

토끼 동방결절 부위에 따른 Na-Pump 활동도의 차이에 관한 연구

서울대학교 의과대학 생리학교실

서 종 진** · 문 형 로** · 엄 응 의

=Abstract=

Local Difference of Na-Pump Activity in the Rabbit Sinoatrial Node

Jong Jin Seo**, Hyung Ro Moon** and Yung E Earm

Department of Physiology and Paediatrics**, College of Medicine Seoul National University

Electrophysiological difference of the central and peripheral area of the sinoatrial node in the rabbit was studied by glass microelectrode technique. Effects of K^+ , Na^+ , Cs^+ , adrenaline and ouabain on the action potential of the two areas were investigated, and transient hyperpolarization (K^+ -induced hyperpolarization) which developed following readmission of potassium after having pre-treated with K^+ -free Tyrode solution for 10 minutes was analyzed.

The results obtained were as follows;

1) The frequency of the spontaneous action potential recorded in the periphery of the SA node was faster than the central area. Reduction by Cs^+ and increase by 0 mM K^+ , $10^{-6}M$ adrenaline and $10^{-6}M$ ouabain in the frequency of action potential were noticed more prominently in the peripheral than the central area. On the contrary, the frequency in the central area was more decreased than the peripheral area by 13 mM K^+ and 1 mM Co^{2+} .

2) The amplitude of the K^+ -induced hyperpolarization was very small in the central area but large in the peripheral area. Transient hyperpolarization was abolished by ouabain and low sodium, and decreased by cooling the tissue ($17^\circ C$).

3) By changing the concentration of Ca^{2+} in the perfusate, the amplitude and the rate of transient hyperpolarization were increased in the high Ca^{2+} concentration.

It could be concluded that the central area of the SA node is less susceptible to the inhibition of Na-Pump and more susceptible to Ca-blocker and high concentration of K^+ . The Na-Pump activity of the central area measured by means of transient hyperpolarization is found to be much less active than that of the peripheral area.

서 론

심장의 자동능은 동방결절 세포막을 경계로 하여 발

*본 연구는 1983년도 한국과학재단 연구비의 보조로 이루어졌음.

**서울대학교 의과대학 소아과학교실

생하는 pacemaker 전압에 의하여 크게 좌우된다. 이런 pacemaker 전압의 발생기전에 관하여서는 아직 분명히 밝혀진 바 없으며, 여러가지 종류의 이온전류가 복합적으로 작용할 것으로 알려져 왔다(Brown, 1982).

Na-Pump는 세포내 Na^+ 농도를 낮게 유지하여 세포 기능이 원활히 유지될 수 있게 하며, Na^+ 과 K^+ 을 서

로 반대 방향으로 교환하는 교환 pump인데 그 교환 비율은 3:2정도임이 알려져 있다(Irisawa, 1978). 이와같은 교환비율은 electrogenic 해서 막전압에 대한 공헌이 예상되고 실험결과 여러 심근세포에서 확인되었다. electrogenic 한 Na-Pump의 활동은 crustacean 심장신경절(Livengood and Kusano, 1972), 연체동물의 심장세포(Wilkens, 1972), 그리고 포유류의 동방결절(Noma and Irisawa, 1974; 1975; Irisawa, 1978) 및 방실결절(Kurachi et al., 1981)에서도 관찰된 바 있다. Na-Pump의 활동은 K^+ -free 용액에서 K^+ 이 포함된 용액에 옮겼을 때 촉진된다. 이와같은 방법은 여러가지 흥분세포(Thomas, 1972)에서 Na-Pump의 존재를 확인하는 데 사용되었다. K^+ 에 의하여 유발되는 과분극(K^+ -induced hyperpolarization)은 ouabain으로 전처리하거나(Hiraoka and Hecht, 1973; Noma and Irisawa, 1974), Li^+ 를 가하였을 때(Keynes and Swan, 1959), 그리고 $6^\circ C$ 이하로 온도를 낮추었을 때(Keynes and Swan, 1959; Noma and Irisawa, 1975) 소실된다. 그리고 이러한 일과성 과분극의 크기는 K^+ 농도를 높혔을 때 더욱 증가한다(Noma and Irisawa, 1975). 소장 평활근중 중주근에서 서파(slow wave)의 pacemaker 기전은 electrogenic Na-Pump의 활동과 관련이 있는 것으로 생각되고 있다(Connor et al., 1974; Prosser et al., 1976). 그러나 동방결절의 pacemaker 활동에 Na-Pump가 관여하리라는 데는 증거는 확실하지 않으나 영향을 줄 가능성은 예상할 수 있다. 정상상태에서 Na-Pump는 동방결절 막전압에 어느 정도 영향을 주고(Isenberg and Trautwein, 1974, 1975), Purkinje 섬유에서 adrenaline은 Na-Pump 활동을 촉진시킨다는 사실(Noble, 1979)로부터 Na-Pump가 심장박동수 조절에 관여하리라는 것을 예측할 수 있다. 또한 overdrive suppression 동안 Na-Pump의 활동은 증가되고 심장박동수를 느리게 하는 점(Vassalle, 1970)으로도 Na-Pump가 박동수 조절에 간접적으로 관여함을 알 수 있다.

여러 연구자들이 전기생리학적 방법으로 연구한 결과(Bleeker et al., 1980; Masson-Pévet et al., 1984), 동방결절은 기능상 균일한 구조를 갖지 않았음이 알려졌다. 일반적으로 맨 처음의 impulse는 동방결절의 중심부(central area, dominant cells)에서 시작하여 그 주변부(peripheral area, follower cells)로 전파되는 것으로 알려져 있다. 이와같은 전기생리학적 및 해부학적 구분은 경우에 따라서 pacemaker 활동의 진원지가 옮겨간다는 사실(Bouman et al., 1968), 활

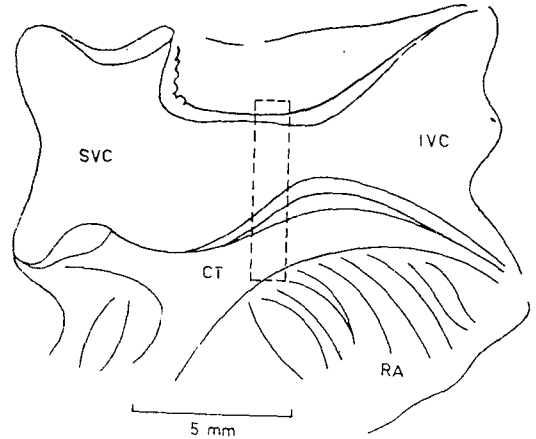


Fig. 1. A diagram of the rabbit SA node. Preparations were usually taken within a broken line.

CT: Crista Terminalis,
IVC: Inferior Vena Cava,
RA: Right Atrium,
SVC: Superior Vena Cava

동전압의 모양에 차이가 많은 점(Masson-Pévet, 1979), Ca^{2+} 작용이 온도변화에 따라 차이가 있는 점(Mackaay et al., 1980) 등 여러가지 사실로 미루어 보아 애매해진다. 그러나 중심부와 주변부의 기능상 혹은 전기생리학적 측면에서 이온전류의 차이를 예상할 수 있으며, 아직까지 막전압 고정법에 의하여 중심부와 주변부의 이온전류의 차이를 규명한 연구결과는 없었다(Brown, 1982).

이에 저자는 동방결절을 작은 절편으로 만들어 중심부와 주변부로 나누고, 두 부위에 유리 미세전극을 삽입하여 기록되는 활동전압의 차이를 분석하고, 활동전압에 영향을 주는 Cs^+ 등을 투여하여 pacemaker 활동 및 빈도수에 미치는 효과를 분석하였다. 그리고 중심부와 주변부의 Na-Pump 활동도에 어떤 차이가 있는가를 보고 그 차이를 중심부와 주변부의 pacemaker 활동의 차이점의 하나로 분석하고자 하였다.

