

심정지액이 백서 배양 심근세포에 미치는 영향

임진수* · 정연태**

=Abstract=

A Study on the Effect of St. Thomas' Cardioplegic Solution in the Cultured Rat Myocardial Cells

Jin Soo Im, M.D.*, Yeun Tai Chung, M.D.**

In an attempt to evaluate the effect of St. Thomas' hospital cardioplegic solution (STH I and II) on the cultured rat myocardial cells, beating rate, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (tetrazolium MTT) and lactate dehydrogenase activity were investigated, and also light and electron microscopic studies were carried out.

After rat myocardial cells were cultured for 72 hours, cells were treated with STH I or with STH II solution for 30 and 120 min. and thereafter myocardial cells were cultured in control medium for 24 hours.

The results obtained were as follows:

1. Beating rate was 154 times per min. in control group, 147 times per min. in STH I solution (for 120 min.)-treated group and 145 times in STH II solution (for 120 min.)-treated group.
2. MTT absorbances by MTT assay were 102% in STH I solution (for 120 min.)-treated group and 93% in STH II solution (for 120 min.)-treated group compared with control group.
3. The amount of lactate dehydrogenase released into the medium were 123% in STH I solution (for 120 min.)-treated group and 109% in STH II solution (for 120 min.)-treated group compared with control group.
4. In the light microscopy examination, myocardial cells showed no differences between experimental and control groups in their number and shape.
5. In the electron microscopy examination, myocardial cells treated with STH I solution showed fewer destroyed mitochondria compared to STH II solution-treated group.

These results suggest that both St. Thomas' cardioplegic solution STH I and STH II have no cytotoxicity on cultured rat myocardial cells, but STH II solution has more protective effect on myocardial cells compared to STH I solution.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 29: 365-72)

Key words : 1. Cardioplegic solutions

* 조선대학교 의과대학 흉부외과학교실

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chosun University

** 원광대학교 의과대학 해부학교실

** Department of Anatomy, College of Medicine, Won Kwang University

이 논문은 1994년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음

논문접수일: 95년 9월 25일 심사통과일: 95년 11월 6일

통신저자: 임진수, (501-140) 광주광역시 동구 서석동 588, Tel. (062) 220-3160, Fax. (062) 228-1444

서 론

개심술에 있어서 냉각 심정지액은 신속한 심정지와 심장 재관류시 심근의 손상을 최소화시키기 위하여 사용되어 왔으며 많은 종류가 개발되어 사용되고 있는 실정이다. 이중 St. Thomas' 심정지액은 일반적으로 가장 널리 사용되고 있는 심정지액중 하나이며, 고칼륨 용액에 마그네슘 및 칼슘 등이 첨가되어 있고, 급속한 심정지와 국소빈혈시 심근 손상의 위험을 줄이는데 목적이 있다¹⁾. 이들 심정지액의 기능은 개심술에 소요되는 충분한 시간을 심정지 상태로 유지시키고 동시에 재관류 후 심근 보호 효과가 커야 함은 물론이다. 그러나 아직까지 가장 좋은 심근 보호 방법이 확립되어 있지 않을 뿐만 아니라 개심술은 시간제한을 면치 못하고 있기 때문에 각 병원마다 여러 종류의 심정지액이 조제되어 사용되고 있는 실정이다. 이들 각각의 심정지액들은 나름대로 특성을 가지고 있을 뿐 아니라 pH 변화나 칼슘 농도 변화^{2,3)}, glucose 농도 변화⁴⁾ 및 aspartate 첨가⁵⁾ 등에 의하여 심근의 기능 회복이 달라지는 것으로 보고되어 있다. 따라서 이들의 기능 회복을 평가할 방법의 개발도 중요한 과제라 하겠다.

한편 심정지액의 기능을 평가하는 데는 여러 가지 방법이 있을 수 있겠으나 개 및 흰쥐 등의 적출 심장을 이용한 연구가 주종을 이루어 왔다⁵⁻⁷⁾. 그러나 적출 심장을 이용한 모델이 생체로부터 분리되어 실험에 사용해야 되기 때문에 최선의 방법이라고 할 수는 없겠다. 최근에 심근 세포 배양법을 이용한 독성 실험 모델이 제시되었으며 Kessler-Icekson 등⁸⁾이 최초로 백서 심근 세포를 배양하여 심근 세포 박동을 측정하였고, Takahashi 등⁹⁾과 Kim¹⁰⁾은 심근 세포 박동을 심장 독성의 측정 지표로 보고하였으며, 그 외에도 독성 물질의 영향에 대한 많은 연구가 시행된 바 있다. 배양 세포를 이용한 실험은 분화가 활발하고 외부의 독성 물질에 매우 민감하게 반응하기 때문에 동물 실험에 비하여 단시간 내에 독성을 검정할 수 있고, 비교적 일정한 실험 조건을 갖추기가 용이하며 반복 실험 및 실험 결과의 수치화가 가능하기 때문에 독성 물질의 검정에 매우 효과적으로 이용되고 있다^{11, 12)}. 이러한 독성 검정에는 세포의 기능⁹⁾, 생화학적 검정¹³⁾ 및 형태학적 관찰을 통하여 보다 객관적이고 정확한 결과를 얻는 것이 필요하다.

