

家兔心筋 Mitochondria 分劃內 Adenosine triphosphatase 活性度에 對한 Diphenylhydantoin sodium 및 Quinidine 의 作用*

釜山大學校 醫科大學 藥理學教室

<指導 崔 信 貞 副教授>

洪 起 煥

= Abstracts =

The Actions of Diphenylhydantoin sodium and Quinidine on the Adenosine triphosphatase Activity in Mitochondrial Fraction of Rabbit Heart

Ki Whan Hong, M.D.

*Department of Pharmacology, College of Medicine, Pusan National University,
Pusan, Korea*

(Director: Assoc. Prof. Sin Jyoung Choi, M. D.)

The author studied the actions of ouabain and diphenylhydantoin sodium on the ATPase activity in mitochondrial fraction isolated from rabbit heart and compared with that of quinidine. The results obtained are as follows:

1) In studying the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase activity, the rabbit heart isolated was immediately frozen for 7-9 days (ageing of preparation) and thereafter the mitochondrial fraction obtained by differential centrifugation technic was treated with solution A containing 0.15% deoxycholate for 24-48 hours at -10°C before using in experiment. These methods increased the activity ratio to 0.87-0.98.

2) The $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase activity in mitochondrial fraction of rabbit heart was not completely but markedly inhibited by ouabain. This inhibitory action of ouabain was moderately antagonized by K^+ concentration at constant Na^+ concentration.

3) Diphenylhydantoin sodium in concentration of $5 \times 10^{-4} \sim 10^{-3}\text{M}$ stimulated markedly not only Mg^{++} -dependent ATPase activity but also $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase activity and in concentration lower than 10^{-6}M had little effect.

However, this effect of diphenylhydantoin was markedly increased in the presence of Na^+ alone rather than K^+ alone, but lesser than that effect in the presence of both Na^+ and K^+ , together. The stimulating effect of diphenylhydantoin was specifically antagonized by ouabain.

4) When the rabbits were intravenously injected with ouabain and diphenylhydantoin respectively, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase activity of rabbit heart of ouabain-treated group was much decreased and both $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase and Mg^{++} -activated ATPase activity were moderately increased in diphenylhydantoin-treated rabbit group.

* 本論文은 1971年 第23回 大韓藥理學會에서 發表하였음.

5) The $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase activity in mitochondrial fraction of rabbit heart was slightly inhibited by quinidine in high concentration of 10^{-4} M, but nearly little effect was observed below the concentration of 5×10^{-6} M.

6) It might be possible to conclude that diphenylhydantoin specifically antagonized the action of ouabain on the membrane ATPase, which is different from the action of quinidine.

緒 論

Diphenylhydantoin sodium(DPH 라 略記함)은 1938 年 Merritt 및 Putnam¹⁾에 의하여 전간의 對症療法劑로 紹介된 以來 널리 使用되었다.

Harris 및 Kokernot(1950)²⁾는 犬에서 實驗的으로 誘發시킨 心筋梗塞에 依한 心不整脈에 DPH 를 使用하여 그 有効性を 報告하였으며, Mosey 및 Tyler³⁾는 犬에서 digitalis 中毒에 依한 心室頻脈을 DPH 로 治療된다고 하였으며, 最近 Leonard⁴⁾, Lang et al.⁵⁾ 및 Conn⁶⁾ 등은 臨床的으로 DPH 의 治療效果를 言及하였고, 특히 digitalis 에 依한 心室不整脈治療에 있어서는 다른 藥物보다도 優秀하다고 하였다.

Woodbury⁷⁾는 正常白鼠에 DPH 를 投與하였을 때 DPH 는 腦, 骨骼筋 및 心筋의 細胞內 Na^+ 濃度を 低下시키며, 특히 急性 hyponatremia 로 惹起되는 腦細胞內 Na^+ 增加와 K^+ 減少를 DPH 로 防止된다고 하였고 DPH 의 전간 發作에 對한 抑制作用은 腦細胞內 Na^+ 의 能動的 移動에 關與하는 代謝過程에 作用하여 發作興奮성이 減少된다고 報告하였다.

한편 細胞膜을 통한 電解質의 能動的 移動에 對하여는 Skou(1957)⁸⁾가 蟹神經膜에서 adenosine triphosphatase(以下 ATPase 라 略記함) 酵素系의 存在를 報告한 以來 Post et al. (1960)⁹⁾ Dunham 및 Glynn (1961)¹⁰⁾ 및 Lee et al. (1965)¹¹⁾ 등에 依하여 이 酵素의 活性化가 細胞膜을 통한 Na^+ 및 K^+ 의 能動的 移動에 密接한 關係가 있고, 이때 Na^+ 및 K^+ 의 一定量이 同時에 存在함으로써 ATPase 의 活性도가 더욱 增加되며, 이는 strophanthin 에 依하여 選擇的으로 抑制된다고 報告하였으며^{12, 13, 14)}, Lee 및 Yu(1963)¹⁵⁾와 Repke et al. (1965)¹⁶⁾은 ouabain 의 ATPase 活性도에 對한 抑制作用이 心筋收縮機轉과 關係가 있으리라고 暗示하였다.

著者는 家兔剔出心筋 mitochondria 分割內 ATPase 에 對해서 ouabain 및 DPH 의 作用을 比較하고 心不整脈治療劑로서 DPH 와 ouabain 과의 關係를 觀察하였으며 나아가서 心不整脈治療劑로 널리 使用되고 있는 quinidine 의 mitochondria 分割內 ATPase 酵素系에 對한 作用을 比較觀察하여, 이에 成績을 報告하는 바이다.

實驗方法

成熟白色家兔의 頸動脈을 切斷하여 出血死를 일으킨 後 心臟을 剔出하여 實驗에 使用하였다.

剔出心臟을 即時 心囊과 脂肪質을 除去하고 -10°C 에서 數日間 冷凍시켰다.