실험 방법

1) 동방결절의 절편

1~1.5 kg 정도의 토끼의 머리를 강타하고 실험시킨 후 심장을 꺼내서 100% O_2 로 포화되어 있는 Tyrode 용액에 넣고, 심실 부분을 절개하여 혈액을 씻어내고 심실을 분리 제거하여 방실개구 부분을 노출시켰다.

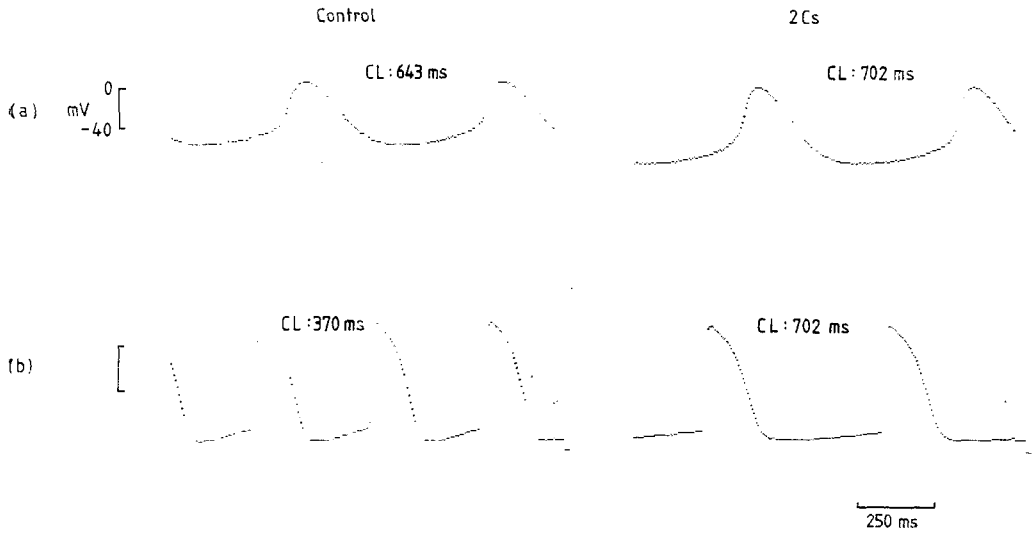


Fig. 2. Effect of 2mM Cs⁺ on the action potential of the central(a) and the peripheral(b) area of the SA node. Cs⁺ decreased frequency of action potential in both area but more prominently in the peripheral area. (CL: Cycle Length)

우심방을 나머지 부분에서 분리하고 상대정맥 부분과 하대정맥 부분을 절개하여 동방결절을 노출시켰다(Fig. 1). 1시간 가량 회복시킨 후 면도날로 crista terminalis에 수직방향으로 폭 0.3 mm, 길이 5~8 mm 되는 절편 2~3개를 우심방근이 붙어있는 채로 잘라내어 stainless steel 핀으로 양 끝을 고정하였다. 그 후 10 mM의 Ca²⁺이 포함된 Tyrode 용액에 1~2분 방치 후 다시 정상 Tyrode 용액으로 바꿔 1~1.5시간 방치 회복시켰다. 대개의 절편은 5분 이내에 자동능이 회복되었다. 회복된 절편을 무명실 한 가닥으로 폭이 0.2 mm 가량되게 두 곳을 묶었는데 그 위치가 ring bundle에서 2~3 mm 정도 떨어진 곳을 택하여 중심부(central area)와 주변부(peripheral area)가 분리되도록 하였다. 다시 10 mM Ca²⁺이 든 Tyrode 용액에 1~2분 방치 후 정상 Tyrode 용액으로 되돌려 1시간 가량 회복시켰다. 위의 절편조작은 입체 현미경의 시야에서 하였다(얼, 1983; 엄동 1984).

2) 실험장치 및 용액

실험용기 : perspex로 만든 0.2 ml 가량의 용량을 가진 것으로 바닥은 sylgard를 부어 핀이 쉽게 꼽힐 수 있게 하였으며, peristaltic pump를 이용하여 1 ml/min의 일정한 관류속도를 유지하였다. 실험장치는 두 개의 미세전극을 중심부와 주변부에 각각 삽입하였으며 미세전극 전치증폭기를 통하여 막전압을 기록하였다. 유리 미세전극은 3 M KCl로 채워 저항이 30~40

MΩ인 것을 골라서 사용하였다.

모든 기록은 Grass polygraph와 Apple II micro-computer에 하였고, Tektronix oscilloscope를 통해서 계속 monitor 하였다.

실험용액 : 정상 Tyrode 용액의 조성은 NaCl 140 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, Glucose 5 mM 이었고 Tris-HCl 5 mM을 가하여 35°C에서 pH가 7.4가 되게 하였으며 100% O₂로 포화시켰다. Na⁺대치 실험은 NaCl 대신 동일 농도의 LiCl을 사용하였고 K⁺, Ca²⁺농도를 높이는 경우에는 삼투질 농도를 고려하지 않고 첨가하였다.

Na-Pump의 활동도는 K⁺-free 용액에 10분 가량 두었다가 10~13 mM의 K⁺용액에 노출시켰을 때 나타나는 과분극(K⁺-induced hyperpolarization)의 크기로 측정하였다.

실 험 성 적

1) 중심부와 주변부에서 기록되는 활동전압의 특성

동방결절의 중심부와 주변부에서 기록되는 활동전압을 Fig. 2의 왼쪽에 보였다. 두 부분에서 기록되는 활동전압은 크게 세 가지 점에서 차이를 나타내었다. 중심부의 활동전압은 크기가 작고(최대이완기 전압 및 지나치기 전압), upstroke가 매우 완만하게 일어나며 빈도수가 주변부에서 기록되는 활동전압에 비하여 느린 것이 특징이었다. 주변부에서의 활동전압은 크기가

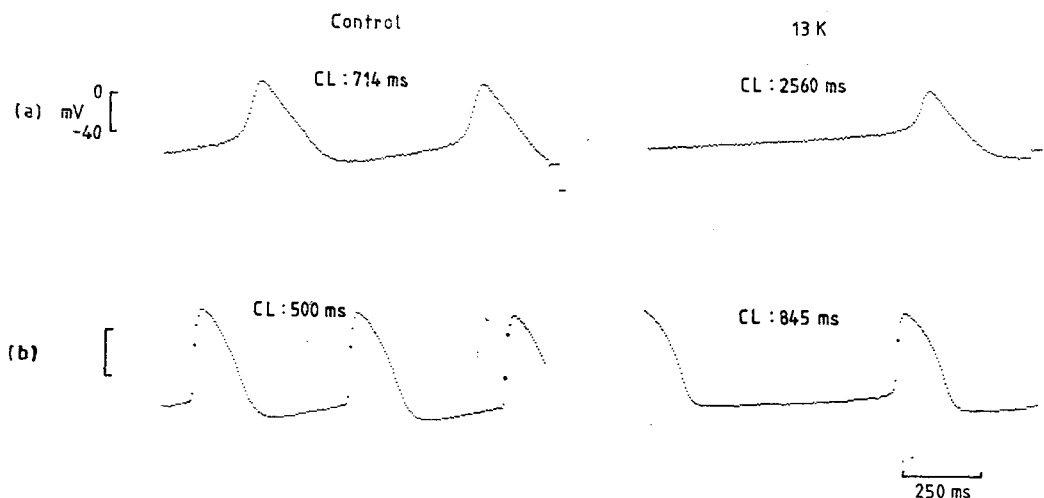


Fig. 3. Effect of 13mM K⁺ on the action potential of the central (a) and the peripheral (b) area. The frequency decreased verymuch in the central area.