본 연구에서는 개심술시 사용되는 심정지액의 심근 세포 보호 효과를 평가하는데 있어서 기준이 되는 방법을 제시하고자 시험관내 배양 세포를 이용한 모델을 사용하였고, 임상 분야에서 흔히 이용되고 있는 St. Thomas' 심정지액 I과 II의 효과를 비교하여 백서 배양 심근 세포에 대

한 심근 보호 효과를 관찰함과 동시에 앞으로 더욱 이상적인 심정지액을 개발하기 위한 기초 자료를 얻고자 이들 심정지액을 배양 심근 세포에 처리한 후 정상 배양액으로 교환하여, 심근 세포 박동수 조사와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(이하 MTT라 함) 정량 및 LDH 정량을 시행하였다. 이러한 기능적, 생화학적 정량분석과 병행하여 손상된 배양 심근 세포의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 광학 및 전자현미경적 관찰을 시행하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

본 실험에 사용한 심근 세포는 생후 1~3일째의 Sprague-Dawley 계통의 백서 심장에서 분리 배양하였다. 백서의 흉부 정중선을 따라 절개한 후 심장을 적출하고 심실만을 분리하여 잘게 잘라 직경 100mm 배양용 petri dish(Nunc)에서 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 후 4℃의 0.125% trypsin-0.1% collagenase 용액에서 하룻밤 방치하고, 다음날 37℃ shaking water bath(Precision-Co.)에서 60회/분으로 10분간 진탕하여 세포를 분리하였다. 배양액은 Earle's balanced salt solution(EBSS, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)을 넣어 사용하였다. 분리된 세포를 2시간 동안 배양하면 먼저 내피 세포가 petri dish에 부착하므로, 부착되지 않은 세포만을 모아서 24 well plate(Nunc)에 1×10^5 cells/well로 분주하였다. 분주한 심근 세포는 37℃, 5% CO₂ 정온기(Bellco)에서 배양하였으며, 24시간 배양하여 심근 세포가 24 well plate 바닥에 완전히 부착된 후 72시간이 경과하여 심근 세포의 동시 박동이 관찰되면 실험에 사용하였다.

2. 심정지액 처리

본 실험에 사용한 심정지액은 현재 흉부외과에서 사용되고 있는 St. Thomas' cardioplegic Solution I과 II를 조제한 후 일정 시간(30분 및 120분) 처리하였으며 대조군으로는 심정지액 대신 PBS(Phosphate buffered saline)를 120분간 처리하였고, 심정지액의 조성^{14, 15)}은 다음 표와 같다(Table 1).

3. 세포 독성 검정

1) 심근 세포 박동수 조사

대조군과 심정지액 처리군을 분주한 후 72시간 배양하고 전체 심근 세포가 규칙적으로 박동 하는 것을 확인한

Table 1. Composition of the St. Thomas' hospital cardioplegic solutions

	STH I (mmol/L)	STH II (mmol/L)
Sodium chloride	144.0	110.0
Potassium chloride	20.0	16.0
Magnesium chloride	16.0	16.0
Calcium chloride	2.0	1.2
Sodium bicarbonate		10.0
Procaine hydrochloride	1.0	
pH	5.5~7.0	7.8
Osmolarity (mOsmol/kg H ₂ O)	300~320	285~300

STH : St. Thomas Hospital Solution

다음, 배양액을 제거한 후 PBS를 처리한 군을 대조군, 심정지액을 처리한 군을 실험군으로 하여 각각 30분 및 120분이 지난 후 배양액으로 교환하고 다시 24시간이 경과한 후, 도립위상차 현미경에 설치된 온도와 CO₂ 농도가 정온기와 같은 상태로 유지되는, 소형 chamber (Nikon, NP-2) 내에서 대조군과 실험군 모두 동일한 시간대에 1분 동안의 심근 세포 박동수를 8회 반복 측정하여 평균치를 구하고 이를 대조군과 비교 조사하였다.

