

실험적 허혈 및 재관류유도시 Adenosine이 심근재관류 손상에 미치는 영향

영남대학교 의과대학 내과학교실, 의공학과,* 약제과,** 해부학교실***
신동구 · 김영조 · 심봉섭 · 이준하* · 박종민** · 김미진***

= Abstract =

The Protective Effect of Intravenous Adenosine on Myocardial Reperfusion Injury in Feline Heart Model

Dong Gu Shin, M.D., Young Jo Kim, M.D., Bong Sub Shim, M.D.,
Jun Ha Lee, Ph.D.,* Chong Min Park,** Ph.D., Mi Jin Kim, M.D.***

Department of Internal Medicine, Biomedical Engineering, Pharmacy,** Anatomical Pathology,***
College of Medicine, Yeungnam University, Taegu, Korea*

Background : Among the various mechanisms of myocardial reperfusion injuries, neutrophil is thought to be one of them. Endogenous coronary vasodilator adenosine is known to have myocardial protective effect through variable pharmacologic action, influencing the function of several cell types involved in the pathogenesis of myocardial reperfusion injury. This study was designed to determine the beneficial effect of adenosine on the left ventricular function during reperfusion and whether this effect is due to the adenosine on the role of neutrophil.

Methods : 27 open-chest cats were randomly divided into 3 groups. 6 cats received ischemic injury without reperfusion(group 1). 21 cats were subjected to 60 minutes of proximal left anterior descending coronary artery occlusion followed by a 60-minute reperfusion. 11 of 21 cats received intravenous adenosine(0.15mg/Kg/min) infusion starting 5 minutes before reperfusion throughout the entire period(group 3). 10 cats received equal volume of saline instead of adenosine(group 2).

Results :

1) During the experimental period, significant decrease of heart rate, blood pressure, RPI, negative dP/dT and increase of LVEDP were noted in group 2 and 3 with no difference between the two groups. The reduction of positive dP/dT was more significant in group 2 at 30 and 60 minute of reperfusion than the preocclusion value(1404 ± 111 , 1631 ± 161 vs 1832 ± 169 mmHg/sec at baseline, $p < 0.05$). In contrast, positive dP/dT in group 3 at 30 and 60 minute of reperfusion were similar to baseline values(1890 ± 92 , 2052 ± 112 vs 2025 ± 227 mmHg/sec at baseline, $p = \text{NS}$). These were significantly higher($p < 0.05$) than untreated group 2.

2) Infarct size was significantly reduced in adenosine-treated group 3, when expressed as a percentage of the area at risk($28.4 \pm 3.3\%$ vs $44.5 \pm 3.2\%$ of group 2, $p < 0.05$). The significant increase in myeloperoxidase activity observed after reperfusion was not detected in adenosine-

treated group 3. (0.18 ± 0.05 vs 0.46 ± 0.09 unit/100mg wet tissue weight, $p < 0.05$). A significant correlation was present between infarct size (% of left ventricle) and myeloperoxidase activity ($r = 0.72$, $p < 0.01$).

3) Light microscopic examination demonstrated the decreased acute interstitial and intravascular inflammatory infiltration and capillary plugging together with decreased tendency of incidence of contraction band necrosis in adenosine treated group 3.

Conclusion : These findings suggest that intravenous administration of adenosine during the early reperfusion period significantly reduces infarct size, improving the early recovery of global ventricular function. The probable cause is the effect of adenosine on neutrophil as one of the various protective mechanisms of adenosine in feline heart model subjected to coronary occlusion and reperfusion, 60 minutes each.

KEY WORDS : Intravenous Adenosine · Reperfusion injury.

서 론

관상동맥폐색후 재관류시에 발생할 수 있는 심근세포괴사의 촉진, 세포부종, 무혈류현상(no-reflow phenomenon), 출혈성경색, 칼슘의 축적으로 인한 독성(calcium and oxygen paradox), 유리 산소기의 발생, 허혈후 심근기능의 저하(postischemic left ventricular dysfunction) 및 전기 생리학적인 변화에 의한 재관류부정맥등이 발생하여 재관류요법시 기대되는 허혈성심근손상 방지효과를 감소시킬 수 있다¹⁾.

재관류손상의 중요한 기전중 하나는 유리산소기에 의한 것으로 생각되어지고 있는데^{2,3)} 이는 심근세포, 혈관내피세포, 호중구와 대식세포 등에서 발생하거나 카테콜라민의 산화, 불포화지방산산화물로 인한 부산물로 발생하여 심근 및 혈관내피세포의 손상을 일으키게 된다⁴⁻⁷⁾.

1975년 Hill과 Ward⁸⁾의 재관류손상과 호중구와의 관계에 대한 기술을 시작으로 심근재관류 손상의 중요한 기전중의 하나인 호중구의 역할에 대해서 많이 연구되어지고 있는데⁹⁻¹⁴⁾ 호중구는 재관류시 유리산소기나 단백분해효소를 발생¹⁵⁾하여 혈관내피를 손상시키고 leukotriene이나 PAF(platelet activating factor)같은 혈관활성물질을 분비하며¹⁶⁾, 응집된 호중구는 심근내 모세혈관을 막아 궁극적으로 심근내 미세혈행을 차단함으로써¹²⁾ 재관류 손상의

기전에 증추적 역할을 하는 것으로 생각되어지고 있다. 이런 호중구의 역할에 대해서는 호중구감소후²²⁾나 소염제의 사용시²³⁾ 또는 호중구에 대한 단일항원항체 사용시²⁴⁾ 재관류손상이 감소된다는 연구사실로서¹⁷⁾ 뒷받침된다.

아데노신(adenosine)은 인체에 내재하는 ATP 대사산물이며 관상동맥혈류조절인자¹⁸⁾로서 관상동맥혈류 증가에 의한 허혈성심근손상 감소작용이외 유리산소기나 단백분해효소분비의 억제¹⁹⁾, 호중구와 혈관내피와의 결합억제²⁰⁾, 혈소판의 응집과 thromboxane의 유리억제²¹⁾등 다양한 약리작용을 나타낸다고 알려져 있다. 이러한 사실로 미루어 보아 아데노신은 재관류 손상을 감소시킬 수 있을 것이라고 생각되며 특히 호중구에 대한 영향으로 호중구의 유리산소기의 발생¹⁹⁾, 혈관내피와의 작용²⁰⁾, 심근내 침윤 등을 감소시킴으로써 재관류손상 감소방법으로 유용한 약물이 될 것이라고 사료되나 생체내에서는 그 정도나 기전에 대하여 논란의 여지가 많다.