冷凍 7~9日 後에 心室筋 2.0 g 을 달아서 切片을 作成하고 이에 solution A(0.25 M sucrose, 5 mM histidine, 5 mM disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA) 및 0.15% sodium deoxycholate 가 含有된 溶液을 다시 Tris base 로서 pH 7.4 로 操節되었다.) 10 ml 를 添加하여 glass-grinder 로 3分間 0°C 에서 homogenize 하였다.

Mitochondria 分割의 分離는 differential centrifugation technic^{17, 18)}에 依하여 homogenate 를 $700 \times g$ 10分間 冷凍 遠心沈澱하고 上層에 浮遊하는 脂肪層을 버리고 下層에 沈澱된 cell debris 와 核分割이 섞이지 않도록 上澄液만 다시 $10,000 \times g$ 로 10分間 沈澱시켰다. 이 沈澱物에 다시 solution A 6 ml 와 1 mM EDTA-Tris 4 ml 를 添加하여 teflon homogenizer 로 均質化시켜 mitochondria 分割을 얻었다.

이 mitochondria 分割을 實驗에 使用하기 前에 다시 -10°C 에서 24~48 時間 冷凍保存하여 翌日 이 浮遊液內 含有되어 있는 蛋白質量을 biuret 方法¹⁹⁾에 依하여 測定하고 20 mM Tris-HCl buffer 로서 蛋白質量을 操節하였다.

每 實驗時 mitochondria 分割內 ATPase 活性度 反應에는 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA 로서 全體量이 1 ml 가 되도록 使用하였으며 ATP 를 除外한 모든 試藥과 酵素를 添加하고 37°C 恒溫水槽內에서 5分間 放置한 後에 各試驗管들에 1.5 mM Tris-ATP 를 添加하여 10分間 反應시켰다. 이를 遠心沈澱하고 上澄液內 無機磷酸量을 測定하여 酵素活性度 單位로 하였다.

以上の 모든 操作은 試驗管을 2重으로 하여 復數로 行하고 이의 平均値로서 計算하였다.

無機磷酸量의 測定은 Fiske 및 SubbaRow 方法²⁰⁾에 依하였으며, Coleman Junior Spectrophotometer 를 使

—K.W.Hong: The Actions of Diphenylhydantoin sodium and Quinidine on the Adenosine triphosphatase Activity in Mitochondrial Fraction of Rabbit Heart—

Table 1. Influence of ageing and deoxycholate-treatment on the Mg^{++} -activated ATPase and $(Na^+ + K^+)$ -activated ATPase activity.¹⁾

Expt. Samples Frozen Age (day)	Specific Activity (μ m Pi/mg protein/hour)				Activity Ratio	No. of samples	Duration of treatment of Homogenate with sol. A ²⁾
	(A) Mg^{++} activity	Activity difference	B($Na^+ + K^+$) -activity	Activity difference	$\frac{B-A}{A}$	N	
immediately	6.31		6.55		0.04	10	—
immediately	5.81	0	6.63	0	0.14	5	24 hours
3-4	4.48	-1.33	6.48	-0.15	0.45	7	
7-9	3.92	-1.89	7.34	+0.71	0.87	8	
12-13	3.41	-2.40	7.78	+1.15	1.29	6	
25-30	3.24	-2.57	6.46	-0.17	1.01	4	
7-9	3.31	-2.50	6.72	+0.09	0.98	6	48 hours

- 1) The reaction system included 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1.5 mM ATP, 1.5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, and 10 mM KCl in a total volume of 1ml, Incubation, 10 minutes at 37°C.
 2) Solution A, containing 0.25 M sucrose, 5mM histidine, 5 mM EDTA and 0.15% deoxycholate.

用하여 波長 660 m μ 에서 測定하였다.

本實驗에 있어서 ouabain(Sigma)은 再蒸溜수로 稀釋 溶解시켰으며, quinidine(Sigma)도 再蒸溜수로서 溶解 시켰으나 $2 \times 10^{-4}M$ 이상의 濃度에서는 濁濁이 일어나서 無機磷酸量測定이 困難하여 $10^{-4}M$ 以下の 濃度를 使用하였다. Diphenylhydantoin sodium(Sigma)은 $10^{-2}M$ 溶液을 作成할 때 pH 11.7의 NaOH-蒸溜水 溶媒로서 溶解시킨 것을 原液으로 하고 稀釋 때에는 再蒸溜水를 使用하였다. $10^{-2}M$ 溶液 0.1ml를 50mM Tris-HCl buffer가 含有的 incubation medium에 添加하여 1ml가 되었을 때 pH는 7.4~7.6이었다.

實驗成績

1) Mg^{++} -activated 및 $(Mg^{++} + Na^+ + K^+)$ -activated Adenosine triphosphatase 活性度の 檢討

豫備實驗으로서 家兎心筋 mitochondria 分劃內 ($Na^+ + K^+$)-activated ATPase 活性度 [以下 ($Na^+ + K^+$)-ATPase 活性度라 略함]을 測定함에 있어서 Mg^{++} 에 依하여 活性化된 ATPase 活性度 (Mg^{++} -ATPase 活性度라 略함)와 區別하기가 어려운 點을 고려하여 다음과 같은 方法을 實驗에 應用하였다.^{13, 14, 17, 21)}

첫째는 心臟을 剔出하여 即時 冷凍固定하고 이를 數日間 放置하였다.

둘째는 冷凍心臟에서 mitochondria 分劃을 作成하고 이를 deoxycholate 溶液으로 24~48時間 다시 冷凍處理하였다.

그 方法과 操作은 實驗方法에서 記述한 바와 같으며 그 成績은 表 1에서 보는 바와 같다.

이 表에서 specific activity는 1時間에 1mg 蛋白質이 1.5 mM ATP에 作用하여 遊離된 無機磷酸量으로서 酵素活性度를 나타내고, activity ratio는 $(Mg^{++} + Na^+ + K^+)$ -ATPase 活性度(以下 이를 total ATPase라 略함)에서 Mg^{++} -ATPase 活性度를 減한 것을 다시 Mg^{++} -ATPase로 나눈 比를 表示한 것이다.

