

미세 투석기를 이용한 실험적 급성 허혈 심근에 관한 연구

박성달* · 김송명*

=Abstract=

Investigation of Experimental Acute Ischemic Myocardium with a Microdialysis Apparatus

Sung Dal Park, M.D*, Song Myung Kim, M.D*

Protective effect of superoxide dismutase(SOD) and substrates on acute ischemic and reperfused myocardium was assessed by cardiac microdialysis. 30 Rabbits were divided into 4 groups; normal control group (group I, n=5), ischemic group (group II, n=5), SOD treated group (group III, n=10), and substrates treated group (group IV, n=10).

After a microdialysis apparatus was implanted in rabbit myocardium, coronary artery was occluded for 5 minutes and reperfusion was performed for 30 minutes.

Hemodynamic changes, CK-MB isoenzyme level and adenine ring compound level in effluent dialysates (equilibrated with interstitial fluid), and ultrastructural changes of myocardial cell were analysed.

Systolic blood pressure at 10 and 30 minutes after reperfusion was higher in group III and IV than in group II ($p < .05$). Also percent recovery of systolic blood pressure in group III ($p < .01$) and IV ($p < .02$) was higher than in group II. CK-MB isoenzyme level in effluent dialysates was peaked at 10 minutes after reperfusion, thereafter decreased in group II, III and IV. At 30 minutes after reperfusion, its level was lower in group III and IV than in group II ($p < .05$). Adenine ring compound level in effluent dialysates increased till 10 minutes after reperfusion and progressively decreased. At 10 and 30 minutes after reperfusion, its level was lower in group III and IV than in group II without significance. Degree of myocardial damage was estimated by scoring of mitochondrial injury. Group I was within normal range and most severe injury was seen in group II. And the score of mitochondrial injury in group III and IV was lower than in group II.

In conclusion, SOD and substrates (KMP solution) had protective effect on stunned myocardium. The microdialysis apparatus was a good device for studying stunned myocardium, and cardiac microdialysis might be a unique technique for analysis of regional intramyocardial interstitial fluid.

(Korean J Thoracic Cardiovas Surg 1993;26:441-451)

Key words : Myocardial protection, Cardiac microdialysis, SOD, Substrates

서론

* 고신대학 의학부 흉부외과학교실

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kosin Medical College, Pusan

† 본 논문은 1992년도 제 24 차 추계 대한흉부외과학회에서 구연되었음.

성인병의 발생이 증가함에 따라 심근 경색증의 이환율이나 사망율이 증가되어 가고있다¹⁾. 또한 허혈성 심근증이나 외과적 조치인 대동맥 차단이 정도와 기전의 차이는 있

Table 1. Experimental groups

Groups	No. of cases
I Normal Control Group	5
II Ischemic Group	5
III SOD Group	10
IV Substrate Group	10

SOD; superoxide dismutase

Table 2. Body weight of experimental animal

Group	No. of Cases	Body Weight (kg)
I	5	3.5 ± 0.21
II	5	3.1 ± 0.49
III	10	2.4 ± 0.59
IV	10	2.4 ± 0.37
Total	30	2.7 ± 0.61

mean ± SD

으나 허혈손상과 재관류성 손상이 필연적으로 연관되어 나타나는 유사한 변화이며, 이로 인하여 심기능 장애가 발생하여 인체의 생명을 위협하는 요인으로 근래에 주목되고 있다. 그러나 심근허혈에 대한 보호법이 아직도 명확히 확립되어 있지 않는 실정이다.

허혈심근에 대한 연구의 방법에는 여러 분야가 있으나, 저자는 superoxide dismutase(이하 SOD)와 기질용액(substrate solution)의 심근 보호효과를 검색하기 위하여 토끼의 생체에서 실험적 급성 허혈상태(stunned myocardium)를 유발하여 일차적인 심기능과 그 회복을 관찰하고, 저자가 모방 개선한 미세투석기를 심근내에 위치시켜 세포간 질액과 평형을 이룬 투석액을 채취하여 고에너지 인산염의 대사산물들과, 심근손상정도를 가장 잘 알 수 있는 특이표식자(specific marker)인 CK-MB 효소치를 세포간질액의 수준에서 정량분석한 값으로 비교하고, 심근보호법의 차이에 따른 미세 투석구조를 비교 분석하였다.

대상 및 방법

1) 실험 대상

체중 2kg 내외의 건강한 토끼 30마리를 성별에 무관하게 사용하였다. 실험동물을 4군으로 구분하여 제 1군은 정상 대조군, 제 2군은 허혈군, 제 3군은 SOD 투여군으로, 체중 kg당 6mg(18u)의 SOD를 실험 개시 12시간전에 경구 투여하였고, 제 4군은 기질(substrate)군으로 좌전

Table 3. Substrates in KMP solution

Substrates	gm/L	mMol/L
Histidine	27.94	180
Glutamine	3.80	26
Tryptophane	0.408	2
L-arginine	0.174	1

KMP: Kosin myocardial protection

하행지 결찰 5분전부터 기질용액(KMP solution)을 투여하기 시작하여 결찰중 5분과 결찰제거후 5분까지 1 ml/kg/min의 속도로 정주하였다(Table 1, 2, 3).

2) 실험 방법 (Fig. 1)

실험용 토끼의 체중을 측정후 이정맥(auricular vein)에 22G Medicut으로 정맥선을 확보하고 Pentobarbital sodium을 25mg/kg로 주사하여 전신마취를 유도하였으며 경부에 소절개를 가하여 기관을 노출시켜 기관 절개술로서 삽관하고 Harvard 소동물 호흡기에 연결하여 실험 기간동안 양압 인공호흡을 실시하였다.

혈액 가스 분석을 시행하여 동맥혈 산소, 동맥혈 탄산가스 농도와 아울러 pH가 적정하게 유지되도록 호흡량, 호흡수를 조절하고 95% 산소와 5% 이산화 탄소를 혼합한 Carboxan을 흡입공기에 사용하였다.

실험 가토의 사지에 직침을 이용한 유도를 피하여 삽입하여 실험기간동안 표준 및 사지 유도 심전도를 관찰하였다. 우대퇴 동정맥을 노출하고 18G Medicut®을 각각 삽입하여 동맥혈 가스 분석과 체동맥압을 관찰 기록하였으며 정맥관은 수액제를 주입하거나 실험용 기질용액을 주입하는데 이용하였다. 좌측 제4번 늑간 절개로 개흉하였으며 개흉후 심장의 요람을 만들어 심장을 노출하였다. 좌심실에 주머니 봉합을 한후 18G polyethylene 관으로 삽관을 실시하고 좌심방압을 측정하였다.

