

심근정지후 심근세포의 회복과정과 심근정지용액에 관한 연구

연세대학교 의과대학 생리학교실

서창국 · 박소라 · 박혜수 · 이영호 · 강복순

(1988년 5월 20일 접수)

= Abstracts =

A Study on the Cardioplegic Solutions and the Cardioplegia of Guinea Pig Heart

Chang Kook Suh, So Ra Park, Hye Soo Park, Young Ho Lee and Bok Soon Kang

Department of Physiology, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

The changes in membrane potential and intracellular Ca^{2+} activities along with adenosine triphosphate (ATP) and creatine phosphate (CP) contents of guinea pig hearts were studied during the cardioplegia and recovery phase.

The results obtained were summarized as follows:

- 1) A low concentration of Ca^{2+} in the cardioplegic solution caused significant changes in membrane potential during the cardioplegia and action potential configurations of the first beat after cardioplegia.
- 2) Intracellular Ca^{2+} activities were decreased significantly during cardioplegia and increased when the cardiac tissue was reperfused with the normal Tyrode solution. The magnitude of increase in intracellular Ca^{2+} activities was larger in the 0.1 mM Ca^{2+} -cardioplegic solution than the 1.8 mM Ca^{2+} -solution.
- 3) ATP and CP contents of cardiac ventricular tissue were decreased during the cardioplegia, regardless of Ca^{2+} concentration in the cardioplegic solutions, and CP contents were recovered with the reperfusion of normal Tyrode solution faster than those of ATP. And, there were no significant differences in the recovery of CP contents with different concentrations of Ca^{2+} in the cardioplegic solutions tested, while the recovery of ATP contents was faster with 15 mM K^+ , 0.1 mM Ca^{2+} cardioplegic solution.

These results suggest that the Ca^{2+} concentration in the cardioplegic solution is one of major factors influencing the recovery of cardiac tissue from the cardioplegia.

Key Words: Cardioplegia, Na^+ - Ca^{2+} exchange, Ca^{2+} activity, ATP, CP

서 론

임상에서 심장질환의 치료 목적으로 시행되고 있는 개심술(open-heart surgery)은 대동맥 혈류를 차

단하여 무혈적인 상태에서 수술을 하기 때문에 심근 세포로 가는 산소 공급이 중단되어 산소 결핍증에 빠지게 되는데 이를 ischemic arrest라고 한다. 이러한 심근의 산소 결핍증은 수술 이후 심장기능의 회복을 지연시키고 때로는 심장조직의 영구적인 손상을 초래할 수 있다는 것이 보고되었다(Ebert, 1978; Levitsky, 1986). 이와 같은 심근세포 손상을 방지하기 위하여 심박동정지(arrest)를 신속히 일으키고 심장의

*본 연구는 1986년도 문교부 자유과제 학술연구조성비와 연세대학교 교수연구비(1987년도)에 의하여 이루어 졌음.

전기-기계적 활동을 중지시켜 심근세포의 에너지 소모를 감소시키는 방법으로 심근정지용액 (cardioplegic solution) 투여법이 Gay & Ebert (1973)에 의해 시도되었으며, 근자에는 여러 종류의 심근정지용액이 개발되어 사용되고 있다 (McGoon, 1985).

즉 10내지 20 mM의 K^+ 이온을 포함한 심근정지용액을 관상동맥에 주입하여 심근세포의 흥분전도를 차단시키고, 심근정지용액과 심장의 온도를 15내지 20°C로 급속히 냉각시킴으로써 산소결핍에 의한 심근의 손상을 방지할 수 있다는 것이 보고되었다 (Roberts et al., 1980). 이와 같이 고농도의 K^+ 으로 심근세포막전압을 탈분극시키면 심박동은 신속히 중지할 수 있으나, 세포막전압 탈분극 정도에 따라 세포막을 통한 Ca 이온유입량의 증가로 세포내에 Ca 이온이 축적될 수 있으며 (Mullins, 1981; Kimura et al., 1986; Mechmann & Pott, 1986; Kimura et al., 1987), 또 세포막전압의 탈분극이 지속되면 Na 및 Cl 이온을 포함한 세포내 주요 이온의 농도가 달라져, 세포의 부피가 변하여 심장에 손상을 초래할 수가 있다 (Jakobsson, 1980).

또한 세포내 Ca^{2+} 이 증가되면 심근의 수축력에 관여하는 단백질 (contractile proteins), Ca^{2+} 저장소인 sarcoplasmic reticulum (SR) 및 미토콘드리아에서의 에너지 이용율의 증가로 adenosine triphosphate (ATP)의 양이 감소되고 (Opie, 1984), 동시에 산소결핍증으로 세포내 ATP의 감소현상이 촉진되어, 심근수축단백질의 이완작용 (relaxation)을 방해하여 심근의 경직 (ischemic contracture)을 유발하게 됨으로써 심근세포가 기능을 소실하게 된다고 한다 (Reimer & Jennings, 1986). 이와 같이 심근정지용액의 사용에 있어 세포내 Ca 이온과 ATP의 양은 심장수술후 심근의 기능회복의 정도를 결정하는 중요한 인자가 된다는 것이다. 그러므로 심근세포내로의 Ca^{2+} 축적을 방지하기 위해 심근정지용액의 Ca^{2+} 농도를 감소시키거나 심근세포내로의 Ca^{2+} 유입을 막기 위하여 심근정지용액과 Ca^{2+} 길항제들을 병행하여 사용하고 있다 (Pinsky et al., 1981; Bourdillin & Poole-Wilson, 1982; Balderman et al., 1984; Hearse et al., 1984; Yamamoto et al., 1984; Hendriks et al., 1985). 그러나 Ca^{2+} 농도를 감소시킨 심근정지용액을 사용하여 심근정지를 일으킨 후 다시 정상 Ca^{2+}

농도의 용액으로 회복시킬 때에도 세포내에 Ca^{2+} 이 축적될 수 있어, 심근세포의 기능 및 구조가 비가역적인 손상 (reperfusion injury)에 빠지게 된다고 한다 (Singal et al., 1986; Sunnergren & Rovetto, 1987).

따라서 본 연구에서는 심근정지용액의 Ca^{2+} 농도가 심근의 정지 및 회복과정에 미치는 영향을 규명하기 위해, 심실유두근세포에서 세포막전압, 세포내 Ca^{2+} 활성화도, 심근의 ATP와 creatine phosphate (CP)의 변화 양상을 관찰하고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

체중 300 g 내외의 guinea pig를 암, 수 구별없이 사용하였다.

2. 세포막전압 및 세포내 Ca^{2+} 활성화도의 측정

Guinea pig의 두부를 강타한 후 심장을 신속히 적출하여 이를 100% O_2 로 산소화된 Tyrode 용액 (NaCl 133.5; KCl 4.0; $CaCl_2$ 1.8; $MgSO_4$ 1.2; NaH_2PO_4 0.3; Tris 10; Glucose 10 mM)에 넣은 후 우심실 유두근을 분리하였다. 유두근의 한쪽 끝을 27.5°C로 일정하게 유지되는 실험대 (perfusion chamber)에 고정시키고, 다른 끝은 장력 측정기 (Model 400A Force Transducer System, Cambridge Technology, Inc.)에 연결하였다.

