뇌허혈 발생전 K^+ 통로 조작이 해마의 $[K^+]_e$ 및 Glutamate 농도에 미치는 영향

울산대학교 의과대학 마취과학교실, *약리학교실, †서울대학교 수의과대학 약리학교실

최규택 · 조명원 · 서병태 · 이정락 · 박형섭* · 류판동†

= Abstract =

Effect of the K^+ Channel Modulations on Glutamate and K^+ Concentrations in Rabbit Hippocampus during Transient Global Ischemia

Kyu-Taek Choi, M.D., Myung-Won Cho, M.D., Byung-Te Suh, M.D., Jeong-Rak Lee, M.D.
Hyung-Seop Park, M.D.*, and Pan-Dong Ryu, M.D.†

Department of Anesthesiology and *Pharmacology, University of Ulsan, Seoul;

†Department of Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, Korea

Background: Cerebral ischemia causes an increase in extracellular potassium ($[K^+]_e$) through activation of the K_{ATP} channel. This increase in $[K^+]_e$ could result in neuronal depolarization and a reversal of the glutamate uptake system in glia. This may further contribute to the excessive concentrations of glutamate and aspartate in the extracellular space during ischemia. If the early rise in $[K^+]_e$ during ischemia could be attenuated, less excitotoxic neuronal damage may be the result. However, activation of K_{ATP} channels has been shown to attenuate the anoxia induced depolarization in the hippocampus and may reduce the release of excitatory neurotransmitters during cerebral ischemia. In this study, we address the question of whether K_{ATP} channel modulation affects $[K^+]_e$ and whether it is related with extracellular glutamate concentrations.

Methods: After approval by the Animal Care and Use Committee, 18 New Zealand white rabbits were anesthetized with halothane and mechanically ventilated to maintain normocarbida. Microdialysis catheters were inserted into the left dorsal hippocampus and perfused with artificial cerebrospinal fluid at 2 ml/min. K^+ sensitive microelectrodes were inserted into the contralateral hippocampus. A pneumatic tourniquet was placed loosely around the neck. Animals were randomized to receive glibenclamide ($n=5$, K_{ATP} blocker, 3.7 mg/kg) or cromakalim ($n=5$, K_{ATP} opener, 0.5 mg/kg). The control group ($n=6$) had neither drug. Ten-minute period of global cerebral ischemia was produced by inflation of the tourniquet combined with induced hypotension. Hippocampal $[K^+]_e$ was measured throughout the periischemic period and glutamate concentrations in dialysate were determined by high-performance liquid chromatography. Peak levels were compared by ANOVA.

Results: Glutamate concentration significantly increased during ischemia period for all groups ($p < 0.05$). In glibenclamide treated animals, brain glutamate concentration increased markedly during early

논문접수일 : 1998년 10월 2일

책임저자 : 최규택, 서울시 송파구 풍납동 388-1, 서울중앙병원 마취과, 우편번호: 138-040

Tel: 2224-3857, Fax: 482-8007

본 연구는 1996년도 학술진흥재단 자유공모과제 및 아산생명과학재단 연구비의 보조를 받아 이루어졌음.

reperfusion ($t=15$) compared to other groups ($p<0.05$). There were no statistical differences on ischemia-induced increases in $[K^+]_e$ among the three groups.

Conclusions: Although it was not possible to demonstrate an effect of modulators of the ATP sensitive K^+ channel on $[K^+]_e$, glibenclamide increased glutamate during reperfusion. This paradoxical increase in glutamate after administration of a K^+ channel blocker suggests that the mechanism of glutamate release is not related to $[K^+]_e$ change. (Korean J Anesthesiol 1999; 36: 510~517)

Key Words: Ischemia; cerebral, Ion channel; K^+ , Excitatory Aminoacids; glutamate.

