 안정기 및 재관류기시 측정한 측정지표(LVDP, LV dp/dt, Coronary flow, NO conc. HR)의 측정 시기.
■ : 심근 허혈기, □ : 재관류기
LVDP : Left ventricular developed pressure
NO conc : Nitric oxide concentration, HR : Heart rate.

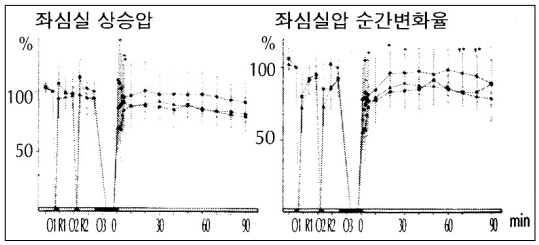

Fig. 2. 각 군간의 좌심실 상승압 및 좌심실압 순간변화율의 비교, -●- : 1군, -■- : 2군, -▲- : 3군, ■ : 심근허혈기(O), □ : 재관류기(R), † : 1군 대 2군, * : 1군 대 3군, $p<0.05$.

복에 유익하지 않음을 보여주었다(Table 2, Fig. 2).

2) 관상관류량의 비교

1분 관상관류량은 각 군에서 모두 재관류 직후 유의한 증가를 보여 허혈조건부여 여부에 관계없이 반동성 충혈이 같은 수준으로 일어남을 보여주었다. 그러나 허혈조건을 부여한 2군과 3군에서 허혈조건을 주지 않은 1군에 비해서 재관류후에 관상관류량이 더 낮은 것을 보여주고 있으며 특히 재관류 20분후에 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 보여 허혈조건부여가 재관류후 관상관류량의 회복에 유익한 효과를 주지 못하고 오히려 더 저해하는 효과가 있음을 보여주었다. 또한 L-arginine의 투여도 유익한 효과가 없음을 보여주었다(Table 3, Fig. 3).

3) 관상관류액내 일산화질소 농도의 비교

우심방의 관정맥동 위치에서 측정한 일산화 질소의 농도는 세 군에서 모두 재관류 직후 허혈전 측정한 기본 측정치보다 상승하였다가 시간경과에 따라 감소하는 소견을 보였으며 이같은 재관류 초기의 일산화질소의 일시적 상승은 1분 관상 관류량으로 본 재관류후 반동성 충혈과 일치하였다. 일산화질소의 농도도 허혈조건을 부여하지 않은 1군에서 허혈조건을 부여한 2군과 3군에 비해 높은 것을 보여주어 허혈조건부여

Table 3. 기본 측정치의 백분율로 표시한 각 군의 1분 관상 관류량, 관류액내 일산화 질소 농도, 심박동수의 변화

	1분 관상 관류량			관류액내 일산화질소 농도			심박동수		
	1군	2군	3군	1군	2군	3군	1군	2군	3군
기본 측정치	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ±0	100 ± 0
재관류 0 1분	139.2±39.8	148.1±43.4	134.9±20.6	116.2±11.7					
1분	164.1±51.5	161.5±42.8	142.6±21.7	115.0±12.0	108.5±32.7	106.1±17.5	101.8± 4.4	105.3±8.3	92.9±15.0
2분	171.9±51.0	167.9±39.2	143.5±21.5	114.9±10.0	105.8±33.2	101.5±16.0	104.9± 4.3	109.7±7.0	94.1±15.0*
3분	169.4±42.0	170.7±38.7	141.6±19.9	112.5± 9.7	105.3±34.1	100.4±14.8	107.6±10.2	109.8±6.8	93.9±16.2*
4분	155.2±34.5	162.2±35.1	135.9±20.4	111.5± 9.2	105.4±34.2	100.2±13.8	107.8± 8.4	110.2±6.7	95.1±15.5*
5분	142.1±27.8	152.9±31.9	131.3±18.8	105.5± 6.5	101.8±40.0	99.8±12.1	107.2± 7.5	108.6±6.6	96.4±14.6*
10분	116.3±19.6	103.2±18.8	103.3±10.9	97.7± 9.8	95.9±38.6	95.5±11.8	102.9± 8.1	101.1±5.3	96.4±13.2
20분	102.3±18.7	79.0±15.4#	78.5± 8.0*	93.9±14.5	84.6±35.3	90.3±12.1	97.9± 6.7	96.8±6.3	88.3±10.1*
30분	96.7±14.0	76.1±16.1#	74.5± 6.5*	93.4±17.1	81.5±34.5	87.4±14.1	97.0± 7.4	92.4±2.4	87.0± 8.4*
40분	94.9±12.4	76.7±16.2#	71.1± 8.8*	92.0±20.4	81.3±33.7	85.9±14.4	93.1± 9.2	93.5±4.7	85.6± 7.1
50분	95.2±13.1	85.1±37.4	69.4± 7.4	93.1±22.2	83.0±34.2	88.2±10.2	93.6± 7.5	93.1±4.6	85.1± 8.2*
60분	99.5±14.9	72.3±15.9#	67.3± 9.3*	91.4±24.3	80.3±33.7	87.3±9.2	92.9± 9.5	91.1±4.6	84.7± 7.3
70분	92.9±15.2	72.4±16.9#	63.4± 8.1*	89.9±24.8	81.9±29.6	84.4±9.4	91.8± 9.7	89.5±6.5	84.4± 8.6
80분	91.6±17.0	70.1±17.1#	60.8± 8.2*	90.2±22.8	86.2±29.2	83.5±9.3	93.0±10.1	90.7±5.8	82.3± 7.2*
90분	90.8±17.1	67.3±17.5#	59.3± 7.4*		90.3±38.8	82.0±10.9	93.6±11.4	89.2±7.0	82.1± 7.8*