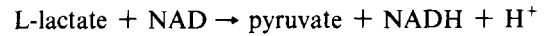
2) MTT 정량

대조군과 실험군들의 well에 대하여 MTT 정량을 실시하였고, MTT 정량은 Mosmann의 방법¹²⁾에 따랐다. 즉 심근 세포를 심정지액으로 30분 및 120분간 처리하고, 정상 배양액으로 교환하여 다시 24시간 배양한 후 상층액을 버리고 사용 당일 제조한 500µg/ml MTT를 배양용기당 1ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 37°C, 5% CO₂로 유지된 정온기 내에서 배양하였다. 배양 완료 후 세포 내의 formazan을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck)를 배양용기당 1ml씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 흡광 광도계로 503nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

3) Lactate dehydrogenase (LDH) 정량

배양액 내로 유출된 LDH 정량을 위하여 심근 세포를 심정지액으로 30분 및 120분 처리한 다음 정상 배양액으로 교환하여 24시간 배양한 후, 각 well의 상층액을 tube에 담아 1,000rpm으로 7분간 원심 분리시키고, tube의 부유액을 검체량 50ml와 효소기질액 kit인 LD-L (Gilford) 1.0ml를 섞어 30°C, 340nm에서 Gilford-Impact 400E로 측정하였다.

측정 원리는 다음과 같다.



Lactate dehydrogenase 활성도는 340nm에서 NADH양을 측정함으로써 간접적인 방법으로 구하였다.

4. 심근 세포의 형태학적 관찰

1) 광학 현미경적 관찰

심정지액을 처리한 심근 세포의 형태학적 변화를 조사하기 위하여 PBS와 심정지액을 30분 및 120분 동안 처리하고 다시 24시간 동안 배양액에서 배양한 후, 배양 중인 배양 용기 (well plate)를 도립위상차 현미경 (Nikon)으로 관찰하였고, 필요시 부착된 사진기로 촬영하였다.

2) 전자현미경적 관찰

세포의 전자현미경적 관찰을 위하여 30분 및 120분 동안 심정지액을 처리하고, 정상 배양액으로 교환한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 세포 배양 용기의 배양액을 버리고 PBS로 2회 세척하였다. 세척한 세포들을 1M phosphate 완충액 (pH 7.4)으로 조절된 1% glutaraldehyde 용액에 1시간 전고정한 후 같은 완충액으로 조절된 2% osmium산에 1시간 후고정하였다. 고정된 세포를 PBS로 씻은 후, ethanol과 epon 동량 혼합액에서 1시간 침투시키고 epon 혼합액에 포매하였다. 포매된 세포는 35°C, 45°C, 60°C 오븐 내에서 각각 24시간씩 방치시켜 중합을 완료하였다. 중합이 완료된 epon 블럭을 작은 조각으로 자른 후, ultramicrotome (LKB)으로 80nm내의 두께의 초박 절편을 얻어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하고, Hitachi H-600 전자현미경으로 75kv 가속 전압하에서 관찰하였다.

5. 통계처리

세포 독성 검정을 위하여 3회 측정된 결과를 평균하였으며 대조군과 실험군 사이의 통계학적 분석은 ANOVA test를 하였고, 각 군간의 유의성은 다중 검사로 Scheffe 방법을 이용하여 P 값이 0.05이하일 때, 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 심근 세포 박동수

본 실험에 사용한 백서 심근 세포의 박동수는 대조군의 경우, 분당 154회로 나타났으며, St. Thomas' I 심정지액을 30분 처리한 실험군에서는 150회, 120분 처리 군에서는 147회 박동하였고, II 정지액을 30분 처리한 실험군에서는

Table 2. The beating rate, MTT* assay and the amount of LDH** into the medium of cultured rat myocardial cells treated with cardioplegic solutions and control medium

		Beating rate (% of control)	MTT* (% of control)	LDH* (% of control)
control		154 ± 10.8(100.00)	1.136 ± 0.031(100.00)	12.98 ± 0.81(100.00)
St.Thomas' cardioplegic solution	I(30min.)	150 ± 8.2(97.40)	1.148 ± 0.045(101.06)	13.75 ± 1.47(105.93)
	I(120min.)	147 ± 5.1(95.45)	1.155 ± 0.053(101.67)	15.98 ± 3.60(123.11)
	II(30min.)	150 ± 8.9(97.40)	1.112 ± 0.077(97.89)	14.68 ± 3.48(113.10)
	II(120min.)	146 ± 7.7(94.81)	1.055 ± 0.056(92.87)	14.13 ± 2.73(108.86)

* Beating rate(beats/min), MTT(Absorbance), LDH(Wroblecki-Ladue unit)

The values are mean ± SD

MTT*: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

LDH**: Lactate Dehydrogenase

150회, 120분 처리군에서는 146회로 나타나 약간의 감소를 보였으나 유의한 차이는 없었다(Table 2).

2. MTT정량

심근 세포내 미토콘드리아의 활성을 나타내는 지표인 MTT정량을 위하여 심정지액을 30분과 120분간 처리한 결과 심정지액 I 처리군에서는 30분 및 120분 처리군 모두 대조군의 101%로 나타났으며, II 처리군에서는 30분 처리군이 97%, 120분 처리군이 92%로 나타나서 I 처리군이 약간 높았으나 통계학적 유의성은 없었다(Table 2).