서 론

허혈시 glutamate는 신경세포에서 유리가 증가하거나 재흡수가 되지 않아 몇 배로 증가하고^{1,2)} NMDA 혹은 non-NMDA 수용체에 작용하여 세포내 Ca^{2+} 농도를 증가시키고 결국 세포가 죽게 한다.³⁾ 따라서 세포외액에 glutamate가 많이 축적되는 것을 예방하는 것은 임상에서 환자의 치료 방법으로 사용할 수 있다.

정상적으로 glutamate는 Ca^{2+} 의 세포내 유입에 의하여 exocytosis되지만 뇌허혈기 동안은 Ca^{2+} 에 의하지 않고도 많이 유리되는데 그 기전은 몇 가지로 제안되었다.⁴⁾ 허혈 상태에서는 Na^+ pump 중단으로 세포외액의 $[K^+]$ ($[K^+]_e$)이 매우 증가하여 뉴런을 탈분극시켜 신호(impulse)의 발사 빈도가 증가되어 glutamate가 소포에서 더욱 많이 유리된다. 그리고 허혈에 의해 $[K^+]_e$ 가 증가되면 plasma membrane glutamate uptake carrier가 반대로 작용하여 glutamate의 세포외 농도를 증가시킨다.^{5,6)}

무산소 상태는 K^+ 전도성을 증가시키므로 $[K^+]_e$ 가 증가하고 세포내 K^+ ($[K^+]_i$)가 감소한다. 따라서 K^+ 전도성을 감소시키면 $[K^+]_e$ 의 증가를 줄일 수 있다. 이와같은 근거로 Zetterstrom등은 K 통로 차단제가 $[K^+]_e$ 증가를 억제함을 보여주고 있다.⁷⁾ 안정막 전위는 막사이의 K^+ 농도 경사에 의해 결정되기 때문에 $[K^+]_e$ 의 증가는 막의 과분극에 반대되는 힘을 제공하여 막을 탈분극하기 쉽게 해준다.

K^+ 통로 개방제인 lemakalim, RP 52891, galanin은 해마 절편조직에서 허혈에 의한 glutamate 유리를 억제하고 K^+ 통로 차단제인 glibenclamide는 유리를 증가시킨다고 보고되었다.^{8,9)} 이러한 효과는 K^+ 통로 개방제에 의하여 K^+ 통로가 열려 신경세포가 과분

극되고 허혈에 의한 탈분극을 일시적으로 억제하여 glutamate 유리를 지연시키고 그리고 차단제는 K^+ 통로를 차단하여 탈분극을 강화하므로 glutamate 유리를 증가시킨다고 생각한다.

이러한 사실들을 종합하면 허혈시 K^+ 통로 조작은 다음과 같은 결과가 예상된다.

1) K^+ 통로 개방제를 사용하여 세포를 과분극시키면 세포질 내의 glutamate의 유리를 지연 혹은 억제시킬 수 있을 것이다.

2) K_{ATP} 통로(ATP sensitive K^+ channel)은 ATP가 아직 존재하는 허혈의 초기 몇 분 정도만 작용하고 이후는 기능이 없어질 것으로 기대한다. 그리고 K^+ 통로의 종류에 따라 지속적으로 개방된다면 허혈 상태에서 K^+ 가 계속 세포외로 유출되어 나와 $[K^+]_e$ 가 증가하여 오히려 glutamate의 세포외 농도를 증가시킬 지도 모른다.

따라서 위의 가설을 증명하기 위하여 K^+ 통로 작용제 투여후 시간에 따른 glutamate 농도의 변화를 관찰하면서 $[K^+]_e$ 를 지속적으로 측정하여 K^+ 통로 조작이 뇌허혈시 뇌세포외액의 $[K^+]$ 의 변화에 미치는 영향을 조사하고 glutamate가 허혈에 의해 증가하는 것이 K^+ 통로 조작에 의해 어떻게 변화하는가를 측정하였다.

대상 및 방법

토끼(New Zealand White Rabbit)에게 K 통로 조절을 위한 약제를 투여 한 후 범발성 뇌허혈을 유도하여 허혈기 동안 해마의 세포외액의 glutamate와 $[K^+]$ 의 변화를 관찰하기 위하여 다음의 조작을 하였다. K 통로 개방제로 cromakalim 0.5 mg/kg ($n=5$), K 통로 차단제로 glibenclamide 5 mg/kg ($n=5$)를 허혈 유도 10 분전에 정맥 주입하였다. 대조군($n=6$)으로 약제를 투

여하지 않고 허혈만을 유도하였다.

