

A₂ Adenosine 작용약물인 5'-N-Ethylcarboxaminoadenosine의 심근 재관류 손상에 대한 심장 보호 기전

계명대학교 의과대학 마취통증의학교실, *푸른병원 마취과

이용철 · 장영호* · 김찬진 · 김진모

Cardioprotective signaling cascade of A₂ adenosine receptor agonist 5'-N-ethylcarboxaminoadenosine against myocardial reperfusion injury

Yong Cheol Lee, M.D., Young Ho Jang, M.D.*, Chan Jin Kim, M.D., and Jin Mo Kim, M.D.

Department of Anesthesiology and Pain Medicine, School of Medicine, Keimyung University; *Department of Anesthesiology, Pureun Hospital, Daegu, Korea

Background: This experiments investigated the signaling cascade responsible for anti-infarct effect by an A₂ adenosine receptor (AR) agonist 5'-N-Ethylcarboxaminoadenosine (NECA).

Methods: Langendorff perfused isolated rat hearts were subjected to 30 minutes of regional ischemia and 120 minutes of reperfusion. Drugs were perfused for a period of 5 minutes before and 60 minutes after reperfusion. For comparison of cardioprotection among groups, area at necrosis (AN) and area at risk (AAR) were measured by triphenyltetrazolium chloride staining.

Results: NECA significantly attenuated AN/AAR ($14.1 \pm 1.9\%$, $P < 0.001$) compared with control hearts ($30.7 \pm 2.8\%$). Anti-infarct effect by NECA was attenuated by an A_{2A}AR antagonist 8-(3-chlorostyryl)caffeine ($23.7 \pm 3.4\%$, $P < 0.05$) and an A_{2B}AR antagonist MRS1706 ($29.9 \pm 3.3\%$, $P < 0.001$). Cardioprotection by NECA was blocked by a guanylyl cyclase inhibitor ($23.1 \pm 2.9\%$, $P < 0.05$) and a protein kinase G (PKG) inhibitor KT5823 ($30.3 \pm 3.2\%$, $P < 0.001$). Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) inhibitor SB216763 attenuated the AN/AAR in both NECA with MRS ($17.8 \pm 2.7\%$, $P < 0.01$ vs. control) and NECA with KT5823 treated hearts ($8.2 \pm 1.8\%$, $P < 0.001$ vs. control). The mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opener atractyloside also aborted NECA's anti-infarct effect ($24.7 \pm 2.4\%$, $P < 0.05$).

Conclusions: The signaling pathway by NECA administered at reperfusion involves the activation of both A_{2A}AR and A_{2B}AR and cGMP/PKG pathway, which in turn depends on inactivation of GSK-3 β and inhibition of mPTP opening. (Korean J Anesthesiol 2008; 55: 716~22)

Key Words: adenosine receptor, mitochondria, myocardial infarction, NECA, reperfusion injury.

서 론

지금까지 심근 허혈 및 재관류 손상에 있어 purine nucleoside 유도체인 adenosine의 유용성에 대하여 많은 연구들이 진행되어왔다. Adenosine 수용체(adenosine receptor, AR)는 A₁AR, A_{2A}AR, A_{2B}AR 및 A₃AR의 네 가지 아형으로 구분되며, AR의 활성화는 G-단백과의 결합을 통하여 생리학적 및 약리학적 효과를 나타낸다.¹⁾ 이중 심장 허혈 및 재관

류 손상 보호 효과에 대하여 가장 많은 연구가 진행된 AR는 A₁AR로 이 수용체의 자극은 세포내에서 protein kinase C, mitogen activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3-kinase) 등과 같은 다양한 키나아제 활성화를 통하여 K_{ATP} 통로 및 사립체 투과전이공(mitochondrial permeability transition pore, mPTP)에 신호를 전달함으로써 심근을 보호하는 것으로 알려져 있다.²⁻⁴⁾ 그리고 최근 많은 연구가 진행 중인 A₃AR 역시 A₁AR와 유사한 세포내 신호 전달 경로를 통하여 심근을 보호하는 것으로 보고되어 있다.^{1,5,6)}

한편 A₂AR 즉, A_{2A}AR 및 A_{2B}AR가 심혈관 스트레스 반응 및 염증반응 과정에 관여하는 중요한 매개인자 중의 하나로 알려져 있으나 심근 허혈 및 재관류 시의 역할에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 아직까지 A₂AR에만 선택적으로

논문접수일 : 2008년 5월 13일

책임저자 : 장영호, 대구광역시 남구 대명2동 2083-13

푸른병원 마취과, 우편번호: 705-821

Tel: 053-427-8275, Fax: 053-427-8276

E-mail: weonjo@dsmc.or.kr

작용하는 약물이 개발되어 있지 않아 A₂AR의 작용을 연구하기 위해서는 많은 어려움이 있으며, 따라서 A₂AR의 작용을 연구하기 위해서는 A₂AR 길항제를 이용한 연구들이 시행된다.