재관류후 시간 경과에 따라 측정한 값은 심근 허혈기전 안정기에 측정한 기본 측정치에 대한 백분율로 환산하여 평균±표준편차로 표시하였다.
: 1군 대 2군, * : 1군 대 3군, † : 2군 대 3군, Oneway ANOVA, p-value<0.05

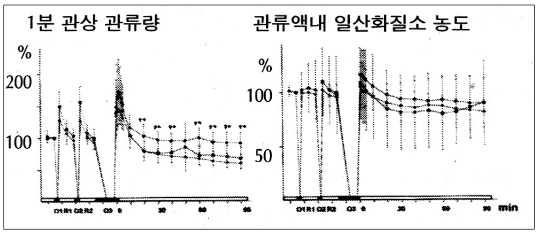

Fig. 3. 각 군간 1분 관상 관류량 및 관류액내 일산화질소 농도의 비교.
● : 1군, ■ : 2군, ▲ : 3군, ▬ : 심근허혈기(O), ▭ : 재관류기(R), † : 1군 대 2군, *1군 대 3군, p<0.05.

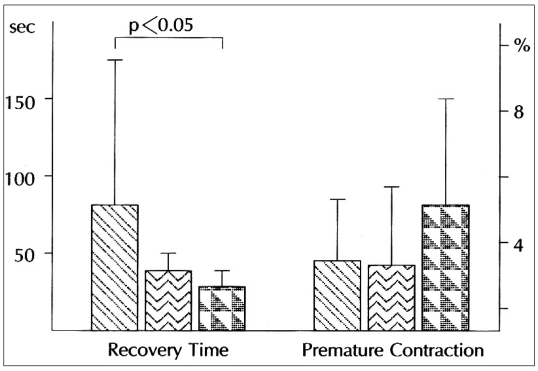

Fig. 4. 각 군간의 재관류 부정맥 지표의 비교, Recovery time : 허혈로 소실되었던 심박동이 정상 심박동으로 회복되기 까지의 시간, Premature contraction : 재관류후 5분간 전체 심박동중 조기 심박동의 비율, ▧ : 1군, ▨ : 2군, ▩ : 3군.

가 일산화질소 농도에 유익한 영향을 미치지 못하였다. 또한 허혈조건부여후에는 일산화질소의 전구물질인 L-arginine을 투여하여도 관상정맥내 일산화질소를 높히지 못하였다(Table 3, Fig. 3).

4) 심박동수의 비교

심박동수는 1군과 2군에서 재관류 직후 기본 측정치보다 상승하였다가 시간 경과에 따라 감소하는 소견을 보였으며 3군에서는 재관류 직후부터 기본 측정치보다 감소되는 소견을 보였고 1군과 2군간에는 유의한 차이는 없었으나 3군은 1군과 2군에 비하여 유의하게 감소된 소견을 보였다(Table 3). 이같은 소견은 L-arginine이 심박동수를 낮추는 것으로 해석된다.