1) 전극의 제작

해마 세포외액의 $[K^+]$ 는 K^+ 선택성 미세전극(K^+ selective microelectrode)을 이용하여 측정하였다. 미세전극은 먼저 double-barrelled glass capillary(2.0 mm O.D.)를 vertical glass puller(Narishige PP-83, Japan)를 이용하여 유리미세전극을 만든 다음 끝을 킴와이프와 같은 티슈에 접근시켜 5 micrometer 정도로 되게 하였다. 다음에 dimethyl silane(Fluka, Chemika-Bio-medika, U.K.)으로 한 쪽 barrel의 내부를 도포하여 hydrophobic하게 하고 Valinomycin-based ionophore(Potassium ionophore, Fluka, U.K.)액으로 끝 부분을 약 1 mm까지 채우고(back-fill method) 남은 부분은 0.1 M KCl로 채워 준비하였다. Reference electrode는 150 mM NaCl로 채우고 신호는 증폭기(IE251, Warner, U.S.A.)를 이용하여 종이에 기록하였다. 준비된 전극은 표준용액의 $[K^+]$ 에 대한 반응성을 측정하여 표준선을 구하였다. 표준선은 실제 기록시와 비슷한 상태 즉, 140 mM NaCl 존재하에 KCl 농도를 달리하여 만든 용액을 이용하였다.¹⁰⁾

2) Glutamate 농도의 측정

미세투석용 탐침(MA-10, Carnegie Medicin, Sweden)을 해마에 삽입하기 위하여 두개를 노출시킨 후 후방 해마 상부에 burr hole을 만들었다. 그리고 미세투석용 카테타를 삽입하여 해마 내에 위치하도록 하였다. 미세투석용 카테타의 회복율은 10^{-2} M 포도당 용액을 사용하여 뇌속에 삽입하기 전과 실험이 끝난 후 측정하여 평균치를 사용하였다. 투석액으로 인공뇌척수액(147 mM NaCl, 2~3 mM $CaCl_2$, 0.9 mM $MgCl_2$, 4.0 mM KCl)을 사용하여 2 ml/min 속도로 관류하였다. 투석물을 수집하기 전에 최소한 1시간 이상 카테타를 관류시켰다. 투석물질은 다음과 같이 수집하였다. 뇌 속에 탐침을 삽입 후 1시간부터 수집을 시작하여 2번의 기초샘플(수집기간 각각 20분)을 수집한 후 뇌허혈 중 2번(수집기간 각각 5분), 재관류 초기에 2번(수집기간 각각 5분), 재관류 후기에 2번(수집기간 각각 20분) 채취하였다.

3) 실험동물의 마취

토끼를 투명한 플라스틱 통속에 넣은 후 할로탄과

산소를 흡입시켜 마취하였다. 내경 3.5 mm 철선 강화 튜브를 이용하여 기관내 삽관한 후 기계 환기하였다. $PaCO_2$ 는 35~45 mmHg가 되도록 환기를 조절하였다. 체온은 보온담요와 백열등을 이용하여 38°C로 유지하였다. 1% lidocaine을 피하 주사한 후 피부 절개를 한 후 PE 90 카테타를 대퇴동맥에 거치하여 동맥압과 pH, $PaCO_2$, PaO_2 , 포도당, 혈색소치를 측정하는데 사용하였다. 대퇴정맥에도 카테타를 삽입하여 허혈기간동안 약제의 투여로 사용하였다. 귀정맥에 카테타를 삽입하여 생리식염수를 주입하는데 사용하였다. 실험동물의 유지수액은 4 ml/kg/hr 속도로 주입하였다. 토끼의 머리를 입체정위대(stereotactic frame)에 고정된 후 공기 구혈대(폭 6 cm, Zimmer, U.S.A.)를 목 주위에 느슨하게 감았다. K^+ selective microelectrode를 해마 내에 삽입한 후 지속적으로 세포외액의 $[K^+]$ 를 측정하였다. 범발성 뇌허혈은 저혈압과 경부에 구혈대의 압력을 20 psi로 올려서 유도하였다. 유도저혈압의 목표는 평균동맥압이 40 mmHg 이하가 되도록 하며 흡입마취제의 농도를 올리고 기도내 양압을 적용하여 유도하였다. 허혈 기간이 끝나면 팽창된 구혈대를 풀고 phenylephrine을 주입하여 평균 동맥압을 75 mmHg 이상이 되도록 하였다.

