

피루브산염과 아스파라진산염을 첨가한 위스콘신대학 용액의 심근보호 효과

이 정 렬* · 김 준 석** · 한 재 진*** · 강 문 철*

=Abstract=

Effect of Pyruvate and Aspartate Enriched University of Wisconsin Solution on Myocardial Protection

Jeong Ryul Lee, M.D.*, Jun Seok Kim, M.D.**,
Jae Jin Han, M.D.***, Moon Chul Kang, M.D.*

Background: Ischemia-reperfusion myocardial injury is an important factor to determine the early and the late mortality of transplanted patients. Recently, modulation of the cytosolic NADH/NAD⁺ ratio by pyruvate and aspartate was tested to protect the heart from ischemia-reperfusion injury. **Material and Method:** We added pyruvate and aspartate to the University of Wisconsin solution, and evaluated their effect on myocardial protection. We used 16 piglet(age 1 to 3 days) hearts. Eight hearts were arrested with and stored in the University of Wisconsin solution(UW solution) for 24 hours(control group), and the other eight hearts were arrested with and stored in the modified UW solution added pyruvate(3 mmol/L) and aspartate(2 mmol/L)(test group). All hearts underwent modified reperfusion with blood cardioplegic solution followed by conversion to a left-sided working model with perfusion from a support pig. And then, we measured stroke work index(SWI), high-energy phosphate stores, and myocardial water content of the hearts. SWI was calculated at left ventricular end-diastolic pressures of 3, 6, 9, and 12 mmHg after 60 and 120 minutes reperfusion, respectively. **Result:** At 60 minutes and 120 minutes after reperfusion, SWI was higher in the test group than in the control group significantly. The levels of AMP, ADP, ATP of the test group were also higher. But, the creatine phosphate level and myocardial water content were similar in the two groups. **Conclusion:** From these results, we could

*서울대학교 의과대학, 흉부외과학 교실, 서울대학교병원 임상의학연구소

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Hospital Clinical Research Institute

**서울위생병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Seoul Adventist Hospital

***이화여자 대학교 의과대학, 흉부외과학 교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Ewha Womans University, College of Medicine

†본 논문은 보건복지부 1998년도 보건의료기술연구개발사업에 의하여 수행된 연구과제(HMP-98-DS-0001)임.

논문접수일 : 2001년 8월 21일 심사통과일 : 2001년 11월 22일

책임저자 : 이정렬(110-744) 서울시 중로구 연건동 28번지, 서울대학교 병원 흉부외과. (Tel) 02-760-2877, (Fax) 02-765-7117

E-mail: jrl@plaza.snu.ac.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

prove that pyruvate and aspartate enhance cardiac contractility and high-energy phosphate stores after ischemia.

(Korean Thorac Cardiovasc Surg 2002;35:11-9)

Key word : 1. Pyruvate
2. Aspartate
3. Myocardial protection
4. Oran preser vation

서 론

심장이식 수술 후 공여심장의 허혈성 손상에 의한 기능부전은 이식 후 초기 생존에 큰 영향을 미친다. 더구나, 현재까지 인정되는 안전한 공여심장의 보존 가능 시간은 4시간에서 6시간 정도에 불과하다.¹⁾

1986년에 Wahlberg, Southard와 Belzer 등이 개발한 위스콘신대학 용액(University of Wisconsin solution)은 간, 췌장, 신장 등과 같은 고형장기를 장시간 보존하는데 탁월하다고 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 그리고, 여러 다른 연구들은 여러 가지 동물 실험 모델에서 위스콘신대학 용액이 심장보존에도 효과가 좋음을 보고하고 있고,⁵⁻⁷⁾ 임상적으로도 심장이식에 위스콘신대학 용액이 안전하고 효과적으로 쓰이고 있다고 보고하고 있다.^{8,9)} 몇몇 고무적인 동물실험들에서는 공여심장에 이차심근 보존액을 적시에 추가하는 등, 여러 조건을 추가한다면 위스콘신대학 용액에 24시간 동안 저장한 후에도 심장이 기능적 회복을 완전히 할 수 있다고도 한다.^{5,10)} 그러나, 실제적으로 임상에 위스콘신대학 용액을 적용함에 있어서는 아직 6시간이상의 장시간은 적절하다고 인정받고 있지 못하다.¹¹⁾

심장의 허혈-재관류 손상을 극복하기 위해서 조직손상을 일으키는 여러 가지 물질들을 감소시키기 위한 많은 연구들이 진행되어 왔지만, 여전히 완벽하다고 할 수는 없다. 최근에는 세포질내의 NADH/NAD⁺ 비율을 조절함으로써 공여심장의 허혈-재관류 손상을 줄이려는 실험들이 시행되었다.¹²⁾ 심근이 허혈되면 심근세포내에 NADH가 축적이 되는데, 이것은 미토콘드리아의 대사율을 저하시키고, 조직내 증가된 젖산(lactate)과 함께 세포질의 대사율을 감소시킨다.¹³⁾ 또한, 이 축적된 NADH는 세포내 여러 곳에서 산화대사를 저해시켜 TCA cycle의 활동을 저하시키고, 비특이적 Ca⁺⁺-sensitive channel을 통한 칼슘의 배설을 저해하여 미토콘드리아내의 칼슘을 증가시킨다.¹⁴⁾ 이러한 작용들은 허혈시간 동안 심근 손상을 일으키고, 재관류 시에 심근 수축력을 억제한다.

본 연구에서는 세포내의 NADH의 농도를 저하시키려는

노력이 허혈-재관류 심근손상을 감소시켜 심근 기능 부전을 방지할 수 있으리라는 가정 하에, 세포 내 대사 경로 중 lactate dehydrogenase pathway와 malate shuttle system에 각각 작용하여 NADH를 NAD⁺로 전환시켜 세포내의 NADH의 농도를 줄일 수 있는 피루브산염과 아스파라진산염을 위스콘신대학 용액에 첨가한 후, 심근의 박출기능회복, 에너지원 보존능, 심근 수분 함유량 등을 측정함으로써 그 효과를 분석하고자 하였다. 또한 이 연구에서 임상적으로 아직 확실하게 인정되지 못한, 심장을 위한 장기 보존액의 장시간 보존 가능성을 높이고자 한다.