5) 재관류후 부정맥의 비교

재관류 후 심박동이 소생되어 정상적으로 회복되기 까지의 소요 시간은 1군(78.3±98.0초)과 2군(35.1±16.9초)간에는 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 2군

이 1군보다 짧은 경향을 보였고 3군(26.2±9.5초)에서 1군보다 통계적으로 유의하게 짧은 결과를 보였다($p<0.05$). 정상 심박동으로 회복된후의 부정맥의 출현 빈도는 1군(2.9±2.7%), 2군(2.8±3.1%), 3군(5.0±4.1%)간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

고 안

심근 기절(myocardial stunning)은 심근 괴사를 일으키지 않는 단 기간의 심근 허혈후 심근 관류가 완전히 회복된 후에도 지속되는 심근 기능부전 현상으로 수 시간 또는 수 일에서 수 주일까지 지속되다가 완전히 회복되는 현상으로[1,2] 심근 허혈후 재관류시 발생하는 산소 자유기와 심근 세포내로의 일시적인 칼슘의 과부하등 여러 기전의 단독 또는 복합적으로 작용하여 심근 수축기능 장애가 회복되지 못한 결과로 발생하며[10,11] 또한 심근 허혈시 심근 세포의 손상과 함께 일어나는 혈관 내피세포의 손상에 의한 내피 세포유래 확장인자(Endothelium - derived relaxing factor, EDRF)의 생성 저하가 심근 기절현상에 어느정도 관여하는 것으로 알려져 있다[12,13]. 이러한 심근기절은 여러 동물실험을 통하여 확인되었을 뿐만 아니라 임상에서도 협심증이나 심근경색증에서 관찰되며 심근허혈후 좌심실 기능부전을 유발하는 중요한 기전의 하나로 허혈성 심장질환 환자의 회복이나 사망에 중대한 영향을 미친다[14,15]. 그러나 Swain[16]이나 Reimer[17]등은 반복적으로 심근에 허혈을 가할때 심근 세포내에 ATP나 고 에너지 인산기의 손실이 누적되지 않는다고 하여 장 시간의 심근 허혈을 일으키기 이전에 가해지는 짧은 시간의 심근 허혈이 심근 보호효과를 나타낼 가능성을 보고한 후 Murry등이 개를 이용한 동물실험에서 40분간의 심근 허혈 이전에 4차례의 짧은 심근 허혈을 가할때 장시간의 심근허혈에 의한 심근 경색의 정도를 감소시키는 것을 관찰하여 이같은 허혈조건 부여(preconditioning)가 심근 보호기능이 있음을 보고한바 있다[5]. 이 허혈조건 부여의 심근 보호기능에 대한 기전은 아직까지 명확하게 밝혀지지는 않았지만 Liu[18]나 Thornton[19]등에 의하면 허혈조건 부여시에 발생하는 adenosine에 의한 A_1 수용체 활성화에 의하여 매개된다고 하며 또한 K_{ATP} channel의 활성화되면 심근 세포의 활동 전위 지속시간이 짧아지는 것이 그 기전이라는 보고도 있다[20,21]. 그 외에도 허혈조건 부여시 ATPase 억제 효과에 의한 허혈중 ATP의 보존이나[22] 심근 허혈에 의하여 생성되는 열 쇼크 단백질(heat shock protein)이 허혈조건 부여의 심근 보호하는 기전이라는 보고가 있다[23,24]. 이러한 허혈조건 부여의 심근 보호기능은 여러 동물 실험 모델에서 보고되고 있으며[5,18,25] 사람에서도 이같은 효과가 보고되고 있다[26,27]. 하지만 허혈조건 부여가 심근 기절시 발생하는 심근기능 부전에 대하여도 그 정도를 감소시키는 심근 보호기능이 있는지에 대하여는 아직 불분명하며 이에 대하여 Cohen[28,29]이나 Cave[30]등은 허혈조건 부여가 심근경색을 줄일 뿐만 아니라 심근 기절에서 심근 기능부전의 정도를 감소시킨다고 보고한 반면 Bolli[31], Jenkins[32], Ovize[33]등은 허혈조건 부여는 심근 경색의 정도를 줄이고 심근 세포의 대사에는 영향을 미치지만 심근 기절시의 좌심기능 부전을 보호하는 효과가 없다고하는 등 상반된 보고가 있어 이에 대한 좀더 확실한 기전을 알기위해서는 규명되어야 할 점이 적지않다.

본 연구에서 세 군 모두에서 심근기절을 유발하기 위해 심근 허혈을 15분간 가하였는데 이는 Kloner등[34]의 개를 이용한 동물 실험에서 20분 이하의 심근 허혈은 심근 괴사는 일으키지 않으면서 재관류 후 지속적인 심근 수축기능 장애만을 초래한다는 보고와 Jenkins등[32]의 토끼의 적출 심장 모델에서 15분간의 심근 허혈후에는 허혈조건 부여여부에 관계없이 비슷한 정도의 심근 괴사가 적게 발생한다고 하여 허혈후 심근 기능부전의 호전여부를 구명하려는 본 실험의 목적에 비추어 심근경색이 발생하지 않는 것으로 알려진 15분의 심근 허혈은 적당한 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 허혈조건 부여로서 15분간의 심근 허혈전 3분간의 심근 허혈과 12분간의 재관류를 2회 반복하였는데 이는 Miura등[25]에 의하면 한 차례의 2분간 심근 허혈만으로도 허혈조건 부여의 심근 보호효과가 나타나며 Li등[35]에 의하면 1회의 짧은 심근 허혈기만으로도 6회 이상 심근 허혈을 부여한 것과 같은 허혈조건 부여의 심근 경색에 대한 효과가 있었다고 하여 3분간의 허혈조건을 2회에 시행한 본 연구의 시도는 심근기절에 대한 허혈조건 부여로서 타당한 방법인 것으로 생각된다. 본 연구는 Langendorff 심장 관류 장치를 이용한 흰쥐의 적출 심장 모델에서 허혈조건 부