실험이 끝난 후 미세전극의 위치를 확인하기 위하여 5 ml의 Evans blue(2%)를 정주하고 실험동물을 안락사 시킨 후 뇌를 적출하여 관상 절개하여 검사하였다.

기록지에 기록된 $[K^+]$ 의 변화에 따른 전압의 변화를 $[K^+]$ 로 환산하기 위하여 다음의 공식을 이용하였다. K^+ 의 평형전위 $E_k = 2.303 \text{ BT/F} \log_{10} \{ [K^+]_e / [K^+]_i \}$ 이며 25°C에서 $[K^+]_e / [K^+]_i$ 가 e배 증가할 때의 E_k 는 25.69이고 10배 증가하면 59.16이므로 $[K^+]$ 가 10 mM 이하의 경우 E_k 는 25.69, 10~100 mM 사이의 경우 E_k 는 59.16으로 볼 수 있다.¹¹⁾

따라서 $[K^+]_e = 10^x$, $x = (\text{observed mV}) / E_k(\text{mV})$ 로 계산되며 $[K^+]$ 가 10 mM 이상일 경우 계산된 값에 10을 곱하였다.

Glutamate는 high performance liquid chromatography를 이용하여 정량하였다.

4) 통계 처리

각 군간 생리적 지표의 차이는 ANOVA로 분석하

Table 1. Physiological Data

Variable	Group	Control (n=6)	Glibenclamide (n=5)	Cromakalim (n=5)
Weight (kg)				
		2.70 ± 0.60	2.40 ± 0.30	2.30 ± 0.30
pH				
Baseline		7.38 ± 0.05	7.40 ± 0.07	7.39 ± 0.04
10 min		7.34 ± 0.04	7.30 ± 0.09	7.37 ± 0.1
60 min		7.32 ± 0.05	7.32 ± 0.06	7.31 ± 0.07
PaCO ₂ (mmHg)				
Baseline		35 ± 7	33 ± 7	35 ± 3
10 min		38 ± 3	36 ± 6	36 ± 5
60 min		38 ± 5	39 ± 5	39 ± 8
PaO ₂ (mmHg)				
Baseline		349 ± 107	424 ± 155	406 ± 140
10 min		369 ± 59	450 ± 84	422 ± 121
60 min		317 ± 55	462 ± 54	407 ± 147
Hematocrit (%)				
Baseline		29 ± 3	30 ± 3	31 ± 6
10 min		30 ± 3	26 ± 6	28 ± 6
Mean Arterial pressure (mmHg)				
Baseline		76 ± 14	78 ± 10	75 ± 12
10 min		36 ± 8	39 ± 5	34 ± 12
60 min		83 ± 11	85 ± 8	78 ± 7
Heart Rate (beats/min)				
Baseline		249 ± 24	252 ± 4	236 ± 32
10 min		220 ± 38	197 ± 37	190 ± 24
60 min		216 ± 44	225 ± 35	221 ± 37
B.E. (mEq/L)				
Baseline		-1.3 ± 8.9	-4.3 ± 4	-2.7 ± 3.4
10 min		-3.4 ± 4	-2.8 ± 2.1	-4.1 ± 3.6
60 min		-3.9 ± 3.8	-7.7 ± 4.6	-8 ± 3
Blood Glucose (g/dl)				
Baseline		166 ± 42	155 ± 26	159 ± 51
60 min		175 ± 69	204 ± 104	137 ± 50
Esophageal Temperature (°C)				
Baseline		37.9 ± 0.5	37.6 ± 0.9	37 ± 1.9
10 min		36.4 ± 0.6	36.7 ± 1.6	36.8 ± 1.7
60 min		36.7 ± 1.4	37.1 ± 0.7	36.8 ± 1
Epidural Temperature (°C)				
Baseline		37 ± 0.9	36.5 ± 1.1	36.8 ± 1.6
10 min		35.8 ± 1.4	35.8 ± 1.6	35.9 ± 1.4
60 min		36.6 ± 17	37.1 ± 0.8	36.6 ± 1.8
Blood [K ⁺] (mM)				
Baseline		3.3 ± 0.2	2.5 ± 0.6	3 ± 0.6