크고, upstroke가 상당히 빠르며, 빈도수가 빠른 것이 특징이었다. 주변부의 활동전압은 중심부와 심방근의 중간 형태를 취하였다. 이러한 차이를 보이는 상태에서 심장근의 이온전류 중에서 과분극에 의하여 활성화되는 내향전류, i_f 를 차단하는 2mM의 Cs⁺을 첨가하여 그 효과를 보았다. Fig. 2의 오른쪽에 보이는 것처럼 중심부의 활동전압은 2mM의 Cs⁺에 의하여 약간 느려졌으나 활동전압의 크기는 오히려 약간 증가하였다. 주변부에서는 활동전압의 빈도수가 현저히 느려지고 크기가 약간 감소하였다. 2mM의 Cs⁺에 의하여 주변부에 현저한 변화가 있는 것으로 보아 중심부보다 주변부의 활동전압 성분에 i_f 가 많이 관여함을 알 수 있었다.

다음은 용액 속의 K⁺농도를 변화시켰을 때 두 부분에서 기록되는 활동전압의 모양을 Fig. 3에 나타내었다. 13mM의 K⁺농도에서 중심부의 활동전압은 매우 느려지고 최대이완기 전압이 약간 저분극되었으며, 주변부의 활동전압도 빈도수가 느려지고 최대이완기 전압도 저분극되었다. 그러나 중심부의 활동전압의 빈도수가 더욱 현저히 감소하였다. 용액 속의 K⁺을 뺀 0mM의 경우 두 부분 활동전압의 변화를 Fig. 4에 표시하였다. 0mM K⁺용액에서는 짧은 시간내에 Na-Pump의 활동이 억제되는 것으로 알려졌는데 두 부분에서 모두 활동전압의 빈도수가 빨라지고 모양이 완만해졌으며 크기가 감소되었다. 특히 주변부 활동전압의 모양과 크기가 현저히 변화하였고 빈도수가 크게 증가하였다. 이와같이 낮은 농도의 K⁺용액에서는 주변부

가, 높은 농도의 K⁺용액에서는 중심부가 현저한 변화를 보였다.

동방결절의 활동전압은 자율신경계 전달물질에 의하여 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 심장에 촉진적으로 작용하는 adrenaline을 투여하여 보았다 (Fig. 5). 10⁻⁶M의 농도에서 중심부 및 주변부 모두에서 활동전압의 크기가 커졌고 빈도수가 빨라졌으며, pacemaker 전압의 변화속도가 현저히 증가하였다. 특히 주변부의 활동전압은 모양이 크게 변화하였고 빈도수의 증가도 중심부보다 현저하였다.

다음에는 일반적으로 강심작용을 나타내고 Na-Pump의 기능을 억제한다고 알려진 digitalis의 효과를 보았다. Fig. 6에 ouabain 10⁻⁶M의 높은 농도를 투여하여 30분이 경과한 후의 변화를 나타내었다. 중심부에서는 활동전압의 빈도수가 약간 빨라지면서 불규칙해졌고 크기도 약간 감소하였다. 그러나 주변부의 활동전압은 크기가 현저히 감소하고 빈도수가 빨라졌으며, pacemaker 전압에서 upstroke기로 옮겨가는 모양이 중심부의 활동전압과 비슷한 형태로 변화하였다.

Na-Pump 억제효과가 중심부보다는 주변부가 더욱 현저한 점으로 보아 Na-Pump의 활동은 주변부에서 더욱 활발할 것으로 추측할 수 있었다.

일반적으로 동방결절의 활동전압은 Na⁺에 의한 급속 탈분극기가 없고 Ca²⁺에 의한 완만 탈분극기가 이루어진다. Ca²⁺에 의한 탈분극 정도에 따라 탈분극기의 dv/dt가 달라지는데 중심부에서 특히 낮은 값을 보인다. Ca²⁺에 의한 완만 내향전류 억제효과를 보기 위하여

—서중진 외 2인 : 토끼 동방결절 부위에 따른 Na-Pump 활동도의 차이에 관한 연구—

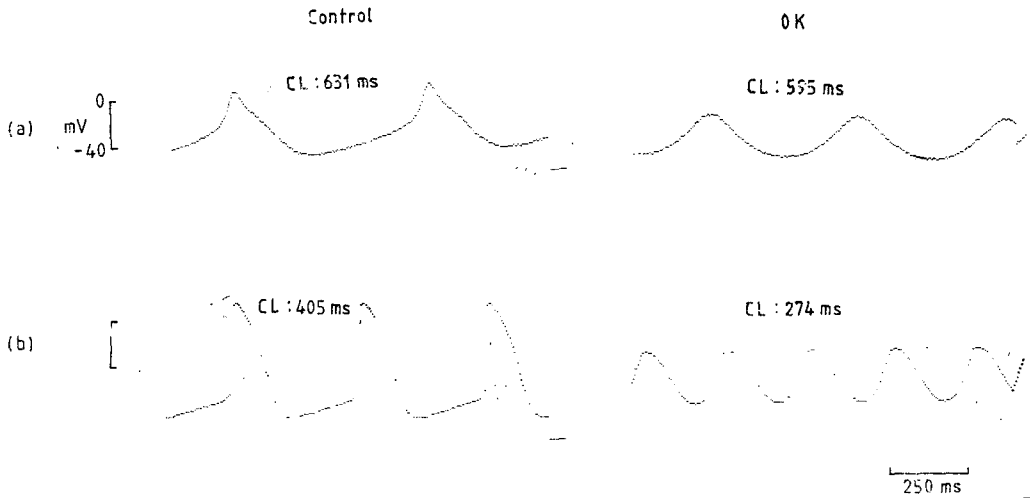


Fig. 4. Effect of 0 mM K^+ on the action potential of the central (a) and the peripheral (b) area. Exposing in K^+ -free solution, the amplitude of action potential decreased and the frequency increased, especially in the peripheral area.

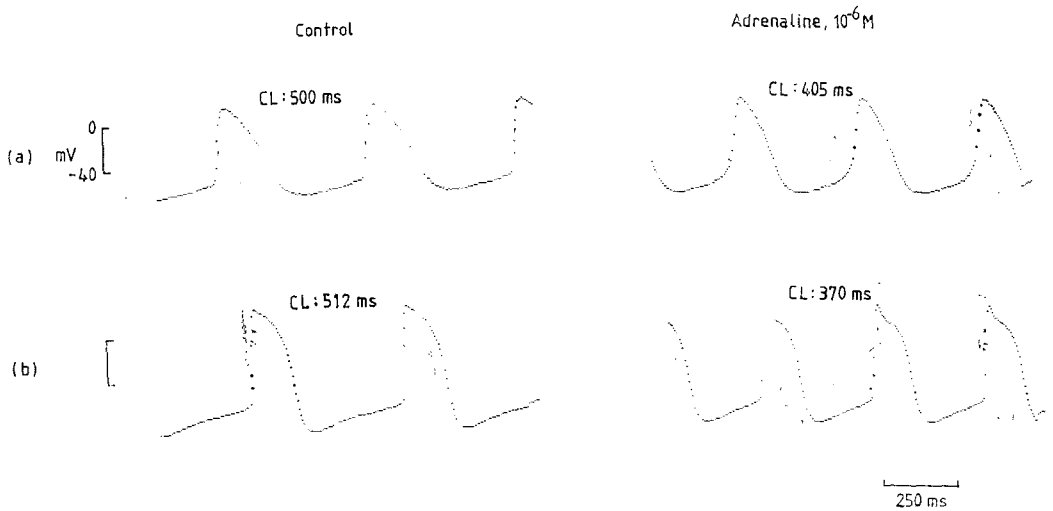


Fig. 5. Effect of 10^{-6} M adrenaline on the action potential of the central (a) and the peripheral (b) area. Adrenaline increased the rate of depolarization and frequency of action potential. Its effect was more prominent in the peripheral area than the central area. In both area the amplitude of action potential increased.

여 Co^{2+} 1 mM 을 투여하여 보았다(Fig. 7). 중심부와 주변부 모두에서 활동전압의 크기와 빈도가 감소하고 기간이 크게 연장되었다. 빈도의 감소는 중심부에서 특히 심하였다. 이와같이 중심부의 활동전압이 Ca^{2+} 전류 감소에 더욱 예민한 것으로 미루어 보아 Ca^{2+} 전류가 중심부 활동전압의 대부분을 차지함을 알 수 있었다.

