

토끼 동방결절에서 Pacemaker 전류 (과분극에 의해 활성화되는 내향전류, i_f)의 동력학적 특성에 관한 연구

서울대학교 의과대학 생리학교실

업 용 의

=Abstract=

The Kinetics of Hyperpolarization Activated Current (i_f) in Sinoatrial Node of the Rabbit

Yung E Earm

Department of Physiology, Seoul National University, College of Medicine

- 1) The two microelectrode method was used to voltage clamp small preparations of rabbit sinoatrial node. The kinetics of hyperpolarization activated inward current, i_f were analysed.
- 2) The hyperpolarization pulses activated i_f current in the presence of 10^{-7} g/ml TTX and 2 mM Mn^{2+} . The activation range was in between -45 mV to -75 mV. The current magnitude was increased and time course was faster by strong hyperpolarization pulses.
- 3) Standard envelope tests indicated that this current is exponentially controlled by single gate.
- 4) Semilogarithmic plot of i_f activation versus time was found to be linear in the activation range. The decrease in current magnitude and the shifts in activation curve and rate constants curve to the hyperpolarizing direction were obtained with Ba^{2+} , indicating that Ba^{2+} shifts the voltage dependence of the gating kinetics, were partially reversed by 24 mM K^+ .

서 론

정상 심장의 자동능은 동방결절(sinoatrial node)에서 시작하는 일련의 전기적 변화에 기인한다는 사실은 일찍부터 알려져 왔다. 그러나 동방결절에 대한 전기생리학적인 연구는 심장 다른 부분의 연구에 비교하여서 최근까지 대단히 적었는데 그 이유는 주로 방법상의 제한 때문이었다(Brown, 1982). 그동안 pacemaker 활동에 대한 연구는 정상 심장에서는 pacemaker로서 작용을 하지 않는 Purkinje 섬유나 심방, 심실근에서 어떤 특별한 조건하에서 생기는 pacemaker 활동에 대하여 연구는 1982년도 문교부 학술연구조성비로 수행되었음.

한 것이 대부분이었다(Noble, 1979). 1976년 Noma와 Irisawa에 의하여 동방결절의 아주 작은 절편에서 two microelectrode voltage clamp 방법이 성공되어 동방결절에서의 정상 pacemaker 기전에 대한 이온 전류들의 분석이 가능해졌다. 여기서 얻어진 결과는 지금까지 심장의 다른 부분에서 일어난 pacemaker 활동에서 얻어진 결과를 가지고 동방결절에서 일어나는 pacemaker 현상을 짐작했던 지금까지의 해석과는 다른 점을 제시하여 주었다(Noble, 1979). 그러나 동방결절을 살 아있는 작은 절편(0.3×0.3 mm)으로 만드는 것이 대단히 어렵고 또 동방결절 부위별로 약간의 전기생리학적 및 해부학적으로 차이가 있으며(Masson-Pévet, 1979), voltage clamp의 성공율이 대단히 낮고, 거기에서 얻어진 결과들도 여러가지 차이점을 보이고 있다

(Brown, 1982). 지금까지 동방결절에서 확인된 이온 전류들은 크게 4가지 종류로 나눌수 있는데 이들은 -40 mV 정도에서 유지 고정하고 있던 막전압(holding potential, HP)을 저분극 쪽으로 변화시켰을때 시간에 따라 점차 활성화되는 완만 내향전류(slow inward current, i_{si}) (Noma, Kotake and Irisawa, 1980) 그리고 재분극을 일으키는데 관여하는 외향전류(outward current, i_K) (Yanagihara and Irisawa, 1980b)와 과분극 pulse에 의하여 활성화되는 내향전류인, $i_f(i_h)$ (Brown, DiFrancesco and Noble, 1979; Yanagihara and Irisawa, 1980a) 그리고 막전압에만 관계있고 시간에 무관한 background 전류(i_b) (Brown, 1982) 등이다.

이중 과분극 pulse에 의하여 활성화되는 $i_f(i_h)$ 전류는 토끼의 동방결절에서 -50 mV 이하에서 시작하여 -120 mV 까지의 범위를 가진 전류로서 알려져 있으며 (Yanagihara and Irisawa, 1980a) K^+ 의 평형전압(E_K)에서 전류의 방향이 reverse되지 않고 오히려 크기가 증가하는 내향전류이고 순수한 K^+ 전류가 아니라는 일련의 실험결과(Brown and DiFrancesco, 1980; DiFrancesco and Ojeda, 1980)는 이 전류가 새로운 종류임을 암시하였다. 한편 i_f 의 활성화되는 막전압범위, 그리고 느린 시간경과(time course)가 1968년 Noble과 Tsien에 의하여 Purkinje 섬유에서 기술된 i_{K2} 와 아주 유사하다(DiFrancesco and Ojeda, 1980). 그러나 i_{K2} 는 외향성 전류이고 pacemaker 전압 범위에서 decay되며 E_K 근처에서 reversal이 일어나는 사실을 근거로 하여 순수한 K^+ 전류로 해석해 온 반면, 새롭게 발견된 i_f 는 내향전류이고 E_K 근처에서 i_f 의 reversal이 일어나지 않고 순수한 K^+ 전류가 아니라는 차이점을 보였으나 Purkinje 섬유에서의 i_{K2} 를 내향전류로 재해석(DiFrancesco, 1981a)함으로써 이 두 전류는 거의 동일한 것으로 여겨지게 되었다. 그러나 동방결절에서의 i_f 전류에 대해서 전류의 특성, 활성화되는 막전압 범위 등 기본적인 kinetics에 대해서는 막전압을 충분히 negative로 고정시키기 어려운 점때문에 거의 알려진 바가 없었다.

이에 저자는 토끼 동방결절을 작은 절편으로 만든 다음 two microelectrode technique에 의한 voltage-clamp를 하여 과분극 pulse에 의하여 활성화되는 i_f 의 활성화범위, i_f 의 막전압에 따른 시간경과의 변화, Ba^{2+} 및 K^+ 의 영향, gating parameter의 동력학적 특성(kinetics)등을 밝혀보고자 하였다.