유두근을 1 contraction per second (cps)로 약 1시간 동안 자극하여 평형상태에 이르게 한 후 세포막전압 (E_m)과 Ca^{2+} 농도에 의한 전압 (E_{Ca})을 측정하여 oscilloscope (Philips PM3305)와 chart recorder (Gould 220)에 기록하였다. 이어 심근정지용액으로 30분동안 유두근을 관류하여 심근정지를 일으키고, 다시 정상 Tyrode 용액을 관류시켜 유두근을 회복시켜 이때의 E_m 과 E_{Ca} 를 측정하였다. 심근정지용액은 정상 Tyrode 용액중에서 K^+ 농도와 Ca^{2+} 농도를 실험목적에 따라 달리하였고, NaCl의 농도를 조절하여 osmolarity를 일정하게 조정하였으며, 관류용액의 pH는 7.4로 조절하였다.

유두근 세포에서 세포막 전압의 측정은 microfiber capillary tubings (TW150-G, WPI Inc.)을 뽑아서 만든 microelectrode에 3M KCl을 채워 사용하였으

며, 이 reference electrode(RE)의 저항은 5-20 megohms으로, 또 microelectrode tip의 직경은 0.5 μm 이하로 하였다. 세포내 Ca²⁺ 활성도는 Prof. W. Simon이 개발한 neutral resin인 Ca²⁺-Cocktail (10% ETH 1001, 1% NaTPB, 89% O-NPOE)을 채운 Ca²⁺-selective electrode(CSE)를 만들어 본 교실에서 제작한 differential electrometer를 이용하여 측정하였다(Suh et al., 1987).

3. 심근내 adenosine triphosphate와 creatine phosphate의 측정

1) **심장의 관류방법** : 기본관류액은 100% O₂로 산소화된 정상 Tyrode 용액을 사용하였고, 관류액의 온도는 37°C로 유지하였으며, 심근정지용액의 조성은 K⁺과 Ca²⁺의 농도를 실험목적에 따라 달리하여 사용하였다. 심장의 관류장치는 Langendorff retrograde perfusion model을 이용하여 관상동맥에 정상 Tyrode 용액으로 30분동안 관류하여 평형시켰고(정상기), 심근정지용액으로 30분동안 심박동을 정지시켰으며(심근정지기), 심근정지 후 정상 용액을 30분간 관류시켜 심근을 회복시켰다(회복기).

2) **Guinea pig 심실균질액의 제조** : 심실균질액은 정상기, 심근정지기 및 회복기에 심장관류가 끝난 즉시 심장을 액화질소에 넣어 동결한 후, 심방 및 주위조직을 제거하고 심실의 무게(wet weight)를 측정 한 뒤, 0.8N perchloric acid(PCA) 용액을 가하여 homogenizer(Polytron, Type PT10/35)로 균질화하고, 이 균질액을 2,000×g에서 10분간 원심분리(CRU-5000 centrifuge, Damon)하여 상층액을 얻어, 여기에 6N KOH를 가하여 균질액의 pH를 7.4로 맞추었다. 이 부유액을 다시 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액에서 ATP와 CP 양을 측정하였다. 이상의 모든 실험은 4°C이하의 온도에서 실시하였다.

3) **심실균질액의 ATP 및 CP 측정** : ATP 및 CP는 Heinz 및 Weisser(1985)의 방법으로 측정하였다. ATP를 측정하기 위하여 incubation 용액 3 ml (triethanolamine-hydrochloride 94.5; MgCl₂ 23.6; nicotinamide adenine diphosphate 0.6; D-glucose 118.2 μmole 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase 3; hexokinase 2 unit; pH 7.5)에 심실추출액

0.1 ml을 가하여 잘 혼합하여 상온에서 5분간 반응시킨 후 fluorescence 값을 측정하였다(Model LS-5, Perkin-Elmer). 그 후 CP를 측정하기 위하여 0.51 μmole 의 adenosine diphosphate를 첨가하여 fluorescence의 값(F1)을 측정하고 여기에 80 unit creatine kinase를 첨가하여 5분간 반응시킨 후, 다시 fluorescence 값(F2)을 측정하여 F2에서 F1을 감한 값으로부터 CP의 양을 계산하였다. 심실조직내의 ATP 및 CP 양은 $\mu\text{mole/g wet wt}$ 로 나타내었다.

실 험 결 과

1. 세포막전압

Guinea pig의 우심실 유두근을 1시간 동안 1 cps의 자극빈도로 자극하여 평형상태에 이르게 한 뒤 K⁺과 Ca²⁺ 농도를 달리한 심근정지용액으로 관류시켜 심근정지상태에서 일정시간동안 탈분극되는 정도를 관찰하고, 다시 정상 Tyrode 용액으로 관류시켜 정상기, 심근정지기 및 회복기에서 측정 한 심근세포의 활동전압과 안정막 전압은 Fig. 1, Table 1 및 Table 2에 나타난 바와 같다.

Fig. 1은 15 mM K⁺, 1.8 mM Ca²⁺을 포함한 심근정지용액을 관류하였을 때의 결과를 나타낸 것인데 심근정지기 동안에 안정막전압은 32.8±0.9 mV 만큼 탈분극되었으며, 정상 Tyrode 용액으로 30분동안 회복시켰을 때 안정막 전압은 거의 심근정지전의 막전압으로 회복되었다. 심근정지시 탈분극된 상태에서 세포내에 발생된 변화를 관찰하기 위하여 15 mM K⁺, 1.8 mM Ca²⁺의 심근정지용액으로 관류한 후 처음 나타나는 활동전압의 모양(Fig. 2A)을 보면 안정막전압은 탈분극이 되어 있었으나, upstroke의 최고치(peak)는 심근정지전 활동전압의 최고치와 별 차이가 없었고, 활동전압의 폭은 현저히 증가되어 있었다(Fig. 2, Table 3).

15 mM K⁺의 심근정지용액에서 Ca²⁺의 농도를 달리하였을 때 활동전압의 변화를 보면 1.0 mM Ca²⁺의 심근정지용액에서는 36.0±1.9 mV 만큼 탈분극되었으며, 회복시에 나타나는 첫 활동전압의 크기, 모양 그리고 회복시킨 후 30분때의 막전압이 1.8 mM Ca²⁺인 심근정지용액에 비하여 별 차이가 없었다(Table 1, 2 & 3). Ca²⁺의 농도를 0.1 mM로 감소시