2) Na-Pump 활동도

동방결절 절편에서 Na-Pump의 활동도를 알기 위하여 0 mM K^+ 에 10분간 방치하여 Na-Pump의 활동을 억제시킨 다음 10~13 mM K^+ 에 노출시킬 때 막전압이 과분극되는 정도(K^+ -induced hyperpolarization)로서 다시 활성화되는 Na-Pump 활동의 기준으로

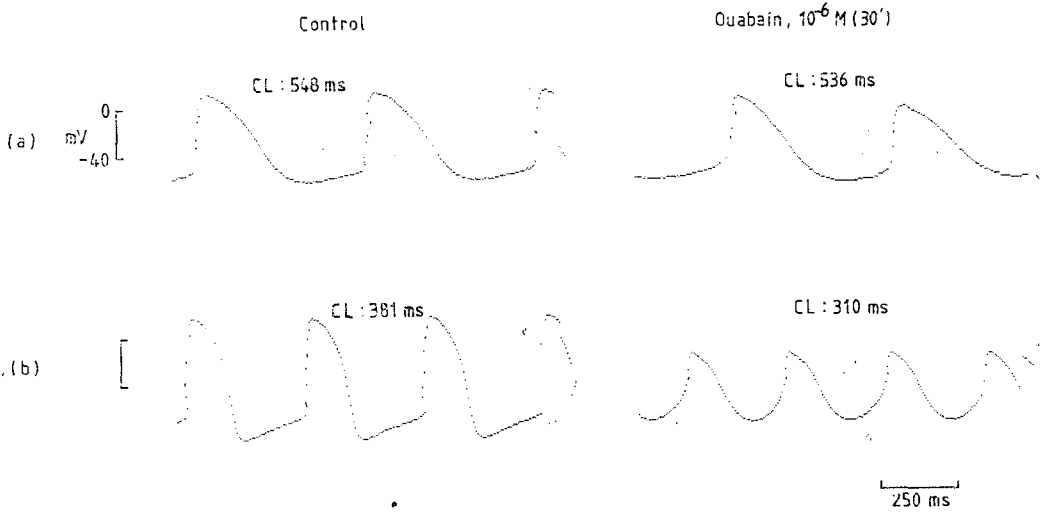


Fig. 6. Effect of 10^{-6} M ouabain on the action potential of the central (a) and the peripheral (b) area. Ouabain, known to be a Na-Pump blocker, increased the frequency of the action potential but decreased its amplitude especially in the peripheral area.

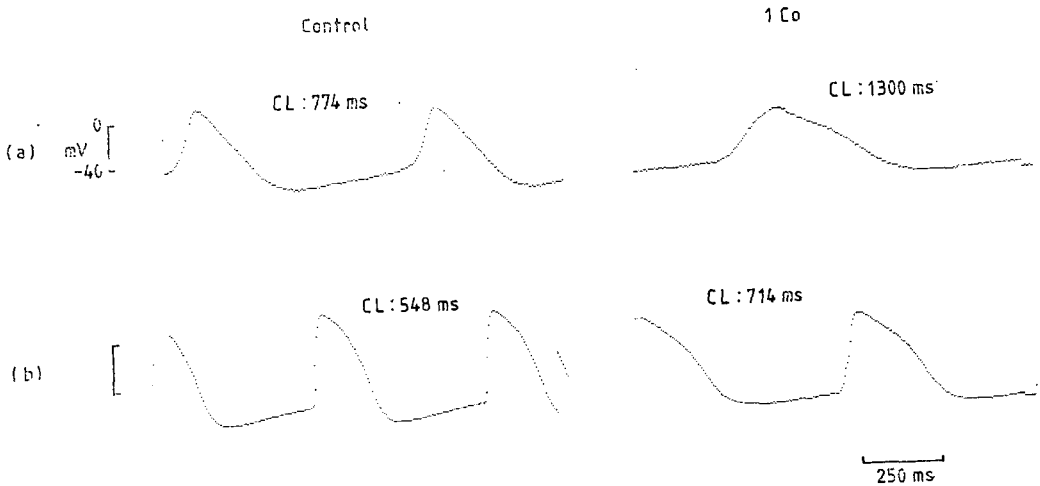


Fig. 7. Effect of 1 mM Co^{2+} on the action potential of the central (a) and the peripheral (b) area. Co^{2+} , an inorganic Ca-blocker, reduced the frequency of action potential in both area. Reduction effect was more prominent in the central area.

삼았다. 이와같은 과정에 의하여 일어나는 막전압의 변화를 중심부와 주변부로 구분하여 관찰한 것이 Fig. 8이다. 0 mM K^+ 에 노출시켰을 때 주변부 및 중심부에서의 활동전압은 점차 크기가 감소하고 빈도수가 증가하였다. 대개의 경우 중심부의 자발적인 활동전압은 중지되는 수가 많았다. 13 mM의 K^+ 으로 관류시키면 두 부분 모두에서 일과성인 과분극이 일어나고 다시 서서히 13 mM K^+ 평형전압 방향으로 저분극된다. 일

과성 과분극의 크기 및 최대값에 도달하는 속도를 Na-Pump 활동도의 중요한 지표로 삼았다. 이 경우 항상 주변부의 과분극 정도가 중심부에 비하여 컸으며, 중심부에서 나타나는 과분극은 그 크기도 작았고 많은 경우에 전혀 나타나지 않는 경우도 있었다. 중심부에서 Na-Pump의 활성화에 의한 과분극이 일어나지 않는다는 사실은 예기치 못한 결과이었다.

이상과 같이 0 mM K^+ 에 노출시킨 후 10~13 mM

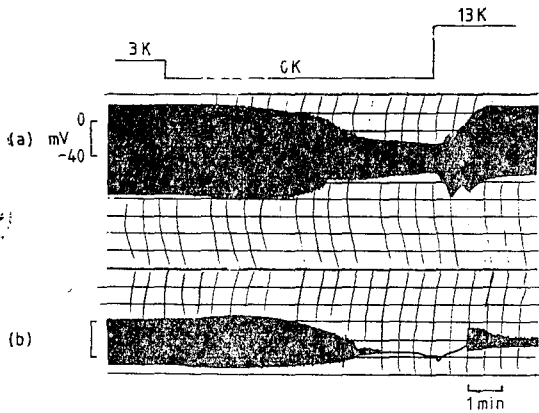


Fig. 8. Example of K^+ -induced hyperpolarization after the pretreatment of K^+ -free solution. During K^+ -free perfusion, spontaneous action potential in the central (a) area was stopped but continuous firing was noticed in the peripheral (b) area. Transient hyperpolarization in both area was found but small in the central area.

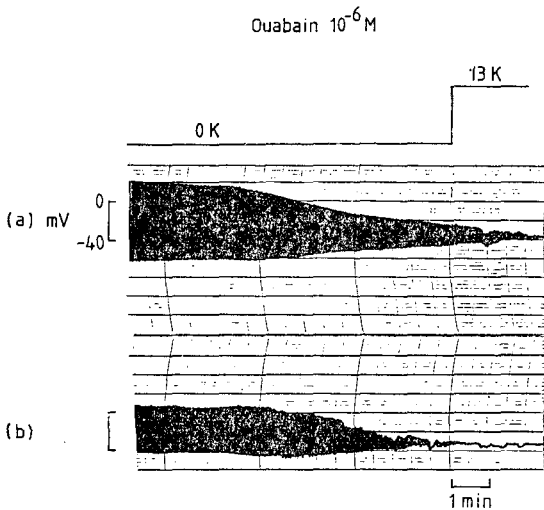


Fig. 9. Effect of ouabain on the transient hyperpolarization. No hyperpolarization was found after readmission of 13 mM K^+ in either area. This finding indicates that transient hyperpolarization is the result of reactivation of electrogenic Na-Pump.