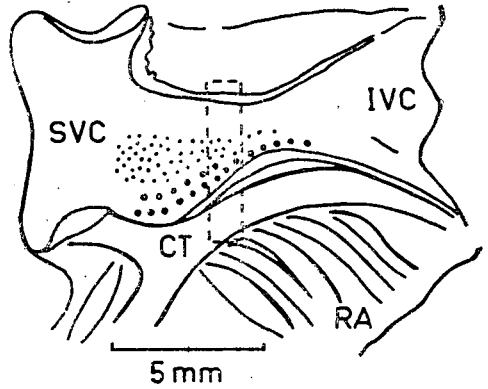


Fig. 1. A diagram of the rabbit SA node. Small dots indicate the compact area where the typical nodal cells are found (Bleeker et al., 1980) and larger dots the periphery. Preparations were usually taken within 1.5 mm of the ring bundle. CT: crista terminalis, IVC: inferior vena cava, RA: right atrium, SVC: superior vena cava.

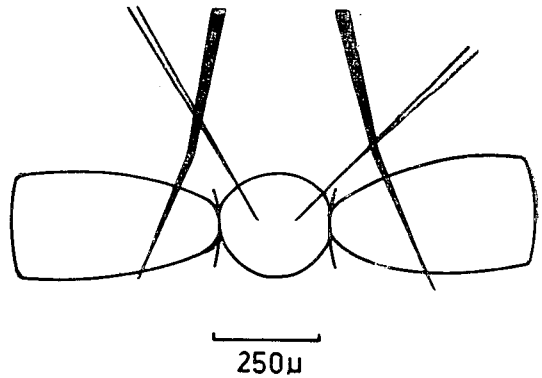


Fig. 2. A ligatured preparation is held under the tungsten wire claw and two microelectrodes inserted.

실험 방법

1) 동방결절의 절편

1~1.5 kg 정도의 토끼를 머리를 강타한 후 심장을 꺼내서 100% O_2 로 포화되어 있는 따뜻한 Tyrode 용액 (25°C 정도)에 넣고 심실부분을 빨리 절개하여 혈액을 씻어내고 심실을 분리 제거하여 방실개구 부분을 노출시켰다.

—업용의 : 토끼 동방결절에서 Pacemaker 전류(과분극에 의해 활성화되는 내향전류, i_i)의 동력학적 특성에 관한 연구—

우십방을 나머지 부분에서 분리하고 상대정맥(superior vena cava, SVC) 부분과 하대정맥(inferior vena cava, IVC)을 절개하여 그림 1에 보이는 것처럼 동방결절 부분을 노출시켰다.

30분~1시간 가량을 회복시킨 후 면도날(razor blade)로 crista terminalis 에 수직방향으로 폭 0.3 mm, 길이 0.5~0.8 cm 되는 절편 2~3개를 우십방근이 일부 붙어 있는 채로 잘라내어 stainless steel 핀으로 양끝을 고정하였다. 이 절편에서 crista terminalis 부분은 상당히 두껍기 때문에 두께 0.3 mm 이하되게 잘라냈다. 그후 10 mM의 Ca 이 포함된 30°C 내외의 Tyrode 용액에 1~2분 둔 후 다시 2 mM의 Ca 이 든 정상 Tyrode 용액에 1시간~1시간 30분동안 방치 회복시켰다. 대개의 절편은 자동능이 5분 이내에 회복되었다. 회복된 절편을 투명실을 풀어서 그 한 가닥으로 ring bundle 에서 약 1~1.5 mm 떨어진 부위에서 길이 0.3 mm 되게 두곳을 묶었다. 다시 10 mM Ca 이 든 Tyrode 용액에 1~2분 방치후 정상 Tyrode 용액으로 되돌려 1시간 가량 회복시켰다. 모든 경우 용액은 100% O₂로 포화시켰고 절편조작은 stereomicroscope 시야(×14)에서 하였다.

2) 실험용기 및 실험장치

실험용기는 Perspex 로 만든 0.2 ml 가량의 용량을 가진 것으로 바닥은 Sylgard 를 부어서 만들었으며, LKB peristaltic pump 를 이용하여 1 ml/min 의 관류속도를 유지하였다. 완전회복된 절편을 100% O₂로 포

화되고 35°C 정도를 유지하고 있는 실험용기에 옮겨 그림 2의 모양처럼 고정하였다.

실험용기의 전기적 연결의 대강을 그림 3에 보인다. 기준(reference) 전극(AB)은 agar bridge(KCl) 혹은 Ag/AgCl 을 사용하였고 전류측정(I_m)은 Ag/AgCl 전극으로 virtual ground amp 를 통하여 측정하였다. Voltage clamp 는 두개의 유리 미세전극으로 행하였는데 유리 미세전극은 3M KCl 로 채워 15 MΩ 정도인 것을 사용하였다.

Ev 전극을 통해서 막전압을 측정하고 Ec 전극은 feedback amp 에 연결, 전류를 흘려 막전압을 고정하였다. commanding pulse 는 pulse generator(PG)를 통하여 하였으며 두 미세전극은 holder 에 끼워 Ag/AgCl 선이 든 Prior 의 Micromanipulator 에 연결하여 각각 세포내에 삽입하였고 결과기록은 Grass-Polygraph 와 Tektronix Oscilloscope 에 하였다.

3) 용 액

정상 Tyrode 용액 조성은 NaCl 140 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Glucose 5 mM 이었고, Tris-HCl 5 mM 을 가하여 35°C 에서 pH 7.4 가 되게 하였으며 100% O₂로 포화시켰다. K⁺농도는 삼투농도를 고려하지 않고 1 M KCl 용액을 가하여 변화시켰고 급속내향전류(fast inward current, i_{Na})를 차단하기 위하여 tetrodotoxin(Sigma), 1~5×10⁻⁷g/ml, 완만내향전류, i_{Si} 를 차단하기 위하여 2mM Mn²⁺을 사용하였다.

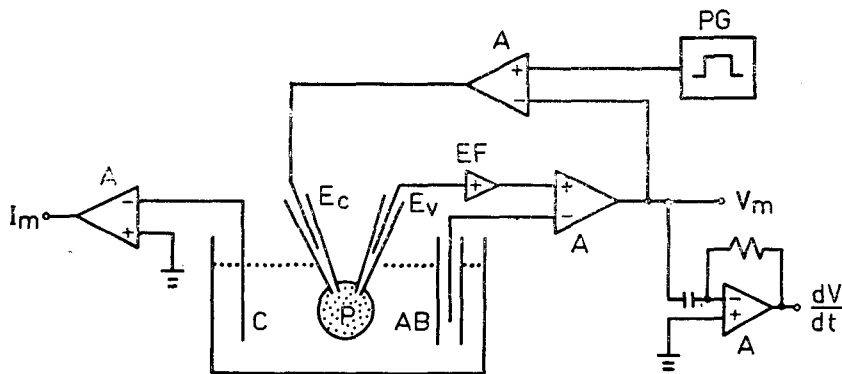


Fig. 3. Simplified scheme of the electrical circuit for voltage clamp. A: amplifiers. AB: 3M KCl agar bridge or Ag/AgCl reference electrode. C: Ag/AgCl current recording electrode. Ec: glass microelectrode for current injection. Ev: glass microelectrode for voltage recording. EF: emitter follower of FET input operational amplifier. P: preparation. PG: pulse generator. Vm: membrane potential. Im: membrane current. dV/dt: rate of rise of membrane potential.