表 1에서 보는 바와 같이 心臟을 剔出하여 即時 mitochondria 分劃을 作成하였을 때 activity ratio는 0.04로서 total ATPase 活性도는 Mg^{++} -ATPase 活性도와 거의 區別이 困難하였으나, 이때 mitochondria 分劃을 0.15% deoxycholate 含有 solution A에 24時間 冷凍處理함으로써 Mg^{++} -ATPase 活性도가 약간 減少를 보이나 activity ratio의 큰 變動은 보이지 아니하였다.

心臟을 剔出하여 3~4, 7~9, 12~13 및 25~30日 群으로 區分하여 冷凍시키고 다시 mitochondria 分劃을 作成하고 deoxycholate 含有 solution A에 24時間 處理하면 冷凍日수가 經過함에 따라 Mg^{++} -ATPase 活性도는 12~13日에는 顯著히 減少하였고 그 以後 25~30日에도 계속 減少를 보였다. 그리고 ($Na^+ + K^+$)-ATPase 活性도는 약간 增加되는 變動을 보이나 顯著하지는 아니하였다. Activity ratio는 冷凍日수의 經過에 따라 12~13日까지는 점차로 增加를 보여 1.29이었고 그 이후 25~30日에도 1.01을 維持하였다.

家兎心臟을 7~9日間 冷凍시킨 後 0.15% deoxycholate 含有 solution A에 48時間 處理한 實驗에 있어서는 24時間 處理한 實驗에 比하여 activity ratio는 0.98로 增加되었다.

以上的 實驗成績에 依據하여 앞으로 實驗에서는 家

家兎心臓을 剔出하여 7~9日間 冷凍시킨 後 mitochondria 分劃을 作成하고 다시 0.15% deoxycholate 含有 solution A 에 24~48時間 處理한 것을 使用하였다.

2) 家兎心筋 Mitochondria 分劃內 ATPase 活性度에 對한 Na^+ 및 K^+ 의 作用

豫備實驗으로서 家兎心筋 mitochondria 分劃內 ATPase 活性度에 對한 Na^+ 및 K^+ 의 作用을 보던 圖表 1에 서 보는 바와 같이 incubation medium 內에 1.5 mM Mg^{++} 存在 아래 Na^+ 이 存在하지 아니하였을 때는 K^+ 濃度(2.5~40 mM)增加에 依하여 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性度에 거의 作用을 주지 못하였으나, Na^+ 濃도가

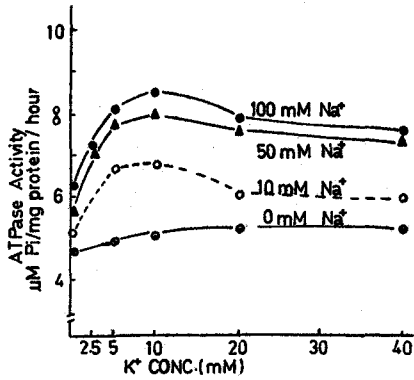


Fig. 1. The effect of K^+ and Na^+ on Mg^{++} -activated ATPase activity in mitochondrial fraction of rabbit heart in the presence of 1.5 mM MgCl_2 , 1.5 mM Tris-ATP, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer in the reaction system. Total volume; 1 ml. In this and all following figures, each point has mean of 5-8 experiments and the same reaction system.

10, 50, 및 100 mM 로 增量됨에 따라 各濃度の K^+ 에 依하여 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性度는 顯著히 增加되었다. 即 Na^+ 이 50~100 mM, K^+ 이 5~10 mM 濃度로 同時에 存在할 때 그 活性度가 最高值에 達하였고, 또 Na^+ 이 200 mM 以上, K^+ 이 20 mM 以上으로 Na^+ 및 K^+ 이 同時에 作用할 때는 오히려 酵素活性度增加는 減退되었다.

以上の 成績에 依하여 앞으로 實驗에서는 Mg^{++} 1.5 mM 存在 아래 Na^+ 100 mM 과 K^+ 10 mM 을 使用하였다.

3) 家兎心筋 Mitochondria 分劃內 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATP}$

ase 活性度에 對한 Ouabain 의 作用

豫備實驗으로서 家兎心筋 mitochondria 分劃內 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性度에 미치는 ouabain 의 作用은 圖表 2에서 보는 바와 같이 10^{-7} M ouabain 에 依하여는 거의 作用이 없었으며, 濃度の 增加에 따라 10^{-6} M ouabain 에 依하여 23%, 10^{-4} M 에서는 71%의 抑制를 보였다. Ouabain 의 濃도가 10^{-3} M 에서도 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性度에 對한 完全한 抑制效果는 볼 수 없었다. 그리고 ouabain 의 酵素活性度에 對한 抑制作用은 圖表 3에서 보는 바와 같이 一定한 Na^+ 量에서 K^+ 量이 10~30 mM 로 增量될 때 그 抑制는 中等度の 減

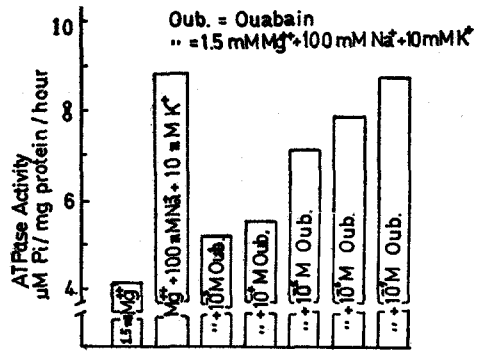


Fig. 2. The effect of ouabain on $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{activated}$ ATPase activity in mitochondrial fraction of rabbit heart at 100 mM NaCl and 10 mM KCl concentrations. Other conditions of incubation are same as in Fig. 1.

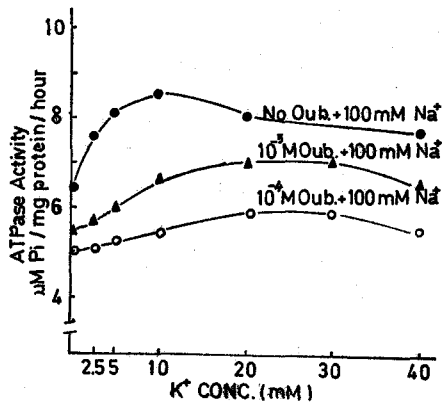


Fig. 3. The effect of K^+ concentrations on $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{activated}$ ATPase activity in the absence or presence of 10^{-5} M ~ 10^{-4} M ouabain in mitochondrial fraction of rabbit heart. Concentration of Na^+ are 100 mM and other conditions of incubation are same as Fig. 1.