K^+ 의 용액을 관류할 경우에 나타나는 과분극이 과연 Na-Pump의 활성화에 의한 것인가를 검증하기 위하여 Na-Pump를 억제하는 ouabain $10^{-6}M$ 으로 30분간 전

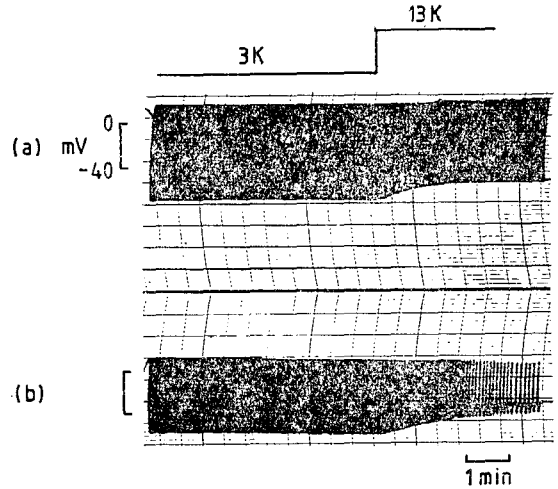


Fig. 10. Effect of 13 mM K^+ on the action potential of the central (a) and the peripheral (b) area. High concentration of potassium shifts the resting potential level to depolarizing direction.

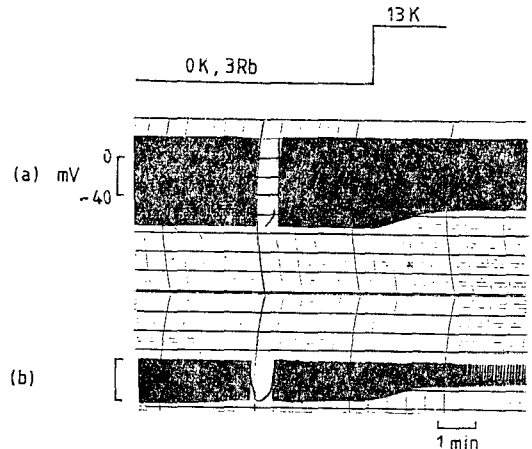


Fig. 11. Effect of substituting Rb^+ for K^+ in K^+ -free treatment solution on the K^+ -induced hyperpolarization of SA node. No hyperpolarization was found in either area and Rb^+ could be a substitute for potassium.

처치하여 놓은 다음, 0 mM K^+ 및 13 mM K^+ 에 노출시켰을 때의 변화를 본 것이 Fig. 9이다. 주변부와 중심부 모두에서 ouabain에 의하여 활동전압의 크기가 감소하였으며 0 mM K^+ 에 노출하였을 때 더욱 감소하였다. 두 부분 모두에서 Na-Pump의 활성화에 의한 과분극현상은 볼 수 없었다. ouabain에 의하여 일과성 과분극 현상이 소실됨은 곧 과분극 현상이 Na-

Pump의 활성화에 의한 것임을 나타내 주었다.

다음에는 정상 3 mM K⁺농도에서 바로 13 mM K⁺ 농도로 바꿔주었을 경우 활동전압의 변화를 관찰하였다(Fig. 10). 예상한 대로 활동전압의 크기가 감소하고 빈도수 또한 줄어 들었으나 일과성 과분극 현상을 관찰할 수는 없었다. 13 mM K⁺에 의하여 막전압은 K⁺의 평형전압 값에 가깝게 바로 저분극되었다. 이 결과도 일과성 과분극이 Na-Pump의 활성화에 의하여 일어남을 간접적으로 증명하는 것이라 할 수 있겠다. Na-Pump는 세포 밖 K⁺농도에 비교적 예민하게 선택성을 보이는 것으로 알려져 있다. 그래서 0 mM K⁺용

액에 K⁺과 성질이 비슷한 3 mM의 Rb⁺을 가하여 Na-Pump 활동이 억제되는가를 보았다. Fig. 11은 그 결과를 보이는데 활동전압의 모양이나 빈도수에 약간의 변화를 보이긴 했으나 pump 억제 현상은 볼 수 없었고 13 mM K⁺에 의하여 다시 활성화되는 일과성 과분극 현상도 볼 수 없었다. 이로서 Na-Pump 활동도에 관한 Rb⁺은 K⁺대신 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

0 mM K⁺용액에 의해 Na-Pump가 억제되면 그 결과로 세포내 Na⁺농도는 계속 증가하게 될 것이다. 그러나 세포 밖 Na⁺농도를 낮추어 주거나 혹은 없애주던 세포내 Na⁺축적 현상(Na⁺ loading)이 감소 혹은 없어질 것을 기대하여 Na⁺대신 Li⁺으로 70%를 대체하여 본 실험을 하였다. Fig. 12에 보인 것처럼 주변부나 중심부 모두에서 30% Na⁺용액에서는 일과성 과분극 현상을 보이지 않았다. 이는 0 mM K⁺에 의하여 Na-Pump의 기능이 억제되어도 세포 밖 Na⁺농도가 낮아서 세포내 Na⁺의 축적 현상이 현저하지 않았음을 말해 주는 것이다.

일반적으로 생물 반응속도는 온도에 따라서 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 특히 에너지를 사용하는 생체 반응은 온도 변화에 크게 영향을 받는다. 동방절절에서 Na-Pump의 활동도 또한 온도에 따라 크게 변화하리라 예상되어 35°C와 실온(17°C)의 두 경우 Na-Pump 활동도를 비교하여 보았다. 35°C의 경우 주변부와 중심부 모두에서 일과성 과분극 현상을 보인 절편에서 다시 관류액의 온도를 실온인 17°C로 내려 보았다. Fig. 13에 나타난 것처럼 실온에서 일과성 과

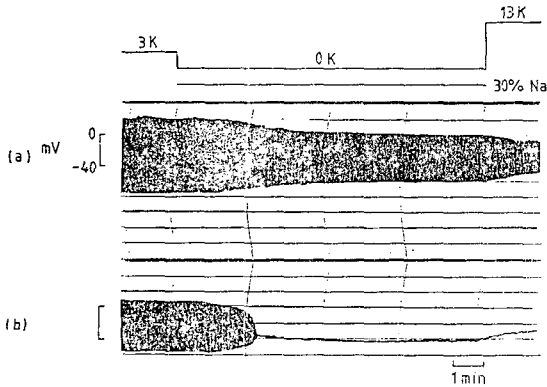


Fig. 12. Effect of low sodium (30%) on the transient hyperpolarization. Sodium was replaced by equimolar Li⁺. In both area transient hyperpolarization was abolished.

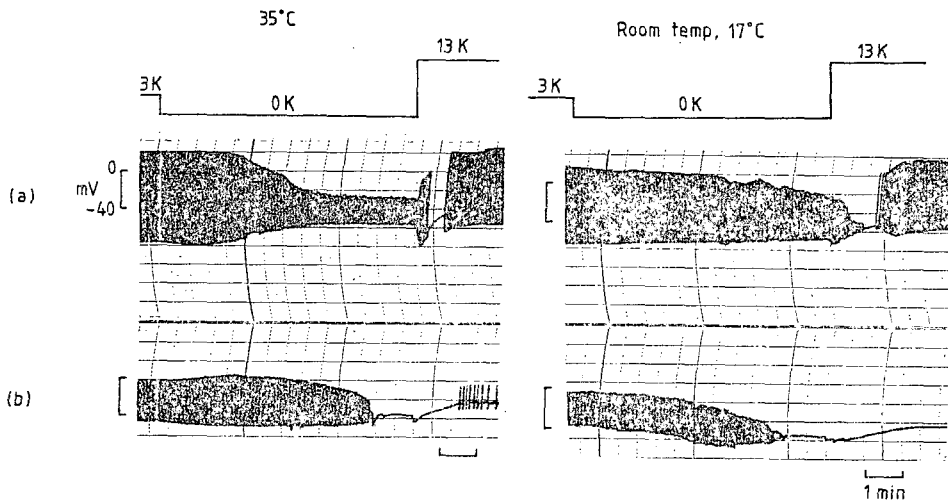


Fig. 13. Effect of low temperature (17°C) on the K⁺-induced hyperpolarization in the central (a) and the peripheral (b) area of the SA node. The magnitude of transient hyperpolarization in both area was diminished.