4) Voltage clamp 실험

두 유리 미세전극의 삽입위치는 전류를 흘리는데 쓸 E_c 는 절편의 중앙부위에, 막전압을 측정할 전극 E_v 는 주변부에 있는 세포속에 삽입하였고 두 전극사이의 거리는 되도록 가깝게 하도록 노력하였다(대개 $100 \mu m$ 이내). clamp는 막전압 전극에서의 square pulse가 꺼그러짐이 없이 기록되는 것만 골라서 실험하였으며 holding potential은 전류가 내의 어느 방향으로도 흐르지 않는 전압을 골랐는데 거의 모든 절편에서 $-40 mV$ 가량이었다.

실험 성적

1) 과분극에 의해 활성화되는 내향전류, i_f

Purkinje 섬유가 어떤 조건하에서 pacemaker가 될 수 있는 것은 i_{K2} 라는 전류의 존재 때문으로 알려져 왔다(Noble and Tsien, 1968). 근래에 i_{K2} 가 동방절절에

서 발견된 i_f 와 동일한 것이라는 새로운 해석(DiFrancesco, 1981a)은 거꾸로 i_f 가 동방절절에서 일어나는 정상적인 pacemaker 활동에 커다란 역할을 하리라는 가능성을 제시하였다. HP $-40 mV$ 에서 과분극 pulse를 주어 막전압을 변화시키면 $-45 \sim -50 mV$ 부터 매우 느린 내향전류가 capacitive discharge 후에 활성화된다(그림 4). 과분극 pulse에 의하여 활성화되는 i_f 는 pulse의 크기를 과분극 쪽으로 크게 할수록 그 크기가 커지고 시간경과가 빨라졌다. 이와같은 i_f 의 활성화는 pulse를 중지하고 원래의 HP $-40 mV$ 혹은 근처로 되돌리면 deactivation이 일어나는데, 이때도 capacitive discharge가 생기고 그 후에 아주 빠른 내향전류(Na-전류와 완만내향전류)의 tail이 함께 나타난다. 순수한 i_f 의 tail을 보기 위하여 i_{Na} 억제제인 TTX와 i_{si} 억제제인 M_n^{2+} 를 사용하였다.

2) Envelope test

이와같이 과분극에 의하여 활성화되는 i_f 에 재분극을

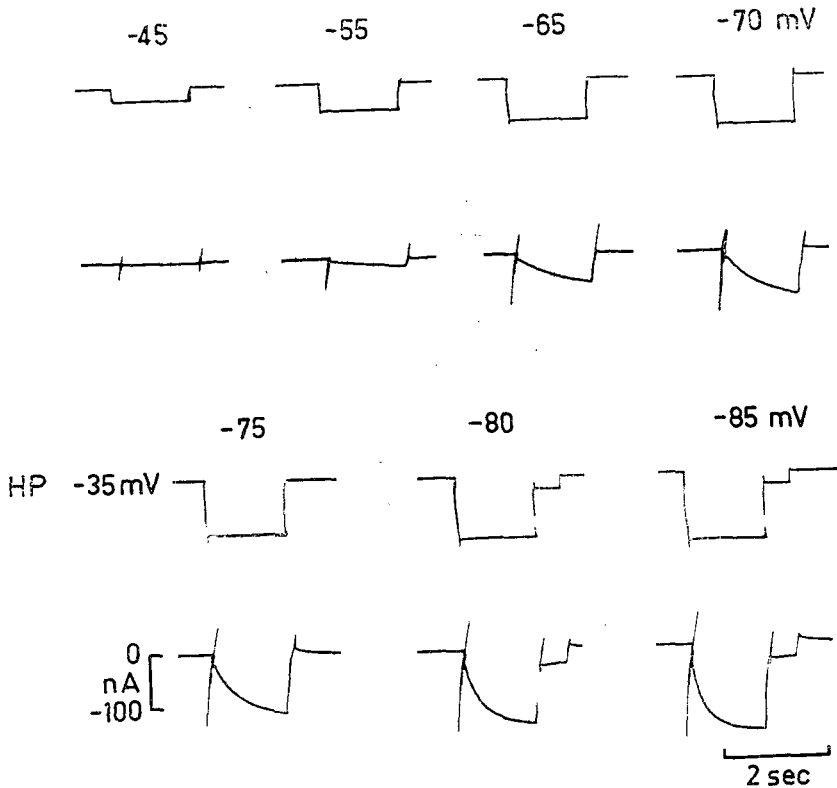


Fig. 4. Current activation, i_f at the different membrane potentials. Increasing the level of membrane potential to hyperpolarizing direction which increased the current magnitude, also increased the rate of i_f activation.

—임용의 : 토끼 동방결절에서 Pacemaker 전류(과분극에 의해 활성화되는 내향전류, i_f)의 동력학적 특성에 관한 연구—

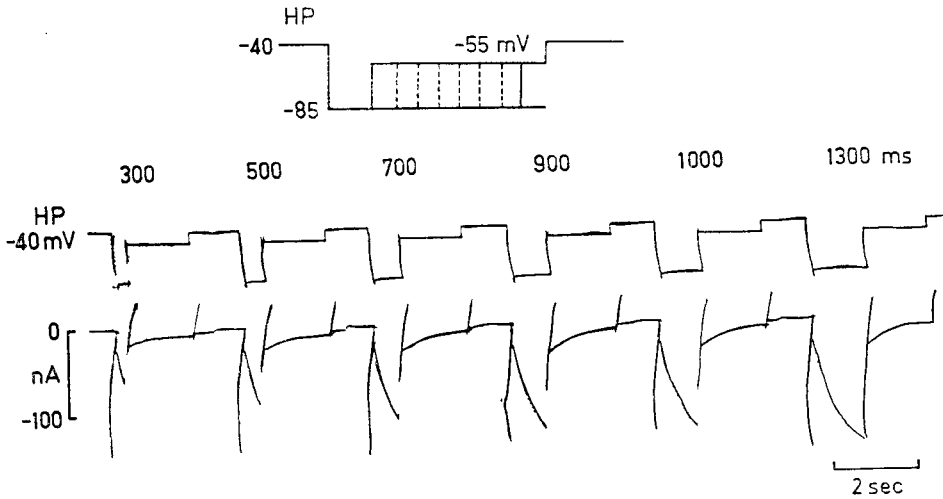


Fig. 5. Pulse protocol for the envelope test and few voltage clamp records. 10^{-7} g/ml TTX and 2 mM Mn^{2+} present.