대상 및 방법

공여심장의 허혈-재관류 손상은 심장이식 후 심근 기능 부전을 일으키는 주요 요인이며, 이 손상을 극복하고자 여러 가지 연구들이 시행되어지고 있는데, 세포내의 NADH/NAD⁺의 비율을 조절함으로써 허혈성-재관류성 손상으로부터 심근을 보호하려는 노력이 최근 실험들에서 실행되고 있고, 본 연구에서도 세포내의 NADH의 농도를 줄임으로써 심근보호 효과를 얻고자 하였다. 본 연구자는 위스콘신대학 용액에 세포내 NADH의 농도를 줄일 수 있는 물질인 피루브산염과 아스파라진산염을 첨가한 장기 보존 용액을 만들어서 신생돈의 심장을 적출 후 24시간 동안 보존한 뒤, 그 기능을 평가하여 위 두 물질의 효능을 검사하였다.

연구 방법

실험 동물

실험은 대조군과 실험군의 두 군으로 나누어 실행하였다. 대조군(n=8)은 위스콘신대학 용액으로 심정지 시키고 적출된 후, 동일액으로 24시간 동안 저장된 신생돈의 심장들이고, 실험군(n=8)은 위스콘신대학 용액에 피루브산염 3 mmol/L 와 아스파라진산염 2 mmol/L를 첨가한 용액을 심정지와 적출심장의 저장에 사용하였다.

실험 방법

1) 심장적출

생후 3일 미만의 신생돈에 체중 1 kg 당 100 mg 용량의 케타민을 근주하여 마취를 유도한 후, 신생돈이 조용해지면 수술대로 옮겨 양와위를 만든 뒤 전정부에 2% 리도케인을 피하 주사하여 국소마취를 시행하고 기관절개술을 하고 삽관하였다. 이 때 기도내 도관은 4 Fr. 크기의 도관을 사용하고 인공호흡기(Model 900; Servo Co., U.S.A.)와 연결하여 100% 산소로 분당 15~20회로 인공호흡을 시작하였다. 2% 리도케인을 전흉부에 근주하고 정중 흉골절개로 개흉한 후 흉선과 전방 심낭을 제거하여 심장과 연결되어 있는 대혈관들이 충분히 노출되도록 하고, 심장을 우측으로 견인하면서 좌측에 있는 반기정맥(hemiazygos vein)과 좌측 쇄골하동맥(left subclavian artery)을 흑색명주사(black silk)로 결찰하였다. 또한 다른 흑색명주사를 이용하여 하행대동맥(descending aorta), 무명동맥(innominate artery), 상공정맥(superior vena cava), 하공정맥(inferior vena cava), 주폐동맥(main pulmonary artery)에 혈관 고리를 걸어 두었다. 헤파린과 cefazolin을 각각 300 units/kg, 50 mg/kg 용량으로 주폐동맥을 통하여 주사한 뒤, 무명동맥에 특별히 고안된 12G 도관을 이용하여 삽관한 후 동맥압을 감시하였다. 상공정맥과 하공정맥을 결찰하고 폐정맥과 주폐동맥에 소절개를 하여 양심실 감압조치를 시행한 후 하행대동맥을 혈관 검자로 차단하였다. 미세하게 파쇄된 얼음 생리식염수(ice-slashed saline)를 이용하여 심장 외부 국소 급속냉각을 유도하면서 동시에 무명동맥도관을 통해 4°C의 위스콘신대학 용액 또는 피루브산염과 아스파라진산염이 첨가된 위스콘신대학 용액을 60 mmHg 압력으로 2분간 주입하여 심장을 정지시켰다. 심장보존액의 주입이 끝난 후, 하행대동맥, 좌측반기정맥, 무명동맥, 상공정맥, 하공정맥, 주폐동맥을 차례대로 결찰부위보다 원위부에서 절제한 후 좌심방 끝동(cuff)을 최대한 많이 남기면서 적출을 완료하였다. 이때 무명동맥 도관은 그대로 남겨두었다.

2) 적출심장 저장

용기에 4°C의 위스콘신대학 용액 또는 피루브산염과 아스파라진산염이 첨가된 위스콘신대학 용액을 가득 채우고 적출된 심장을 침적(immersion)시켰다. 각각의 용기는 얼음 생리식염수 속에 묻고 0.5~1°C에서 24시간 동안 보관하였다.

3) 재관류

성돈을 지지동물(supporter animal)로 쓰는 교차순환(cross circulation)을 이용한 좌심단순작업성 관류모델을 사용하였다 (Fig. 1). 체중 90~100 kg의 성돈에 100 mg/kg의 용량의 케타

민을 근주하여 마취시킨 후, 수술대로 옮겨 양와위를 만든 뒤 전정부를 2% 리도케인을 피하 주사하여 국소마취를 시행하고 기관절개술을 하고 기도내 삽관하였다. 이 때 기도내 도관은 7~8 Fr. 크기의 도관을 사용하고 인공호흡기(Model 900; Servo Co., U.S.A.)와 연결하여 100% 산소로 분당 12~15회로 인공호흡을 시작하고 1시간 간격으로 동맥혈가스 분석을 하면서 결과에 따라 호흡기를 조절하였다. 그 후, 대퇴동맥과 대퇴정맥에 삽관을 한 후에 10,000 units/hr의 용량의 헤파린을 정주하여 혈액응고를 방지했다.