심근 미세 투석기는 polyurethane으로된 silica tube와 polypropylene membrane fiber로 된 투석섬유(dialysis fiber)부분으로 나누어져 있으며 강력 접착제(super glue)로 연결시켜 제조하였다(Fig. 2). 미세 투석기를 삽입하기 위하여 21G의 만곡한 주사침을 먼저 좌심실 전면부 좌전 하행지 분지 부위의 심근에 삽입하고 투석 섬유관(dialysis membrane fiber)를 주사침 속으로 통과시킨후 침을 제거함으로써 심근내에 위치시켰다. 이때 좌전하행지의 결찰 예정지에서 가능한 거리를 두었으며 심근내에 삽입된 부분이 1cm을 넘지않도록 하고, 심실내로의 경유는 피하였

Experimental protocol

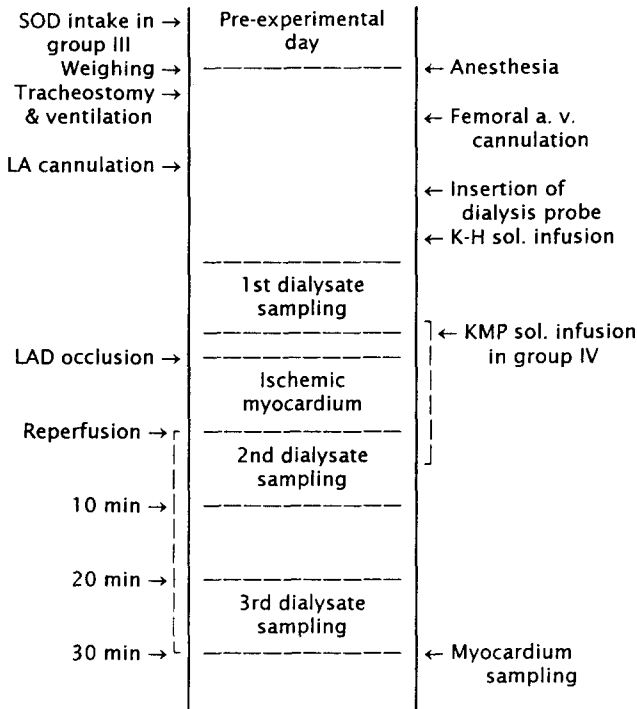


Fig. 1. A scheme representing the whole time course of experimental procedures.

다(Fig. 3). 미세 투석기를 심근내에 삽입한 후 Krebs-Henseleit 용액으로 일차 세척을 시행하고, 이후 6 ml/hr의 속도로 주입하였으며 이어서 출구로 나오는 투석액(dialysate)을 채취하여 분석 검사하였다.

투석액은 좌전하행지 결찰전에 제 1 표본액을, 5분간의 좌전하행지 결찰을 해제한후 재관류 직후 10분간 제 2 표본액을, 재관류 20분부터 30분까지 제 3 표본액을 채취하였다. 이후 다량의 KCl을 정주하여 안락사 시키고 즉시 심장을 적출하여 심근의 미세 구조 관찰을 위해 심실 중격 가검물을 채취하였다.

3) 혈액학적 측정

Physiograph (Sein)을 이용하여 심전도, 동맥압, 좌심방압을 관찰하였으며 관동맥 결찰 직전, 결찰 5분후, 재관류 10분후, 20분후, 30분후의 측정치를 기록하였다.

4) CK-MB 효소 측정

각 투석액의 CK-MB 측정은 IMX system(Abott La-

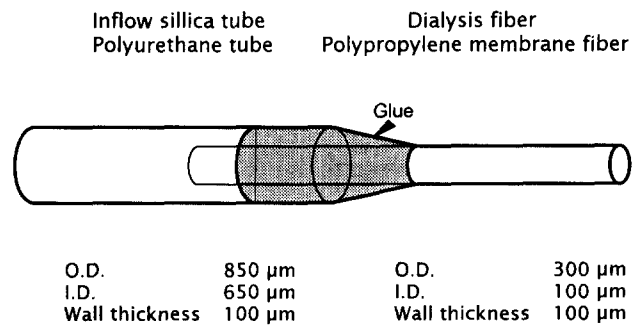


Fig. 2. Design of cardiac microdialysis probe. O.D.: outer diameter, I.D.: inner diameter

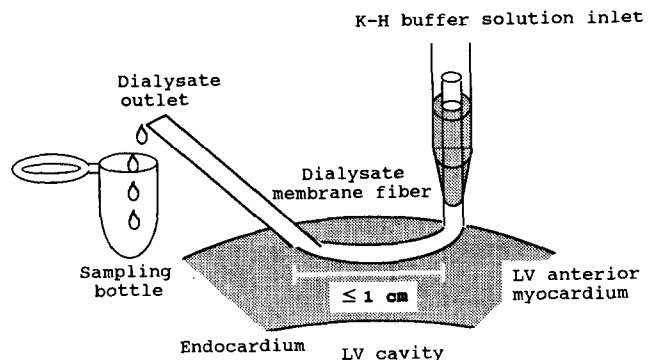


Fig. 3. In vivo experimental preparation for microdialysis: Polypropylene membrane fiber portion was implanted in LV anterior myocardium about 1 cm in length. Krebs-Henseleit solution was infused via polyurethane silica tube at a rate of 6 ml/hr and equilibrated effluent dialysate was collected.

boratories)을 사용하였으며 Anti-CK-MB coated micro-particle을 이용한 미세입자 효소 면역 측정법(Microparticle Enzyme Immunoassay, MEIA)으로 정량 분석하였다.

5) Adenine 복합체 측정

투석액 중의 Adenine 복합체의 분석은 SPECTRONIC 1001 (Milton Roy)을 이용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정한후 선형 회기분석(linear regression analysis)으로써 정량 분석하였다(상관계수 = 0.9885).

6) 심근 미세 구조 변화 관찰

적출된 심장의 심실 중격에서 채취된 심근 조직 표본은 4°C, 2.5% glutaraldehyde(in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)에 20~30분간 고정 시키고 재차 같은 고정액에 10시

Table 4. Ultrastructural criteria for scoring of mitochondria

Score	Ultrastructural features
0 Normal	
1 Mild enlargement	amorphous matrix densities scarce of absent
2 Mild to moderate enlargement	decreased matrix density disruption of cristae few amorphous matrix densities
3 Moderate to marked enlargement	decreased matrix density disruption of cristae few amorphous matrix densities
4 Megamitochondria	loss of integrity of membranes many amorphous matrix densities

간 이상 침적하였다. 고정된 심근을 1 mm³ 크기로 세절한 후 1% osmium tetroxide로 후고정하였다. 이들 조직을 50~100%에 이르는 ethanol에 탈수하고, propylene oxide에 침투시켜 Epon 812에 포매하였다. 이 Epon 블록으로 2 μm 두께의 박절편을 만들어 toluidine blue로 염색하여 광학 현미경하에서 관찰한 후 대표적인 블록을 선택하여 30~50 μm 두께의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과형 전자현미경(Hitachi 600)으로 관찰하였다.