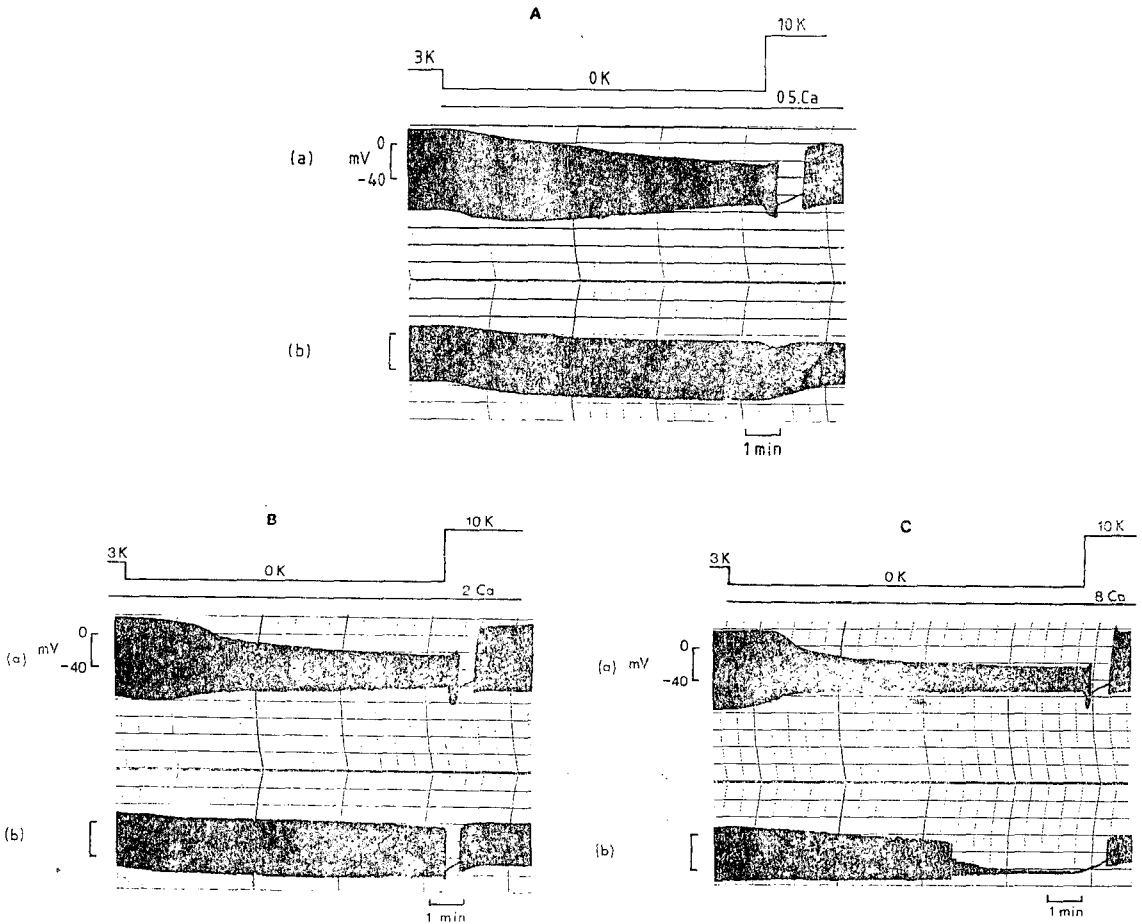


Fig. 14. Effect of various concentration of calcium(A: 0.5 mM, B: 2 mM, C: 8 mM) on the transient hyperpolarization of the central (a) and the peripheral (b) area. The magnitude of hyperpolarization was largest in the 8mM Ca^{2+} solution. Hyperpolarization in the central area was not evident or very small, and spontaneous activity was stopped in 8mM Ca^{2+} solution.

분극 현상은 완전히 소실되지는 않았으나 현저하게 감소하는 결과를 보였다. 따라서 일과성 과분극으로 나타나는 Na-Pump의 활동도가 온도가 낮아짐으로 해서 크게 감소하였음을 알 수 있었다.

Na-Pump의 활동과 더불어 세포 속에 Na^+ 의 축적 현상은 또 다른 기전 즉 Na-Ca 교환기전의 활성화를 일으키게 할 것으로 생각된다. 세포내 Na^+ 의 축적에 의해 Na^+ 과 Ca^{2+} 이 교환되어 Na^+ 농도를 낮추는 방향으로 Na-Ca 교환기전이 작용할 가능성이 있다고 생각되어 관류액 속의 Ca^{2+} 농도를 변화시켜 보았다. 0.5 mM Ca^{2+} 상태에서 0 mM K^+ , 10 mM K^+ 농도에 노출시킨 실험 결과를 Fig. 14-A에 나타내었다. 마찬가지로 2 mM Ca^{2+} , 8 mM Ca^{2+} 에서의 효과를 각각 Fig.

14-B와 14-C에 나타내었다. 세 경우 모두 주변부에서는 일과성 과분극을 보였으나, 중심부에서는 2 mM Ca^{2+} 정상 상태에 약간 나타나는 것을 제외하고서는 과분극 현상은 나타나지 않았다. 특히 8 mM Ca^{2+} 용액에서는 중심부의 활동전압이 거의 정지 상태에 이르렀다. 주변부에서 나타나는 자기 다른 농도의 Ca^{2+} 용액에서 과분극의 크기와 최대값에 이르는 속도는 8 mM Ca^{2+} 때 가장 크고 빨랐고, 0.5 mM Ca^{2+} 농도에서는 조금 작고 속도 또한 느렸다. 이러한 실험이 10 mM K^+ 에 다시 노출시킬 때에도 서로 Ca^{2+} 농도가 다른 조건이었기 때문에 그와 같은 차이를 없애기 위하여 0 mM K^+ 에 노출하였을 동안만 0.5 mM과 8 mM Ca^{2+} 농도로 다르게 하여 보았다(Fig. 15-A, 15-B). 마찬가지로

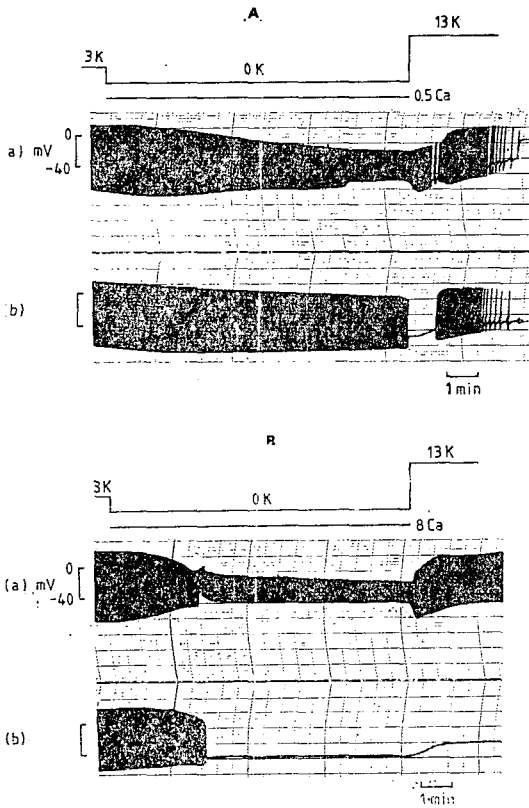


Fig. 15. Effect of Ca^{2+} concentration on the K^{+} -induced hyperpolarization. Same protocol as Fig. 14, but exposure to various Ca^{2+} concentration was terminated at readmission of potassium.

