

NO 억제제가 허혈전처치의 심장 보호효과에 미치는 영향

유호진* · 조은용** · 장인엽*** · 전제열**** · 최철희* · 임동윤*

=Abstract=

Effect of Inhibitor of Nitric Oxide Synthesis on the Ischemic Reconditioning in Isolated Heart of Rat.

Ho-Jin You M.D.*, Eun-Yong Cho M.D.**, In-Youb Jang M.D.***,
Jae-Yeul Jun M. D. ****, Cheol-Hee Choi M.D.*, Dong-Yoon Lim Ph. D.*

The protective effect of 'ischemic preconditioning' on ischemia-reperfusion injury of heart has been reported in various animal species, but without known mechanism in detail. In an attempt to investigate the cardioprotective mechanism of ischemic preconditioning, we examined the effects of nitric oxide(NO) synthesis in preconditioned heart of rat. The isolated hearts perfused by Langendorff's method were exposed to 30min global ischemia followed by 30min reperfusion with oxygenated Krebs-Henseleit(K-H) solution. Ischemic preconditioning was performed with three episodes of 5min ischemia and 5min reperfusion before the induction of prolong ischemia(30min)-reperfusion(30min). Ischemic preconditioning prevented the depression of cardiac function(left ventricular pressure x heart rate) observed in the ischemia-reperfusion hearts and reduced the release of lactate dehydrogenase during the reperfusion period. On electromicroscopic pictures, myocardial ultrastructures were relatively well preserved in ischemic preconditioned hearts. N^G-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME) an inhibitor of L-arginine citric oxide pathway, was infused at a rate 0.5ml/min in a dose of 10mg kg⁻¹ before the initial ischemic preconditioning. Neither the protection of cardiac function nor the reduction of LDH release in ischemic preconditioning hearts was altered in the presence of added L-NAME. On ultrastructural finding, the preservation of morphology in ischemic preconditioning heart was not change by the pretreatment of L-NAME. The failure of the NO synthesis inhibitor to reduce the effect of ischemic preconditioning may be related to be species specific in that NO may not be the trigger for ischemic preconditioning in rats.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1996; 29: 807-15)

Key words: 1. Nitric oxide
2. Myocardial protection
3. Reperfusion injury

* 조선대학교 의과대학 약리학 교실

* Department of Pharmacology, College of Medicine, Chosun University

** 조선대학교 의과대학 흉부외과학교실

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

*** 조선대학교 의과대학 해부학교실

*** Department of Anatomy, College of Medicine, Chosun University

**** 조선대학교 의과대학 생리학교실

**** Department of Physiology, College of Medicine, Chosun University

본 연구는 1994년도 조선대학교 학술연구비 지원을 받아 연구되었음

논문접수일: 96년 4월 30일 심사통과일: 96년 6월 11일

책임저자: 유호진, (500-759) 광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 의과대학 Tel. (062) 220-3720, Fax. (062) 232-4045

서 론

관상 혈류 차단에 의한 허혈성 심근손상은 시간경과에 따라 역동적으로 진행되기 때문에 비가역적 괴사를 방지하기 위해서는 가능한 한 빠른 시간 내에 혈류를 재개시켜야 된다. 이를 위해 현재 임상적으로 혈전용해 약물을 투여하거나 balloon catheter로 협착된 혈관을 확장하는 방법들을 이용하고 있으며 때로는 관상동맥 우회술을 시행하고 있다. 심근의 허혈성 손상은 이런 병적 상황뿐만 아니라 개심술 과정에서도 진행될 수 있기 때문에 수술시간의 단축이 예후를 가름하는 중요한 관건이 되기도 한다. 그러나 허혈 심근의 재관류는 허혈기간이 어느 정도 진행된 후에는 임상적으로 유효한 효과를 가져오지 못할 뿐 아니라 경우에 따라선 오히려 세포 손상이 가속화되는 역설적인 재관류 손상을 일으키기도 한다^{1,2)}. 따라서 이러한 문제를 해결할 수 있는 보다 효과적이고 안전한 대처방안을 장구하기 위한 연구들이 끊임없이 진행되고 있으나 아직 만족스런 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다. 그러나 근자에 허혈성 심근 손상에 대한 효과적 대응 방법과 관련하여 소위 허혈전처치(Ischemic preconditioning)³⁾에 의한 심장 보호작용이 많은 관심을 끌고 있다. 즉 Murry 등은⁴⁾ 개의 관상 혈관을 5분간 묶었다가 다시 5분간 풀어주는 전처치를 4회 반복한 다음 계속해서 40분 동안 혈관을 묶었을 때 전처치하지 않은 경우보다 심근괴사 부위가 약 75%정도 축소되며 재관류시 심기능 회복이 촉진됨을 보고하였다. 이후 이런 현상은 개 뿐 아니라 토끼⁵⁾, 돼지⁶⁾, 흰쥐^{6,7)} 등 각종 동물에서도 보고되었다. 이렇듯 허혈전처치의 심장보호 효과가 종에 관계없이 나타나는 것으로 미루어 보면 사람에서도 이러한 효과가 나타날 가능성이 있다. 이런 가능성은 매우 제한된 방법이지만 Deutsch 등⁸⁾에 의해 임상적으로 검토된 바 있다. 그들은 12명의 관상동맥 성형술 환자에서 인위적으로 90초간 관상동맥 좌전하행지를 5분 간격으로 2회 막은 경우 2번째 허혈 시기에 흉통, ST 분절상승, lactate 생성등 심근손상의 지표들이 감소함을 보고하여 허혈심장이 허혈전처치에 의하여 보호효과가 있을 가능성을 사람에서 최초로 제시하였다.