5'-N-Ethylcarboxaminidoadenosine (NECA)는 A₁AR보다 A₂AR에 보다 선택적으로 작용하여 현재로서는 NECA가 A₂AR의 작용을 간접적으로 이해하기 위하여 사용될 수 있는 가장 유용한 약물이며, 최근 NECA에 의한 심근 재관류 손상 보호 기전을 밝히기 위한 연구들이^{7,8)} 진행되고 있으나 아직까지 그 기전은 분명하지 않다.

한편 세포내에서 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의존성 protein kinase G (PKG)의 활성화는 심장 보호를 위한 세포내 신호를 세포질에서 사립체 내막으로 전달하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ Xu 등은¹⁰⁾ 심근 세포를 이용한 실험을 통하여 모든 아형의 AR에 작용하는 내인성 adenosine의 심근 보호 작용에 PKG가 adenosine의 하향매개인자로 작용한다고 보고하였으며 이에 A_{2A}AR가 주로 관여한다고 하였다. 그러나 대표적인 A₂AR 작용약물인 NECA가 PKG를 활성화시키는 지에 대해서는 알려진 바 없다.

최근 연구에 의하면 mPTP 개방 억제제가 재관류 손상에 의한 심근 보호의 최종 신호전달 부위로 알려지고 있다.^{11,12)} 또한 허혈성 전처치(ischemic preconditioning, IPC) 및 허혈성 후처치(ischemic postconditioning, Post-C)에 의한 심근 보호 기전에도 mPTP가 관여함이 알려져 있다.¹³⁻¹⁵⁾ 한편 흰쥐에서 재관류 시 투여한 A₃AR 작용약물인 IB-MECA가 glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) 비활성화 및 mPTP 개방을 억제시켜 심근 재관류 손상을 예방함이 보고되어 있다.⁵⁾ 그러나 A₂AR에 주로 작용하는 NECA가 GSK-3 β 억제 및 mPTP 개방 억제를 유발하는 지에 대해서는 아직까지 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 흰쥐의 적출 심장에서 재관류 시 투여한 NECA가 심근 괴사를 감소시킬 수 있는지를 확인하고 NECA에 의한 심근 보호 기전에 cGMP/PKG 경로의 활성화, GSK-3 β 비활성화 및 mPTP 개방 억제제가 관여하는지를 연구함으로써 재관류 시 NECA의 심장 보호 기전에 관여하는 세포내 신호전달 경로를 밝히고자 하였다.

대상 및 방법

약물 및 화학물질

마취제로 pentobarbital sodium (Entobar[®], Hallim Pharm, Korea)을 이용하였고 실험용 처치약물로 NECA와 A_{2B}AR 길항제인 MRS1706, PKG 억제제인 KT5823, guanylyl cyclase 억제제인 ODQ 및 GSK-3 β 억제제인 SB216763 (Tocris Cookson Inc., USA)를 이용하였고 A_{2A}AR 길항제인 8-(3-

chlorostyryl)caffeine (CSC, Research Biochemicals International, USA)는 dimethyl sulfoxide에 녹여 사용하였다. mPTP 개방제로 atractyloside (Sigma Chemical Co., USA)는 증류수에 녹여 사용하였다.

허혈위험 영역 및 괴사 영역을 측정하기 위해 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma Chemical Co., USA)와 형광 중합체 미세구(fluorescent polymer microsphere, Duke Scientific Corp., USA)를 사용하였다.

Langendorff 시스템을 이용한 적출 심장의 관류

모든 동물실험은 본원 실험동물관리위원회의 심의 후 규정에 따라 시행되었다. 체중 280–330 gm의 수컷 Wistar 흰쥐(Korea Taconic Co., Korea)를 대상으로 100 mg/kg의 pentobarbital sodium을 복강 내로 주입하여 마취를 유도하였으며 300 IU의 헤파린을 함께 투여하였다. 꼬리에서의 통증 자극에 대한 반응이 없음을 확인한 후 정중 개흉을 시행하여 심장을 노출시킨 다음 4°C 식염수를 심장 위에 붓고 심장을 빠르게 적출하였다. 적출된 심장의 대동맥을 신속히 Langendorff 시스템에 걸고 modified Krebs-Henseleit (KH) 완충액을 흐르게 하여 관상동맥 관류가 가능하도록 하였다. Modified KH 완충액은 118.5 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 1.8 CaCl₂, 24.8 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄ 및 10 glucose (단위 mM)로 실험 당일 제조하여 사용하였다. 제조된 modified KH 완충액은 2.0 μ m의 미세여과기(Nalge Nunc International Corp., USA)로 여과한 후 사용하였다. 실험 30분 전부터 95% O₂와 5% CO₂를 modified KH 완충액으로 투여하였으며, pH가 약 7.4가 되도록 하였다. Langendorff 시스템은 물순환펌프를 이용하여 38°C가 되도록 하였으며, 관류압은 심장에서부터 완충액까지의 높이를 맞춤으로써 100 cmH₂O가 되도록 하였다. Langendorff 시스템에 걸린 심장의 좌심방을 통하여 좌심실내로 작은 풍선을 넣어 MP150 압력변환기(Biopac Systems, USA)에 연결한 다음 좌심실압을 측정할 수 있도록 하였다.

