

토끼의 혈관 절편 세포내에서 Sevoflurane의 작용기전

연세대학교 의과대학 마취과학교실

김원옥 · 민경태 · 김해금 · 정재원 · 김종래

= Abstract =

Intracellular Mechanism of Sevoflurane's Effect on Isolated Vascular Rings of the Rabbits

Won Oak Kim, M.D., Kyeong Tae Min, M.D., Hae Keum Kil, M.D.
Jai Won Jung, M.D. and Jong Rae Kim, M.D.

Department of Anesthesiology Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

The purpose of this study were to elucidate how sevoflurane affects vascular smooth muscle and to understand the intracellular mechanism of sevoflurane. Isolated aortic rings of the rabbit were examined. Rings were mounted on tissue bath containing 40 ml of modified Krebs solution bubbled with 95% O₂/5% CO₂ and attached to force transducers. The preparations were contracted with either 40 mM KCl, or 0.1 μ M norepinephrine followed by 0.1 μ M acetylcholine (and 1 nM ryanodine)- or 2.8 mM lidocaine induced relaxation. At steady state contraction or relaxation, the effects of sevoflurane (2, 4, 5%) were studied. The steady state tension before administration of sevoflurane was considered as 100% and the changing tension during sevoflurane was expressed as a percentage. Sevoflurane (2, 4, 5%) produced relaxing effects (99.4 ± 0.6 , 98.1 ± 0.9 , $95.9 \pm 1.0\%$) on KCl-induced tension, independent of endothelium. Sevoflurane increased tension in the acetylcholine ($55.4 \pm 5.1\%$)- or lidocaine ($75.3 \pm 8.3\%$)- relaxed state (acetylcholine: 73.6 ± 5.3 , 86.8 ± 3.2 , $94.1 \pm 5.2\%$, acetylcholine+ryanodine: 63.7 ± 4.6 , 68.6 ± 7.2 , $70.4 \pm 2.5\%$, lidocaine: 83.7 ± 7.0 , 84.6 ± 12.1 , $85.3 \pm 4.4\%$). The effects were dose-dependent manner.

It is concluded that sevoflurane directly alters vascular contraction or relaxation in relation to Ca²⁺ mobilization on condition and that mechanism of sevoflurane's effects on the sarcoplasmic reticulum may play a primary role.

Key Words : Anesthetics, Sevoflurane, Smooth Muscle, Calcium

서 론

각종 흡입마취제의 투여는 혈액학과 신체의 여러 혈관에서 혈류의 변화를 초래하는 심혈관계 반응으로 나타나며, 각 흡입마취제에 따라 약간의 차이가

있는 것은 잘 알려진 사실이다.

흡입마취제 중에서 비교적 최근에 개발된 sevoflurane은 사람과 동물에서 심혈관계 작용에 있어서 기존의 다른 할로젠화 흡입마취제와 혈액학적으로 유사한 점도 많지만, 다소의 차이가 있기도 하다. 이 점에 있어서 sevoflurane은 특히 isoflurane, desflurane과 비슷한 것으로 보고 되고 있다¹⁻³⁾.

지금까지 알려진 바에 의하면 sevoflurane은 투여

*본 논문은 1993년도 연세대학교 학술연구비에 의해 이루어졌음.

용량에 비례하여 평균동맥압, 심근수축, 맥박수를 감소시키며, 기존의 흡입마취제 보다는 미약하지만 내장순환 혈관의 확장을 초래하는 것으로 되어 있다. 또 관상동맥 혈류의 변화는 별로 없지만 신허류는 상당히 감소시킨다고 한다³⁴⁾. 그러나 아직까지 이러한 신허관계의 변화를 초래하는 기전을 규명하는 구체적인 연구보고는 없다.

따라서 저자들은 자율신경 작용이 배제된 상태에서 sevoflurane이 혈관에 작용하는 기전에 대하여 연구 해볼 필요가 있다고 생각하여, sevoflurane이 토끼의 대동맥 평활근에서 근막(sarcolemma)를 통한 Ca^{2+} 과 근소포체(sarcoplasmic reticulum, SR)로부터 나오는 Ca^{2+} 에 미치는 영향을 알아 보는 실험을 하였고에 보고하는 바이다.