그러면 이러한 허혈전처치가 어떻게 허혈내성을 유도하고 허혈및 허혈-재관류 손상을 방지하는가? 허혈전처치의 기전에 대해서는 많은 가설들이 제시되고있으나 아직 근본적인 기전에 관하여 밝혀진 바가 거의 없고, 허혈전처치에 의한 세포내 모종의 변화가 세포 적응능력을 증가

시켜 이후 더 큰 스트레스를 극복하게 만들 것으로 막연히 추정하고 있다. 그런데 최근에 몇몇 연구자들이 허혈 자극에 의해 생성이 증가될 수 있으리라 여겨지는 내인성 산물들이 허혈전처치에 의한 허혈내성 획득과 관련이 있을 것이라는 가설들을 제시하고 있다. 즉 짧은 허혈기간에 여러 내인성 산물들의 분비가 촉진되고 이들이 심근세포에 어떤 일련의 변화를 초래해 이 후 긴 기간의 허혈에 심장을 보호 할 것으로 생각하고 있다. 이와 관련하여 내인성 산물들의 하나인 adenosine 이 허혈전처치에 의한 심근괴사 감소효과와 관련이 있고⁹⁾ 또다른 내인성 물질의 하나인 prostaglandine이 허혈전처치에 의한 부정맥 감소와 관련이 있다¹⁰⁾는 보고는 허혈전처치에 의한 내인성 물질의 증가가 심장에 모종의 변화를 초래하여 일반 심근세포를 허혈내성을 지닌 심근세포로 변화시켜 허혈에 견디게 할 것이라는 주장을 설득력 있게 뒷받침하고 있다. 심장내피 세포에서 유리되는 nitric oxide(NO)는 adenosine 및 prostaglandine과 매우 밀접한 관련이 있고 그 기능에도 매우 유사성이 많다. 즉 NO는 adenosine 및 prostaglandine 처럼 허혈시 유리되는 내인성 물질이고 이 두물질처럼 심보호 효과가 있어서^{11,12)} NO 역시 허혈전처치의 심보호 효과와 관련이 있을 가능성이 매우 높겠다. 따라서 본 연구에서는 허혈전처치의 허혈내성 획득에 NO관련 가능성을 실험하고자 적출 심장을 Langendorff 장치로 관류시켜 심장 이외의 외부적 요인을 배제시킨 상태에서 허혈전처치의 심장보호 효과가 나타나는지를 검토하고 이런 단순화된 환경에서 NO가 허혈전처치 심장보호 작용과 관련이 있는지를 비교 검토하고자 한다.

연구 재료 및 방법

연구 재료

실험 동물들은 성구별 없이 체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. L-NAME, NG-nitro-L-arginine methyl ester는 research biochemical international (RBI)사 제품을 사용하였고 기타 모든 시약들은 특급시약을 사용하였다.

연구 방법

(1) In vitro 흰쥐 심장의 허혈-재관류손상 유도 및 허혈전처치

흰 쥐에 30 mg/kg 용량으로 sodium penobarbital을 복강 주사하여 마취시킨 후 인공 호흡기(Phippa 210)로 호흡을 시킨 상태에서 흉부를 절개하였다. 대동맥을 절개하여

삽입관을 삽입한 다음 폐장을 포함한 주위조직을 제거하고 곧이어 Langendorff 관류장치에 대동맥 삽입관을 연결시켜 역방향 관류를 하였다. 관류액은 95%O₂-5%CO₂로 포화시킨 Krebs-Henseleit(K-H) 완충 용액(NaCl 118 mM, NaHCO₃ 27.2 mM, KCl 4.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KH₂PO₄ 1 mM, CaCl₂ 1.25 mM, Glucose 10 mM, pH 7.4)을 80cm H₂O의 일정 압력으로 관류하였고, 심장 온도를 37℃로 일정하게 유지하였다. 충분히 산소가 포화된 K-H용액으로 15분 동안 관류하여 심기능이 안정화된 후, 대동맥 삽입관에 장치된 3-way 코크를 막아 심장 전체허혈(total global ischemia)을 유도하였다. 30분간 허혈을 지속한 다음 다시 3-way 코크를 열어 재관류 시켰다. 허혈전처치로는 심기능이 안정화된 후, 5분간 허혈 시키고 5분간 재관류 시키는 작업을 3회 연속으로 반복하였으며 곧이어 30분간 허혈 및 재관류를 시행하였다. NO 합성을 억제할 목적으로 투여한 L-NAME는 허혈전처치 유도 10분전부터 펌프를 이용하여 0.5 ml/min의 속도로 10mg/kg의 용량으로 투여하였다.