일으키는 전류인 K^+ 의 항전류(i_k)의 감소 혹은 i_f 이외의 다른 artefact나 전류가 섞일 가능성을 검증하기 위하여 envelope test를 하였다. 보통 널리 사용되는 envelope test는 그림 5에 보이는 것처럼 -40 mV 의 HP로부터 i_f 가 최대로 activate되는 과분극전압 즉 -85 mV 의 pulse를 아주 짧은 기간부터 여러가지 기간동안 주어서 각 시간별로 활성화되는 i_f 와 -55 mV 에 되돌릴 때 나타나는 i_f 의 deactivation tail의 크기를 기록 분석하였다. -55 mV 로 되돌린 것은 HP -40 mV 근처가 i_f 의 reversal potential(E_{rev})이어서 tail의 크기를 재기 어려웠기 때문이었다. 각 기간별로 활성화되거나 deactivate되는 i_f 혹은 tail을 각각의 최대치(충분한 시간을 주어서 항정상태에 이른 후의 i_f 및 tail의 크기)에 대한 비율로 계산하여 횡축에 시간, 종축에 대수눈금의 비율을 plot하여 본 것이 그림 6이다. i_f 와 tail 모두 직선적인 관계를 보였으며 각각의 시정수(time constant, τ)도 아주 비슷하였다.

이와같은 사실에서 과분극 pulse에 의하여 기록되는 전류는 순수한 i_f 한가지 전류계이며 single exponential함을 알 수 있었다. 그러나 그림 5에 보이는 것과 같이 i_f tail이 잘 나타나는 경우는 그리 많지 않았다.

3) Activation curve

그림 7은 i_f 의 막전압에 따른 변화를 s라는 gating molecule의 활성화 범위로서 표시하기 위한 즉 activation curve를 그리기 위한 pulse protocol을 보인

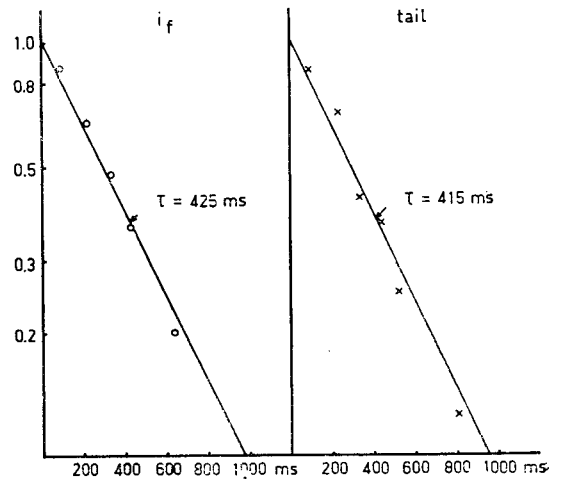


Fig. 6. Semilogarithmic plot of i_f current activation and tail decay as in fig. 5. Abscissa: duration of clamp pulse. Ordinate: normalized value of i_f current. Time courses are nearly identical in two plots. (Lines drawn by eyes).

것이다. HP -40 mV 에서 각각의 test pulse를 항정상태가 될 때까지 충분한 시간동안 주고 $-90 \sim -100 \text{ mV}$ 정도의 커다란 과분극 pulse를 주어서 이때 나타나는 i_f 의 크기를 test pulse 없이 $-90 \sim -100 \text{ mV}$ 의 과분극

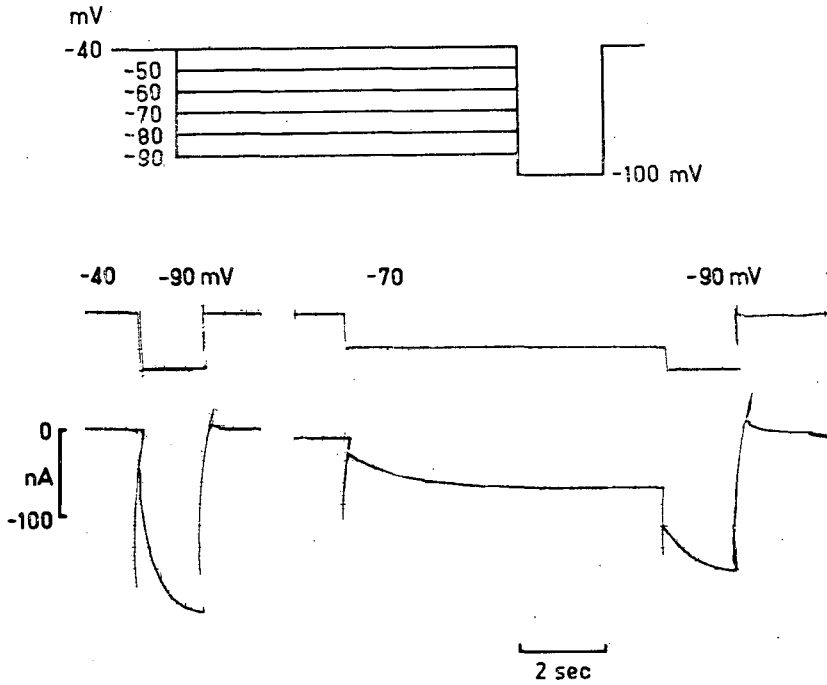


Fig. 7. Experimental procedure for determining activation gate variable, s . Repetitive pulses were given to $-90 \sim -100$ mV hyperpolarizing pulse followed by different test pulses of various duration until steady values were obtained. 10^{-7} g/ml TTX and 2 mM Mn^{2+} present.

