

생쥐 심방근 활동전위 특성에 미치는 유리 활성산소의 영향

전남대학교 의과대학 전남대학교병원 순환기내과학교실,¹ 약리학교실,² 전남대학교 의과학연구소³

박형욱¹ · 정대호¹ · 윤남식¹ · 고점석¹ · 임상엽¹ · 이상록¹ · 홍서나¹

김계훈¹ · 손일석¹ · 홍영준¹ · 김주한¹ · 김 원¹ · 박령화² · 주정민²

안영근^{1,3} · 정명호^{1,3} · 조정관^{1,3} · 김재하^{2,3} · 박종춘^{1,3} · 강정채^{1,3}

Effects of Oxygen Free Radical on Action Potential in Mouse Atrial Myocardium

Hyung Wook Park, MD¹, Dae Ho Jeong, MD¹, Nam Sik Yoon, MD¹, Jeom Suk Koh, MD¹

Sang Yup Lim, MD¹, Sang Rok Lee, MD¹, Seo Na Hong, MD¹, Kye Hun Kim, MD¹

Il Suk Sohn, MD¹, Young Joon Hong, MD¹, Ju Han Kim, MD¹, Weon Kim, MD¹

Ryung Hwa Park, MD², Jeong Min Ju, DVM², Young Keun Ahn, MD^{1,3}, Myung Ho Jeong, MD^{1,3}

Jeong Gwan Cho, MD^{1,3}, Jae Ha Kim, MD^{2,3}, Jong Chun Park, MD^{1,3} and Jung Chae Kang, MD^{1,3}

¹Division of Cardiology, Chonnam University Hospital, ²Pharmacology, Chonnam National University Medical School and

³Chonnam National University Research Institute of Medical Sciences, Gwangju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives : Reactive oxygen species are known to be produced when atrial fibrillation develops. This study was performed to investigate the effects of hydrogen peroxide (H₂O₂) on the action potential parameters of the mouse atrium. **Subjects and Methods :** Mouse (ICR) atrial fibers were excised and immersed in cold bicarbonate-containing Tyrode's solution. The preparations were then perfused with oxygenated (95% O₂, 5% CO₂) Tyrode's solution and driven by an electrical stimuli 1 ms in duration at a frequency of 1 Hz. The transmembrane potentials were recorded at 0, 2.5, 5, 10, 20 and 30 minute, and compared between groups I (control), II (H₂O₂ 0.1 mM), III (H₂O₂ 0.5 mM) and IV (H₂O₂ 1 mM). **Results :** In group I, the maximal diastolic potential (MDP), action potential amplitude (APA), maximal slope at phase 0 depolarization (V_{max}), action potential duration until 50% and 90% of repolarization (APD₅₀, APD₉₀) were unchanged with increasing time. In group II, the MDP and APA were unchanged, but the V_{max} was decreased, and the APD₅₀ and APD₉₀ prolonged. In group III, the MDP was increased and the V_{max} decreased; the APD₅₀ and APD₉₀ were prolonged, but the APA unchanged. In group IV, the MDP was increased, the V_{max} and APA decreased And the APD₅₀ and APD₉₀ prolonged. After-depolarization was observed in 40% (8/20) and 54.5% (12/22) of groups III and IV, respectively, and asystole occurred in 18.2% (4/22) of group IV. **Conclusion :** Hydrogen peroxide changed the action potential parameters in both time and dose dependent manner, and also elicited after-depolarization at higher concentrations. These results suggest reactive oxygen species are involved in the electrical remodeling and arrhythmogenesis in atrial myocardium. (Korean Circulation J 2006;36:108-114)

KEY WORDS : Free radicals ; Action potentials ; Atrial fibrillation.

서론

심방세동은 지속성 부정맥 가운데 가장 흔하여 부정맥으로

입원하는 환자의 5% 정도를 차지하며 심방수축의 소실과 불규칙하고 빠른 심실율동에 의해 혈전색전증, 심부전증, 협심증, 빈맥성 심근증 등의 다양한 합병증을 일으킨다.¹⁻³⁾

논문접수일 : 2005년 10월 27일

심사완료일 : 2006년 1월 17일

교신저자 : 조정관, 501-757 광주광역시 동구 학동 8 전남대학교 의과대학 전남대학교병원 순환기내과학교실

전화 : (062) 220-6242 · 전송 : (062) 228-7174 · E-mail : chojg@unitel.co.kr

산화성 스트레스(oxidative stress)는 심혈관질환의 위험인자인 고혈압, 당뇨병, 흡연, 고지혈증 등과 함께 심방세동 유발의 원인으로 알려져 있다. Nitric oxide(NO)는 혈관확장, 혈소판 응집억제, plasminogen activator inhibitor-1 생성 증가, 백혈구 증식 억제, 평활근 증식억제 등과 함께 항산화 작용을 갖는 것으로 알려져 있다. 그러나 유리 활성산소는 NO의 작용을 억제하여 동맥경화증, 고지혈증, 흡연, 고혈압, 당뇨병, 심부전, 심방세동 등을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 관동맥우회술(coronary artery bypass surgery)은 안지오텐신 II, 유리 활성산소를 증가시켜 심방세동이 잘 발생하는 것으로 알려져 있으며 연령이 증가할수록 심방세동의 유병율이 증가하는 것은 산화성 스트레스가 연령증가에 따라 증가하는 것과도 일치한다 할 수 있다.⁵⁾

심방세동이 발생하면 산소요구량이 급격히 증가하여 유리 활성산소가 더욱 증가하고 NO 생성은 감소하게 된다. 발작성 심방세동의 발생 빈도나 지속시간이 길어질수록 심방세동의 재발 위험과 만성화 위험이 증가하는 것도 유리활성산소의 작용이 일부 기여할 것으로 생각되고 있다.