(2) 심기능 지표 측정

심기능의 지표로서 심박수와 좌심실 압력을 측정하였다. 좌심실 압력은 끝에 balloon이 붙은 20G의 plastic 삽입관을 승모판을 통해서 좌심실에 삽입하고 압력변환기에 연결한 후, 생리기록계를 이용해서 측정하였다. 이때 안정화된 좌심실 이완기말 압력(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)이 5 mmHg가 되도록 balloon을 팽창시켰다. 심박수는 1분간 기록된 수축 횟수로 알 수 있었으며 좌심실 압력중 이완기말 압력은 심근의 수축 정도를, 수축기말 압력과 이완기말 압력의 차이(developed pressure)는 심장의 수축력을 나타내는 지표로 사용하였다. 또한 심장의 혈액순환 능력(심기능 지수)은 developed pressure에 심박수를 곱하여 산출하였고, 허혈조작전과 허혈후 재관류 30분에서의 이 수치를 비교하여 재관류 후 심기능 회복률을 계산하여 이를 전처치한 경우와 비교 검토하였다.

(3) Lactate dehydrogenase(LDH) 측정

세포질 효소인 LDH의 유출을 심근세포 손상의 지표로 삼아 측정하였다. 30분 허혈에 이은 재관류시 3분 간격으로 4번 관류액을 받아 관류량을 측정하고 이를 얼음 속에 보관하여 8시간 내에 효소 측정 시료로 사용하였다. LDH 활성은 48 mM phosphate buffer(pH 7.5), 0.6 mM sodium pyruvate, 0.18 mM NADH를 함유한 반응계에 관류액 시료 0.5 ml를 첨가한 후 25℃에서 NADH가 NAD로 산화되

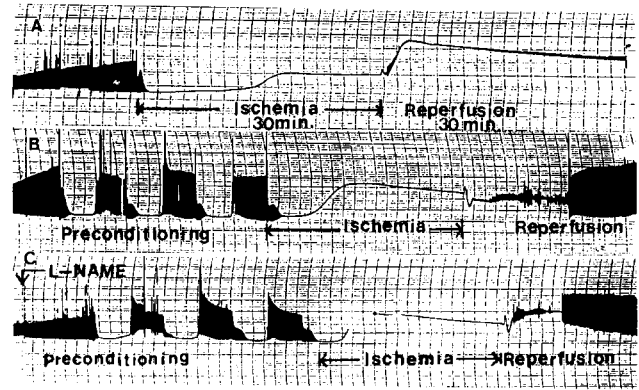


Fig. 1. The record of left ventricular pressure in isolated rat heart. A. 30 min of ischemia and 30 min of reperfusion B. Ischemic preconditioning following 30 min of ischemia and 30 min of reperfusion C. L-NAME treatment before ischemic preconditioning following 30 min of ischemia and 30 min of reperfusion. L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester

는 과정을 340 nm에서의 흡광도 변화로 측정하였다¹³⁾. LDH 유출량은 1g 조직당 1분간의 평균치로 표시하였다.

(4) 전자 현미경 표본 제작

허혈-재관류 심근세포와 허혈전처치 심근세포의 구조적 변화를 관찰하기 위해 실험이 종료된 즉시 심장을 관류장치에서 제거한 후 좌심실벽을 잘게 잘라 심근층(myocardium)의 중앙부위를 택하였다. 이를 4% paraformaldehyde와 2% glutaldehyde의 혼합 고정액(0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4)에 2시간 침적 고정하고, 1% osmium tetroxide로 2시간 후고정 하였다. 고정된 조직을 통상의 ethanol로 탈수시키고 propylene oxide으로 투명하게 처리한 후 Epon혼합액(EM bed-812)에 포매하였다. 포매된 조직은 MT-2B형 초박절편기를 사용하여 다이아몬드 칼로 박절편을 제작하며, uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색 후 JEM 100CX II 투과형 전자현미경으로 80KV의 가속 전압하에서 관찰하였다.

(5) 통계처리

각군간의 통계적차이는 Student's t-test방법으로 측정하였으며 P-value가 0.05보다 적을 때 각군간에 통계적 유의성이 있다고 분석 하였다.

Table 1. Effect of ischemic preconditioning on cardiac function in post-ischemic reperfused heart of rat

	Non-preconditioned		Preconditioned	
	Pre-ischemia	Reperfusion	Pre-ischemia	Reperfusion
HR(beats/min)	322.91 ± 44.73	221 ± 11.69	318.5 ± 34.78	296.13 ± 37.46*
LVEDP(mm Hg)	5	54.83 ± 10.89	5	13.46 ± 9.59*
LVDP(mm Hg)	83.8 ± 19.2	15.7 ± 5.1	78.91 ± 15.49	64.45 ± 13.22
LVDP×HR×10 ⁻³ (mmHg/min)	26.8 ± 6.02	3.48 ± 1.21	25.15 ± 5.54	18.94 ± 3.83*
Recovery of function(%)		13.42 ± 4.85		77.1 ± 15.15*

HR, heart rate; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVDP, left ventricular developed pressure. Ventricular function was assessed by the product of LVDP×HR×10⁻³.

Recovery of function was calculated by division of the product at the end of 30 minutes of reperfusion by the product before induction of ischemia.

Values are given as mean ± SEM of 6 hearts.