退를 보였으며, K^+ 濃도가 40 mM 일 때는 K^+ 의拮抗作用이 다시 減少되었다.

4) 家兎心筋 Mitochondria 分割內 ATPase 活性度에 미치는 Diphenylhydantoin sodium 의作用

以上の豫備實驗成績을 基礎로 하여 DPH 의作用을 보면 圖表 4에서 보는 바와 같이 incubation medium 內 $10^{-3}M$ DPH 를 添加하였을 때 Mg^{++} -ATPase 活性度 뿐만 아니라 (Na^++K^+) -ATPase 活性度も 增加되었고, 이때 1.5 mM Mg^{++} 存在 아래 K^+ 單獨 添加에 依하여는 K^+ 量의 增加에도 불구하고 (Na^++K^+) -ATPase 의 增加는 거의 볼 수 없었으나, K^+ 代身 Na^+ 이 單獨

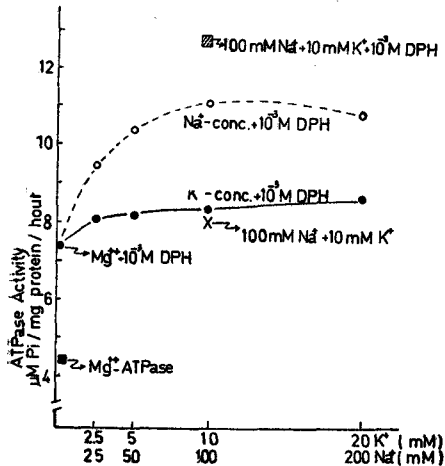


Fig. 4. The effect of DPH on Mg^{++} -, $(Mg^{++}+Na^+)$ -, $(Mg^{++}+K^+)$ -and $(Mg^{++}+Na^++K^+)$ -activated ATPase activity in mitochondrial fraction of rabbit heart in the presence of 1.5 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl and 10 mM KCl.

으로 添加되었을 때는 Na^+ 量의 增加 (25~200mM)에 따라서 그 增加는 顯著하였다. 100 mM Na^+ 및 5~10 mM K^+ 이 同時에 存在할 때는 $10^{-3}M$ DPH 에 依하여 total ATPase 活性度가 더욱 亢進되었다.

그리고 各各 다른 濃度の K^+ 및 Na^+ 을 同時에 添加하고 $10^{-3}M$ DPH 의作用을 觀察하여 보면 圖表 5에서 보는 바와 같이 그 曲線이 K^+ 에 依한 活性度變動에 比하여 Na^+ 增加에 依한 活性度增加가 더욱 顯著함을 보여 주고 있다.

以上の成績에서 보면 $10^{-3}M$ 의 DPH 는 (Na^++K^+) -ATPase 活性度뿐만 아니라 Mg^{++} -ATPase 活性度를

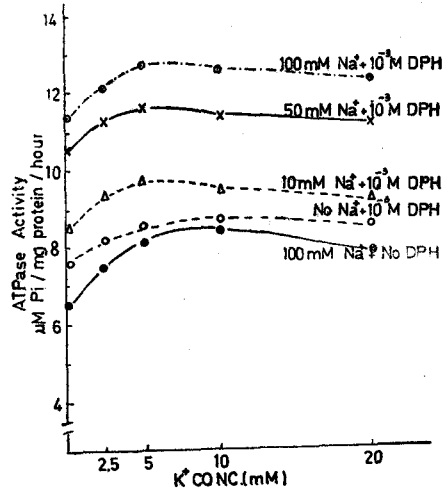


Fig. 5. The effect of DPH on the (Na^++K^+) -activated ATPase activity at different Na^+ and K^+ concentrations in mitochondrial fraction of rabbit heart.

顯著히 增加시켰으며 이와같은 DPH 의作用은 Na^+ 없이 K^+ 單獨으로 存在할 때는 活性度增加는 輕微하였으나 DPH 및 Na^+ 이 같이 作用할 때는 Na^+ 濃度の 增加에 따라 特異하게 ATPase 活性度가 亢進되었고 Na^+ 및 K^+ 兩者같이 作用할 때 보다는 그 効果는 弱하였다.

5) Diphenylhydantoin sodium 의作用에 對한 Ouabain 의影響

家兎心筋 mitochondria 分割內 ATPase 活性度에 미치는 各種 濃度 DPH (10^{-6} ~ $10^{-3}M$) 의作用을 觀察한 後에, DPH 에 依해 增加된 (Na^++K^+) -ATPase 活性度에 여러 濃度の ouabain (10^{-6} ~ $5 \times 10^{-4}M$) 을 添加하였을 때 그 成績은 圖表 6과 같다.

이 圖表에서 DPH 에 依한 dose-response curve 를 보면 DPH 濃度 5×10^{-4} ~ $10^{-3}M$ 에 依하여 (Na^++K^+) -ATPase 活性度增加는 顯著하나 10^{-4} 以下에서는 緩慢한 曲線을 보였다.