여가 심근기절시 발생하는 심근 기능부전 및 관상관류량의 변화에 어떠한 영향을 미치는지 조사한 것으로 본 연구 결과 15분간의 심근 허혈을 주기 전 2회에 걸친 3분간의 허혈조건을 부여했던 두군에서 허혈조건을 부여하지 않고 15분간의 심근 허혈만 가한 군보다 심근 허혈후 발생한 심근 기능부전의 정도가 심하고 관상관류량도 더 감소되는 것이 관찰되었다. 또한 재관류후 정상 심박동으로 회복된 후로부터 재관류후 5분까지의 전체 심박동에 대한 심실 조기 수축은 허혈조건 부여에 관계없이 실험군간의 유의한 차이는 없었으나 재관류후 정상 심박동으로 회복되기까지 소요 시간은 허혈조건 부여군에서 그렇지 않은 군보다 짧은 것으로 나타났으며 특히 허혈 부여후 재관류시 L - arginine을 관류액에 첨가한 군에서 허혈조건을 부여하지 않은 군보다 유의하게 짧은 결과를 보여 허혈조건 부여가 재관류시 정상 심장박동을 회복시키는데 유익한 효과가 있음을 보여주는 것으로 생각된다. 본 연구의 결과 좌심실 수축기능 지표였던 좌심실 상승압과 좌심실압 순간변화율이 허혈조건을 부여했던 군에서 허혈조건을 부여하지 않은 군보다 낮은 회복율을 보였는데 이는 허혈조건 부여가 단 시간의 심근 허혈후 재관류시 발생하는 좌심 기능부전 즉, 심근기절에 대한 보호기능이 없었던 것으로 생각된다. 이는 수차례의 단 기간의 심근 허혈을 부여하는 경우, 허혈후 재관류시 발생하는 심근 기능 부전의 정도가 순차적으로 감소되는 것이 허혈조건 부여의 심근 보호기능이며 허혈조건 부여가 심근 경색의 정도를 감소시키며 또한 재관류시 심근 기능부전의 회복을 돕는다고 한 Cohen등의 보고[28,29]와 다르다. 하지만 본 연구 결과 허혈조건 부여가 심근 허혈후 재관류시 심근기절에 의한 심근 기능부전을 감소시키지 못한 것은 Jenkins[32] 등이 허혈조건 부여시 심근 허혈후 나타나는 심근 기능부전의 호전은 허혈조건 부여가 심근기절에 의한 심근 기능부전을 감소시킨 것이 아니라 심근경색의 정도가 감소되어 나타나는 이차적인 결과로 설명한 바 있으며 Ovize[33], Rehring[36]등이 허혈조건 부여는 심근허혈에 의한 비가역적인 심근 손상은 줄이지만 심근 허혈후 발생하는 심근 기능부전의 정도를 감소시키지는 못한다고 한 보고와 같은 결과로 생각된다. Preuss[37] 등이 보고한 바와 같이 허혈기의 지속시간이 늘어남에 따라 심근기절 즉, 허혈후 심근기능부전이 심화되고, 또 Bolli[31]등이 지적한 바와 같이 반복되는 심근 허혈과 재관류로 심근기절 효과가 누적되기 때문에 2회의 허혈조건을 부여한 군에서는 2번의 심근기절 효과가 누적됨으로 허혈조건을 부여하지 않은 군에 비해 재관류시 심근 기능부전이 더 심화된 것으로 생각된다. 본 연구 결과 허혈조건을 부여한 군에서 허혈조건을 부여하지는 않고 15분 간의 비교적 짧은 심근 허혈만 가한 군보다 재관류후 관상 관류량이 감소되어 나타났는데 이는 Bauer[38]등이 허혈조건 부여는 심근 허혈후 재관류시 관상 맥관계에 보호 효과를 나타내지 못하여 재관류시 심근관류의 악화와 혈관확장 예비력의 감소를 막지 못한다는 보고와 같이 허혈조건 부여가 관상 맥관계에 대한 보호효과를나타내지 못하며 오히려 관상 혈류를 저하시키는 관상 맥관계의 기능부전을 야기함을 보여주었다. 이같은 소견이 2회의 허혈조건 부여에 따른 더 많은 횟수의 관상혈류 차단에 의한 관상 혈관의 기능부전 효과가 누적됨으로서 나타난 것인지 또는 심근 허혈후 재관류시 좌심 기능이 허혈조건 부여군에서 더 감소되어 관상 혈류에 대한 요구량이 감소됨으로서 이차적인 관상 관류량의 감소에 의한 것인지를 알수 없었으나 허혈조건 부여군에서 심근 허혈후 재 관류시 관상 관류량이 더 저하된 것은 위의 두 가지 기전이 모두 작용하였을 것으로 추측된다. 본 연구에서 심근 허혈후 재관류시 우심방 내의 관정맥동 앞에서 측정한 관류액내의 일산화 질소 농도가 허혈조건 부여군보다 허혈조건 비부여군에서 높게 측정되었고 특히 허혈조건 부여후 L - arginine을 관류액에 첨가한 군에서도 증가하지 않은 것이 무엇을 의미하는지 해석이 필요할 것 같다. 이는 허혈조건 부여가 관상 맥관계의 내피세포의 보호기능보다는 손상을 주어 관상 내피세포에 의한 일산화 질소 생성에 L - arginine이 충분히 기여하지 못한 결과인지, Palmer[39]나 Rees[40]등이 보고한 바와 같이 관상 내피세포가 L - arginine을 이용하여 일산화 질소를 생성하지만 세포내에 일산화 질소의 기질로서 L - arginine이 풍부하기 때문에 외부에서 주어지는 L - arginine이 일산화 질소의 생성에 미치는 영향이 제한되었기 때문에 나타난 것인지 알수 없었다. 본 연구에서 허혈조건을 부여하면서 재관류시 관류액에 L - arginine을 첨가한 군에서도 허혈조건만 부여한군과 비슷한 정도의 좌심 수축기능을 보이며 허혈조건을 부여하지 않