Data represent mean ± SD

*: p < 0.05 vs control group

Abbreviations: 10 min and 60 min represent 10 min and 60 min after onset of the ischemia.

였고 $[K^+]_e$ 및 glutamate의 각 군의 시간에 따른 변화는 허혈전(I-20)을 기준으로 하여 ANOVA repeated measurement 후 Dunnett's test를 이용하였으며 군 간의 변화의 유의성은 허혈전(I-40, 20), 허혈기(I+5, 10), 재관류 초기(I+15, 20), 재관류 후기(t=I+40, 60)로 구분한 후 ANOVA repeated measurement 후 Post-hoc test를 이용하여 분석하였고 $p < 0.05$ 이면 유의하다고 검정하였다. 수치는 모두 평균 $\pm$ 표준오차로 기록하였다.

결 과

생리적 지표는 각 군간 유의한 차이가 없었다(Table 1). 허혈 유도전 해마 $[K^+]_e$ 는 대조군에서 4.1 ± 0.8 mM이었고 cromakalim 투여군은 5.0 ± 0.4 mM, glibenclamide 투여군이 3.9 ± 0.2 mM로 각군간 유의한 차이는 없었다. $[K^+]_e$ 는 각군 모두 허혈에 의해 첫 2~3분부터 유의하게($p < 0.05$) 증가하여 최고치는 각각 46.5 ± 3.4 mM, 51.6 ± 3.6 mM, 46.8 ± 6.8 mM이었고, 재관류 후 다시 감소하여 30분후 정상치로 환원되었다. 변화의 양상에서 각 군 간 유의한 차이는 없었다(Fig. 1). 해마의 glutamate 농도의 변화는 허혈 기동간(t=I+5, 10) 유의하게($p < 0.05$) 증가한 뒤 대조

Fig. 1. Changes of $[K^+]_e$ during the study period. Increases of $[K^+]_e$ were significant at the end of ischemia compared to baseline measurements for all groups ($p < 0.05$). However, there were no significant intergroup differences. Data represent means $\pm$ SEM.

군과 cromakalim 투여군은 재관류후(t=I+15, 20, 40, 60) 감소하였으나, glibenclamide 투여군은 재관류후(t=I+15, 40, 60)에도 계속 유의하게($p < 0.05$) 높았다. glutamate 농도의 시간대별 군 간 차이는 glibenclamide 투여군이 재관류 초기(t=I+15)에 대조군과 cromakalim 투여군에 비해 유의하게($p < 0.05$) 높았고, 대조군과 cromakalim 투여군과는 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

고 찰

세포내 ATP 양에 의해 조절되는 K_{ATP} 통로는 1983년 Noma에 의해 처음 기술되었다.¹²⁾ 이 통로는 세포내 ATP가 없어지면 열리고 증가하면 닫힌다. ATP 의존성 통로(ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}))은 ATP에 반응하여 통로가 닫히면 세포막의 탈분극이 일어나 전위 의존성 Ca^{2+} 통로가 열리는 기능이 있다.