본 연구는 고양이의 좌전하행지동맥을 60분간 결찰한 후 60분간 재관류시켜 허혈-재관류손상을 유도하고 재관류직전 아데노신을 정맥투여하여 아데노신이 허혈-재관류손상에 의한 심근경색의 크기와 혈역학적 변화에 미치는 영향 및 호중구와의 관계등을 관찰함으로써 재관류손상의 기전 특히 호중구의 역할에 대해 관찰하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 실험재료 및 준비

실험동물은 체중 2.2~4.5kg의 건강한 고양이 27마리를 암수 구별없이 사용하였다. 마취는 ketamine을 체중 kg당 2mg을 정맥주사하여 유도하고 필요에 따라 체중 kg당 1mg을 수시로 정맥주사하여 유지시켰다. 마취된 고양이는 자발호흡동안 실험대위에 양와위로 고정하고 기관절제를 시행한 후 내경 5mm의 기도내관으로 기도를 확보하고 인공호흡장치(Harvard model 607 respirator)를 사용하여 실내공기로 양압인공호흡을 실시하여 동맥혈의 PCO_2 , PO_2 , pH 및 체온을 각각 25~30mmHg, 80 mmHg 이상, 7.35~7.40, 36~37°C로 유지시켰다.

검상돌기에서 흉골좌연을 따라 제2늑골까지 절개하여 개흉한 후 심막을 절개하여 심막요람을 만들었다. 심전도는 사지유도를 통해 표준심전도(유도 II)를 지속적으로 기록하였으며 동맥압 측정 및 adenosine의 주입을 위해 각각 대퇴동맥, 대퇴정맥을 23G silastic needle로 삽관하였고 좌심실압 및 좌심실압 변화속도(dP/dT치)를 측정하기 위해서 23G silastic needle를 좌심실에 삽입하였다. 실험중 삽입된 도관의 폐쇄 혹은 좌전하행지 결찰후 혈전에 의한 관상동맥폐색을 방지하기 위하여 heparin을 kg당 1000 u를 정맥주사하고 간헐적으로 heparinized saline액(10 u/cc)으로 도관을 세척하였다. 심전도 및 각 혈액학적 측정치는 Acqknowledge 881 컴퓨터 프로그램(MP100WS, BIOPAC System Inc, USA)을 이용하여 컴퓨터에 기록저장하였다.

2. 실험방법

1) 관상동맥폐쇄 및 재관류(Fig. 1)

경색부위 및 크기를 일정하게 하기 위해서 관상동맥 좌전하행지의 기시부에서 5mm 정도의 부위에서 동맥 손상없이 3~0 견사를 동맥 주위로 켜 후 길이 1cm, 직경 3mm 정도의 폴리에틸렌관을 통해서 견사를 넣은 다음 견사 끝을 겹자로 묶으로써 혈류 차단을 유도하였으며 혈관의 폐쇄 및 재관류 여부는 육안으로 심외막 심근색깔의 변화 및 심전도상 ST절의 변화로 판단하였다.

실험준비가 끝난 후 혈압 및 맥박이 안정될 때까지 30분간 기다렸다가 실험을 시작하였으며 Fig. 1과 같이 6마리에서는 허혈성 손상만을 가하기 위하여 60분간 관동맥결찰후 재관류없이 중단하여 제 1 대조군으로 하였고, 10마리에서는 재관류에 의한 심근손상을 관찰하기 위해 60분간 관동맥결찰후 60분간 재관류시키고 재관류 5분전부터 생리식염수만을 분당 0.25cc로 계속 정맥주사하여 제 2 대조군으로 하였다. 11마리에서는 2 대조군과 같이 60분 관동맥결찰, 60분 재관류시켰으며 재관류 5분전부터 adenosine(Sigma Chemical Co. St. Louis, USA)(2mg/ml in 0.9% NaCl)을 infusion pump를 이용하여 0.15mg/kg/min 속도로 재관류 60분동안 계속 정맥주사하여(평균주입수액량 16cc, adenosine양 32.5mg) 실험군(제 3 군)으로 하였다.

세군 모두에서 관상동맥폐쇄와 재관류로 발생할 수 있는 치명적인 부정맥을 예방하기 위해서 관동맥결찰전에 2% lidocaine을 체중 kg당 2mg을 전처치하였다.

2) 혈액학적 측정

심박동수, 수축기 및 이완기 혈압, 좌심실압, 좌심실 이완말기 혈압을 측정하였다. RPI(rate-pressure product index)는 수축기혈압 심박동수/1,000을 이용하여 계산하였으며, 컴퓨터에 기록된 좌심실압의 변화로부터 심근수축력을 나타내는 positive dP/dT치, 이완력을 나타내는 negative dP/dT치를 구하였다.

3) 심장경색부위 및 위험지역 결정

실험이 끝난 각 동물의 심장은 생체내 위험지역을 결정하기 위해 다시 관상동맥을 겹자로 조여 재폐쇄시키고 60초 이내에 5% Evans blue 30ml를

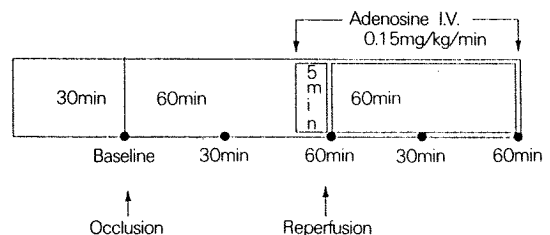


Fig. 1. Diagram of experimental procedure.