심근의 부위 허혈 유발

부위 허혈을 유발하기 위하여 좌심실부속물과 우심실 유출부 사이에 위치한 좌관상동맥 근위부를 바늘이 달린 4-0 폴리프로필렌 실을 이용하여 튼 다음 실의 양 끝을 PE50 튜브에 통과시켜 올가미가 형성되도록 하였다. 부위 허혈의 유발은 최소 30분간의 안정기를 취한 후 시행되었다. 부위 허혈은 올가미가 형성된 실을 당겨 관상관류를 차단함으로써 유발하였으며, 허혈 부위 이하에서의 심장 색깔 변화 및 좌심실압의 감소를 관찰함으로써 확인하였다. 재관류는 올가미를 이완시켜 유발하였다. 재관류 후 심실세동이 나타나는 경우 대부분 수 십초 이내에 자발적으로 동성리듬으로 전

환되었으나 45초 이상 심실세동이 지속되는 경우에는 손가락으로 심장을 자극시켜 정상 리듬으로 전환되도록 하였다.

실험 프로토콜

모든 심장의 부위 허혈은 30분간 시행되었고, 재판류는 2시간 동안 시행하였다. 동물을 무작위로 총 11군의 실험이 시행되었다. 투여된 약물의 농도는 흰쥐에 사용된 기존 보고들을 근거로 결정하였다(NECA 100 nM, CSC 1 μM, MRS1706 10 nM, atractyloside 20 μM, KT5823 1 μM, ODQ 10 μM, SB216763 3 μM).^{5,16-18} 모든 실험 약물들은 2.5 mM 이하의 저장액을 만든 다음 4°C에 저장하여 사용하였으며, 재판류 5분 전부터 재판류 후 60분까지, 총 65분간 투여되었다.

허혈/재판류 모델을 이용한 흰쥐의 적출 심장에서 재판류 시 투여한 NECA에 의한 심근 괴사 감소 정도를 확인하기 위하여 대조군(n = 8) 및 NECA군(n = 8)에서 재판류 2시간 후 심근 괴사 정도를 비교하였으며, 이의 효과를 재판류 후 심근 괴사를 유의하게 감소시킬 수 있음이 최근 보고된 Post-C군(n = 9)과 비교하였다. Post-C는 재판류 직후 10초의 전허혈(global ischemia) 및 10초의 재판류를 6회 반복 시행하여 유발하였다.¹⁴ 또한 NECA에 의한 항괴사 효과가 A₂AR의 어느 아형에 의한 것인지를 알아보기 위하여 두 종류의 A₂AR 길항제 즉, A_{2A}AR 길항제인 CSC (NECA + CSC군, n = 7) 및 A_{2B}AR 길항제인 MRS1706 (NECA + MRS군, n = 8)을 NECA와 함께 투여하여 심근 괴사 정도를 NECA 투여 군과 비교하였다.

또 다른 군에서는 NECA에 의한 재판류 손상 감소 기전에 PKG와 guanylyl cyclase의 관련성을 알아보기 위하여 적출 심장을 무작위로 재판류 시 NECA와 함께 PKG 억제제인 KT5823 (NECA + KT군, n = 8) 및 guanylyl cyclase 억제제인 ODQ (NECA + ODQ군, n = 8)를 투여하여 재판류 2시간 후 심근 괴사 정도를 NECA 투여 군과 비교하였다. 또한 NECA에 의한 심근보호 작용에 GSK-3β가 관여하는 지 그리고 GSK-3β가 AR 및 PKG의 하향 매개인자가 되는 지를 알아보기 위하여 재판류 시 NECA 및 GSK-3β 억제제인 SB216763과 함께 KT5823 (NECA + KT + SB군, n = 8) 혹은 MRS1706 (NECA + MRS + SB군, n = 7)을 투여하는 심장에서 재판류 후 심근 괴사 정도를 NECA군과 비교하였다. 그리고 재판류 시 투여한 NECA가 mPTP 개방을 억제하는지를 알아보기 위하여 재판류 시 NECA와 함께 mPTP 개방 억제제인 atractyloside를 투여하여(NECA + ATR군, n = 7) 심근 괴사 정도를 NECA군 및 atractyloside 단독 투여 군(ATR군, n = 10)과 비교하였다.