*P<0.01 versus values of non-preconditioned hearts

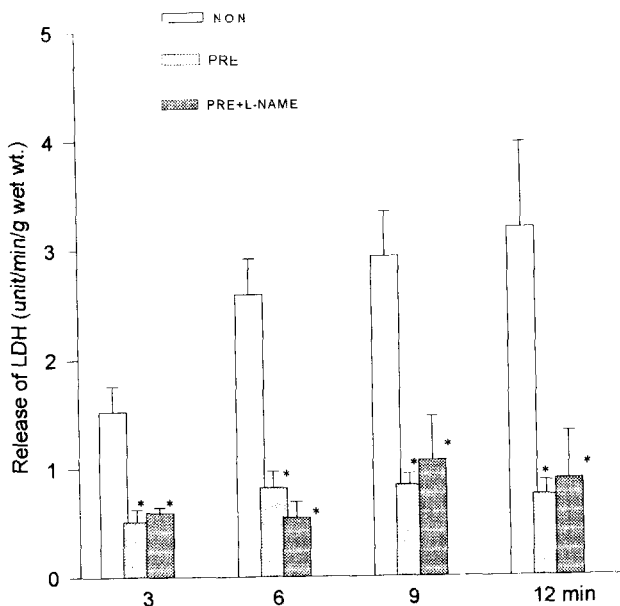


Fig. 2. Effect of L-NAME on the LDH release in preconditioned ischemic heart of rat. Isolated rat hearts were reperfused after 30min global ischemia. L-NAME(10mg/kg) was infused at a rate 0.5ml/min during 10min before preconditioning. NON:30min reperfusion after 30min global ischemia of non-preconditioned hearts. PRE:30min reperfusion after 30min global ischemia of preconditioned hearts. PRE+L-NAME: preconditioned after L-NAME pretreated. LDH was measured in the coronary effluents collected every 3min. Each bar represents mean ± SEM of six experiments. *P<0.01 versus values of non-preconditioned hearts. L-NAME: N^G-nitro-L-arginine methyl ester.

연구성적

1) 허혈전처치의 효과

심장을 15분간 관류를 하여 수축기능이 불량하거나 수

축이 불규칙한 심장은 모든 실험에서 제외하였다. 적출심장의 관류를 차단하면 1내지 2분내에 수축이 정지되며, 약 15분부터 LVEDP가 상승하는 허혈수축 소견이 관찰되었다. 30분간 허혈에 이어 재관류를 시행하면 심장은 곧 불규칙적인 수축을 하게되고 계속 수축이 심해져 2내지 5분만에 수축이 멈추었다. 재관류 30분 후에도 심한 수축과 부정맥이 지속되어 정상적인 수축을 하지 못하며 그 수축력도 매우 빈약 하였다(Fig. 1A). 반면 5분 허혈 및 5분 재관류를 3회 반복한 허혈전처치 심장에서는 허혈기간에 LVEDP 상승이 있으나 재관류시 급격한 LVEDP 감소에 이어 5 내지 10분부터 정상적인 수축이 이루어 졌다(Fig. 1B). 이렇듯 허혈전처치 심장의 재관류시 심박수와 수축력은 허혈전과 대등하여 이들 숫자로 산출된 심기능지수(DP×HR×10-3)로 볼 때 기능회복률은 77%에 달하였다(Table. 1). 허혈전처치가 심근 세포손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 세포질효소인 LDH유출을 관상 관류액에서 측정하였다. 관상 관류액에서 3분 간격으로 4회 LDH 효소활성을 측정한 결과 허혈전처치를 시행하지 않은 심장에서는 허혈-재관류 3분, 6분, 9분 및 12분에 LDH 유출은 각각 1.53±0.23, 2.62±0.25, 2.95±0.31, 3.21±0.34 unit/min/g wet wt이었으나 허혈전처치를 시행한 심장에서 허혈-재관류 3분, 6분, 9분 및 12분에 LDH유출은 각각 0.51±0.12, 0.82±0.14, 0.81±0.11, 0.71±0.12 unit/min/g wet wt으로 비전처치 심장에 비하여 LDH 유출의 정도가 P 값이 0.01 수준에서 의미가 있게 줄었다(Fig. 2). 세포의 미세구조를 비교한 결과 허혈-재관류 심장에서는 myofibril 배열이 불규칙하며 심한 세포 손상의결과로 세포막의 파괴가 보이고 mitochondria, actin-myosin, 세사, 사립체등의 세포내 소기관의 소실이 관찰 되었다(Fig. 3B). 그러나 5분 허혈초작을 3회 실시한 후 허혈-재관류를