이 모델은 지지동물의 대퇴동맥으로부터 공급되는 동맥혈을 Roller pump(Model Heart-Lung machine; Cobe Co., U.S.A.)를 이용하여 일단 좌심방 부하를 조절할 수 있는 유리그릇에 모아서 좌심방 관류를 시키기 때문에 좌심방으로부터 유리그릇의 높이를 조절하여 좌심방부하를 걸 수 있다. 또한 하행대동맥 끝동(cuff)에 삽입된 도관은 긴 심폐우회술용 플라스틱 도관에 연결되어 있으므로 이 또한 높낮이를 조절하여 좌심실 후부하를 일정한 수준으로 유지할 수 있다. 좌심방부하를 걸기 전에 심근이 어느 정도 회복될 때까지는 무명동맥 도관을 통한 관상동맥만을 관류시키고 좌심방부하는 걸지 않은 무작업성 관상동맥 관류모델로 심장관류를 실시하였다. 처음 10분간은 백혈구필터(Model RC100; Pall Filter Corp., U.S.A.)를 사용하여 백혈구 제거 혈액을 사용함으로써 임파구 매개에 의한 염증반응에 의한 심근 손상의 인자를 배제하도록 하였고 이후 10분 정도 60 mmHg의 압력의 37°C 혈액으로 무명동맥의 도관을 통하여 재관류를 하였다. 대동맥의 끝동(cuff)에 16 Fr. 굵기의 관류관을 삽입하고 그 끝은 개방된 측정용 용기에 연결하였다. 관상동맥혈류량은 주폐동맥에 삽관된 도관을 통하여 배출되는 혈액량을 측정하여 반영하였다. 심박출량과 관상동맥혈류량을 측정하기 위해서 모은 혈액은 필터를 통하여 걸러진 후 다시 지지동물 혈류에 순환되었다. 좌심방에 전부하를 걸어서 시행되는 단순 작업 모델로 전환하기 위하여 좌심방을 통하여 심방중격을 관찰하여 난원공이 관찰되면 polypropylene 봉합사를 이용하여 봉합하였고, 좌심방혈류를 위한 도관은 씌지 봉합술을 이용하여 좌심방이에 설치하였다. 그 후, 심근이 회복되기를 기다려 안정적인 심박동이 확보되면 좌심방에 전부하를 걸기 시작하였다. 좌심방압을 3, 6, 9, 12 mmHg로 걸면서 일정한 시간 간격으로 심박동수, 분당심박출량, 관상동맥혈류를 측정하였고, 후부하는 60 mmHg에 맞추어 놓도록 하였다.

4) 심장기능 측정

심장기능의 회복 정도는 박출작업계수(stroke work index)로 계산하였는데, 작업성 관류를 시작한 후 1시간 동안 안정 상태를 만든 후, 좌심방압을 3, 6, 9, 12 mmHg로 걸면서 60분

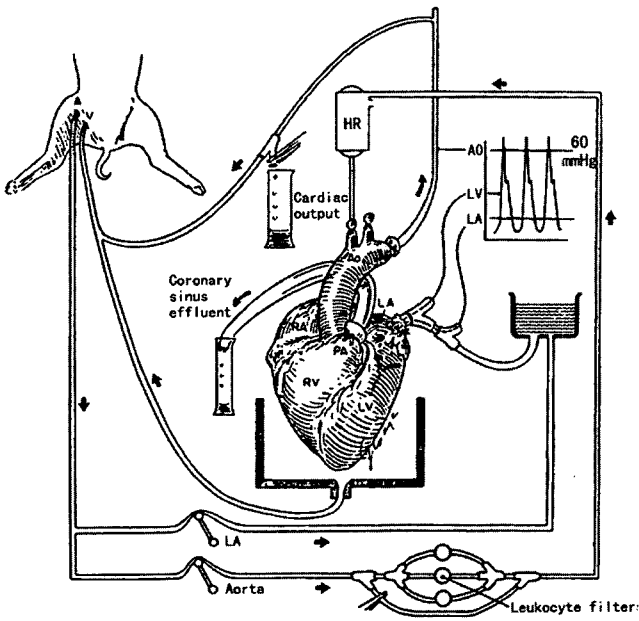


Fig. 1. Diagram of isolated perfusion circuit. Blood from support animal can be pumped to either aortic root or to height-adjustable reservoir that supplies blood into left atrium. Afterload is determined by height-adjustable aortic column. Cardiac output can be measured by collecting coronary sinus effluent via pulmonary artery cannula plus overflow aortic column.

A, femoral artery; V, femoral vein; LA, left atrium; LV, left ventricle; RA, right atrium; RV, right ventricle; PA, pulmonary artery; Ao, aorta; HR, heated reservoir containing cardioplegia.

과 120분에 각각의 분당 심박동수, 관상동정맥동 환류혈, 분당심박출량 등을 측정하여 계산하였다.

박출작업계수의 계산식은 다음과 같다.

$$SWI = \frac{(MAP - LVEDP) \times CO \times 1333}{HR \times Wt}$$

SWI, stroke work index(erg/g); MAP, mean aortic pressure (mmHg); CO, cardiac output(ml/min); Wt, body weight(g); LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure(mmHg)

5) 고 에너지 인산 함유량 측정

심장의 기능 측정이 모두 끝난 직후에 좌심첨 부위의 적당한 정도의 조각의 전층을 조직생검(transmural biopsy)하여 액화질소에 바로 냉동 저장하였다. 이 조직을 high performance liquid chromatography의 방법을 이용하여, ATP, ADP, AMP 및 creatine phosphate의 함유량을 측정하였다.

6) 심근의 수분함유량 측정

생검한 좌심실조직을 100℃에서 24시간 건조시키기 전과 후의 무게를 측정하여 그 차이를 계산함으로써 수분함유량을 측정하였다.

통계처리

모든 결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 자료의 분석은 SPSS(version 7.5) 통계 프로그램을 이용하였다. 각 군간의 자료비교는 모수적 통계방법인 t-test를 이용하였고, 비모수적인 통계방법인 Mann-Whitney test로 검증하였다. 통계적 유의 수준은 p-value 0.05를 기준으로 하였다.