3. 배양액 내로 유출된 LDH양

심근 세포로부터 배양액 내로 유출된 LDH양을 정량한 결과 I 처리군에서는 30분 처리군이 대조군의 105%, 120분 처리군이 123%로 나타났으나, II 처리군은 30분 처리군이 113%, 120분 처리군이 108%로 나타나서 I 처리군이 약간 높았다($p < 0.05$) (Table 2).

4. 형태학적 관찰 소견

1) 광학현미경적 관찰 소견

광학현미경적 관찰 결과 돌기들이 잘 발달되어 있었고, 많은 세포들이 군집을 형성하고 있었으며, 심정지액을 처리한 백서 배양 심근 세포의 형태는 심정지액 I 처리군(Fig. 1B) 및 II 처리군(Fig. 1B) 모두 대조군(Fig. 1A)에 비하여 세포수 및 형태에 있어서 별다른 차이를 보이지 않았다.

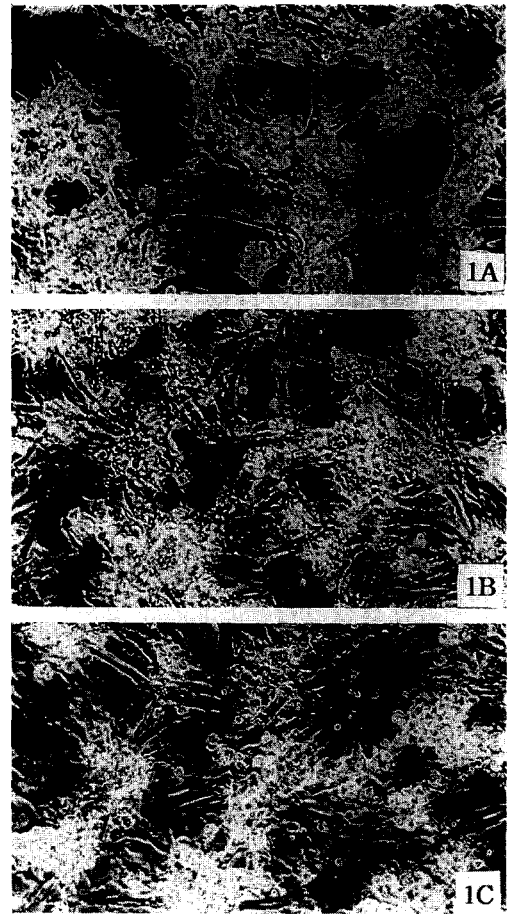


Fig. 1. Inverted phase contrast photomicrograph of cultured neonatal rat myocardial cells in the control medium(A), and exposed to St. Thomas' cardioplegic solution I (B) and II (C) for 120 min. respectively. X 1,000.

No difference in the cell number and morphology.

2) 전자현미경적 관찰 소견

대조군의 전자현미경적 관찰 소견에서는 전형적인 심근 세포의 특징을 잘 관찰할 수 있었다. 즉, 타원형의 핵과 세포질 내에 많은 근원 세사가 관찰되었으며 이들 사이에서 뚜렷한 Z대가 관찰되었다. 그리고 근원 세사 사이에 비교적 크고 간상인 미토콘드리아가 관찰되었으며, 다수의 당원 과립도 볼 수 있었다(Fig. 2A). 또한 인접한 심근 세포들 사이에서 간극 결합이 관찰되기도 하였다(Fig. 2B). 심정지액 처리군에 있어서도 미세구조적인 변화에 대한 뚜렷한 소견은 관찰할 수 없었으나 심정지액 I 처리군에서 소수의 미토콘드리아가 관찰되어(Fig. 3A, B), 비교적 대조군과 유사한 소견을 보인 II 처리군(Fig. 4A, B)과는 차이를 보였다.



Fig. 2. Electron micrograph of cultured neonatal rat myocardial cells in the control medium for 98 hours. Nucleus (N), mitochondria (M), myofibrils (MF), glycogen granules (G) and gap junctions (arrow) are seen. X 23,000

