

신생돼지 심장에서 상온의 Krebs 용액 관류에 따른 좌심실 기능의 변화*

오 봉 석** · 나 국 주** · 이 동 준**

- Abstract -

Left Ventricular Function Changes Under Normothermic Krebs Perfusate in Newborn Piglet

Oh, Bong Suk, M.D., Nah, Kook Ju, M.D., Lee, Dong June, M.D.

To clarify the changes of left ventricular function under normothermia, the time interval between the onset of ischemia and the beginning of contracture of left ventricle(TIC) were recorded in newborn piglet. Myocardial performance was assessed using intraventricular balloon to determine compliance and systolic function after 5 to 10 minutes interval perfusing normothermic substrate free Krebs solution as a perfusate.

The time to onset TIC was 29.5 ± 1.7 minutes and peak ischemic contracture was 46.7 ± 4.0 minutes ($p < 0.01$).

In myocardial performance, systolic function of left ventricle(defined as cardiac contractility) was kept until 25 minutes of perfusion, but was decreased abruptly after 30 minutes of perfusion ($p < 0.0018$) and diastolic function of left ventricle(defined as diastolic compliance) was kept until 15 minutes of perfusion, but was decreased after 20 minutes of perfusion ($p = 0.0079$).

This study demonstrated maximal time of the tolerance to normothermic global ischemia and functional changes of left ventricle using Krebs perfusate under the same condition.

서 론

심장외과 영역에서 신생아의 개심술은 높은 사망률과 기술적인 면에서 복잡한 문제점이 있으며 특히 여러가지 심근 보호의 방법중 어느 방법이 가장 좋은 것 인지는 아직도 논란의 여지가 많다.

*본 논문은 대한 흉부외과 학회 제22차 추계 학술 대회에서 구연 되었음.

**전남대학교 의과대학 흉부외과학교실

**Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery,
Chonnam University Medical School
1990년 12월 29일 접수

최근 개심술의 보편화와 더불어 성인 및 소아에서의 개심술의 결과는 각 병원에서 팔목할 만한 향상을 보였으나 신생아 및 유아기에서의 성적은 여전히 높은 사망률과 치명률을 가지고 있으며 그 주요 원인을 Bull¹ 등은 수술중 부적절한 심근 보호에서 기인한다 하였다¹⁾. 이것은 신생아 및 유아기에서의 개심술을 할 때 성인에서와 같은 방법의 심근 보호법이 사용되는 데서 오는 것이며 이는 신생아 심장이 대사적 혹은 기능적으로 성인 및 소아의 심장과 같다는 가정하에서 심근 보호를 하고 있기 때문이다.

Wells²⁾의 보고에 의하면 연령에 따라서 심근의 energy 대사가 다르다고 하였다. 이는 심근 보호에 있

어서도 연령에 따른 심근 보호방법이 달라야 한다고 주장될 수 있을 것이다. 이에 저자는 ~~어떤 목적~~ 목적으로 소아 심장 수술시 심근 보호의 기초적인 자료로 사용하기 위해서 normothermia 하에서 좌심실 기능의 변화를 알기 위해 신생 돼지의 심장을 이용하여 global ischemia에 대한 반응으로 좌심실의 허혈성 수축기간(TIC : Time to ischemic contracture)을 측정하고 또한 Krebs 용액을 관류액으로 사용하여 좌심실 기능의 시간에 따른 변화를 관찰함으로써 normothermia하에서 좌심실 기능이 최대 어느 시간까지 기능유지가 가능한가를 알아 보았다.

재료 및 방법

가. 좌심실 허혈성 수축기간의 측정. (Time to ischemic contracture)

수컷 신생돼지(생후 3-4일)6두를 sodium pentobarbital (30mg/Kg)로 복강내 주입하여 마취를 유도한후 기관 절개를 하여 기관내 삽관을 한후 인공 호흡기를 부착하여 호흡을 유지시킨다.