대상 및 방법

토끼의 대동맥 혈관 절편을 준비하는 과정은 Furchgott와 Zawadzki⁴⁾가 기술한 것과 같하였다. 암, 수 구별없이 백색 토끼(체중 2-2.5 kg) 17 마리를 대상으로 하여 ketamine 50 mg/kg를 정맥주사하여 마취를 한후에 한쪽 경동맥을 절단하여 실험을 시켰다. 그리고 난 후 조심스럽고 재빠르게 대동맥을 떼내어 실온의 Krebs 용액에 담그고 대동맥 표면에 붙어 있는 지방조직 및 결체조직을 제거하였다. 이때 용액에는 5% CO_2 /95% O_2 (혼합가스)가 포화 되도록 하였다.

정돈된(trimmed) 대동맥은 2.5-3.0 mm의 넓이로 잘라서 원 모양 절편 고리들(rings)를 만들었다. 이때 혈관내피(endothelium)를 없애야 하는 경우에는 가는다란 나무막대로 혈관벽 내부를 부드럽게 몇번 문질러 주었다. 그리고 40 ml의 Krebs 용액이 담긴 조직수조(tissue bath)로 옮겨서 대동맥 고리의 한쪽은 조직수조의 바닥에 있는 고리(hook)에 고정하고, 다른쪽은 L자형 stainless 철사로 장력측정기(force transducer, FT 03C, Grass, Quincy, MA, USA)에 연결하여 변화하는 대동맥 고리의 장력을 polygraph (79E, Grass)로 기록하였다. 조직수조의 용액은 혼합가스를 계속 주입하면서 pH 7.4, $37 \pm 0.6^\circ C$ 의 온도가 유지되도록 하였다. 대동맥 절편 고리는 기초장력을

2 g으로 하고 2 시간동안 안정이 되도록 하였다. Sevoflurane 투여때 혈관내피의 역할을 알아보기 위하여 내피를 그대로 둔 것과 제거한 것을 비교 하였다. 혈관내피의 존재여부는 대동맥 절편 고리를 norepinephrine(NE)으로 수축시킨 후에 acetylcholine (ACh)에 대한 이완 여부로 판정하였다.

실험용액은 변경된 Krebs 용액을 사용하였는데, 그 조성(단위 mM)은 121 NaCl, 1.2 $MgSO_4$, 2.4 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 11 glucose, 24.8 $NaHCO_3$, 2.5 $CaCl_2$, 0.03 Na_2EDTA 이며 5% CO_2 /95% O_2 (혼합가스)가 지속적으로 주입되도록 하였다. Sevoflurane은 혼합가스(분당 2 L)가 기화기(Sevoflu-Matic TCV-7, Aika Medical Co., Tokyo, Japan)를 통과하도록 하여 혼합가스와 함께 조직수조로 들어가 포말이 되도록 하였다. Sevoflurane의 농도는 기화기의 눈금판(dial set, %)으로 결정하였다.

실험절차는 혈관내피의 유무에 상관없이 다 같이 대동맥 절편 고리에 기초장력이 주어진 상태에서 안정이 된 후에 1) 40 mM의 KCl로 수축을 유발하여, 그 높이가 최대가 되면서 안정되었을 때 sevoflurane을 농도별(2, 4, 5%)로 투여하고 새롭게 안정이 될 때까지(대략 10-15분 간격) 같은 농도를 유지하였다. Sevoflurane의 투여중단 후에 본래의 장력으로 회복하는지를 보아 가역성을 판단하였다. 이러한 실험은 혈관내피를 그대로 둔 것과 제거한 것을 동시에 시행하여 비교하였다. 혈관내피의 존재여부는 대동맥 고리를 0.1 μM NE으로 수축시킨 후에 0.1 μM ACh에 대한 이완 여부에 따라 판정하였다. 2) 0.1 μM NE으로 수축이 일어난 후에 0.1 μM ACh으로 이완된 대동맥 절편 고리에 sevoflurane을 농도별로 투여하여 농도에 따른 수축 또는 이완의 정도를 관찰하였다. 3) Sevoflurane에 의한 SR에서 Ca^{2+} 유리를 알아보기 위하여 0.1 μM NE으로 수축이 일어난 후에 0.1 μM ACh으로 이완시킨 후, SR Ca^{2+} 유리 차단제인 1 nM의 ryanodine(RYA)을 투여하고 sevoflurane을 농도별로 투여하여 각각의 농도에 따른 수축 또는 이완의 정도를 관찰하였다. 4) 0.1 μM NE으로 수축이 일어난 후에 2.8 mM lidocaine을 투여하고 sevoflurane을 농도별로 투여하여 각각의 농도에 따른 수축 또는 이완의 정도를 관찰하였다.