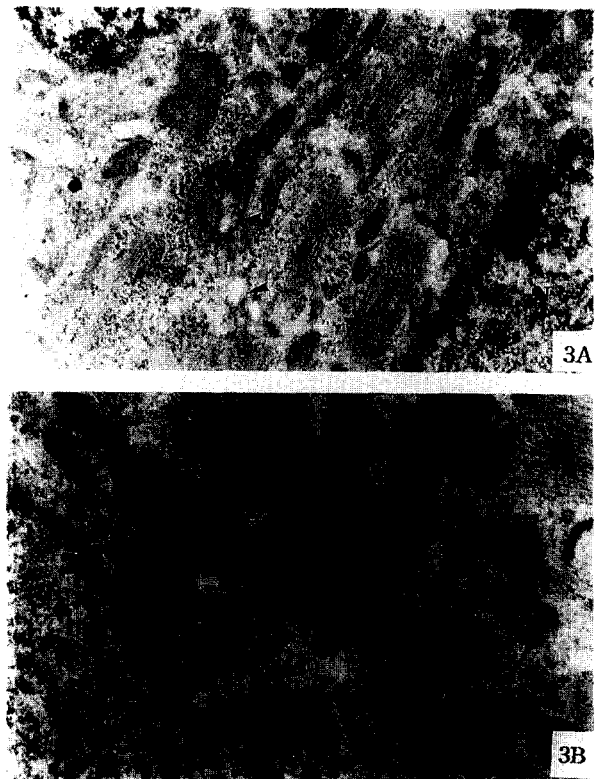


Fig. 3. Electron micrograph of cultured neonatal rat myocardial cells in the control medium for 72 hours. Cells were exposed to St. Thomas' cardioplegic solution I for 120 min. and after maintained in the control medium for 24 hours. Nucleus (N), myofibrils (MF) and few destructed mitochondria (arrow heads) are observed. X 23,000

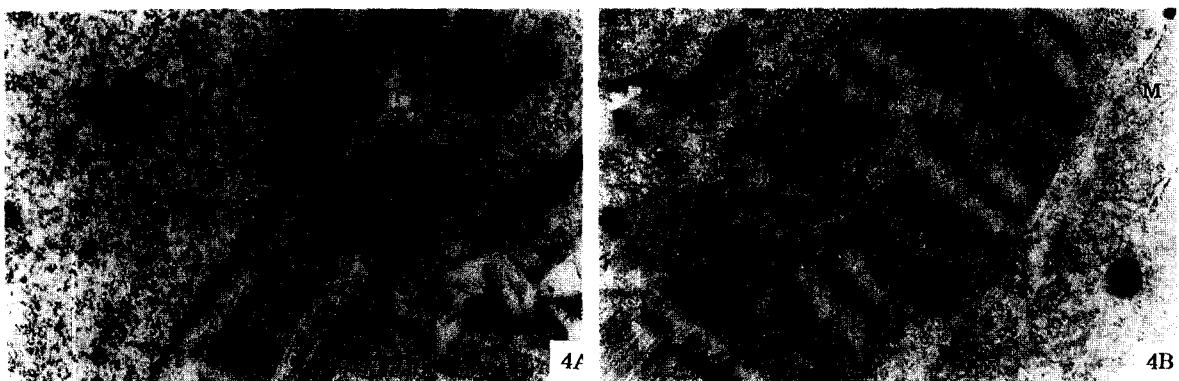


Fig. 4. Electron micrograph of cultured neonatal rat myocardial cells in the control medium for 72 hours. Cells were exposed St. Thomas' cardioplegic solution II for 120 min. and after maintained in the control medium for 24 hours. Nucleus (N), mitochondria (M) and myofibrils (MF) are observed. X 23,000

고 찰

심장외과 영역의 발달로 개심술이 보편화되고 좋은 결과를 얻고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾. 심근 보호 효과에 대한 실험적 평가 방법으로 다양한 실험 동물의 적출 심장이 이용되고 있으나, 배양 세포를 이용한 모델을 이용하는 방법도 여러가지 측면에서 잇점이 있으리라 생각된다. 현재 사용되고 있는 심정지액은 매우 다양한 종류들이 조제되어 사용되고 있으며 이들의 개선을 위한 노력들이 진행 중에 있으나 심정지액의 가장 중요한 기능은 심근 보호라 할 수 있으므로 심정지액의 평가 또한 이러한 점에 초점이 맞추어져야 한다 하겠다. Hultgren 등¹⁹⁾은 정상 관상동맥을 가진 환자에서 개심술을 실시한 환자중 수술 중에 발생하는 급성 심근 경색 환자는 7%가 된다고 하였다. 이러한 임상 경험을 통하여 개심술중에 발생하는 허혈성 심근 손상에 대한 관심이 고조되어서 심정지와 심근 보호에 관한 임상적 연구가 활발하게 진행되어 왔다. Takemoto 등¹¹⁾의 보고에 의하면 정상 체온 하에서 심정지시, 고칼륨 심정지액에 있어서 마그네슘과 칼슘의 심근 보호 효과는 상호 연관 관계가 있는 것으로 보고되어 있다. 임상에서 널리 사용되고 있는 고칼륨 심정지액의 이온 조성은 심근 세포 보호 효과와 밀접한 관계가 있으며, 또한 세포내의 칼슘은 세포막의 생리적 성질에 영향을 미치고, 낮은 칼슘 농도는 세포막 투과성을 증가시키는 것으로 보고^{20, 21)}되어 있고, 국소빈혈시 세포내 칼슘 항상성이 유지되지 못하는 것이 재관류시 심근 세포 손상의 주된 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 또한 칼슘 농도와 pH 변화에 따른 심근 세포 회복의 변화²²⁾나 칼슘의 존재 유무에 따른 심근 기능 회복 효과와 칼슘이 포함되지 않은 심정지액을 이용한 연구²³⁾ 및 칼슘 농도에 따른 심근 세포 회복 실험에서 칼슘이 1.2mmol이나 그 이하 농도일때 효과적이라는 보고²³⁾ 등으로 보아 칼슘 농도의 조절을 통한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 마그네슘은 칼슘 channel을 통한 칼슘 유입을 경쟁적으로 저해하기 때문에 세포내 칼슘의 증가를 억제하고²⁴⁾, 칼륨 channel을 안정화시켜 세포내 칼륨의 유출을 저해한다는 보고²⁵⁾도 있으며, 그 외에 미토콘드리아의 기능 손상을 방지하고²⁶⁾ 많은 대사 경로에 있어서 조효소로서의 작용을 하고 있다^{27, 28)}. 뿐만 아니라 aspartate의 첨가에 의하여 미토콘드리아의 손상이 최소화되었다는 보고⁵⁾와 같이 aspartate 첨가에 의한 미토콘드리아 손상 유무나, glucose 농도에 따른 pH 변화⁴⁾ 등의 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 심근 세포는 자동성을 가지고 있어서 분리 배양 중에도 박동을 시작하고 일정 시간이 경과한 후에는