허혈 위험 영역 및 괴사 영역의 측정

허혈 위험 영역 및 괴사 영역의 측정은 흰쥐 적출 심장에서 시행된 기존의 보고와¹⁹) 동일하게 다음과 같이 시행되었다. 실험 종료(재판류 2시간) 후 좌관상동맥에 거치된 폴리프로필렌 실을 절찰 한 다음 희석된 2-9 μm 직경의 형광 중합체 미세구 3 ml를 대동맥을 통하여 서서히 주입하였다. 심장을 Langendorff 시스템에서 떼어내어 무게를 잰 후 -20°C에 1-3시간 냉동시킨 다음 Acrylic Rodent Heart Matrix (Zivic Instruments, USA)를 이용하여 2 mm의 두께로 수평으로 절개하였다. 절편들을 37°C의 sodium phosphate 완충액에 녹인 1% TTC 용액(pH = 7.4)에 20분간 담근 후 10% 포르말린 용액에 넣어 염색이 되는 생존 영역(viable area)과 염색이 되지 않는 괴사 영역(area at necrosis, AN)이 명확하게 되도록 하였다. 이후 절편들을 유리판 위에 놓고 또 다른 유리판으로 덮었으며 두 유리판 간격은 2 mm가 되도록 하였다. 유리판 위에 아세테이트 투명지를 놓고 자외선 발생기를 이용하여 형광 중합체 미세구가 보이지 않는 허혈 영역(area at risk, AAR)과 TTC에 의하여 염색이 되지 않은 AN을 그린 후 스캔 한 다음 Image Tool 프로그램(UTHSCSA Image Tool, version 3.0)을 이용하여 정량화하였다. 심장 괴사 영역은 허혈 영역에 대한 비율(AN/AAR)로 표현하였으며, 모든 영역의 측정은 본 동물실험에 직접 참여하지 않은 연구자에 의하여 맹검법으로 시행하였다. 각 군에서 흰쥐의 체중 및 적출된 심장 무게의 차이는 없었다.

통계 처리

결과 값은 평균 ± 표준오차로 표시하였으며, 결과 분석은 SPSS 프로그램(SPSS for windows, version 12.0, USA)을 이용하여 one-way ANOVA와 사후 검정으로는 LSD test를 시행하였고, P값이 0.05 미만인 경우를 유의있는 것으로 간주하였다.

결 과

모든 동물의 심장은 40초 이내에 Langendorff 시스템에 걸러 관상동맥 관류가 시행되었다. 실험을 위하여 총 92마리의 흰쥐가 이용되었으며, 안정기 동안 3마리에서 좌심실유발압(좌심실수축기압-좌심실이완말기압)이 80 mmHg 이하, 1마리에서 분당 250회 이하의 서맥이 발생되어 4마리가 실험에서 제외되어 88마리의 적출 심장에서 결과를 비교하였다.

대조군에서 AN/AAR은 30.7 ± 2.8%였으며, NECA군에서의 AN/AAR은 14.2 ± 1.9%로 대조군에 비하여 유의있게 감소하였다(P < 0.001). 이러한 NECA에 의한 심근 보호 효

과는 Post-C 군의($12.4 \pm 3.1\%$, $P < 0.001$ vs. control) 항괴사 효과와 유사하였다(Fig. 1).

NECA에 의한 항괴사 효과는 A_{2A} AR 길항제인 CSC ($23.7 \pm 3.4\%$, $P < 0.05$ vs. NECA)와 A_{2B} AR 길항제인 MRS1706 ($29.9 \pm 3.3\%$, $P < 0.001$ vs. NECA)에 의하여 상쇄되었다(Fig. 2).

NECA + KT군 및 NECA + ODQ 군에서의 AN/AAR은

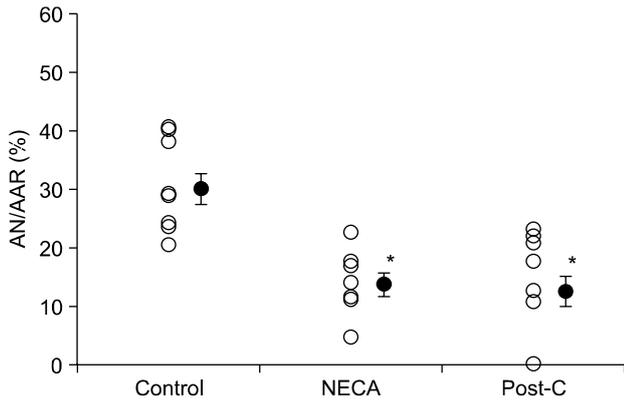


Fig. 1. Area at necrosis (AN) as a percentage of area at risk (AAR) by NECA treatment targeting reperfusion phase and ischemic postconditioning (Post-C) in isolated rat hearts. The anti-infarct effect of NECA is comparable to the Post-C. Open circles represent individual experiments while closed circles depict group mean \pm SEM. *: $P < 0.05$ vs. control.

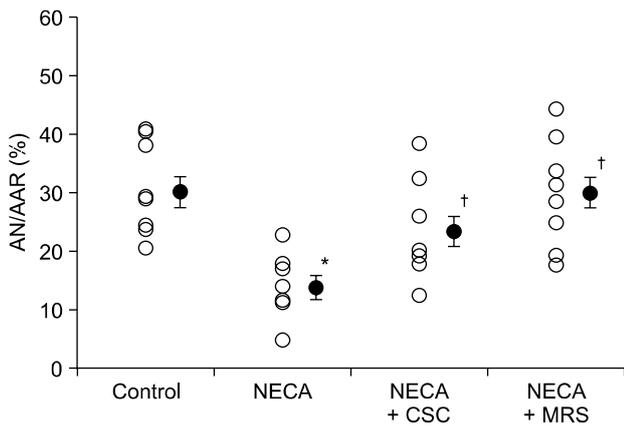


Fig. 2. Area at necrosis (AN) as percentage of area at risk (AAR) by A_2 adenosine receptor (AR) antagonists in NECA treatment hearts. The anti-infarct effect of NECA is antagonized by both CSC and MRS1706. Open circles represent individual experiments while closed circles depict group mean \pm SEM. CSC: 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (an A_{2A} AR antagonist), MRS: MRS1706 (an A_{2B} AR antagonist). *: $P < 0.05$ vs. control, †: $P < 0.05$ vs. NECA.