모든 실험결과는 sevoflurane 투여 전 상태의 최대 수축높이를 기준(100%)으로 하여 실험으로 생기는 변화 정도를 %로 표시하여 여러번 측정된 값의 평균값을 구하였다. 같은 혈관내에서 마취농도의 차이에 따라 대조군(100%)과 비교하고 시간에 따라 변화하는 정도를 검정할 때는 ANOVA, 혈관내피의 유무에 따라 비교해야 하는 경우에는 Student independent t-test로 하였다. 통계 결과에서 $p < 0.05$ 를 의의 있는 것으로 간주하였다.

사용된 약품은 모두 시약수준으로 탈이온화된 중류수(Ca^{2+} free water)에 녹여서 사용하였다. Sevoflurane(일성신약 주식회사, 서울, 한국), lidocaine(Deimos, Milano, Italy), NE, ACh, RYA은 Sigma 제품(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)이다.

결 과

1) 40 mM KCl에 의해 유발된 수축에서 sevoflurane에 의한 장력의 변화

대동맥 절편 고리들($n=18$)을 두 시간동안 안정시킨 후에 40 mM KCl로 수축을 유발하였을 때 10분 이내에 수축의 높이가 최대로 되면서 안정되었다. 그러나 안정이 된 후에도 수축 높이가 약간의 변화(1.6 ± 0.2 %)가 있었다(그림 1의 윗부분). 그래서 변화가 있는 값들을 평균하여 40 mM KCl에 의한 평균 최대수축의 높이로 하였다. 이 평균 최대수축의 높이를 기준(100%)으로 하였을 때 sevoflurane 각각의 농도에 대하여 비례적으로 이완이 일어났다. 혈관내피의 존재에 따른 이완의 정도는 유의성이 없었다. 그러나 평균 최대수축의 높이에 대하여 sevoflurane 2%에서 99.4 ± 0.6 , 4%에서 98.1 ± 0.9 , 5%에서 95.9 ± 1.0 (%)에 해당하는 이완이 있었다(그림 2). Sevoflurane의 투여를 중단하니 다시 투여하기전 원상태(KCl에 의한 최대수축의 높이)로 회복되었다(그림 1의 아래 부분).

2) 0.1 μM NE에 의해 유발된 수축에서 0.1 μM ACh으로 이완한 후에 sevoflurane에 의한 장력의 변화

대동맥 절편 고리들($n=16$)을 두 시간동안 안정시

Time control

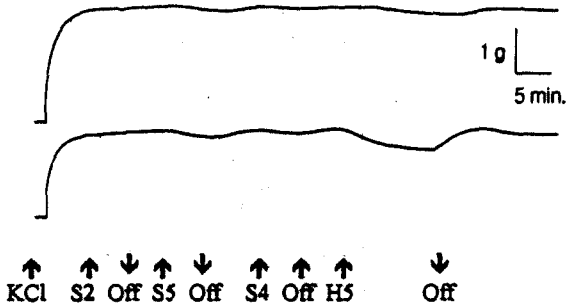


Fig. 1. Effects of sevoflurane on 40 mM KCl-induced tension development in isolated intact aortic rings(with or without endothelium intact-below). Time control means no drug administration, S2,4,5 means 2,4,5% sevoflurane; H5 means 5% halothane administration.