각 군에서 2마리의 표본을 대상으로 하여, 총체적으로 핵, 미토콘드리아, 근원섬유, 글리코겐 과립, 간질, 근장세망(sarcoplasmic reticulum)의 변화를 관찰하였으며, 각 표본당 24개의 미토콘드리아를 조사하였는데, 정상을 0으로 하고 손상이 가장 심한것을 4로하여 손상의 정도를 점수로 나타내었다(Table 4).

7) 통계처리

통계자료는 평균 ± 표준편차로 표시하였고 통계처리는 컴퓨터 프로그램인 SAS (version 6.02)를 이용하였다. 유의성 검증은 Duncan's multiple range test와 student's t-test로 하였으며 유의 수준은 p value가 0.05이하로 하였다.

결 과

1) 혈역학적 변화

혈압은 수축기, 확장기 및 평균 혈압을 좌전하행지 결찰전, 결찰 5분후 재관류 10분, 20분, 30분에 각각 측정하였다. 각 군의 혈압은 좌전하행지 결찰전 이미 정상대조군에 비해 4~8 mmHg 정도 낮았으며, 좌전하행지 결찰중 급

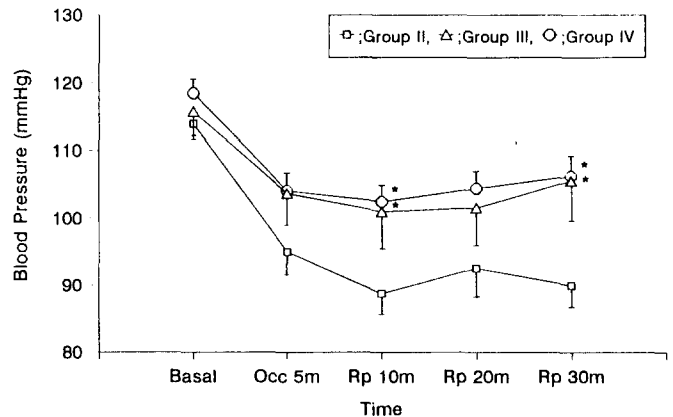


Fig. 4. Time course of change in systolic blood pressure during LAD occlusion and reperfusion (n: group II = 5, group III, IV = 10, mean ± SE). *: p < .05, vs group II.

격히 하강 하였다가 재관류 동안 각군에 따라 완만하게 지속적으로 하강하거나, 수평적 변화를 보이거나, 점차 회복되는 추세를 보였다.

i) 수축기 혈압의 변화

제 II군 허혈군은 결찰전 114.0 ± 5.75 mmHg에서 결찰 5분에 95.0 ± 8.29 mmHg, 재관류 10분에는 88.8 ± 7.75 mmHg로 최저치를 보였으며 재관류 30분에는 90.0 ± 7.94 mmHg의 성적을 보였다. 제 III군 SOD 투여군은 결찰전 115.8 ± 10.64 mmHg에서 결찰후 5분에 103.7 ± 13.28 mmHg로 II군에 비해 하강의 폭이 적었으며, 재관류 10분, 20분에서는 각각 101.0 ± 15.5 mmHg, 101.6 ± 15.8 mmHg로 수평을 이루다가 재관류 30분에는 105.6 ± 16.92 mmHg로 약간의 회복을 보였다. 제 IV군 기질 투여군은 결찰전 118.5 ± 6.44 mmHg였던 수축기 혈압이 결찰 5분후에는 104.1 ± 8.37 mmHg로 세군 중에서는 가장 완만한 하강을 보였고, 재관류 10분에는 102.5 ± 7.76 mmHg로 비슷한 정도였고, 재관류 20분에는 104.5 ± 7.98 mmHg로서서히 회복되기 시작하였으며, 재관류 30분에는 106.3 ± 9.53 mmHg로 좀더 회복되는 경향을 보였다. 수축기 혈압의 변화중 제 II군의 재관류 10분과 30분에 비교한 제 III군과 IV군의 혈압 사이에는 통계학적인 유의성이 있는 것으로 밝혀졌다(Fig. 4, p < .05).

ii) 확장기 혈압의 변화

확장기 혈압의 변화는 수축기 혈압과 비슷한 추세이나, 결찰전 각군의 혈압이 거의 동일하였으며, 제 II군에서 결찰 5분에 70.1 ± 7.79 mmHg로 급격히 감소한 후 수평적인 변화를 보였고, II, III, IV군간의 확장기 혈압차이가 수

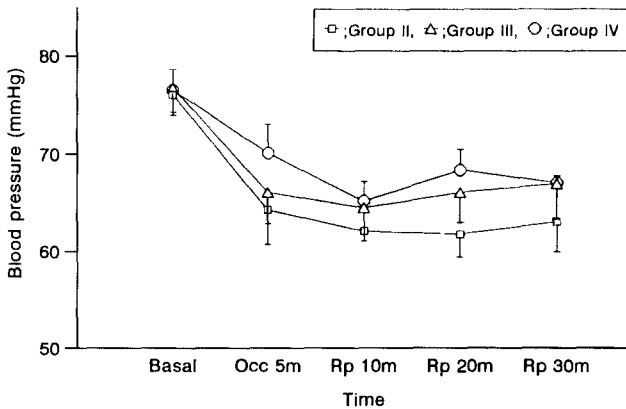


Fig. 5. Time course of change in diastolic blood pressure during LAD occlusion and reperfusion (n: group II = 5, group III, IV = 10, mean ± SE).

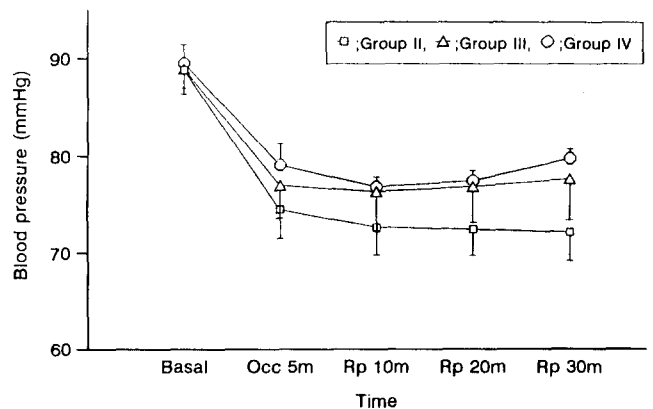


Fig. 6. Time course of change in mean blood pressure during LAD occlusion and reperfusion (n: group II = 5, group III, IV = 10, mean ± SE).

축기 혈압차이에 비해 적었으며, 각군간의 통계학적 유의성은 없었다 (Fig. 5).

iii) 평균혈압의 변화

각군간의 평균혈압의 변화는 수축기 보다는 확장기 혈압의 변화와 거의 유사하였다 (Fig. 6).

iv) 수축기 혈압의 회복율

수축기 혈압의 회복율 (BP at Rp 30 min × 100 / BP at Basal; %)은 II 군이 78.6 ± 6.92%, III 군이 91.9 ± 8.01%, IV 군이 89.0 ± 7.98%로 III 군에서 가장 좋은 회복율을 보였으며, III, IV 군이 II 군에 비해 유의하게 높은 회복율을 나타내었으나 (p < .01 vs group III, p < .02 vs group IV), III, IV 군 사이에는 유의한 차이가 없었다 (Fig. 7).