정중 흉골 절개를 한후 심장을 뗄 수 있는데로 빨리 절제하여 37°C bath내에 substrate free krebs-Henseleit 용액(table 1)내에 담그고 심근 온도를 Shiley probe를 이용하여 심실중격에서 측정하고 compliant

balloon를 좌심실을 통해서 좌심실내에 넣어서 ballooning의 압력이 10mmHg가 되도록 polygraphy(P23D stathum transducer, honeywell AR6)에 연결후 계속적인 좌심실내 압력을 측정한다.

TIC onset(time to onset ischemic contracture)는 기준치 압력에서 2mmHg 이상 압력이 증가될 때로 하였으며 TIC peak(time to peak ischemic contracture)는 좌심실내 압력이 高平部(plateau)을 나타낼 때의 시간과 압력을 측정하였다.

나. 좌심실 기능의 측정

TIC의 측정시와 동일 방법으로 수컷 신생돼지(생후 3-5일) 6두 sodium pentobarbital(30 mg/Kg)를 복강내 주입하여 마취를 유도한후 기관절개를 하여 기관내 삽관을 한후 인공 호흡기를 부착하여 호흡을 유지시킨다.

10분후 혈액가스 분석이 정상으로 될때 정중 흉골 절개를 한후 대동맥궁 및 좌우측 경동맥까지 박리한후 심장을 절개하여 4°C Krebs-Henseleit 용액에 담근 상태에서 대동맥내로 polyvinyl tube를 삽관하여 좌심방을 통하여 compliant ballooning을 좌심실내에 놓게 만들고 난다음 isolated perfused heart circuit (Fig. 1)에 부착하여 관류시킨다.

이때 room temperature는 절제된 심장은 온도를 37°C로 유지하기 위해 30°C 이상을 유지해야 하며 pe-

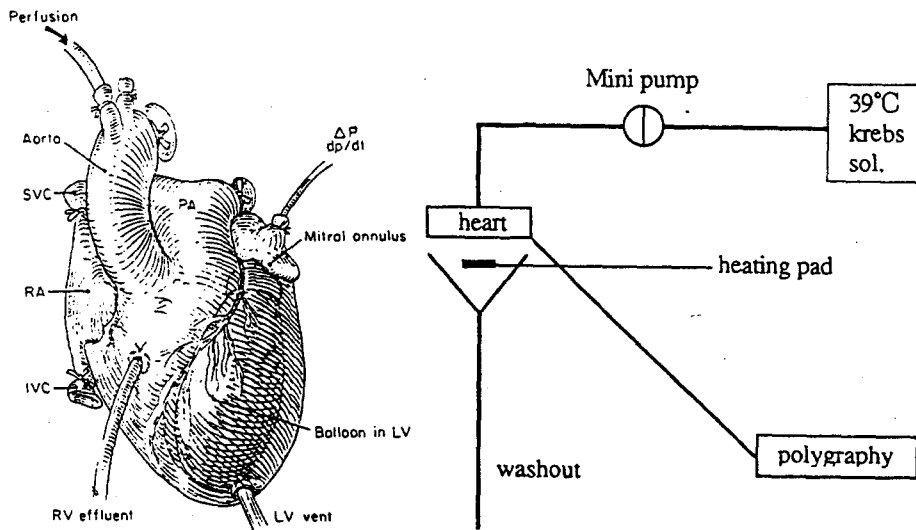


Fig. 1. Schematic illustration of perfused circuit for assessment of left ventricular function

Table 1. Ciomposition of Krebs-Henseleit solution (mM)

NaCl	120.00
KCl	5.60
CaCl ₂	2.50
MgSO ₄	1.30
NaH ₂ PO ₄	1.17
NaHCO ₃	25.00

rfusate는 39℃ Krebs-Henseleit용액을 사용 하였고 절제된 심장의 하부에 heating pad를 사용하여 mini-pump로써 recirculation 시켰고 하면 perfused 용액은 재관류하지 않았다.