이와 같이 DPH 에 依하여 增加된 曲線에 ouabain 各種 濃度 添加에 依하여 그 曲線은 右下側으로 移動하였으며, DPH 高濃도에 對한 ouabain 의 抑制作用에 比하여 低濃度側에서 抑制가 顯著하였으며, ouabain $5 \times 10^{-4}M$ 에 依하여서도 $10^{-3}M$ DPH 로 增加된 (Na^++K^+) -ATPase 活性度는 完全히 抑制되지 아니하였

—洪起煥: 家兔心筋 Mitochondria 分割內 Adenosine triphosphatase 活性度에 對한
Diphenylhydantoin sodium 및 Quinidine 의 作用—

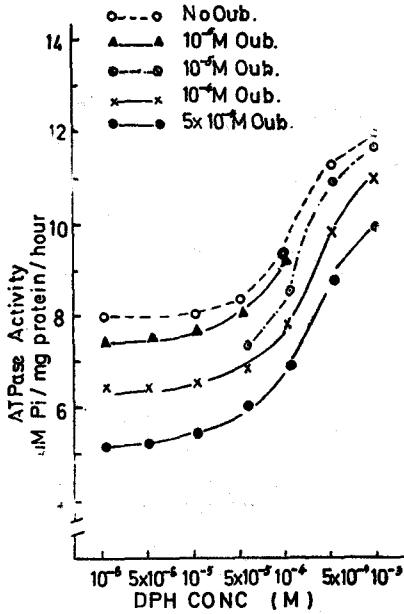


Fig. 6. Dose-response curves for combinations of several constant concentrations of DPH without and with varying concentrations of ouabain on the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase activity in mitochondrial fractions of rabbit heart in the presence of 1.5 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 10 mM KCl.

다.

即 DPH 와 ouabain 은 膜 ATPase 에 對하여 相互拮抗作用을 나타내었다.

Table 2. Effects of ouabain and DPH on Mg^{++} - and $(\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase activity (in vivo) in mitochondrial fraction isolated from rabbit hearts previously treated with 75~100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ouabain and 10 mg/Kg DPH, respectively for 20 min.

Rabbit number	Ouabain-treated rabbit (75~100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$)		Rabbit number	DPH-treated rabbit (10 mg/Kg)	
	Mg^{++} -ATPase Activity	$(\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase Activity		Mg^{++} -ATPase Activity	$(\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase Activity
	$\mu\text{moles Pi}/\text{mg protein}/\text{hour}$			$\mu\text{moles Pi}/\text{mg protein}/\text{hour}$	
1.	4.10	6.32	11.	6.64	10.68
2.	5.36	7.08	12.	7.08	10.32
3.	3.36	5.68	13.	5.20	8.16
4.	3.12	5.56	14.	4.84	8.16
5.	5.00	7.72	15.	7.60	10.80
6.	4.06	5.44	16.	6.16	8.16
7.	4.76	6.96	17.	6.01	10.32
Mean	4.44	6.39	Mean	6.21	9.51

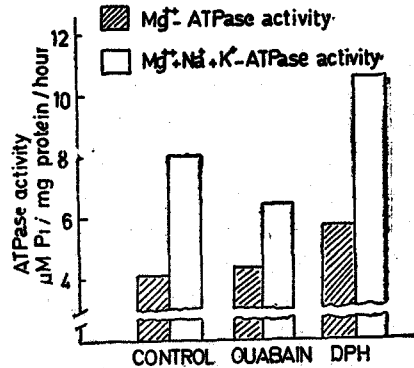


Fig. 7. The effects of ouabain or DPH injection on Mg^{++} - and $(\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase activity in mitochondrial fraction of rabbit heart, in vivo. Each group of rabbits was previously treated with 75~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ouabain and 10 mg/kg DPH for 20 min., respectively. Control group pretreated with 1 ml/kg isotonic saline for 20 min.

6) Diphenylhydantoin sodium 및 Ouabain 注射에 依한 ATPase 活性度의 變化

In vivo 實驗으로서 各各 7마리의 家兔를 3群으로 나누고 第1群에는 ouabain 75~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 單回注射하여 20分이 經過한 後에 心電圖上에 心室不整脈이 惹起됨을 觀察한 後에 心臟을 剔出하였다.

또 豫備實驗으로서 心電圖上에 ouabain 으로 일어난 心室不整脈을 治療할 수 있는 DPH 用量이 平均 10 mg/kg 으로 充分함을 確認하고난 다음, 第2群의 家兔에 DPH 10 mg/kg 을 單獨으로 注射하고 20分後에 心臟을

剔出하였다.

第3群은 對照實驗으로서 生理食鹽水 1 ml/kg 를 注射하고 20分後 心臟을 剔出하였다.

이와같이 얻은 剔出心臟을 實驗에 使用하였다.

表 2 및 圖表 7에서 보는 바와 같이 ouabain 中毒心筋의 $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 活性도는 對照群에 比하여 中等度の 減少를 보였으며 이 抑制作用의 程度를 試驗管內 成績과 比較하여 보면 試驗管內 ouabain $10^{-6}M$ 의 作用과 類似하며, DPH 單獨으로 注射한 群에 있어서는 對照群에 比하여 $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 와 $Mg^{++} - ATPase$ 活性도가 모두 增加되었고, 이는 試驗管內에서 DPH $10^{-4}M$ 의 作用과 같은 程度의 增加를 나타내었다.

7) 家兎心筋 Mitochondria 分劃內 ATPase 活性도에 미치는 Quinidine의 作用

이 實驗에서는 quinidine의 作用을 觀察하였던 바 圖表 8과 같다.

Quinidine $10^{-4}M$ 를 使用하여 家兎心筋 mitochondria 分劃內 $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 活性도를 보았을 때 약간의 抑制를 나타내었고, quinidine $5 \times 10^{-5} \sim 10^{-5}M$ 를 作用시켰을 때는 거의 作用이 없었다. 이와 같은 quinidine의 作用은 incubation medium內 Na^+ 및 K^+ 濃度の 變動에 따라 觀察하였으나 quinidine을 處置하지 아니한 對照實驗에 比하여 큰 差異를 볼 수가 없었다.

即 quinidine은 高濃度에서 약간의 抑制作用을 보인다. Na^+ 및 K^+ 의 變動에 依한 影響도 거의 없었다.

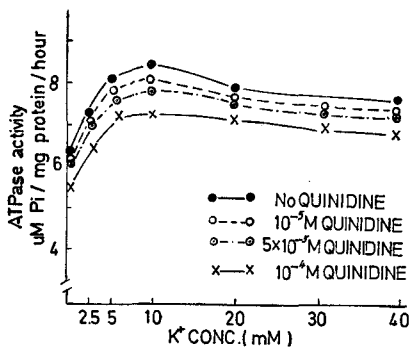


Fig. 8. The effect of quinidine on $(Na^+ + K^+) - activated$ ATPase activity in mitochondrial fraction of rabbit heart at different K^+ concentrations in the presence of 100 mM NaCl.