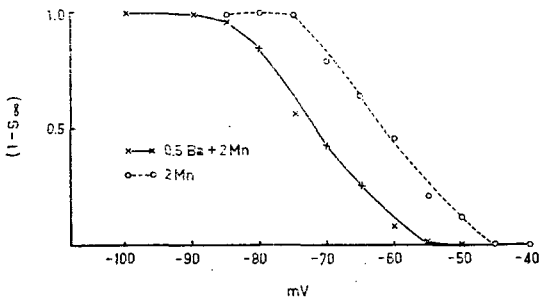


Fig. 8. Activation curve of i_f in control and 0.5 mM Ba^{2+} Tyrode solution. Barium shifts the curve to hyperpolarizing direction about 10 mV. Abscissa: membrane potential. Ordinate: normalized activation variable, s .

pulse 만을 동일한 기간 주었을 때 나타나는 i_f 크기와
의 비율로서 계산한 값을 막전압에 plot 한 것이 activation
curve 이다(그림 8). 그러나 원래 s 는 Noble
과 Tsien(1968)이 외향전류의 activation gate로서 사
용하였기 때문에 여기서는 $1 - s_{\infty}$ 로 표시하였다(s_{∞} 는
 s 의 항정상태 값을 뜻한다). 점선이 대조군에서 얻
어진 activation curve 이다. -45 mV에서 부터 활
성화되기 시작하여 약 $-75 \sim -80$ mV에서 완전히 활

성화됨을 보여 주고 그 모양은 완전한 S자 모양
(sigmoid)이다.

실선으로 된 곡선은 0.5 mM의 Ba^{2+} 을 가하였을 때
의 activation curve로서 과분극 쪽으로 이동된 것을
나타낸다. 일반적으로 Ba^{2+} 은 흥분성 세포에서 K^+ chan
nel의 억제제, 특히 i_K 나 background current인 i_b
의 억제제로서 사용되어 왔다. Ba^{2+} 에 의한 activation
curve의 이동은 Ba^{2+} 이 어느 막전압범위에서 i_f 를 현
저히 감소시켰음을 뜻한다.

4) 항정상태에서의 i_f 의 시간경과(time course) 및 Ba^{2+} 의 영향

항정상태에서의 i_f 의 시간경과의 변화를 보기 위하여
여러가지 test pulse를 충분한 시간주어 i_f 의 대수값을
취하여 종축에 그린 것이 그림 9이다. 이 경우에는 정
상 Tyrode 용액에서의 시간경과를 본 것으로 과분극
pulse의 크기가 클수록 빨리 활성화되며 전류의 크기
도 증가한 것을 보여 준다. 모든 pulse에서 직선적인
관계를 보이므로 i_f 는 지수함수적으로 활성화되는 전류
이고 single exponential함을 알 수 있다. 각 막전압
에서 활성화되는 전류의 시정수(time constant)는 화

—업응의 : 토끼 동방결절에서 Pacemaker 전류(과분극에 의해 활성화되는 내향전류, i_f)의 동력학적 특성에 관한 연구—

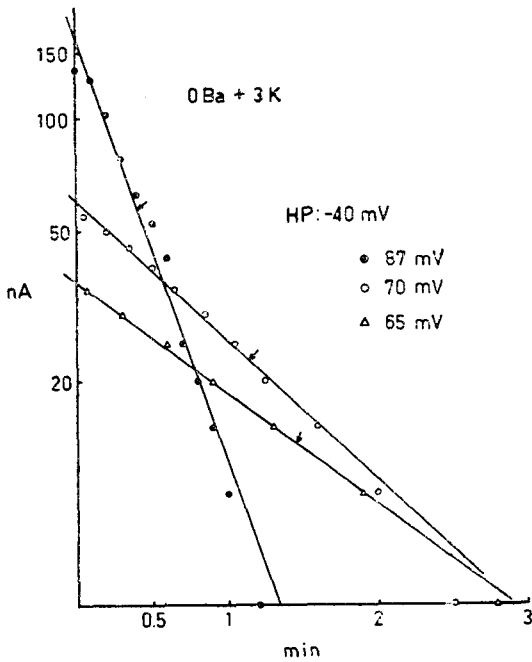


Fig. 9. Semilogarithmic plot of i_f activation at different membrane potentials. Closed circles (●) are i_f activation at -87 mV, open circles (○) at -70 mV and triangles (△) at -65 mV respectively. Arrows of each line indicate time constants of i_f currents at each potential (460 ms at -87 mV, 1150 ms at -70 mV and 1450 ms at -65 mV). 10^{-7} g/ml TTX and 2 mM Mn^{2+} present.

살표(←)로 표시하여 비교하였다.

위에서와 같이 항정상태의 i_f 를 반대수 그림표에 plot 하는 방법을 그대로 이용하여 막전압 -80 mV에서 2 mM의 Ba^{2+} 의 첨가하였을 때 그리고 2 mM Ba^{2+} 과 24 mM의 K^+ 용액에서의 시간경과를 그린 것이 그림 10이다. 2 mM의 Ba^{2+} 은 정상 Tyrode 용액에서 활성화되었던 i_f 의 크기를 감소시켰으며 또한 시간경과를 대단히 느리게 하였다. 이 그림에서 화살표로 표시한 것처럼 시정수 520 ms에서 2120 ms로 느리게 하였다. 이렇게 느려진 상태에서 24 mM K^+ Tyrode 용액으로 바꿔주니 i_f 의 크기도 증가하고 시간경과도 빨라졌다(시정수 1170 ms). 그러나 정상 Tyrode 용액에서 보였던 크기와 시정수에는 미치지 못하였다. 그림 10에서 plot 하였던 것과 같은 방법으로 여러 다른 막전압에서 plot 하여 시정수를 구하고 그 시정수의 역수를 반응속도상수(rate constant)로 잡아 plot 하여 본 것이

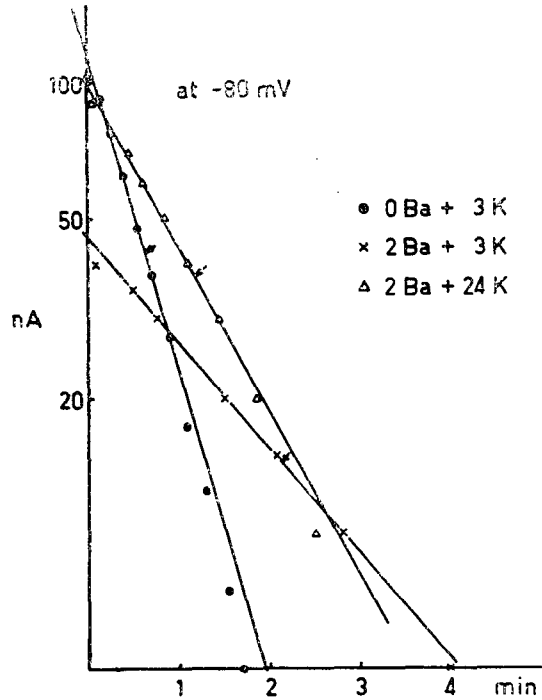


Fig. 10. Semilogarithmic plot of i_f activation at -80 mV in 3 mM K^+ (●), 2 mM Ba^{2+} + 3 mM K^+ (×) and 2 mM Ba^{2+} + 24 mM K^+ Tyrode solution (△). Arrows indicate time constants of i_f activation which were 520 ms in 3 mM K^+ , 2120 ms in 2 mM Ba^{2+} and 1170 ms in 2 mM Ba^{2+} and 24 mM K^+ Tyrode solution.