킨 후에 0.1 μM NE로 수축(100%)을 유발하고 0.1 μM ACh으로 이완되도록 하였다. 혈관내피가 있는 것은 55.4 ± 5.1 %의 이완이 있었지만, 혈관내피를 없앤 것은 이완이 일어나지 않았다. 그리고 sevoflurane을 각각의 농도로 투여하였을 때 혈관내피가 있는 것은 농도에 비례하여 ACh으로 이완된 상태에서 다시 수축이 생겼지만(그림 3의 윗부분), 혈관내피가 없는 것은 이완되지 않은 상태에서 약간의 변화만 있었다(그림 3의 아래부분). 혈관내피가 있는 경우에 ACh으로 이완된 상태에서 수축되는 정도를 보면 sevoflurane 2%에서 73.6 ± 5.3 , 4%에서 86.8 ± 3.2 , 5%에서 94.1 ± 5.2 (%)로 나타났다(그림 2)($p < 0.05$). 혈관내피가 없는 경우는 각각 102.1 ± 9.0 , 108.6 ± 18.2 , 102.4 ± 16.1 (%)이 되어 유의한 변화는 없었다.

3) 0.1 μM NE에 의해 유발된 수축에서 0.1 μM ACh으로 이완한 후에 1 nM ryanodine을 투여한 후 sevoflurane에 의한 장력의 변화

대동맥 절편 고리들($n=8$)을 두 시간동안 안정시킨 후에 0.1 μM NE로 수축(100 %)을 유발하고 0.1 μM ACh으로 이완되도록 하였다. 혈관내피가 있는 것은 54.6 ± 4.3 %의 이완이 있었지만, 혈관내피를 없앤 것은 이완이 일어나지 않았다. 그리고 ryanodine 1 nM을 투여하고 sevoflurane을 각각의 농도로 주었

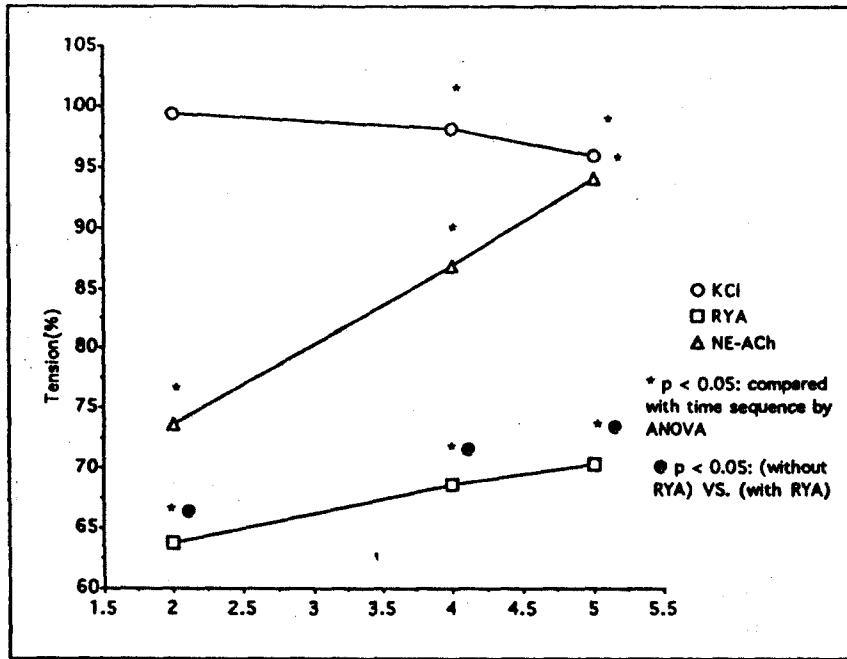


Fig. 2. Dose-response relationship of sevoflurane on KCl and NE-induced tension development on isolated intact aortic rings.