K 통로 개방제가 허혈시 뇌를 보호하는 증거들이 있다.¹³⁾ Abele와 Miller는 해마 신경배양에서 Mg^{2+} 이 없고 glycine을 함유한 용액에 15분 노출하여 glutamate 수용체의 활동을 증가시키면 24시간에 죽은 뉴런이 증가하고 $[Ca^{2+}]_i$ 이 크게 증가하는 것을 보고하였다.¹⁴⁾ 흥미롭게도 K 통로 개방제인 cromakalim과

Fig. 2. Changes of glutamate concentrations during the study period. Glutamate concentrations during ischemic period increased significantly compared to baseline values for all groups ($p < 0.05$). However, glutamate concentrations during early reperfusion period (I+15) remained significantly higher in cromakalim group than in other groups ($p < 0.05$)*. Abbreviation: I $\pm$ m represents m minutes after or before ischemia. Data represent means $\pm$ SEM.

diazoxide에 의해 $[Ca^{2+}]_i$ 의 증가와 죽는 세포가 감소되었고 차단제인 glibenclamide에 의해 길항되었다. K_{ATP} 개방제인 lemakalim 등은 신경을 과분극시켜서 glutamate 유리를 억제하고 glibenclamide는 반대로 작용한다고 한다. 개방제인 Y-26763을 0.03 mg/kg/h 정주하여 50분의 국소허혈에서 연접전 glutamate 유리를 감소시킨다.¹⁵⁾ 그러나 본 실험에서 개방제(cromakalim)는 영향이 없었으나 차단제(glibenclamide)는 glutamate를 증가시켰다. Cromakalim은 산소나 포도당이 없는 배양에서 혹은 고농도의 glutamate (100 μ M)에 의한 세포사를 방지한다. 그러나 그 효과는 glutamate에 의한 초기의 생화학적 반응을 방지한 것이 아니다. 즉 세포내 Ca^{2+} 의 증가를 예방하지 못하였고 초기의 세포종창도 방지하지 못하며 c-fos mRNA의 유도도 막지 못한다. 그 대신 glutamate에 의한 지연성 흥분독 작용을 방지한다고 한다. 즉 glutamate 노출 수 시간 후 세포내 Ca^{2+} 이 증가하는 것을 방지하고 세포 종창이 수 시간이 지나면 회복시킨다. 또한 점차적인 DNA 파괴에 의한 apoptosis도 방지한다. 그리고 glibenclamide는 이러한 효과를 방지한다. 따라서 이러한 사실을 보면 cromakalim은 Ca^{2+} 조절과 세포용적을 조절하는 연접후 작용이 주된 것으로 사료된다.¹⁶⁾ 따라서 본 실험에서 cromakalim의 뇌보호효과는 허혈시 glutamate의 증가를 예방하는 것과 상관이 없는 것으로 사료된다.

Glutamate는 뇌허혈시 Ca^{2+} 에 의존하지 않고 유리되며 $[K^+]_e$ 와 관련이 있다. $[K^+]_e$ 는 허혈시 매우 증가한다. $[K^+]_e$ 가 증가하면 glutamate가 더 많이 세포 외공간으로 유리되는데 2가지 기전이 있다.^{5,6)} (1) 뉴런을 탈분극시켜 신호의 발산속도를 증가시켜 glutamate가 연접전 소포에서 유리되는 것을 증가시킨다. (2) 세포외액의 K^+ 가 plasma membrane glutamate uptake carrier의 작용방향을 반대로 하도록 하여 glutamate의 재흡수를 방해한다. 이렇게 증가된 glutamate는 뉴런을 더욱 탈분극시켜 K^+ 를 더 유리시킨다. Glutamate가 증가하는 공통의 원인으로 세포외액의 $[K^+]_e$ 가 증가하는 것이다. 따라서 뉴런의 K 통로를 약리적으로 조작하여 세포외액의 $[K^+]_e$ 를 감소시킬 수 있으면 glutamate 유리를 효과적으로 조절할 수 있다.

