Protamine의 심근 독성에 대한 연구

연세대학교 의과대학 마취과학교실

박윤곤 · 방서욱 · 홍용우 · 신호선

=Abstract=

Cardiotoxic Depressant Effects of Protamine

Wyun Kon Park, M.D., **Sou Ouk Bang**, M.D., **Yong Woo Hong**, M.D. and **Ho Sun Shin**, M.D.

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

The cellular cardiac effects of protamine, the cationic polypeptide employed to reverse heparin anticoagulation, were examined in vitro to define its mechanisms of action. Isometric contractile force and action potential (AP) characteristics after rest (RS) and at frequencies up to 3 Hz were recorded in guinea pig ventricular papillary muscle. The actions of protamine (10-300 μg/ml) were compared to those of heparin (10, 30 units/ml), and to heparin (10 units/ml) neutralized with equivalent (100 μg/ml) or excess (200 μg/ml) protamine. The effects of protamine were also examined using muscle rapid cooling contractures (RCCs to assess intracellular Ca^{2+} stores). Protamine (100-300 μg/ml) depressed contractions by 35-65% at 3 Hz, whereas contractions were enhanced 150-500% at lower rates (RS-0.5 Hz), with a concommitant rise in resting force. Protamine caused a resting depolarization from -84 to -72 mV and depressed AP amplitude. In contrast, heparin minimally altered contractile or AP characteristics. In 26 mM K^+-solution with 0.1 μM isoproterenol, 30-300 μg/ml protamine caused dose-dependent depression of late peaking force development and slow AP prolongation. After 15 minutes rest, when RCCs were not normally elicited, rest RCCs became prominent in 100-300 μg/ml protamine. Effects of heparin with 100 μg/ml excess protamine were similar to those of 100 μg/ml protamine alone. In conclusion the loss of normal force-frequency relation, partial depolarization, rise in resting tension, and appearance of rested state RCCs suggest that unbound protamine can lead to excess intracellular Ca^{2+}, mediated by an alteration in memebrane ionic conductances.

Key Words : Protamine, Heparin, Contractility, Electrophysiology, Rapid cooling contracture

서 론

Protamine sulfate는 개심술시 사용되는 heparin을 중화시키기 위해 현재 임상에서 널리 사용되고 있다. Protamine 투여시 heparin-protamine 복합체(complex)에 의한 보체 중개성 반응(complement-mediated reaction)에 의해 생성된 물질인 thromboxane에 의해 유발되는 심한 폐혈관수축에 의하거나[1] 또는 protamine에 대한 과민반응(anaphylactic reaction)[2,3]에 의해 드물기는 하나 간혹 심한 저혈압의 발생이 보고되어 왔다. 일부 임상 연구[4] 및 실험 동물을 이용한 생체내(in vivo) 연구[5-7]에서 저혈압의 원인은

*이 논문은 1993년도 연세대학교 학술연구비에 의하여 연구된 것임.

심근 수축기능의 저하가 주된 원인으로 보고되어 있는 반면, 다른 임상 연구[8-10] 및 생체내 연구[11]에서는 protamine 투여에 의한 체내의 histamine 유리에 의해 말초 혈관 저항이 감소하는 것이 심한 저혈압의 주된 원인으로 보고되어 있기도 하다. 적출된 심근 절편을 이용한 실험[12-17]에서 protamine의 심근 수축억제 작용이 보고되어 있기는 하나, 현재 protamine의 심근수축 억제에 대한 기전은 잘 알려져 있지 않다. 여러 세포형(cell type)에서 protamine에 의한 세포막의 이온 투과도의 증가에 의한 독성 효과가 또한 보고되어 왔다[7,18-20]. 적출된 guinea pig의 심실 유두근을 이용하여 protamine 의 심근 수축에 미치는 영향 및 전기 생리학적인 효과를 검증하고 아울러 이 결과를 heparin 단독 투여 및 heparin-protamine 복합체의 투여시 심근에 미치는 효과와 비교해 보고자 하였다.

실험대상 및 방법

Pentobarbital(30 mg/kg)을 복강내 주사로 마취후 guinea pig(300-400 gm)의 우심실 유두근을 적출하였다. 적출된 유두근을 기존의 acrylic bath에 수평으로 고정시키고 유두근의 기저부를 고정시킨후 유두건(chordae tendineae)의 끝부분을 GRASS FT03 Force Transducer에 연결하였다. 95% O_2/5% CO_2의 혼합 개스로 기포화 시킨 modified Kreb's solution [mM: Na 143, K 5, Cl 123, $MgSO_4$ 1.2, Ca 2, HCO_3^- 25, Glucose 11, Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 0.1]을 순환 펌프를 이용하여 분당 8 ml의 속도로 순환시켰으며 온도는 37℃, pH는 7.4±0.5로 유지하였다. GRASS S44 Stimulator에 연결되어 있으며 또한 bath의 벽에 부착되어 있는 스테인리스강으로 만든 전극을 이용하여 심근을 자극시키고 그 결과를 Digital storage oscilloscope 및 GRASS Model 79 E Polygraph을 통해 관찰, 기록하였다. 유두근 크기에 대한 최대장력 및 최대장력 발생속도를 비교하기 위해 각실험이 끝난 후 유두근의 횡단면 넓이(cross sectional area)를 근육의 길이, 무게 및 밀도(1.04 g/ml)를 측정하여 계산하였다. 횡단면 넓이의 평균치는 0.59±0.30 mm^2(mean±SD, n=42)이었다.

1) 심근 수축에 대한 실험

심근 수축의 정도는 최대장력(peak force) 및 최대장력 발생 속도(maximum rate of rise of force development, dF/dt max)의 측정으로 평가하였다. 1 Hz 자극하에 1시간 정도의 지속적인 자극으로 근수축이 안정되었다고 판단되면 15분간 휴식기를 가진 후 일회 자극(single stimulus)으로 근수축을 측정하고[이후부터는 이러한 자극에 대한 근수축을 RS (rested state) contraction으로 일컬음] 이후 0.1, 0.5, 1, 2, 3 Hz 순서로 근수축을 유발시켜 그 결과를 측정하였다. 각 자극회수에서의 근수축을 대조치로 하여 측정한 후 protamine을 10, 30, 100, 300 μg/ml의 농도로 순서적으로 투여하여 각 농도에 대한 반응을 관찰하였으며, 또 다른 실험군으로서 heparin 10 및 30 units/ml를 순서적으로 투여하였다. Heparin-protamine복합체 투여군은 대조치의 측정후 heparin을 10 units/ml로 15분간 투여한 상태에서 protamine 100 μg/ml 및 200 μg/ml를 연차적으로 투여하여 실험하였다. 각각의 약물의 검증이 끝난후 15분간 세척하여 회복을 관찰하였다. 이러한 실험을 5 mM K^+ 농도의 modified Kreb's solution 및 26 mM 농도의 high K^+ Kreb's solution(mM: Na 122, K 26, Cl 144, Ca 2, $MgSO_4$ 1.2, $HCO3^-$ 25, glucose 11, EDTA 0.1) 하에서 각각 시행하였다. 26 mM high K^+ Kreb's solution을 사용하는 경우 심근 수축을 유발시키기 위해 0.1 μM isoproterenol을 첨가하여 사용하였다. 0.1 μM Isoproterenol이 첨가된 상태에서 15분간 휴식기를 가진후 일회 자극(single stimulus)으로 근수축을 측정하고 이후 0.1, 0.5, 1, 2, 3 Hz 순서로 근수축을 유발시켜 그 결과를 측정하였다. 각 자극회수에서의 근수축을 대조치로 하여 측정한 후 protamine을 10, 30, 100, 300 μg/ml의 농도로 순서적으로 투여하여 각 농도에 대한 반응을 관찰하였으며, 또 다른 실험군으로서 heparin은 10 및 30 units/ml를 순서적으로 투여하였다. Heparin-protamine 복합체군은 대조치의 측정후 heparin을 10 units/ml로 15분간 투여한 상태에서 protamine 100 μg/ml 및 200 μg/ml를 연차적으로 투여하여 실험하였다. 각 약물의 검증이 끝난후 15분간 세척하여 회복을 관찰하였다. 0.1 μM