실험동물의 처치

모든 실험동물은 미국의 National Society for Medical Research에서 제작된 Principles of Laboratory Animal Care"와 Institute of Laboratory Animal Resources와 National Institute of Health에서 편찬한 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH Publication No. 86-23, revised 1985)의 기준에 의해서 다루어지고 처치되었다.

결 과

박출작업계수 측정치는 Fig. 2 와 3에 나타내었으며, 실험군에서 대조군보다 통계적으로 유의하게 높았다.

재관류 60분 후에 측정된 박출작업계수는, 좌심실후부하가 3 mmHg 일 때, 대조군이 12.0±4.4 erg/g, 실험군이 17.0±4.0(n=8, p=0.032), 좌심실후부하가 6 mmHg 일 때, 대조군이 11.8±4.1 erg/g, 실험군이 22.0±8.5(n=8, p=0.012), 좌심실후부하가 9 mmHg 일 때, 대조군이 12.2±4.4 erg/g, 실험군이 29.0±14.3(n=8, p=0.012), 그리고, 좌심실후부하가 12 mmHg 일 때, 대조군이 16.3±8. erg/g, 실험군이 33.1±15.1(n=8, p=0.016)이었다.

재관류 120분 후에 측정된 박출작업계수는, 좌심실후부하가 3 mmHg 일 때, 대조군이 12.7±3.5 erg/g, 실험군이 17.4±3.9(n=8, p=0.022), 좌심실후부하가 6 mmHg 일 때, 대조군이 13.6±5.2 erg/g, 실험군이 26.5±11.3(n=8, p=0.011), 좌심실후부하가 9 mmHg 일 때, 대조군이 14.5±6.4 erg/g, 실험군이 31.3±13.7(n=8, p=0.011), 그리고, 좌심실후부하가 12 mmHg 일 때, 대조군이 15.8±8.0 erg/g, 실험군이 35.1±16.3(n=8, p=0.009)이었다. 고 에너지 인산의 함유량은 Fig. 4에 나타내었으며, ATP, ADP, 및 AMP는 실험군에서 통계적으로 유의하게 높았고, creatine phosphate는 실험군에서 높게 측정되었으나, 통계적으로는 유의하지 않았다.

각각의 측정치는, ATP는 대조군에서 67.5±23.8 micromol/g

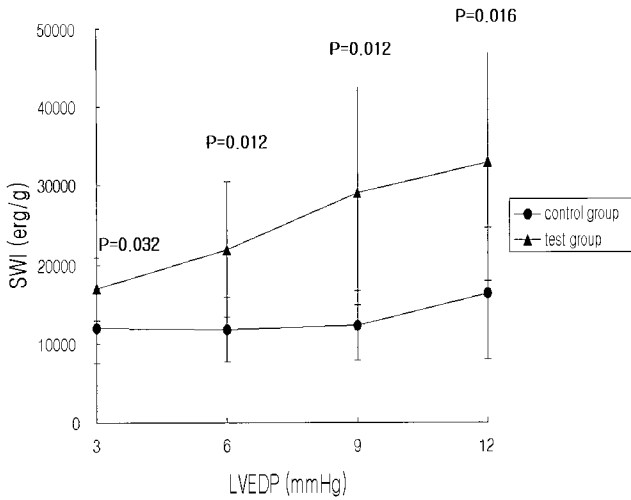


Fig. 2. Comparison of stroke work index measured at 60 minutes after reperfusion between the two groups. SWI was higher in the test group than in the control group significantly(n=8, p<0.05). SWI, stroke work index; LVEDP, left ventricular end diastolic pressure

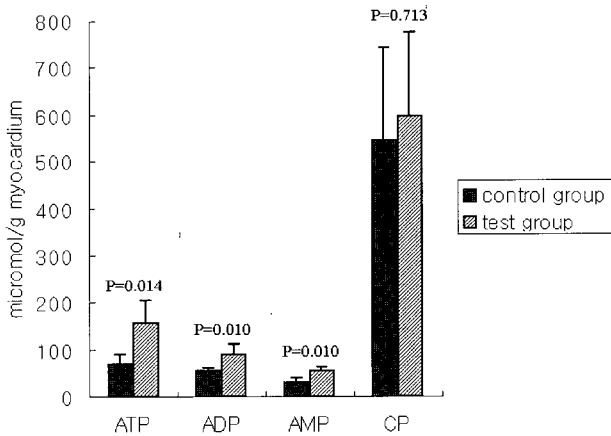


Fig. 4. Comparison of the levels of high-energy phosphate stores between the two groups. The levels of ATP, ADP and AMP were higher in the test group than in the control group significantly(n=8, p<0.05), but creatine phosphate levels were similar in both groups(n=8, p>0.05) ATP, adenosine triphosphate; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; CP, creatine phosphate

myocardium, 실험군에서 156.8 ± 45.8 (n=8, p=0.010), ADP는 대조군에서 52.6 ± 7.3 , 실험군에서 91.3 ± 20.9 (n=8, p=0.010), AMP는 대조군에서 30.8 ± 8.7 , 실험군에서 53.1 ± 11.1 (n=8, p=0.014), 그리고, creatine phosphate는 대조군에서 546.6 ± 197.0 , 실험군에서 595.5 ± 179.6 (n=8, p=0.713)이었다.