K^+ 평형전위(E_k)는 정상에서는 안정막 전위 보다 더 음성이기 때문에 K^+ 통로의 개방이 증가되면 K^+

유출에 의해 세포내 전위는 상대적으로 더욱 음성이 되어 세포막은 과분극하게 된다. 반대로 K^+ 통로를 차단하면 탈분극하게 된다.¹⁷⁾ 신경세포에는 여러 종류의 K^+ 통로가 있다. Ca^{2+} activated K 통로와 K_{ATP} 통로가 과분극에 관여한다고 본다. 신경의 K_{ATP} 통로는 ATP의 감소에 의해 아주 민감하게 열린다.¹⁸⁾ 이러한 전기적 현상이 어느 정도 지속되는가에 따라 K 전류의 증감이 결정되고 세포외액으로 나오는 $[K^+]_e$ 에 영향을 미친다. 4분의 무산소상태에서 K_{ATP} 통로 차단제인 glibenclamide, tolbutamide는 세포의 K^+ 유출을 용량에 비례하여 방지하고 피질에서 허혈에 의한 $[K^+]_e$ 증가를 차단할 수 있었다.¹⁹⁾ 동맥혈압이 정상인 저산소증 상태의 피질내로 glibenclamide (10~100 μ M)를 투여하면 $[K^+]_e$ 의 증가를 완하시킨다.²⁰⁾ 이것은 허혈에 의한 K^+ 유출은 ATP-의존형 K 통로가 차단되면 감소함을 의미한다. 그러나 본 연구에서는 glibenclamide 투여군의 $[K^+]_e$ 증가 양상이 K 통로를 조절하지 않은 대조군의 허혈시 $[K^+]_e$ 증가 양상과 유의한 차이가 없었다. 즉 K_{ATP} 통로 차단이 $[K^+]_e$ 증가를 완하시키지 못하였고 허혈시 glutamate의 유리를 증가시켰다. 그 기전은 K^+ 유출의 감소에 의한 안정막 전위가 상승되어 세포의 탈분극이 지속되었고 이로 인하여 glutamate가 계속 연접전 신경종말단에서 유리되어 나왔기 때문으로 사료되었다. 혹은 본 실험에서 투여한 약제의 경로가 정맥이어서 혈뇌장벽을 통과하여 해마에 작용하기에는 농도가 충분하지 않았을 지도 모른다.

Cromakalim은 해마 절편의 흥분성을 감소시키고 epilepsy 양상의 발사를 감소시키고 K^+ 통로를 활성화하여 흥분발사를 억제한다고 한다.²¹⁾ 배양된 해마에 대한 cromakalim의 효과를 조사한 바에 의하면 전압고정상태에서 K^+ 전류를 증가시킨다고 한다.²²⁾ 그러나 본 연구에서 cromakalim은 허혈에 의한 $[K^+]_e$ 증가 양상에 변화를 주지 않았다. 따라서 해마에 있는 K 통로의 흥분발사를 억제하는 효과가 약하다고 본다.

Glutamate가 이온의 이동에 미치는 영향은 해마에서 많이 연구되었다. 허혈성 탈분극이 일어나기 전에 $[K^+]_e$ 는 10 mM 이상으로 증가하는데 이때는 신경전달물질의 유리에 의해 연접전 종말단(presynaptic terminals)이 탈분극되면서 시작된다고 볼 수 있다.²³⁾ CA3 신경을 제거하여 해마의 CA1으로 들어오는