심방세동이 지속함에 따라 심방의 불응기가 점진적으로 짧아지는 심방의 전기생리적 재형성(electrophysiologic remodeling)이 일어나며, 이와 더불어 심방세동으로 인해 심방의 확장과 수축기능이 감소되는데 심방 수축기능 감소가 현저할수록 심방세동의 재발이 용이하므로 이러한 심방의 구조적, 기능적 변화도 심방세동을 지속시키는 중요한 요소가 되는 것이다. 최근의 연구에서도 산화성 스트레스가 심방조직에 작용하여 심방의 수축기능 저하를 일으킨다고 하여 심방세동에 의한 심근세포의 허혈성 변화가 심방세동을 지속시키는 기전이 될 수 있음을 시사해 주고 있다.⁶⁾

본 연구는 유리 활성산소의 하나인 과산화수소(H_2O_2)가 생쥐 심방근의 활동전위 특성에 미치는 영향을 알아보고 심방세동의 발생기전을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

경주 탈구법으로 실신시킨 20~25 g 내외의 생쥐(ICR계)의 심장을 절개하여 좌심방을 분리해낸 다음 1~2 mm의 절편으로 만들어 Tyrode액(조성; NaCl 131 mM, $NaHCO_3$ 18 mM, KCl 5.4 mM, NaH_2PO_4 1.8 mM, $MgCl_2$ 1.0 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, Dextrose 5.5 mM, 95% O_2 -5% CO_2 혼합가스로 포화

시켜 pH=7.4 되게 하고 온도는 유리 열교환기를 이용하여 37℃로 유지)을 7 mL/min의 속도로 관류시킨 bath에 넣어 놓은 후 약 1시간이 경과하고 조직이 안정되면 막 전위를 측정하였다. 활동전위는 microelectrode puller(Stoelting CO.)를 이용하여 만든 미세전극에 3 M KCl을 채우고(DC 저항이 10~30 MΩ) 이것을 micromanipulator(Brinkman 3 axis)를 이용하여 세포내에 찔러 넣고 electrometer(WPI, S7071A)를 통하여 측정된 전위를 oscilloscope(Tektronics 5113)에 그리면서 BIOPAC system(MP150CE, USA)에 저장하여 분석하였다.

활동전위로부터 분석한 변수는, 최대 이완기 전위(maximum diastolic potential; MDP, mV), 활동전위의 크기(action potential amplitude; APA, mV), 탈분극 후 50% 및 90% 재분극까지의 기간(action potential duration; APD_{50} , APD_{90} , ms), phase 0 탈분극의 최대 상승속도(V_{max}) 등이었다.

활동전위를 유도하기 위한 표본의 자극은 자극기(Grass S48)에 연결된 bipolar silver electrode(지름 0.1 mm)를 심방근 표본에 가볍게 접촉시키고 1 Hz, 1 ms 기간의 구형파를 활동 전위를 유발할 수 있는 역치 전압의 두 배로 자극하였다. 정상 대조군으로 25마리의 생쥐를 이용하였다. 유리 활성산소로는 H_2O_2 를 이용하였고 각 군에서(Sigma, USA) 0.1 mM (n=27), 0.5 mM(n=20), 1 mM(n=22) 농도로 Tyrode 용액에 용해시켜 관류시켰고 시간에 따른 변화를 관찰하기 위해 기저 상태, 2.5분, 5분, 10분, 20분, 30분치를 각각 분석하였다.

실험결과는 각 실험 군에서의 값을 평균±표준편차로 표시하였으며 통계적인 유의성 검정은 unpaired Student's t-test를 사용하였다.

결 과

Tyrode액 관류하의 활동전위 특성

정상 대조군 활동전위로부터 측정된 변수값들은, Tyrode액 관류 후 기저 상태에서 MDP는 -78.3 ± 7.1 mV, V_{max} 는 206.4 ± 50.8 V/sec였다. APA는 기저 99.6 ± 5.8 mV였고, 50% 재분극까지의 활동전위 기간은 99.2 ± 28.5 ms, 90% 재분극까지의 활동전위 기간은 170.0 ± 60.1 ms였으며 이들 값들은 활동전위를 측정하였던 시간 동안 모든 변수 값들은 유의한 변화가 없었다(Table 1).

Table 1. Effects of tyrode solution superfusion on action potential parameters in the mouse atrial fibers at each time

	Baseline	2.5 min	5 min	10 min	20 min	30 min
MDP (mV)	-78.3 ± 7.1	-81.8 ± 6.9	-80.3 ± 6.8	-81.3 ± 7.0	-79.6 ± 7.6	-80.1 ± 8.9
V_{max} (V/sec)	206.4 ± 50.8	208.4 ± 51.1	219.9 ± 48.1	212.1 ± 48.4	210.3 ± 48.8	219.9 ± 48.1
APA (mV)	99.6 ± 5.8	102.0 ± 5.7	101.4 ± 5.8	102.1 ± 5.9	102.8 ± 6.9	103.9 ± 7.4
APD_{50} (ms)	99.2 ± 28.5	97.3 ± 17.1	98.7 ± 17.5	98.4 ± 15.7	97.5 ± 16.4	98.0 ± 14.2
APD_{90} (ms)	170.0 ± 60.1	163.4 ± 35.0	165.0 ± 31.4	168.1 ± 28.4	167.5 ± 29.5	168.4 ± 25.6