좌심실 압력은 먼저 ballooning의 unstressed volume을 측정 한후 이를 넘지않는 범위내에서 ballooning 내에 microsyringe를 이용한 volume증가와 좌심실의 peak systolic pressure(수축기 압)와 이완기 압(diastolic pressure)을 polygraphy에 의해서 5분 간격으로 기록하였다.

다. 통계 처리

TIC의 onset 및 peak는 student's t-test를 이용하여 Mean±SEM을 구 하였고 onset와 peak의 비교는 paired t-test에 의해서 비교하였다.

좌심실 기능의 변화는 각각 개체에 따른 수축기압 및 이완기압과 ballooning 용적의 변화와의 관계를 Slope로 나타내었다(Table 2,3). 또한 Slope의 시간에 따른 경과 변화를 보았으며 그의 유의성은 BMPP program의 2-way ANOVA test를 이용하여 통계 처리하였다.

결 과

1. 허혈성 수축기(ischemic contracture)의 측정.

각 개체의 좌심실의 허혈성 수축을 나타내는 도표는 Fig 2와 같으며 TIC onset는 29.5±1.7분 이었고 TIC peak는 46.5±4.0min이 었으며(Fig. 3) 이때의 압력은 59±2.0mmHg에서 허혈성 수축의 최대치에 도달 하였다(Fig. 4).

Table 2. Systolic function (contractility)

Pig Time	1	2	3	4	5	6	Slope value
5		25		25	25	27	25.5
10	26						26
15		38	43	29	29	37	35.2
20	43	44					43.5
25		44	54				49.0
30		33		42	49	50	36.5

Table 3. Diastolic function (compliance)

Pig Time	1	2	3	4	5	6	Slope value
5		39		19	27	26	25.5
10	27						27.0
15		29	43	25	30	14	28.2
20	46	38					42
25		35	47				41
30		35		40	46	37	39.5

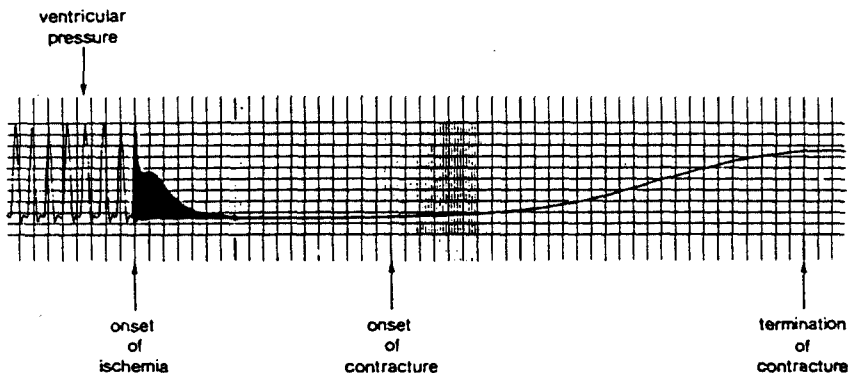


Fig. 2. Development of ischemic contracture

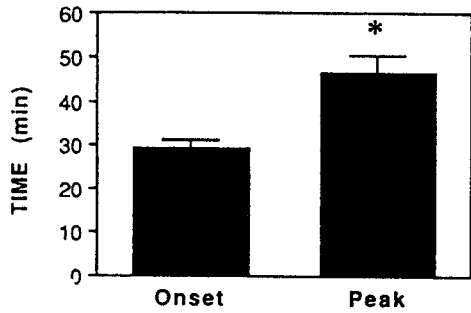


Fig. 3. Time to ischemic contracture(TIC)

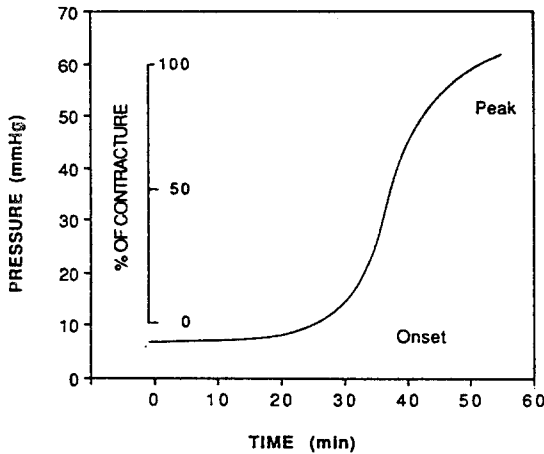


Fig. 4. Development of ischemic contracture

2. 좌심실 기능의 변화

가) 수축기압의 변화.