2) 투석액의 CK-MB 효소치 변화

심근손상의 지표인 CK-MB 효소치는 제 I 군이 0.36 ± 0.15 ng/ml 이었다. 제 II 군은 결찰전 0.46 ± 0.15 ng/ml 로서 대조군에 비해 20% 정도 높았으며, 재관류 10분에는 결찰 전보다 2.5배 증가한 0.92 ± 0.23 ng/ml 였고, 재관류 30분에는 0.68 ± 0.26 ng/ml 로 감소하였다. 제 III 군에서는 결찰전은 II 군과 거의 같은 0.42 ± 0.22 ng/ml 였고 재관류 10분에는 0.62 ± 0.21 ng/ml 로 상승 하였다가 재관류 30분에는 0.34 ± 0.11 ng/ml 로 결찰전 보다 오히려 낮은 값을 보였다. 제 III 군의 결찰전 CK-MB 치는 정상대조군과 거의 같은 0.34 ± 0.16 ng/ml 이었고, 재관류 10분에는 0.64 ± 0.20 ng/ml 로 증가된 후 재관류 30분에는 0.38 ± 0.16 ng/ml 로 거의 결찰전의 수준까지 감소하는 변화를 보였다. 제 III, IV 군에서 재관류 30분후의 CK-MB 효소치는

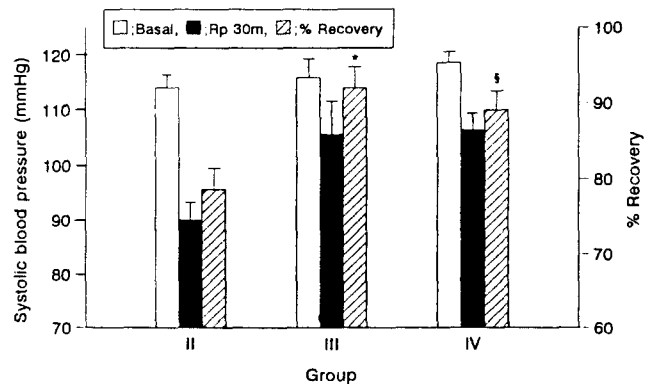


Fig. 7. Percent recovery of systolic blood pressure after 30 min reperfusion (n: group II = 5, group III, IV = 10, mean ± SE). *; p < .01, vs group II, §; p < .02, vs group IV.

제 II 군에 비해 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다 (Fig. 8, p < .05).

3) 투석액의 Adenine 복합체 농도의 변화

심근세포의 손상에 의해 adenosine 과 같은 구조의 ring 을 가진 화합물이 세포간질액으로 유출됨에 따라 간질액과 평형을 이룬 투석액으로 그 농도를 측정 한 결과, 정상대조군은 74.7 ± 1.75 mol 이었다. 제 II, III, IV 군의 표본액에서 adenine 복합체 농도의 변화는 각군 모두 재관류 10분에 증가 하였다가 이후 재관류 30분에 제 II 군은 77.5 ± 2.03 mol 로 약간 감소 하였으며, 제 III, IV 군은 거의 결찰전의 값으로 감소 하였으나, 통계적으로 유의하지는 않았

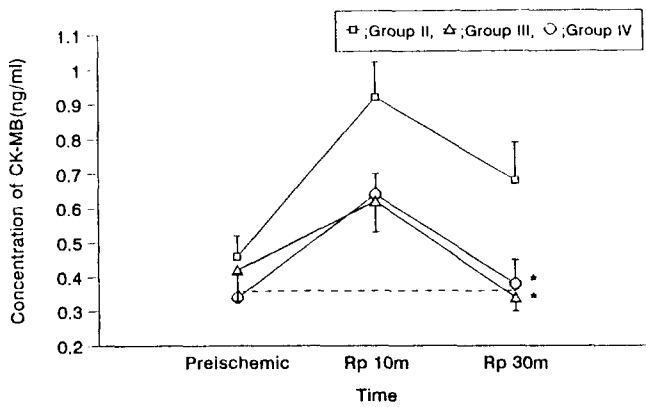


Fig. 8. Time course of change in CK-MB isoenzyme levels during LAD occlusion and reperfusion in effluent dialysate (n: group II = 5, group III, IV = 10, mean \pm SE). Dashed line indicates levels of normal control group. *: $p < .05$, vs group II.

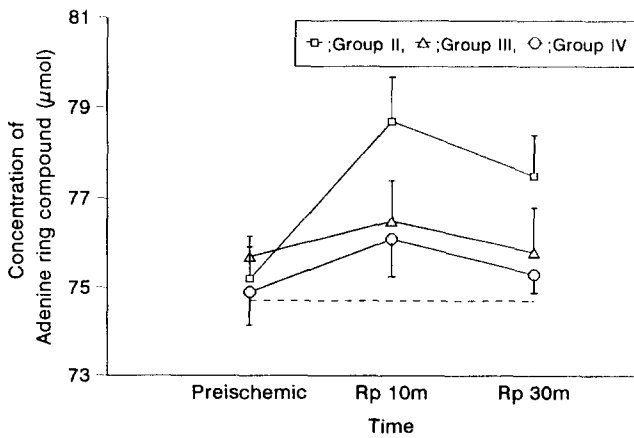


Fig. 9. Time course of change in adenine ring compound level during LAD occlusion and reperfusion. Dashed line indicates levels of normal control group (n: group II = 5, groups III, IV = 10, mean \pm SE).

다 (Fig. 9).

4) 심근 미세 구조의 변화

투과형 전자 현미경으로 각군의 심근 조직소견을 관찰한 결과 정상대조군의 경우 미세구조가 잘 보존되어 있었으며, II, III, IV군에서 특기할 만한 변화를 보이지 않았으나 미토콘드리아의 변화는 현저하였다. II군에서는 심근 부종, 근원섬유의 용해 (myofibrillar lysis)와 함께, 미토콘드리아의 심한 부종 (megamitochondria), 다량의 고전자 밀도 (electron-dense)의 침착물이 관찰되어 심근손상의 정도