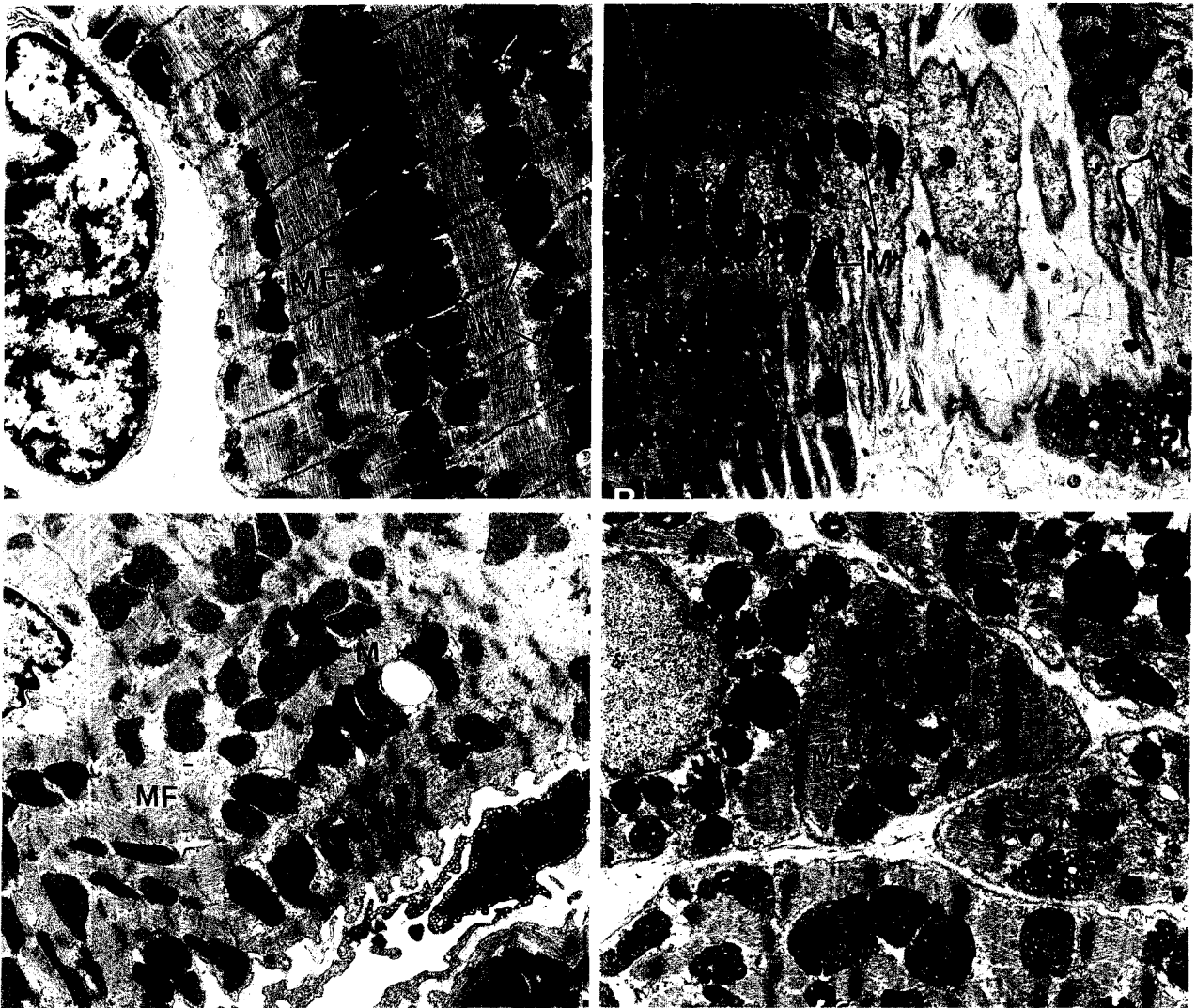


Fig 3. Transmission electron micrograph of left ventricular myocardium A. Control. B. 30min of ischemia and 30min of reperfusion. C. Ischemic preconditioning following 30min of ischemia and 30 min of reperfusion. D. L-NAME treatment before ischemic preconditioning following 30min of ischemia and 30min of reperfusion MF; myofibrils, M; mitochondria

시행한 심장에서는 정상에 비해 myofibril이 약간 불규칙하며 mitochondria의 팽창이 관찰되나 전체적으로 세포윤곽은 비교적 잘 보존되어 있었다(Fig. 3C).

2) 허혈전처치에 대한 L-NAME 효과

허혈전처치의 심장 보호작용이 NO와 관련이 있는지를 관찰하기 위하여 NO합성 억제제인 L-NAME를 전처치하여 허혈전처치의 심근보호 효과에 NO생성이 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였다. 결과 L-NAME를 투여한 후 허혈전처치를 시행한 허혈-재관류 심장에서 심박동수는 285.3 ± 58.6 , 좌심실 확장기말 압력은 16.2 ± 7.46 그리

고 이들로부터 산출된 심기능지수는 15.41 ± 4.86 , 심회복률은 70%로 L-NAME를 투여하지 않는 군과 비교할 때 P 값이 0.05수준에서 별다른 통계적 의의가 없었다(Fig. 1C, Table 2). L-NAME의 투여가 허혈전처치에 의한 허혈심근세포손상 억제효과에 어떠한 영향을 주는지를 관찰하기 위하여 세포질효소인 LDH유출을 측정하였다. 결과 L-NAME를 투여한 심장에서 허혈전처치 후 허혈-재관류 3분, 6분, 9분 및 12분에 LDH유출은 각각 0.6 ± 0.49 , 0.8 ± 0.27 , 1.32 ± 0.36 , 1.14 ± 0.41 unit/min/g wet wt로 비전처치 심장과 비교할 때 P 값이 0.05 수준에서 통계적 의의가 없었다(Fig. 2). L-NAME를 투여하더라도 허혈전처치에 의

Table 2. Effect of L-NAME on cardiac function in preconditioned ischemic heart of rat

	PRE		PRE+L-NAME	
	Pre-ischemia	Reperfusion	Pre-ischemia	Reperfusion
HR(beats/min)	318.5±34.78	296.13±37.46	305.5±36.21	285.3±58.6
LVEDP(mm Hg)	5	13.46±9.59	5	16.2±7.46
LVDP(mm Hg)	78.91±15.49	64.45±13.22	73.19±14.21	54.01±20.1
LVDP×HR×10 ⁻³ (mmHg/min)	25.15±5.54	18.94±3.83	22.36±3.13	15.41±4.68
Recovery of function (%)		77.1±15.15		70.26±20.81

PRE, preconditioning; HR, heart rate; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVDP, left ventricular developed pressure. L-NAME: NG-nitro-L-arginine methyl ester. Ventricular function was assessed by the product of LVDP×HR×10⁻³. Recovery of function was calculated by division of the product at the end of 30 minutes of reperfusion by the product before induction of ischemia. Values are given as mean±SEM of 6 hearts.