● : indicate the time of hemodynamic measurements

대퇴정맥으로 주입하고 약 20초후 염화칼리움으로 심장을 정지시킨 후 즉시 심장을 적출하여 냉각된 생리식염수로 관상동맥 및 심실내강을 세척하고 좌심실만을 분리하였다. 분리된 좌심실의 무게를 측정 한 후 심첨부에서 시작하여 방실간구(aurio-ventricular groove)에 평행하게 2~3mm의 간격으로 절단하여 5개의 절편을 만들고 각 절편의 무게를 측정하였다. 각 절편에서 위험지역의 % 면적을 구하기 위해 각절단면은 심첨부 방향이 위로 오게 해서 사진촬영하였다. 이 후 각 절편에서 심근경색지역의 크기를 측정하기 위해서는 생존가능세포에만 존재하는 보효소와 탈수효소에 대한 반응으로 염색이 되는 tetrazolium을 사용하여 각 절편을 pH 7.4, 37°C, 0.1% nitroblue tetrazolium(NBT) (이상 Sigma Chemical Company, St. Louis, USA)용액에 15분간 부화시키고 다시 상기방법으로 사진촬영하였다. 좌심실에 대한 위험지역 및 경색면적은 각각 Evans blue 및 NBT 염색에 의해 염색이 안된 부위를 면적측정기를 이용하여 각절단면의 전체 면적당 % 면적으로 계산하고 좌심실 전체무게에 대한 각 절편의 무게의 비를 곱한 후 이를 합산하여 좌심실전체중 위험지역 및 경색부위의 크기를 결정하였다(예 : 좌심실의 무게가 10gm이고 1번 절편에서 5번절편의 무게가 각각 1.5, 2.0, 3.0, 2.5, 1.0gm이고, 각 절편에서 경색부위가 차지하는 면적비율이 10, 20, 30, 15, 25%일 경우 경색의 크기는 $1.5/10 \times 0.1 + 2.0/10 \times 0.2 + 3.0/10 \times 0.3 + 2.5/10 \times 0.15 + 1.0/10 \times 0.25 = 20.75\%$ 이다). 이후 즉시 3번 절편은 조직병리학적인 변화를 관찰하기 위해 10% neutral buffered formalin에 담았고 나머지는 실험이 끝난후 myeloperoxidase 측정을 위해 즉시 -70°C의 deep freezer에 저장하였다.

4) Myeloperoxidase 측정

Bradley등²⁵⁾과 Mullane등²⁶⁾에 의한 방법으로 측정하였는데 대략 기술하면 다음과 같다.

상기 실험후 얻은 심장조직을 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide(HTAB)를 함유한 pH 6, 6ml의 50mM potassium phosphate 완충용액에 넣고 homogenization 시킨 후 30초간 sonication후 10,000g에서 30분간 원심분리후 상층액 0.1ml를 0.167mg/ml 0-dianisidine hydrochloride와 0.0005%

hydrogen peroxide(이상 Sigma Chemical Co. St. Louis, USA)가 함유된 2.9ml의 pH 6인 50mM potassium phosphate 완충액과 섞은 후 분광측정기로 460nm에서 30초간격으로 2분간 측정하였으며 30초와 90초 사이의 흡광도의 차이를 이용하여 결과는 units(u)/100mg wet tissue weight로서 표시하였으며, MPO의 단위는 25°C에서 분당 1 mol의 peroxide를 중화시키는 것을 1 unit의 MPO로 하였다.

5) 조직병리학적인 변화

조직변화를 관찰하기 위해 3번째 절편으로 hematoxylin-eosin(H & E)염색후 광학현미경적검사를 실시하였다. 호중구와 조직구의 침윤정도, 출혈, 경색부위의 관찰은 Romson등²²⁾의 방법을 변형하여 정도에 따라 0점에서 3점까지 반정량화하였으며, 호중구의 침윤정도는 200배의 배율에서 관찰되지 않거나 5개이하일 경우 0점으로 하고 5개이상, 10개이상, 15개이상 관찰될 경우 각각 +1, +2, +3점으로 하였다. 구축괴사(contraction band necrosis)의 정도는 Tazelaar등²⁷⁾의 방법으로 괴사가 관찰되지 않을때 0점, 국소적으로 존재할때 +1, 미만성으로 관찰될때 +3점으로 하여 0점에서 3점까지로 나누어 조직변화의 정도를 측정하였다.

6) 통계처리

모든 자료는 평균값과 표준오차로 표시하였고 자료의 통계처리는 SPSS 통계처리 프로그램을 이용하여 각 군간의 평균치의 비교는 분산분석(ANOVA) 및 unpaired t-test, 각 군내의 시간대별 평균치의 비교는 paired t-test, 조직학적 변화의 정도는 Fisher의 정확도검정을 이용하였으며, p값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 혈역학적 변화(Table 1, Fig. 2, 3)

심박동수는 제 1, 2 대조군 및 실험군에서 실험 시작시 각각 분당 200 ± 13 , 187 ± 7 , 205 ± 6 회였으며 재관류직전까지 유의한 변화가 없었으나 재관류 30분 및 60분의 심박수는 제 2 대조군이 각각 163 ± 5 , 164 ± 6 회, 실험군에서는 175 ± 8 , 176 ± 8 회로서 기준치에 비하여 유의한 감소를 보였으나 각 군간의

Table 1. The changes of hemodynamic variables during the experimental procedure

Group Time	HR(beats/min)			SBP(mmHg)			RPP(HR×SBP/1000)		
	1*	2	3	1	2	3	1	2	3
Baseline	200±13	187±7	205±6	162±10	167±11	179±10	33.1±3.8	31.6±3.8	37.2±2.9
Occlusion									
30 min	171±16	184±9	187±7	142±8	154±8	156±10	24.8±3.4	28.5±2.3	29.7±2.7
60 min	180±15	175±8	186±8	145±9	156±6	159±7	26.9±4.0	27.4±1.8	29.8±2.2
Reperfusion									
30 min		163±5	175±8		154±7	163±8		25.0±1.3	28.6±1.8
60 min		164±6	176±8		162±5	165±10		26.8±1.8	29.4±2.6
Group Time	LVEDP(mmHg)			P-dP/dT(mmHg/sec)			N-dP/dT(mmHg/sec)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Baseline	10.8±0.9	11.2±1.2	12.2±1.0	1755±1.7	1832±169	2025±227	1544±149	149±135	1555±212
Occlusion									
30 min	14.7±1.3	12.2±1.1	15.2±1.5	1530±168	1645±71	1983±200	1269±118	1447±109	1469±155
60 min	15.1±2.3	13.8±2.6	16.4±2.0	1520±91	1530±91	1881±179	1188±132	1289±71	1310±73
Reperfusion									
30 min		19.5±4.5	15.4±2.9		1404±111	1890±92**		1195±34	1413±139
60 min		15.8±2.8	15.4±2.2		1631±161	2052±112**		1404±116	1526±160

HR : heart rate, SBP : systolic blood pressure, RPP : rate-pressure product, LVEDP : left ventricular enddiastolic pressure, P-dP/dT : positive dP/dT, N-dP/dT : negative dP/dT

*1, 2, 3 denote group

**p<0.05 vs group 2

차이는 관찰할 수 없었다. 수축기혈압은 실험시작시 제 1, 2 대조군 및 실험군에서 각각 162±10, 167±11, 179±10mmHg였고 관상동맥 결찰 30분에 142±6, 154±8, 156±10mmHg, 60분에 145±9, 156±6, 159±7mmHg로서 각 기준치에 비해 유의하게 감소하였으며, 재관류 30분의 수축기 혈압은 제 2 대조군에서 154±7mmHg로서 유의하게(p<0.05 vs 167±11mmHg) 감소하였다가 재관류 60분에 163±8mmHg로 기준치로 회복하였다. 심근산소요구량의 지표인 RPI는 각 군의 기준치가 33.1±3.8, 31.6±2.8, 37.2±2.9로서 유의한 차가 없었으며 제 2 대조군 및 실험군의 재관류 30분 및 60분의 RPI는 각각 25.0±1.3, 28.6±1.8 및 28.6±1.8, 29.4±2.6 으로서 모두 기준치에 비해 유의하게 감소하였으나 각 군간의 차이는 없었다.