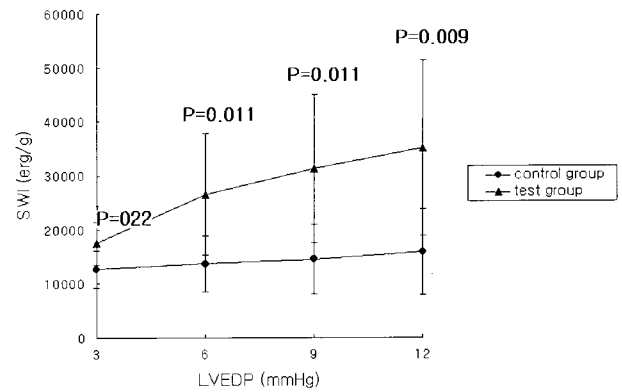


Fig. 3. Comparison of stroke work index measured at 120 minutes after reperfusion between the two groups. SWI was higher in the test group than in the control group significantly(n=8, p<0.05). SWI, stroke work index; LVEDP, left ventricular end diastolic pressure

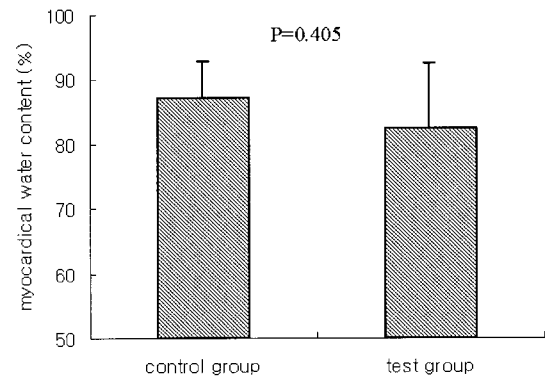


Fig. 5. Comparison of the amount of myocardial water content between the two groups. Mean water content was similar in the two groups(n=8, p>0.05)

심근의 수분 함유량 측정치는 Fig. 5에 나타내었으며, 대조군에서 높았으나 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 측정치는 대조군에서 $87.2 \pm 5.5\%$, 실험군에서 82.4 ± 10.1 (n=8, p=0.405)이었다.

고찰

심장이식에서 공여심장을 적절하게 보존한다는 것은 심장 적출 후, 심근의 생육성을 잘 유지하여 조직 손상을 최소화한다는 것이다. 이러한 목적 하에 좀 더 나은 장기보존액을 개발하려는 노력과 연구들은 오래 전부터 계속되어져 왔고,^{1 5-18} 공여심장을 허혈된 상태에서 보존할 때 발생하는 여러 가지 생리학, 생화학적 부작용을 개선하기 위해서 장기보

존액들은 계속 보완되어져 왔다. 또한, 항산화물질, 항대사물질 또는 여러 다른 약물 등에 대한 연구들도 공여심장에 대한 재판류 손상을 줄이기 위하여 개발되어져 왔다. 그러나, 이러한 연구들의 결과는 아직 만족할 만한 수준은 아니다.¹⁹⁾

장기보존액 중의 하나인 위스콘신대학 용액은 Wahlberg, Southard 와 Belzer(1986)등이 공여체장의 보존을 위하여 개발하였는데, 이 용액은 신장과 간을 보존하는데에도 실험적으로나 임상적으로 우수한 효과가 있음이 보고되고 있다.^{4),5),20)} 그리고, Stein(1991)등⁶⁾과 Wicomb(1989)등¹⁰⁾은 이 용액이 공여심장을 보존하는데에도 다른 여러 장기보존액과 비교할 때, 탁월한 효과가 있음을 보고하고 있는데, 이 용액은 전해질 조성비가 정상 세포내의 조성(intracellular electrolyte composition)으로 이루어져 있고, lactobionate와 raffinose는 colloid-hydroxyethyl starch 와 반응하여 저온에서 흔히 발생할 수 있는 세포부종을 막는 세포막 침투방지물질로 되며, 용액내에 첨가되어있는 adenosine은 허혈상태에서 감소되는 ATP의 전구물질로 작용하고 재판류 시에 관상동맥의 저항을 감소시킬 수 있도록 되어있다. 또한 glutathione과 allopurinol은 oxygen free radical을 청소하는데 작용하여 심근의 재판류 손상을 줄이는데 도움을 준다. 그리고, phosphate는 조직이 산성화되는 것을 조절하며, 고농도의 potassium은 세포내 양이온의 소실을 최소화시킨다(Table 1). 실제로 여러 실험적인 연구에서 위스콘신대학 용액을 이용하여 공여심장을 12~24시간 동안 저장한 후에 심장기능회복을 연구하여 좋은 결과들을 보고하고 있으나,^{6,10)} 이러한 장시간을 임상에 적용하는 것에는 아직 반론이 많으며, 아직 6시간 이상의 장시간 동안 이 용액에 심장을 저장한 뒤 이식하는 것은 인정되고 있지 않다.¹¹⁾ 이렇게 이 용액을 장시간 동안 공여심장에 적용할 수 없는 기본적인 이유는 Stringham(1992)등의 보고에 따르면, 심장은 근본적으로 근육의 구조로 이루어져 있기 때문에 허혈시간 동안 ATP의 함유량 감소로 일어나는 현상을 구조적으로 견디기 어렵기 때문이라고 한다.¹⁾

장기보존액을 발전시키려는 여러 연구 중에 최근에 세포질내 NADH/NAD⁺의 비율을 조절함으로써 심장의 허혈-재판류 손상을 감소시키려는 실험이 시도되었다.¹²⁾ 허혈된 심근의 세포질내에는 NADH의 산화가 억제되면서 NADH를 사용하여 ATP를 생산하는 전자전달계가 억제되어 미토콘드리아의 대사가 억제되고, 조직내 젖산이 축적되면서 세포질의 대사율이 감소하여 NADH가 심근세포질내에 축적이 된다. 이렇게 축적된 NADH는 세포내 여러 곳에서 산화대사를 억제하고 따라서 TCA cycle의 활동성을 저하시키며, 비특이적인 Ca⁺⁺-sensitive channel을 통한 칼슘의 배설을 방해하여 미토콘드리아내 칼슘을 증가시킨다. 이러한 효과들은 허혈시 심근의 손상을 더욱 심화시키고, 재판류시 심근의 수축력을 저

Table 1. Composition of the University of Wisconsin solution.