한 허혈심근의 심기능 보호효과 및 심근세포 보호효과에 별다른 영향을 주지 못한 결과들이 심근세포의 형태학적인 소견과도 일치한가를 관찰하기 위하여 L-NAME 처치 후 허혈전처치를 시행한 허혈-재관류 심장을 전자현미경으로 관찰하여 비전처치 심장의 미세구조와 비교하였다. L-NAME를 전처치한 심근 세포에서 mitochondria이 약간 커지는 소견이 있었으나 myofibril 및 세포내 소기관등이 비교적 잘 보존돼 있고 세포막의 파괴가 관찰되지 않았다(Fig. 3D).

고 찰

심장은 다량의 에너지를 계속 사용하는 조직으로 비교적 짧은 기간의 허혈에도 에너지가 급격히 고갈될 뿐 아니라 대사 이상과 구조적 변형을 동반하는 심근수축기능의 저하(myocardial stunning)가 장기간 계속된다¹⁴⁻¹⁶. 이와 같이 심기능이 허혈에 의하여 쉽게 저하된다는 사실로 볼 때 비록 짧은 기간이라도 허혈이 반복될 경우에는 심근손상이 누적되어 비가역적인 세포손상으로 까지 진행될 수 있으리라는 의견이 보편적이었다¹⁷. 그러나 최근에 Murry 등³은 짧은 기간의 반복적인 허혈이 심근조직 세포를 허혈자극에 적응케하므로써 장기간의 허혈 손상을 오히려 방지함을 관찰하여 이를 '허혈전처치'에 의한 심장보호 작용이라 하였다. 이로부터 많은 연구자들이 짧은 허혈자극에 의한 심근손상의 정도를 재조사 한 바 있으며, 그 결과로 심근괴사, 세포구조의 변형, ATP와 adenosine nucleotide감소, 그리고 수축기능 감소 등이 짧은 허혈 심근에서는 매우 미약함이 보고되었다¹⁸⁻²⁰. 본 연구결과에서도 허혈 30분이 경과된 심근에서는 재관류

심한 부정맥을 동반한 급격한 수축과 더불어 심장기능이 현저히 저하되고 세포질 효소의 유출이 크게 증가 하였으나 5분간 3회 실시한 허혈에 의해서는 이후 장기간의 허혈(30분)자극을 주더라도 심장 수축기능 변화나 LDH 유출이 없었으며 구조적 변형이 약간 있으나 세포손상의 증거는 찾지 못하였다(Table 1, Fig. 1,2,3). 이같은 허혈심근에 있어서 허혈전처치가 상기 모든 소견을 경감시켰다는 사실은 심근세포가 세포수준에서 근본적으로 허혈내성을 획득하는 결과라 판단된다.

허혈전처치에 의한 허혈내성 획득 기전은 심장학 분야에서 대단히 흥미로운 사실이나 허혈전처치에 의한 허혈 및 재관류손상 보호기전에 대해서는 아직 명확히 밝혀진 바가 없고, 최근에 몇 가지 가설들만이 검토되고 있다. 우선적으로 허혈전처치의 효과를 허혈부위의 collateral혈류 증가로 설명할 수 있겠으나 본 연구에서와 같이 global ischemia 조건에서는 허혈시 collateral 혈류가 있을 수 없으므로 이 가설은 타당성이 적다고 생각된다. 한편 허혈은 근본적으로 에너지 공급을 중단시킴으로써 그 효과를 나타낼 가능성도 있다. 이와 관련하여 몇몇 연구자들은 허혈 전처치시 허혈기간에 나타날 수 있는 ATP의 급격한 소모가 감소하며, 혐기성 해당작용의 대사가 억제되어 lactate 축적이 줄어든다고 보고하였다^{19,21}. 이외에도 허혈전처치가 자극되어 heat shock protein같은 stress 단백질이 발현되어 보호효과가 나타난다는 가설²², 허혈전처치 기간에 ATP 소모의 결과로 adenosine같은 purine대사물이 생성되어 심근세포막에 있는 purine 수용체(AI 수용체)와 결합함으로써 심장보호가 된다는 가설⁹, 허혈시 생성이 증가되는 prostaglandine계 물질이 재관류시 부정맥을 억제한다는 가설¹⁰등이 있다. 이렇듯 많은 가설들이 주장되기는 하지

만 뚜렷이 확립된 것이 없기 때문에 본 연구에서는 허혈전처치의 보호기전을 조사하기 위한 일환으로 허혈전처치의 심보호 효과와 관련되어 아직도 논란이 많은 NO가 허혈전처치에 의한 허혈심근 보호 효과에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하였다.