그림 11이다. 막전압이 -60 mV 이하 즉 i_f 가 활성화되는 범위에서만 plot 하였고 -60 mV 이상의 막전압에서는 i_K 와 섞여 구분하기 어려웠기 때문에 시도하지 않았다. 반응속도상수의 막전압에 의한 영향은 정상 Tyrode 용액에서 포물선 관계를 보였고 2 mM의 Ba^{2+} 에 의하여 왼쪽 아래 방향으로 이동된 것을 보여준다. 24 mM K^+ 에 의해서 Ba^{2+} 에 의한 이동을 되돌리기는 하나 정상 Tyrode 용액에서 보였던 값에는 이르지 못하였다.

이 반응속도상수를 gating molecule의 개방 혹은 폐쇄되는 정도로 분석하여 보면 $ds/dt = \alpha_s(1-s) - \beta_s \cdot s$ 의 식으로 표현할 수 있다(Noble, 1979). 이때 s는 i_f 를 조절하는 gate의 열린 상태의 확률을 표시한 것이고 α_s 는 닫힌 gate가 열리는 반응속도계수(opening coefficient), β_s 는 열린 gate가 닫히는 반응의 계수(closing coefficient)이다.

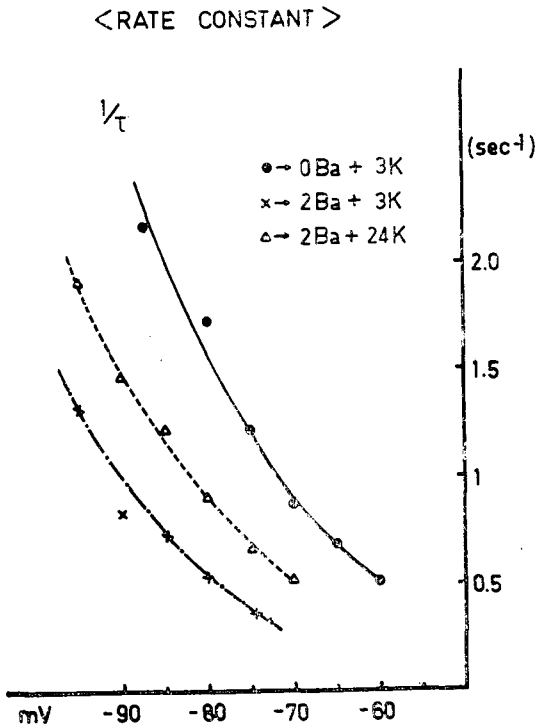


Fig. 11. Rate constants plotted $1/\tau$ as functions of membrane potential obtained from same preparation of fig. 10. Closed circles(●) indicate control, crosses(x) in 2 mM Ba^{2+} , and triangles(Δ) in 2 mM Ba^{2+} and 24 mM K^+ Tyrode solution.

그림 12는 정상 Tyrode 용액에서의 반응속도상수를 이용하여 α_s , β_s 를 그림그린 것이다. α_s 는 값이 크고 막전압이 감소함에 따라 현저히 감소함을 보이고 β_s 는 그와 반대로 점차 증가됨을 보인다. Ba^{2+} 이 α_s , β_s 의 막전압에 따른 성질을 변화시킨 것을 알 수 있다.

고 찰

1) Voltage clamp 방법 및 기록

홍분성 세포의 막전압을 실험자의 의도대로 고정해서 여러가지 종류의 이온전류를 밝히는 voltage clamp 방법은 몇가지가 알려져 있다. 특히 심장에서 널리 쓰이는 방법은 single 혹은 double sucrose gap 방법으로 주로 심방 혹은 심실근에서 이용되고(Noble, 1979; Beeler and McGuigan, 1978) 두개의 유리 미세 전극 방법은 Purkinje 섬유에서 널리 이용되어 왔었다(New and Trautwein, 1972). 어느 방법이던 장단점이 있어

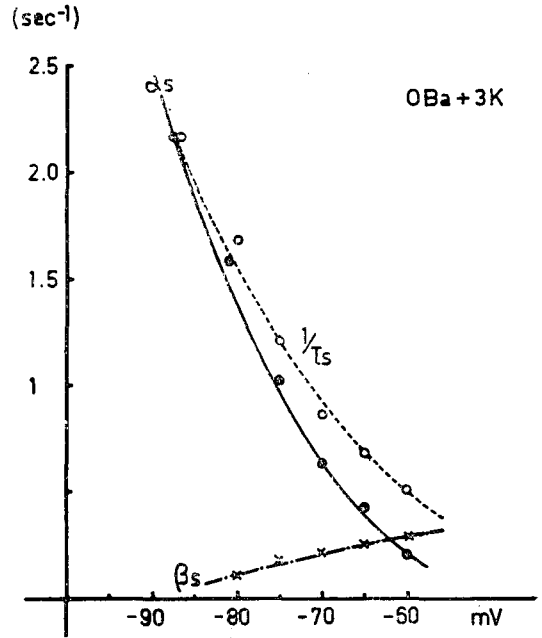


Fig. 12. Rate coefficients of activation, α_s and deactivation, β_s as functions of membrane potential obtained from fig. 11 in 3 mM K^+ Tyrode solution.

sucrose gap 방법은 기술적으로 비교적 쉽고 전류를 흘리기가 쉬운 반면 artefact 인 leak current가 기록되는 단점을 가지고 있으며, two microelectrode 방법은 전류를 흘리는데 제한이 있고 기술적으로 어려운 점은 있으나 artefact가 섞일 염려가 없어 방법 자체로는 가장 좋은 방법이다(Beeler and McGuigan, 1978). 동방결절에 two microelectrode 방법은 Noma와 Irisawa (1976)가 시도하여 성공하였는데 동방결절이 갖는 특수성에도 불구하고 절편을 작게(0.3 mm 이하) 만들면 거의 모든 부분을 균등하게 clamp를 할 수 있다고 하였다.

그들은 0.3×0.3 mm의 절편에 세개의 전극을 찢어서 모두 거의 크기와 모양이 동일한 활동전압을 기록하였고 한 전극에서 전류를 흘려 남은 두 전극에서 동일한 모양의 전압변동을 기록한 것으로 보아 이 정도 크기의 절편은 전기적으로 거의 균등함을 알 수 있었다.