각각 $30.3 \pm 3.2\%$ ($P < 0.001$ vs. NECA) 및 $23.1 \pm 2.9\%$ ($P < 0.05$ vs. NECA)로 NECA에 의한 항괴사 효과가 상쇄되었다(Fig. 3). NECA + MRS + SB군 및 NECA + KT + SB군에서의 AN/AAR은 각각 $17.8 \pm 2.7\%$ ($P < 0.05$ vs. control) 및 $8.2 \pm 1.8\%$ ($P < 0.001$ vs. control)로 두 군 모두에서 대조군에 비하여 심근 괴사가 감소하였다(Fig. 4).

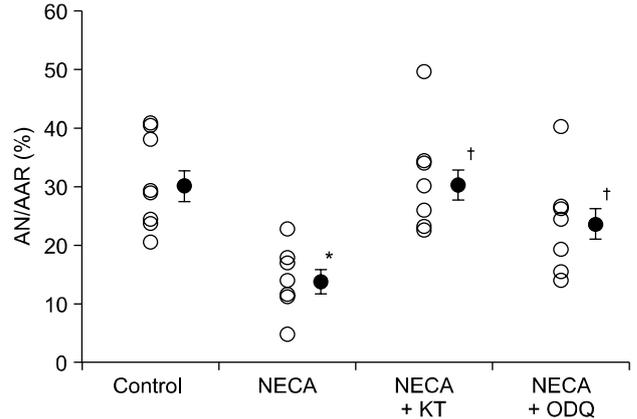


Fig. 3. Area at necrosis (AN) as percentage of area at risk (AAR) by protein kinase G (PKG) inhibitor or guanylyl cyclase inhibitor in NECA treatment hearts. The anti-infarct effect of NECA is antagonized by KT5823 and ODQ. Open circles represent individual experiments while closed circles depict group mean \pm SEM. ODQ: a guanylyl cyclase inhibitor, KT: KT5823, a PKG inhibitor. *: $P < 0.05$ vs. control, †: $P < 0.05$ vs. NECA.

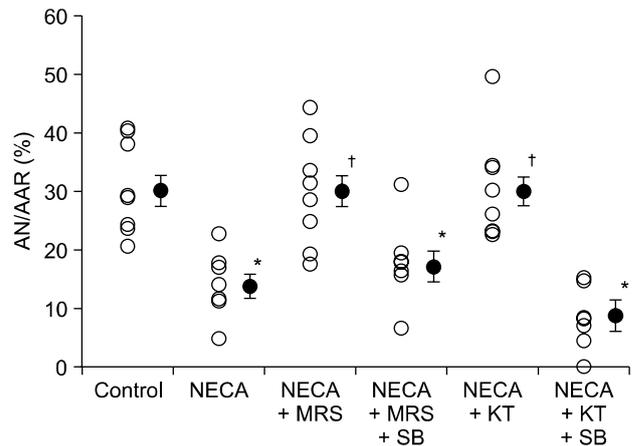


Fig. 4. Area at necrosis (AN) as percentage of area at risk (AAR). SB216763 attenuates the AN/AAR in both NECA with MRS and NECA with KT5823 treated hearts. Open circles represent individual experiments while closed circles depict group mean \pm SEM. MRS: MRS1706 (an A_{2B} AR antagonist), KT: KT5823 (a protein kinase G inhibitor), SB; SB216763 (a glycogen synthase kinase-3 β inhibitor). *: $P < 0.05$ vs. control, †: $P < 0.05$ vs. NECA.

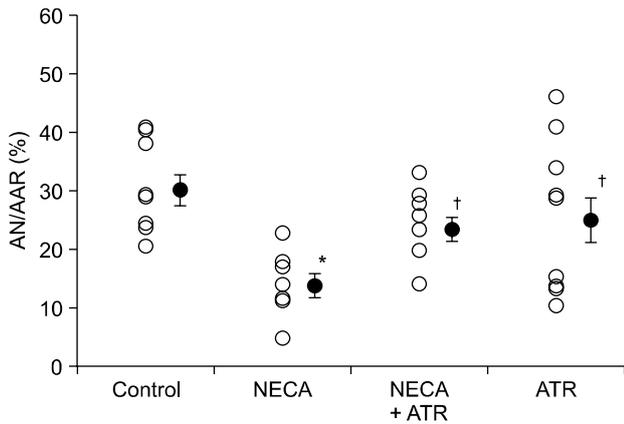


Fig. 5. Area at necrosis (AN) as percentage of area at risk (AAR) by mitochondrial permeability transition pore opener (atractyloside, ATR) in NECA treatment hearts. ATR aborts NECA's anti-infarct effect. ATR itself does not alter infarct size. Open circles represent individual experiments while closed circles depict group mean \pm SEM. *: $P < 0.05$ vs. control, †: $P < 0.05$ vs. NECA.