전체 세포가 동시 박동을 하게 된다²⁹⁾. Takahashi 등⁹⁾은 심근 세포의 박동수를 심장 독성의 지표로 삼을 수 있다고 보고하였으며, 상기 실험에서 사용한 생쥐 심근 세포는 배양 24시간 후 분당 134회 박동하였으나 본 실험에 사용한 백서 심근 세포에서는 154회로 나타나서 생쥐 심근 세포 보다는 더 빠른 박동수를 보였다. 본 실험에 사용한 심정지액에 있어서는 심정지후 2시간이 경과한 후 심근 세포 박동수에 있어서 대조군에 비하여 90% 이상의 회복을 보임으로서 우수한 회복 효과를 나타내었다.

본 연구에 사용된 MTT 정량에 의한 세포 독성 검정은 Mosmann¹²⁾에 의하여 처음으로 화학 약제 등의 독성 검사에 이용되었다. 이는 용해성 tetrazolium MTT가 미토콘드리아 내막에 존재하는 succinic dehydrogenase(SDH)에 의하여 불용성인 청색 formazan을 생성하는데 이를 유기 용매로 용해시켜 흡광도를 측정한 후, 대조군과 비교 분석하는 방법으로 MTT 분석 결과는 세포 기관 내의 효소인 SDH 활성, 나아가서 미토콘드리아의 활성을 반영하고, 이는 곧 세포 전체의 활성을 나타내는 것으로 볼 수 있기 때문에 세포의 독성 검정에 널리 이용되고 있다. 미토콘드리아 내의 효소 활성의 측정 지표인 MTT 정량 결과에 대해서도 대조군의 90% 이상 회복되는 것으로 나타났다. 한편 세포질 내에 존재하는 lactate dehydrogenase(LDH)는 세포의 사멸이나 세포막의 손상으로 인하여 배양액 내로 유출되므로⁹⁾, 배양액 내의 LDH 양을 측정하여 대조군과 비교함으로써 세포의 사멸 내지 세포막의 손상 정도를 간접적으로 파악할 수 있는 지표로 사용되고 있다. LDH정량 결과에 대하여 STH I 처리군에서 약간 높은 결과를 보임으로서 STH II 처리군에 비하여 세포막 손상이 심한 것으로 생각된다. 그러나 심근 세포에 독성이 큰 adriamycin³⁰⁾ 및 bupivacaine¹⁰⁾ 처리 결과와 비교하였을때 배양액 내로 유출된 LDH의 양은 매우 낮은 수준으로 나타나서 심근 세포의 세포막에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 생각된다.

광학현미경적 관찰 결과 대조군과 심정지액 처리군 사이에 별다른 차이가 없는 것은 적어도 광학현미경적으로는 심정지액이 심근 세포에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났으며, 심정지액 처리 전과 유사한 형태를 보이는 것으로 보아 기능상의 영향도 크지 않을 것으로 생각된다.

전자현미경적 관찰 결과에서도 STH I 처리군에 있어서 미토콘드리아의 파괴가 관찰되었을 뿐 다른 소견은 대조군과의 차이가 관찰되지 않아서 큰 손상이 없었음을 알 수 있으나, 고농도의 칼륨을 포함한 심정지액 처리시 미토콘드리아 및 근원 섬유의 감소를 초래하였다는 보고³¹⁾로

보아 미토콘드리아의 손상을 형태계측학적으로 추구할 필요가 있을 것으로 생각된다.

STH I과 STH II의 차이는 procaine과 sodium bicarbonate의 유무이다. Procaine은 심근 세포막을 안정화시키며³²⁾, sodium bicarbonate는 pH를 조절하기 위한 것으로 알려져 있으나, 심근 세포내 pH가 산성일 때가 알칼리성일 때에 비하여 심근 세포의 회복이 우수하였다는 보고³³⁾로 보아 심정지액 조성에 약간의 변화를 주어 pH를 조절하고 이에 따른 회복 정도를 추구할 필요가 있을 것으로 생각된다.