isoproterenol이 첨가된 26 mM high K^+ Kreb's solution에서는 modified Kreb's solution과는 달리 근수축시, 특히 낮은 회수의 자극하(RS, 0.1, 0.5, 1 Hz)에서 이상성(二相性) 근수축(biphasic contraction) 현상을 관찰할 수 있으며 이러한 이상성 근수축은 현재 심근의 근소포체로 부터 Ca^{2+}의 방출에 의한 것으로 생각되어지고 있다[21]. 26 mM high K^+ Kreb's solution하의 대조군(약물투여를 하지않은 심근)에서는 RS contraction, 0.1, 0.5 Hz 자극시 근수축 후반부에 장력발생(late phase of force development, dF_L/dt)을 관찰할 수 있으나 2 및 3 Hz의 자극에서는 modified Kreb's solution하의 근수축(early rapid rate of force development, dF_E/dt)과 같은 모습을 관찰할 수 있다[21]. 또한 심근의 부분적인 탈분극화 현상(partial depolarization, 약 40 mV)으로 인하여 심근막의 Na channel이 불활성화되므로 이때의 탈분극 최대 속도(dV/dt max)를 측정함에 의해 세포막의 Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+}의 근세포 원형질내로의 유입 정도를 간접적으로 측정할 수 있다.

2) 급속냉각 연축법에 의한 근수축에 대한 실험[22]

37℃의 modified Kreb's solution 하에서 우심실 유두근을 15분간 휴식시킨후 37℃로 순환시키던 순환 펌프를 중단시키면서 동시에 0-5℃의 냉각 modified Kreb's solution으로 약 2초간 유두근이 담겨 있는 bath를 급속 냉각시켰다. 급속냉각에 의한 장력 발생을 측정한 후 순환 펌프를 다시 작동시켜 37℃의 modified Kreb's solution으로 재순환시키면서 bath의 온도가 35℃로 증가되면 1 Hz의 회수로 심근을 자극하여 지속적인 근수축을 유발시켰다. 이후 2Hz 자극하에 최대 장력을 유발시킨후 37℃로 순환시켰던 순환 펌프를 다시 중단 시킨후 급속냉각을 시키면서 이때 유발된 연축(contracture)의 최대장력을 측정하였다. 정상 상태하에서는 15분간의 휴식기를 통해 근소포체내의 Ca^{2+}이 고갈되있는 상태[23,24]이므로 15분간의 휴식기후 급속냉각에 의한 연축의 유발은 관찰할 수 없으나 어떠한 원인에 의하던 간에 근소포체에 Ca^{2+}이 과잉 축적되어 있는 상태라면 15분간의 휴식기후 일회자극으로 심근의 연축정도를 관찰할 수 있다. Rested state 및 2Hz 자극후 급속냉각하여 이때 나타나는 장력을 각 자극회수에서의 대조치로 하고 이후 protamine 10, 30, 100, 300 μg/ml 농도를 순서적으로 투여하여 실험하였으며 또한 다른 실험군으로서 heparin-protamine 복합체(1:1 및 1:2)의 결과를 측정하였다. 각 약물농도의 투여 기간은 15분으로 하였다. 각 약물의 검증이 끝난후 15분간 세척하여 회복시의 연축현상을 관찰하였다.

3) 활동 전위에 대한 실험

WPI VF-1 amplifier에 연결된 conventional KCL-filled glass microelectrode(10-20 megaOhm)를 유두근의 기저부에 삽입시킨 후 심근을 0.1, 0.5, 1 Hz로 자극시켜 측정하였다. 각 자극회수에서의 활동전위를 대조치로 하여 측정한 후 protamine을 10, 30, 100, 300 μg/ml의 농도로 순서적으로 투여하여 각 농도에 대한 반응을 관찰하였으며, 또 다른 실험군으로서 heparin은 10 및 30 units/ml를 순서적으로 투여하여 관찰하였다. 각 약물의 검증이 끝난후 15분간 세척하여 회복시의 활동전위를 관찰하였다.

전 실험 기간동안 microelectrode가 한 세포에 유지되도록 하였으며 microelectrode가 동일한 세포로부터 빠진 경우는 결과에서 제외하였다. 측정된 결과를 Digital Storage Oscilloscope 및 GRASS Model 97 E Polygraph를 통해 관찰, 기록하였다. 활동전위의 높이(AP amplitude), 탈분극 최대속도(maximum rate of rise of depolarization, dV/dt max), 50% 및 90%에서의 활동전위 기간(APD_{50}, APD_{90}) 및 탈분극화 정도를 측정하였다. Modified Kreb's solution 및 26 mM high K^+ Kreb's solution하에서 상기 지표들을 측정하였다.

4) 약물의 종류와 사용 농도 및 투여 방법

Protamine sulfate(Elkins-Sinn Inc, Cherry Hill, NJ, USA)와 heparin sodium(Elkins-Sinn Inc, Cherry Hill, NJ, USA)을 사용하였다. Protamine은 modified Kreb's solution을 사용하여 100 mg%의 원액(stock solution)으로 만든 후 bath의 농도를 10, 30, 100, 300 μg/ml로 각각 유지하여 측정하였다. Heparin은 10, 30 units/ml의 농도를 사용하고 1:1 heparin-protamine 복합체(1H:1P)는 heparin 10 units/ml로 유지한 상태

에서 protamine 100 μg/ml를 투여하여 측정하며, 1:2 heparin-protamine 복합체 (1H:2P)는 heparin 10 units /ml, protamine 200 μg/ml를 순서적으로 사용하였다.

5) 자료 검증 방법

심근수축 및 활동전위 측정치는 각 약물 농도간의 차이를 검증하기 위하여 repeated measures of Analysis of Variance(ANOVA)를 사용하고 각 집단간의 유의성을 검증하기 위해 Fisher's PLSD test를 적용하였다. 동일 자극 회수에서 대조군과 각 농도의 차이를 검증하기 위해서는 two-tailed unpaired Student's t-test를 사용하였다. P value가 0.05 미만인 것을 통계학적인 의의가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1) Modified Kreb's solution 하의 유두근 실험

대조군의 실험에서 guinea pig의 유두근은 다른 실험 결과와 동일하게 positive force frequency "staircase"를 보였다. RS, 0.1, 0.5, 1, 2, 3 Hz 자극하에서 10 및 30 μg/ml의 protamine은 최대장력 및 최대장력 발생속도에 영향을 미치지 않았다. 100 및 300 μg/ml의 protamine 은 RS, 0.1, 0.5 Hz 자극하에서 투여 용량 증가에 비례하여 근수축이 증가되는 결과를 보이는 반면, guinea pig의 생리학적인 범주의 자극인 2, 3 Hz에서는 최대장력 및 최대 장력 발생속도가 투여 용량에 비례하여 대조치에 비해 감소하였다. 1 Hz의 자극 회수에서는 최대장력 및 최대장력 발생속도가 대조군과 비교하여 차이가 없었다.