NECA + ATR군에서 AN/AAR은 $24.7 \pm 2.4\%$ 로 NECA에 의한 심근 괴사 감소 효과가 상쇄되었으며($P < 0.05$ vs. NECA) atractyloside 자체는 심근 괴사($24.7 \pm 4.0\%$)에 영향을 미치지 않았다(Fig. 5).

고 찰

1987년 Olafsson 등이²⁰⁾ 개의 관상동맥 내로 adenosine을 주입하여 재관류 시 심근 괴사를 감소시킬 수 있었다는 보고를 한 이후로 adenosine에 의한 심근 재관류 손상 보호에 대하여 많은 연구들이 시행되었다. 그러나 adenosine의 심장 보호 효과는 동물의 종, 허혈 시간 및 재관류 시간 등에 따라 일치되지 않아 재관류 시 투여하는 adenosine의 효과에 대해서는 많은 논란이 있어 왔다.^{21,22)} 하지만 최근 A₁AR 및 A₃AR 등의 수용체에 선택적으로 작용하는 adenosine 유사물질들이 개발되고 이 약물들이 재관류 시 심근 보호에 효과적임이 실험적으로 입증되면서^{1,5,8)} 이에 대한 연구들이 많이 진행되고 있다.

한편 A₂AR의 심근 보호 작용에 대한 최초 연구는 현재는 생산되지 않는 A₁AR와 A_{2A}AR에 동시에 작용하는 약물인 AMP579를 이용하여 이루어졌다. Xu 등과²³⁾ Kis 등은²⁴⁾ 토끼를 이용한 실험에서 재관류 시 투여한 AMP579가 심근 괴사를 감소시켰으며, 여기에 A_{2A}AR가 중요한 역할을 한다고 하였고 이러한 재관류 시 투여한 AMP579의 항괴사 효과 기전에는 세포의 신호조절 키나아제(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 등이 관여한다고 알려져 있다.^{25,26)} 그러나 AMP579는 A₂AR 중 A_{2A}AR에는 친화력이 있으나

A_{2B}AR에는 친화력이 없으므로 심근 보호를 위한 A₂AR의 역할을 연구하기에는 한계가 있으며, A₁/A_{2A}AR 작용약물로 알려진 AMP579의 심근 보호 기전에 A₁AR가 작용하지 않는 이유 또한 명확하지 않다.

한편 A₂AR에 주로 작용하는 약물로는 CGS21680과 본 연구에서 사용한 NECA가 대표적인데 CGS21680과 NECA의 A_{2A}AR의 친화력은 유사하지만 A_{2B}AR의 친화력은 NECA가 CGS21680에 비하여 37배 더 친화적이며,²⁷⁾ 따라서 CGS21680이 선택적 A_{2A}AR 작용약물로 분류되는 반면 NECA는 비선택적 A₂AR 작용약물로 분류된다. 본 연구 결과 흰쥐 적출 심장의 재관류 시 투여한 NECA는 대조군에 비하여 심근 괴사를 유의하게 감소시켰으며, NECA에 의한 항괴사 효과는 Post-C에 의한 항괴사 효과와 유사하였다. 또한 NECA에 의한 심근 괴사 감소 효과가 A_{2A}AR 길항제인 CSC와 A_{2B}AR 길항제인 MRS1706에 의하여 모두 상쇄되었는바 이러한 결과는 흰쥐의 재관류 시 투여한 NECA가 A_{2A}AR와 A_{2B}AR 모두를 활성화시키며, 이 두 가지 아형의 A₂AR 중 어느 한 가지 수용체를 차단할 경우 심근 보호 작용이 상쇄됨을 알 수 있었다. 즉, NECA에 의한 심근 보호 기전에는 A_{2A}AR 및 A_{2B}AR 두 가지 AR 활성화 모두가 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