각 개체의 시간에 따른 좌심실 수축기압의 변화는 Table 2에 나타나 있으며 이중 개체 3에서의 시간에 따른 좌심실 수축기압의 slope의 변화는 ballooning의 volume이 증가함에 따라서 증가되었으며 잔류 5분에서 slope는 25로 최저치를 나타내고 있으나 15분, 20분에서 37, 43, 43으로 증가를 보이다가 30분에서 32로 급작스런 하강을 보이고 있다(Fig. 5).

이를 전체적으로 보면 역시 관류 5분, 10분에서 25.5, 26의 비슷한 slope를 보이며 수축기압은 15분, 20분, 25분에서 각각 35.2, 43.5, 49.0으로 급격한 상승을 보이다가 30분에서 36.5로 급격한 하강을 보이고 있다(Fig. 6) 이를 통계적 처리 결과 시간에 따른 개체의 수축기압의 변화를 $P=0.0018$ 로써 유의한 변화를 보이고 있다.

또한 시간에 따른 수축기의 slope변화를 4개의 군으로 나눌시(5-10분, 11-15분, 20-25분, 30분)의 변화는 역시 25분에서 최고의 slope를 보이고 있다(Fig. 7). 이는 normothermic perfusion하에서의 좌심실의 수축기 기능은 25분이 경과하면서 급격한 감소를 보이는 것을 의미한다.

나) 이완기압 변화.

각 개체의 시간에 따른 좌심실 이완기압의 변화는

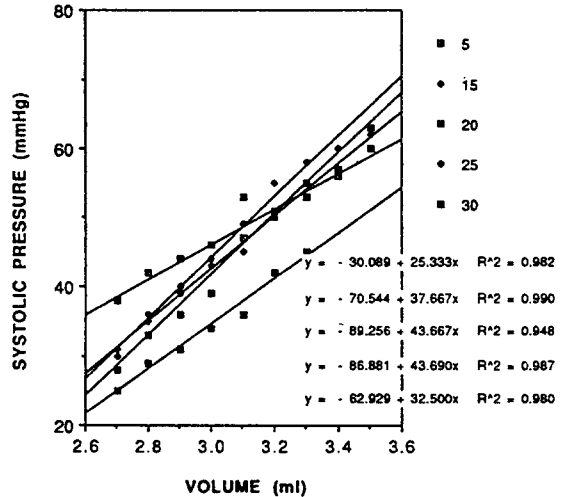
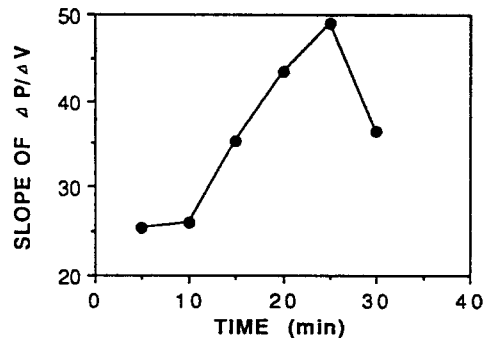


Fig. 5. Volume-pressure relationship systolic function (in Case 3)



Statistics : 2-way anova(bmdp program)

	Sum of squares	mean square	F	tail prob.
Pig	218.73099	43.74620	1.82	0.2151
Time	961.39766	320.46589	13.33	0.0018*
Error	191.26901	24.03362		