0.1 Hz의 자극에서 100 μg/ml protamine 투여시 최대 장력이 130±60% 증가한 반면, 3 Hz에서는 34 ±9%로 대조치(100%)에 비해 감소하였다. RS, 0.1, 0.5 Hz의 자극에서 각 농도의 protamine은 최대 장력을 대조치에 비해 크게 증가시켰다(RS: 30 μg/ml, 89-350%, 100 μg/ml: 100-725%, 300 μg/ml: 237-537 %)(Fig. 1A). 최대장력 발생속도는 최대장력의 변화와 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 1B). 약물의 농도를 증가시킴에 따라 안정기 장력은 점차 증가하였으며 세척시 더욱 증가하였다. 100 및 300 μg/ml의 protamine은 protamine을 투여하지 않은 상태의 각

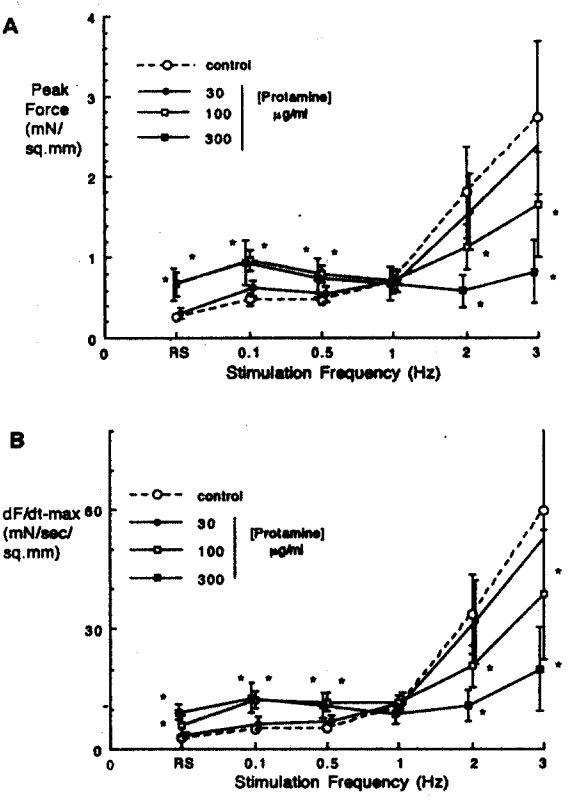

Fig. 1. Effects of increasing concentrations of protamine (30-300 μg/ml) on isometric force development of guinea pig papillary muscle in modified Kreb's solution from rested state (RS) up to a rate of 3 Hz. A, Peak developed force, and B, dF/dt-max, for control (open circle, dashed line) and for 30 (small square), 100 (large open square), and 300 μg/ml (large filled square) protamine concentrations (n=5). Depression of force at 2 and 3 Hz was significantly greater in 300 than 100 μg/ml. Force development in 10 μg/ml protamine (not shown) did not differ from control or 30 μg/ml. Results are plotted as mean±SEM. * $p<0.05$ from control values.

자극회수에서의 안정기(resting state) 장력(대조치)에 비해 안정기장력을 증가시켰으며, 특히 300 μg/ml의 protamine 투여시 더욱 현저하였다(Fig.2 A).

10 units/ml의 heparin은 RS, 0.1 Hz의 자극하에서 최대장력 발생 속도를 heparin을 투여하지 않은 상태인 대조치의 82-83%로 저하시킨 반면, 0.5, 1, 2, 3 Hz의 자극에서 별다른 변동을 관찰할 수 없었다. 30 units/ml의 heparin은 RS, 0.1 Hz의 자극에서 최대장

력 발생 속도를 대조치의 65±6%(RS), 73±8%(0.1 Hz)로 각각 감소시킨데 비해 0.5, 1, 2, 3 Hz에서는 대조치에 비해 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

10 units/ml heparin을 100 μg/ml로 중화시킨 경우(1H:1P) 심근 수축은 0.1 Hz의 자극회수의 경우를 제외하고는 대조치와 비교하여 변동이 없었다(Fig. 3). Rested state에서 3 Hz까지의 자극회수에서 heparin 투여전의 각 자극회수에서의 안정기 장력(대조치)과 비교하여 볼 때 heparin에 의한 안정기장력의 변화는 관찰할 수 없었으며 또한 각 자극회수에서의 1H:1P 복합체도 안정기 장력의 변동을 일으키지 않았으나, 1H:2P 복합체에서는 100 μg/ml protamine 투여시와 유사한 결과를 보였다(Fig. 2B, 이 그림에서는 0.5 Hz 자극시의 안정기 장력의 증가만을 표시하였다). 1H:2P 복합체는 RS, 0.1, 0.5 Hz의 자극에서 최대 장력 및 최대장력 발생속도가 약물을 투여하지 않은 상태의 대조치에 비해 증가하였으나, 2, 3 Hz에서는 감소하였다. 예로서 100 μg/ml protamine과 1H:2P 복합체는 0.1 Hz 자극하에서 대조치에 비해 각각 130±6 및 62±23%로 증가한 반면 3 Hz의 자극하에서는 34±9 및 52±3%로 감소하였다(Fig. 3).

10 및 30 μg/ml의 protamine은 안정막 전위(resting membrane potential)를 탈분극(depolarization)시키지 않은 반면, 100 및 300 μg/ml의 protamine은 의의있는 탈분극 현상을 보였다(Fig.2). 300 μg/ml의 protamine의 경우 탈분극 현상에 의해 활동전위는 0.5 Hz의 자극하에서 대조치 122±3 mV에서 101±6 mV로 감소하였다. 탈분극 최대속도는 10, 30, 100 및 300 μg/ml의 protamine 투여시 대조치에 비해 변동을 관찰할 수 없었다(Tab. 1). 0.5 Hz의 자극에서 100 μg/ml의 protamine은 대조치(100%)에 비해 APD_{50}가 84%, APD_{90}가 87%로 단축되었으며, 300 μg/ml에서는 각각 60, 68%로 단축되었다(대조치의 APD_{50}, APD_{90}: 142±8, 166±7 msec)(Tab 1). Heparin 투여군(10, 30 units/ml)에서는 활동전위 지표들의 변동을 관찰할 수 없었다(Tab. 1).

2) 26mM high-K^+ Kreb's solution 하의 유두근 실험

RS, 0.1, 0.5 Hz 자극하의 최대장력은 대조치에 비해 현저히 증가되었으며 또한 late maximum delay 전에 initial delay가 더욱 늦추어지는(delay) 효과를 보였다. 2, 3 Hz하에서는 initial 및 late delay 현상을

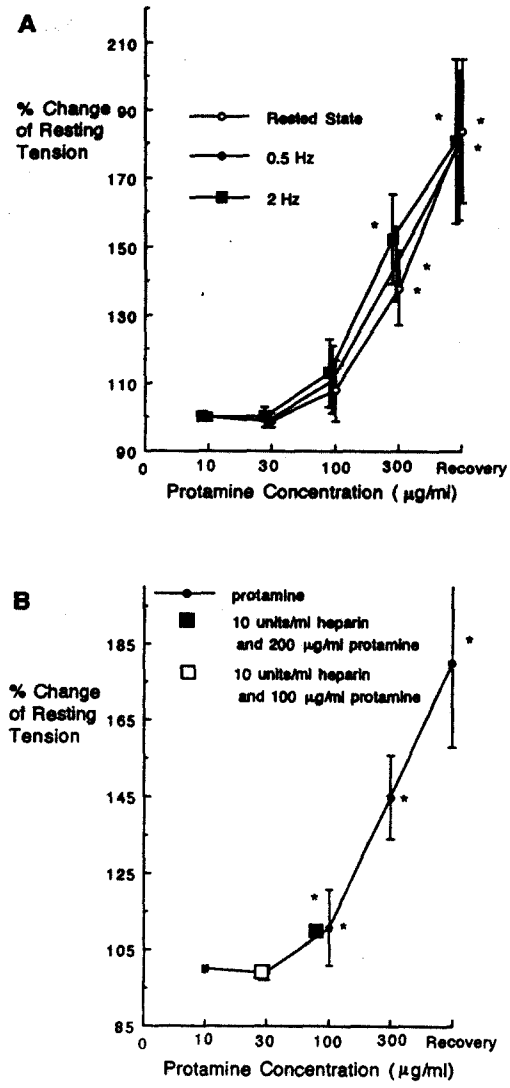

Fig. 2. A. Change in resting force induced by increasing concentrations of protamine at RS, 0.5 and 2 Hz stimulation rates. B. Change in resting force induced by increasing concentrations of protamine. The effect of 100 μg/ml excess protamine (10 units/ml heparin neutralized with 200 μg/ml protamine) is also indicated (large filled square). Results from froce-frequency and rapid cooling contracture studies are combined. Results are plotted as mean±SEM. * $p<0.05$ from control values.