은 군보다 그 회복정도가 좋지 않았는데 이는 외부에서 주어지는 L-arginine이 일산화 질소의 생성에 미치는 영향이 제한되었기 때문인 것으로도 생각할 수 있다. 또 Beckman[41]등이 보고한 바와 같이 외인성의 L-arginine에 의하여 생성된 일산화 질소는 그 경로가 내인성 일산화 질소의 경로와는 달리 그 대사 과정에서 peroxynitrite anion등 일산화 질소로 부터 생성되는 산소 자유기를 생성하여 심근에 유해하게 작용하였을 수 있다. 금번 연구에서 보면 허혈조건을 부여하지 않은 군에서 관상관류량이 높은점으로 보아 NO의 증가도 이와 관련이 있을 가능성도 생각할수 있을것 같다. 본 연구에서 재관류 부정맥의 지표로서 재관류후 정상 심박동으로 회복된 후로부터 재관류 후 5분까지의 전체 심박동수에 대한 심실 조기 수축수의 비와 재관류후 정상 심박동으로 회복되기까지 소요 시간을 측정하였는데 전체 심박동수에 대한 조기 심박동수의 비는 세 군간의 유의한 차이는 없었으나 재관류후 정상 심박동으로 회복되기까지 소요 시간은 허혈조건 부여군에서 허혈조건을 부여하지 않은군보다 짧은 것으로 나타났으며 특히 재관류시 L-arginine을 관류액에 첨가한 군에서 허혈조건을 부여하지 않은군보다 유의하게 짧은 결과를 보였다. 이는 Shiki[6]나 Vegh[7]등이 보고한 바와 같이 허혈조건 부여가 재관류 부정맥의 감소에 기여한 것으로 생각된다.