심실이완말기혈압은 실험시작시에 10.8±0.9, 11.2±1.2, 12.2±1.0mmHg였으며 재관류 30분 및 60분의 제 2 대조군에서 19.5±4.5, 15.8±2.8mmHg로 모두 유의하게(p<0.05, vs 11.2±1.2mmHg)증가하

였다. 실험군에서는 15.4±2.9, 15.4±2.2mmHg로 증가하였으나 기준치와 유의한 차이는 관찰할 수 없었으며(Table 1, Fig. 3), 제 2 대조군과 차이도 발견할 수 없었다.

Positive dP/dT는 기준치가 제 1, 2 대조군 및 실험군에서 1755±179, 1832±169, 2025±227 mmHg/sec였으며 제 2 대조군에서는 재관류30분 및 60분에 각각 1404±111, 1631±161mmHg/sec로 유의하게(p<0.05 vs 1832±169mmHg/sec) 감소하였다. 그 변화는 재관류 30분에 최저로 감소하였다가 60분에 회복되는 경향을 관찰할 수 있었다. 실험군에서는 재관류 30분 및 60분에 1890±92, 2052±112mmHg로서 기준치에 비해 유의한 감소는 없었으며 재관류 30분과 60분에서 제 2 대조군과 차이를 보였다(1404±111 vs 1890±92mmHg, 1631±161 vs 2052±112mmHg, p<0.05).

Negative dP/dT는 positive dP/dT와 비슷한 변화의 경향을 보였으나(Table 1, Fig. 3), 제 2 대조군과 실험군간의 통계적인 차이는 관찰할 수 없었다.

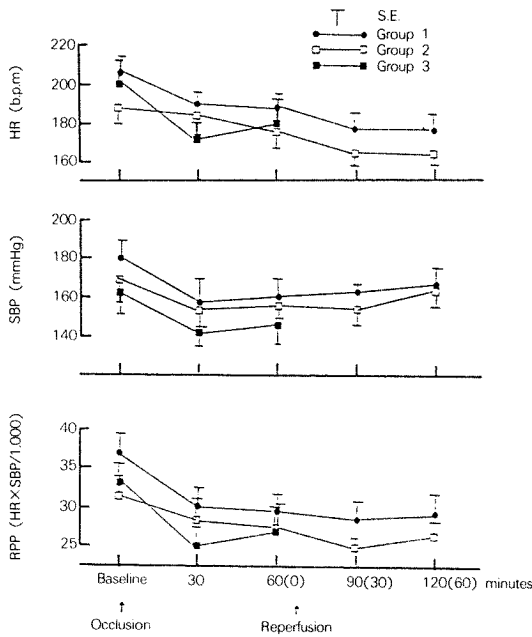


Fig. 2. The changes of hemodynamic variables during the experimental procedure.
 HR : heart rate, SBP : systolic blood pressure,
 RPP : rate-pressure product
 Group 1 : received ischemic injury only as control 1, Group 2 : ischemia+reperfusion as control 2. Group 3 : ischemia+reperfusion+adenosine as experimental group

2. 심근경색크기에 대한 영향(Table 2, Fig. 4)

제 1, 2 대조군 및 실험군에서 좌심실에 대한 위험부위의 비율이 각각 $33.7 \pm 9.1\%$, $38.4 \pm 3.4\%$, $40.4 \pm 7.6\%$ 로서 통계적 차이없이 비교적 일정하였다. 각 군의 위험부위에 대한 경색의크기는 각각 $37.8 \pm 7.3\%$, $44.5 \pm 6.4\%$, $28.4 \pm 6.5\%$ 로서 제 1 대조군의 37.8% 보다 재관류군인 제 2 대조군에서 44.5% 로서 재관류후 6.7% 정도 경색부위의 크기가 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 좌심실에 대한 위험부위가 실험군이 가장 컸음에도 불구하고 실험군에서는 경색의 부위가 대조군에 비해 유의하게 (28.4 ± 6.5 vs $44.5 \pm 6.4\%$, $p < 0.05$) 작았으며 16% 의 감소효과를 관찰할 수 있었다.

3. Myeloperoxidase치의 변화(Fig. 5)

Myeloperoxidase치는 제 1 대조군에서 0.14 ± 0.04 unit/100mg wet tissue weight였으며 재관류치료를 한 제 2 대조군에서는 0.46 ± 0.09 unit/100mg wet tis-

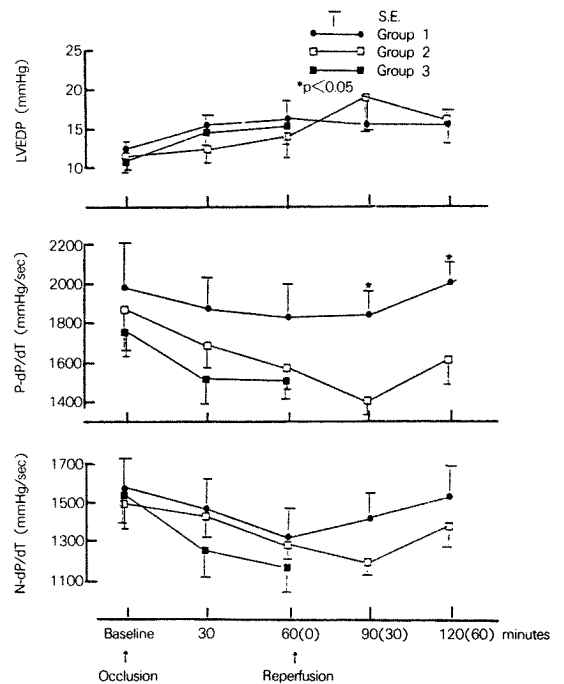


Fig. 3. The change of left ventricular indices during the experimental procedure.
 LVEDP : left ventricular enddiastolic pressure
 P-dP/dT : positive dP/dT
 N-dP/dT : negative dP/dT
 * $p < 0.05$ vs group 2
 **see Fig. 2 for the group

Table 2. Analysis of infarct size

Group	AR/LV(%)	AN/AR(%)
1	33.7 ± 4.6	37.8 ± 3.6
2	38.4 ± 1.7	44.5 ± 3.2
3	40.4 ± 3.8	$28.4 \pm 3.3^*$

AR : area at risk, LV : left ventricle,

AN : area of necrosis

Values are given as mean \pm S.E.