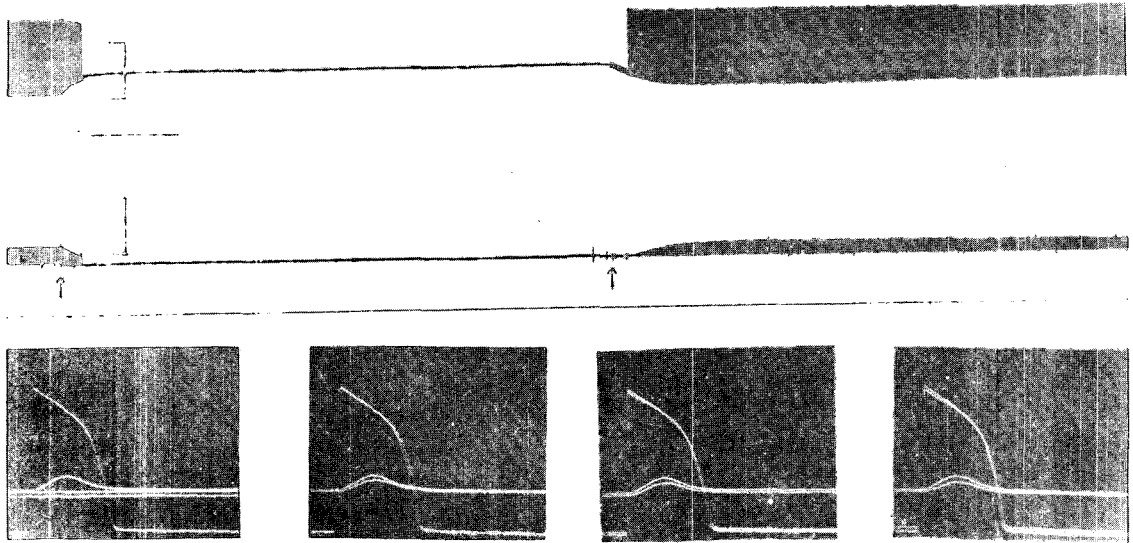


Fig. 1. Effects of high K^+ cardioplegic solution on action potential and contractility. Heart tissue was stimulated at 1.0 cps. When the tissue was perfused with 15 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{2+} cardioplegic solution (first arrow), resting membrane potential was depolarized and tissue stopped the beating. When the tissue was reperfused with normal Tyrode solution (second arrow), the resting membrane potential was repolarized and the beating was reappeared. The sequence of polaroid pictures is as follows; precardioplegia (control), postcardioplegia (recovery) of 10 minutes, 20 minutes and 30 minutes with normal Tyrode solution. Horizontal scale = 5 minutes. Vertical scale = 100 mV for E_m (upper trace); 50 mg for tension (lower trace).

Table 1. Effects of high K^+ cardioplegic solution on membrane potentials during the cardioplegia

Ca^{2+} (mM)	15K		25K	
	O_2	N_2	O_2	N_2
1.8	$32.8 \pm 0.9^*$	31.8 ± 0.4	43.9 ± 1.0	43.0 ± 1.0
1.0	36.0 ± 1.9	—	—	—
0.1	$36.6 \pm 0.5^{**}$	—	44.3 ± 0.3	—

*: Mean \pm SEM

** : $p < 0.05$ (Statistically significant compared to cardioplegic solution containing 15 mM K^+ and 1.8 mM Ca^{2+})

Numbers represent the magnitudes of membrane depolarization in mV induced with the cardioplegic solutions, bubbled with 100% O_2 or N_2 , containing various concentrations of K^+ and Ca^{2+} .

Table 2. Changes in resting membrane potentials after the cardioplegia

Ca^{2+} (mM)	15 K		25 K	
	O_2	N_2	O_2	N_2
1.8	$-0.15 \pm 0.49^*$	-0.83 ± 2.79	0.33 ± 0.50	-1.67 ± 0.88
1.0	0.70 ± 1.77	—	—	—
0.1	1.40 ± 0.75	—	2.67 ± 1.76	—

*: Mean \pm SEM

Resting membrane potentials, after the cardiac tissues were perfused for 30 minutes with the normal Tyrode solution, were measured and compared with those of the precardioplegia. The values in mV are the differences in resting membrane potential before and after the cardioplegia, and (—) sign represents hyperpolarization compared to the resting membrane potential before the cardioplegia.

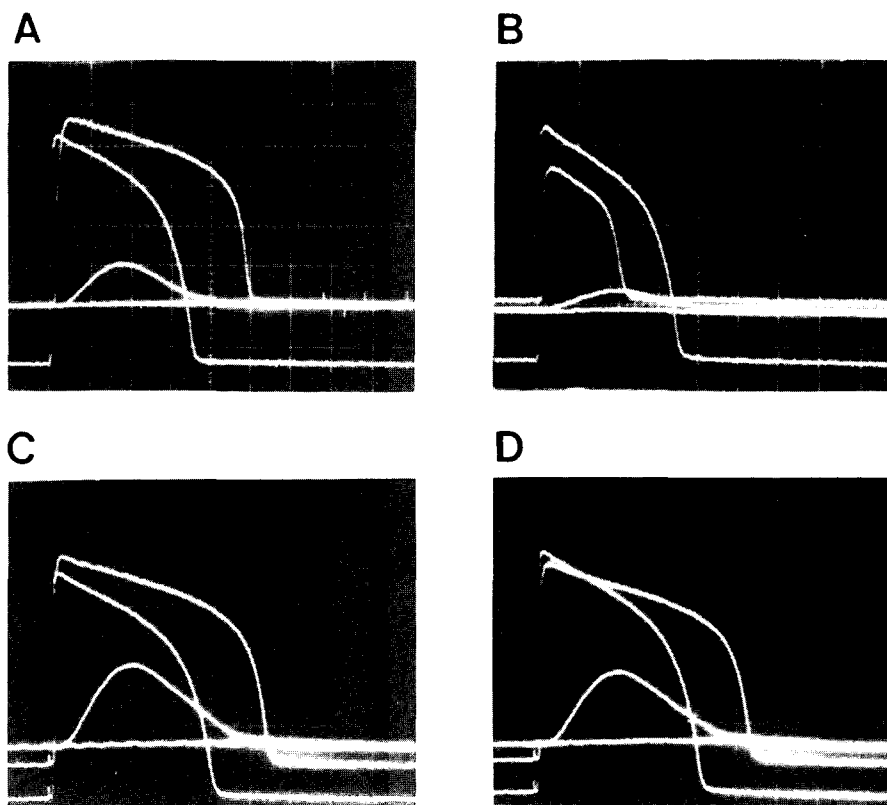


Fig. 2. Changes in action potential configurations of the first beat after cardioplegia. Action potentials of the first beats after the tissue was perfused for 30 minutes with cardioplegic solutions containing various concentrations of K⁺ and Ca²⁺ listed as follows. A, 15 K⁺, 1.8 Ca²⁺; B, 15 K⁺, 0.1 Ca²⁺; C, 25 K⁺, 1.8 Ca²⁺; D, 25 K⁺, 0.1 Ca²⁺. Horizontal scale = 100 msec/div. Vertical scale = 20 mV/div.

Table 3. Changes in overshoot potentials of the first beat after the cardioplegia.