Pentafraction (%)	5
Lactobionate (mmol/L)	100
Raffinose (mmol/L)	30
Adenosine (mmol/L)	5
MgSO ₄ (mmol/L)	5
Glutathione (mmol/L)	3
Allopurinol (mmol/L)	1
KH ₂ PO ₄ (mmol/L)	25
NaOH (mmol/L)	29
KOH (mmol/L)	104
Osmolarity (mmol/L)	300
pH	7.6 ~ 7.8

하시킨다. 그리고, 또 다른 가능한 NADH에 의한 허혈성 심근손상의 기전으로는 NADH가 유발하는 산화손상(NADH-induced oxidative damage)인데, Kaminski(1981)등²¹⁾과 Kato(1990)등²²⁾의 실험결과에 따르면, 세포질내에 축적된 NADH는 탈수소효소들의 기능을 선택적으로 저해하여 hypoxanthine/xanthine의 대사를 방해한다. 이 물질은 reactive oxygen species들의 생산을 촉진시켜 산화손상을 유발한다. Jennings(1981)등이 보고한 바에 의하면, 심근이 허혈되면 심근내에 Hypoxanthine/xanthine과 NADH의 함유량이 증가하고, 재판류시에 reactive oxygen species들의 함유량이 증가한다고 한다. 따라서, NADH의 축적은 심근의 산화손상에도 중요한 역할을 한다고 생각되어진다.²³⁾

따라서, 심근손상에 관여하는 세포질내 NADH의 농도를 감소시키는 것은 허혈성 심근손상 방지를 위해 중요한 것으로 생각되어지며, 세포내에서 일어나는 여러 대사과정 중에서 젖산의 탈수소화 과정(lactate dehydrogenase pathway)과 말레이트 운반과정(malate shuttle system)이 세포질내의 NADH의 함유량을 감소시키는 중요한 대사과정으로 고려되어 질 수 있다(Fig. 6). 그래서, 본 연구에서는 세포질내 NADH의 농도를 감소시켜 허혈-재판류 심근손상을 줄이기 위하여 피루브산염과 아스파라진산염을 장기보존액의 첨가 물질로 사용하였다. 이 두 물질은 이미 최근의 한 연구보고(Park et al., 1998)에서 세포질내 NADH의 농도를 줄이는데 효과적이라고 보고되기도 하였다.¹²⁾ 한편, 피루브산염과 아스파라진산염은 각각 허혈-재판류 심근손상을 방지한다고 여러 논문에서 이미 보고된바 있으며, 장기보존액에 첨가하는 여러 물질중의 하나로 알려져 있으나, 아스파라진산염은 glutamate 또는 다른 TCA cycle의 여러 중간 물질에 관련되는 아미노산들과 주로 같이 연구되어왔고,^{24~26)} 피루브산염은 단독으로 주로 연구되어져 왔는데,^{27~31)} 피루브산염과 아스파라진산염 두 물질만을 특정한 가설에 의해 장기보존액에 첨가하여 연구

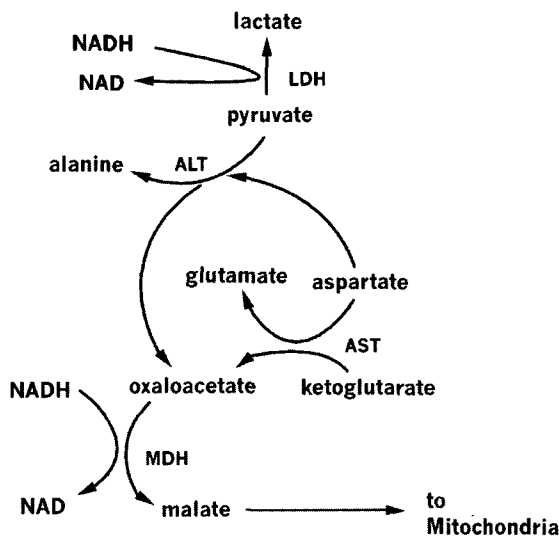


Fig. 6. Metabolic map indicating the proposed role of pyruvate and aspartate in the reduction of NADH during ischemia. MDH, Malate Dehydrogenase; AST, Aspartate Aminotransferase; ALT, Alanine Aminotransferase; LDH, Lactate Dehydrogenase.

한 보고는 찾아볼 수 없었다.

한편, 세포질내의 NADH 농도를 줄이는 작용 외에 피루브산염과 아스파라진산염이 심근의 허혈손상을 방지하는 기전에 대해서는 여러 연구에서 이미 보고되고 있는데, Cavallini (1990)²⁷⁾과 Bunger(1989)²⁸⁾은 피루브산염이 피루브산염 dehydrogenase를 활성화하고 보호하여 허혈손상을 방지한다고 보고하였고, 피루브산염은 자체적으로 과산화수소(H₂O₂)를 직접적으로 청소하는 기능도 있다고 하였으며, 세포내 ATP의 보존율을 높인다고도 하였다. Choong과 Gavin(1990)²⁹⁾은 St. Thomas Hospital 심정지액에 sodium 아스파라진산염을 첨가한 뒤 이 용액을 사용하여 쥐의 심장을 보관한 뒤 평가한 실험에서, 허혈 뒤 심장 기능의 회복이 좋게 나타났음을 보고하였고, Rau(1979)³⁰⁾은 아스파라진산염이 저산소상태의 토끼 심장의 회복에 도움이 된다고 하였다.

Fig. 6에서 보여 주듯이 젖산의 탈수소화 과정과 말레이트 운반과정은 결국 서로 영향을 주면서 연결되는 대사과정이며, 전구물질과 중간물질이 상호 연관이 있어서 두 물질간에 어떤 작용이 있으리라 예상됐지만, 증명할 수는 없었다.