* $p < 0.05$ vs group 2

sue weight로서 허혈성 손상만을 받은 제 1 대조군에 비하여 유의하게 ($p < 0.05$) 높았으며, 실험군에서는 0.18 ± 0.05 unit로서 제 2 대조군에 비해 유의하게 ($p < 0.05$) 낮았다.

4. 경색의 크기와 myeloperoxidase치와의 관계 (Fig. 6)

좌심실내 위험부위에 대한 경색부위의 크기와 myeloperoxidase치의 상관관계는 Fig. 7과 같았다.

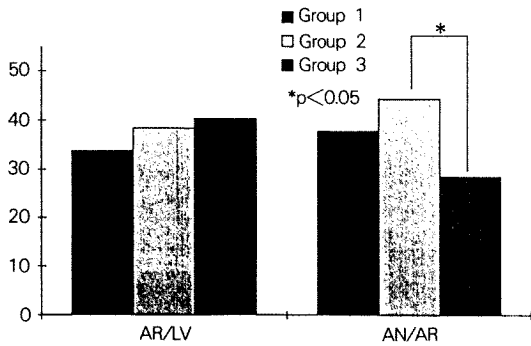


Fig. 4. Effect of intravenous adenosine on the size of area of necrosis(AN) expressed as a percentage of area at risk(AR). AR as a percentage of total left ventricle(LV) is also shown. Despite a greater AR, AN was significantly reduced when expressed as a percent of area at risk.

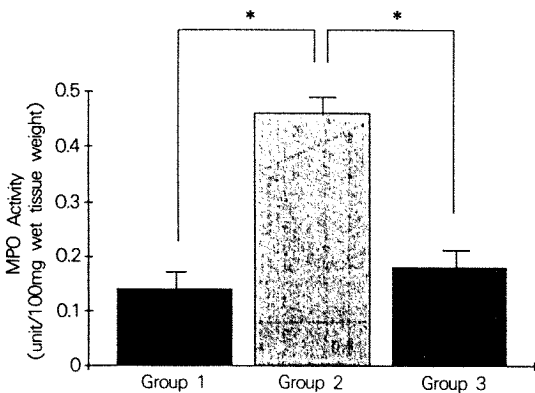


Fig. 5. Myeloperoxidase(MPO) activity in unit/100mg wet tissue weight in each groups.
* $p<0.05$

경색의 크기가 클수록 myeloperoxidase치가 증가하였고 경색의 크기와 myeloperoxidase치는 통계적으로 유의한 상관관계가 있었다($r=0.72$, $p<0.01$).

5. 조직병리학적 변화(Table 3)

5마리의 제 2 대조군과 7마리의 실험군에서 적출한 심장의 광학현미경적 소견상 간질내 호중구의 침윤정도는 +2 이상인 경우가 제 2 대조군에서는 전 예에서 관찰되었으나 실험군에서는 7예중 4예에서만 관찰되었다($p<0.05$). 혈관내 호중구의 응집정도도 제 2 대조군에서는 전 예에서 +2 이상이었으나 실험군에서는 전 예에서 +1 이하였다($p<0.05$).

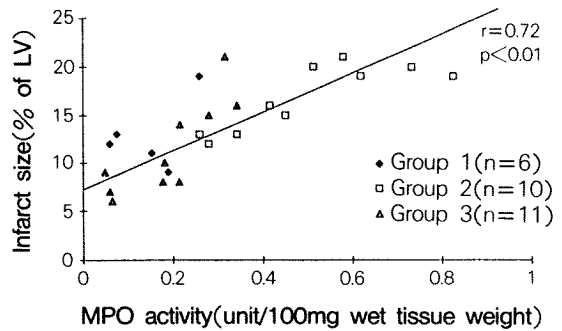


Fig. 6. Relationship between infarct size and units of MPO activity in infarcted myocardium.

Table 3. Semiquantitative histological assessment by light microscopy

Histological parameter	Group 2 (n=5)	Group 3 (n=7)
Hemorrhagic infarct		
0-+1**	5	7
+2-+3	0	0
Contraction band necrosis		
0-+1	0	2
+2-+3	5	5
Neutrophil infiltration		
Interstitial 0-+1	0	3*
+2-+3	5	4
Intravascular 0-+1	0	7*
+2-+3	5	0
Patchiness of infarct		
0-+1	5	7
+2-+3	0	0

* $p<0.05$ vs group 2 by Fisher's exact test

**see text for grading score

조직구의 침윤, 구축성괴사의 정도는 Table 3과 같이 실험군에서 적은 경향을 보였으나 유의한 감소는 관찰되지 않았고, 출혈성경색소견 및 경색의 분포정도는 전혀 관찰되지 않았으며 허혈-재관류 손상의 시간이 짧았기 때문인지 양 군간의 유의한 차이는 관찰할 수 없었다.

고 찰

임상적으로 급성관동맥폐쇄에 의한 허혈성심근 손상을 감소시키기위한 방법으로 혈전용해요법이 나 경피적 관상동맥성형술, 관상동맥우회술 등의

재관류요법이 필요함은 이미 많은 실험적 근거를 가지고 발전되어왔다. 재관류시 심근손상의 정도가 더욱 악화될 수 있는 문제점이 있는데 이것을 재관류손상이라고 하며, 이러한 현상은 관상동맥연축에 의한 이형협심증에서 연축이 소실되어 재관류되거나 관동맥내 혈전이 자연 개통되는 경우에서도 나타난다.