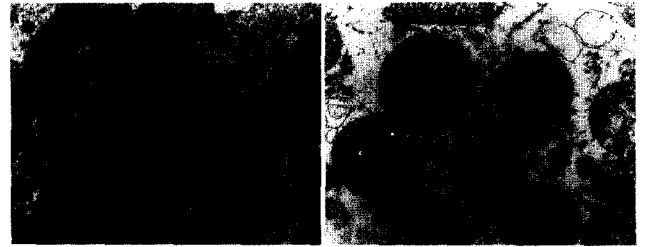
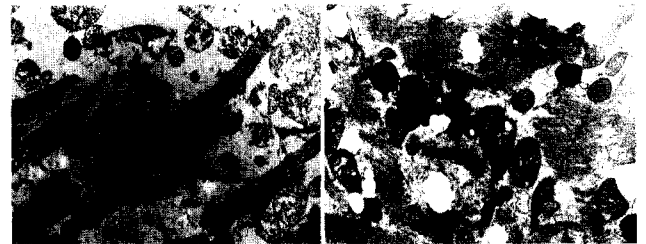
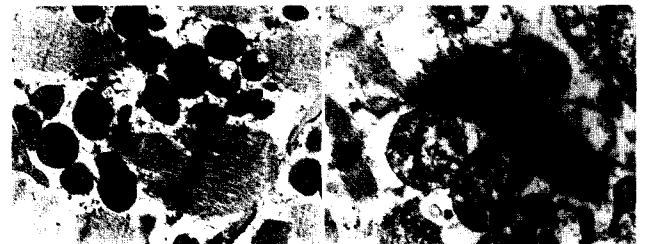


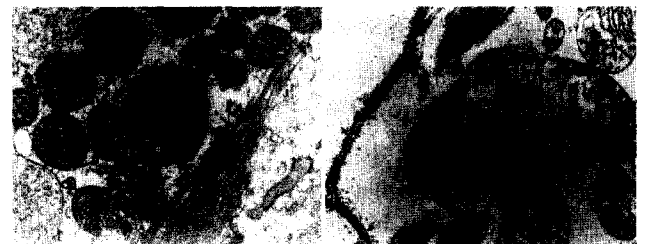
Fig. 10. Electron microscopic findings in each group. **A.** Group I: Normal nonischemic myocardium demonstrating intact sarcolemma, abundant glycogen granules, and mitochondria with densely packed cristae.



B. Group II: Severely injured myocardium showing edema of interstitium manifested by widely spaced myofilaments, and lysis of myofils. Severe swelling of mitochondria (megamitochondria) and many electron-dense deposits in mitochondria.



C. Group III: Mitochondria are mildly enlarged and cristae are disrupted. Matrix density is decreased and few amorphous electron-dense deposits are demonstrated.



D. Group IV: Slightly swollen mitochondria with cristae disruption are noted; matrix density is decreased.

가 심한 것으로 나타났고 III, IV군에서는 약간 커져있는 미토콘드리아 내에 cristae는 파괴되고 소량의 고전자 밀도

의 침착물이 관찰 되었으며, 기질의 밀도는 다소 감소 되어 있었다(Fig. 10). 또한 각군에서의 미토콘드리아의 손상 정도를 준정량적으로 표현하기 위하여 점수로 환산한 결과 I군이 0.62 ± 0.52 , II군이 2.74 ± 1.16 , III군이 2.26 ± 1.23 , IV군이 1.92 ± 1.16 으로 결찰 및 재관류를 시행한 II, III, IV군은 모두 정상대조군에 비해 정도의 차이는 있으나 좌전 하행지 결찰에 의한 stunned myocardium의 경우에서 미세구조상 심근의 손상이 있는것으로 나타났다. II군이 가장 심한 손상을 보였고 IV군이 가장 적은 손상을 보였으며, II군과 III, IV군 사이에는 손상정도의 뚜렷한 차이를 보여, II군에 비해 III, IV군에서는 심근 보호효과가 있는것으로 인정 되었다(Fig. 11).

고 찰

조직내의 혈액이 결핍된 상태를 허혈이라고 정의하고 신체조직 중에서 허혈손상에 의해 중독한 임상 증상을 초래하는 대표적인 장기중의 하나가 심장이다. 심근 허혈은 조직의 요구에 대한 관상동맥 혈류공급의 불균형에서 초래되며 조직내 산소, 기질과 에너지가 결핍되는반면, 중독한 대사 산물들이나 lactate, 탄산가스과 양자등의 제거는 오히려 불충분한 상태이다.

임상에서 발생하는 관상동맥 질환은 대부분 국소적 허혈(regional ischemia)성 변화에 기인하고, 심장외과에서 개심 수술시 필수적으로 시행하는 대동맥 차단술이나 이식을 위하여 적출 보관중인 심장은 전체적인 허혈(global ischemia)성 변화를 나타낸다. 상기의 상이한 조건의 허혈성 변화로 인하여 관동맥 혈류의 중단이 일어났을 때라도 반드시 관련 부위에 심근 경색이 일어나는 것은 아니며, 1969년 Jennings 등³⁾은 이같은 사실을 실험적으로 증명하였는데, 심근의 허혈시에는 육안적이나 현미경적으로 심하게 허혈 손상을 받은 세포 군락 부위와 정상세포에 가까운 세포 군락 부위가 혼재하는 상태의 이질성(heterogeneity)을 나타낸다고 하였으며, 이러한 현상은 이미 존재하는 손상이나 비균질화된 부혈행류에 의해서 발생할 수 있다고 하였다. 또한 전체적인 허혈때도 이질성으로 인하여 세포 손상의 정도가 다양하게 발생된다.

심근 허혈의 정도는 허혈이 지속되는 시간에 따라 가역적인 변화와 비가역적인 변화가 속발하여 일어나게 되며 실험적으로 관상동맥 혈류를 일시적으로 차단시키는 상태를 precondition(前準備), stunning, hibernation(冬眠)이라고 일컬으며 일반적으로 위와 같은 상태의 심근을 stunned myocardium¹⁾이라 지칭한다.

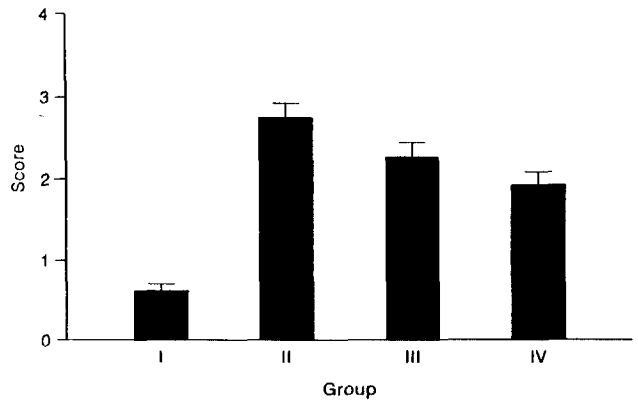


Fig. 11. Electronmicroscopic assessment to mitochondrial damage represented by score(n=48 in each group, mean ± SE).

Stunned myocardium은 미세구조의 변화없이 기능 이상을 초래할 수도 있으며, 때로는 지연성 기능회복(prolonged myocardial dysfunction)을 나타내는 정도의 심근손상을 뜻하며 Braunwald 등⁴⁾은 myocardial stunning 2주후 실시한 좌심실 조영술로서 지연성 심기능 회복례를 증명한 바가 있다. 저자가 실험적으로 유발한 stunned myocardium에서는 심근 손상의 지표가되는 mitochondria의 손상정도를 점수로 환산한 성적에 의하면, 정상보다 3~4.4배에 이르는 손상이 관찰 되었고 기능적으로도 혈압의 뚜렷한 하강이 인정되었다. 즉, 형태학적으로나 기능적으로 심근손상을 인정할 수 있었다.