Fig. 6. Changes in LV systolic function

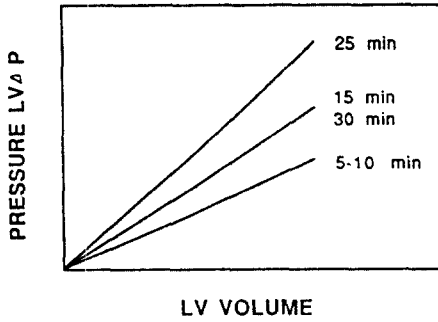
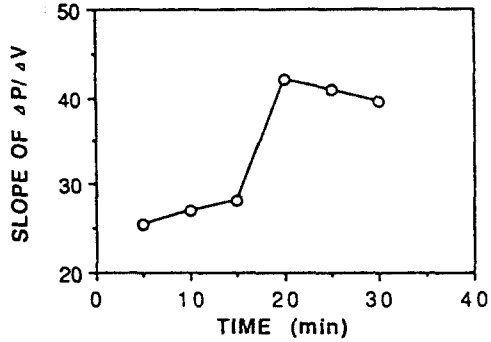


Fig. 7. LV systolic function



Statistics : 2-way anova (BMDP program)

	Sum of squares	mean square	F	tail prob.
Pig	415.58095	83.11619	2.87	0.0898
Time	717.81429	239.27143	8.25	0.0079*
Error	232.01905	29.00238		

Fig. 9. Changes in LV compliance

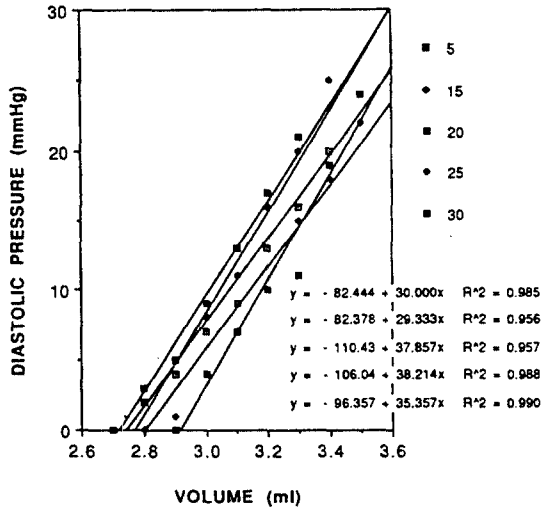


Fig. 8. Volume-pressure relationship diastolic compliance (in Case 3)

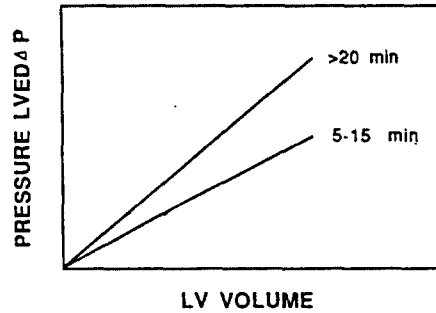


Fig. 10. LV compliance

Table 3에 나타나 있으며 이중 개체 3에서의 시간에 따른 좌심실 수축기 압의 변화는 좌심실내 ballooning의 volume을 증가시켰을 때의 이완기 압의 slope의 변화는 관류 5분에서 30, 15분에서 30, 29를 보이며 관류 20분, 25분, 30분에서 38, 38, 36으로 상승을 보이고 있다(Fig. 8).

이를 전체적으로 보면 관류 5분, 10분, 15분에서 slope의 변화를 각각 25.5, 27.0, 28.2로 비슷하나 관류 20분, 25분, 30분에서는 각각 42, 41, 39.5로 급격한 증가를 보이고 있다(Fig. 9). 이를 통계적 처리 결과 시간에 따른 개체의 이완기 압의 변화는 $P=0.0079$ 로써 유의한 변화를 보이고 있다. 또한 시간에 따른 수축기의 slope변화를 20분 전후로 나누어 보면 5-15분 치에 비해 20분 이후에서 급격한 상승을 보이고 있다(Fig. 10). 이는 normothermic perfusion하에 좌심실

의 이완기 기능은 관류 20분을 지나면서 급속한 감소를 보이고 있다.