심근세포부종, 심근세포의 괴사축진, 출혈성심근경색, 무혈류현상, 허혈성 심근의 지연회복(postischemic left ventricular dysfunction)의 현상으로 나타나는 재관류손상^{4,5,28)}은 화학적 매개체, 즉 leukotriene B₄, chemotactic factor나 phorbol ester 등^{8,16)}에 의해 활성화된 호중구와 허혈성 손상을 받은 심근세포나 혈관내피세포에서 ATP의 분해과정에서 생성되는 유리산소기에 의해 발생하는데^{2,3,6,7)} 특히 호중구는 단백분해효소, platelet-activating factor, 아라키돈산 대사산물, 산소활성물질등을 분비하여 심근손상을 초래하는 중요한 기전으로 작용하게 된다^{7,9-15)}. 유리산소기중 과산화음이온(O₂⁻)이 가장 중요한 손상을 초래하게 되며 이에 근거하여 유리산소기소거효소제인 superoxide dismutase(SOD)를 사용하여 재관류손상을 감소시킬 수 있다는 보고^{29,30)}가 있다. 그러나 Engler등³¹⁾의 보고에 의하면 연구마다 실험동물의 차이, 소거효소제의 양 및 투여시간 등 실험방법의 차이와 SOD 자체의 작용시간이 짧기때문에 재관류초기에 유리산소기를 제거시키더라도 재관류후기에 나타날 수 있는 심근손상에 대한 효과는 기대하기 어려우며 따라서 소거효소제의 효과에 대한 결론을 내리기는 어렵다고 한다. 그러므로 보다 직접적인 방법으로 허혈-재관류시 염증반응으로 생길 수 있는 호중구의 심근내 침윤을 감소시킴으로써 호중구의 심근손상기전을 차단하여 재관류손상을 줄일 수가 있다고 할 수 있겠다. 호중구감소후나^{17,22)} 호중구에 대한 단일항원항체 사용시²⁴⁾, 이부프로펜 등²³⁾의 약물사용시 심근손상이 감소된다는 보고들은 이에 대한 근거가 된다.

이러한 기전을 가진 약물중의 하나로서 최근 아데노신의 허혈-재관류시 심근손상방지효과에 대한 관심이 높아지고 있다. 아데노신은 인체에 내재된 ATP대사산물로써 심장에 대한 작용으로 음성변력(變力) 및 변시(變時)효과를 나타낼뿐만

아니라 심근허혈시 분비되어 관상동맥확장을 통한 심근내 혈류 및 산소공급증가, 카테콜아민의 분비 감소^{18,32)} 등을 통하여 심근보호효과를 나타내고 호중구의 알파 2 수용기에 작용하여 단백분해효소 및 과산화음이온의 발생억제¹⁹⁾, 호중구와 혈관내피세포의 응집억제²⁰⁾ 및 당대사를 개선³³⁾ 시켜 세포산성도를 감소시키고 칼슘축적을 막는등 다양한 약리작용이 보고되어 있으며, 이러한 기전으로 허혈-재관류손상을 감소시킬 수 있다고 추측할 수 있다.

허혈-재관류실험을 위한 방법에 있어서 일반적으로 90분 정도의 관동맥폐색과 충분한 재관류손상을 관찰하기 위해 24 내지 72시간 이상의 재관류기간이 필요하나 Reimer등³³⁾의 연구에 의하면 관동맥결찰후 40분경 위험부위에 대한 경색부위의 비율이 38% 일어남으로 실험후 경색의 크기를 측정하는데 있어 본 실험에서 사용한 60분간의 허혈손상기간도 충분하리라 생각되며, 재관류기간은 재관류시 손상정도가 아데노신의 투여로 지연되어 나타날 수 있으므로 24 내지 72시간후 손상정도를 판단해야 된다고 주장³¹⁾하고 있으나 본 실험은 재관류시 손상이 호중구에 의한것임을 밝히고 재관류시 60분 이내에 호중구의 침습⁹⁾이 시작될뿐 아니라 Pitrays등³⁴⁾의 보고처럼 투여한 아데노신의 효과가 재관류이후 지속적으로 관찰될 수 있기 때문에 60분허혈, 60분재관류모델로서도 위양성 실험결과를 초래하지 않는다고 생각한다.

혈역학적지표중 심박수, 수축기혈압은 대조군에서는 재관류 30분까지 지속적인 감소현상을 보이다가 재관류60분경 다소 회복되는 경향을 보였으나 아데노신처치군에서는 재관류30분경부터 회복되기 시작하였으며 본 연구에서 아데노신투여로 16% 정도의 심근경색감소효과를 관찰할 수 있었는데 이는 심근산소요구량의 지표인 RPI와 좌심실이완말기 혈압이 각군간에 동일하였기 때문에 아데노신의 관상동맥확장에 의한 효과인지는 이 실험에서는 배제할 수 없지만 아데노신의 혈역학적 영향으로 인한 효과라고는 생각할 수 없다. 좌심실말기압과 최대 및 최소 dP/dT치는 대조군에서 재관류 30분경 최저로 감소하였다가 재관류 60분경 약간 회복되는 경향을 보였으나 아데노신처치군에서는 재관류직 후부터 기준치로 회복하기 시작하였으며 이중 최고

dp/dT치는 재관류 30분, 60분경에 대조군에 비해 유의한 증가를 보임으로써 심근변력작용의 조기회복을 관찰할 수 있었다.

Mullane 등²⁶⁾의 보고처럼 호중구의 침윤 정도와 myeloperoxidase치의 관계는 비례한다고 볼 수 있기 때문에 조직내 호중구의 침윤 정도를 평가할 수 있는 방법으로서 호중구에 특이적으로 존재하는 myeloperoxidase를 측정하였는데 Fig 5에서와 같이 허혈성손상만을 받은 군에 비해 재관류시킨 군에서 myeloperoxidase치의 유의한 증가를 관찰할 수 있었으며 재관류시 아데노신을 처치한 군에서는 유의하게 감소하였다. 또한 myeloperoxidase치의 변화와 좌심실에 대한 경색부위의 크기가 유의한 상관관계가 있는 것으로 보아 이러한 결과는 호중구의 심근침윤증가로 인한 심근 손상을 의미하며 아데노신은 이러한 결과의 기전으로 단순히 재관류에 의한 관동맥혈류량의 증가뿐만 아니라 심근조직내 호중구의 혈관내 응집이나 침윤을 막음으로써 재관류에 의한 손상을 감소시킨 것이라 생각된다. 아데노신투여시간도 재관류시작직전에 투여하였기 때문에 이것은 아데노신의 허혈성손상보다는 재관류손상에 대한 효과인 것으로 판단할 수 있다.