Table 1. Effects of Protamine and Heparin on Normal Action Potential Characteristics at 0.5Hz

	N	Amplitude (mV)	dV / dt (V / sec)	APD_{50} (ms)	APD_{90} (ms)	Vm (mV)
Protamine	6					
Control		122±3	278±18	142± 8	166± 7	−84±2
30 ug/ml		118±3	259±16	139±11	163±11	−82±2
100 ug/ml		117±5	256± 9	119± 9	144±10	−79±2*
300 ug/ml		101±6*	225±14	85±10*	113±12*	−72±3*
Heparin	6					
Control		126±2	266±21	139± 9	162±10	
10 units/ml		127±1	250±25	140± 5	161± 6	
30 units/ml		124±2	241±34	138± 7	159± 7	

Values represent Mean±SEM for 17 experiments. Repeated measures of analysis of variance followed by fisher's PLSD test was used to test for difference among grous. * $P<0.05$ differed from control.

관찰할 수 없었다(Fig 4A). 0.5 Hz 이하의 자극에서 10, 30, 100 및 300 μg/ml의 protamine은 후반부 최대장력(late peaking force)의 감소를 보이는 반면, 2, 3 Hz에서는 대조치와 차이를 보이지 않았다. 30, 100 및 300 μg/ml의 protamine은 RS contraction에서 후반부 최대장력 발생속도(dF_L/dtmax)가 대조치에 비해 각각 58±6, 46±9, 28±8%로 감소하였으며, 0.1 및 0.5 Hz에서도 유사한 결과를 보였다. 전반부 최대장력 발생속도(dF_E/dtmax)는 RS, 0.1, 0.5 Hz 자극에서 대조치에 비해 약 60-70%로 감소한 반면 2, 3 Hz에서는 전반부 최대장력 발생속도의 감소를 관찰할 수 없었다(대조치의 96-115%). Protamine 투여시 안정기 장력의 변동은 관찰할 수 없었다.

활동전위에서 protamine은 활동 전위의 높이, 탈분극 최대속도의 변화를 나타내지 않았으나 modified Kreb's solution의 결과와는 반대로 APD_{50} 및 APD_{90}가 용량에 비례하여 의의있게 연장되었다(Tab 2, Fig. 4B, C).

3) 급속 냉각 연축법을 이용한 유두근 실험

적출된 근절편을 냉각수에 갑자기 노출시켰을 때 근소포체로 부터의 급격한 Ca^{2+} 방출에 의해 근육의 연축현상이 발생된다. 급속 냉각 연축 방법은 소포체의 Ca^{2+} 저장량을 측정할 수 있는 방법으로 생각되어지고 있다[22]. 정상 상태에서 15분간의 휴식기를

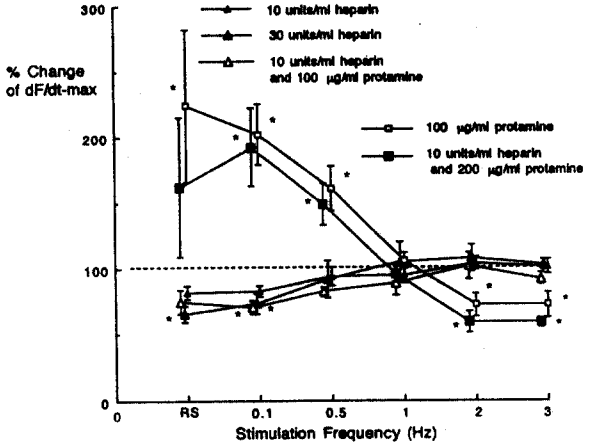

Fig. 3. Effects of 10 (small filled triangle) and 30 (large filled triangle) units/ml heparin on dF/dt max at various stimulation rates. The effects of 10 units/ml heparin neutralized with 100 μg/ml or overneutralized (large open angle) with 200 μg/ml protamine (open circle) are also shown. Results are plotted as percentage of control. For comparison, the effects of 100 μg/ml protamine alone (filled circle) are also shown. Results are plotted as mean±SEM. * $p<0.05$ from control values.

가진후 냉각수에 갑자기 노출시켰을 때 심근 수축현상은 일반적으로 관찰할 수 없는 반면(Fig. 5A), 37℃에서 유두근을 2 Hz로 자극후 최대장력에 이르렀을 때 자극을 중단하면서 바로 냉각수에 노출시켰을 때에는 심근의 연축 현상을 관찰할 수 있었다

(Fig. 5B). 대조군에서 2 Hz 자극후 급속 냉각시의 근수축 정도는 2 Hz 자극하의 근수축 정도와 유사하거나 약간 증가되는 양상을 보였다. 대조군에서 급속냉각 연축에 의한 최대장력과 2Hz 자극하의 최대장력의 비는 평균 0.87±0.12였다. 100 μg/ml의 protamine은 15분간의 휴식기후 적용한 급속 냉각에서 최대장력을 약간 증가시켰으나, 300 μg/ml에서는 의의있는 증가를 나타내었다(Fig. 5A). 이 결과는 protamine 투여군에서 대조군과는 달리 휴식기시 근소포체에 Ca^{2+}이 축적되어 있는 것을 의미한다. 100 및 300 μg/ml의 protamine 투여후 2 Hz의 자극은 modified Kreb's solution에서의 결과와 같이 대조치에 비해 감소한데 반해, 급속 냉각시의 최대장력은 대조치와 비교하여 차이가 없었다. 300 μg/ml의 protamine 투여시 2 Hz 자극후의 급속 냉각 연축에 의한 최대 장력과 2 Hz 자극하의 최대장력의 비는 2.0±0.5였다(Fig. 5B). Heparin의 경우 급속냉각시의 최대장력은 대조군과 동일하였다. 15분간의 휴식기후의 급속 냉각 연축에서 heparin 10 units/ml와 100 μg/ml protamine 복합 투여군의 급속냉각시의 최대장력은 대조군과 비교하여 차이가 없었으나, 200 μg/ml의 protamine 복합투여군에서는 급속 냉각 연축시 최대장력의 의의있는 증가를 나타내었다(Fig. 5C). 2 Hz 자극후의 급속냉각 연축시 최대장력은 100 μg/ml protamine의 결과와 유사하거나 약간 증가하는 결과를 보이고 있다(Fig. 5C). 2 Hz 자극후의 급속 냉각 연축에 의한 최대 장력과 2 Hz 자극시의 최대장력의 비는 1.5/2.0이었다.

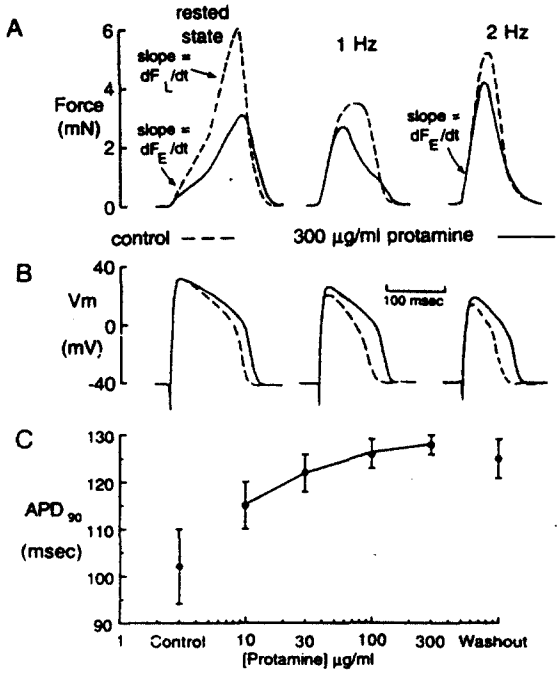

Fig. 4. Effects of 300 μg/ml protamine on contractile and electrophysiologic behavior of muscles exposed to 26 mM K^+ and 0.1 μM isoproterenol at rested state and stimulation frequencies of 1 and 2 Hz. A, typical frequency-dependent changes in contractile force under control (dashed line) and protamine-treated (filled line) conditions. Early (dFE/dt) and late (dFL/dt) rates of force development could be clearly identified. B, Slow action potentials under control (dashed line) and in the presence of protamine (filled line). C, Protamine-induced enhancement of action potential duration (APD90) observed at 0.5 Hz. Data are plotted as mean±SEM. All concentrations of protamine yielded significant changes from control ($p<0.05$).