Ca ²⁺ (mM)	15K						25K					
	AP ₁ (mV)	O ₂ AP _{ss} (mV)	%	AP ₁ (mV)	N ₂ AP _{ss} (mV)	%	AP ₁ (mV)	O ₂ AP _{ss} (mV)	%	AP ₁ (mV)	N ₂ AP _{ss} (mV)	%
1.8	33.3* ±1.6	31.3 ±1.7	110 ±6.2	30.5 ±2.9	30.3 ±2.9	101 ±2.8	33.6 ±1.7	33.1 ±1.8	102.6 ±3.8	36.9 ±1.1	34.1 ±1.0	108 ±0.6
1.0	29.9 ±2.6	30.8 ±2.3	97 ±5.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.1	17.6 ±1.8	31.0 ±0.9	57** ±5.6	—	—	—	21.7 ±4.4	25.3 ±4.8	88 ±9.0	—	—	—

*: Mean ± SEM

** : p < 0.05 (statistically significant compared to the values of cardioplegic solutions containing 15 mM K⁺, 1.8 mM Ca²⁺)

AP₁ represents the overshoot of the first action potential after cardioplegia. AP_{ss} represents the overshoot of the steady-state action potential before cardioplegia.

킨 심근정지용액에서도 36.6 ± 0.5 mV의 탈분극을 유발시켰으며 이는 1.8 mM Ca^{2+} 인 심근정지용액에 비해 의의있게 증가하였으며 (Table 1), 심근정지 후 회복시 나타나는 첫 활동전압의 크기, 폭 및 최고치가 모두 1.8 mM Ca^{2+} 인 심근정지용액으로 관류시켰을 때보다 의의있게 감소하였다 (Fig. 2B, Table 3).

심근정지용액의 K^+ 농도를 달리하였을 때, 즉 25 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{2+} 을 포함한 심근정지용액에서는 43.9 ± 1.0 mV 크기의 탈분극을 유발시켰고 (Table 1), 회복시 나타나는 첫 활동전압의 모양은 15 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{2+} 의 심근정지용액으로 관류시킨 후와 거의 유사하였다 (Fig. 2C, Table 3).

25 mM K^+ , 0.1 mM Ca^{2+} 의 심근정지용액으로 관류시는 44.3 ± 0.3 mV의 탈분극을 유발시켰고 (Table 1), 회복시 나타나는 첫 활동전압의 모양은 Fig. 2D에 나타낸 것과 같이 25 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{2+} 일 때와 비교해서 큰 차이는 없었다.

Ischemia 상태를 유도하기 위해서 심근정지용액에 N_2 를 공급하였을 때, 15 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{2+} 의 심근정지용액은 31.8 ± 0.4 mV의 탈분극을 유발시켰으며, 25 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{2+} 의 심근정지용액에서는 43.0 ± 1.0 mV 만큼 탈분극되었다. 또한 탈분극되

는 정도는 O_2 를 공급했을 때와 O_2 를 제거 (N_2 공급)했을 때를 비교해 볼 때 별 차이가 없었다 (Table 1).

2. 세포내 Ca^{2+} 활성도의 변화

안정상태 (resting state)에서 측정된 유두근의 세포내 Ca^{2+} 활성도는 6내지 359 nM 사이이었으며, 그 평균값은 185 ± 34 nM ($n=14$)이었다. Fig. 3은 안정상태의 심근을 고농도 K^+ (25 mM)의 심근정지용액으로 관류시키고 다시 정상 Tyrode 용액으로 관류시켰을 때 세포내 Ca^{2+} 활성도의 변화를 측정하는 것이다. 정상 Tyrode 용액에서의 세포내 Ca^{2+} 활성도는 122.7 nM이었는데, 25 mM K^+ , 1.8 mM Ca^{2+} 의 심근정지용액으로 관류시 세포내 Ca^{2+} 활성도는 3.2 nM로 pCa 1.6 unit 만큼 감소하였다. 이것을 정상 Tyrode 용액으로 다시 관류시켰을 때, 회복기 1분에는 180 nM로 정상기에 비해 pCa 0.17 unit 만큼 증가하고, 회복기 5분에는 122.7 nM로 정상기만큼 다시 감소하였고, 회복기 10분에는 32 nM로 정상기에 비해 pCa 0.58 unit 감소되었다.

심근정지용액의 Ca^{2+} 농도가 세포내 Ca^{2+} 활성도에 미치는 영향을 보기 위해 심근정지용액의 Ca^{2+} 을 0.1 mM로 낮추어 비교관찰한 결과 25 mM K^+ ,

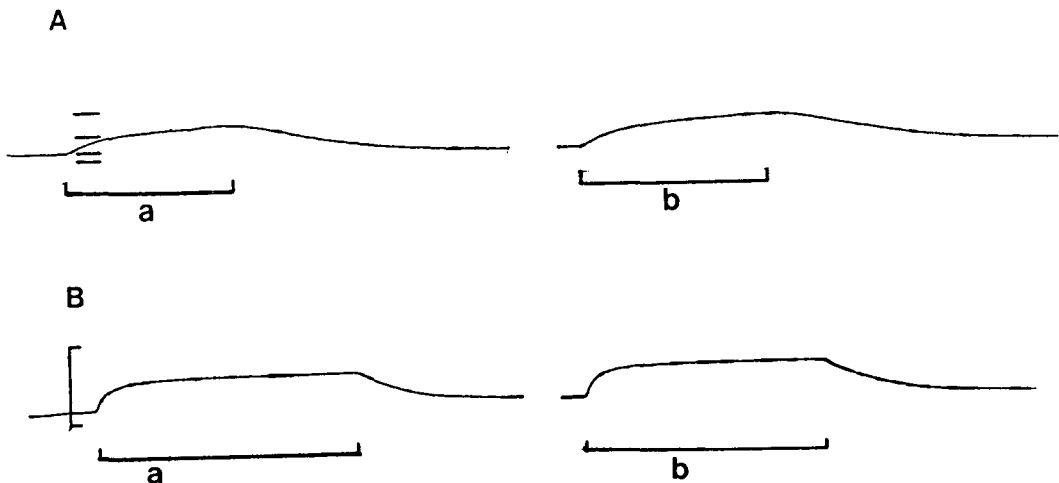


Fig. 3. Changes of intracellular Ca^{2+} activities during cardioplegia and recovery in resting state. Horizontal bars represents when the tissue was perfused with the cardioplegic solutions containing (a) 25 mM K^+ and 1.8 mM Ca^{2+} (b) 25 mM K^+ and 0.1 mM Ca^{2+} . A, e.m.f. from Ca^{2+} -selective electrode. B, Transmembrane potential (E_m). Vertical scale of upper trace was converted to pCa = 5, 6, 7 and 8 from the top to the bottom. Vertical scale = 100 mV for lower trace.

0.1 mM Ca²⁺의 심근정지용액을 관류하였을때 정상기의 값 122.7 nM에서 1.8 nM로 pCa 1.83 unit 만큼 감소하였다. 회복기 1분대에는 327.5 nM로서 pCa 0.43 unit 만큼 증가하였고, 회복기 5분대에는 320 nM로, 회복기 10분대에는 32 nM로 pCa 0.58 unit 만큼 감소하였다.