아데노신의 효과를 보고한 다른 연구결과³⁵⁻³⁸⁾에 의하면 좌전하행지결찰시 아데노신의 정맥투여로는 18% 내지 20% 정도, 정맥투여를 한 본 연구에서도 16%의 심근경색감소효과를 볼 수 있었으나 관상동맥내로 직접투여한 경우 31% 정도의 효과를 보고하였는데 이는 투여경로에 의한 차이일 것이라고 추정되며 재관류시간이나 실험방법에 의한 차이도 고려해야 할 것이다.

본 연구의 제한점으로 첫째 심근내 혈류량의 변화를 측정하지 않았기 때문에 아데노신에 의한 심근내 혈류량변화에 대한 영향이 미치는 정도가 고려되지 않았고 둘째 치료량의 리도카인이 호중구에 작용하여 경색의 크기를 줄인다는 보고³⁹⁾도 있기 때문에 본 연구에서는 모든 군에서 관동맥결찰직전부터 리도카인을 사용하였으므로 리도카인의 영향에 대해서는 판단하기 힘들며 특히 아데노신과 리도카인의 상호작용에 대해서는 좀더 연구해볼 필요가 있으리라고 생각된다. 세째 허혈-재관류시간이 짧았기 때문에 충분히 재관류손상의 정도를 파악하지 못한 점이라고 할 수 있겠다.

결과적으로 본 연구는 60분 허혈, 60분 재관류시킨 고양이심장에서 아데노신을 분당 0.15mg/Kg으로 재관류직전부터 60분간 정맥투여함으로써 혈액역학적 지표의 변화없이 16% 정도의 심근경색부위의 크기를 감소할 수 있었고 심근기능이 재관류후 악화되는 현상을 방지할 수 있었으며 또 심근의 myeloperoxidase치가 재관류후 증가하였다가 아데노신의 사용으로 감소하였고 조직학적으로도 심근내 호중구의 침윤이 감소되었다는 점으로 보아 심근의 재관류손상의 한 기전으로 호중구의 작용을 알 수 있었으나 아데노신의 심근에 대한 다른 작용기전이나 호중구에 대한 직접적인 작용으로 인한 침윤의 감소가 원인인지는 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

이상의 결과로 미루어 보아 아데노신의 투여로 재관류손상에 의한 심근경색의 크기를 감소시키고 심실기능의 호전을 기대할 수 있었으며 그러나 재관류손상발생의 기전과 아데노신의 작용기전에 대해 아직 인간에게서 밝혀진바 없으므로 그대로 인체에 적용할 수는 없지만 재관류요법시 아데노신의 정맥투여는 인간에게서도 경색의 크기를 감소시키기 위한 방법이 되리라고 생각하며 향후 이에 대한 연구가 더 필요하다고 생각된다.

요 약

연구배경 :

허혈후 재관류시 재관류손상은 호중구, 혈관내피 및 심근세포 등에서 생성되는 독성 산소유리기에 의해 일어난다고 생각되어지며 최근 재관류손상의 감소방법에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다. 이중 아데노신은 인체내재성 관상동맥확장작용을 가지는 물질로서 재관류시 다양한 기전에 의해 심근재관류손상감소효과를 나타낸다고 생각된다.

방 법 :

본 연구는 아데노신의 정맥투여가 재관류시 재관류손상에 의한 심실기능의 악화에 미치는 영향을 관찰하고 심근의 myeloperoxidase측정을 이용하여 심근내 호중구의 침윤 정도를 측정함으로써 아데노신의 재관류손상 감소효과가 아데노신의 호중구에 대한 작용에 의한 것임을 알아보고자 한 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

결 과 :

아데노신 투여시 혈액학적 측정치중 심박수, 수축기 및 이완기혈압, 심실이완말기혈압과 RPI(rate-pressure product index)는 제 2 대조군과 실험군 사이에 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

위험부위에 대한 심근경색의 크기는 아데노신을 사용한 실험군에서 제 2 대조군에 비해 유의한 감소를 관찰할 수 있었다(28.4 ± 3.3 vs $44.5 \pm 3.2\%$, $p < 0.05$). Myeloperoxidase치는 허혈성 손상만을 받은 제 1 대조군보다 재관류군인 제 2 대조군에서 현저하게 높았으며(0.46 ± 0.09 vs 0.14 ± 0.04 unit/100 mg wet tissue weight, $p < 0.05$), 재관류직전 아데노신을 투여한 실험군에서는 현저한 감소현상을 보였다(0.18 ± 0.05 vs 0.46 ± 0.09 unit/100 mg tissue weight, $p < 0.05$). 그리고 myeloperoxidase치와 좌심실의 위험부위에 대한 심근경색부위의 크기와는 유의한 상관관계를 보였다($r = 0.72$, $p < 0.01$). 조직학적으로 호중구의 심근침윤 및 혈관내 응집 정도는 실험군에서 유의하게 감소하였으며 조직구나 구축괴사의 정도는 아데노신을 사용한 실험군에서 줄어든 경향이 보였으나 유의한 차이는 없었다. 혈액학적 지표중 심근수축기능의 지표인 positive dP/dT치는 실험군에서는 재관류 30분, 60분에 기준치에 비해 심근수축력의 유의한 감소가 없었으며(1890 ± 92 , 2052 ± 112 vs 2025 ± 227 mmHg/sec, $p = NS$), 제 2 대조군에서는 기준치에 비해 지속적인 감소현상을 나타내었고(1404 ± 111 , 1631 ± 161 vs 1832 ± 169 mmHg/sec, $p < 0.05$), 재관류 30분에 최저로 감소하였다.

결 론 :

아데노신을 재관류직전 정맥투여함으로써 심근 경색부위의 크기를 감소시킬 수 있었고 심근수축력이 재관류후 악화되는 것을 방지할 수 있었으며, 이는 아데노신의 다양한 약리작용중 호중구의 심근침윤의 억제효과가 그 기전의 일부라고 생각된다.