NECA에 의한 심근 보호 기전으로 Yang 등은⁸⁾ PI3-kinase, ERK, 및 산화질소(nitric oxide)에 의한다고 하였으며, Förster 등은²⁸⁾ NECA의 항괴사 작용에 p70S6 키나아제가 중요한 역할을 한다고 하였다. 한편 cGMP/PKG 경로의 활성화는 심근 보호를 위한 중요한 세포내 신호 전달 과정 중의 하나로 알려져 있다. 심근 보호를 위한 약물의 투여 혹은 IPC 이나 Post-C과 같은 조작들은 세포 재생 인자 수용체(epidermal growth factor receptor)의 transactivation에 의하여 PI3-kinase를 활성화시키게 된다. PI3-kinase의 활성화는 주요 세포내 신호전달 효소 중의 하나인 Akt 및 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)를 인산화시키고 이는 guanylyl cyclase를 활성화시켜 cGMP 생성을 증가시킨다. cGMP는 다시 PKG를 활성화시켜 궁극적으로 사립체 내막에 있는 사립체 K_{ATP} 통로를 개방시키게 된다.²⁹⁾ 결국 심근 재관류 시 심근 세포 내로의 칼슘 과부하는 심근 과수축에 의한 재관류 손상을 야기하게 되는데 PKG의 활성화는 이러한 칼슘에 의한 심근 과수축을 감소시킨다.³⁰⁾ Xu 등은¹⁰⁾ 재관류 시 A₂AR 활성화가 심근 세포 내 칼슘 역학을 변화시켜 재관류로 인한 심근 세포의 과수축을 감소시켜 심근을 보호한다고 하였다. 본 연구 결과 NECA와 함께 guanylyl cyclase 억제제인 ODQ 혹은 PKG 억제제인 KT5823를 투여한 군들에서 NECA에 의한 심근 괴사 감소 효과가 완전히 상쇄된 것으로 보아 재관류 시 투여한 NECA의 항괴사 효과 기전에 cGMP/PKG 경로가 관여함을 알 수 있었다.

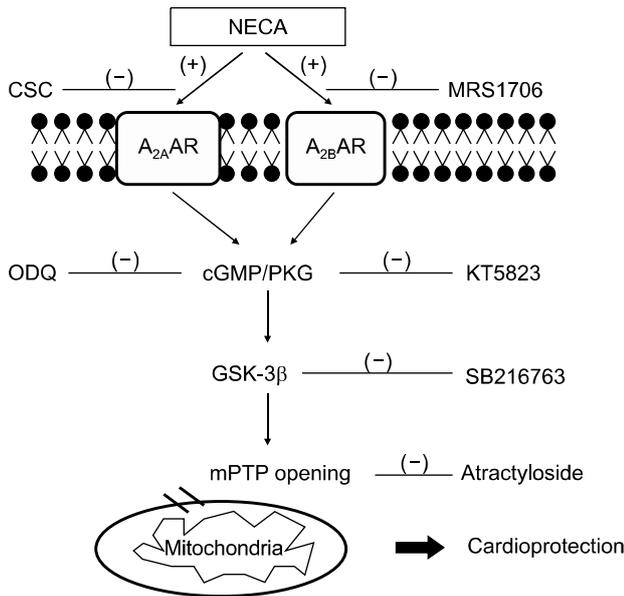


Fig. 6. Proposed cardioprotective mechanism responsible for NECA at reperfusion by various pharmacological inhibitor study. NECA activates both A_{2A} and A_{2B} adenosine receptor (AR) and inhibits cGMP dependent protein kinase G (PKG). This in turn inactivates glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and inhibits mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening, which is considered as an end effector of cardioprotection. (+): activation, (-): inactivation or inhibition.

한편 허혈 및 재관류 손상에 의한 심근 보호 작용에 GSK와 mPTP가 중요한 역할을 함이 밝혀져 있는데 GSK는 전사(transcription), 대사, 세포분열 및 세포자멸사 등과 같은 세포내 과정에 관여하는 중요한 효소 중의 하나로³¹⁾ 이의 비활성화가 심장 보호에 중요한 세포내 신호 전달의 중간 매개인이자 된다. 또한 사립체 내벽에 있는 mPTP의 개방은 막전위를 허탈시키고 호흡사슬 고리를 끊으며, 시토크롬 c 및 세포자멸사 유도인자(apoptosis-inducing factor)들을 방출시켜 세포자멸사 혹은 괴사를 야기하게 되며 이의 개방 억제체는 심근 보호를 위한 최종 효과처로 알려지고 있다.³²⁾ 본 연구 결과 재관류 시 투여한 NECA는 MRS1706 및 KT5823 과 함께 NECA를 투여한 군에서 GSK-3 β 억제제인 SB216763에 의하여 심근 괴사 감소 효과가 억제되지 못하였다. 이는 GSK-3 β 가 A_2 AR 및 PKG의 하향 매개인자임을 의미한다. 또한 mPTP 개방 억제제인 atractyloside에 의하여 NECA에 의한 항괴사 효과가 상쇄되었으며, 이는 NECA에 의한 재관류 시 심근 괴사 감소 기전에 mPTP의 개방 억제 역시 중요한 역할을 함을 의미한다.

결론적으로 허혈의 적출 심장에서 재관류 시 투여한 NECA는 A_2 AR 즉, A_{2A} AR 및 A_{2B} AR 모두를 활성화시키며, cGMP/PKG 기전을 활성화시키고 GSK-3 β 를 억제시켜

mPTP 개방을 방지함으로써 인하여 재관류 손상을 감소시킬 수 있었다(Fig. 6). 하지만 NECA에 의한 A_1 AR 및 A_3 AR에의 작용은 본 연구에서 제외되어 이에 대한 역할은 차후 밝혀져야 하겠다.