고 찰

본 실험을 통해 guinea pig의 유두근에서 protamine은 생리학적인 범주의 자극시 투여 용량에 비례하여 심근수축을 억제시키는 반면, 저자극하(RS-0.5 Hz)에서는 심근 수축을 증가시키는 현상을 알게되었다. 적출된 심실근(Isolated ventricular myocardium)

Table 2. Effects of Protamine on Slow Action Potential Characteristics at 0.5 Hz

	N	Amplitude (mV)	dV/dt (V/sec)	APD_{50} (ms)	APD_{90} (ms)
Protamine	7				
Control		79±3	26±2	110±9	124±9
30 ug/ml		84±2	23±2	130±3*	143±3*
100 ug/ml		83±1	26±1	130±4*	143±4*
300 ug/ml		83±1	22±2	132±4*	147±4*

Values represent mean±SEM for 7 experiments. Repeated measures of analysis of variance followed by Fisher's PLSD test was used to test for differences among group. * $P<0.05$ differed from control

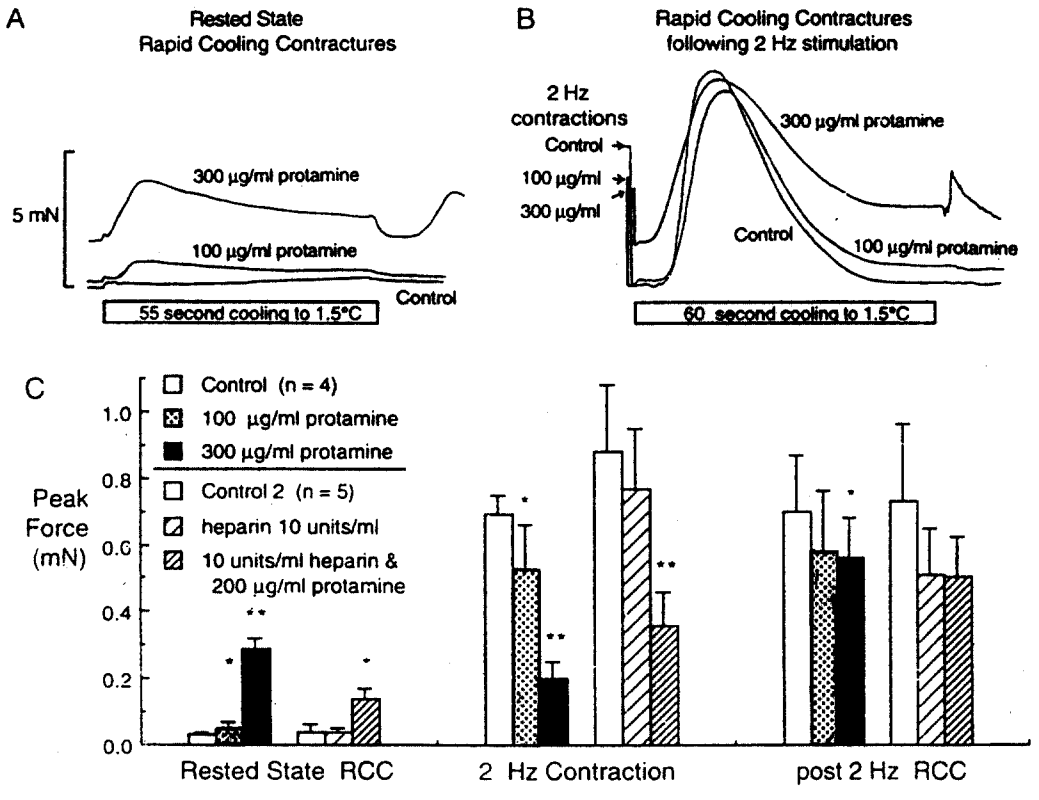

Fig. 5. Effects of protamine on the isometric force of rapid cooling contractures (RCCs). The control response is indicated by the dashed line with the effects of protamine indicated by the filled line. A, Rested state RCCs under control conditions and in the presence of 100 and 300 μg/ml protamine treatment. B, Steady state contractile force with 2 Hz stimulation, and post 2 Hz RCC, in which cessation of stimulation was followed by immediate cooling. C, Mean effects of 100 and 300 μg/ml protamine on rested state RCCs, 2 Hz contractions, and on post 2 Hz RCCs. The effects of 10 units/ml heparin alone and in the presence of excess protamine neutralization (200 μg/ml) are also indicated for a set of experiments (control 2).

에서 protamine의 심근수축 억제작용은 이미 여러 저자들에 의하여 보고된 바 있다[12-17]. 보고에 따라 사용된 protamine 농도 및 적용한 자극 회수의 차이가 있기는 하나 적출된 심실근 절편(isolated ventricular muscle preparation)에서의 심근 수축억제 효과는 저자들의 결과(고빈도 자극하에서 300 μg/ml의 protamine이 약 65%의 심근수축 저하효과를 보이는 것)와 유사한 소견을 보이고 있다. 이와같은 용량에 비례한 심근수축 억제 작용외에 본 실험의 결과는 이 약물의 수축정도가 자극회수에 의존(frequency dependence) 한다는 것을 보여주고 있다. 만일 본 실험이 0.1-1 Hz의 자극 회수에서만 이루어 졌다면 protamine은 단지 심근 수축을 증가시키거나 또는 심근 수축에 영향을 미치지 않는 결과가 나왔을 것이다.

본 실험에서 protamine의 특징적인 효과는 안정기 장력을 증가시키며 또한 종국에는 연축현상을 일으킨다는 것이다. Protamine에 의해 안정기 장력이 증가하는 것은 이미 다른 연구에서 관찰된 바 있으나[13,14] 현재 이러한 현상에 대한 원인 규명은 밝혀져 있지않은 상태이다. 이러한 안정기 장력의 증가는 세포내 Ca^{2+}이 정상보다 증가된 결과인 것으로 생각된다. Protamine 100 μg/ml에서 안정기 장력의 증가는 미약한 편이나 급속냉각 연축 실험에서 15분간의 휴식기후 최대장력이 대조치보다 증가한 점이나, modified Kreb's solution 하에서 RS contraction

이 크게 증가하는 것으로 미루어 보아 세포내 Ca^{2+}이 정상보다 증가된 것으로 생각되어 진다. 대조군 즉 대부분의 포유동물의 심근에서 휴식기동안 Ca^{2+}이 근소포체로 부터의 누출때문에 근소포체내의 Ca^{2+}이 고갈되어 있는 상태[23,24]이므로 15분간의 휴식기 후의 RS contraction은 매우 낮거나 없게되고 또한 이러한 근소포체에서의 Ca^{2+}고갈 현상은 급속냉각 연축 실험을 통해 입증된바 있다[22]

Protamine 투여군에서 15분간의 휴식기후 급속냉각시의 심근 수축(연축) 현상은 세포외부에 Na^+을 감소시켰을 때 나타나는 심근 수축의 양상과 비슷한 점을 관찰할 수 있다[22]. 세포 외부의 Na^+ 농도가 낮은 경우 Na/Ca 교환 펌프가 활성화되어 Ca^{2+}의 세포내로의 유입이 증가되고 결과적으로 증가된 세포내의 Ca^{2+}은 근소포체내에 축적되게 된다[22]. 또한 이러한 심근 수축 현상은 cardiac glycoside인 acetylstrophantidine을 사용한 경우와 유사하다. Acetylstrophantidine은 electrogenic sodium pump를 억제하여 Na^+의 세포외로의 유출을 저하시켜 세포내 Na^+을 축적시키게 되고 이로인하여 Na/Ca 교환 펌프가 활성화되어 Ca^{2+}이 세포내로 유입되어 안정기장력의 증가, RS contraction의 증가 및 15분간의 휴식기후 급속냉각시 심근 수축의 증가를 일으키는 것을 관찰할 수 있다[22].