허혈전처치의 심보호 효과와 관련이 있을 것으로 여겨지는 내인성 산물중 NO는 그 자체가 심근보호 작용을 지닐 뿐만 아니라 재관류시 초래되는 조직손상을 보호하는 효과 때문에^{11, 12)} 허혈 전처치에 의한 허혈심근 보호현상과 관련이 있을 가능성을 충분히 예견할 수 있다. 이와 관련하여 Patel 등²³⁾은 L-NAME투여가 허혈전처치에 의하여 줄어든 심경색 크기에 효과를 나타내지 못함을 관찰하여 허혈전처치에 의한 심보호 효과에 NO가 관여할 가능성이 희박하다고 보고하고 Vegh 등²⁴⁾은 심장에 NO합성 억제제인 L-NAME를 투여시 허혈전처치에 의한 항부정맥 효과가 사라지는 것을 관찰하여 NO가 허혈전처치에 의한 허혈내성 획득과 밀접한 관련이 있음을 보고하였다. 본 연구에서 NO합성 억제제인 L-NAME를 허혈전처치 유도 전에 투여한 후 허혈-재관류 심장에서 심기능 지표를 측정된 결과 L-NAME의 투여가 허혈전처치에 의하여 회복된 심박수, 이완기말 압력 및 수축기능에 아무런 영향을 주지 못하였다(Fig. 1, Table 2). 또한 허혈전처치에 의한 심근세포 보호효과에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 세포질 효소인 LDH를 심근 세포손상의 지표로 이용하여 측정된 결과 L-NAME는 허혈전처치에 의한 LDH유출의 감소에도 아무런 영향을 주지 못하였다(Fig. 2). 이같은 결과는 미세구조 상에서 허혈전처치에 의한 세포구조 보호 효과에 L-NAME가 아무런 영향을 주지 못하는 관찰결과와도 일치하였다(Fig. 3D). NO합성 억제제의 투여로 허혈전처치에 의한 심보호 효과를 감소시키는데 실패한 본 실험결과는 쥐 심장에서는 NO 생성이 허혈전처치의 심보호 효과와 관련한 중요 매개인자로 작용하지 않음을 시사한다고 여겨진다.

그러면 왜 허혈전처치의 심보호 효과에 대한 NO 합성 억제제 효과가 본 실험과 vegh 등²⁴⁾의 실험 결과가 다르게 관찰될까? 이에 대한 가장 큰 가능성은 허혈전처치의 매개인자가 종에 따라 다를 수 있다는 사실이다. 허혈전처치의 매개인자로 가장 잘 알려져 있는 adenosine이 쥐에서는 허혈전처치에 관여하지 않는다는 연구결과는 종에 따라 허혈전처치의 매개인자가 다를 가능성을 시사하는 것으로 vegh 등이²⁴⁾ 실험동물로 사용한 개와 본 실험에서 사용된 쥐간의 종에 따른 차이 때문에 다른 결과가 나왔을 가능성이 있을 것으로 생각된다. 또다른 가능성으로 NO는 적은

량에서는 심보호 작용이 있지만¹¹⁾ 많은량에서는 오히려 세포 독성을 나타내기 때문에²⁵⁾ 허혈전처치에 의하여 생성된 NO량에 따라 심보호효과에 미치는 영향이 매우 크다고 하겠다. 따라서 in vivo 실험에 비해 적출심장 실험은 심장에 더 많은 자극을 초래해 NO 생성량이 크게 증가할 가능성이 있으며 만약 NO생성이 많아졌다면 NO에 자체에 의한 세포 독성으로 인하여 허혈전처치의 심보호 매개인자로서의 역할이 묻혀져 버렸을 가능성 또한 배제할 수 없다고 생각된다. 하지만 이러한 가능성에 대해서는 추후 검토할 필요가 있다고 여겨진다.

결론

이상의 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 허혈전처치는 허혈-재관류 심장의 심박수, 좌심실압등 심기능의 저하를 현저히 회복시켰다(회복률:77%)
2. 허혈-재관류 심장에서 lactate dehydrogenase(LDH) 유출증가는 허혈전처치에 의해 현저히 저하되었다.
3. 허혈-재관류 심근세포의 전자현미경상 미세구조는 허혈전처치시 비교적 잘 보존되었으며, 특히 myofibril구조 및 세포내 소기관의 보존이 뚜렷하였다.
4. L-NAME 투여 후 허혈전처치를 시행한 허혈-재관류심장에서 허혈전처치에 의한 심기능 회복에 L-NAME는 아무런 영향을 미치지 않았다.
5. 허혈-재관류심장에서 허혈전처치에 의하여 감소된 LDH 유출은 L-NAME 투여로 증가하지 않았다.
6. 허혈-재관류심장에서 허혈전처치에 의하여 비교적 잘 보존된 미세구조는 L-NAME 투여로 아무런 영향을 받지 않았다.

참고 문헌

1. Genote CE, Armstrong S, Downey JM. Adenosine and A1 selective agonists offer minimal protection against ischemic injury to isolated rat cardiomyocytes. Cardiovasc Res 1993;27:1670-76
2. Hearse DJ. Reperfusion of ischemic myocardium. J Mol Cell Cardiol. 1977;9:605-16
3. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation 1986; 74:1124-36.
4. Miusra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem. 1972; 247:3170-75.
5. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. Circ

