Original Articles Korean Circulation J 1999;29(4):392-402

허혈성 전조건에서 Adenosine 수용체, Protein Kinase C 및 K_{ATP} 통로에 의한 단상성 활동전압기의 변화와 심근보호효과

영남대학교 의과대학 내과학교실,[1] 김유홍 내과의원[2]
박종선[1] · 석준호[1] · 신동구[1] · 김영조[1] · 심봉섭[1] · 김유홍[2]

The Myocardial Protective Effect and Change of the Monophasic Action Potential Duration by Adenosine Receptor, Protein Kinase C and K_{ATP} Channel in Ischemic Preconditioning in Cats

Jong Seon Park, MD[1], Jun Ho Seok, MD[1], Dong Gu Shin, MD[1], Young Jo Kim, MD[1], Bong Sup Shim, MD[1] and You Hong Kim, MD[2]

[1]Department of internal Medicine, College of Medicine, Yeungnam University, Taegu, [2]Dr. Kim's Clinic, Ulsan, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives: The myocardial protective effect of ischemic preconditioning is well known. However, the mechanism is remains unclear. The purpose of this study is to determine the role of adenosine, protein kinase C, K_{ATP} channel and the change of monophasic action potential duration on cardioprotective effect of ischemic preconditioning in cat. **Materials and Methods**: In this experiment, 66 cats were allocated into 7 groups: control (n=10), ischemic preconditioning (n=10), adenosine pre-treated (n=10), SPT (8-p-sulfophenyl theophylline) pre-treated (n=9), polymyxin B pre-treated (n=9), glibenclamide pre-treated (n=9) and nicorandil pre-treated (n=9) groups. Ischemic preconditioning was performed in ischemic preconditioning, SPT pre-treated, polymyxin B pre-treated and glibenclamide pre-treated groups by 3 episodes of 5 minutes ischemia and 10 minutes reperfusion. All animals were subjected to 40 minutes of ischemia and 40 minutes of reperfusion. Monophasic action potential duration at 50% repolarization (MAP_{50}) was measured in the ischemic and non-ischemic area respectively by epicardial probe throughout the experiment. The effect of ischemic preconditioning was determined by infarct size (% area at risk). **Results**: Ischemic preconditioning, adenosine pre-treatment and nicorandil pre-treatment groups demonstrated a significant reduction in infarct size (26±4%, 25±4% and 34±8% infarction of the risk zone, respectively, $p<0.01$, $p<0.01$ and $p<0.05$ vs. control) with respect to control (41±8% infarction of the risk zone). However, pretreatment with SPT, polymyxin B or glibenclamide abolished the effect of ischemic preconditioning. Ischemic preconditioning group exhibited a significant reduction of MAP_{50} duration in the ischemic area during preconditioning; at the first preconditioning 128±11 msec vs. 144±10 msec control, at the second preconditioning 110±10 msec vs.147±10 msec control ($p<0.01$)at the third preconditioning 114±10 msec vs. 145±11 msec control ($p<0.05$). But, pretreatment with SPT, polymyxin B and glibenclamide prevented the reduction of MAP_{50} in

논문접수일 : 1999년 1월 25일
심사완료일 : 1999년 4월 2일
교신저자 : 박종선, 705 - 035 대구광역시 남구 대명동 317 - 1 영남대학교 의과대학 내과학교실
전화 : (053) 620 - 3830 · 전송 : (053) 654 - 8386
E - mail : pjs@medical.yeungnam.ac.kr

the ischemic area during ischemic preconditioning. During 40 minutes ischemia, the shortening of MAP_{50} was more pronounced in the preconditioned group than in control group ; at 5 minutes 112±13 msec vs. 124±10 msec control, at 10 minutes 89±12 msec vs. 133±11 msec control ($p<0.05$), at 20 minutes 93±12 msec vs. 136±11 msec control ($p<0.05$), and at 30 minutes 107±19 msec vs. 144±14 msec control ($p<0.05$). In adenosine pre-treated group, the MAP_{50} was significantly shortened than control group throughout 40 minutes occlusion period ; at 5 minutes 90±8 msec $p<0.05$), at 10 minutes 77±9 msec ($p<0.05$)at 20 minutes 92±8 msec ($p<0.05$), and at 30 minutes 103±8 msec ($p<0.05$). Nicorandil pretreatment pronounced the ischemic shortening of MAP_{50} in ischemic area and the effect was significant during early ischemic period ; at 10 minutes 98±22 msec ($p<0.05$ vs. control). In pretreatment groups with SPT, polymyxin B or glibenclamide, the ischemic preconditioning of MAP_{50} measured in non-ischemic area was not significantly different compared with control group. MAP_{50} measured in ischemic area during reperfusion was not significantly different between groups. **Conclusion** : Based on this study, adenosine receptor-protein kinase C-K_{ATP} channel activation and monophasic action potential duration shortening during ischemia play an important role in myocardial protection during ischemic injury. **(Korean Circulation J 1999;29(4):392-402)**

KEY WORDS : Ischemic preconditioning · Adenosie · Protein kinase C · K_{ATP} channel.

서 론

허혈성 전조건의 심근 보호작용은 1986년 Murry[1] 등에 의해 처음으로 보고되었으며, 다양한 실험동물에서 허혈손상에 대해 심근 보호효과가 있음이 보고 되었다.[2-4] 그러나 그 작용기전에 대해서는 아직 논란이 있으며 동물의 종에 따른 작용기전의 차이도 보고되고 있다. Liu 등[5]은 처음으로 토끼에서 특이적 adenosine A1 수용체 동족체를 이용하여 허혈성 전조건과 유사한 심근 보호작용을 관찰하여 adenosine A1 수용체의 활성화가 허혈성 전조건에서 매우 중요한 초기 매개체임을 제시한 바 있다. 반면에 Kim 등[6]은 고양이를 이용한 허혈성 전조건 모델에서 adenosine A3 수용체의 활성화를 통한 protein kinase C의 활성화가 허혈성 전조건의 심근 보호작용과 관계 있다고 하였다. 대부분의 동물 종에서 adenosine 수용체의 활성화를 이용한 심근 보호작용은 많이 연구되었으나 adenosine 수용체 이후의 매개체나 작용기전에 대해서는 연구가 매우 미미하다. Noma[7]에 의해 심실세포에서 처음으로 발견된 K_{ATP} 통로의 개방은 심근의 허혈-재관류 손상을 어느 정도 예방하는 것으로 알려지고 있다.[8-10]