세포내 Ca^{2+} 과잉 축적은 안정기 장력을 증가시킴과 동시에 심근 수축의 저하를 일으키는데 이는 아마도 근소포체내에 과잉 축적된 Ca^{2+}이 근소포체로 부터 근이완기시 자동적으로 유출됨에 따른 현상으로 생각되어 진다[25]. 정상적인 상태에서 근소포체로의 Ca^{2+} 흡수(uptake), 방출 및 세포밖으로의 제거등의 정상 Ca^{2+} 조절기능은 세포내로의 Ca^{2+} 과량 유입 또는 Na/Ca 교환 펌프를 통한 세포외로의 Ca^{2+} 배출의 저하등으로 인해 근소포체에 Ca^{2+}이 과잉 축적되었을 때 이러한 정상 조절기능이 깨지게 되어 근소포체로 부터 근세포 원형질(myoplasm)로 주기적이고도 자연적(자발적)으로 Ca^{2+}이 방출되게 된다. 이러한 현상이 일어났을 때 안정기 장력이 증가하고 또한 근수축시 최대장력이 감소하게 된다[25].

본 실험의 결과로 미루어 볼 때 15분간의 휴식기시 protamine에 의해 Ca^{2+}이 세포내로의 유입이 증가하는 반면 2 Hz의 자극시에는 Ca^{2+}의 유입(I_{Ca})이 비교적 감소하는 것으로 생각되어 진다. I_{Ca}의 감소는 근소포체의 Ca^{2+} 양을 감소시키게 되고 따라서 근소포체로 부터의 Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release를 감소시키게 된다. Modified Kreb's solution하에서 2 Hz의 자극시 최대장력이 감소한 것과, 또한 2 Hz 자극후의 급속냉각시 최대 장력이 대조치에 비교하여 차이를 보이지 않는 것으로 미루어 보아 근소포체내의 Ca^{2+}의 양이 15분간의 휴식기의 경우와는 달리 증가하지 않은 것으로 생각되어 진다. 세포내의 Ca^{2+}이 과잉 축적된 경우 사립체(mitochondria)가 석회화(calcification)되고 최종적으로 파괴되는 현상을 관찰할 수 있다. 소의 폐동맥 내피 배양세포(cultured bovine pulmonary endothelium)에서 protamine에 의해 야기된 Ca^{2+} 과잉에 의한 사립체의 파괴가 보고된 바있다[19].

Protamine에 의해 초래된 세포내 Ca^{2+} 과잉 현상은 몇가지로 설명되어 질 수 있을 것이다. 첫째, protamine에 의한 세포막의 이온 전달능력(membrane ionic conductance)의 전반적인 증가를 들 수 있다. Protamine은 50-110 개의 아미노산(분자량 5,500-13,000 Daltons)으로 구성되어 있는 펩타이드(peptide)이며 이들중 대부분을 차지하고 있는 것은 arginine과 lysin 이다[26]. 염기성(basic) 아미노산의 밀도가 높은 이유로 protamine은 정상 pH 범주내에서 매우 강한 양이온의 성질(7-8 charges/KD)을 띄게 되므로 강한 음이온의 성질을 지니고 있는 heparin 분자와 강력하게 결합하게 된다. 이러한 이유로 protamine은 heparin을 중화시키게 되는 것이다. Protamine과 같은 다염기성(polybasic) 또는 다양이온성 펩타이드(polycationic peptide)는 세포막의 성질을 크게 변화시킬 수 있다. 다염기성 펩타이드는 artificial bilayers에서 세포막을 통한 이온의 전달능력을 증가시키는 것으로 알려져 왔다[27]. 호중구(Neutrophil)의 경우 20 μM protamine(~100 μg/ml)은 세포내 Ca^{2+}을 증가시켜 라이소솜(lysozome)의 분비를 증가시키는 것으로 또한 알려져 있다[20]. 세포막을 통한 이온 투과도(ionic permeability or leak)의 증가는 세포내로의 Ca^{2+} 유입을 증가시킬 수 있으며 결과적으로 세포내 Ca^{2+} 과잉 현상을 유발시킬 수 있다. 둘째, 세포내 Ca^{2+}

과잉의 원인으로서 Na^+의 세포내 유입을 들 수 있다. 일정한 회수의 근수축중 세포의 Ca^{2+} 항상성(homeostasis) 을 유지하기 위하여 탈분극시 세포내로 유입된 Ca^{2+}은 근이완시 세포밖으로 유출되며 이때 Na/Ca 교환 펌프가 중요한 역활을 담당하게 된다. Na^+이 세포내로 누출되면서 세포내외의 Na^+ 차가 감소하게 되고 따라서 Na/Ca 교환 펌프를 통해 Ca^{2+}이 Na-K ATPase inhibitor의 경우[28]에서와 같이 세포내로 들어오게 되어 세포내 Ca^{2+} 과잉 현상을 초래하게 된다. 직접적인 세포막의 이온 투과도의 증가에 의한 심근 세포막의 누출을 초래하는 외에 protamine 및 기타 다양이온성 약물에 의한 세포막의 손상 및 미세혈관 투과도의 증가가 보고되어 있으며 이러한 세포막의 손상은 다양이온성 약물에 의한 세포막 표면 음전하의 중화에 의한 것으로 생각되어지고 있다[18]. 세포막의 음전하를 중화시킴에 의해 다양이온성 약물은 또한 세포막 표면에 있는 Ca^{2+}을 감소시킬 수 있으며 protamine 에 의한 대동맥 수축기능의 억제는 이러한 이유로 설명되어 지고 있다[29].

정상 활동 전위에 대한 실험에서 300 μg/ml의 protamine은 활동 전위의 높이를 감소시켰는 바 이는 protamine 투여에 따른 안정막 전위의 탈분극화 현상에 의해 설명되어 질 수 있을 것이다. 정상 활동전위 실험에서 최대 탈분극 속도의 변화가 없었던 것은 Na^+ channel을 통한 Na^+ 이온의 세포내로의 유입이 protamine에 의해 영향을 받지 않기 때문인 것으로 생각되어 진다. 즉, 안정막 전압이 약간 증가하기는 하였으나 그 정도(일부 Na^+ channel의 불활성화)가 크지 않음으로 인하여 최대 탈분극 속도에 영향을 미치지 않은 것으로 생각되어 진다. 심근 세포에서 세포내의 Ca^{2+} 농도는 활동 전위 기간에 영향을 미친다고 알려져 있다. 세포내 Ca^{2+}이 증가하게 되면 K^+ channel을 통한 세포외로의 K^+ 전도도가 증가되어 활동 전위기간이 단축되게 된다[30,31]. Protamine에 의한 세포내 Ca^{2+} 과잉에 의해 이러한 현상이 초래되었을 것으로 생각되어 진다.

26 mM high-K^+ Kreb's solution에 의해 세포밖의 K^+ 농도가 증가되어 있는 경우 세포막의 electrogenic sodium pump가 활성화되어 세포내 Na^+의 농도가 감소하는 경우를 생각해 볼 수 있는 데 이와같이 세포내 Na^+ 농도가 감소하게 되면 Na/Ca 교환 펌프가 활성화되어 Ca^{2+}의 세포밖으로의 이동이 촉진되게 된다. 결과적으로 세포내 Ca^{2+} 과잉이 감소하게 되는데 26 mM high-K^+ Kreb's solution하의 근수축 실험에서 안정 장력이 변화하지 않은 것은 아마도 이러한 것이 한 요인으로 작용한 때문으로 생각되어 진다. 26 mM high-K^+ Kreb's solution 하의 활동전위 실험에서 최대 탈분극 속도가 변화하지 않은 점으로 미루어 보아 Ca^{2+} channel을 통한 세포내로의 Ca^{2+}의 유입은 protamine에 의해 영향을 받지않는다고 가정한다면 활동전위 기간의 연장은 K^+ channel을 통한 K^+ 전도도의 직접적인 억제 효과에 의한 것으로 설명되어 질 수 있을 것이다. 26 mM high-K^+ Kreb's solution하의 활동전위 실험에서 최대 탈분극 속도는 Ca^{2+}과 K^+ 전도도의 총괄적인 합이므로 Ca^{2+} channel을 통한 Ca^{2+} 이온의 세포내로의 유입의 감소 및 K^+ channel을 통한 K^+ 이온의 세포외로의 유출의 감소는 전기적으로 서로 상쇄되는 효과를 초래하여 탈분극 최대 속도가 정상으로 나타날 수 있으므로 protamine에 의한 세포내로의 Ca^{2+} 유입의 억제 또한 배제할 수 없을 것이다.