이상의 실험결과를 종합해보면 고농도 K⁺의 심근정지용액을 관류시에는 심근세포내 Ca²⁺ 활성도는 정상 Tyrode 용액으로 관류하였을 때에 비해 점점 감소하다가 정상 Tyrode 용액으로 다시 회복시킬 때,

Ca²⁺의 세포내 유입이 증가했다가 점점 감소하는 것을 알 수 있다. 심근정지용액의 Ca²⁺ 농도를 0.1 mM 로 낮추어 관류시켰을 때 심근정지동안의 세포내 Ca²⁺ 활성도의 감소 정도는 1.8 mM Ca²⁺의 심근정지용액 관류시와 유사하였지만 회복초기의 Ca²⁺ 유입은 1.47×10^{-7} M 만큼 더 증가하였다(Fig. 3에서 나타낸 기록외에도 본 실험중 심근정지용액 관류 후 정상 Tyrode 용액으로 회복시켰을 때 유두근에 삽입한 CSE가 빈번히 빠져, Eca 측정이 계속되지 못하였는데, 이는 회복시 세포내에 Ca²⁺이 갑자기 증가

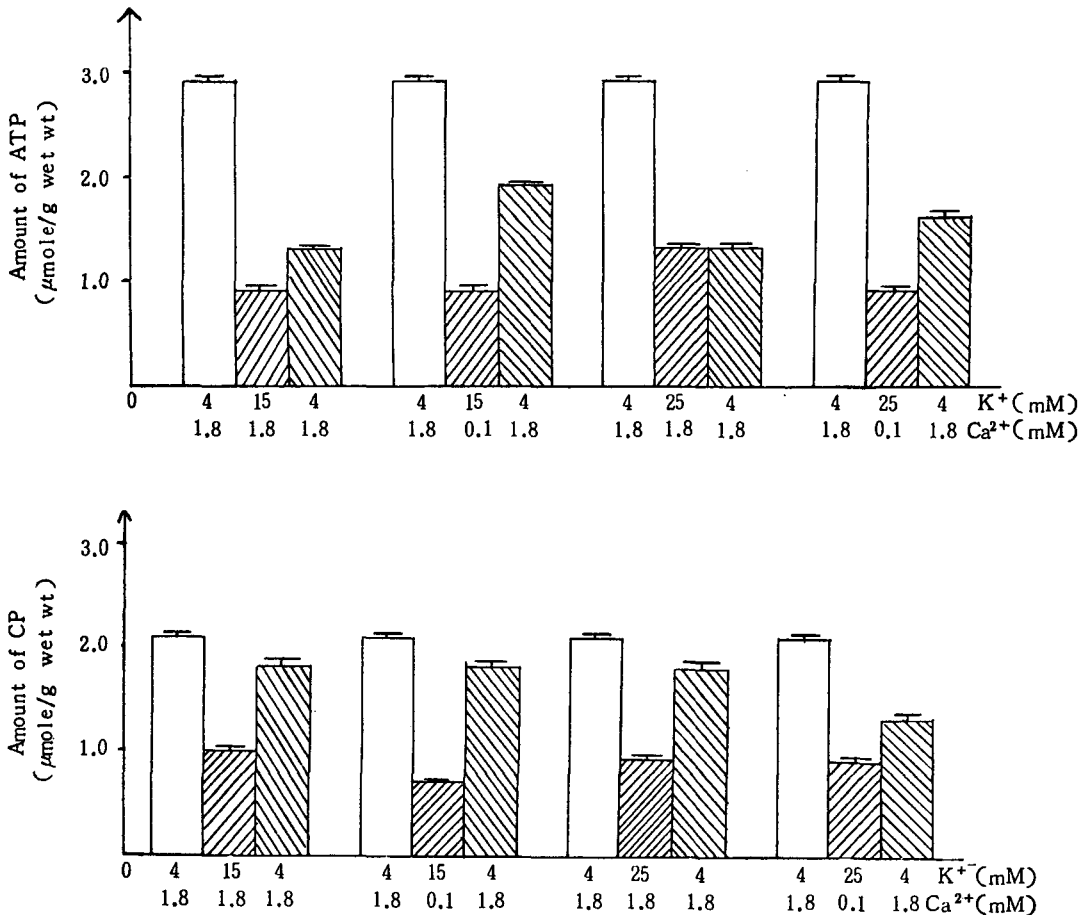


Fig. 4. Effect of various cardioplegic solutions on the amount of ATP and CP of guinea pig heart. Guinea pig hearts were perfused with cardioplegic solutions of various K⁺ and Ca²⁺ concentration for 30 minutes and reperfused with normal Tyrode solution. After a series of perfusion, whole heart tissue was quickly frozen under liquid nitrogen. ATP and CP of ventricular tissue were measured fluorometrically (see the Methods for details). The sequence of pictures is as follows; control (□), cardioplegia (▨) and recovery after a cardioplegia (▧). All values are mean ± SEM of 3 to 6 experiments.

하여 contracture를 유발하였기 때문이라고 생각된다).

3. 세포내 ATP 및 CP 양

심근정지용액의 K⁺ 및 Ca²⁺의 농도가 심근 세포내의 ATP 및 CP 양에 미치는 영향을 관찰한 결과 정상기, 심근정지기 및 회복기에서의 ATP와 CP 양은 Fig. 4에 나타낸 바와 같다. 정상기의 심근세포내 ATP 양은 2.9±0.5 μmole/g wet wt이고, CP 양은 2.1±0.4 μmole/g wet wt이었으며, 심근정지기의 ATP 및 CP 양은 심근정지용액의 K⁺과 Ca²⁺ 농도에 관계없이 정상기때의 값보다 의의있게 감소하였으며 회복기에는 다시 증가되었다.

15 mM K⁺, 0.1 mM Ca²⁺의 심근정지용액은 심근의 ATP 및 CP 양을 0.9±0.2 μmole ATP/g wet wt와 0.7±0.1 μmole CP/g wet wt로 감소시켰으며, 회복기의 ATP 및 CP 양은 각각 1.9±0.3 μmole/g wet wt와 1.8±0.4 μmole/g wet wt로 심근정지기에 비하여 의의있게 증가시켰다. 15 mM K⁺, 1.8 mM Ca²⁺을 포함한 심근정지용액은 0.9±0.1 μmole ATP/g wet wt 및 1.0±0.2 μmole CP/g wet wt로 감소시켰으며, 회복기에는 각각 1.3±0.3 μmole ATP/g wet wt와 1.8±0.6 μmole CP/g wet wt로, 15 mM K⁺, 0.1 mM Ca²⁺이 포함된 심근정지용액으로부터의 회복시보다 의의있게 감소되어 있었다.

25 mM K⁺, 1.8 mM Ca²⁺의 심근정지용액은 심근세포내의 ATP 및 CP의 양을 각각 0.9±0.2 μmole ATP/g wet wt와 0.9±0.3 μmole CP/g wet wt로 감소시켰으며, 회복기에는 1.6±0.6 μmole ATP/g wet wt, 1.3±0.5 μmole CP/g wet wt로 증가되었다. 25 mM K⁺, 1.8 mM Ca²⁺의 심근정지용액은 ATP와 CP 양을 각각 1.3±0.2 μmole ATP/g wet wt, 0.9±0.2 μmole CP/g wet wt로 감소시켰으며 회복기에는 각각 1.3±0.3 μmole ATP/g wet wt와 1.8±0.4 μmole CP/g wet wt로 증가되었다.