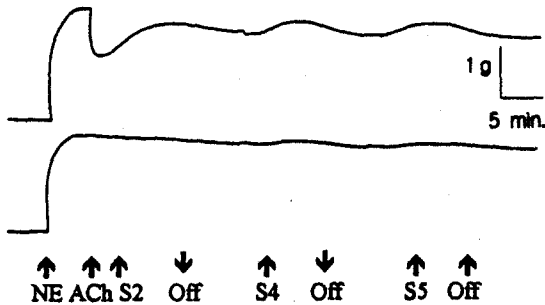


Fig. 3. Effects of sevoflurane on 0.1 μ M NE induced tension development in the presence of 0.1 μ M ACh in isolated intact aortic rings with endothelium intact or disrupted. S2,4,5 means 2,4,5% sevoflurane.

을 때 혈관내피가 있는 것은 농도에 비례하여 ACh으로 이완된 상태에서 다시 약간의 수축이 생겼지만, 혈관내피가 없는 것은 거의 변화가 없었다. 혈관내피가 있는 경우에 ACh으로 이완된 상태에서 수축되는 정도를 보면 sevoflurane 2%에서 63.7 ± 4.6 , 4%

에서 68.6 ± 7.2 , 5%에서 70.4 ± 2.5 (%)로 나타났으며 (그림 2), RYA를 주지 않은 경우에 비하여 완만하게 증가하였다($p < 0.05$). 혈관내피가 없는 경우는 각각 100.0 ± 3.2 , 102.8 ± 1.3 , 102.5 ± 2.3 (%)이 되어 차이가 없었다.

4) 0.1 μ M NE에 의해 유발된 수축에서 2.8 mM lidocaine을 투여한 후 sevoflurane에 의한 장력의 변화

대동맥 절편 고리들($n=10$)을 두 시간동안 안정시킨 후에 0.1 μ M NE로 수축(100%)을 유발하고 2.8 mM lidocaine으로 이완되도록 하였다. 혈관내피에 상관없이 이완이 일어났으며 혈관내피의 유무에 따른 이완 정도에는 차이가 없었다. 혈관내피가 있는 것은 $75.4 \pm 8.3\%$, 혈관내피를 없앤 것은 $74.9 \pm 6.5\%$ 의 이완이 있었다. 둘을 합친 평균적인 이완은 $75.3 \pm 4.4\%$ 였다. 그리고 2.8 mM lidocaine을 투여하고 sevoflurane을 각각의 농도로 주었을 때 혈관내피의

존재와 관계없이 농도에 비례하여 lidocaine으로 이완된 상태에서 다시 수축이 생겼는데(그림 4), 각각의 농도에 따라 평균적으로 2 %에서 83.7 ± 7.0 , 4%에서 84.6 ± 12.1 , 5%에서 85.3 ± 4.4 (%)가 되었다($p < 0.05$).

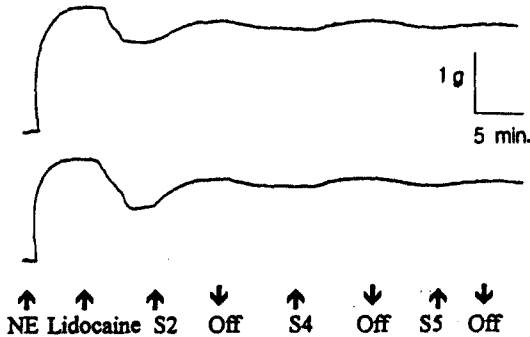


Fig. 4. Effects of sevoflurane on 0.1 μ M NE-induced tension development in the presence of 2.8 mM lidocaine in intact aortic rings with endothelium intact or disrupted. S2,4,5 means 2,4,5% sevoflurane.

고 찰

본 실험의 결과는 sevoflurane이 백색 토끼의 대동맥 절편 고리들에서 작용하는 기전이 halothane이나 enflurane과 비슷한 양상을 보여주고 있다⁵⁶⁾. 다만 sevoflurane이 halothane에 비하여 KCl에 의한 수축 유발때 같은 농도에서 이완정도가 상대적으로 약한 것을 확인할 수 있었다(그림 1). 토끼의 대동맥 혈관 절편 고리에서 halothane에 비하여 sevoflurane에서 이완의 정도에 있어서 차이가 나는 것은 sevoflurane이 halothane에 비하여 Ca^{2+} 에 대한 작용이 미약한 때문으로 생각된다. 그러나 sevoflurane은 halothane과 같이 처음에 약간의 수축이 있다가 금방 다시 이완이 생기는 biphasic 반응은 없었다. 이와같은 이완은 가역적으로 회복이 가능하며 또한 혈관내피의 유무와 상관없이 생기는 것으로 보아서 sevoflurane은 KCl에 의한 장력에서 혈관내피의 존재와 관계없이 영향을 미치고 있는 것을 알 수 있