고 찰

허혈성 심근수축(TIC : Time to ischemic contraction) 시간은 심근내의 high energy phosphate의 결핍과 관계가 있으며 이는 허혈성 심근손상의 정도의 중요한 지침이 되는 것은 잘알려져 있다³⁾. 이것은 또한 심근의 myofibril내 energy 저장 및 특이한 ATP가 허혈 상태에서 감소되어 있는 것을 추측할 수 있으며⁴⁾ 결국 허혈하에서 감소된 ATP양은 myosin-actin "Rigor complex"의 숫자를 증가시키서 이를 해리시키지 못하게 된다⁴⁾.

심근의 허혈성 수축이 시작되고 끝나는 것은 세포내의 mitochondria의 손상 정도를 나타내고 결국 심근내 energy 요구량이 감소되면 심근이 허혈성 수축의 시작 시기가 지연될 것이고 이는 mitochondria내의 기능적 파괴를 대변하게 될 것이다⁵⁾.

이러한 모든 보고들은 실제 생체의 심장에서 collateral blood flow 혹은 심방외의 요소들은 제외된 결과이기에 생체내에서는 다른 결과도 나올 수 있을 것이다.

본 연구에서 사용된 허혈성 심근 수축에의 측정에서는 관상동맥 혈류가 차단된 상태이기에 anaerobic 대사가 이루어질 것이나 Kubler⁶⁾ 등은 허혈성 상태는 초기에는 aerobic 대사가 이루어지며 이때 심근내에 용해되어 있는 산소(0.3 vol. %) 혹은 myoglobin에 붙어있는 산소(0.5 vol. %)를 사용하여 high-energy phosphate와 심근내 lactate의 농도를 조절하게 된다. 이 기간은 성인 심방에서 허혈 상태에서 약 8초 동안은 조절 가능하며 최소한 산소운반에 필요한 산소 분압은 10 mmHg 정도라 하였다⁶⁾. 결국 산소분압이 위험 수준에 도달하면 high-energy phosphate는 파괴되고 lactate를 생성하게 된다.

aerobic대사에서 anaerobic대사로 이행하는데 중요한 energy 주요소는 glycolysis인데 약 20배의 glycolytic flux가 이루어 진다. 그러나 이는 전 비호기성 대사시 심근의 energy 요구량의 65%~70%밖에 미치지 못한다⁶⁾.

실제적으로 lactate 생성은 심근내의 ATP 결핍시 감소되고 있으며 2 umol/gm wet weight 이하의 ATP가 심근내 존재시 심근 허혈의 가역적 변화의 한 계로 생각되었고⁶⁾, 이는 본 연구에서의 TIC onset가 지나면 TIC peak에 도달할 때까지 lactate의 생성은 비슷할 것이라고 생각할 수 있을 것이다.

개심술에서 심장의 기능을 보호하려는 노력은 매우 다양한 심근 보호법에서 보듯 계속 개발되고 있으나 지금까지 가장 확실하고 안전한 심근 보호법은 없는 듯 하며 특히 신생아의 심장에서의 연구는 매우 적다. 심근 보호의 기본적인 목적은 술중에 허혈성 손상을 줄이고 reperfusion injury를 방지 하거나 감소시켜 주는데 있다. 그러나 신생아의 심장에서의 global ischemia에 대한 반응 자체가 논쟁의 여지가 있으나 최근 성인 심장에서 보다 잘 견딘다고 설명되고 있다. 이는 1) 심근내 높은 glycogen치⁷⁾ 2) 비호기성 대사가 보다 효과적으로 일어나기 때문에 심근내 high ene-

rgy compound가 잘 유지되며⁸⁾ 3) calcium induced reperfusion injury에 감수성이 낮으며⁹⁾ 4) 낮은 심근내 energy demand¹⁰⁾ 5) 산성에 대해서 매우 높은 내성¹¹⁾ 등으로 설명되고 있다.