Gross 등[11]은 K_{ATP} 통로의 활성화가 허혈성 전조건의 심근 보호작용에서 중요한 역할을 하는 것으로 제시하였으며 Park[12]은 고양이 심장에서 K_{ATP} 통로의 활성화와 이로 인한 활동전압기의 단축이 허혈성 심근 손상을 감소시키는 것으로 보고 하였다. K_{ATP} 통로는 허혈로 인한 세포내 adenosine triphosphate(ATP) 농도의 저하, 세포내 lactate 농도의 증가, adenosine 수용체의 활성화 등에 의해 활성화 되는 것으로 알려져 있으며,[13-15] Van Winkle 등[15]은 돼지에서 adenosine으로 인한 심근 보호효과가 K_{ATP} 통로 차단제로 소실됨을 보고하여 adenosine 수용체의 활성화와 K_{ATP} 통로의 관련성을 제시하였다. 또한 Speechly-Dick 등[16]은 K_{ATP} 통로의 활성화에 protein kinase C가 중요한 역할을 한다고 하였다.

이러한 관점에서 일시적이고 가역적인 심근허혈로 인한 adenosine 수용체와 protein kinase C의 활성화는 K_{ATP} 통로를 활성화시켜 심근 보호효과를 나타내는 것으로 추정된다.

본 연구의 목적은 허혈성 전조건의 심근 보호작용에 있어서 중요한 매개체로 제시되고 있는 adenosine 수용체, protein kinase C, K_{ATP} 통로의 활성화와 억제를 통한 심근보호효과와 활동전압기의 변화를 파악하여, 허혈성 전조건의 심근 보호작용기전에 있어서 adenosine과 protein kinase C, K_{ATP} 통로의 역할을 활동전압기의 변화를 통하여 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물은 체중 2.5~3.5 kg의 외견상 건강한 잡종 고양이 66마리를 암수 구별없이 사용하였다. 실험군은 대조군 10마리, 허혈성 전조건군 10마리, Adenosine 처치군 10마리, adenosine 수용체 차단제(8-p-sulf-

ophenyl theophylline,SPT)투여군 9마리, protein kinse C 억제제(polymyxin B) 처치군 9마리, K_{ATP} 통로 차단제(glibenclamide) 처치군 9마리, K_{ATP} 통로 개방제(nicorandil) 처치군 9마리 등 7군으로 나누어 시행 하였다.

실험동물의 마취는 체중 kg 당 2 mg의 ketamine을 정맥주사하여 유도하였으며 필요에 따라 체중 kg 당 1 mg을 추가로 정맥주사하여 마취를 유지시켰다. 마취된 고양이는 자발호흡동안 실험대위에 앙와위로 고정하고 기관절개를 시행한 후 내경 5 mm의 기도삽관으로 기도를 확보하고 인공호흡장치(Harvard model 607 respirator, USA)를 사용하여 호흡을 유지시켰다. 인공호흡은 실내공기로 양압호흡을 실시하였으며 동맥혈의 PCO_2와 PO_2, pH는 각각 25~35 mmHg, 80~100 mmHg, 7.35~7.40이고 체온은 36~37℃로 유지시켰다.

흉골좌연에서 제4늑간을 따라 액와부까지 절개하여 개흉한 후 심막을 절개하여 심막요람을 만들었으며 심전도는 사지유도를 통해 표준심전도(유도 II)를 지속적으로 기록하였다. 동맥압 측정 및 약물의 주입을 위해 각각 대퇴동맥, 대퇴정맥에 23G silastic needle을 삽입하였고 좌심실 확장기말압 및 최고 좌심실압 변화속도(+dP/dt max)의 측정은 경동맥을 통해 5F 소아용 도관(5F pediatric polyvinyl catheter)을 좌심실내에 삽입하여 기록하였다. 실험 중 삽입된 도관의 폐쇄나 좌전하행 관상동맥을 결찰 후 혈전에 의한 동맥폐색을 방지하기 위하여 헤파린을 체중 kg 당 1000 U를 정맥주사하였으며 간헐적으로 헤파린이 첨가된 식염수(10 U/cc)로 도관을 세척하였다. 실험준비가 끝난 후 혈압 및 맥박이 안정될 때까지 약 20분간 안정을 취한 후 본 실험을 시작하였다. 대조군은 실험준비가 끝난 후 허혈성 전조건 없이 sham operation을 시행하였으며 좌전하행 관상동맥을 40분간 결찰하여 경색을 유도한 후 40분간 재관류하였다. 허혈성 전조건군은 허혈성 전조건 후 대조군과 같은 방법으로 경색을 유도한 후 재관류하였다. Adenosine 처치군은 허혈성 전조건 없이 경색유도전에 adenosine을 200 mg/kg/min으로 경정맥으로 5분간 투여한 후 경색을 유도하고 재관류하였다. SPT 처치군은 SPT를 허혈성 전조건 5분전에 체중 kg 당 7.5 mg을 정맥주사하였으며 polymyxin B 처치군은 polymyxin B를 체중 kg 당 24 ng을 허혈성 전조건 시작 10분 후부터 30분간 정맥주사 한 후 허혈성 전조건을 유도한 다음 경색을 유도하고 재관류 하였다. Glibenclamide 처치군은 허혈성 전조건 5분전에 glibenclamide를 체중 kg당 0.5 mg을 정맥주사하고 전조건 기간 중에는 분당 5 μg을 정맥주사 후 경색을 유도하고 재관류하였다. Nicorandil 처치군은 경색유도 10분전에 nicorandil을 체중 kg 당 0.5 mg을 정맥주사한 후 경색을 유도하고 재관류 하였다(Fig. 1).