저자들의 실험적 연구에 사용된 심근 미세 투석기(myocardial microdialysis apparatus)는 1984년 Sweden의 Ungerstedt⁵⁾가 생체의 뇌에서 신경전달 물질의 분비에 관한 연구를 위해 처음 사용하였고, 그후 여러 학자들에 의해 다양한 방면에서 발전되어 왔다^{6,7)}.

Van Wylen 등⁸⁾ 두개강내의 투석장치를 좀더 발전시켜 관혈류를 측정할 수 있도록 고안 하였으며, 처음으로 심근 대사의 연구에 미세 투석기를 사용하였다. 저자는 Van Wylen의 미세 투석기를 국내에서 구할 수 있는 재료로서 변형 고안하여 본 연구에 사용하였다(molecular weight cut-off: 5,000).

미세 투석기는 심근의 대사를 조사하는 유용한 장치로서 심근 세포의 세포 간질액 수준에서의 변화를 알 수 있는 특징을 가지고 있다. 미세 투석기를 심근에 장치하기 위해 21 G의 만곡한 주사침을 삽입한 후, 저자가 고안한 미세 투석기의 membrane 부위만을 심근에 위치시켰다. 이때, 심실강내로는 노출되지 않도록 세심한 주의를 기울였

으며, 관동맥 결찰 부위 이하의 심근에 위치를 정하고 결찰 부위와 일정한 거리를 유지토록 하였고, 심내막에 가까운 부위를 투석 섬유관의 최저점이 되도록 하여 전층의 심근 대사 상태가 반영되도록 하였다. 또한 미세 투석기 삽입시 심근 손상의 정도가 실험에 주는 영향을 극소화하고 안정된 성적을 얻기 위해 삽입후 약 20분간 관류한 후 실험에 필요한 투석액을 채취하였다.

임상에서 수술중 심근보호는 일차적으로 수축기 및 확장기 심실기능의 회복에 의해 판단되고, 다음으로 고 에너지 인산과 기질의 보존, 조직 지질대사나, 유리 산소기(oxygen free radicals)의 변화, 심근내의 pH 변화, 미세 구조의 보존 상태로 평가된다⁹.

허혈의 과정은 일련의 연속적 변화이나, 이를 인위적으로 분획한다면 수초이내 수개 박동이내의 즉각적 반응(immediate events), 조기 반응(early events), 늦은 반응(late events)으로 나눌 수 있다¹⁰. 즉각적 반응으로는 Ca^{2+} 이온 평형 장애, 양자(proton)의 축적등으로 수축력의 감소가 초래되며, 호기나 혐기하에서도 산화 인산화(oxidative phosphorylation)과정으로 ATP 생산이 증가 또는 계속되는 변화가 나타난다. 조기 반응으로는 미토콘드리아의 대사가 감소하고 지방산에 대한 베타-산화경로(β -oxidation pathway)를 통해 일어나는 일련의 변화도 감소한다. 지방산 이용 감소가 acetyl-CoA 유도체의 축적을 조장하고, cyclic AMP에 의한 지방분해가 활성화 된다.

조기 반응(early events)시에 양자는 아데닌 핵산(adenine nucleotides)의 붕괴로인해 생산되며, 결과적으로 양자에 의한 Ca^{2+} 이동과 근초(sarcolemma)의 변화가 유발하게 된다. 가역적 허혈 손상시는 관 혈류를 재개시키는 것이 가장 좋으며 이 시기에 streptokinase, urokinase등 혈전 용해 약물투여, 경피적 관상동맥 확장술(PTCA), 관상동맥 우회술(CABG)과 같은 치료들이 이루어 지나, 비가역적 손상일때는 재관류로 인하여 더욱 심한 손상이 초래된다. 심근의 관상혈류를 완전히 차단한 상태로 20분 이상 경과 되면 심근 경색을 얻을 수 있고, 90분 이내에는 "Wave front" 현상¹¹과 90분 이상에는 transmural infarction이 일어난다¹². 경색 부위의 크기는 실험적으로 결찰 시간과 부혈행로의 발달 정도에 의존되기 때문에, 저자는 부혈행로가 적은 토끼에서 5분간의 결찰 시간으로 실험에 필요한 허혈성 심근을 얻을 수 있었다.

본 실험에서 결찰후 재관류를 시행한 결과 혈압의 변화와 심근을 재료로한 투과성 전자 현미경 관찰성적으로 미루어 보면 가역성 심근 손상에 아울러 재관류성 심근 손상이 있었던 것으로 확인되었다. 재관류성 심근손상은 허혈

심근의 어느 부위라도 생길 수 있으나 가장 심한 부위는 심내막이다. 그 이유로서 심외막 부위는 부혈행로의 관류로 인해 재관류시 발생된 유리 산소기가 쉽게 제거되어 stunning 효과를 적게 받는 반면, 심내막에는 혈류가 거의 완전히 차단되고 부혈행로에 의한 혈류 공급도 차단되어 경색이 완전하게 일어나는 부위이기 때문이라고 설명할 수 있으며 이때에는 약제를 투여하더라도 효과를 얻을 수 없다.

Kloner 등¹³의 주장에 의하면 재관류 심근손상은 유리 산소기 발생으로인한 미세 혈관의 손상에 기인 한다고 하며 "No reflow" 현상이라고 부르기도 하였다. 유리 산소기에 의한 심근 손상의 연구는 역사적으로 1973년 Hearse 등¹⁴이 20분간의 저산소 상태후 산소를 재공급시 CK-MB 농도가 감소되었으나 100분간의 저산소 상태후 산소를 재공급하였을 때에는 CK-MB 농도가 더욱 상승한다는 데에서 비롯되었고, 그 이후 변성된 심근에 산소가 손상을 가중시킨다는 사실이 확인 되었으며, "Oxygen paradox"라고 명명한 바도 있었다. 생체내 산소 분자는 필요한 전자를 받아 들어 H_2O 로 변화되는 과정에서, 부분적으로 환원된 유리산소기(Superoxide anion, radical O_2^-)이 생길 수 있다. 이들은 화학적으로 안정되기 위해 주위의 다른 물질들과 반응하여 전자를 제공받아 안정화하는 과정에서 각종 단백질, 지질이나 핵산 혹은 효소등에 손상을 줌으로써 세포의 기능을 손상시키고 있다.

1987년 Puett 등¹⁵은 stunned myocardium내에 과산화 음이온(superoxide anion), 과산화 수소(hydrogen peroxide)와 수산화기(hydroxyl radical) 등이 증가하여 세포내의 단백질을 변성 시키고 각종 효소들이 이들의 작용에 의해 비활성화되며 불포화 지방산들은 peroxidation을 야기하여 세포막 손상에 의한 투과성을 변화시킴으로 심근 기능의 장애를 유발한다고 보고하였다. 유리 산소기 발생에 관여하는 효소로는 xanthine oxidase의 O형과 $NADP^+$ oxidase¹⁶이고 이러한 유리산소기 발생을 방지하는 약제로서 저자가 사용한 SOD와 Catalase 등을 열거할 수 있다. 연구 결과에 따라 Jolly 등¹⁷, Ambrosio 등¹⁸은 SOD의 심근 보호 효과를 인정한 반면 Gallagher 등¹⁹은 그 효과를 인정하지 않았다. 또 SOD와 Catalase의 동시 투여로 보다 좋은 심근 보호효과를 얻을 수 있었다고 주장한 학자도 있다²².