References

- 1) Braunwald E, Kloner RA : Myocardial reperfusion : A double-edged sword ? J Clin Invest 76 : 1713-1719, 1985
- 2) Lucchesi BR : Myocardial ischemia, reperfusion

and free radical injury. Am J Cardiol 65 : 141-231, 1990

- 3) Zweier JL, Kuppusamy P, Lutty GA : Measurement of endothelial cell free radical generation : Evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. Proc Natl Acad Sci 85 : 4046-4050, 1988
- 4) Krug A, Mesnil de RW, Korb G : Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. Circ Res 19(1) : 57-62, 1966
- 5) Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB : The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. J Clin Invest 54(6) : 1496-1508, 1974
- 6) McCord JM : Oxygen-derived free radicals in postischemic cell injury. N Engl J Med 312(3) : 159-163, 1985
- 7) Harlan JM : Leukocyte-endothelial interactions. Blood 65 : 513-519, 1985
- 8) Hill JH, Ward PA : The Phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts in rats. J Exp Med 133 : 885-893, 1975
- 9) Engler RL, Dahlgren MD, Peterson MA, Dobbs A, Schmid-schonbein GW : Accumulation of polymorphonuclear leukocytes during 3-h experimental ischemia. Am J Physiol 251 : H93-H100, 1986
- 10) Go LO, Murry CE, Richard VJ, Weischadel GR, Jennings RB, Reimer KA : Myocardial neutrophil accumulation during reperfusion and reversible or irreversible ischemic injury. Am J Physiol 255 : H1188-H1198, 1988
- 11) Jennings RB, Reimer KA : Factors involved in salvaging ischemic myocardium : Effect of reperfusion of arterial blood. Circulation 68(suppl I) : 125-136, 1984
- 12) Tsao PS, Ma XL, Lefer AM : Activated neutrophils aggravate endothelial dysfunction after reperfusion of the ischemic feline myocardium. Am Heart J 123 : 1464-1472, 1992
- 13) Ma XL, Tsao PS, Viehman GE, Lefer AM : Neutrophil-mediated vasoconstriction and endothelial dysfunction in low-flow perfusion-reperfused cat coronary artery. Circ Res 69 : 95-106, 1991
- 14) Werns SW, Lucchesi BR : Leukocytes, oxygen radicals and myocardial injury due to ischemia and reperfusion. Free Radicals Biol Med 4 : 31-37, 1988

- 15) Fontone JC, Ward PA : *Polymorphonuclear leukocyte-mediated cell and tissue injury : Oxygen metabolites and their relation to human disease. Human Pathol* 16 : 973-978, 1985
- 16) Fort-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley MV, Smith MJH : *Leukotriene B₄, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. Nature* 286 : 264-265, 1980
- 17) Bajaj AK, Cobb MA, Virmani R, Gay JC, Light RT, Forman MB : *Limitation of myocardial reperfusion injury by intravenous perfluorochemicals : Role of neutrophil activation. Circulation* 79 : 645-656, 1989
- 18) Berne RM : *The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. Circ Res* 47(6) : 807-813, 1980
- 19) Cronstein BN, Kramer SB, Weissman G, Hirschorn R : *Adenosine : A physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. J Exp Med* 158 : 1160-1167, 1983
- 20) Cronstein BN, Levin RI, Belanoff J, Weissman G, Hirschorn R : *Adenosine : An endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. J Clin Invest* 78 : 760-770, 1986
- 21) Tanabe M, Terashita Z, Nishikawa K, Hirata M : *Inhibition of coronary circulatory failure and thromboxane A₂ release during coronary occlusion and reperfusion. J Cardiovasc Pharmacol* 6 : 442-448, 1984
- 22) Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schort MA, Lucchesi BR : *Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. Circulation* 67 : 1016-1023, 1983
- 23) Romson JL, Hook BG, Rigot VH, Schork MA, Swanson DP, Lucchesi BR : *The effect of ibuprofen on accumulation of Indium-111-labeled platelets and leukocytes in experimental myocardial infarction. Circulation* 66(5) : 1002-1011, 1982
- 24) Simpson PJ, Todd III RF, Mickelson JK, Fantone JC, Gallagher KP, Lee KA, Tamura Y, Cronin M, Lucchesi BR : *Sustained limitation of myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody that alters leukocyte function. Circulation* 81 : 226-237, 1990
- 25) Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein GR : *Measurement of cutaneous inflammation : Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. J Invest Dermatol* 78 : 206-209, 1982
- 26) Mullane KM, Kraemer R, Smith B : *Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. J Pharmacol Meth* 14 : 157-167, 1985
- 27) Tazelaar HD, Karsh SB, Stephens BG, Billingham ME : *Cocaine and the heart. Human Pathol* 18 : 195-199, 1987
- 28) Tao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson III G, Lefer AM : *Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. Circulation* 82 : 1402-1412, 1990
- 29) Naslund U, Haggmark S, Johansson J, Marklund SL, Reiz S : *Limitation of myocardial infarct size by superoxide dismutase as an adjunct to reperfusion after different durations of coronary occlusion in the pig. Circ Res* 66 : 1294-1301, 1990
- 30) Mehta JL, Nichols WH, Donnelly WH, Lawson DL, Thompson L, Riet Mtier, Saldeen TGP : *Protection by superoxide dismutase from myocardial dysfunction and attenuation of vasodilator reserve after coronary occlusion in dog. Circ Res* 65 : 1283-1295, 1989
- 31) Engler R, Gilpin E : *Can superoxide dismutase alter myocardial infarct size ? Circulation* 79(5) : 1137-1142, 1989
- 32) Wilson RF, Wyche K, Christensen BV, Zimmer S, Laxson DD : *Effects of adenosine on human coronary arterial circulation. Circulation* 82 : 1595-1606, 1990
- 33) Finegan BA, Lopaschuk GD, Coulson CS, Clanchan AS : *Adenosine alters glucose use during ischemia and reperfusion in isolated rat hearts. Circulation* 87 : 900-908, 1993
- 34) Pitray II CJ, Virmani R, Vildibill HD, Jackson EK, Forman MB : *Reduction of myocardial reperfusion injury by intravenous adenosine administered during the early reperfusion period. Circulation* 83(1) : 237-247, 1991
- 35) Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, Virmani R : *Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intraco-*

- ronary adenosine : Importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 76(5) : 1135-1145, 1987
- 36) Norton ED, Jackson EK, Turner MB, Virmani R, Forman MB : The effect of intravenous infusions of selective adenosine A1-receptor and A2-receptor agonists on myocardial reperfusion injury. *Am Heart J* 123 : 332-338, 1992
- 37) Sun Sc, Appleyard R, Masetti P, Byrne JG, Laurence RG, Marsh JD, Cohn LH : Adenosine infusion during early reperfusion failed to limit myocardial infarct size in a collateral deficient species. *Cardiovasc Res* 25(11) : 943-949, 1991
- 38) Toombs CF, McGee S, Johnston WE, Vinten-Johnsen J : Myocardial protective effects of adenosine. Infarct size reduction with pretreatment and continued receptor stimulation during ischemia. *Circulation* 86(3) : 986-984, 1992
- 39) Nasser RN, Walls JT, Edwards WD, Harrison LE : Lidocaine-induced reduction in size of experimental myocardial infarction. *Am J Cardiol* 46 : 967-975, 1980