본 연구 결과 STH I 처리군에서 소수의 미토콘드리아 파괴가 관찰되는 것으로 보아 STH II 심정지액이 STH I 심정지액에 비하여 심근 보호 효과가 우수한 것으로 생각된다.

결 론

St. Thomas' 심정지액 I과 II가 백서 배양 심근 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 심장박동수, MTT 정량, LDH 정량 및 형태학적 관찰을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 심근 세포 박동수는 대조군이 분당 154회, St. Thomas' 심정지액 I에 120분 처리한 실험군에서는 146회, II 처리군에서는 145회로 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다.
 2. MTT 정량 결과 St. Thomas' 심정지액 I 처리군에서는 대조군의 102%로 나타났으며, II 처리군에서는 92.7%로 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다.
 3. LDH 정량 결과 St. Thomas' 심정지액 I 처리군에서는 대조군의 123%로 나타났으며, II 처리군에서는 109%로 약간의 증가를 보였다.
 4. 광학현미경적 관찰 결과 세포수 및 세포 형태에 있어서 대조군과 실험군간에 차이를 보이지 않았다.
 5. 전자현미경적 관찰 결과 St. Thomas' 심정지액 I 처리군에서는 소수의 미토콘드리아 파괴가 관찰되었으며, II 처리군에서는 대조군과 유사한 소견을 보였다.
- 이상의 실험결과를 종합하여 볼 때, St. Thomas' 심정지액 I과 II는 백서 배양 심근세포에 세포 독성을 나타내지 않았으나, 전자현미경적 관찰 결과 심정지액 II가 심정지액 I에 비하여 심근 보호 효과가 더 양호한 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Takemoto N, Kuroda H, Hamasaki T, Hara Y, Ishiguro S, Mori T. *Effect of magnesium and calcium on myocardial protection by cardioplegic solutions.* Ann Thoracic Surg 1994;57:177-82
2. Nakanishi T, Seguchi M, Tsuchiya T, Yasukouchi S, Takao A. *Effect of acidosis on intracellular pH and calcium concentration in the newborn and adult rabbit myocardium.* Circ Res 1990;67:111-23
3. Iannettoni MD, Bove EL, Fox MH, Groh MA, Bolling SF, Gallagher KP. *The effect of intramyocardial pH on functional recovery in neonatal hearts receiving St. Thomas' hospital cardioplegic solution during global ischemia.* J Thorac Cardiovasc Surg 1992;104:333-43
4. Owen P, du Toit EF, Opie LH. *The optimal glucose concentration for intermittent cardioplegia in isolated rat heart when added to St. Thomas' hospital cardioplegic solution.* J Thorac Cardiovasc Surg 1993;105:995-1006
5. Choong YS, Gavin JB, Buckmann J. *Long-term preservation of explanted hearts perfused with L-aspartate-enriched cardioplegic solution.* J Thorac Cardiovasc Surg 1992;103:210-8
6. Kawakami T, Watanabe F, Takahashi J, Mats M. *Cardiac function study of the isolated canine heart by use of newly designed perfusion apparatus.* JJATS 1981;29:41-7
7. Liedtke AJ, Hughes HC, Neely JR. *An experimental model for studying myocardial ischemia.* J Thorac Cardiovasc Surg 1975;69:203-11
8. Kessler-Icekson G, Sperling O, Rotem C, Wasserman L. *Cardiomyocytes cultured in serum-free medium-Growth and creatine kinase activity.* Exp Cell Res 1984;155:113-20
9. Takahashi K, Fujita Y, Mayumi T, Kishi T. *Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells.* Chem Pharm Bull 1987;35:326-34
10. Kim YI. *Cytotoxicity and recovery of bupivacaine in myocardial cells of neonatal rat in vitro.* Kor J Anat 1994;27:385-98
11. Carmichael J, Dectraff WB, Gazder AF, Minna JD, Mitchell JB. *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay: assessment of radiosensitivity.* Cancer Res 1987;47:943-6
12. Mosmann T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays.* J Immunol Meth 1983;65:55-63
13. Galli CL, Viviani B, Marinovich M. *Cell cultures. A tool for the study of mechanisms of toxicity.* Toxicol in Vitro 1993;7:559-68
14. Braimbridge MV. *European origins of cardioplegia.* In: Engelman RM, Levitsky S. *A Textbook of Cardioplegia for Difficult Clinical Problems.* 2nd ed. New York: Futura Publishing Co. 1992;9-16