Numerals are mean±SD. MDP: maximal diastolic potential, V_{max} : maximum upstroke velocity of phase 0 depolarization, APA: action potential amplitude, APD_{50} and APD_{90} : action potential duration at 50% and 90% of repolarization, respectively

Table 2. Effects of hydrogen peroxide superfusion on action potential parameters in the mouse atrial fibers at each time

H ₂ O ₂ 0.1 mM						
	Baseline	2.5 min	5 min	10 min	20 min	30 min
MDP (mV)	-74.5 ± 10.5	-75.9 ± 17.6	-76.1 ± 13.3	-73.7 ± 14.7	-72.0 ± 19.7	-71.9 ± 15.0
V _{max} (V/sec)	209.1 ± 51.3	217.1 ± 53.2	206.3 ± 44.0	194.8 ± 41.7	195.1 ± 67.8	166.1 ± 88.8*
APA (mV)	98.3 ± 7.7	102.3 ± 3.9	97.0 ± 7.1	93.3 ± 9.8	87.8 ± 15.2	90.3 ± 15.4
APD ₅₀ (ms)	100.5 ± 16.7	107.3 ± 11.1	108.3 ± 19.4	116.1 ± 21.7*	119.9 ± 30.0*	134.4 ± 43.4*
APD ₉₀ (ms)	180.8 ± 30.0	193.1 ± 19.8	195.0 ± 35.0	209.0 ± 39.1*	199.1 ± 38.0*	241.9 ± 78.2*
H ₂ O ₂ 0.5 mM						
	Baseline	2.5 min	5 min	10 min	20 min	30 min
MDP (mV)	-76.1 ± 12.2	-74.7 ± 13.5	-74.8 ± 12.5	-74.7 ± 12.9	-73.1 ± 11.9	-73.6 ± 12.2
V _{max} (V/sec)	208.9 ± 31.2	223.1 ± 29.9	209.2 ± 34.3	190.4 ± 50.6	197.9 ± 27.9	111.0 ± 51.5 [†]
APA (mV)	104.8 ± 4.2	104.7 ± 5.8	103.2 ± 6.6	100.1 ± 7.2	99.8 ± 3.4	75.0 ± 10.9*
APD ₅₀ (ms)	92.2 ± 14.7	96.4 ± 11.9	109.9 ± 19.1	135.2 ± 32.3*	161.0 ± 57.3*	219.7 ± 73.8 [†]
APD ₉₀ (ms)	166.0 ± 26.4	173.5 ± 21.4	197.7 ± 34.3	243.3 ± 58.0*	289.8 ± 103.1*	389.6 ± 172.5 [†]
H ₂ O ₂ 1.0 mM						
	Baseline	2.5 min	5 min	10 min	20 min	30 min
MDP (mV)	-80.2 ± 7.7	-82.9 ± 7.2	-79.9 ± 8.7	-79.4 ± 9.2	-74.3 ± 11.4	-65.0 ± 8.0*
V _{max} (V/sec)	197.2 ± 54.5	223.4 ± 56.4	205.8 ± 73.8	186.6 ± 71.2	146.6 ± 79.1 [†]	101.1 ± 36.4 [†]
APA (mV)	102.1 ± 6.9	104.6 ± 4.7	101.7 ± 7.0	102.4 ± 7.8	81.6 ± 34.4	71.6 ± 13.9*
APD ₅₀ (ms)	89.2 ± 15.0	95.8 ± 20.0	118.3 ± 34.0*	130.0 ± 38.0*	173.2 ± 54.3 [†]	216.5 ± 95.8 [†]
APD ₉₀ (ms)	160.5 ± 27.0	171.8 ± 36.0	213.0 ± 61.2*	233.9 ± 68.4*	311.7 ± 97.6 [†]	395.5 ± 132.8 [†]

Numerals are mean ± SD. MDP: maximal diastolic potential, V_{max}: maximum upstroke velocity of phase 0 depolarization, APA: action potential amplitude, APD₅₀ and APD₉₀: action potential duration at 50% and 90% of repolarization. *: p<0.05, †: p<0.01, as compared with the baseline

H₂O₂ 0.1 mM 관류시의 활동전위 특성의 변동

MDP는 기저 -74.5±10.5 mV, 2.5분 -75.9±17.6 mV, 5분 -76.1±13.3 mV, 10분 -73.7±14.7 mV, 20분 -72.0±19.7 mV, 30분 -71.9±15.0 mV으로서 유의한 차이가 없었다. V_{max}는 기저 209.1±51.3 V/sec, 2.5분 217.1±53.2 V/sec, 5분 206.3±44.0 V/sec, 10분 194.8±41.7 V/sec, 20분 195.1±67.8 V/sec, 30분 166.1±88.8 V/sec로서 감소하는 경향을 보였고, 특히 30분 경과시에는 유의하게 감소하였다(p<0.05). APA는 기저 98.3±7.7 mV, 2.5분 102.3±3.9 mV, 5분 97.0±7.1 mV, 10분 93.3±9.8 mV, 20분 87.8±15.2 mV, 30분 90.3±15.4 mV로 유의한 변화는 없었다. 50% 재분극까지의 활동전위 기간은 기저 100.5±16.7 ms, 2.5분 107.3±11.1 ms, 5분 108.3±19.4 ms, 10분 116.1±21.7 ms, 20분 119.9±30.0 ms, 30분 134.4±43.4 ms로서 증가하는 경향을 보였고 10분경과 시 부터는 유의하게 증가하였다(p<0.05). 90% 재분극까지의 활동전위 기간은 기저 180.8±30.0 ms, 2.5분 193.1±19.8 ms, 5분 195.0±35.0 ms, 10분 209.0±39.1 ms, 20분 199.1±38.0 ms, 30분 241.9±78.2 ms로서 APD₅₀의 경우와 마찬가지로 증가하는 경향을 보였고 10분경과 시 부터 유의하게 증가하였다(p<0.05, Table 2).