로 8 mM Ca^{2+} 때가 0.5 mM Ca^{2+} 때보다 일과성 과분극의 크기가 크고 최대값에 이르는 속도가 빨랐다.

고 찰

1) 동방결절 부위별 활동전압의 특성

동방결절이 포유류 심장에서 pacemaker로서 작용한다는 사실은 Keith와 Flack(1907)에 의하여 처음으로 확인되었다. 동방결절은 상대정맥과 하대정맥 사이에 우심방의 한 부분으로 심방 중격과 crista terminalis 사이에 위치하고 있다. Bleeker 등(1980)은 동방결절에서 연속적으로 미세전극을 삽입하여 활동전압의 모양과 활성화 양상을 연구하였다. 중심부 즉 dominant pacemaker 부분은 최대이완기 전압(Maximal

diastolic potential, MDP)이 -50 mV 정도로 낮고 최대탈분극속도(\dot{V}_{\max})는 2 V/sec 정도로 작은 값을 보인다. 중심부에서 기록되는 활동전압은 tetrodotoxin(TTX)에 비교적 영향을 받지 않는 점으로 보아 급속내향전류, i_{Na} 는 거의 작용을 않는 것으로 알려지고 있다(Yamagishi and Sano, 1966). 이러한 중심부 pacemaker 세포의 구조적 특성은 수축기구와 세포내 기관의 발달이 비교적 적어 현미경 소견으로는 비어있는 듯한 감을 주고(Masson-Pévet et al., 1976) 불규칙하게 배열되어 있으며, 수축단백의 양과 활동전압의 \dot{V}_{\max} 와는 직접적인 연관을 지을 수는 없다고 하였다(Masson-Pévet et al., 1984).

이러한 중심부의 특성은 주변부로 갈수록 최대이완기 전압이 커지고 \dot{V}_{\max} 도 증가하며, 구조적으로는 수축기구가 잘 발달되고 세포내 기관들이 풍부해지는 것으로 알려져 있다(Brown, 1982). 이상의 일반적인 전기생리학적 특성은 본 실험결과에서도 확인되었다. 그러나 기본적인 자동능의 빈도는 이제까지 인정되어 왔던 가장 빠른 박동을 가진 부분이 pacemaker 역할을 한다는 원칙과는 상반되게 중심부보다 주변부 활동전압의 빈도가 더 빨랐다. 이와 같은 사실은 DeHann(1982)이 chicken embryo 심장근 세포에서 발견한, 빠른 부분이 항상 dominant pacemaker가 되는 것은 아니라는 사실로 어느 정도 설명이 가능하다. 그러나 본 실험 결과와 같이 주변부 활동전압이 극히 드문 예외를 제외하고서는 항상 중심부보다 빠르다는 사실을 완전히 설명해 주지는 못한다. 아마도 주변부와 중심부 사이의 전기적 연결을 단절한 상황에서 두 부분의 pacemaker 활동기전에 차이가 생기는 때문일 가능성도 고려해 봐야 될 것 같다. 이와 같은 가정하에 주변부 활동전압이 중심부보다 2 mM Cs^{+} 에 더욱 예민하게 변화한다는 사실에서 주변부 pacemaker 활동에 과분극에 의해 활성화되는 내향전류, i_{K} 가 상당부분 관여함을 간접적으로 짐작할 수 있을 것 같다. 이는 Cs^{+} 이 비교적 선택적으로 i_{K} 를 억제한다는 실험결과와 model(Noble and Noble, 1984)에 근거를 둔 것이다.

2) Na-Pump의 활성화도

Na-Pump의 활동은 세포내 Na^{+} 과 세포 밖 K^{+} 농도에 의하여 활성화된다는 것은 심장근에서도 잘 알려진 사실이다(Noble, 1979). 세포 밖 K^{+} 농도를 0 mM로 하였을 때 Na-Pump는 억제되고 다시 K^{+} 농도를 높이면 Na-Pump가 활성화된다(Noma and Irisawa, 1974; 1975). 또한 ouabain은 비교적 선택적으로 심장근에

존재하는 Na-Pump의 활동을 억제한다(Gadsby and Cranefield, 1979; Gadsby, 1980). 이와같은 Na-Pump의 활동은 세포의 대사활동의 결과로 생산되는 ATP를 사용한다. 0 mM K⁺이나 ouabain 10⁻⁶M로 동방결절을 관류하면 Na-Pump의 활동이 억제될 것으로 예상된다. Na-Pump의 기능이 억제되면 그 결과로 세포내 Na⁺농도가 증가하고, Na⁺농도 증가는 세포내 Ca²⁺농도를 증가시키는 것으로 생각하고 있다(Marban and Tsien, 1982). 이러한 ouabain 및 0 mM K⁺조건에 의해 Na-Pump 기능을 억제시켰을 때 중심부보다 주변부의 변화가 더욱 현저하였다. 이는 중심부보다 주변부에서 Na-Pump의 활동이 활발하고 더 의존적임을 암시하는 것으로 해석된다. 이는 구조상 Mitochondria 등 세포내 기관의 발달이 중심부에서는 미약하고 주변부에서 뚜렷한 것과 관련 지을 수 있을 것 같다. 이와 같은 가정은 0 mM K⁺에 10분간 방치한 다음 10~13 mM K⁺으로 Na-Pump의 기능을 다시 활성화시켰을 때 나타나는 일과성 과분극의 정도가 중심부보다 주변부에서 더욱 크다는 사실로 다시 확인할 수 있었다. 특히 대부분의 경우 중심부에서는 본 실험에서 기록한 기록범위내에서 일과성 과분극이 전혀 기록이 안될 정도로 낮았다. 이는 Noma와 Irisawa의 결과(1974, 1975)가 중심부에서 이루어진 것이라면 본 실험결과와는 상당한 차이를 보인 것이고, 만약 주변부에서 기록한 것이었다면 비슷한 결과라고 할 수 있겠다. 그러나 본 실험에서처럼 주변부와 중심부를 인위적으로 단절시킨 후 행한 실험이 아니기 때문에 차이가 날 수 있는 가능성을 제외할 수는 없을 것 같다. 30% Na⁺에 의해서 Na-Pump에 의한 일과성 과분극의 소실은 낮은 Na⁺농도에서는 비록 0 mM K⁺에 의하여 Na-Pump가 억제되었다 해도, 세포내로의 Na⁺ 축적이 그리 크지 않고 Na-Ca 교환기전에 의해 오히려 Na⁺의 세포내 농도가 감소되거나 그리 증가하지 않았음을 시사하는 결과라고 해석된다. 이러한 Na-Ca 교환기전이 Na-Pump 기능 억제시에 얼마나 큰 영향을 끼치는가를 보기 위하여, Ca²⁺농도를 변화시켜 본 실험에서 낮은 Ca²⁺농도(0.5 mM)에서 더욱 많은 Na⁺이 세포내로 이동하여 Na-Pump의 활성화 크기 즉 일과성 과분극의 크기가 2 mM, 8 mM의 Ca²⁺농도에 비하여 클 것으로 예상되었으나 결과는 반대였다. 오히려 8 mM Ca²⁺농도에서 일과성 과분극의 크기가 크고 최고값에 도달하는 시간도 빨랐다. 이와 같은 예상 밖의 결과는 Na-Ca 교환기전 이외에 다른 기전이 작용하는지 앞으로 더욱 연구해야 할 과제라고 사료된다.