었다. 이런 사실은 이미 Su 등이 토끼의 대동맥 절편 고리에서 KCl 혹은 NE의 투여에 의한 수축때 halothane의 이완작용이 혈관내피의 존재와 상관없이 작용한다는 것을 보고 한 바와 같다⁵⁾.

평활근에서 생리적인 수축을 위한 세포내 Ca^{2+} 의 원천은 근막을 통한 것이나 또는 근소포체에 저장된 것이 나오는 것으로 알려지고 있다. 고농도의 K은 막의 비탈분극을 통하여 근막으로 Ca^{2+} 의 유입을 가져온다. 유입된 Ca^{2+} 은 다시 근소포체에서 Ca^{2+} 의 유리가 생기게하여 세포내 Ca^{2+} 의 농도가 높아지게 한다. 그러므로 KCl에 의한 수축(그림 1)때 sevoflurane에 의해 이완되는 것은 sevoflurane에 의해 근막을 통한 Ca^{2+} 의 유입이 억제되고 그리고/또는 Na^+ - Ca^{2+} 의 교환이 촉진되기 때문으로 설명될 수 있다. 또한 근막을 통한 Ca^{2+} 의 유입의 감소로 근소포체에서 Ca^{2+} 의 축적이 억제되어 다음 수축때 근소포체 Ca^{2+} 의 이용이 저하될 것으로 생각할 수 있다. 그러나 근막을 통한 Ca^{2+} 의 유입 억제에 대한 실험적인 확증을 얻지는 못하였다.

한편 ACh(그림 3) 또는 lidocaine(그림 4)에 의해 이완된 상태에서 sevoflurane의 투여로 농도에 비례하여 다시 수축이 생기는 것은 세포내 Ca^{2+} 의 증가 때문으로 볼 수 있다. 이러한 증가의 원인으로는 근소포체에서 Ca^{2+} 의 유입 축적을 억제하거나 또는 유리를 촉진하기 때문이거나, 근막을 통하여 Ca^{2+} 이 유입되기 때문으로 생각할 수 있다. ACh은 NE에 의해 유입되는 Ca^{2+} 과 근소포체로부터 나오는 Ca^{2+} 를 감소시킨다. ACh에 의해 생성되는 내피 세포성 이완인자는 Ca^{2+} 이 근소포체로부터 유리되거나 재흡수되는 것을 억제한다. 이와같은 사실은 혈관내피의 유무에 영향을 받지 않고 작용하는 lidocaine에 의한 이완때나 ACh에 의한 이완때 sevoflurane에 의해 다시 수축이 생기는 것으로 보아 sevoflurane이 혈관내피와 상관없이 세포내에서 영향을 미치고 있다는 증거가 되고 있다. 그렇지만 Muldoon 등⁷⁾과 Toda 등⁸⁾은 halothane, isoflurane에서 ACh에 의한 내피 세포성 이완인자(EDRF, endothelium-derived relaxing factor)의 생성감소를 주장한 바 있다. 그러므로 halothane이나 isoflurane에 의한 수축과 ACh에 의해

유발된 이완의 약화가 내피 세포성 이완인자의 생성 감소 때문인지는 내피 세포성 이완인자의 생성에 대한 직접적인 측정에 의해 확인되어야 할 것으로 보인다. 이점은 sevoflurane에서도 유효한 것이 될 것이다.