H₂O₂ 0.5 mM 관류시의 활동전위 특성의 변동

MDP는 기저 -76.1±12.2 mV, 2.5분 -74.7±13.5 mV,

5분 -74.8±12.5 mV, 10분 -74.7±12.9 mV, 20분 -73.1±11.9 mV, 30분 -73.6±12.2 mV로서 유의한 변화는 없었다. V_{max}는 기저 208.9±31.2 V/sec, 2.5분 223.1±29.9 V/sec, 5분 209.2±34.3 V/sec, 10분 190.4±50.6 V/sec, 20분 197.9±27.9 V/sec, 30분 111.0±51.5 V/sec로서 30분경과 시에만 유의하게 감소하였다(p<0.05). APA는 기저 104.8±4.2 mV, 2.5분 104.7±5.8 mV, 5분 103.2±6.6 mV, 10분 100.1±7.2 mV, 20분 99.8±3.4 mV, 30분 75.0±10.9 mV로서 감소하는 경향을 보였고 특히 30분 경과시에는 유의하게 감소하였다(p<0.05). 50% 재분극까지의 활동전위 기간은 기저 92.2±14.7 ms, 2.5분 96.4±11.9 ms, 5분 109.9±19.1 ms, 10분 135.2±32.3 ms, 20분 161.0±57.3 ms, 30분 219.7±73.8 ms로서 증가하는 경향을 보였는데 10분경과 시 부터는 유의하게 증가하였다(p<0.05). 90% 재분극까지의 활동전위 기간은 기저 166.0±26.4 ms, 2.5분 173.5±21.4 ms, 5분 197.7±34.3 ms, 10분 243.3±58.0 ms, 20분 289.8±103.1 ms, 30분 389.6±172.5 ms로서 APD₅₀의 경우와 마찬가지로 증가하는 경향을 보였고 10분경과 시부터 유의하게 증가하였다(p<0.05, Table 2).

H₂O₂ 1 mM 관류시의 활동전위 특성의 변동

MDP는 기저 -80.2±7.7 mV, 2.5분 -82.9±7.2 mV, 5분 -79.9±8.7 mV, 10분 -79.4±9.2 mV, 20분 -74.3±11.4 mV, 30분 -65.0±8.0 mV로서 탈분극하는 경향을 보였고

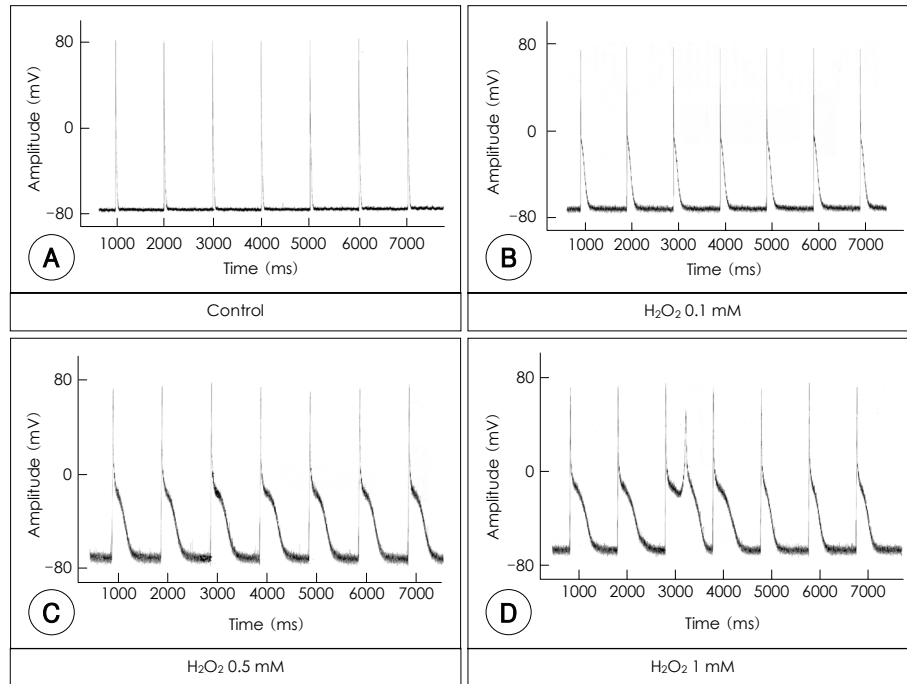


Fig. 1. Effects of hydrogen peroxide on action potential configuration in the mouse atrial fibers at 30 minute in group I (A, control), group II (B, H_2O_2 0.1 mM), group III (C, H_2O_2 0.5 mM) and group IV (D, H_2O_2 1.0 mM). After depolarization was elicited sometimes in group III and IV.