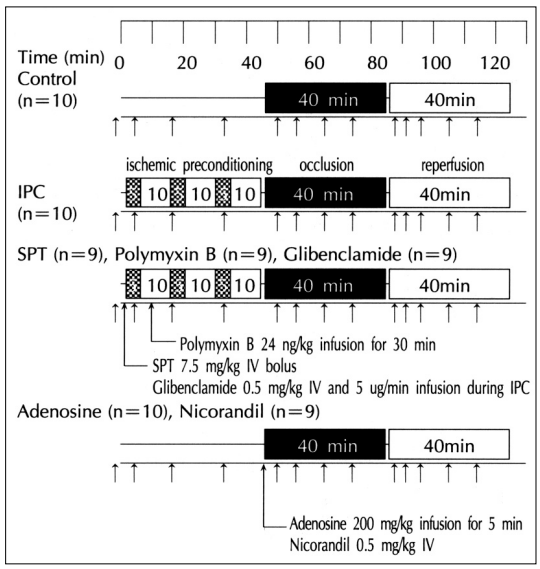

Fig. 1. Diagram of experimental time course. Ischemic pre-conditioning (IPC) was elicited by three 5 min episodes of ischemia and 10 min reperfusion. Arrow indicate epicar-dial monophasic action potential recording.

허혈성 전조건, 심근경색 유도 및 재관류

경색지역의 크기를 일정하게 하기 위해서 관상동맥 좌전하행지의 기시부에서 3~5 mm 정도 원위부에서 동맥 손상없이 3-0 견사로 동맥주위를 꿴 후 길이 1 cm, 직경 3 mm 정도의 폴리에틸렌관을 통해서 견사를 넣은 다음 견사끝을 겸자로 조임으로써 혈류를 차단하였으며 혈관의 폐쇄 및 재관류 여부는 육안으로 심근색깔의 변화 및 심전도상 ST절의 변화로 판단하였다. 허혈성 전조건의 방법은 5분간 관상동맥결찰 후 10분간 재관류하는 방법으로 3회 반복하여 유도하였으며 심근경색은 관상동맥을 40분간 차단하여 유도하였고 경색유도 후 40분간 재관류를 시행하였다.

혈역학적 지수 및 단상성 활동전압기 측정

심박동수, 좌심실 수축기압, 좌심실압 최대 +dP /dt_{max}

를 기저상태, 관상동맥결찰 30분 후, 재관류 30분 후 각각 5분간 측정하여 평균치를 구하였다. 심전도 및 각 혈역학적 측정치는 MP100WS, BIOPACK system (*USA*)을 이용하여 Acqknowledge 881 컴퓨터 프로그램에 기록저장 하였다. 단상성 활동전압(monophasic action potential, MAP)은 Franz epicardial MAP probe(EP Technologies Inc., *USA*)을 사용하여 심근 허혈부위(좌심실 전벽)와 비허혈부위(좌심실 후벽)의 심외막에서 측정하였다. 전극봉은 좌전 하행관상동맥 및 우관상동맥 관류영역의 중간의 심외막에 일정한 압력이 가해지도록 위치시킨 후 전기적 연속성을 유지하기 위해 전극과 심외막 사이에 생리식염수에 적신 스폰지를 끼웠다. 전극의 전기신호는 MAP 증폭기(EP Technologies Inc., *USA*)로 증폭하였으며 MP100WS, BIOPACK system(*USA*)을 이용하여 Acqknowledge 881 컴퓨터 프로그램에 기록 저장하였다. MAP측정시에는 심박수를 일정하게 유지하기 위해서 좌심방 부속지에 전극을 부착하여 심박 조율기로 1 mV, 180회/분으로 심박 조율을 실시하였다. 50% 재분극기간(MAP_{50})은 탈분극 시작점부터 전진폭의 50%가 재분극된 지점까지의 기간으로 하였으며 10개의 심박동에서 측정된 MAP_{50}를 평균하여 구하였다. MAP_{50}의 측정시간은 실험을 시작하기 전과 허혈성 전조건시에는 허혈유도 3분 후 측정하였으며 경색유도시는 관동맥 결찰 5분, 10분, 20분, 30분, 재관류시에는 1분, 5분, 10분, 20분, 30분에 측정하였다.

허혈 위험지역 및 경색지역의 측정

실험이 끝난 각 동물의 심장은 위험지역을 결정하기 위해 다시 관상동맥을 결찰하여 재폐쇄시킨 후 5% Evans blue 30 ml를 좌심실내 카테터로 주입하였다. 염화칼륨으로 심장을 정지시킨 후 심장을 적출하여 냉각된 생리식염수로 관상동맥 및 심실내강을 세척한 후 좌심실만을 분리하였다. 분리된 좌심실의 무게를 측정한 후 심첨부에서 시작하여 방실간구에 평행하게 2~3 mm의 간격으로 절단하여 4~5개의 절편을 만들고 각 절편의 무게를 측정하였다. 각 절편에서 좌심실에 대한 허혈 위험지역의 백분율 면적을 구하기 위해 각 절단면은 심첨부 방향이 위로 향하게 한 후 사진촬영하여 허혈 위험지역을 구하였다. 이후 각 절편에서 심근경색지역의 면적을 측정하기 위해서 각 절편을 pH 7.4, 37℃, 0.1% TTC 용액에 15분간 부화시키고 10% 포르마린 용액에 24시간 고정시킨 후 사진촬영을 실시하였다. 좌심실에 대한 허혈위험지역 및 경색지역의 면적은 각각 Evans blue 및 TTC 염색에 의해 염색이 안된 부위를 면적측정기를 이용하여 각 절단면의 전체 면적당 백분율 면적으로 계산하고 좌심실 전체 무게에 대한 각 절편의 무게의 비를 곱한 후 이를 합산하여 좌심실에 대한 허혈 위험지역 및 경색지역의 크기를 결정하였다.

사용된 약물

사용된 약물은 adenosine, 비특이적 adenosine 수용체 차단제인 8-p-sulfophenyl theophylline, protein kinase C 억제제인 polymyxin B, K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide, K_{ATP} 통로 개방제인 nicorandil(이상 Sigma Chemical Co. St. Louis, *USA*) 등을 사용하였다. 위험지역 및 경색지역을 결정하기 위한 염색은 triphenyl tetrazolium chloride(TTC)와 Evan′s blue (이상 Sigma Chemical Co. St. Louis, *USA*)을 사용하였다.