본 실험에서도 경우에 따라 크기가 조금 큰 절편에서는 균등한 clamp를 할 수가 없었으나 적당한 크기에서는 막전압 측정 전극 기록으로 미루어 clamp가 성공적으로 이루어졌다고 할 수 있었다.

2) 과분극에 의해 활성화되는 i_f 의 activation 범위 및 deactivation tail

본 실험에서 얻어진 i_f 의 activation curve는 모두 2 mM Mn^{2+} 과 $1 \sim 5 \times 10^{-7}$ g/ml의 TTX 존재하에서 기록한 결과를 plot 한 것으로 -45 mV에서 시작하여 -75 mV 정도에서 최대로 활성화됨을 보여 주었다. 이 범위는 Yanagihara와 Irisawa(1980a)가 얻은 activation 범위보다 10~20 mV 가량 낮은 범위였다. 이와 같은 차이는 실제 정상 동방결절의 pacemaker 탈분극에 관하여 여부를 판단하는데 매우 큰 차이인 셈이다. 이와같은 차이가 일어날 수 있는 가능성으로 첫째는 절편의 성질에 차이점일 수 있고 둘째로는 실험용액 성분의 차이일 수도 있겠다.

본 실험에서는 i_{si} 차단제로 2 mM의 Mn^{2+} 을 사용했으나 Irisawa 등은 유기 Ca-억제제인 D-600을 사용하였으며 덧붙여서 i_K 를 차단하기 위하여 5 mM의 Ba^{2+} 을 사용하였다. Mn^{2+} 은 일부 보고서에서 i_f 를 증가시킨다(Kass and Tsien, 1975; Kimura, 1982)고 하였으나 어느정도 증가시키는 것은 알 수 없었다. 또 한편으로 Ba^{2+} 은 본 실험에서 밝힌 것처럼 i_f 를 억제하는 효과가 있으므로 아마도 i_f activation 범위는 중간쯤에 있으리라고 생각된다. 이 문제는 i_f 에 영향을 주지 않는 확실한 i_{si} 차단제를 사용해야만 밝혀질 수 있을 것이다. 한편 envelope test를 하거나 보통의 pulse 후에 i_f tail의 decay를 보기 어려운 점이었다. 많은 경우 holding potential, -40 mV 정도에서의 i_f tail은 거의 완전히 i_f 를 activate시킨 다음에 보면 reverse되어 있을 때가 많았다. 이와같이 tail이 없어지거나 혹은 reverse되는 현상은 높은 농도 K^+ (13 mM)에서는 보이지 않았다. 가능성이 있는 것으로 첫째 i_f tail의 decay가 너무 빨랐기(기록할 수 없을 정도로) 때문이라는 생각인데 지금까지 i_f 의 tail은 본 실험에서 envelope test한 경우 혹은 Purkinje 섬유에서의 기록(DiFrancesco, 1981b)과 비교하여 보았을 때 합당치 않을 것 같다. 둘째 가능성은 HP -40 mV 근처가 진짜 i_f 의 Erev이기 때문일 것이라는 생각이다. 즉 Erev에 되돌리면 순간적으로 i_f 에 대한 전압 및 농도경사가 없어져 decay tail이 생기지 않을 것이라는 이 설명은 tail의 reverse를 설명하지는 못한다. 셋째 가능성은 강한 과분극 pulse에 의하여 세포막 주위의 세포외액 즉 cleft에 K^+ 이 감소하게 되어(Baumgarten and Isenberg, 1977) Na-K pump를 어느정도 억제하고 있다가 과분극 pulse가 끝난 다음엔 일시적으로 pump

의 활동이 촉진되어 Na^+ 를 더 많이 퍼내는 electrogenic current(Noma and Irisawa, 1975; Courtney and Sokolove, 1979)가 의향성으로 나타나 i_f tail을 상쇄해 버리거나 혹은 증가하여 tail이 없거나 혹은 reverse되리라는 생각이다.

이 가능성은 pump전류가 시간적으로 그리 빠르지 않다는 실험결과(Noma and Irisawa, 1975)로 미루어 보아 일부 관여했을 가능성은 배제할 수 없으나 전체 tail decay를 변화시켰을 것 같지는 않다. 네번째로는 Na-Ca exchange 기전에 의한 $i_{Na, Ca}$ (Mullins, 1979)를 고려할 수 있는데 computer model에 의하여 pulse의 시작과 끝 직후에 상당한 이온전류를 일으킬 수 있다(DiFrancesco, Hart and Noble, 1982; DiFrancesco and Noble, 1982)는 보고는 매우 가능성 있는 것이라고 생각된다. 그러나 현재까지 알려진 Na-Ca exchange를 선택적으로 차단하는 물질이 없기 때문에 이 가설을 증명하거나 부정할 실험적 증거는 없다.

3) Ba^{2+} 의 영향

Ba^{2+} 은 일반적으로 세포막 K^+ channel 특히 back-ground current(i_b)중 K-성분, i_{K1} 을 억제하는 것(DiFrancesco, 1981 a)으로 생각되어 왔다. 본 실험에서 0.5~2 mM의 농도에서 activation curve를 10 mV 가량 과분극 쪽으로 이동시킨 것은 매우 이상한 것이었다. 지금까지 Yanagihara와 Irisawa(1980a)는 i_f 는 Ba^{2+} 에 의해 영향이 없고 i_K 만을 억제한다고 하였고 DiFrancesco(1981 b)는 Ba^{2+} 이 약간 i_f 의 크기를 작게 하나 activation curve를 이동시키지는 않았다고 보고한바 있다.

이와같은 Ba^{2+} 의 i_f 억제 효과를 좀더 알아보기 위하여 i_f 의 시간경과(time course)가 막전압에 따라 어떻게 달라진가를 보았다. Ba^{2+} 은 실험한 모든 전압 범위에서 시간경과를 느리게 하였고 반응속도상수 곡선을 과분극 쪽으로 이동시켰다. 이러한 이동은 gate를 열고 닫는 반응속도계수 α_s 와 β_s 에 영향을 주어서 초래된 것으로 해석할 수 있으며 높은 농도(24mM)의 K^+ 에 의하여 약간 저분극 방향으로 이동하였다. 그러나 Ba^{2+} 이 없는 상태의 값으로 돌아오지 않았다. 그러나 Ba^{2+} 이 어떤 기전으로 gating molecule에 영향을 주는지는 알 수 없었다. 이러한 효과가 Mn^{2+} 으로 i_{si} 를 억제한 상황에서 특수하게 나타나는지 여부는 Mn^{2+} 과는 성질이 다른 아주 선택적인 i_{si} 억제제를 사용해 보아야지만 밝혀질 것 같다.