30분 경과시에는 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). V_{\max} 는 기저 197.2 \pm 54.5 V/sec, 2.5분 223.4 \pm 56.4 V/sec, 5분 205.8 \pm 73.8 V/sec, 10분 186.6 \pm 71.2 V/sec, 20분 146.6 \pm 79.1 V/sec, 30분 101.1 \pm 36.4 V/sec였고 20분 경과시부터는 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). APA는 기저 102.1 \pm 6.9 mV, 2.5분 104.6 \pm 4.7 mV, 5분 101.7 \pm 7.0 mV, 10분 102.4 \pm 7.8 mV, 20분 81.6 \pm 34.4 mV, 30분 71.6 \pm 13.9 mV로서 감소하는 경향을 보였으나 30분 경과시에만 유의하게 감소하였다($p < 0.05$). 50% 재분극까지의 활동전위 기간은 기저 89.2 \pm 15.0 ms, 2.5분 95.8 \pm 20.0 ms, 5분 118.3 \pm 34.0 ms, 10분 130.0 \pm 38.0 ms, 20분 173.2 \pm 54.3 ms, 30분 216.5 \pm 95.8 ms로서 현저히 증가하는 경향을 보였고 5분 경과시부터 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 90% 재분극까지의 활동전위 기간은 기저 160.5 \pm 27.0 ms, 2.5분 171.8 \pm 36.0 ms, 5분 213.0 \pm 61.2 ms, 10분 233.9 \pm 68.4 ms, 20분 311.7 \pm 7.6 ms, 30분 395.5 \pm 132.8 ms로서 APD_{50} 의 경우와 마찬가지로 현저히 증가하였는데 5분 경과시부터 유의하게 증가하였다($p < 0.05$, Fig. 1, 3)(Table 2).

H_2O_2 에 의한 활동전위의 후탈분극(after-depolarization) 현상의 발생

정상 대조군 및 H_2O_2 0.1 mM 투여 군에서는 시간의 경과에 따라 후탈분극이 나타나지 않았으나 H_2O_2 0.5 또는 1 mM 투여 군에서는 시간 경과에 따라 각각 40%(8/20), 54.5%(12/22)에서 후탈분극이 나타났다. H_2O_2 1 mM 투여 군에서는 18.2%(4/22)에서 15분 경과 후부터는 심방근의 무수축(asy-stole)이 발생하였다(Fig. 2).

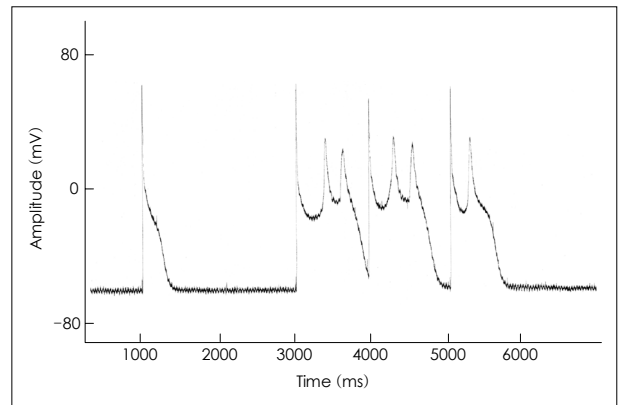


Fig. 2. Influence of hydrogen peroxide 1 mM on atrial contraction and after-depolarization. Action potential was not elicited sometimes and frequent after-depolarization occurred with H_2O_2 1 mM.

고 찰

본 연구에서 H_2O_2 는 농도, 시간 의존적으로 생쥐 심방근의 phase 0 탈분극의 최대 상승속도(V_{\max})를 감소시키고, 탈분극 후 50% 및 90% 재분극까지의 기간을 연장 시켰다. 이는 H_2O_2 가 심방세동에서처럼 급격하게 산소 소모량이 증가하여 H_2O_2 가 과량으로 생성되는 경우에는 산소 소모량이 증가할수록, 기간이 연장될수록 심방근의 전기적 재형성에 영향을 미친다고 여겨진다.

심방세동이 지속되면 세포내에 칼슘이 과다 축적되고 심방의 전기적 재형성 현상이 일어나고 이는 다시 심방세동을 지속시키는 주요 기전이 된다고 알려져 있다.⁴⁾⁷⁾⁸⁾ 이는 vera-

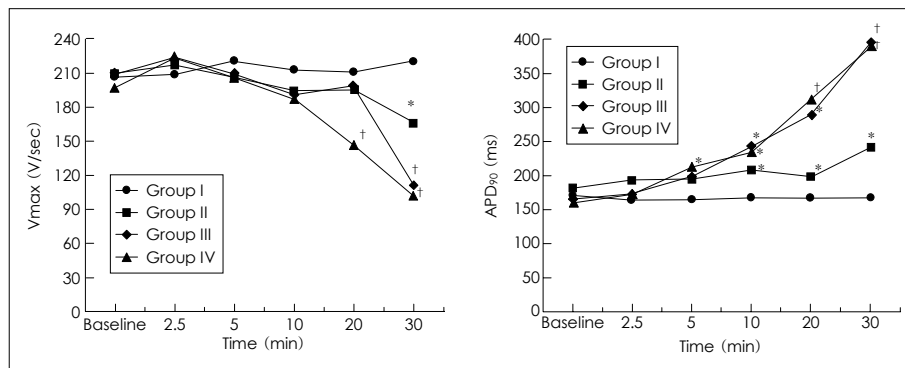


Fig. 3. Influence of hydrogen peroxide on maximal slope at phase 0 depolarization (V_{max} , left panel) and action potential duration until 90% of repolarization (APD_{90}). Group I (control), group II (H_2O_2 0.1 mM), group III (H_2O_2 0.5 mM) and group IV (H_2O_2 1.0 mM). *: $p < 0.05$, †: $p < 0.01$, as compared with the baseline.

pamil을 투여하면 심방세동에 의한 전기적 재형성이 상쇄되므로 이 같은 사실을 뒷받침한다.⁹⁾ 이런 전기적 재형성 현상은 심방세동이 만성화되는 주요 기전으로 알려져 있지만 심방세동이 동율동으로 전환된 후 유효 불응기는 수일 내 회복되더라도 심방세동의 재발은 1주가 지나서도 발생해 심방세동의 지속 기전을 전기적 재형성 현상으로만 설명하기는 미흡하다.