통계처리 : 모든 자료는 평균값과 표준편차로 표시하였고 자료의 통계처리는 SPSS/PC+ 통계처리 프로그램을 이용하였다. 대조군과 각 군간의 평균치의 비교는 Student′s t-test를 이용하였다. $p<0.05$의 경우를 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

각 군의 혈역학적 변화

심박수는 경색유도, 재관류에 따라 감소하는 경향을 보였으나 대조군과 각 실험군간에 유의한 차이는 없었다. 좌심실 수축기압(LVSP)은 경색유도시에는 대조군과 각 군간에 유의한 차이는 없었으나 재관류시 전조건군 및 adenosine 투여군이 대조군에 비해 유의하게 높았다(각각 $p<0.05$). 좌심실 확장기말압(LVEDP)은 경색유도시 전조건군, adenosine 처치군, nicorandil 처치군이 대조군에 비해 유의하게 높았으며(각각 $p<0.05$), 재관류 후에는 대조군과 각 군간에 유의한 차이는 없었다. Rate pressure product(RPP)와 좌심실 $+dP/dt_{max}$는 경색유도시나 재관류시 대조군과 각 군간의 차이는 없었다(Table 1).

Table 1. Hemodynamic parameters of the experimental groups

Group	Heart rate (bpm)			LVSP (mmHg)			LVEDP (mmHg)			RPP (mmHg×bpm/10^3)			dP/dtmax (mmHg/sec)		
	B	O	R	B	O	R	B	O	R	B	O	R	B	O	R
Control (n=10)	185±14	162±18	160±16	148±18	110±12	108±14	3±1	18±4	13±4	28±5	18±3	17±3	1552±126	1101±117	1233±130
IPC (n=10)	187±10	156±11	176±12	152±16	126±12	127±13*	2±1	11±4*	9±3	28±3	20±3	22±3	1591±114	1322±154	1404±129
Adenosine (n=10)	186± 9	158± 9	175±11	151±11	127±12	125±13*	2±1	11±4*	9±4	28±2	20±3	22±3	1582±109	1279±115	1383±128
SPT (n=9)	180±16	160±10	154±10	157±13	118±13	113±16	3±1	16±5	12±5	28±3	19±2	17±2	1609±135	1232±142	1193±115
Polymyxin B (n=9)	182±19	158±10	152±11	155±16	115±11	110±14	3±1	16±5	11±5	28±2	18±2	17±2	1562± 99	1182±115	1223±127
Glibenclamide (n=9)	181±17	159±25	126±30	154±22	117±20	112±18	3±2	13±5	11±4	28±6	18±4	14±4	1514±164	1235±248	1253±181
Nicorandil (n=9)	185±19	145±27	137±29	158±19	116±19	109±13	4±2	11±5*	8±3	29±5	16±2	15±3	1625±146	1258±153	1164±157

B ; basal, O ; occlusion, R ; reperfusion, IPC ; ischemic preconditioning, SPT ; 8-p-sulfophenyl theophylline, LVSP ; left ventricular systolic pressure
LVEDP ; left ventricular end-diastolic pressure, RPP ; rate-pressure product. Values are mean±SD, *p<0.05 vs. control group

Table 2. Percent of risk area to total left ventricular (LV) weight and percent of infarct area to risk are

Group	Risk area / LV	Infarct area / Risk area
Control (n=10)	43± 8	41± 8
IPC (n=10)	40± 3	26± 4**
Adenosine (n=10)	42± 9	25± 4**
SPT (n=9)	42± 9	39± 8
Polymyxin B (n=9)	41±14	39±12
Glibenclamide (n=9)	43± 7	41± 8
Nicorandil (n=9)	41± 4	34± 8*

LV ; left ventricle, IPC ; ischemic preconditioning, SPT ; 8-p-sulfophenyl theophylline. Values are mean±SD
*p<0.05, **p<0.01 vs. control group

Fig. 2. The difference of area at risk as a percent of left ventricular weight. There was no significnat difference between groups.

Fig. 3. The difference of infarct area as a percent of risk area. #p<0.01, *p<0.05 compare to control.

좌심실 허혈지역 및 경색지역

좌심실의 허혈지역은 대조군과 각 군간에 유의한 차이는 없었다(Table 2, Fig. 2). 허혈지역에 대한 경색지역은 허혈성 전조건군 26±4%(p<0.01), adenosine 처치군 25±4%(p<0.01), nicorandil 처치군 34±8%(p<0.05)로 대조군 41±8%에 비해 유의하게 적었다. SPT 처치군, polymyxin 처치군, glibenclamide 처치군의 위험지역에 대한 경색지역은 각각 39±8%, 39±12%, 41±8%로 대조군과 유의한 차이는 없었다(Table 2, Fig. 3).

단상성 활동전압기의 변화

1) 허혈부위(좌심실 전벽)의 MAP50의 변화 : 초기

Table 3. Monophasic action potential duration at 50% repolarization (MAP_{50}, msec) measured in ischemic area in cat heart

Group	Basal	Ischemic preconditioning			Occlusion			Reperfusion				
		1st	2nd	3rd	5 min	10 min	20 min	30 min	1 min	5 min	10 min	20 min	30 min
Control (n=10)	145±10	144±10#	147±10#	145±11#	124±10	133±11	136±11	144±14	145±13	149±13	156±13	161±13	167±14
IPC (n=10)	150±19	128±11	110±10**	114±10*	112±13	89±12*	93±12*	107±19*	136±12	151±13	159±14	170±18	174±19
Adenosine (n=10)	152± 6	148± 8#	150± 8#	152± 7#	90± 8*	77± 9*	92± 8*	103± 8*	120± 8	140± 8	149± 8	155± 8	167± 8
SPT (n=9)	141±16	131±16	138±17	142±21	130±17	132±17	135±17	139±19	142±22	154±26	165±31	170±22	172±34
Polymyxin B (n=9)	146±12	132±13	138±13	141±19	131±18	139±18	139±14	141±15	144±18	154±18	164±16	172± 8	174± 6
Glibenclamide (n=9)	142±13	124±18	128±11	128±13	123±15	130± 9	138±19	129±22	139±25	143±24	157±23	163±22	169±21
Nicorandil (n=9)	147±10	145± 6#	147± 5#	149± 7#	109±10	98±22*	105±31	132±26	131±31	138±31	150±26	153±32	168±22