저자가 실험한 결과는 허혈군, SOD 투여군, 기질투여군 모두에서 재관류성 손상이 인지되었고, SOD 투여군과 기질투여군이 재관류성 손상 정도가 적었다는 사실에 근거하여 stunned myocardium에 대한 심근보호 작용이 SOD와 기질 모두에 있었음을 증명하였다.

저자는 L-arginine, glutamine, histidine, tryptophan이 혼합된 KMP 용액을 기질군에 투여하여 심근 보호효과를 비교하였다. KMP 용액을 사용하게된 근거로서는 허혈후 심근내의 ATP 양이 감소하고 그 중요한 인자로서 아미노산과 Krebs cycle intermediates의 농도가 감소하기 때문이라는 사실에 근거하였다.

Gluconeogenesis의 과정에 의해서 glutamine, arginine 등으로부터 형성된 glutamate는 α -ketoglutarate의 중요한 원료가 되며, 허혈 및 재관류 심근손상에 대한 glutamate의 보호효과는 이미 Lazar 등²⁰⁾의 연구에서 확인되었고, 또한 glutamate는 항암제에 의한 심근독성을 경감시키고자 하는 연구²¹⁾에서 사용되기도 하였으며, 이러한 사실은 관상동맥 환자의 심근이 glutamate를 많이 이용한다는 것으로도 뒷바침 될 수 있다²²⁾. 뿐만아니라, hypoxic rat heart에서도 glutamate와 Krebs cycle intermediates의 투여로 저산소 기간 동안 심장기능이 잘 보존 되도록 하고, 아울러 기능적 회복을 향진 시킨다는 보고가 있어, 보다 직접적인 증거가 된다²³⁾.

Tryptophan은 Kyurenine-anthranilate 경로를 통하여 주로 nicotinic acid로 분해되고, 생리적으로 활성화된 amine을 형성하기도 한다. 또한 이러한 대사과정에서 여러종류의 부산물(byproducts)이 만들어 지는데, 이들중 alanine은 glucose를 형성하여 에너지대사에 이용되며, semialdehyde는 산화되어 α -ketoapitate를 형성하고, 나아가 glutaryl CoA, acetoacetyl CoA로 되어 케톤체 산생성 에너지대사(ketogenic energy metabolism)에 이용되므로 본 실험에서는 이러한 사실을 근거로 tryptophan을 사용하였다.

Histidine은 myocardial acidosis를 지연시키고 허혈 기간동안 glycogen이 lactate로 분해되는 과정을 조장함으로 ATP의 제공을 현저히 개선시킨다²⁴⁾. 최근 1987년 Moncada 등²⁵⁾에 의해 알려진 혈관작용물질(vasoactive product)인 Nitric oxide(NO)는 과거에는 EDRF(Endothelium-derived relaxing factor)로 알려졌던 바, 이는 L-arginine으로부터 합성되어 지는 것으로 밝혀졌다^{26, 27)}.

Nitric oxide는 최근 생체의 생리 활동에 매우 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀져 관심을 모으고 있다. Acetylcholine이 혈관 내피세포에 있는 수용체와 결합하면 EDRF 즉, Nitric oxide가 만들어지며, Nitric oxide는 혈관확장 조절기전을 통하여 혈관수축 작용을 억제하고, 심근세포와 혈관 내피세포의 막 손상과 세포 손상을 방지하여 수분 손실을 안정시키는 효과가 있다²⁸⁾. 또한 Acetylcholine은 choline ester, vagus transmitter 등 심장 전체의 muscarine myocardial receptor에 작용하며 M2 muscar-

inic receptor의 활성화는 Nitric oxide의 분비를 유발한다. Superoxide radicals은 NO를 비활성화 시키고 SOD는 관상맥관계 내에서 NO의 활성을 보존하는 역할을 하며, 저자들이 기질군에서 투여한 L-arginine 등이 NO 합성 과정에 관여되고 있다는 것이 밝혀짐으로서 저자가 의도한 바, Nitric oxide의 심근 보호 효과가 반영된 것으로 생각된다.

정상세포내에는 실지로 free adenosine이 존재하지 않고 대부분 세포막에 부착되어 있으며, 또 세포내에서는 혈관에 대한 작용이 없다. 5분 허혈은 심근 adenosine 수준이 3배 가량 증가하고 이러한 현상이 반응적 총혈(reactive hyperemia)로 나타난다. 저자는 이러한 대사 기전에 근거하여 adenosine을 포함한 아데닌 환식화합물(adenine ring compound)을 검사하여 심근 손상 정도의 척도로 사용하였다. Adenosine 단독을 검사한 것은 아니나 adenosine과 같은 ring을 가진 일련의 화합물들은 ATP의 분해 산물이 주종을 이루고 있으므로 adenosine 단독 검사보다 장점일 수 있다. Adenosine의 혈관작용 효과는 Van Wylen 등⁸⁾에 의해 많은 부분이 밝혀져 있으며 심정지역에 첨가 사용함으로써 보다는 심근 보호효과가 기대되어 임상에 이용되고 있다.

심근 허혈시 조기 가역적 심근 손상은 빠른 시간내에 재관류 시킴으로서 경한 구조적 변화가 신속히 회복된다. 이에 반해 허혈 심근 손상이 심한 상태에서는 재관류로 인해 구조적 손상 정도가 더욱 심화되며, 특히 재관류 초기에 현저한 손상이 야기되어, 극심한 심근구축, 근원섬유 및 세포막의 파괴, 심한 세포 부종, 미토콘드리아내 다량의 칼슘 침착물, 미토콘드리아 파괴 등의 소견을 나타낸다.

본 실험에서 각 군간의 stunned myocardium의 미세구조를 비교하기 위해 먼저 세포핵, 미토콘드리아, 근원섬유, 글리코오겐과립의 량, 간질과 근장제망(sarcoplasmic reticulum)의 변화를 관찰하였다. 심근손상의 형태학적 지표로서 미토콘드리아의 변화를 점수로 집계한 바, 허혈군에 비해 SOD군, 기질군에서 유의하게 차이가 있었던 결과에 근거하여, 저자는 SOD와 KMP 용액내의 기질에 의한 심근 보호 작용이 있었음을 실험적으로 증명하였다.