산화성 스트레스는 심부전, 허혈-재관류 손상과 재관류 부정맥의 발생 등 여러 심장질환과 관련이 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 산화성 스트레스로 생성된 반응성 산화물(reactive oxygen species)은 지방의 peroxidation과 thiol군의 산화작용으로 인지질과 단백질을 변형시켜 세포막의 투과성 변화와 형태의 변성을 일으키는데 이는 여러 이온 통로에 영향을 주어 세포내 Ca^{2+} 의 과축적과 세포사를 일으키게 된다.¹³⁻¹⁶⁾ 조직학적 변화로 나타나는 심방세포 내 glycogen 축적이나 sarcoplasmic reticulum의 변성, mini-mitochondria의 증가, 핵 모양의 변성 등은 만성적 심근허혈에 의한 동면 심근에서 나타나는 소견과 유사하며 세포내 glycogen의 축적은 산소 공급과 수요의 불균형으로 지방산 대신 포도당이 에너지원으로 사용된 결과이다.¹⁷⁾ 심방세동이 발생하면 발생 즉시 심방조직의 산소 소모량이 급격히 증가하고 이로 인해 혈류 증가의 예비력이 현저히 저하된다고 한다.¹⁸⁾ 그러므로 심방의 조직학적 변성은 심근내 허혈성 변화에 의한 것일 가능성이 있다고 할 수 있으며 빠른 빈맥으로 심방이 허혈상태에 빠지고 과량의 반응성 산소물이 심방세포에 지속적인 손상을 유발했을 가능성을 시사해 준다고 하겠다.

반응성 산화물의 하나인 H_2O_2 는 비교적 실온에서 안정적으로 존재하고 큰 조직으로의 투과성이 좋아 조직내에서 쉽게 OH-나 HOCl 등으로 변환되며 본 연구에서 나타난 결과는 H_2O_2 자체에 의한 변화라기보다 세포내에서 H_2O_2 가 Fenton 반응에 의해 OH-로 변환되어 나타났으리라 생각되며 이는 다른 동물실험에서와 유사한 결과였다.¹⁹⁻²¹⁾

항산화제인 ascorbate를 동물에게 전처치하면 심방고속조율에 의한 심방의 유효 불응기(effective refractory period)

의 변화를 약화시킬 수 있고, 고속 조율이 조직의 단백질의 nitration을 증가시키고 ascorbate가 이를 감소시킨다고 알려져 있어 고속 조율이 산화제의 생성을 촉진시키고 항산화제의 소비를 증가시키며 세포내 redox 상태를 변화시킨다고 할 수 있다.²²⁾ 본 연구에서는 고농도의 H_2O_2 에서 시간이 지남에 따라 심방근에서 후탈분극을 발생시켜 심근경색증과 같이 산소공급량이 급격히 감소하는 경우에는 유리 활성산소가 다량으로 발생하여 심방세동이 흔히 발생하는 이유를 뒷받침하는 결과로 생각된다.

심근의 수축력을 조절하는데 중요한 역할을 하는 myofibrillar creatinine kinase는 산화성 스트레스에 매우 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있는데 심방세동 환자의 심근조직에서 감소되어 있고, peroxynitrite의 표지자인 3-nitrotyrosine이 증가되어 있어 유리 산소가 protein의 nitration을 조장하고 심근수축력을 감소시킨다고 하며,²³⁾ 이는 본 연구에서 고농도의 H_2O_2 가 심방근 수축력을 감소시키는 결과와 일치하였고 시간이 경과함에 따라 활동전위의 phase 0 upstroke의 속도 감소, 최대 이완기전위의 증가에 미치는 결과로 생각된다.

심방세동의 우심방이(right atrial appendage)에서 산화성 스트레스와 관련된 유전자들이 과발현되어 있다는 보고는 심방세동이 지속될수록 산화성 스트레스가 심방세동의 유지에 중요한 역할을 한다는 것을 시사해 주며 심근의 대사 활성도, 이온 전도, 이온 평형, 세포막 구조, 수축력, 전기적 활성에 영향을 준다고 알려져 있다.²⁴⁻²⁶⁾

반응성 산화물이 부정맥을 일으키는 것은 안정 막전위의 감소 또는 상승, 활동전위 크기의 감소, 탈분극 속도의 감소, 활동전위 기간의 증가 또는 감소, 후탈분극(조기 또는 후탈분극) 등 다양한 기전이 제시되고 있으며 K^+ 전도의 변화(inward rectifying K^+ current), ATP 민감성 K^+ 전도의 활성화, Ca^{2+} , Na^+ 전도의 변화 등 여러 이온들이 복합적으로 관여하여 일어난다.²⁷⁻²⁹⁾