IPC ; ischemic preconditioning, SPT ; 8-p-sulfophenyl theophylline. Values are mean±SD, #denoted ischemic preconditioning was not performed in this subjects
*p<0.05, **p<0.01 vs. control group

안정상태의 허혈지역 50% 재분극시간(MAP_{50})은 대조군과 각 군간에 유의한 차이는 없었다. 전조건 유도시 허혈성 전조건군의 MAP_{50}은 첫 번째 전조건 유도시 대조군과 유의한 차이는 없었으나, 두 번째 전조건시 110±10 msec, 세 번째 전조건시 114±10 msec로 대조군의 각각 147±10 msec, 145±11 msec보다 유의하게 낮았다($p<0.01$, $p<0.05$). 그러나 SPT, polymyxin B, glibenclamide로 전처치한 군에서는 대조군과 비교하여 전조건 유도에 따른 MAP_{50}은 유의한 차이가 없었다(Table 3, Figs. 4 and 5). 경색유도시 대조군의 MAP_{50}은 5분 124±10 msec, 10분 133±11 msec, 20분 136±11 msec, 30분 144±14 msec로 시간경과에 따라 증가하는 경향을 보였다. 허혈성 전조건군의 MAP_{50}은 초기 5분에는 대조군과 유의한 차이가 없었으나 10분 89±12 msec, 20분 93±12 msec, 30분 107±19 msec로 대조군에 비해 유의하게 낮았다($p<0.05$). Adenosine 처치군의 MAP_{50}은 5분 90±8 msec, 10분 77±9 msec, 20분 103±8 msec로 대조군에 비해 경색유도 전기간에 걸쳐 유의하게 낮았다($p<0.05$). Nicorandil 처치군에서는 경색유도 10분후에 98±22 msec로 대조군보다 유의하게 낮았으나($p<0.05$), 5분, 20분, 30분에는 대조군과 유의한 차이가 없었다. SPT 처치군, polymyxin B 처치군, glibenclamide 처치군에서는 경색유도 시간경과에 따른 허혈지역 MAP_{50}은 대조군과의 유의한 차이가 없었다(Table 3, Figs. 4 and 6). 재관류시 시간경과에 MAP_{50}은 대조군과 각 군간에 유의한 차이는 없었다(Table 3, Figs. 4, 5, 6 and 7).

2) 비허혈부위(좌심실 후벽)의 MAP_{50}의 변화 : 비허혈부위의 MAP_{50}은 허혈성 전조건, 경색유도, 재관류에 따른 대조군과 각 군간에 유의한 차이는 없었다(Table 4).

고 안

허혈성 전조건은 내재된 심근 보호기전의 하나로 대부분의 종에서 나타나는 것으로 알려져 있으며[2)3)17)] 사람의 심근에서도 관찰된 바 있다.[16)18)] 고양이를 이용한 본 연구에서 허혈성 전조건군은 대조군의 41±8%보다 낮은 26±4%의 위험지역 경색률을 보여 허혈성 전조건의 심근 보호작용이 관찰 되었다.

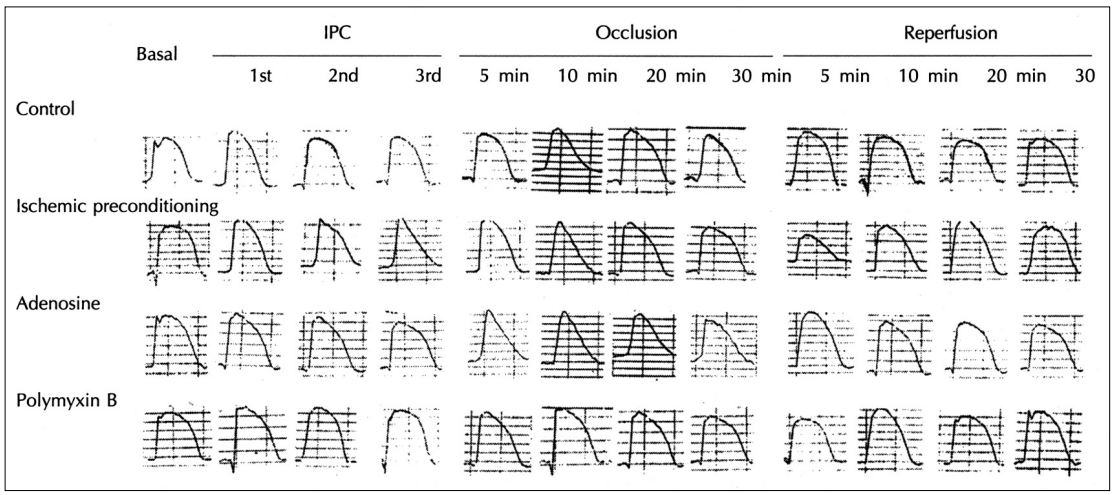

Fig. 4. A typical pattern of the monophasic action potential change in ischemic area in cat heart.

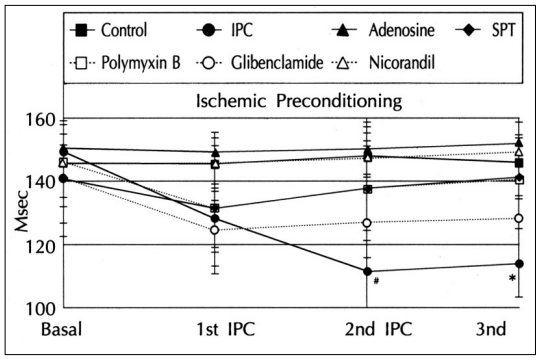

Fig. 5. Monophasic action potential duration at 50% repolarization (MAP_{50}) of the ischemic area. Ischemic preconditioning was not performed in control, adenosine and nicorandil group, *p<0.05 vs. control, #p<0.01 vs control.

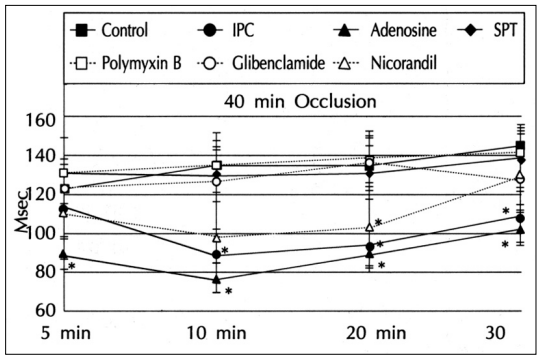

Fig. 6. Monophasic action potential duration at 50% repolarization (MAP_{50}) of the ischemic area. *p<0.05 vs. control, #p<0.01 vs control.