결 론

가토 30마리를 정상 대조군(제 I군; 5마리), 허혈군(제 II군; 5마리), SOD 투여군(제 III군; 10마리), 기질 투여군(제 IV군; 10마리)으로 나누고 저자가 변형 고안한 미세 투석기를 심근에 삽입한 후 국소적 급성 허혈 및 재관류동안 혈액학적 변화, 심근 간질액과 평형 상태를 이룬 표본

액의 CK-MB 효소치 및 아데닌 환식화합물(adenine ring compound)을정량 분석하였으며 아울러 심근의 전자 현미경 소견상의 변화를 각 군간 비교 분석 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈압의 변화는 각군 모두 좌전 하행지 결찰 전보다 허혈 및 재관류시 하강한 상태로 유지되었으며, 수축기 혈압의 하강 정도가 확장기나 평균압의 변화보다 현저하였다.
2. III, IV군이 허혈군에 비해 혈압 유지가 좋았으며, 특히 재관류 10분, 30분에서의 수축기 혈압이 유의하게 잘 유지되었고, 국소 허혈이 후부하(afterload)에는 영향을 주지 않았다.
3. 심근 손상의 지표인 투석액 중의 CK-MB 효소치로 미루어보아, 허혈군에 비해 III, IV군에서 유의하게 심근 보호 효과가 있었음이 인정되었다.
4. 심근 미세구조의 변화를 관찰한 결과, II, III, IV군 모두 허혈성 및 재관류성 손상이 인정되었으며 SOD와 저자가 사용한 KMP액이 심근 보호에 효과가 있는 것으로 확인되었다.

결론적으로 SOD와 KMP액 내의 기질은 급성허혈 및 재관류성 심근 손상에 대한 보호 효과가 있었으며, 아울러 저자가 변형 고안한 미세 투석 장치가 심근의 허혈 및 재관류성 손상의 연구에 유용한 역할을 할 수 있다는 사실이 확인되었다.

References

1. Hurst JW. *Atherosclerotic coronary artery disease*. In: Hurst JW, Schlant RC, Rackley CE, Sonnenblick EH, Wenger NK. *The Heart*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Information Services Co. 1990;961-1001
2. Jennings RB. *Symposium on the pre-hospital phase of acute myocardial infarction: Early phase of myocardial ischemic injury and infarction*. Am J Cardiol 1969;24:753-65
3. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, et al. *Regional myocardial function and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs*. J Clin Invest 1975;56:978-85
4. Braunwald E, Kloner RA. *The stunned myocardium: Prolonged postischemic ventricular dysfunction*. Circulation 1982;66:1146-50
5. Hillered L, Persson L, Ponten U, Ungerstedt U. *Neurometabolic monitoring of the ischemic human brain using microdialysis*. Acta Neurochir 1990;102:91-7
6. Bolinder J, Hagstrom E, Ungerstedt U and Arner P. *Microdialysis of subcutaneous adipose tissue in vivo for continuous glucose monitoring in man*. Scand J Clin Lab Invest 1989;49:465-74
7. Nakamura M, Itano T, Yamaguchi F, et al. *In vivo analysis of extracellular proteins in rat brains with a newly developed intracerebral microdialysis probe*. Acta Med Okayama 1990;44:1-8
8. Van Wylen DG, Willis J, Sodhi J, Weiss RJ, Lasley RD, Mentzer RM Jr. *Cardiac microdialysis to estimate interstitial adenosine and coronary blood flow*. Am J Physiol 1990;258:1642-9
9. Krukenkemp IB and Silverman NA. *Cardiac mechanics and energetics: An integrated assessment of chemomechanical performance*. In: Kron IL, Mavroudis C. *Cardiac surgery*. Philadelphia: Hanley and Belfus Inc. 1990;613-4
10. Hearse DJ. *The pathophysiology of myocardial ischemia*. In: Robert AJ. *Myocardial protection in cardiac surgery*. New York: Marcel Dekker Inc. 1987;7-28
11. Reimer KA, Jennings RB. *The wave front phenomenon of myocardial ischemic cell death: Transmural progression of necrosis within the frame-work of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow*. Lab Invest 1979;40:633-44
12. 김철호, 서정돈, 이영우 등. 실험적 심근경색 model 에서 superoxide dismutase 와 catalase 투여가 심근 경색 부위와 심근장애에 미치는 영향. 순환기 1992;22:645-58
13. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. *The "No Reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog*. J Clin Invest 1974;54:1496-508 1974
14. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested perfused rat heart: A study of myocardial enzyme release*. J Mol Cell Cardiol 1973;5:395-407
15. Puett DW, Forman MB, Cates CU, et al. *Oxypurinol limits myocardial stunning but does not reduce infarct size after reperfusion*. Circulation 1987;76:678-86
16. Freeman BA, and Crapo JD. *Biology of disease: Free radicals and tissue injury*. Lab Invest 1982;47:412-26
17. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR. *Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase*. Circ Res 1984;54:227-85
18. Ambrosio G, Becker LC, Hutchins GM et al. *Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathogenesis of reperfusion injury*. Circulation 1986;74:1424-33
19. Gallagher KP, Buda AJ, Pace D, Green RA, Shlafer M. *Failure of superoxide dismutase and catalase to alter size of infarction in conscious dogs after 3 hours of occlusion followed by reperfusion*. Circulation 1986;74:1965-75
20. Lazar HL, Buckberg GD, Manganaro AJ et al. *Reversal of ischemic damage with aminoacid substrate enhancement during reperfusion*. Surgery 1980;70:2-4
21. 박성달, 김승명, 정황규. Doxorubicin에 의한 급성 심근독성과 L-Glutamate의 효과에 관한 실험적 연구. 대흉외지 1980;22:436-47
22. Mudge GH, Mills RM, Taegtmyer H, Gorlin R, Lesch M. *Alterations of myocardial aminoacid metabolism in chronic ischemic heart disease*. J Clin Invest 1976;58:1185-92
23. Haas GS, DeBoer LWP, O'Keefe DD et al. *Reduction of pos-*

- tischemic myocardial function by substrate repletion during re-perfusion.* Circulation(suppl I) 1984;70:1-50
24. Gebhard MM, Bretschneider HJ, Gersing E, Schnabel PA. *Bretschneider's histidine-buffered cardioplegic solution: concept, application and efficacy.* In: Roberts AJ. *Myocardial protection in cardiac surgery.* New York: Marcel Dekker Inc. 1987:101-6
25. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. *Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology.* Pharmacological reviews 1991;43:109-42
26. Ignarro LJ, Byrus RE, Buga GM, Wood KS. *Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical.* Circ Res 1987;61:886-79
27. Ignarro LJ. *Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein.* Circ Res 1989;65:1-21
28. Lefer AM, Tsao PS Johnson GIII. *Role of endothelium-derived relaxing factors as cardioprotective agent in myocardial ischemia.* In: Rubanyi GM, Vanhoutte PM. *Endothelium-derived contracting factors.* Basel Karger:1990:190-7
29. Johns RA. *EDRF/nitric oxide. The endogenous nitrovasodilator and a new cellular messenger.* Anesthesiology 1991;75:927-31
-