본 연구는 실제로 허혈 심장에서 피루브산염과 아스파라진산염의 효과를 평가 분석하기 위해서 시행되었고, 실험 결과에서 보여주듯이, 피루브산염과 아스파라진산염이 첨가된 위스콘신대학 용액을 사용하여 심정지시키고 저장했던 심장들에서 단순히 위스콘신대학 용액만을 사용했던 경우에서

보다 재관류후 심장의 기능 복구의 효과가 박출작업계수 측면에서 평가할 때 좋게 나타났고(Figs. 2, 3), 심근의 고 에너지 인산의 함유량도 creatine phosphate를 제외하고는 높게 나타났다(Fig. 4). creatine phosphate는 물질 대사과정이 NADH/NAD⁺의 대사 및 이동과 관련이 없기 때문에 함유량의 차이가 없었던 것으로 생각되며, 이 결과는 피루브산염과 아스파라진산염이 NADH/NAD⁺의 비율을 조절하여 허혈-재관류 심근손상을 줄일 것이라는 가설을 뒷받침해주고 있다.

한편으로, 본 실험에서는 각 군의 실험 동물이 8마리에 불과하여 각각의 측정치의 편차가 크게 나타나는 문제점이 있었으며, 지지동물로 사용한 성돈의 상태가 집중관리를 했음에도 불구하고 일정하지 못했던 경우가 있었고, 위스콘신대학 용액의 조성의 정도관리에도 어려움이 있었다. 또한 지지동물 1마리 당 신생돈의 심장을 두 번 또는 세 번 실험하여 첫 번째 이후에 실험된 신생돈의 심장은 염증매개 물질 등에 의한 영향도 있었으리라 생각된다.

위와 같은 실험 결과를 통하여 본 실험자는 피루브산염과 아스파라진산염이 장기이식, 특히 심장이식에서 공여심장을 보존하는데 유용하게 적용될 수 있을 것이라고 생각하며, 관상동맥 우회수술을 포함한 여러 가지 심장 수술의 심근 보호 및 치료에도 도움이 될 것이라고 생각한다.

결론

위와 같은 결과를 통하여 본 실험자는 피루브산염과 아스파라진산염이 장기이식, 특히 심장이식에서 공여심장을 보존하는데 유용하게 적용될 수 있을 것이라고 생각하며, 관상동맥 우회수술을 포함한 여러 가지 심장 수술을 시행받은 환자의 수술후 치료와 보존 치료에도 도움을 줄 수 있을 것이라고 생각한다.

참고 문헌

1. Stringham JC, Southard JH, Hegge J, Triemstra L, Fields BL, Belzer FO. Limitation of heart preservation by cold storage. *Transplantation* 1992;53:287-94.
2. Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold storage solution for pancreas preservation. *Cryobiology* 1986;23:477-82.
3. D'Allessandro AM, Stratta RJ, Sollinger HW, et al. Use of UW solution in pancreas transplantation. *Diabetes* 1989;38(suppl 1):7-9.
4. Kalayoglu M, Sollinger HW, Belzer FO, et al. Extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Lancet* 1988;1:617-9.
5. Breda MA, Drinkwater DC, Laks H, et al. Successful long-term preservation of the neonatal heart with a

- modified intracellular solution.* J Thorac Cardiovasc Surg 1992;104:139-50.
6. Stein DG, Permut LC, Drinkwater DC, et al. *Complete functional recovery after 24-hour heart preservation with University of Wisconsin solution and modified reperfusion.* Circulation 1991;84(Suppl):III316-23.
 7. Yeh T Jr, Hanan SA, Johnson DE, et al. *Superior myocardial preservation with modified UW solution after prolonged ischemia in the rat heart.* Ann Thorac Surg 1990;49:932-9.
 8. Stein DG, Drinkwater DC, Laks H, et al. *Cardiac preservation in patients undergoing transplantation.* J Thorac Cardiovasc Surg 1991;102:657-65.
 9. Jeevanandam V, Barr ML, Auteri JS, et al. *University of Wisconsin solution versus crystalloid cardioplegia for human donor heart preservation.* J Thorac Cardiovasc Surg 1992;103:194-9.
 10. Wicomb WN, Collins GM. *Twenty-four hour rabbit heart storage with UW solution; effects of low-flow perfusion, colloid, and shelf storage.* Transplantation 1989;48:6-9.
 11. Stringham JC, Love RB, Welter D, et al. *Impact of University of Wisconsin solution on clinical heart transplantation: a comparison with Stanford solution for extended preservation.* Circulation 1998;98:II157-62.
 12. Park JW, Chun YS, Kim MS, et al. *Metabolic modulation of cellular redox potential can improve cardiac recovery from ischemia-reperfusion injury.* Int J Cardiol 1998;65:139-47.
 13. Opie LH, editor. *Lack of oxygen: ischemia and angina in the heart: physiology and metabolism.* New York: Raven Press, 1991:425-50.
 14. Hunter DR, Haworth RA. *The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria.* Arch Biochem Biophys 1979;195:453-77c.
 15. Lower RR, Stofer RC, Hurley EJ, Dong E, Cohn RB, Shumway NE. *Successful homotransplantation of the canine heart after anoxic preservation for seven hours.* Am J Surg 1962;104:302-6.
 16. Thomas FT, Szentpetery SS, Mammanna RE, Wolfgang TC, Lower RT. *Long-distance transplantation of human hearts for transplantation.* Ann Thorac Surg 1978;26:344-50.
 17. Copeland JG, Jones M, Spragg R, Stinson EB. *In vitro preservation of canine hearts for 24 to 28 hours followed by successful orthotopic transplantation.* Ann Surg 1973;178:687-92.
 18. Warner M, Guerraty A, Alivizatos P, Choi SC, Lower RR, Hess ML. *Assessment of myocardial subcellular function after 24 hours of in vitro preservation and transplantation.* J Thorac Cardiovasc Surg 1982;83:290-7.
 19. Collins GM. *What solutions are best? Overview of flush solutions.* Transplant Proc 1997;29:3543-4.
 20. Henery ML, Sommer BG, Ferguson RM. *Improved immediate function of renal allografts with Belzer perfusate.* Transplantation 1988;45:73-5.
 21. Kaminski ZW, Jezewska MM. *Effect of NADH on hypoxanthine hydroxylation by native NAD⁺-dependent xanthine oxidoreductase of rat liver, and the possible biological role of this effect.* Biochem J 1981;200:597-603.
 22. Kato S, Kawase T, Alderman J, Inatomi N, Lieber CS. *Role of xanthine oxidase in ethanol-induced lipid peroxidation in rats.* Gastroenterology 1990;98:203-10.
 23. Jennings RB, Reiner KA, Hill ML, Mayer SE. *Total ischemia in dog hearts, in vitro: Comparison of high energy phosphate production, utilization, and deletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo.* Cir Res 1981;49:892-900.
 24. Choong YS, Gavin JB, Armiger LC. *Effects of glutamate on cardiac function and energy metabolism of rat heart during ischemia and reperfusion.* J Mol Cell Cardiol 1988;20:1043-51.
 25. Bittl JA, Shine KI. *Protection of ischemic rabbit myocardium by glutamic acid.* Am J Physiol 1983;245:H406-12.
 26. Pisarenko OI, Rosenfeldt FL, Langley L, Conyers RAJ, Richards SM. *Differing protection with aspartate and glutamate cardioplegia in the isolated rat heart.* Ann Thorac Surg 1995;59:1541-8.
 27. Cavallini L, Valente M, Rigobello MP. *The protective action of pyruvate on recovery of ischemic rat heart: comparison with other oxidizable substrates.* J Moll Cell Cardiol 1990;22:143-54.
 28. Bunker R, Mallet RT, Hartman DA. *Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart. Near-complete prevention of reperfusion contractile failure.* Eur J Biochem 1989;180:221-33.
 29. Choong YS, Gavin JB. *L-aspartate improves the functional recovery of explanted hearts stored in St. Thomas' Hospital cardioplegic solution at 4 °C.* J Thorac Cardiovasc Surg 1990;99:510-7.
 30. Rau EE, Shine KI, Gervais A, Douglas AM, Amos III EC. *Enhanced mechanical recovery of anoxia and ischemic myocardium by amino acid perfusion.* Am J Physiol 1979;236:H873-9.