연구의 제한점

관상 내피 유발 확장인자(endothelium-derived relaxing fator, EDRF)로 알려진 일산화 질소는 L-arginine을 기질로 하여 관상 내피세포에서 생성되며[39,42] 관상 맥관계의 혈관 긴장도를 조절하는 주요 인자중 하나로서 강력한 혈관 확장 작용[43,44] 및 혈관의 생리적 불투과성을 유지하는 작용[45]을 가지고 있고 또한 혈소판이나 백혈구의 응집을 억제하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며[46,47], 심근 허혈후 재관류시 이 일산화 질소의 농도가 감소하는 것이 심근 기능부전을 일으키는 한 중요한 기전으로 알려져 있다. 하지만 일산화 질소는 반감기가 정상 심장내의 혈액에서는 HbO_2의 영향에 의하여 반감기가 130 msec 정도로 매우 짧기 때문에 그 농도의 측정이 제한적이며 특히 심 정맥혈에서는 그 측정이 힘든 것으로 알려져 있다[48]. 본 연구에서 관상 내피세포 기능지표의 하나로서 관류액내 일산화 질소의 농도를 측정하였는데 이는 관류액내에 적혈구가 없어도 일산화 질소가 관류액내의 산소 분압에 의해서 영향을 받아 산소 분압이 700mmHg인 경우 그 반감기가 3.8초에 불과하다고 하여[48] 그 측정의 의미가 제한적이다. 하지만 본 연구에서 심장 맥관계를 통과한 관류액에서 일산화 질소를 측정하였지만 관류액내에 HbO_2가 없어 혈액내에서의 일산화 질소의 반감기 보다는 길것으로 생각되고, 또한 측정 위치가 우심방내 관정맥동 입구이고 심근 관류액이 심장 맥관계를 통과하는데 소요되는 시간이 1초 미만임을 감안할 때 본 연구에서 관류액내 일산화 질소의 농도를 측정한 것은 관상 내피세포 기능지표의 하나로서 의의가 있을것으로 생각된다.

본 연구에서 허혈조건 부여를 위하여 15분간의 심근 허혈기 이전에 2차례의 3분간의 심근 허혈기를 주었는데 이는 Miura등[25]이나 Li등[35]의 연구 결과에 의하면 비교적 타당한 방법으로 생각되나 본 연구에서 측정한 지표들의 결과만으로는 이러한 방법이 허혈조건 부여로서 충분하였는지에 대하여 객관적으로 확인할 수 없었으며 향후 열 쇼크 단백질(heat shock protein)의 측정이나 심근세포의 대사에 대한 연구등을 통하여 이러한 허혈조건 부여방법에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다. 또한 본 연구결과 심근허혈후 재관류 90분까지 좌심 수축기능 지표였던 좌심실 상승압, 좌심실압 순간변화율과 관상혈류 및 관상 내피기능 지표인 1분 관상 관류량과 관류액내 일산화 질소의 농도가 허혈조건 부여군에서 낮은 결과를 보였다. 하지만 심근 기절시 심근 기능저하는 완전히 회복되기까지 수 일 내지 수 주간의 시간이 소요되는 것으로 알려져있으며 허혈조건 부여가 심근 허혈후 심근기능 및 관상혈류가 완전히 회복되기까지 전체적으로 어떠한 영향을 미치는지에 관하여 알기 위해서는 재관류후 장시간에 걸친 실험이 계속되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

연구배경 :

허혈조건 부여(preconditioning)는 심근경색의 정도를 완화시키며 재관류 손상에 의한 부정맥을 감소시

키지만 허혈조건 부여가 심근기절에서 보이는 심근 기능저하나 심근 관류의 회복에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 논란이 많다. 이에 본 연구는 심근 허혈조건 부여가 심근기절만을 일으키는 심근 허혈후 심근기능 부전과 관상관류량에 어떤 영향이 있는지를 알아보고자 하였다.

방 법 :

실험은 Langendorff 심장 관류장치를 이용한 등압관류형 모델로 Sprague - Dawley계 흰쥐 30마리를 허혈조건 부여 방법과 L - arginine의 투여 여부에 따라 허혈조건 비부여군인 1군과 허혈조건 부여군인 2군, 허혈조건 부여군으로 재관류시 L - arginine을 투여한 3군으로 나누어 각 군에서 좌심실 상승압, 좌심실압 순간 변화율, 1분 관상 관류량과 우심방의 관정맥동 입구에서 심근 관류액내의 일산화 질소(NO)의 농도를 측정하였고 재관류후 심박동이 정상적으로 회복되기까지의 시간과 정상 심박동으로 회복된 후로부터 5분까지의 전체 심박동에 대한 조기 심박동의 백분율을 구하였다. 적출 심장을 Langendorff 심장 관류장치에 연결한 후 안정기에 측정한 값을 기본값으로 하여 재관류후 측정한 값을 기본값에 대한 백분율로 환산하여 재관류 후 회복율로 나타내어 비교하였다.

결 과 :