總括 및 考案

著者が 本實驗을 通하여 觀察한 家兎心筋 mitochond-

ria 分劃內 ATPase 活性도에 미치는 DPH 및 quinidine의 作用을 總括하고 이 考案을 加하면 다음과 같다.

Skou⁸⁾가 蟹神經膜에서 ATPase 酵素系의 存在를 밝힌 以來 많은 學者들이 動物의 各種 細胞膜이나 또는 細胞下構造인 microsome 分劃²³⁾ 또는 mitochondria 分劃²⁵⁾에서 $(Na^+ + K^+) - activated$ Mg^{++} -dependent ATPase 存在를 報告하였고 이 酵素는 Na^+ 및 K^+ 等 電解質의 細胞膜을 통한 能動的 移動에 關與할 것이라고 하였으며, ^{9, 10, 18)} 이 ATPase 活性度에는 Mg^{++} 이 絕對的으로 必要하며 一定量의 Na^+ 및 K^+ 이 同時에 存在하여야 活性도가 增加된다고 하였다^{22, 23)}.

Mitochondria 分劃內 ATPase는 microsome 分劃內的 것에 比하여 組織에 따라 性質의 差異가 많으며, mitochondria 分劃에 있어서는 Na^+ , K^+ 및 ouabain에 對하여 感受성이 보다 鈍하다고 하였다^{26, 27)}.

著者は 이런 點을 考慮하여 Akera et al.^{13, 14)}, Auditore(1962)¹⁷⁾와 Matsui 및 Schwartz(1966)²¹⁾ 등의 報告를 檢討하여 첫째 組織을 冷凍(ageing of preparation)시키고, 둘째 이 組織에서 얻은 分劃에 deoxycholate를 處理하는 方法을 採擇하였다. 이러한 方法에 依하여 activity ratio 1.0 以上을 얻을 수가 있었으나, 이는 microsome 分劃에서 얻은 成績과 比較하면 顯著히 낮은 成績이다.

Schatzman(1953)²⁴⁾은 赤血球膜을 통한 ion의 移動이 strophanthin 添加에 依하여 抑制되고, 또 Post (1960)⁹⁾는 人赤血球膜 ATPase 活性도가 ouabain에 依하여 抑制됨을 報告하였다. 最近 Akera et al.^{13, 14)}은 犬에 ouabain을 계속注入하여 惹起되는 心收縮力 增加와 房室傳導의 抑制는 同時에 犬心筋內 $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 活性도와 重要한 關聯이 있을 것이라고 示唆하였다.

本實驗에서도 ouabain ($10^{-7} \sim 10^{-9}M$)에 依하여 $(Na^+ + K^+) - ATPase$ 는 顯著히 抑制되었으나 $10^{-3}M$ 에서도 完全히 抑制되지는 못하였고 Matsui 및 Schwartz²¹⁾가 microsome 分劃에서 얻은 成績과 比較하면 mitochondria 分劃內 ATPase는 ouabain의 作用에 多少 鈍함을 알 수 있다. 또한 ouabain의 抑制作用은 K^+ 의 濃度增加에 依하여 拮抗되는 點을 ouabain의 特異한 作用이라고 하였으며, ATPase에 對하여 抑制作用을 가진 他藥物과 다른 點이라고 지적하였다.

DPH의 心不整脈治療效果에 對하여는 Mosey 및 Tyler³⁾가 犬에서 digitalis 中毒에 依한 心室頻脈이 DPH로 治療됨을 觀察하였고 最近 臨床의 으로^{4, 5, 6)} DPH의 心不整脈治療劑로서 優秀성을 立證하였다. 特히

digitalis 中毒心室不整脈에 效果가 있다고 報告되고 있다.

이에 對하여 Woodbury²⁷가 正常白鼠에 DPH를 投與하여 腦, 骨筋筋 및 心筋의 細胞內 K^+ 濃度에는 變動이 없으나 Na^+ 은 顯著히 低下되며, 이는 Na^+ 의 能動的 移動에 關與하는 代謝過程을 促進시켜서 細胞內 Na^+ 이 減少되고 細胞의 興奮性이 減少되리라고 하였다. 本實驗에서 DPH $5 \times 10^{-4} \sim 10^{-3} M$ 를 作用시키면 Mg^{++} -ATPase 와 $(Na^+ + K^+)$ -ATPase 活性度 모두 增加되었다. Kennedy 및 Nayler²⁸는 toad (*Bufo marinus*) 心筋 microsome 分割에서는 DPH 가 ATPase 活性도에 何等的 作用이 없다고 하였으나, 朴²⁹은 白鼠赤血球膜에 있어서 DPH 는 Mg^{++} -ATPase 活性度を 增加시킨다고 하였다.

이와 같은 DPH 의 作用에 對하여 Helfant et al. (1967)^{23, 29} 및 Strauss et al. (1968)³⁰은 DPH 의 電氣生理學的인 面을 檢討하여 DPH 는 digitalis 의 心筋收縮 作用에는 影響이 없고 正常心臟이나 digitalis 中毒心臟의 心室自動能을 抑制하고 房室傳導를 오히려 增加시켜 digitalis 의 作用을 拮抗한다고 하였다.

그後 Helfant et al. (1968)³⁰은 中毒量의 digitalis 를 吞食後에 心筋에서 K^+ 상실을 觀察하고 다시 DPH 를 投與하여 心室不整脈과 K^+ 상실이 防止됨을 報告하였다. 또한 Scherlag et al. (1968)³¹은 digitalization 을 계속하면 K^+ 流出이 持續되고, DPH 를 處理하면 K^+ 流出이 減少되며 心室頻脈은 洞性搏動으로 轉換되나 心筋收縮力은 오히려 digitalis 의 蓄積作用으로 增加된다고 하여 digitalis 에 依한 心筋 K^+ 流出과 心筋收力縮增加와는 直接 隨伴되지 않는 것이고 DPH 와 digitalis 의 이러한 拮抗作用은 細胞膜에서 일어나는 것이고 心筋의 contractile protein 에서 일어나는 것이 아니라고 하였다.