허혈성 전조건의 심근 보호작용의 기전에 대해서는 많은 연구가 있었으나 근본적인 작용기전에 대해서는 논란이 되고 있다. 그러나 대부분의 실험종에서 adenosine이 중요한 공통 매개체로 제시되고 있다.[5)19)20)] 본 연구에서 adenosine을 경정맥으로 투여한 군에서 25±4%의 위험지역 경색률을 보여 허혈성 전조건군의 26±4%와 유의한 차이가 없었으며, adenosine 수용체 차단제인 SPT 투여후 39±8%의 위험지역 경색율을 보여 고양이에서도 adenosine이 허혈성 전조건의 심근 보호작용에 중요한 역할을 하는 것으로 사료되었다.

Adenosine이 어떠한 작용기전으로 심근 보호효과를 나타내는지에 대해서는 많은 연구에도 아직 정확한 기전이 밝혀져 있지 않다. Ytrehus 등[21)]은 토끼의 전조건 모델에서 4β-phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 같은 protein kinase C 활성제로 전조건과 유사한 심근 보호효과를 유도하였으며 polymyxin B와 같은 protein kinase C 억제제로 전조건의 심근 보호효과를 상쇄하여 허혈성 전조건의 세포내 신호전달체계에 있어서 protein kinase C가 중요한 역할을 한다고 하였다. 또한 Kim 등[6)]은 고양이를 이용한 허혈성 전조건모델에서 허혈성 전조건의 심근 보호효과가 polymyxin B의 전처치로 소실된다고 하였다. 고양이를 이용한 본 연구에서도 polymyxin B 처치군에서 허혈성 전조건시 심근 보호효과가 소실되어 고양이에서도 protein kinase C가 허혈성 전조건의 작용기전에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되었다.

허혈성 전조건에서 adenosine 수용체의 활성화는 G 단백질과 결합하여 phospholipase C를 활성화시키고 이차 전달체인 diacylglycerol(DAG)을 증가시켜 protein

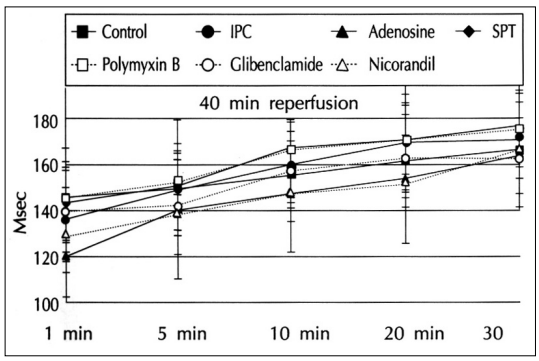

Fig. 7. Monophasic action potential duration at 50% repolarization (MAP_{50}) of the ischemic area. There was no significant difference between groups.

kinase C를 활성화시켜서 최종 효과기의 인산화에 기여하는 것으로 추정된다.[22] K_{ATP} 통로는 현재 제시되는 최종 효과기의 하나로 Noma[7]에 의해 guinea pig의 심근 세포에서 처음 발견되었으며 많은 연구들에서 허혈성 전조건의 심근 보호작용에 관여하는 것으로 알려지고 있다. 고양이를 이용한 본 연구에서 허혈성 전조건의 심근 보호효과가 K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide로 차단되었고 K_{ATP} 통로 개방제인 nicorandil로 허혈성 전조건에 상응하는 심근경색의 감소 효과가 관찰되었다. 그러므로 K_{ATP} 통로가 허혈성 전조건의 심근 보호작용에 있어서 protein kinase C의 인산화 대상이 되는 최종 효과기로 생각된다.

K_{ATP} 통로의 개방은 K^+를 세포내로 유입시켜 심활동전압기를 단축시키고 칼슘의 유입을 억제함으로써 심수축력을 감소시키고 고에너지 인산염을 보존한다.[23] 칼슘은 활동전압기의 정체기에 L-형 칼슘 통로를 통하여 세포내로 유입되어 허혈-재관류 손상에도 직접 관여하는 것으로 알려져 있다. Gross 등[24]은 칼슘 길항제가 심근의 허혈-재관류로 인한 심근 손상을 막는 것으로 보고 하였으며 이것은 세포내 칼슘 과부하가 허혈성 심근 손상의 중요한 원인임을 시사한다. Yao 등[25]은 개에서 K_{ATP} 통로 개방제인 bimakalim을 허혈 초기에 관상동맥내로 투여하여 활동전압기의 감소와 함께 심근경색의 크기가 현저히 감소함을 관찰하였으며 Schulz 등[26]은 돼지를 이용한 허혈성 전조건 모델에서 K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide로 허혈성 전조건으로 인한 활동전압기의 감소와 심근 보호효과가 소실되어 돼지에서도 K_{ATP} 통로가 허혈성 전조건의 심근 보호작용에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였

Table 4. Monophasic action potential duration at 50% repolarization (MAP_{50}, msec) measured in non-ischemic area in cat heart

Group	Basal	Ischemic preconditioning			Occlusion				Reperfusion			
		1st	2nd	3rd	5 min	10 min	20 min	30 min	1 min	5 min	10 min	20 min	30 min
Control (n=10)	145± 9	142±18#	138±13#	140±13#	143±10	145±10	147±10	148±11	155±12	161±13	158±13	162±15	166±15
IPC (n=10)	150±16	133±16	137± 9	142±14	143± 9	143±10	139± 8	144±11	156±14	159±14	160±12	158±13	163±10
Adenosine (n=10)	152± 6	150± 8#	146± 8#	149± 7#	131± 9	141± 8	146± 8	151±11	153± 9	158± 8	162± 8	164± 8	171± 8
SPT (n=9)	144±18	142±16	145±20	139±14	143±18	148±20	155±22	158±23	160±23	166±15	170±26	170±25	176±10
Polymyxin B (n=9)	143± 9	140±11	144±10	141±14	142±13	146±18	152±14	155±16	160±17	162±17	168±12	172±10	176±10
Glibenclamide (n=9)	142±10	138±11	136±11	137±14	139±10	145±13	148±16	150±19	154±30	158±25	159±27	162±22	168±21
Nicorandil (n=9)	145±10	140± 7#	146± 6#	143± 7#	141±25	148±25	152±29	145±35	161±30	157±45	155±18	152±26	165±26