좌심실 상승압은 1군에서는 재관류 직후 상승하였다가 시간 경과에 따라 감소하는 결과를 보였으나 2군과 3군에서는 재관류 직후 허혈전 측정치보다 감소되어 있는 상태가 유지되었다. 좌심실압 순간 변화율은 재관류 직후 부터 세 군 모두에서 감소된 후 점차 회복되는 경향을 보였다. 그러나 1군에 비하여 2군과 3군에서는 재관류 전기간을 통해 좌심실압 순간변화율이 지속적으로 낮은 것을 보여주었다. 1분 관상관류량은 각 군에서 모두 재관류 직후 유의한 증가를 보였으나 2군과 3군에서 1군에 비하여 재관류후에 관상관류량이 더 낮은 것을 보여주었다. 또한 L - arginine의 투여도 유익한 효과가 없음을 보여주었다. 우심방의 관정맥동 위치에서 측정한 일산화 질소의 농도는 세 군에서 모두 재관류 직후 허혈전 측정한 기본 측정치보다 상승하였다가 시간경과에 따라 감소하였으며 이같은 재관류 초기의 일산화질소의 일시적 상승은 1분 관상 관류량으로 본 재관류후 반동성 충혈과 일치하였다. 일산화질소의 농도도 1군에서 2군과 3군에 비해 높은 것을 보여주어 허혈조건 부여가 일산화질소 농도에 유익한 영향을 미치지 못하였다. 또한 허혈조건 부여후에는 L - arginine을 투여하여도 관상정맥내 일산화질소를 높히지 못하였다. 재관류 후 심박동이 소생되어 정상적으로 회복되기 까지의 소요 시간은 1군과 2군 간에는 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 2군이 1군보다 짧은 경향을 보였고 3군에서 1군보다 통계적으로 유의하게 짧은 경과를 보였다. 정상 심박동으로 회복된후의 부정맥의 출현 빈도는 각 군에 차이가 없었다

결 론 :

Langendorff 심장 관류장치를 이용한 흰쥐의 적출 심장 모델에서 심근 기능부전(심근기절)만을 일으키는 심근 허혈기전 단 시간의 심근 허혈 부여(허혈조건 부여)는 재관류 후 정상박동으로 회복을 신속히 하는 효과는 있지만 재관류후 발생하는 심근 기절시의 심근 기능 회복이나 심근 관류의 회복에 대한 유익한 효과는 없는 것으로 생각된다.

References

1) Roberto Bolli : *Mechanism of myocardial "stunning". Circulation. 82 : 723-738, 1990*
2) Heyndrickx GR, Millard RW, McRithie RJ, Maroko PR, Vatner SF : *Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. J Clin Invest 56 : 978-985, 1975*
3) Nicklas JM, Becker LC, Bulkley BH : *Effects of repeated brief coronary occlusion on regional left ventricular function and dimension in dogs. Am J Cardiol 56 : 473-478, 1985*
4) Homans DC, Sublett E, Dai XZ, Bache RJ : *Presistence of regional left ventricular dysfunction after exercise-induced myocardial ischemia. J Clin Invest 77 : 66-73, 1986*
5) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : *Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 74 : 1124-1136, 1986*
6) Shiki K, Hearse DJ : *Preconditioning of ischemic myocardium : reperfusion-induced arrhythmias. Am J Physiol 253 : H1470-476, 1987*
7) Vegh A, Komoro S, Szekeres l Parratt JR : *Antiarrhythmic effects of preconditioning in anaesthetised dogs and rats. Cardiovasc Res, 26 : 487-95, 1992*
8) Defily DV, Chilian WM : *Preconditioning protects coronary arteriolar endothelium from ischemia-reperfusion injury. Am Physiol 265 : H700-H706, 1993*