결론

토끼 동방결절에서 부위별 특성을 알기 위하여 두 개의 미세전극을 주변부와 중심부에 각각 삽입하여 활동전압을 기록, 분석하였다. 이온전류의 차이점을 알기 위하여 Na⁺, K⁺농도를 변화시키고 Cs⁺, adrenaline, ouabain을 투여하여 활동전압의 변화를 관찰하였으며 Na-Pump의 활동도에 대한 차이를 보기 위해 0 mM K⁺에 10분간 노출시킨 후 10~13 mM K⁺으로 관류할 때 다시 활성화되는 Na-Pump의 활동정도 즉 일과성 과분극을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 동방결절의 주변부는 중심부에 비하여 활동전압의 빈도가 더 빨랐고, 2 mM Cs⁺에 의해 빈도수가 더욱 느려졌으며, 0 mM K⁺, 10⁻⁶M adrenaline, 10⁻⁶M ouabain에 의하여 빈도수가 중심부에 비하여 더욱 증가하였다.

2) 중심부의 활동전압은 주변부에 비하여 13 mM K⁺와 1 mM Co²⁺에 의하여 현저하게 빈도수가 감소하였다.

3) 0 mM K⁺에 노출시킨 다음 10~13 mM K⁺용액에 의한 일과성 과분극 현상은 두 부위에서 모두 나타났으나 중심부에서는 아주 미약하였고 주변부에서는 아주 뚜렷하였다. 이러한 일과성 과분극 현상은 10⁻⁶M ouabain으로 30분간 전치치하였을 때 소실되었다.

4) 30% Na⁺용액에서는 일과성 과분극 현상이 완전히 소실되었고 실온(17°C)으로 내렸을 때에도 현저히 감소하였다.

5) 0 mM K⁺에 노출시키면서 동시에 Ca²⁺농도를 변화시켰을 때 일과성 과분극은 0.5, 2 mM Ca²⁺농도에서 보다 8 mM Ca²⁺용액에서 가장 컸고 빨리 일어났다.

이상의 사실에서 동방결절의 중심부는 Na-Pump 억제효과(0 mM K⁺, ouabain)에 크게 영향을 받지 않는 반면 Ca 억제제 및 높은 농도의 K⁺에 현저한 변화를 보였고, Na-Pump 억제 후에 나타나는 일과성 과분극 현상도 아주 작거나 나타나지 않는 점으로 미루어 보아 중심부의 Na-Pump 활동도는 주변부에 비하여 아주 미약한 것으로 생각된다.

REFERENCES

업용의 : 토끼 동방결절에서 Pacemaker 전류(과분극에 의해 활성화되는 내향전류, *i_f*)의 동력학적 특성에 관한 연구. 대한생리학회지, 17:1-11, 1983.

- 엄용의, 황상익, 김기환 : 토끼 동방결절에서 완만내향 전류의 *slow component*에 관한 연구. 대한생리학회지, 18:9-17, 1984.
- Bleeker, W.K., Mackaay, A.J.C., Masson-Pévet, M., Bouman, L.N. and Becker, A.E.: *Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. Circ. Res.*, 46:11-22, 1980.
- Bouman, L.N., Gerlings, E.D., Biersleher, P.A. and Bonke, F.I.M.: *Pacemaker shift in the sinoatrial node during vagal stimulation. Pflügers Arch.*, 302:255-267, 1968.
- Brown, H.F.: *Electrophysiology of the sinoatrial node. Physiol. Rev.*, 62:505-530, 1982.
- Connor, J.A., Prosser, C.J. and Weems, W.A.: *A study of pacemaker activity in intestinal smooth muscle. J. Physiol.*, 240:671-701, 1974.
- DeHaan, R.L.: *In vitro models of entrainment of cardiac cells, In: Cardiac Rate and Rhythm, edited by L.N. Bouman and H.J. Jongasma, Hague, The Netherlands, Nijhoff, 323-362, 1982.*
- Gadsby, D.C.: *Activation of electrogenic Na/K exchange by extracellular K⁺ in canine cardiac Purkinje fibers. Proc. Natl. Sci., U.S.A.*, 77: 4035-4039, 1980.
- Gadsby, D.C. and Cranefield, P.F.: *Direct measurement of changes in sodium pump current in canine cardiac Purkinje fibers. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 76:1783-1787, 1979.
- Hiraoka, M. and Hecht, H.H.: *Recovery from hypothermia in cardiac Purkinje fibers: Considerations for an electrogenic mechanism. Pflügers Arch.*, 339:25-36, 1973.
- Irisawa, H.: *Comparative physiology of the cardiac pacemaker mechanism. Physiol. Rev.*, 58:461-498, 1978.
- Isenberg, G. and Trautwein, W.: *The effect of dihydro-ouabain and lithium ions on the outward current in cardiac Purkinje fibers. Pflügers Arch.*, 250:41-54, 1974.
- Isenberg, G. and Trautwein, W.: *Temperature sensitivity of out-ward current in cardiac Purkinje fibers. Evidence for electrogenicity of active transport. Pflügers Arch.*, 358:225-234, 1975.
- Keith, A. and Flack, M.: *The form and nature of the muscular connections between the primary division of the vertebrate heart. J. Anat. Physiol.*, 41:172-189, 1907.
- Cited from Brown H.F.: Electrophysiology of the sinoatrial node. Physiol. Rev.*, 62:505-530, 1982.
- Keynes, R.D. and Swan, R.C.: *The permeability of frog muscle fibres to lithium ions. J. Physiol.*, 147:626-638, 1959.
- Kurachi, Y., Noma, A. and Irisawa, H.: *Electrogenic Na-Pump evidenced by injecting various Na salts into the isolated A-V node cells of rabbit heart. Pflügers Arch.*, 392:89-91, 1981.
- Livengood, D.R. and Kusano, K.: *Evidence for an electrogenic sodium pump in follower cells of the lobster cardiac ganglion. J. Neurophysiol.*, 35:170-186, 1972.
- Mackaay, A.J.C., Bleeker, W.K., Op't Hof, T. and Bouman, L.N.: *Temperature dependence of the chronotropic action of calcium: functional inhomogeneity of the rabbit sinus node. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12:433-443, 1980.
- Marban, E. and Tsien, R.W.: *Enhancement of calcium current during digitalis inotropy in mammalian heart: positive feedback regulation by intracellular calcium? J. Physiol.* 329:589-614, 1982.
- Masson-Pévet, M., Bleeker, W.K., Mackaay, A.J.C., Bouman, L.N. and Houtkoper, J.M.: *Sinus node and atrium cells from the rabbit heart: a quantitative electron microscopic description after electrophysiological localization. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 11:555-568, 1979.
- Masson-Pévet, M., Bleeker, W.K., Besselsen, E., Treytel, B.W., Jongasma, H.J. and Bouman, L.M.: *Pacemaker cell types in the rabbit sinus node: a correlative ultrastructural and electrophysiological study. J. Mol. Cell. Cardiol.*, 16:53-63, 1984.
- Noble, D.: *The initiation of the heartbeat (2nd*

- ed.). Oxford, England, Clarendon, 1979.
- Noble, D. and Noble, S.J.: *A model of sinoatrial node electrical activity based on a modification of the DiFrancesco-Noble (1984) equations. Proc. Roy. Soc. Lond. B., 222:295-304, 1984.*
- Noma, A. and Irisawa, H.: *Electrogenic sodium pump in rabbit sinoatrial node cell. Pflügers Arch., 351:177-182, 1974.*
- 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.*
- Prosser, C.L., Weems, W.A. and Connor, J.A.: *Types of slow rhythmic activity in gastrointestinal muscles. In: Physiology of Smooth Muscle, edited by E. Bulbring and M.F. Shuba, New York, U.S.A., Raven, 99-109, 1976.*
- Thomas, R.C.: *Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. Physiol. Rev., 52:563-594, 1972.*
- Vassalle, M.: *Electrogenic suppression of automaticity in sheep and dog Purkinje fibers. Circ. Res., 27:361-377, 1970.*
- Wilkens, L.A.: *Electrophysiological studies on the heart of bivalve mollusc. Modiolus demissus. I. Ionic basis of the membrane potential. J. Exptl. Biol., 56:273-291, 1972.*
- Yamagishi, S. and Sano, T.: *Effect of tetrodotoxin on the pacemaker action potential on the sinus node. Proc. Japan. Acad., 42:1194-1196, 1966.*