IPC ; ischemic preconditioning, SPT ; 8-p-sulfophenyl theophylline. Values are mean±SD, #denoted ischemic preconditioning was not performed in this subjects

다. Tan 등[27]은 토끼의 분리 유두근에서 허혈성 전조건시 활동전압기의 감소와 세포내 칼슘의 과부하가 있었으며 이러한 효과가 glibenclamide로 소실되었음을 보고한 바 있다. 고양이를 이용한 본 연구에서 K_{ATP} 통로 억제제인 glibenclamide 투여군은 허혈성 전조건으로 인한 활동전압기의 감소가 나타나지 않았으며 K_{ATP} 통로 개방제인 nicorandil 투여군에서는 허혈성 전조건을 부여하지 않았음에도 불구하고 경색유도 초기에 활동전압기의 유의한 감소가 관찰되었다. 그러므로 K_{ATP} 통로의 활성화로 인한 활동전압기의 감소는 세포내 칼슘 과부하를 억제하여 심근 보호작용을 나타내는 것으로 추정된다.

본 연구의 다른 하나의 목적은 adenosine과 K_{ATP} 통로 활성화를 통한 심근 보호작용의 관련성이다. Kirsch 등[14]은 쥐의 심실근 세포에서 adenosine과 adenosine 수용체 동족체인 cyclohexylammonium으로 K_{ATP} 통로가 개방됨을 보고하여 K_{ATP} 통로가 Gi 단백질을 통하여 adenosine A1 수용체와 결합함을 제시하였으며 Auchampach 등[28]은 개에서 adenosine의 심근 보호효과가 K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide로 차단됨을 보고하였다. 반면에 Thornton 등[19]은 토끼에서 K_{ATP} 통로 차단제가 허혈성 전조건의 심근 보호작용을 차단하지 못한다고 보고하였다. 그러므로 동물의 종에 따라 허혈성 전조건의 심근 보호작용에 차이가 있을 것으로 추정된다. 본 연구에서는 허혈성 전조건, adenosine 수용체의 활성화와 차단을 통하여 K_{ATP} 통로 활성화의 지표인 활동전압기의 변화를 관찰비교 하였다. 고양이를 이용한 본 실험에서 adenosine 투여군에서는 경색 유도시 허혈성 전조건과 유사한 활동전압기의 감소를 관찰할 수 있었으며 adenosine 수용체 차단제인 SPT나 K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide를 경정맥 투여시 허혈성 전조건에서 나타나는 활동전압기의 감소가 소실되었다. 그러므로 adenosine의 심근 보호효과는 K_{ATP} 통로의 활성화와 활동전압기의 감소를 통하여 나타나는 것으로 생각된다.

초기 유도물질인 adenosine과 최종 효과기인 K_{ATP} 통로의 중간매개체로 Kim 등[6]은 protein kinase C를 제시한 바 있다. Speechly-Dick 등[16]은 사람의 심근세포에서 protein kinase C 활성제인 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycerol로 허혈성 전조건이나 K_{ATP} 통로 개방제인 cromakalim과 유사한 심근 보호효과를 얻었으며 이러한 심근 보호효과가 K_{ATP} 통로억제제인 glibenclamide로 차단되어 K_{ATP} 통로를 이용한 심근 보호효과에 protein kinase C가 중요한 역할을 하는 것으로 보고한 바 있다. 본 연구에서는 protein kinase C 억제제인 polymyxin B로 전처치 한 후 허혈성 전조건의 심근경색 감소효과 및 활동전압기 단축이 소실됨을 관찰할 수 있었다. 그러므로 adenosine과 K_{ATP} 통로를 이용한 심근 보호효과에 있어서 protein kinase C가 중간매개체로서 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

이상의 결과로 adenosine 수용체의 활성화는 protein kinasec C를 활성화 시키며 K_{ATP} 통로의 개방으로 인한 활동전압기의 감소가 허혈성 전조건의 심근 보호작용에 있어서 중요한 기전의 하나로 생각된다.

요 약

연구배경 :

허혈성 전조건의 심근 보호작용은 다양한 실험동물에서 보고 되었으며 작용기전은 adenosine 수용체를 통한 작용기전이 보고된 이래 다양한 작용기전이 제시되었고 최근에는 K_{ATP} 통로가 중요한 작용을 하는 것으로 제시되고 있다. 본 연구는 허혈성 전조건에 의한 심근보호 작용기전에서 adenosine, protein kinase C, K_{ATP} 통로 및 활동전압기 단축의 역할을 알아보기 위해 시행하였다.

대상 및 방법 :

체중 2.5~3.5 kg의 고양이 66마리를 대조군, 허혈성 전조건군, adenosine 처치군, 비특이적 adenosine 수용체 차단제인 SPT 처치군, protein kinase C 억제제인 polymyxin B 처치군, K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide 처치군, K_{ATP} 통로 개방제인 nicorandil 처치군 등 7군으로 나누어 실험을 시행하였다. 허혈성 전조건은 좌전하행관상동맥을 5분간 결찰한 후 10분간 재관류를 3회 반복하여 유도 하였으며 활동전압기 측정은 각 군에서 시간경과에 따라 허혈 부위 및 비허혈 부위에서 측정한 후 50% 재분극 시간(MAP_{50})을 측정하였으며 각 군에서 위험지역 및 경색지역의 크기를 측정하였다.

결 과 :

허혈 위험지역에 대한 경색지역의 크기는 대조군 42±7%에 비해 허혈성 전조건군 26±7%($p<0.01$), ade-

nosine 처치군 25±4%(p<0.01), nicorandil 처치군 34±8%(p<0.05)로 유의하게 낮았으나, SPT 처치군, polymyxin B 처치군 및 glibenclamide 처치군 대조군과 유의한 차이가 없었다.