9) Richard V, Kaeffer N, Tron C, Thuillez C：*Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. Circulation 89：1254-1261, 1994*
10) McCord JM：*Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 312：159-163, 1985*
11) Kitakaze M, Weisman HF, Marban E：*Contractile dysfunction and ATP depletion after transient calcium overload in perfused ferret hearts. Circulation 77：685-695, 1988*
12) Lefer AM, Aoki N：*Leukocyte-dependent and leukocyte-independent mechanisms of impairments of endothelium-mediated vasodilation. Blood Vessels 27：162-168, 1990*
13) Ma XI, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM：*Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutorphil adherence to coronary endothelium. Cir Res 72：403-412, 1993*
14) Braunwald E, Kloner RA：*The stunned myocardium：Prolonged, postischemic ventricular dysfunction. Circulation 66：1146-1149, 1982*
15) Patel B, Kloner RA, Przyklenk K, Braunwald E：*Postischemic myocardial "stunning"：A clinically relevant phenomenon. Ann Intern Med 108：626-628, 1988*
16) Swain JL, Sabina RL, Hines JJ, Greenfield JC, Holmes EW：*Repetitive episodes of brief ischemia (12mm) do not produce a cumulative depletion of high energy phosphate compounds. Cardiovasc Res 18：264-9, 1984*
17) Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB：*Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. Am J Physiol 251：H1306-15, 1986*
18) Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, Downey JM：*Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A_1 adenosine receptors in rabbit heart. Circulation 84：350-356, 1991*
19) Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM：*intravenous pretreatment with Alselective adenosine analogues protects the heart against infarction. Circulation 85：659-665, 1992*
20) Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, Paulis RD, Peppo AP, Chiariello L, Gioffre PA：*Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K^+ channel blocker. Circulation 90：700-705, 1994*
21) Mizumura T, Nithipatikom K, Gross GJ：*Bimakalim, and ATP-sensitive potassium channel opener, mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release, and neutrophil function in dogs. Circulation 92：1236-1245, 1995*
22) Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen S：*Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia J Mol Cell Cardiol 23：1383-1395, 1991*
23) Yellon DM, Latchman DS：*Stress proteins and myocardial protection. J Mol Cell Cardiol 24：113-24, 1992*
24) Yellon DM, Pasini E, Cargnoni A, Marber M, Latchman DS, Ferrari R：*The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium. J Mol Cell Cardiol. 24：895-907, 1992*
25) Miura T, Goto M, Urabe K, Endoh A, Shimamoto K, Iimura O：*Does myocardial stunning contribute to infarct size li-mitation by ischemic preconditioning? Circulation 84：2504-2512, 1991*
26) Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorvello F, Limonetti P, Pantoli D, Ristocali F：*Prodromal angina limits infarct size：A role for ischemic preconditioning Circulation 91：291-297, 1995*
27) Yellon DM, Alkhulaifi M Pugsley WB：*Preconditioning the human myocardium. Lancet 342：276-277, 1993*
28) Cohen MV, Downey JM：*Myocardial stunning in dogs：preconditioning effect and influence of coronary collateral flow. Am Heart J 120：282-291, 1990*
29) Cohen MV, Liu GS, Downey JM：*Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient cornary occlusion in rabbits. Circulation 84：341-349, 1991*
30) Cave AC. Hearse DJ：*Ischemic preconditioning enhances postischemic function and reduces creatine kinase leakage in the rat heart even when used in conjunction with hypothermic cardioplegia. (Abstract) Circulation 86 (suppl 1)：31, 1992*
31) Bolli R, Zughaib M, Li XY, Tang XL, Sun JZ, Triana JF, McCay PB：*Recurrently ischemia in the canine heart causes recurrent Bursts of free radical production that have a cumulative effect on contractile function：A pathophysiological basis for chronic myocardial "stunning". J Clin Invest 96：1066-1084, 1995*
32) Jenkins DP, Pugsley WB, Yellon DM：*Ischemic preconditioning in a model of global ischaemia：Infarct size limitation, but no reduction of stunning. J Mol Cell Cardiol 27：1623-1632, 1995*
33) Ovize M, Przyklenk K, Hale SL, Kloner RA：*Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. Circulation 85：2247-2254, 1992*
34) Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E：*Studies of experimental coronary artery reperfusion：Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. Circulation 68 (suppl I)：I-8-I-15, 1983*
35) Li GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR：*Myocardial preotection with preconditioning. Circulation 82：609-619, 1990*
36) Rehring TE, Brew EC, Friese RS, Banerjee A, Harken AH：*Cardiac preconditioning protects against irreversible injury rather than attenuating stunning. J Surg Res 59：111-114, 1995*
37) Preuss KC, Gross GJ, Brooks HL, Warltier DC：*Time course of recovery of "stunned" myocardium following variable periods of iscehemia in conscious and anes-*

thetized dogs. Am Heart J 114：696-703, 1987

38) Bauer B, Simkhovich BZ, Kloner RA, Przyklenk K：*Does preconditioning protect the coronary vasculature from subsequent ischemia/reperfusion injury? Circulation 88：659-672, 1993*

39) Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S：*Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333：664-649, 1988*

40) Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S：*Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood presure. Proc Natl Acad Sci USA 86：3375-3378, 1989*

41) Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA：*Apperent hydroxyl radial production by peroxynitite：implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proc Netl Acad Sci USA 87：1620-1624, 1990*

42) Palmer RMJ, Rees DD, Ashton DS, Moncada S：*L-arginine is the physiological precusor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. Biochem Biophys Res Commun 153：1251-1256, 1988*

43) Ameczua JL, Palmer RMJ, De Souza BM, Moncada S：*Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. Br J Pharmacol 97：1119-1124, 1989*

44) Kelm M, Schrader J：*Control of coronary vascular tone by nitric oxide. Circ Res 66：1561-1575, 1990*

45) Kubes P, Granger DN：*Nitric oxide modulates microvascular permeability. Am J Physiol 262：H611-H615, 1992*

46) Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S：*Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. Lancet 2：1057-1058, 1987*

47) Kubes P, Suzuki M, Granger DN：*Nitric oxide：an endogenous modulator of leukicyte adhesion. Proc Natl Acad Sci USA 86：4651-4655, 1991*

48) Kelm M, Schrader J：*Control of coronary vascular tone by nitric oxide. Cir Res 66：1561-1575, 1990*