26 mM high-K^+ Kreb's solution하의 심근수축 실험 결과에서 protamine은 RS contraction시의 후반부 최대장력(late peaking force)을 감소시켰는바 RS contraction시의 후반부 최대장력은 활동 전위의 발생시 Ca^{2+}이 세포내로 들어온후 근소포체로 흡수되어 탈분극의 후반기에 근소포체로 부터 방출되는 것으로 알려져 있다[32]. RS contraction시 I_{Ca}의 감소에 의해 protamine은 후반부 최대장력에 관여하는 Ca^{2+}의 유입을 감소시킬 수 있을 것으로 생각되어 진다. Protamine은 또한 소포체로 부터 Ca^{2+}을 방출시키는 channel을 차단하는 작용에 의해 소포체로 부터 Ca^{2+} 방출을 억제한다고 하는 보고[33]가 있는 반면, protamine은 고분자량을 띄고 있는 까닭에 혈관의 평활근 세포내로 들어 갈 수 없으므로 소포체로 부터 Ca^{2+}을 방출시키는 channel을 차단하는 효과를 기대할 수 없다고 하는 보고[34] 또한 있다. 만일 이러한 이유때문에 protamine이 심근 세포내로 들어갈 수 없다면 protamine에 의한 근소포체로 부

터의 Ca^{2+} 방출억제 효과는 심근수축 기능 저하의 원인이 될 수 없을 것이다. 다른 한편으로 세포 원형질내 Ca^{2+} 과잉에 의해 근소포체로 부터의 Ca^{2+} 방출이 억제되었을 가능성을 생각할 수 있으며, 이에 의해 후반부 최대 장력이 감소할 수도 있을 것이다.

최근 심근내막 내피(endocardial endothelium)의 심근 수축에 미치는 영향이 보고되어 있는바 심근내막 내피의 제거는 장력 발생의 기간을 단축시킨다고 한다[35]. Protamine이 내피세포에 독성을 초래한다는 결과가 보고[18]되어 있는 반면 본 실험의 결과에서는 최대 장력 발생속도의 감소는 관찰되었으나 장력발생 기간의 변화는 관찰할 수 없었던 점으로 미루어 보아 protamine의 주 효과는 심근 내막 내피에 대한 독성 효과보다는 심근에의 직접적인 효과 때문인 것으로 생각된다.

결과에서 10, 30 units/ml heparin은 RS, 0.1 Hz 자극에서 최대장력을 약간 감소시키는 것을 제외하고는 심근 수축에 별다른 영향을 보이지 않았다. 1.6 Hz 자극하의 적출된 토끼심장의 심실중격 절편에서 heparin(10-40 units/ml)은 심근 수축을 약간 저하시킨다고 하였다[36]. Heparin(10-30 units/ml)은 in vitro에서 혈장내 $[Ca^{2+}]$을 7-10% 감소시킨다고 한다. 그러나 heparin을 중화시키는 용량의 protamine(100 and 200 μg/ml for 10 and 20 units/ml heparin)을 먼저 투여한 결과 Ca^{2+}의 변동이 없었는 바 이는 아마도 protamine과 heparin의 정전적 친화성(electrostatic attraction)이 heparin과 이온화 Ca^{2+}의 상호 작용보다 더 강하기 때문인 것으로 생각된다[37]. Heparin 투여에 의해 protamine에 의한 심근 수축저하가 정상으로 회복된 결과가 적출된 토끼심장의 심실 절편을 이용한 실험에서 보고되어 있다[38].

Heparin-protamine 복합체 투여에 의한 본 실험은 이와 유사한 결과를 보이고 있다. 즉, 100 μg/ml protamine의 심근수축 저하 효과에 비해 10 units/ml heparin이 이미 투여되었던 경우에서는 protamine의 효과를 관찰할 수 없었다. 그러나 10 units/ml heparin이 이미 투여되있는 경우에서 200 μg/ml protamine의 투여는 100 μg/ml protamine 단독 투여군에서와 같은 유사한 정도의 심근 수축 저하현상을 나타내었다.

임상적인 측면에서 볼 때 심근에 독성효과를 보이는 100-300 μg/ml의 유리 protamine 농도는 도달할 수 없을 것으로 보인다. 3-4 mg/kg protamine을 정맥내로 빠른 속도로 주사하는 경우 전신의 혈장량을 신체의 총 중량(whole body mass)의 5%로 가정한다면 protamine의 총 혈장 농도는 순간적으로 60-80 μg/ml에 도달하게 될 것이다. 그러나 이 protamine의 대부분은 즉시 혈장내의 heparin이나 albumin과 결합하게 되어 실제로 혈장내의 유리 protamine의 농도는 심근 수축에 영향이 없는 정도의 농도로 감소될 것이다. 심장 수술시 체외 관류에 의한 허혈(ischemia)로 심근 세포내 저장 에너지원이 고갈되어 세포내 Ca^{2+}이 과잉으로 존재하게 되는 경우 체외 관류후 심근 수축 촉진을 위해 Ca^{2+}을 투여하게 되면 경우에 따라 protamine의 과잉투여(over-titration)는 심근세포내에 Ca^{2+} 과잉을 더욱 촉진시킬 수 있을 것이다. 심장 수술시 체외관류가 끝난후 투여된 heparin의 양 보다 과량의 protamine 투여가 권장되어 왔지만[39], 본 실험의 결과에 의하면 경우에 따라 과잉투여는 심근수축 기능을 저하시킬 수 있으므로 이에 유의하여야 할 것이다. 세포내 Ca^{2+} 과잉에 의한 후탈분극 현상은 triggered activity, 부정맥, diastolic tone의 증가 및 심근수축 기능의 저하를 초래할 것이다. 이러한 혈장내 protamine 농도를 감안하여 볼 때 정상적인 상태의 임상이나 in vivo 상황의 실험에서 protamine에 의해 발생한 저혈압의 원인은 심근에 대한 protamine의 직접적인 독성 효과에 의한 것이기 보다는 혈관이완에 의한 것으로 생각되어 진다[8,9]. Protamine이 heparin과 결합하기 전에 정주된 고농도의 protamine이나 과잉투여된 protamine은 우선적으로 심근이나 혈관 내피에 도달되어 그 작용을 나타낼 것으로 생각되어지며 혈관 평활근 이완에 대한 protamine의 효과는 이미 보고된 바 있다[40]. Protamine이 혈관 내피세포내에 Ca^{2+} 과잉을 일으키면 Ca^{2+}에 의해 nitric oxide(NO) synthase가 활성화[41]되어 혈관이완이 먼저 일어날 수 있을 것이다. 이와같이 심근에 유해한 효과를 일으킬 정도의 혈중 유리 protamine 농도는 임상적으로 가능하지 않을 것으로 생각되나 혈관내피나 기

타 조직에 대한 Ca^{2+} 과잉에 의한 임상적 효과는 고려해 보아야 할 것이다

결 론

Protamine 투여에 의해 정상적인 force-frquency 관계가 없어지고, 부분적인 탈분극 현상이 유발되며, 휴식기에서의 장력이 증가하고, 급속냉각 연축시의 rested state에서 정상 심근에서의 결과와는 달리 연축이 유발되는 점으로 미루어 보아 protamine에 의한 직접적인 심근수축 억제현상은 세포내 Ca^{2+} 과잉에 의한 것으로 생각되어 진다.