고 찰

수술전 심근의 기능이 크게 저하되어 있는 환자에게 개심술을 시행하거나, 수술시 대동맥 혈류차단 시간을 90분 이상 연장할 때는 수술후에 심근의 기능

은 더욱 저하되어 심장으로의 혈류공급 감소로 심근의 ischemic contracture가 온다는 것이 보고되었다 (Ebert, 1978; Levitsky, 1986). 심근이 산소 결핍증에 빠지게 되면 세포내 Ca²⁺ 양을 조절하는 기능 즉 Ca²⁺ pump나 Na⁺-Ca²⁺ 교환 이동기전의 장애로 세포내에 Ca²⁺이 축적될 수 있다(Katz & Reuter, 1979; Mullins, 1981). 세포내에 Ca²⁺이 축적되면 actomyosin ATPase 효소가 활성화되고 이는 ATP의 과도한 가수분해를 일으켜 thick filament와 thin filament의 결합이 증가되어 비가역적인 심근강직을 일으킬 수 있다(Hearse et al., 1977; Reimer & Jennings, 1986). 또한 심근정지후 관상동맥혈류가 재개되면, 세포내의 Ca²⁺이 더욱 축적될 수 있고 ATP의 재합성에 필요한 유리상태의 adenosine nucleotide들이 세포외부로 빠져 나가게 되어 세포내 ATP 양의 회복이 늦어진다고 한다(Vary et al., 1979; Berne, 1983). 이와 같은 반응은 특히 reperfusion injury에서 볼 수 있는 기능적 및 형태학적인 변화를 일으키는 기전으로 설명되고 있다(Singal et al., 1986; Sunnergren & Rovetto, 1987). 그러므로 이와 같은 심근세포의 손상을 막기 위하여 심근세포 막전압을 탈분극시켜 심근의 활동을 줄이거나, 기계적으로 심근활동을 정지시키고, 심근의 온도를 낮추어서 에너지 요구를 줄이거나, 혹은 anaerobic substrate가 될 수 있는 물질들을 심근세포에 공급해 주기도 한다(McGoon, 1985).

고농도의 K⁺을 함유한 심근정지용액으로 심근세포를 탈분극시켰을 때는 심근세포들을 전기적 및 기계적인 정지상태에 머무르게 할 수는 있으나, Na⁺ pump와 Na⁺-Ca²⁺ 교환이동기전에 의해 Na⁺과 Ca²⁺의 세포내 유입을 유발할 가능성이 있다는 것이 보고되었다(Katz & Reuter, 1979; Mullins, 1981; Kimura et al., 1986; Mechmann & Pott, 1986). 그러므로 심근정지용액의 K⁺의 가장 적절한 농도가 어느 정도인지에 대하여는 학자들간에 의견이 일치되어 있지 않은 실정이다(Tucker et al., 1979).

위에서 기술한 바와 같이 심근정지용액의 K⁺ 농도와 Ca²⁺ 농도는 심근정지시 심근세포내의 Ca²⁺ 활성도에 영향을 미칠 수 있는 인자들이므로 본 실험에서는 심근정지용액의 Ca²⁺ 농도와 K⁺ 농도가 심근정지와 그 회복과정에서의 전기생리학적 변수에

미치는 영향을 조사하였는데, 심근정지중의 세포막 전압, 탈분극크기와 심박동회복시 처음 나타나는 활동전압의 모양은 심근정지용액의 Ca^{2+} 농도가 0.1 mM로 아주 낮을 때에만 유의있게 변화하였다 (Table 1, 2, 3, Fig. 2). 또한 0.1 mM Ca^{2+} , 15 mM K^+ 용액으로 심근정지후 회복기의 첫 활동전압의 모양 (Fig. 2B)은 Ca^{2+} 농도가 정상일 때와 K^+ 농도가 25 mM 일 때 (Fig. 2D)에 비해 그 크기와 기간이 유의있게 감소하였다. 이는 후술하는 바와 같이 심근정지동안 세포내 Na^+ 농도의 변화에 의해 생긴 Na^+ 전류의 감소에 의한 것으로 생각되며, 이는 세포내 Ca^{2+} 활성도와 연관되어 있는 것으로 추측된다.

이와 같은 심근정지용액의 Ca^{2+} 농도에 의한 세포막전압 및 활동전압의 변화는 Ca^{2+} 농도가 심근정지와 그 회복과정에 큰 영향을 미친다는 것을 제시하며 심근정지동안과 회복시의 세포내 Ca^{2+} 활성도의 변화가 이를 뒷받침하고 있다. 심근정지용액의 Ca^{2+} 농도를 1.8 mM 과 0.1 mM 로 달리하여 (K^+ 농도는 25 mM) 관류하였을때, 심근정지동안은 두 용액 모두 세포내 Ca^{2+} 활성도를 유의있게 감소시켰으나 두 용액간에 큰 차이는 없었다 (Fig. 3). 그러나 정상 Tyrode 용액으로 관류하였을 때, 회복초기에는 두 용액 모두에서 세포내 Ca^{2+} 활성도가 유의있게 증가하였으며, 특히 0.1 mM Ca^{2+} 의 심근정지용액으로 심근정지시킨 후 1.8 mM Ca^{2+} 농도의 정상용액으로 회복시켰을 때 세포내 Ca^{2+} 활성도가 더욱 증가하였다. 이 결과로서 고농도 K^+ 의 심근정지용액으로 일정기간 관류하였을 때 관류동안의 세포내 Ca^{2+} 의 농도는 감소하며, 회복초기에는 Ca^{2+} 의 유입이 증가하는데, 낮은 Ca^{2+} (0.1 mM)의 심근정지용액으로 관류시킨 후에 Ca^{2+} 의 유입이 더 큰 것을 알 수 있었다. 이는 심근정지중에 올 수 있는 심근경직 (Katz & Reuter, 1979)과는 상반되는 결과로 보이나, 이는 아마도 Langendorff 관류모형과는 달리 분리된 심실 유두근을 심근정지용액으로 계속 관류시킨 결과일 것으로 생각된다.