=국문초록=

배경: 심장이식에 있어서 허혈-재관류 손상은 이식심장의 기능회복이나 장기생존을 좌우하는 중요한 요소이다. 본 연구에서는 세포질내의 $NADH/NAD^+$ 비율의 조절에 관여하는 피루브산염과 아스파라진산염을 현재 일반적으로 흔히 쓰이고 있는 장기 보존액인 위스콘신대학 용액에 첨가하여 심근을 보호하고 재관류 후의 심장 보존능의 효과를 증명하고자 하였다. **대상 및 방법:** 생후 3일 이내의 신생돈의 심장을 4°C 위스콘신대학 용액(대조군, n=8)과 피루브산염과 아스파라진산염을 첨가한 위스콘신대학 용액(실험군, n=8)으로 심정지를 유도하여 적출하고 4°C 동일한 용액에서 24시간 동안 허혈상태로 보존한 후, 성돈을 교차순환 재관류혈 공급원으로 사용하여 좌심단순작업성 관류모델(left-sided working heart model)로 재관류 시킨 다음, 관류심장에서 일정한 시간 간격으로 박출작업계수(stroke work index)를 측정하였고, 관류가 끝난 후, 고 에너지 인산 함유량(high-energy phosphate stores), 심근의 수분 함유량(myocardial water content)을 측정하여 두 군을 비교하였다. **결과:** 재관류가 시작되고 60분과 120분이 경과된 후에 좌심실 확장기말 압력(LVEDP)이 3, 6, 9, 및 12 mmHg일 때 각각 박출작업계수를 측정하였는데, 60분이 경과된 후에 측정한 박출작업계수는 실험군에서 통계적으로 유의하게 높았고 [n=8, p<0.05, 대조군($16.3 \pm 8.3 \times 1,000$ erg/g) vs. 실험군($33.1 \pm 15.1 \times 1,000$ erg/g)], 120분이 경과된 후에도 실험군에서 통계적으로 유의하게 높게 나타났다 [n=8, p<0.05, 대조군($15.8 \pm 8.0 \times 1,000$ erg/g) vs. 실험군($35.1 \pm 16.3 \times 1,000$ erg/g)]. 고 에너지 인산 중, AMP, ADP, 및 ATP의 함유량은 실험군에서 높게 측정되었다 [n=8, p<0.05, AMP -대조군(30.8 ± 8.7 micromol/g myocardium) vs. 실험군(53.1 ± 11.1), ADP -대조군(52.6 ± 7.3) vs. 실험군(91.3 ± 20.9), ATP -대조군(67.5 ± 23.8) vs. 실험군(156.5 ± 45.8)]. 그러나, creatine phosphate 함유량 [n=8, p>0.05, 대조군(546.6 ± 197.0 micromol/g myocardium) vs. 실험군(595.5 ± 179.6)] 과 심근 수분 함유량 [n=8, p>0.05, 대조군($87.2 \pm 5.5\%$) vs. 실험군(82.4 ± 10.1)] 은 두 군간에 유의한 차이가 없었다. **결론:** 이상의 결과는 피루브산염 와 아스파라진산염이 첨가된 위스콘신대학 용액이 위스콘신대학 용액만을 사용한 경우보다, 박출작업계수와 심근에너지 보존 측면에서 평가하기로는 심근보호 기능이 더 우수하다는 것을 나타내고 있다. 그리고, 대사과정에서 $NADH/NAD^+$ 의 대사와 관련이 없는 creatine phosphate의 보존에는 차이가 없다는 결과는 피루브산염과 아스파라진산염이 세포질내의 $NADH/NAD^+$ 의 조절에 관여하여 심근을 보호하리라는 가설을 가능하게 한다.

- 중심 단어:** 1. 피루브산염
2. 아스파라진산염
3. 심근보호
4. 위스콘신대학용액