심실근을 이용한 연구에서는 반응성 산화물에 노출된 경우 시간에 따라 초기에는 전체 K^+ 전류의 감소로 인해 탈분극

활동전위의 연장, 지연 후탈분극과 Na-Ca 교환에 의한 일과성 내향전류로 촉발활동이 나타나고, 시간이 경과할수록 후기에는 전체 Ca^{2+} 전위의 감소로 활동전위 기간이 급격히 감소하고 과분극(hyperpolarization), ATP 민감성 K^{+} 전류의 활성화로 인한 수축력의 감소 등이 나타나는 이상반응(biphasic response)이 나타난다고 한다.³⁰⁾ 그러나 본 연구에서 이용한 심방근에서는 초기 활동전위의 연장이 있었으나 시간 경과에 따른 후기 단축이 나타나지 않아 이것이 심방근의 특이적 반응인지 실험 시간을 30분으로 제한하여 기록하여 이후 활동전위 기간의 변화가 나타날 것인지는 알 수 없었다. 본 연구에서는 각각의 다른 농도에서 시간 변화에 따른 활동전위 특성의 변화를 관찰하고 이를 대조군과 비교한다면 hydrogen peroxide의 조직 활동전위에 미치는 영향을 규명할 수 있으리라 판단하였으나 약물 또는 특정 상황에 의한 전기적 재형성을 평가하는 데는 wash out 후 다시 기저 상태로 회복되는 지를 관찰해야 할 것으로 생각되며 이는 제한점의 하나로 생각된다.

반응성 산화물이 허혈, 관류, 심근중 등에서 심기능을 감소시키거나 전기생리적 변화를 일으키는 기전은 다양한 이온 수송 경로에 영향을 미친 결과로 여겨진다. 이온 수송 경로에 대한 영향은 직접적인 이온 수송 경로의 단백질에 대한 효과이기도 하며 세포막 인지질을 과산화시켜 이차적으로 이온통로에 영향을 미치기도 한다. 2차 반응 전달물질인 Ca^{2+} 이 이런 변화의 주된 목표가 되지만 이외에도 여러 이온들이 반응성 산화물에 의한 막전위 변화에 관여한다. 본 연구에서는 반응성 산화물의 하나인 H_2O_2 를 이용하였으나 실제 심근허혈시에는 다양한 반응성 산화물이 생성되고 각 조직에서 나타나는 전기생리적 변화가 다르기 때문에 이들의 심근 활동전위와 조직에 미치는 영향은 앞으로 개별적으로 연구가 필요할 것으로 생각되며 개별적 이온에 미치는 영향이 밝혀지면 반응성 산화물에 의한 전기적 재형성을 억제하여 부정맥 발생을 예방 및 조기 치료할 수 있는 근간이 마련될 수 있으리라 기대된다.

요 약

배경 및 목적 :

심방세동이 발생하면 심방근의 산소 소모량이 급격히 증가하고 혈류 증가 예비력이 현저히 저하되어 심방이 허혈상태에 빠져 과량의 활성산소(reactive oxygen species)가 생성되고 이 활성 산소는 심방세포를 지속적으로 손상시켜 심방의 구조적, 기능적 변화를 일으킨다고 알려져 있다. 본 연구는 활성산소의 하나인 hydrogen peroxide가 흰쥐 심방근의 활동전위에 대한 노출 시간 및 농도에 따른 영향을 파악하고자 시행되었다.

방 법 :

경주 탈구법으로 실신시킨 흰쥐의 심장을 절개하여 심방을

분리해낸 다음 절편으로 만들어 Tyrode액을 관류시키고 1시간 후 조직이 안정되면 표본을 미세전극을 이용하여 자극하여(1 Hz, 1 ms) 활동전위(action potential: AP)를 유도하고, 0, 2.5, 5, 10, 20, 30분에 반복하여 기록하였다. 활동전위로부터 최대이완기 전위(maximal diastolic potential: MDP, mV), 활동전위 크기(AP amplitude: APA, mV), 탈분극 후 50%와 90% 재분극까지 활동전위 기간(AP duration: APD₅₀, APD₉₀, ms), phase 0 탈분극의 최대상승속도(Vmax, V/sec) 등을 분석하여 hydrogen peroxide를 투여하지 않은 대조군(I 군)과 hydrogen peroxide 0.1 mM(II 군), 0.5 mM(III 군), 1 mM(IV 군)을 투여한 실험군을 비교하였다.

결 과 :

I 군에서 시간 경과에 따라 의미 있는 변화는 없었다. II 군에서 MDP와 APA는 시간경과에 따른 유의한 변화는 없었다. Vmax는 시간 경과에 따라 감소하였으며, APD₅₀와 APD₉₀은 시간 경과에 따라 연장되었다. III 군에서 MDP는 변화가 없었으나 Vmax, APA는 감소하였고 APD₅₀와 APD₉₀은 연장되었다. IV 군에서 MDP는 상승하였으며 Vmax, APA는 점차로 감소하였다. APD₅₀과 APD₉₀은 연장되었다. 지연 탈분극이 III 군의 40%(8/20)에서, IV 군의 54.5%(12/22)에서 관찰되었고, IV 군의 18.2%(4/22)에서 심방근 무수축(asystole)이 발생하였다.

결 론 :

Hydrogen peroxide는 심방근 활동전위에 시간과 농도에 따라 탈분극 속도를 감소시키고 재분극 시간을 연장시켰으며, 고농도에서 후탈분극을 일으켜 심근허혈 및 재관류 상황에서 부정맥 발생과 전기적 재구도에 관여할 것으로 생각된다.

중심 단어 : 유리 활성산소; 활동전위; 심방세동.