세포내의 Ca^{2+} 활성도는 세포막을 통한 Ca^{2+} 의 이동과 세포내 저장소인 SR에 저장된 Ca^{2+} 양에 의해 결정되며, 심근정지동안 탈분극이 지속되는 상태에서는 SR내에 저장된 Ca^{2+} 양이 아주 적어지므로 Ca^{2+} 공급에는 큰 영향을 미치지 않는다고 한다

(Allen et al., 1976; Winegrad, 1979; Sulakhe & St. Louis, 1980; Bridge, 1986). 세포막을 통한 Ca^{2+} 의 이동은 탈분극이 지속되는 동안에는 Ca^{2+} channel이 불활성화되므로, 주로 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동기전에 의해 결정된다고 한다 (Noble, 1979; Mullins, 1981; Kimura et al., 1986; Mechmann & Pott, 1986). 심근정지동안 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동에 의해 Na^+ 이 세포내로 유입되며, Ca^{2+} 은 세포밖으로 유출되어 세포내 Ca^{2+} 활성도는 감소하게 된다. 또한 심근정지동안 세포내 Na^+ 농도가 증가하게 되어 Na^+ - H^+ 교환기전에 의해 세포내가 산성화될 수 있다는 보고도 있다 (Ellis & Noireaud, 1987). 이런 심근정지중에 일어난 세포내 Na^+ 농도의 증가는 심근을 정상용액으로 관류회복시켰을 때, Na^+ - Ca^{2+} 교환이동에 의한 Ca^{2+} 의 유입을 초래하게 되고 또 Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+} 유입량도 증가시켜 세포내의 Ca^{2+} 활성도가 증가하게 되어 세포를 손상시킬 수 있다고 한다 (Singal et al., 1986; Sunnergren & Rovetto, 1987). 이와 같은 Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+} 유입증가는 심근정지동안 세포막의 Ca^{2+} channel 자체에 변화가 있거나 혹은 심근회복시 세포막의 Ca^{2+} 농도차에 의한 Ca^{2+} 전류의 원동력이 증가하여 일어날 수 있다고 볼 수 있다 (Hille, 1984). 그러나 본 연구에서는 세포막의 이온전류는 직접 측정하지 않았으므로 이들을 정확히 알 수는 없다.

심근세포막의 탈분극을 일으키는 심근정지용액의 K^+ 농도는 Na^+ pump와 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동에 영향을 주므로 (Eisner, 1986; Sheu & Blaustein, 1986), 고농도의 K^+ 에 의해 탈분극이 지속되면 Na^+ pump와 Na^+ - Ca^{2+} 교환이동이 Na^+ 을 세포밖으로 유출시키는 방향으로 작용하게 되고 세포내 Ca^{2+} 활성도는 증가하게 된다. 본 실험에 사용된 0.1 mM Ca^{2+} 의 심근정지용액은 1.8 mM Ca^{2+} 의 심근정지용액에 비해 세포내 Na^+ 농도를 증가시킬 수 있으며, 25 mM K^+ 심근정지용액은 15 mM K^+ 용액에 비해 세포내 Na^+ 농도를 감소시킬 것으로 생각된다. 이런 현상은 심근정지 후의 첫 활동전압의 모양을 이해하는데 도움이 된다 (Fig. 2B). 즉 15 mM K^+ , 0.1 mM Ca^{2+} 의 정지용액은 첫 활동전압의 크기와 기간을 크게 감소시켰는데, 이는 세포내 Na^+ 농도의 증가로 인한 Na^+ 전류의 감소때문일 수 있다고 본다. 그러나 25 mM

K⁺은 세포내 Na⁺ 농도를 감소시키므로 15 mM K⁺, 0.1 mM Ca²⁺의 정지용액에서와는 달리 활동전압의 크기와 기간이 15 mM K⁺, 1.8 mM Ca²⁺일 때와 유사하였다 (Fig. 2D).

심근정지시에는 산소공급의 차단으로 인해 mitochondria의 oxidative phosphorylation이 감소되고, anaerobic glycolysis에 의한 ATP 생성은 증가된다 (Opie, 1984). 또한 세포내 Ca²⁺ 양이 증가되면 ATP 생산이 감소하고 심근의 경직유발등으로 심근세포의 기능을 소실케 하여 심근세포의 손상을 초래한다고 한다 (Opie, 1984; Reimer & Jennings, 1986). 심근정지후 회복기에는 ATP가 회복되는데 요하는 시간이 CP가 회복되는데 요하는 시간이 비하여 훨씬 길다고 한다 (Renlund et al., 1984). 본 실험에서도 심근정지후 회복기의 세포내 ATP 양은 정상기의 50% 정도로 회복되었으나 CP 양은 약 70% 까지 회복되어 ATP가 CP 보다 늦게 회복되었다. ATP 양의 회복이 늦은 것은 심근정지기의 세포내 ATP 양이 정상 활동시의 값보다 많이 떨어져 (대개 정상 값의 20내지 50%) 완전한 회복이 불가능한 경우 (Irreversible ischemia)에 해당되고 (Opie, 1984), 동시에 ATP 자체가 근수축시의 직접적인 에너지원으로 이용되므로 회복시 ATP가 생성되는 속도보다 근수축에 이용되는 속도가 더 빠를 수 있기 때문이라고 생각된다. 실제로 15 mM K⁺, 0.1 mM Ca²⁺의 심근정지용액으로 심근정지를 시킨후 회복기의 세포내 ATP 양이 가장 많았는데 이는 심근정지 후 세포내로의 Ca²⁺ 유입의 증가가 다른 용액에서보다 많은 것으로 미루어 보아 (Fig. 3) 심근세포의 손상으로 인해 심근 수축력이 저하되었기 때문일 수 있을 것으로 생각된다. 즉 회복기의 ATP 생성량은 큰 차이가 없으나 회복기의 수축력 저하로 ATP 사용량이 감소되어 그 절대량이 높게 유지될 수 있을 것으로 생각된다 (Swain & Holmes, 1986). 또한 본 실험에서는 심근정지 후 30분간 회복시켰을 때의 ATP 및 CP양만을 측정하였는데, ATP 양이 회복되는데 요하는 시간은 몇일이 필요하다고 하므로 (Swain & Holmes, 1986), ATP 양이 CP에 비해 회복이 늦은 이유가 짧은 회복기간에서의 ATP를 측정한 결과로 올 수 있다는 것을 배제할 수 없다고 본다. 그러므로 심근정지 후 에너지원인 ATP 양과 심근의 회복과정과의 관

계는 적출된 심장을 이용한 본 실험과는 달리 실험 동물 (whole heart in vivo)을 이용하여 (Kloner et al., 1983; Jennings & Morgan, 1986) ATP 양이 충분히 회복될 때까지 지속적으로 측정 조사하여야 할 것으로 생각된다.

결 론

심근정지용액의 조성이 심근정지후 심근세포의 회복과정에 미치는 영향을 조사하기 위해 guinea pig 유두근의 막전압, 세포내 Ca²⁺ 활성도, ATP 및 CP 양의 변화를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 저농도 Ca²⁺의 심근정지용액이 심근정지동안의 막전압 및 회복시 처음 나타나는 활동전압의 모양을 크게 변화시켰다.

2) 세포내 Ca²⁺ 활성도는 심근정지동안 현저히 감소했다가 정상 Tyrode 용액으로 회복시 다시 증가했으며, 특히 회복 초기의 Ca²⁺ 유입의 증가가 두드러지게 나타나는데, 1.8 mM Ca²⁺의 심근정지용액에서보다 0.1 mM Ca²⁺의 심근정지용액에서 더 큰 증가를 보였다.