Lidocaine은 기도⁹⁾, 혈관¹⁰⁾ 등의 평활근에서 Ca^{2+} 의 이동에 영향을 주어 직접 이완을 시키는 것으로 알려지고 있다. 이러한 작용은 일차적으로 세포내 Ca^{2+} 농도의 감소때문으로 설명되고 있는데 근막을 통한 Ca^{2+} 의 유입억제 때문으로 보인다. 그러므로 lidocaine의 투여 후에 sevoflurane에 의해 수축이 생기는 것은 sevoflurane이 근소포체의 Ca^{2+} 축적억제와 유리를 촉진하는 증거가 될 수 있다고 할 수 있다.

Ryanodine(RYA)은 근소포체의 Ca^{2+} 통로 차단제로 작용하면서, Ca^{2+} 의 유리통로에 대한 친화성이 아주 높기때문에 RYA를 세척을 한 후에도 여전히 Ca^{2+} 의 유리가 생긴다고 한다. 이에 따라 NE에 의해 수축을 유발 한 후에 ACh으로 이완이 되었을 때 $1nM$ 의 RYA를 투여하고 sevoflurane을 농도별로 주었을 때 수축의 정도(근소포체의 Ca^{2+} 의 유리)가 억제되고 있음을 알 수 있다. 이것은 RYA에 의해 근소포체의 Ca^{2+} 의 유리가 방해를 받게 되어 sevoflurane에 의해 Ca^{2+} 유리가 더 이상 촉진되지 못하여 수축이 줄어드는 것으로 생각 할 수 있다. 그러므로 이것은 sevoflurane이 근소포체의 Ca^{2+} 에 영향을 준다는 증거가 될 수 있을 것이다. 그렇지만 이와같은 사실로해서 sevoflurane이 근소포체의 Ca^{2+} 의 축적에 까지 영향을 미치는지는 불확실하다고 할 수 있다.

결 론

Sevoflurane은 대동맥 절편 고리에서 KCl에 의해 유발된 장력(수축)에서 혈관내피와 상관없이 장력이 감소(이완)되도록 하였다. 그러나 NE 투여후 ACh에 의한 이완때나 lidocaine에 의한 이완때에 sevoflurane은 농도에 비례하여 수축하는 것을 볼 수 있었다. 그렇지만 근소포체의 Ca^{2+} 차단제인 ryanodine의 투여 후에는 Sevoflurane에 의한 수축의 감소가 있었다. 이러한 결과로 보아 sevoflurane은 여러 조건에 따라 직접 수축과 이완을 유발할 수 있음을 알 수

있었으며, 또한 이때 주로 근소포체에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Jones RM. Desflurane and sevoflurane: Inhalation anaesthetics for this decade? *Br J Anaesth* 1990; 65: 527-36.
- 2) Crawford MW, Lerman J, Saldivia V, Carmichael FJ. Hemodynamic and organ blood flow responses to halothane and sevoflurane anesthesia during spontaneous ventilation. *Anesth Analg* 1992; 75: 1000-6.
- 3) Mazze RI. The safety of sevoflurane in humans. *Anesthesiology* 1992; 77: 1062-3.
- 4) Furgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
- 5) Su JY, Zhang CC. Intracellular mechanism of halothane's effect on isolated aortic strips of the rabbit. *Anesthesiology* 1989; 71: 409-17.
- 6) Su JY, Kerrick GL. Effects of enflurane on functionally skinned myocardial fibers from rabbits. *Anesthesiology* 1980; 52: 385-9.
- 7) Muldoon SM, Hart JL, Bowen KA, Freas W. Attenuation of endothelium-mediated vasodilation by halothane. *Anesthesiology* 1988; 68: 31-7.
- 8) Toda H, Nakamura K, Hatano Y, Nishiwada M, Kakuyama M, Mori K. Halothane and isoflurane inhibit endothelium-dependent relaxation elicited by acetylcholine. *Anesth Analg* 1992; 198-203.
- 9) Kai T, Nishimura J, Kobayashi S, Takahashi S, Yoshitake JI, Kanaide H. Effects of lidocaine on intracellular Ca^{2+} and tension in airway smooth muscle. *Anesthesiology* 1993; 78: 954-65.
- 10) Altura BM, Altura BT. Effects of local anesthetics, antihistamines, and glucocorticoids on peripheral blood flow and vascular smooth muscle. *Anesthesiology* 1974; 41:197-214.