참 고 문 헌

- Xu Z, Jang Y, Mueller RA, Norfleet EA: IB-MECA and cardioprotection. *Cardiovasc Drug Rev* 2006; 24: 227-38.
- Dana A, Skarli M, Papakrivopoulou J, Yellon DM: Adenosine A1 receptor induced delayed preconditioning in rabbits: induction of p38 mitogen-activated protein kinase activation and Hsp27 phosphorylation via a tyrosine kinase- and protein kinase C-dependent mechanism. *Circ Res* 2000; 86: 989-97.
- Mubagwa K, Flameng W: Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001; 52: 25-39.
- Germack R, Dickenson JM: Adenosine triggers preconditioning through MEK/ERK1/2 signalling pathway during hypoxia/reoxygenation in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 429-42.
- Park SS, Zhao H, Jang Y, Mueller RA, Xu Z: N⁶-(3-Iodobenzyl)-adenosine-5'-N-methylcarboxamide confers cardioprotection at reperfusion by inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening via glycogen synthase kinase 3 β . *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 124-31.
- Germack R, Griffin M, Dickenson JM: Activation of protein kinase B by adenosine A1 and A3 receptors in newborn rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 989-99.
- Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV: Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 308-14.
- Yang XM, Krieg T, Cui L, Downey JM, Cohen MV: NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36: 411-21.
- Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, et al: Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res* 2005; 97: 329-36.
- Xu Z, Park SS, Mueller RA, Bagnell RC, Patterson C, Boysen PG: Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 803-12.
- Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ: Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 29-46.
- Hausenloy D, Wynne A, Duchon M, Yellon D: Transient mitochondrial permeability transition pore opening mediates preconditioning-induced protection. *Circulation* 2004; 109: 1714-7.
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, Loufouat J, Robert D, Ovize M: Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 2005; 111: 194-7.

14. Jang Y, Xi J, Wang H, Mueller RA, Norfleet EA, Xu Z: Postconditioning prevents reperfusion injury by activating delta-opioid receptors. *Anesthesiology* 2008; 108: 243-50.
15. Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM: Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 530-5.
16. Lozza G, Conti A, Ongini E, Monopoli A: Cardioprotective effects of adenosine A1 and A2A receptor agonists in the isolated rat heart. *Pharmacol Res* 1997; 35: 57-64.
17. Norton GR, Woodiwiss AJ, McGinn RJ, Lorbar M, Chung ES, Honeyman TW, et al: Adenosine A1 receptor-mediated anti-adrenergic effects are modulated by A2a receptor activation in rat heart. *Am J Physiol* 1999; 276: H 341-9.
18. Penna C, Cappello S, Mancardi D, Raimondo S, Rastaldo R, Gattullo D, et al: Post-conditioning reduces infarct size in the isolated rat heart: role of coronary flow and pressure and the nitric oxide/cGMP pathway. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 168-79.
19. Lee YC, Jang YH, Kim JM, Kim AR, Kim CJ, Kim YN: Effect of a kappa-opioid receptor agonist U50488H given at early reperfusion phase in isolated rat hearts. *Korean J Anesthesiol* 2008; 54: S 29-34.
20. Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, et al: Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 1987; 76: 1135-45.
21. Goto M, Miura T, Iliodoromitis EK, O'Leary EL, Ishimoto R, Yellon DM, et al: Adenosine infusion during early reperfusion failed to limit myocardial infarct size in a collateral deficient species. *Cardiovasc Res* 1991; 25: 943-9.
22. Vander Heide RS, Reimer KA: Effect of adenosine therapy at reperfusion on myocardial infarct size in dogs. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 711-8.
23. Xu Z, Downey JM, Cohen MV: AMP 579 reduces contracture and limits infarction in rabbit heart by activating adenosine A2 receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 38: 474-81.
24. Kis A, Baxter GF, Yellon DM: Limitation of myocardial reperfusion injury by AMP579, an adenosine A1/A2A receptor agonist: role of A2A receptor and Erk1/2. *Cardiovasc Drugs Ther* 2003; 17: 415-25.
25. Smits GJ, McVey M, Cox BF, Perrone MH, Clark KL: Cardioprotective effects of the novel adenosine A1/A2 receptor agonist AMP 579 in a porcine model of myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 611-8.
26. Budde JM, Velez DA, Zhao Z, Clark KL, Morris CD, Muraki S, et al: Comparative study of AMP579 and adenosine in inhibition of neutrophil-mediated vascular and myocardial injury during 24 h of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 294-305.
27. Xu Z, Mueller RA, Park SS, Boysen PG, Cohen MV, Downey JM: Cardioprotection with adenosine A2 receptor activation at reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 794-802.
28. Förster K, Paul I, Solenkova N, Staudt A, Cohen MV, Downey JM, et al: NECA at reperfusion limits infarction and inhibits formation of the mitochondrial permeability transition pore by activating p70S6 kinase. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 319-26.
29. Costa AD, Garlid KD, West IC, Lincoln TM, Downey JM, Cohen MV, et al: Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ Res* 2005; 97: 329-36.
30. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M: A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 291-300.
31. Frame S, Cohen P: GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001; 359: 1-16.
32. Bernardi P, Petronilli V: The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* 1996; 28: 131-8.