3) ATP 및 CP 양은 심근정지동안은 감소하고 회복기에는 다시 증가하였으며, 심근정지후 정상 용액으로 30분간 회복시켰을 때에는 ATP 양의 회복이 CP에 비해 느린 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 심근정지용액의 Ca²⁺ 농도는 심근정지동안보다는 정지후 회복과정에서의 심근세포에서의 전기생리학적 변화에 더 큰 영향을 미친다고 생각되며, 이 연구 결과를 토대로 심근세포내 Na⁺과 H⁺ 활성도의 변화를 측정하고, 더 나아가 심근세포의 산증 (acidosis)에 대한 연구를 첨가하면, 심근정지시의 심근보호기전을 규명하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

REFERENCES

Allen DG, Jewell BR & Wood EH (1976). Studies of the contractility of mammalian myocardium at low rates of stimulation. *J Physiol* 254, 1-17
Baldermann SC, Chan AK & Gage AA (1984). Verapamil cardioplegia: Improved myocardial prevention during global ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg*

- 88, 57-66
- Berne RM (1983). Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol* 204, 317-322
- Bourdillan PD & Poole-Wilson PA (1982). The effects of verapamil, quiescence, and cardioplegia on calcium exchange and mechanical function in ischemic rabbit myocardium. *Circulation Res* 50, 360-368
- Bridge JH (1986). Relationships between the sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal calcium transport revealed by rapidly cooling rabbit ventricular muscle. *J Gen Physiol* 88, 437-473
- Ebert PA (1978). Aspects of myocardial protections. *Ann Thorac Surg* 26, 495-497
- Eisner DA (1986). The Na-K pump in cardiac muscle. Chapter 25 in “*The heart and the cardiovascular system*”, edited by Fozzard HA et al., Raven Press pp489-507
- Ellis D & Noireaud J (1987). Intracellular pH in sheep Purkinje fibres and ferret papillary muscles during hypoxia and recovery. *J Physiol* 383:125-141
- Gay WA & Ebert PA (1973). Functional, metabolic, and morphologic effects of potassium-induced cardioplegia. *Surgery* 74, 284-290
- Hearse DJ, Garlick PB & Humphrey SM (1977). Ischemic contracture of the myocardium: Mechanism and prevention. *Am J Cardiol* 39, 986-993
- Hearse DJ, Yamamoto F & Shattock MJ (1984). Calcium antagonists and hypothermia: the temperature dependency of the negative inotropic and anti-ischemic properties of verapamil in the isolated rat heart. *Circulation* 70(suppl I), 1-54
- Heinz F & Weisser H (1985). *Methods of enzymatic analysis*, 3rd edit., Verlag Chemie, Weinheim, and Academic Press, New York. Vol. VIII, 507-514
- Hendriks FFA, Jonas J, van der Laarse A, Huysmans HA, van Rijk-Zwikker GL & Schipperheyn JJ (1985). Cold ischemic arrest: comparison of calcium-free and calcium-containing solutions. *Ann Thorac Surg* 39, 312-317
- Hille B (1984). *Ionic channels of excitable membranes*. Sinauer Associates, Sunderland, p76-98
- Jakobsson E (1980). Interactions of cell volume, membrane potential, and membrane transport parameters. *Am J Physiol* 238, C196-C206
- Jennings RB & Morgan HE (1986). Strategy of experiment design in metabolic experiments. Chapter 7 in “*The heart and the cardiovascular system*”, edited by Fozzard HA et al., Raven Press, pp123-137
- Katz AM & Reuter H (1979). Cellular calcium and cardiac cell death. *Am J Cardiol* 44, 188-190
- Kimura J, Miyamae S & Noma A (1987). Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J Physiol* 384, 199-222
- Kimura J, Noma A & Irisawa H (1986). Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature* 319, 596-597
- Kloner RA, Ellis SG, Lange R & Braunwald E (1983). Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure, and microvascular damage. *Circulation* [Suppl. I] 68, I8-I15
- Levitsky S (1986). Myocardial protection of the hypertrophied heart. *Ann Thorac Surg* 41, 2-3
- McGoan DC (1985). The ongoing quest for ideal myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 89, 639-653
- Mechmann S & Pott L (1986). Identification of Na-Ca exchange current in single cardiac myocytes. *Nature* 319, 597-599
- Mullins LJ (1981). *Ion transport in heart*. Raven Press, New York, p20-43
- Noble D (1979). *The initiation of the heartbeat*. 2nd edit., Clarendon Press, Oxford, p53-63
- Opie LH (1984). *The Heart: Physiology, metabolism, pharmacology and therapy*. Grune & Stratton, Inc., p136-153
- Pinsky WW, Lewis RM, McMillan WJB, Hara H, Hartley CJ, Gillette PC & Entman ML (1981). Myocardial protection from ischemic arrest. Potassium and verapamil cardioplegia. *Am J Physiol* 240, H326-H335
- Reimer KA & Jennings RB (1986). Myocardial ischemia, hypoxia, and infarction. Chapter 53 in “*The heart and cardiovascular system*”, edited by Fozzard HA et al., Raven Press, pp1133-1201
- Renlund DG, Gerstenblith G, Lakatta EG, Jacobus WE, Kallamn CH & Weisfeldt ML (1984). Perfusate sodium during ischemic functional and metabolic recovery in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 16,

795-801

- Roberts AJ, Abel RM & Alonso DR (1980). Advantages of hypothermic potassium cardioplegia and superiority of continuous versus intermittent aortic cross-clamping. *J Thorac Cardiovasc Surg* 79, 44-58
- Sheu SS & Blaustein MP (1986). Sodium/calcium exchange and regulation of cell calcium and contractility in cardiac muscle, with a note about vascular smooth muscle. Chapter 26 in "*The heart and the cardiovascular system*", edited by Fozzard HA et al., Raven Press pp509-535
- Singal PK, Lee SL, Ganguly PK, Panagia V & Dhalla NS (1986). Reversibility of ultrastructural, contractile function and Ca^{2+} transport changes in guinea pig hearts after global ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 64, 1368-1375
- Suh CK, Park SR, Ahn DS & Paik KS (1987). Effects of vanadate on cellular Ca^{2+} movements in guinea pig papillary muscles. *Yonsei Med J* 28, 23-30
- Sulakhe PV & St. Louis PJ (1980). Passive and active calcium fluxes across plasma membranes. *Prog Biophys Mol Biol* 35, 135-195
- Sunnergren KP & Rovetto MJ (1987). Myocyte and endothelial injury with ischemia reperfusion in isolated rat hearts. *Am J Physiol* 252, H1211-H1217
- Swain JL & Holmes EW (1986). Nucleotide metabolism in cardiac muscle. Chapter 44 in "*The heart and the cardiovascular system*", edited by Fozzard HA et al., Raven Press, pp911-929
- Tucker WY, Ellis RJ, Mangano DT, Ryan CJM & Ebert PA (1979). Questionable importance of high potassium concentrations in cardioplegic solutions. *J Thorac Cardiovasc Surg* 77, 183-190
- Vary TC, Angelakos ET & Schaffer SW (1979). *Relationship between adenine nucleotide metabolism and irreversible ischemic tissue damage in isolated perfused rat heart*. *Circ Res* 45, 218-225
- Winegrad S (1979). Electromechanical coupling in heart muscle. In *Handbook of Physiology, the cardiovascular system*. *Am Physiol Soc* p393-428
- Yamamoto F, Braimbridge MW & Hearse DJ (1984). Calcium and cardioplegia. The optimal calcium content for the ST. Thomas' Hospital cardioplegic solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 87, 908-912