- Res 1990;66:1133-42.
6. Tani M, Neely JR. *Intermittent perfusion of ischemic myocardium: possible mechanisms of protective effects on mechanical function in isolated rat heart.* Circulation 1990;82:536-48
 7. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Browne EE, Pugsley WB. *Ischemic preconditioning limits infarct size in the rat heart.* Cardiovasc Res 1992;26:983-7
 8. Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, et al. *Adaptation to ischemic during percutaneous transmural coronary angioplasty: Clinical, hemodynamic, and metabolic features.* Circulation 1990;82:2044-51
 9. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AWH, Olsson RA, Downey JM. *Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart.* Circulation 1991;84:350-6.
 10. Vegh A, Szekeres L., Parratt JR. *Protective effects of preconditioning of the ischemic myocardium involve cyclo-oxygenase products.* Cardiovasc Res. 1990;24:1020-23.
 11. Johnson G III, Tsao PC, Lefer AM. *Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion.* Crit Care Med 1991;18:244-52
 12. Andrew SW, Xin-liang Ma, Allan ML. *The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat.* Circulation 1992;86:279-88
 13. Bergmeyer HU, Bernt E. *UV assay of lactate dehydrogenase activity with pyruvate and NADH.* In: *Method of Enzymatic Analysis*, vol II, 2nd Ed. (Bergmeyer HU(Ed).) Academic Press, New York. 1974;574-9.
 14. Braunwald E, Kloner RA. *The stunned myocardium: prolonged postischemic ventricular dysfunction.* Circulation 1982;66:1146-49
 15. Jennings RB, Schaper J, Hill ML, et al. *Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury: Changes in cell volume, electrolytes, metabolites and ultrastructure.* Circ Res 1985;56:262-78
 16. Swain JL, Sabina RL, McHale PA, et al. *Prolonged depletion of ATP and of the adenosine nucleotide pool due to delayed re-synthesis of adenosine nucleotide following reversible myocardium ischemic injury in isolated rat heart.* J Mol Cell Cardiol 1981;13:229-39.
 17. Geft IL, Fishbein MC, Ninomiya K, et al. *Intermittent brief periods of ischemia have a cumulative effect and may cause myocardial necrosis.* Circulation 1982;66:1150-3.
 18. Lange R, Ware J, Kloner RA. *Absence of a cumulative deterioration of regional function during three repeated 5 or 15 minute coronary occlusions.* Circulation 1984;69:400-8
 19. Reimer KA, Murry CE, Yamsawa I, Hill ML, Jennings RB. *Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis.* Am J physiol 1986;251:H1306-15.
 20. Swain JL, Sabina RL, Hines JJ, et al. *Repeated episodes of brief ischemia(12 min) do not produce a cumulative depletion of high energy phosphat compounds.* Cardiovasc Res 1984;18:264-9
 21. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. *Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during sustained ischemia.* Circ Res 1990;66:913-31
 22. Knowlton AA, Brech P, Ngoy S, Apstein CS. *Brief cardiac ischemia induces expression of heat shock protein 70.* Circulation 1989;80(suppl II):II-237
 23. Patel VC, Woolfson RG, Singh KJ, Yellon DM. *Ischemic preconditioning is not prevented by inhibition of endothelium-derived nitric oxide.* J Mol Cardiol 1992;24(suppl I):152
 24. Vegh A, Szekeres L., Parratt JR. *Preconditioning of the ischemic myocardium: involvement of the L-arginine nitric oxide pathway.* Br J Pharmacology 1992;107: 648-52
 25. Beckman JS, Beckman Tw, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.* Proc Natl Acad Sci 1990;87:1620-24

=국문초록=

허혈전처치(ischemic preconditioning)의 허혈심장 보호효과와 그 기전을 규명하기 위한 일환으로 Nitric oxide(NO)가 허혈전처치의 심보호 효과에 미치는 영향을 검토하였다.

흰쥐 적출심장의 Langendorff 관류표본에서 실험적인 허혈(30 분)-재관류(30분) 손상을 유도하였고, 허혈전처치는 재관류손상 유도 전에 5분 허혈 - 5분 재관류를 3회 반복하여 시행하였다. 허혈심근 손상의 지표로 심수축기능, 세포질효소 유출 및 미세형태학적 변화를, 그리고 NO 합성 억제제인 L-NAME를 투여하여 허혈전처치와 비전처치 허혈-재관류 심장들에서 손상의 정도를 비교하였다. 그 결과 허혈-재관류 심장에서 심기능의 저하 및 세포질 유출이 현저하게 증가하였고 전자현미경상의 미세구조에서도 세포내 소기관 및 myofibril의 파괴가 관찰되어 심근손상이 심함을 알 수 있었다. 허혈-재관류에 의한 심장손상은 허혈전처치를 시행한 허혈-재관류 심장에서는 현격하게 감소돼 심회복률이 77%로 증가하였고 세포질유출도 현저하게 감소되었으며 미세소견에서도 세포구조가 비교적 잘 보존되었다. 허혈전처치에 의한 심보호 효과에 NO가 관여하는지를 관찰하기 위하여 NO합성 억제제인 L-NAME를 투여하여 허혈전처치를 시행하였다. 결과 L-NAME 투여로 허혈전처치에 의하여 회복된 심기능 및 LDH 유출 감소에 아무런 영향을 주지 않았고 허혈전처치에 의하여 비교적 잘 보존된 미세구조 역시 영향을 받지 않았다. 이상의 결과들로부터 허혈전처치는 세포수준에서 허혈심근의 재관류손상을 방지하며, NO합성의 증가가 흰쥐 적출 심장에서 허혈전처치에 의한 허혈심장 보호효과에 크게 기여하지 않을 것으로 사료되었다.