著者의 實驗에서 興味있는 것은 DPH가 作用할때 특히 Na^+ 을 必要로 하며, 同時에 K^+ 이 存在할 때는 그 ATPase 活性도가 더욱 增加되는 點과 $(Na^+ + K^+)$ -ATPase 에 對하여 ouabain 과 拮抗하는 點, 또한 生體內로 DPH 및 ouabain 을 注射하였을 때 그 成績은 낮지만 試驗管內 成績과 多少 一致하는 點을 考慮하면 DPH 는 細胞外 또는 細胞下構造膜外에 存在하는 Na^+ 및 K^+ 와 같이 細胞膜 또는 細胞下構造膜의 膜 ATPase 系의 受容體에 specific 하게 相加 또는 相乘作用을 하리라고 생각되며, 이 作用이 digitalis 로 抑制된 膜 ATPase 活性度を 增加시켜서 細胞內外 Na^+ 및 K^+ 의 能動的

的 移動에 關與하는 metabolic pump 의 機能을 恢復시켜 주고 digitalis 로 惹起된 電氣生理學的 變化를 恢復시켜 주는 現象과도 關聯이 있을 것이라고 생각하는 바이다.

Quinidine 의 作用에 對하여는 Kennedy 및 Nayler (1965)²⁵는 toad 心筋 microsome 分割內 ATPase 活性도에 對하여 quinidine 은 抑制作用을 한다고 하여, quinidine 의 抗心不整脈作用은 ion 의 能動的 移動을 抑制시키는 機轉과 關聯이 있다고 하였으나 Klein et al. (1960)³² 은 剔出家兔心房에서 quinidine 은 細胞膜을 통한 Na^+ 및 K^+ 의 受動的 移動을 抑制하고 특히 Na^+ 의 細胞內로의 移動이 抑制되어 抗不整脈效果를 가져온다고 하였고 K^+ 의 能動的 移動에는 重要한 作用이 없다고 하였다. 또한 quinidine 은 細胞膜의 Na^+ -carrier 의 利用을 減少시켜서 repolarization 을 지연시키고 細胞膜 興奮性을 減少시킨다고 하였다.³³ 著者의 成績에서 quinidine 의 膜 ATPase 에 對한 作用이 高濃度에서 輕微한 抑制를 보이거나 이는 特異한 作用이 아니며 quinidine 은 心不整脈治療에 있어서 DPH 와 다른 機轉에 依하여 作用이 媒介된다고 思料되는 바이다.

結 論

著者는 家兔心筋 mitochondria 分割內 ATPase 活性도에 對한 diphenylhydantoin sodium 및 quinidine 의 作用을 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 家兔心筋 mitochondria 分割內 $(Na^+ + K^+)$ -activated ATPase 活性度を 觀察함에 있어서 剔出心臟을 7~9 日間 冷凍하고 mitochondria 分割을 24~48 時間 deoxycholate 로 處理하여 activity ratio 0.87~0.98 을 얻었다.

2. 家兔心筋 mitochondria 分割內 $(Na^+ + K^+)$ -ATPase 活性도는 ouabain 에 依하여 完全하지는 못하나 顯著히 抑制되었고, 이는 一定한 Na^+ 濃度에서 K^+ 濃度 增加에 依하여 拮抗되었다.

3. Diphenylhydantoin 은 $(Na^+ + K^+)$ -ATPase 뿐만 아니라 Mg^{++} -ATPase 活性度を 增加시켰다. Diphenylhydantoin 으로 增加된 $(Na^+ + K^+)$ -ATPase 活性도는 ouabain 에 依하여 拮抗되었다.

4. Ouabain 과 diphenylhydantoin 은 各各 따로 注射한 家兔의 心筋 mitochondria 分割內 $(Na^+ + K^+)$ -ATPase 活性도는 ouabain 에 依하여 抑制되었고, diphenylhydantoin 投與群에 있어서는 $(Na^+ + K^+)$ -ATPase 와 Mg^{++} -ATPase 活性度 모두 增加되었다.

5. 家兔心筋 mitochondria 分割의 $(Na^+ + K^+)$ -ATP-

ase 活性도에 對하여 quinidine 은 거의 作用이 없었다.

6. 以上 結果에 依하면 diphenylhydantoin 은 quinidine 과는 달리 膜 ATPase 에 對하여 ouabain 의 作用과 特異한 拮抗作用을 나타내었다.

(本 研究에 있어서 始終 指導해 주시고 또 本稿를 校閱하여 주신 崔信貞教授에게 謝意를 表하는 바입니다.)

이 研究는 1971 年度 文敎部 研究助成費로서 시행하였음.