15. 최종범, 임태근, 윤재도, 최순호, 최봉규. 백서의 적출된 심장에서 심정지액의 산소화가 허혈성 심정지후 심기능의 회복에 미치는 영향(II). 대흉외지 1992;25:1391-8
16. Adams PX, Cunningham JW, Trahan NK, Brazier JR, Reed GE, Spencer FC. *Clinical experience using potassium-induced cardioplegia with hypothermia in aortic valve replacement*. J Thorac Cardiovasc Surg 1978;75:564-8
17. Craver JM, Sams AB, Hatcher CR. *Potassium-induced cardioplegia*. J Thorac Cardiovasc Surg 1978;76:24-7
18. Sondergaard T, Berg E, Staffeldt I, Szczepanski K. *Cardioplegic cardiac arrest in aortic surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg 1975;16:288-90
19. Hultgren HN, Mijagawa M, Vertrees RA et al. *Safety of prolonged ischemic arrest using hypothermic cardioplegia*. J Thorac Cardiovasc Surg 1980;79:705-11
20. Gordon LM, Sauerheber RD, Esgate JA. *Spin label studies on rat liver and heart plasma membranes: effects of temperature, calcium and lanthanum on membrane fluidity*. J Supermol Struct 1978;9:299-326
21. Ramussen H, Goodmann DP. *Relationship between calcium and cyclic nucleotides in cell activation*. Physiol Rev 1977;57:421-509
22. Boggs BR, Torchiana DF, Geffin GA, et al. *Optimal myocardial preservation with an acalcemic crystalloid cardioplegic solution*. J Thorac Cardiovasc Surg 1987;93:838-46
23. Robinson LS, Harwood DL. *Lowering the calcium concentration in St. Thomas' hospital cardioplegic solution improves protection during hypothermic ischemia*. J Thorac Cardiovasc Surg 1991;101:314-25
24. Iseri LT, French JH. *Magnesium: nature's physiologic calcium blocker*. Am Heart J 1984;108:188-93
25. Hearse DJ, Stewart DA, Braimbridge MV. *Myocardial protection during ischemic cardiac arrest. The important of magnesium in cardioplegic infusates*. J Thorac Cardiovasc Surg 1978;75:877-85
26. Sunamori M, Suzuki A, Harrison CE. *Effect of magnesium in cardioplegic solution upon hypothermic ischemic myocardial mitochondria*. Jpn Circ J 1980;44:81-6
27. Polimeni PI, Page E. *Magnesium in heart muscle*. Circ Res 1973;33:367-74
28. Chao DLS, Davis DJ. *Studies on the role of Mg^{++} and Mg^{++} stimulated adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation*. Biochemistry 1972;11:1143-52
29. Goshima K, Tonomura Y. *Synchronized beating of embryonic mouse myocardial cells mediated by FL cells in monolayer culture*. Exp cell Res 1969;56:387-92
30. Chung YT, Choi MK, Kim JM, Park ST. *A study on the cytotoxicity of adriamycin on cultured rat myocardial and endothelial cells*. Chonnam J Med Sci 1988;1:128-38
31. Li Q, MacAulay MA, Landymore RW, Marble A, Dean S, Fris J, Kerstein F. *Morphometric analysis on myocardial injury related to the use of high volume potassium cardioplegic solution during ischemic arrest*. Path Res Pract 1992;188:668-71
32. 이종국. Cardioplegic solution의 심근보호 효과에 관한 실험적 연구. 대흉외지 1980;13:321-37

=국문초록=

St. Thomas' 심정지액 I 과 II 가 백서 배양 심근 세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 심장 박동수, MTT 정량, LDH 정량 및 형태학적 관찰을 시행하였다.

백서의 심근 세포를 72시간 배양한 후 St. Thomas' 심정지액 I 과 II 에 30분 및 120분간 처리한 후 24시간 동안 배양하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 심근 세포 박동수는 대조군이 분당 154회, St. Thomas' 심정지액 I 에 120분 처리한 실험군에서는 147회, II 120분 처리군에서는 145회로 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다.
2. MTT 정량 결과 St. Thomas' 심정지액 I 120분 처리군에서는 대조군의 102%로 나타났으며, II 120분 처리군에서는 93%로 대조군에 비하여 유의한 차이를 보이지 않았다.
3. LDH 정량 결과 St. Thomas' 심정지액 I 120분 처리군에서는 대조군의 123%로 나타났으며, II 120분 처리군에서는 109%로 약간의 증가를 보였다.
4. 광학현미경적 관찰 결과 세포수 및 세포 형태에 있어서 대조군과 실험군간에 차이를 보이지 않았다.
5. 전자현미경적 관찰 결과 St. Thomas' 심정지액 I 처리군에서는 소수의 미토콘드리아 파괴가 관찰되었으며, II 처리군에서는 대조군과 유사한 소견을 보였다.

이상의 실험결과를 종합하여 볼 때, St. Thomas' 심정지액 I 과 II 는 백서 배양 심근세포에 세포 독성을 나타내지 않았으나, 전자현미경적 관찰 결과 심정지액 II 가 심정지액 I 에 비하여 심근 보호 효과가 더 양호한 것으로 생각된다.