요 약

- 1) 토끼동방결절의 작은 절편에 미세 전극 두개로 voltage clamp 를 하고 과분극에 의하여 활성화되는 내향전류, i_f 의 동력학적 성상을 분석하였다.
- 2) 전류 i_f 는 10^{-7} g/ml TTX와 2 mM Mn^{2+} 의 존재하에서 과분극 pulse에 의하여 활성화되었으며 그 범위는 -45 mV ~ -75 mV였다. 전류의 크기와 시간경과는 막전압이 과분극될수록 커지고 빨라졌다.
- 3) Envelope test 결과 i_f 전류는 단일 gate에 의하여 지수함수적(exponential)으로 조절됨을 보였다.
- 4) 2 mM의 Ba^{2+} 에 의하여 i_f 전류의 크기는 감소하고 시간경과도 느려졌으며 반응속도상수와 gating molecule의 열리고 닫히는 반응계수(rate coefficient; α_s, β_s)와 막전압 관계곡선을 과분극쪽으로 이동시켰다. 이러한 Ba^{2+} 의 효과는 24 mM K^+ 에 의하여 일부 상쇄되었다.

REFERENCES

Baumgarten, C.M. and Isenberg, G.: *Depletion and accumulation of potassium in the extracellular clefts of cardiac Purkinje fibres during voltage clamp hyperpolarization and depolarization. Pflugers Arch.* 368:19-31, 1977.

Beeler, G.W. and McGuigan, J.A.S.: *Voltage clamping of multicellular myocardial preparations: capabilities and limitations of existing methods. Prog. Biophys. Mole. Biol.* 34:219-254, 1978.

Bleeker, W.K., Mackaay, A.J.C., Masson-Pevet, M., Bouman, L.N. and Becker, A.E.: *Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. Circ. Res.* 46:11-22, 1980.

Brown, H.F.: *Electrophysiology of the sinoatrial node. Physiol. Rev.* 62:505-530, 1982.

Brown, H.F. and DiFrancesco, D.: *Voltage-clamp of membrane currents underlying pacemaker activity in rabbit sinoatrial node. J. Physiol.* 308:331-351, 1980.

Brown, H.F., DiFrancesco, D. and Noble, S.J.: *How does adrenaline accelerate the heart? Nature* 280:235-236, 1979.

Brown, H.F., Kimura, J. and Noble, S.J.: *The relative contribution of various time-dependent membrane currents to pacemaker activity in the sino-atrial node. In: Cardiac rate and rhythm, ed. Bouman, L.N. and Jongasma, pp.53-68. The Hague: Martinus Nijhoff, 1982.*

Courtney, K.R. and Sokolove, P.G.: *Importance of electrogenic sodium pump in normal and over-driven sinoatrial pacemaker. J. Mole. Cell. Cardiol.* 11:787-794, 1979.

DiFrancesco, D.: *A new interpretation of the pacemaker current i_f in calf Purkinje fibres. J. Physiol.* 314:359-376, 1981a.

DiFrancesco, D.: *A study of the ionic nature of the pacemaker current in calf Purkinje fibres. J. Physiol.* 314:377-393, 1981b.

DiFrancesco, D., Hart, G. and Noble, D.: *Ionic current transients attributable to the Na-Ca exchange process in the heart. J. Physiol.* 325: 15 P-16 P, 1982.

DiFrancesco, D. and Noble, D.: *Implications of the re-interpretation of i_{K2} for the modelling of the electrical activity of pacemaker tissues in the heart. In: Cardiac rate and rhythm. ed. Bouman, L.N. and Jongasma, H.J. pp.93-128. The Hague: Martinus Nijhoff, 1982.*

DiFrancesco, D. and Ojeda, C.: *Properties of the current i_f in the sinoatrial node of the rabbit compared with those of the current i_{K2} in Purkinje fibres. J. Physiol.* 308:353-367, 1980.

Irisawa, H. and Noma, A.: *Pacemaker mechanisms of rabbit sino-atrial node cells. In: Cardiac rate and rhythm. ed. Bouman, L.N. and Jongasma, J.H. pp.35-52. The Hague: Martinus Nijhoff, 1982.*

Kass, R.S. and Tsien, R.W.: *Multiple effects of calcium antagonists on plateau currents in cardiac Purkinje fibres. J. Gen. Physiol.* 66: 169-192, 1975.

Kimura, J.: *Electrophysiological studies of the sino-atrial node of the rabbit. D. Phil. thesis. Oxford University, 1982.*

Masson-Pevet, M.: *The fine structure of cardiac pacemaker cells in the sinus node and in tissue*

—업응의 : 토끼 동방결절에서 Pacemaker 전류(과분극에 의해 활성화되는 내향전류, i_f)의 동력학적 특성에 관한 연구—

- culture. Ph. D. Thesis. Amsterdam, University of Amsterdam, 1979.*
- Mullins, L.J.: *The generation of electric currents in cardiac fibers by Na-Ca exchange. Am. J. Physiol. 236:C103-C110, 1979.*
- New, W. and Trautwein, W.: *Inward membrane currents in mammalian myocardium. Pflügers Arch. 334:1-23, 1972.*
- Noble, D.: *The initiation of the Heartbeat. 2nd edition, Oxford: Oxford University Press, 1979.*
- Noble, D. and Tsien, R.W.: *The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres. J. Physiol. 195: 185-214, 1968.*
- Noma, A. and Irisawa, H.: *Contribution of an electrogenic sodium pump to the membrane potential in rabbit sinoatrial node cells. Pflügers Arch. 358:289-301, 1975.*
- Noma, A. and Irisawa, H.: *Membrane currents in the rabbit sino-atrial node cell as studied by double microelectrode method. Pflügers Arch. 364:45-52, 1976.*
- Noma, A., Kotake, H. and Irisawa, H.: *Slow inward current and its role in mediating the chronotropic effect of epinephrine in the rabbit sinoatrial node. Pflügers Arch. 388:1-9, 1980.*
- Yanagihara, K. and Irisawa, H.: *Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. Pflügers Arch. 385:11-19, 1980 a.*
- Yanagihara, K. and Irisawa, H.: *Potassium current during the pacemaker depolarization in rabbit sinoatrial node cell. Pflügers Arch. 388:255-260, 1980 b.*