참 고 문 헌

1) Lowenstein E. *Lessons from studying an infrequent event: adverse hemodynamic response associated with protamine reversal of heparin anticoagulation. J Cardiothorac Anesth 1989; 3: 99-107.*

2) Horrow JC. *Protamine allergy. J Cardiothorac Anesth 1988; 2: 225-42.*

3) Weiss ME, Nyhan D, Peng Z, Horrow JG, Lowenstein E, Hirshiman C, et al. *Association of protamine IgE and IgG antibodies with life-threatening reactions to intravenous protamine. N Eng J Med 1989, 320: 886-92.*

4) Shapira N, Schaff HV, Piehler JM, White RD, Sill JC, Pluth JR. *Cardiovascular effects of protamine sulfate in man. J Thorac Surg 1982; 84: 505-14.*

5) Fadali MA, Papacostas CA, Duke JJ, Ledbetter M, Osbakken M. *Cardiovascular depressant effect of protamine sulfate. Experimental study and clinical implications. Thorax 1976; 31: 320-3.*

6) Marin-Neto JA, Sykes MK, Marin JLB, Orchard C, Chakrabarti MK. *Effects of heparin and protamine on left ventricular performance in the dog. Cardiovasc Res 1979; 13: 254-9.*

7) Alverez J, Alverez L, Escudero C, Gilsanz F, de Oya S, Castillo-Olivares JL. *Hemodynamic and morphologic alterations after experimental administration of protamine sulfate. Am J Surg 1988; 155: 735-40.*

8) Conahan TJ, Andrews RW, Mac Vaugh III H. *Cardiovascular effects of protamine sulfate in man. Anesth Analg 1981; 60: 33-6.*

9) Michales IAL, Barash PG. *Hemodynamic changes during protamine administration. Anesth Analg 1983; 62: 831-5.*

10) Stoelting RK, Henry DP, Verburg KM, McCammon RL, King RD, Brown JW. *Haemodynamic changes and circulating histamine concentrations following protamine administration to patients and dogs. Can Anaesth Soc J 1984; 31: 534-40.*

11) Rogers K, Milne B, Salerno TA. *The hemodynamic effects of intra-aortic versus intravenous administration of protamine for reversal of heparin in pigs. J Thorac Cardiovasc Surg 1983 ; 85: 851-5.*

12) Iwatsuki N, Matsukawa S, Iwatsuki KA. *Weak negative inotropic effect of protamine sulfate upon the isolated canine heart muscle. Anesth Analg 1980; 59: 100-2.*

13) Caplan RA, Su JY. *Differences in threshold for protamine toxicity in isolated atrial and ventricular tissue. Anesth Analg 1984; 63: 1111-5.*

14) Housmans PR, Ferguson DM. *Inotropic effects of protamine sulfate on isolated mammalian cardiac muscles: mechanisms of action(abstract). Anesthesiology 1987; 67: A24.*

15) Lin C-I, Luk H-N, Wei J, Wei J, Tsao S-J. *Electromechanical effects of protamine in isolated human atrial and canine ventricular tissues. Anesth Analg 1989; 68: 479-85.*

16) Wakefield TW, Bies LE, Wrobleski SK, Bolling SF, Stanley JC, Kirsh MM. *Impaired myocardial function and oxygen utilization due to protamine sulfate in an isolated rabbit heart preparation. Ann Surg 1990; 212: 387-93.*

17) Lee TS, Virtusio L, Lin TL, Chen BJ. *Cardiotoxic effect of protamine on isolated rabbit myocardium (abstract). Crit Care Med 1990; 18: S176.*

18) Chang S-W, Voelkel NF. *Charge-related lung microvascular injury. Am Rev Respir Dis 1989; 139: 534-45.*

19) Wakefield TW, Hinshaw DB, Burger JM, Burkel WE, Stanley JC. *Protamine induced reductions of epithelial ATP. Surgery 1989; 106: 378-85.*

20) Elferink JGR. *Protamin-induced permeability changes in the neutrophil plasma membrane as the basis of activation of exocytosis. Cell Biochem Funct 1992; 10: 35-40.*

21) Lynch III C. *Depression of myocardial contractility in vitro by bupivacaine, etidocaine, and lidocaine. Anesth Analg 1986; 65: 551-9.*

22) Bridge JHB. *Relationships between the sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal calcium transport revealed by rapidly cooling rabbit ventricular muscle. J Gen Physiol 1986; 88: 437-73.*

23) Allen DG, Jewell BR, Wood EH. *Studies on the contractility of mammalian myocardium at low rates of stimulation. J Physiol Lond 1976; 254: 1-17.*

24) Wendt-Gallitelli, Jacob R. *Rhythm-dependent role of different calcium stores in cardiac muscle: x-ray microanalysis. J Mol Cell Cardiol 1982; 14: 487-92.*

25) Allen DG, Eisner DA, Pirolo JS, Smith GL. *The relationship between intracellular calcium concentration and contraction in calcium-overloaded ferret papillary muscle. J Physiol Lond 1985; 364: 169-82.*

26) Ando T, Yamasaki M, Suzuki K. Protamines: *Isolation, Characterization, Structure and Function. 1st ed. New York: Springer-Verlag. 1973; 128.*

27) Montal M. *Lipid-polypeptide interactions in bilayer lipid membranes. J Memb Biol 1972; 7: 245-66.*

28) Yoshida H, Fujisawa H, Ohi Y. *Influences of protamine on the Na^+, K^+-dependent ATPase and on the active transport process of potassium and L-dopa into brain slices. Can J Biochem 1965; 43: 841-9.*

29) Uruno T, Matsumoto R, Okushita K, Sunagane N, Kubota K. *Possible mechanisms of inhibitory action of protamine on contractile activity of rat aorta. J Pharm Pharmacol 1985; 37: 476-80.*

30) Isenberg G. *Cardiac Purkinje fibers. Resting, action, and pacemaker potential under the influence of $[Ca^{++}]_i$ as modified by intracellular injection technique. Pfluers Arch 1977; 371: 51-9.*

31) Isenberg G. *Cardiac Purkinje fibers. $[Ca^{++}]_i$ controls the potassium permeability via the conductance components gK_I and gK_L. Pfluegers Arch 1977; 371: 77-85.*

32) Lynch III C. *Pharmacological evidence for two types of myocardial sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release. Am J Physiol 1991; 260: H785-H795.*

33) Palade P. *Drug-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. III. block of Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release by organic polyamines. The Journal of Biological Chemistry 1987; 262: 6149-54.*

34) Akata T, Yoshitake JI, Nakashima M, Itoh T. *Effetcs of protamine on vascular smooth muscle of rabbit mesenteric artery. Anesthesiology 1991; 75: 833-46.*

35) Smith JA, Shah AM, Lewis MJ. *Factors released from endocardium of the ferret and pig modulate myocardial contraction. J Physiol Lond 1991; 439: 1-14.*

36) Lee TS, Virtussio LL, Lin YL. *Heparin: A myocardial depressant? (abstract). Anesthesiology 1990; 73: A605.*

37) Goto H, Kushihashi T, Benson KT, Kato H, Fox DK, Arakawa K. *Heparin, protamine, and ionized calcium in vitro and in vivo. Anesth Analg 1985; 64: 1081-4.*

38) Wakefield TW, Wrobleski SK, Nichol BJ, Kandell AM, Stanley JC. *Heparin-mediated reductions of the toxic effects of protamine sulfate on rabbit myocardium. J Vasc Surg 1992 ; 16: 47-53.*

39) Shanberg JN, Murato M, Quattrociocchi-Longe T, Van Neste L. *Heparin-protamine complexes in the production of heparin rebound and other complications of extracorporeal bypass procedures. Am J Clin Path 1987; 87: 210-7.*

40) Pearson PJ, Evora PRB, Ayrancioglu K, Schaff HV. *Protamine releases endothelium-derived relaxing factor from systemic arteries: a possible mechanism of hypotension during heparin neutralization. Circulation 1992; 86: 289 -94.*

41) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. *Nitric oxide : physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol Rev 1991; 43: 109-42.*