허혈성 전조건군의 MAP_{50}은 첫 번째 전조건 유도시 대조군과 유의한 차이는 없었으나 두 번째 전조건시 110±10 msec, 세 번째 전조건시 114±10 msec로 대조군의 각각 147±10 msec와 145±11 msec보다 유의하게 낮았다(p<0.01, p<0.05). 그러나 SPT, polymyxin B, glibenclamide로 전처치한 군에서는 대조군과 비교하여 전조건 유도에 따른 MAP_{50}에 유의한 차이는 없었다.

경색유도시 허혈성 전조건군의 MAP 50은 10분 89±12 msec, 20분 93±12 msec, 30분 107±19 msec로 대조군의 각각 133±11 msec, 136±11 msec, 144±14 msec에 비해 유의하게 낮았다(p<0.05). Adenosine 처치군의 MAP_{50}은 5분 90±8 msec, 10분 77±9 msec, 20분 92±8 msec, 30분 103±8 msec로 대조군에 비해 경색유도 전기간에 걸쳐 유의하게 낮았다(p<0.05). Nicorandil 처치군에서는 경색유도 10분 후에 98±22 msec로 대조군보다 유의하게 낮았으나(p<0.05) 5분, 20분, 30분에는 대조군과 유의한 차이가 없었다. SPT 처치군, polymyxin B 처치군, glibenclamide 처치군에서는 경색유도시간 경과에 따른 MAP_{50}은 대조군과 유의한 차이가 없었다. 재관류 후 측정한 허혈 부위 MAP_{50}은 각 군간에 유의한 차이는 없었다.

결 론:

이상의 결과로 고양이에서 나타나는 허혈성 전조건에 의한 심근 보호작용은 adenosine 수용체 - protein kinase C - K_{ATP} 통로의 활성화를 통한 활동전압기의 감소가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

중심 단어 : 허혈성 전조건 · 심근보호효과 · 아데노신 수용체 · K_{ATP} 통로.

REFERENCES

1) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. *Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74:1124-36.*
2) Liu GC, Vasquea JA, Gallagher KP, Lucchesi BR. *Myocardial protection with preconditioning. Circulation 1990; 82:609-19.*
3) Scott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. *Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. Cir Res 1990;66:1133-42.*
4) Van Winkle DM, Thornton J, Downey DM, Downey JM. *The natural history of preconditioning: Cardioprotection depends on duration of transient ischemia and time to sebsequent ischemia. Coron Art Dis 1991;2:613-9.*
5) Liu GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR. *Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. Circulation 1991;84:350-6.*
6) YJ Kim, DG Shin, JS Park, GW Choi, BS Shim. *The Role of The Adenosine Receptor Subtype and Protein kinase C in Ischemic Preconditioning in Vivo Cat Heart. Circulation 1996;26:1038-47.*
7) Noma A. *ATP-regulated K channels in cardiac muscle. Nature 1983;305:147-8.*
8) Grover GJ, Dzwonczyk S, Parham CS, Sleph PG. *The protective effects of cromakalim and pinacidil on reperfusion function and infarct size in isolated perfused hearts and anesthetized dogs. Cardiovasc Drugs Ther 1990;4: 465-74.*
9) Grover GJ, Newberger J, Sleph PG, Dzwonczyk S, Tayor SC, Ahmed SZ, *et al. Cardioprotective effects of the potassium channel opener cromakalim: Streoselectivity and effects on myocardial adenine nucleotides. J pharcol Exp Ther 1991;257:156-62.*
10) Cole WC, McPherson CD, Sontag D. *ATP-regulated K^+ channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. Circ Res 1991;69:571-81.*
11) Gross GJ, Auchampach JA. *Blockage of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. Circulation 1992;70:223-33.*
12) JS Park. *The myocardial protective role of KATP channel activation and monophasic action potential duration shortening by ischemic preconditioning. Korean Journal of Medicine. In press.*
13) Keung EC, Li Q. *Lactate activates ATP-sensitive potassium channels in guinea pig ventricular myocytes. J Clin Invest 1991;88:1772-7.*
14) Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, Brown AM. *Coupling of ATP-sensitive K^+ channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. Am J Physiol 1990;259:H820-H6.*
15) Van Winke DM, Chien GL, Wolff RA, Soifer BE, Kuzume K, Davis RF. *Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the K_{ATP} channel. Am J Physiol 1994;266:H829-H39.*
16) Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. *Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent K^+ channel?. Circ Res 1995;77: 1030-5.*
17) Yellon DM, Alkhulaifi M, Browne EE, Pugsley WB. *Ischemic preconditioning limits infarct size in the rat heart. Cardiovasc Res 1992;26:983-7.*
18) Deutsch E, Bergrer M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW Jr, Herrmann HC, Laskey WK. *Adaptation to ischemia during percutaneous transmural coronary angioplasty: Clinical, hemodynamic and metabolic features. Circulation 1990; 82:2044-51.*

19) Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM. *Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. Circulation 1992; 85:659-65.*
20) Toombs CF, McGee DS, Johnston WE, *Vinton-Johanson J. Myocardial protective effects of adenosine: Infarct size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia. Circulation 1992;86:986-94.*
21) Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. *Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. Am J Physiol 1994;266:H1145-H52.*
22) Cohen MV, Downey JM. *Ischemic preconditioning: Can the protection be bottled?. Lancet 1993;342:6-12.*
23) Escande D, Cavero I. *K^+ channel openers and 'natural' cardioprotection. TIPS 1992;13:269-72.*
24) Gross GJ, Farber NE, Pieper GM. *Effect of amlodipine on myocardial functional and metabolic recovery following coronary occlusion and reperfusion in the dog. Cardiovasc Drugs Ther 1989;3:535-43.*
25) Yao Z, Gross GJ. *Effects of the K_{ATP} channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. Circulation 1994;89:1769-75.*
26) Schulz R, Rose J, Heusch G. *Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. Am J Physiol 1994;267:H1341-H52.*
27) Tan HL, Mazon P, Verberne HJ, Sleeswijk ME, Coronel R, Opthof T. *Ischemic predonditioning delays ischemia induced electrical uncoupling in rabbit myocardium by activation of ATP sensitive potassium channels. Cardiovasc Res 1993;27:644-51.*
28) Auchampach JA, Gross GJ. *Adenosine A1 receptors, K_{ATP} channels, and ischemic predonditioning in dogs. Am J Physiol 1993;264:H1327-36.*