신생아의 심근의 온도에 대한 심근의 회복도에 대한 몇 보고에서 Bare¹²⁾ 등은 20°C에서 90분간 허혈성 심장지 시에 완전한 회복을 보였다. 했으며 Yee¹³⁾은 32-35°C의 심근 온도에서 mature 심장과 un mature 심장의 비교에서 기능적 감소는 비슷하게 나타나나 심근내 water content가 mature 심장에서 높다고 하였고 Starnes¹⁴⁾ 25°C의 심근에서는 양군에서 비슷한 결과를 보였다.

본 저자는 신생태지의 심장을 이용하여 37°C 심장 온도 하에서 perfusate를 substrate free Krebs 용액 사용시 20분, 25분에서 diastolic compliance와 수축기 기능의 감소를 보이고 있으며 TIC peak까지의 기간이 50분 이내 인것을 알수 있었다.

이는 normothermia 하에서 20분까지는 수축기 압 및 이완기 압이 정상치를 이루고 있다는 것을 의미하고 있다.

결 론

신생태지의 심장에서 허혈성 심근 수축기의 측정과 normothermic isolated perfused heart circuit를 이용한 심장기능의 변화는

1. 상온에서 global ischemia 시 TIC peak는 50분 이내로써 이때 stone heart에 이른다.
2. 상온에서 좌심실 기능의 변화는 20분 경과시 이완기 기능의 급격한 감소와 25분 경과시 수축기 기능의 급격한 감소를 보이고 있다.

REFERENCES

1. Bull C, Cooper J, Stark J : *Cardioplegic protection of the child's heart. J Thorac Cardiovasc Surg.* 88 : 287, 1984
2. Wells RJ, Friedman WF, Sobel BE : *Increased oxidative metabolism in the fetal and newborn lamb heart. Am J Physiol.* 222 : 1488, 1972
3. Hearse DJ, Garlick BP, Humphrey SM : *Ischemic contracture of the myocardium. Metabolism and prevention. Am J Cardiol* 39 : 986, 1977

4. Katz AM, Tada M : *The "stone heart" A Challenge to the biochemist* *Am J cardiol* 29 : 181, 1972
5. Sink JD, Pellom GL, Currie WD, Wechsler AS : *Relationship between ischemic contracture and mitochondrial function.* *Surg Forum* 29 : 298, 1978
6. Kubler W, Spieckermann PG : *Regulation on glycolysis in the ischemic and anoxic myocardium.* *J Mol Cell Cardiol* 1 : 351, 1970
7. Gennser G : *Influence of hypoxia and gluconse on contractility of papillary muscle form adult and neonatal rabbits.* *Biol Neonate* 2 : 90, 1972
8. Hoeter JA, Opie LH. : *perinatal changes in glycolytic function in responses to hypoxia in the incubated or perfused rat heart.* *Biol Neonate* 33 : 144, 1978
9. Frank JS, Rich TL : *Calcium depletion and repletion in rat heart. Age-dependent changes in the sarcolemma.* *Am J physiol* 245(heart Cinc physiol 141) : H343, 1983
10. Young HH, Shimizu T, Nishioka K, Nakanishi T, Jarmakani JM : *Effect of hypoxia and reoxygenation on mitochondrial function in neonatal myocardium* *Am J physiol* 245 : (Heart Cinc, physiol 141) H998, 1983
11. Nakanishi T, Okuda H, Nakazawa M, Takao A : *Effect of acidosis on contractile function in the newborn rabbit heart.* *Pediatr Res* 19 : 482, 1985
12. Bave EL, Stammers AH. : *Recovery of left ventricular function after hypothermic global ischemia.* *J Thorac Cardiovasc Surg* 91 : 115, 1986
13. Yee ES, Ebert PA : *Effect of ischemia on ventricular function, compliance, and edema in immature and adult carine heart.* *Surg Form* 30 : 25, 1979
14. Starnes VA, Hammon JW, Lupintti FM, Olson KD, Boucek RT, Bender HW : *Functional and metabolic preservation of the immature myocardium with verapamil following global ischemia.* *Ann thorac Surg* 34 : 58, 1982.