REFERENCES

- 1) Merritt, H. H. and Putnam, T. J.: *Sodium diphenylhydantoinase in treatment of convulsive disorders*. *J. Amer. Med. Ass.*, 111:1068, 1938. *A new series of anti-convulsant drugs tested by experiments on animals*. *Archs. Neurol. Psychiat.* 39:1003, 1938.
- 2) Harris, A. S. and Kokernot, R. H.: *Effects of diphenylhydantoin sodium (Dilantin sodium) and phenobarbital sodium upon ectopic ventricular tachycardia in acute myocardial infarction*. *Amer. J. Physiol.*, 163:505, 1950.
- 3) Mosey, L. and Tyler, M. D.: *Effects of diphenylhydantoin sodium (Dilantin), procain hydrochloride and quinidine hydrochloride on ouabain-induced ventricular tachycardia in unanesthetized dogs*. *Circulation*, 10:65, 1954.
- 4) Leonard, W. A.: *Use of diphenylhydantoin sodium (Dilantin) in the treatment of ventricular tachycardia*. *Arch. Intern. Med.*, 101:714, 1958.
- 5) Lang, T. W., Bernstein, H., Barbieri, F., Gold, H. and Corday, E.: *Digitalis toxicity*. *Arch. Intern. Med.*, 116:573, 1965.
- 6) Conn, R. D.: *Diphenylhydantoin sodium in cardiac arrhythmias*. *New Eng. J. Med.*, 272:277, 1965.
- 7) Woodbury, D. M.: *Effect of diphenylhydantoin on electrolytes and radiosodium turnover in brain and other tissues of normal, hyponatremic postictal rats*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 115:74, 1955.
- 8) Skou, J. C.: *The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves*. *Biochim. Biophys. Acta.*, 23:394, 1957.
- 9) Port, R. L., Merritt C. D., Kinsolving, C. R. and Albright, C. D.: *Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte*. *J. Biol. Chem.*, 235:1796, 1960.
- 10) Dunham, E. T. and Glynn, I. M.: *Adenosine triphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions*. *J. Physiol.*, 156:274, 1961.
- 11) Lee, K. S., Tanaka, K. and Yu, D. H.: *Studies on the adenosine triphosphatase, calcium uptake and relaxing activity of the microsomal granules from skeletal muscle*. *J. Physiol.*, 179:456, 1965.
- 12) Shatzman, H. J.: *Herzglykoside als Hemmstoffe für den aktiven-Kalium und Natrium Transport durch die Erythrocytenmembran*. *Helv. Physiol. Acta*, 11:346, 1953.
- 13) Akera, T., Larsen, F. S. and Brody, T. M.: *The effect of ouabain on sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase from the hearts of several mammalian species*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 170:17, 1969.
- 14) Akera, T., Larsen, F. S. and Brody, T. M.: *Correlation of cardiac sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase activity with ouabain-induced inotropic stimulation*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 173:145, 1970.
- 15) Lee, K. S. and Yu, D. H.: *A study of the sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase activity of heart microsomal fraction*. *Biochem. Pharmacol.*, 12:1253, 1963.
- 16) Repke, K., Est, M. and Portius, H. J.: *Über die Ursach der Speciesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit*. *Biochem. Pharmacol.*, 14:1785, 1965.
- 17) Auditore, J. V.: *Manometric techniques*, 3rd ed., p. 188, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn. 1956. cited from: *Sodium-potassium activated G-strophanthin sensitive ATPase in cardiac muscle*. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 110

- 595, 1962.
- 18) Auditore, J. V. and Murray, L.: *Cardiac (microsome) Na-K adenosine triphosphatase and its possible relationship to the active Na-K transport system.* Arch. Biochem. Biophys., 99:372, 1962.
 - 19) 최신정, 홍기환, 김규태 : 가토심장 및 골격근에서 분리한 *microsome* 분획내 ATPase 활성도에 대한 Mg^{++} , Ca^{++} , Na^{+} 및 K^{+} 의 영향. 대한 약리학잡지, 2; 31, 1966.
 - 20) Fiske, C. H. and SubbaRow, Y.: *The colorimetric determination of phosphorus.* J. Biol. Chem., 66:375, 1925.
 - 21) Matsui, H. and Schwartz, A.: *Purification and properties of a highly active ouabain-sensitive Na, K-dependent adenosine triphosphatase from cardiac tissues.* Biochim. Biophys. Acta, 128: 380, 1966.
 - 22) Glynn, L. M.: *Adenosine triphosphatase from electric organ activated by sodium and potassium and inhibited by ouabain and oligomycin.* Biochem. J., 84:75, 1962.
 - 23) Katz, A. I. and Epstein, F. H.: *Physiologic role of sodium-potassium activated adenosine triphosphatase in the transport of cations across biologic membranes.* New Eng. J. Med., 278:253, 1968.
 - 24) 박찬웅 : Diphenylhydantoin 및 ouabain이 흰쥐 적혈구 세포막 ATPase에 미치는 영향. 대한약리학잡지, 6:1, 1970.
 - 25) Kennedy, K. G. and Nayler, W. G.: *The effect of quinidine on the activity of sodium-potassium activated, magnesium-dependent ATPase enzyme isolated from toad cardiac muscle.* Biochim. Biophys. Acta, 110:174, 1965.
 - 26) Mahler, H. R. and Cordes, E. H.: *Biological chemistry.* 7th printing, p.611, Harper & Row, Tokyo, 1969.
 - 27) Gemba, M. and Ueda, J.: *Effects of sodium and potassium ions on the ATPase activity of rat kidney mitochondria.* Japan. J. Pharmacol., 21: 263, 1971.
 - 28) Helfant, R. H., Scherlag, B. J. and Damato, A. N.: *Protection from digitalis toxicity with the prophylactic use of diphenylhydantoin sodium. An arrhythmic-inotropic dissociation.* Circulation, 36:119, 1967.
 - 29) Helfant, R. H., Scherlag, B. J. and Damato, A. N.: *The electrophysiological properties of diphenylhydantoin sodium as compared to procainamide in the normal and digitalis-intoxicated heart.* Circulation, 36:108, 1967.
 - 30) Helfant, R. H., Ricciutti, M. A., Scherlag, B. J. and Damato, A. N.: *Effect of diphenylhydantoin sodium on myocardial A-V potassium difference.* Amer. J. Physiol., 214:880, 1968.
 - 31) Scherlag, B. J., Helfant, R. H., Ricciutti, M. A. and Damato, A. N.: *Dissociation of the effects of digitalis on the myocardial potassium flux and contractility.* Amer. J. Physiol., 215:1288, 1968.
 - 32) Klein, R. L., Holland, W. C. and Tinsley, B.: *Quinidine and unidirectional cation fluxes in atria.* Circulation, Res., 8:246, 1960.
 - 33) Goodman, L. S. and Gilman, A.: *The pharmacological basis of therapeutics,* 4th ed., p.712, Macmillan, London, 1970.
 - 34) Strauss, H. C., Bigger, J. T., Bassett, A. L. and Hoffman, B. F.: *Actions of diphenylhydantoin on the electrical properties of isolated rabbit and canine atria.* Circulation Res., 23:463, 1968.