이 논문은 전남대학교병원 학술연구비(CUHRI-U-00353)에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- 1) Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation. *N Engl J Med* 1982; 306:1018-22.
- 2) Cobbe SM. Incidence and risks associated with atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 1994; 17:1005-10.
- 3) Peters KG, Kienzle MG. Severe cardiomyopathy due to chronic rapidly conducted atrial fibrillation: complete recovery after restoration of sinus rhythm. *Am J Med* 1988; 85:242-4.
- 4) Diamandopoulos L, Dudley SC Jr. Atrial fibrillation: are we treating the right disease? *Cardiovasc Rev Rep* 2003; 93:231-7.
- 5) de Vecchi E, Pala MG, di Credico G, et al. Relation between left ventricular function and oxidative stress in patients undergoing bypass surgery. *Heart* 1998; 79:242-7.
- 6) Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, et al. Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 2001; 104:174-80.
- 7) Daoud EG, Bogun F, Goyal R, et al. Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. *Circulation* 1996; 94:1600-6.

- 8) Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ. *Electrical remodeling in atrial fibrillation: time course and mechanism*. *Circulation* 1996; 94:2968-74.
- 9) Nam GB, Kim DW, Che C, et al. *Pacing-induced atrial electrical remodeling and its recovery in conscious dog atria*. *Korean Circ J* 1998;28:961-9.
- 10) Cesselli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, et al. *Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy*. *Circ Res* 2001;89:279-86.
- 11) Jeroudi MO, Hartley CJ, Bolli R. *Myocardial reperfusion injury: role of oxygen free radicals and potential therapy with antioxidants*. *Am J Cardiol* 1994;73:2B-7B.
- 12) Woodward B, Zakaria MN. *Effects of some free radical scavengers on reperfusion induced arrhythmias in the isolated rat heart*. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:485-93.
- 13) Ceconi C, Cargoni A, Pasini E, Condorelli E, Curello S, Ferrari R. *Evaluation of phospholipid peroxidation as malondialdehyde during myocardial ischemia and reperfusion injury*. *Am J Physiol* 1991;260:H1057-61.
- 14) Dixon IM, Kaneko M, Hata T, Panagia V, Dhalla NS. *Alteration in cardiac membrane Ca^{2+} transport during oxidative stress*. *Mol Cell Biochem* 1990;99:125-33.
- 15) Dixon IM, Hata T, Dhalla NS. *Sarcolemmal Na^{+} - K^{+} ATPase activity in congestive heart failure due to myocardial infarction*. *Am J Physiol* 1992;262:C664-71.
- 16) Neticadan T, Temsah R, Osada M, Dhalla NS. *Status of Ca^{2+} /calmodulin protein kinase phosphorylation of cardiac SR proteins in ischemia-reperfusion*. *Am J Physiol* 1999;277:C384-91.
- 17) Sun H, Gaspo R, Leblanc N, Nattel S. *Cellular mechanism of atrial contractile dysfunction caused by sustained atrial tachycardia*. *Circulation* 1998;98:719-27.
- 18) White CW, Kerber RE, Weiss HR, Marcus ML. *The effects of atrial fibrillation on atrial pressure-volume and flow relationships*. *Circ Res* 1982;51:205-15.
- 19) Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, et al. *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*. *Circ Res* 1989; 65:607-22.
- 20) Tsai KL, Wang SM, Chen CC, Fong TH, Wu WL. *Mechanism of oxidation stress-induced intracellular acidosis in rat cerebellar astrocytes and C6 glioma cells*. *J Physiol* 1997;502:161-74.
- 21) Wu ML, Tsai KL, Wang SM, Wu JC, Wang BS, Lee YT. *Mechanism of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical induced intracellular acidification in cultured rat cardiac myoblasts*. *Circ Res* 1996;78:564-72.
- 22) Carnes CA, Chung MK, Nakayama T, et al. *Ascorbate attenuates atrial pacing-induced peroxynitrite formation and electrical remodeling and decreases the incidence of post-operative atrial fibrillation*. *Circ Res* 2001;89:E32-8.
- 23) Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, et al. *Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation*. *Circulation* 2001;104:174-80.
- 24) Hwang GS, Kim YH, Kim MK, et al. *Gene expression and ultrastructural remodeling in persistent atrial fibrillation*. *Korean Circ J* 2004;34:693-705.
- 25) Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C Jr, Reimer KA. *Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury: changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure*. *Circ Res* 1985;56:262-78.
- 26) Kim JH, Ju JM, Cho YB, et al. *Influence of ischemic-stimulation on the action potential characteristics in rat atrial fibers*. *Korean Circ J* 1999;29:1225-33.
- 27) Pallandi RT, Perry MA, Campbell TJ. *Proarrhythmic effects of an oxygen-derived free radical generating system on action potentials recorded from guinea pig ventricular myocardium: a possible cause of reperfusion-induced arrhythmias*. *Circ Res* 1987;61:50-4.
- 28) Barrington PL, Meier CF Jr, Weglicki WB. *Abnormal electrical activity induced by free radical generating systems in isolated cardiomyocytes*. *J Moll Cell Cardiol* 1988;20:1163-78.
- 29) Bhatnagar A, Srivastava SK, Szabo G. *Oxidative stress alters specific membrane currents in isolated cardiac myocytes*. *Circ Res* 1990;67:535-49.
- 30) Jaber RI, Cole WC. *Alterations in electrical activity and membrane currents induced by intracellular oxygen-derived free radical stress in guinea pig ventricular myocytes*. *Circ Res* 1993;72: 1229-44.