glutamnergic innervation을 차단하면 허혈시 이온의 항상성이 매우 변한다.²⁴⁾ 허혈성 탈분극시에 전형적으로 세포외액의 $[Ca^{2+}]$ 이 감소하는 것이 보이지 않는다. 그리고 $[K^+]_e$ 의 증가도 느리다. 미세투석해 보면 glutamate도 유리되지 않는다. 이러한 결과를 종합하면 허혈 초기에 이온의 급속한 이동에 영향을 미치는 중요한 인자는 glutamate라고 생각한다. 그러므로 K_{ATP} 통로의 개방 혹은 차단으로 K^+ 유출에 차이가 나지 않은 이유는 10분의 허혈기 동안 분비된 glutamate가 다른 양이온 통로를 개방하여 K^+ 을 대량으로 유출하였거나, K_{ATP} 통로를 통한 K^+ 이동은 전체 K 통로를 통한 이동에 비해 미약하였거나 (무산소상태에서 뇌혈관의 K_{ATP} 통로의 작용이 약화되어,²⁵⁾ K_{ATP} 통로는 허혈 초기에 ATP가 아직 남아 있는 시기에만 작용하고 이후는 통로의 기능이 없어지기 때문으로 사료된다. 그리고 실험에 사용된 약제의 용량 및 투여 경로의 선정이 결과에 영향을 미칠 것인가는 더 연구할 과제라고 생각한다.

요약하면 뇌허혈시 K_{ATP} 통로의 조작용 허혈시 $[K^+]_e$ 의 증가 양상에 영향을 미치지 않았다. 그리고 K_{ATP} 통로 개방제인 cromakalim은 허혈시 glutamate의 증가를 억제하지 못하였고 차단제인 glibenclamide는 오히려 glutamate가 허혈후에도 지속적으로 증가하였다. 그러므로 차단제가 glutamate 유리를 증가시킨 기전은 허혈시 증가하는 $[K^+]_e$ 와는 직접적인 상관이 없었고 cromakalim의 뇌보호 효과는 glutamate의 유리를 조절하는 것과는 상관이 없음을 알 수 있었다. 따라서 뇌허혈시 K_{ATP} 통로 조작용 $[K^+]_e$ 를 변화시키고, 변화한 $[K^+]_e$ 가 glutamate 유리에 영향을 미칠 수 있을 것이라는 가설은 증명하지 못하였다.

참 고 문 헌

- Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 43: 1369-74.
- Nicholls DG: Release of glutamate, aspartate and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem* 1989; 52: 331-41.
- Choi DW: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett* 1985; 58: 293-7.
- Nicholls D, Atwell A: The release and uptake of excitatory amino acids. *TIPS Special Reports* 1991; 68-74.
- Barbour B, Brew H, Attwell D: Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 1988; 335: 433-5.
- Kimelberg HK, Rutledge E, Goderie S, Charniga C: Astrocytic swelling due to hypotonic or high K^+ medium causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 409-16.
- Zetterstrom TSC, Vaughan-Jones RD, Grahame-Smith DG: A short period of hypoxia produces a rapid and transient rise in $[K^+]_e$ in rat hippocampus in vivo which is inhibited by certain K^+ channel blocking agents. *Neuroscience* 1995; 67: 815-21.
- Zini S, Roisin MP, Armengaud C, Ben AY: Effect of potassium modulators on the release of glutamate induced by ischemic-like conditions in rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 1993; 153: 202-5.
- Yaxia X, Elke Z, Hoff P, Frank T: Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 587-94.
- Vaughan-Jones RD, Aikein CC: Ion-selective microelectrodes. *Microelectrode techniques The Plymouth workshop handbook*. Edited by Standen NB, Gray PTA, Whitaker MJ Cambridge. The Company of Biologists Limited. 1988, pp137.
- Hille B: Ion channels of excitable membranes. 2nd ed. Sunderland Mass. Sinauer Associates Inc. 1992 pp15.
- Noma A: ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305: 147-8.
- Takaba H, Nagao T, Yao H, Kitazono T, Ibayashi S, Fujishima M: An ATP-sensitive potassium channel activator reduces infarct volume in focal cerebral ischemia in rats. *Am J Physiol* 1997; R583-6.
- Abele AE, Miller RJ: Potassium channel activators abolish excitotoxicity in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Neurosci Lett* 1990; 115: 195-200.
- Fujita H, Takizawa S, Nanri K, Matsushima K, Ogawa S, Shinohara Y: Potassium channel opener reduces extracellular glutamate concentration in rat focal cerebral ischemia. *Brain Res Bull* 1997; 43: 365-8.
- Lauritzen I, De WJ, Lazdunski M: The potassium channel opener - cromakalim prevents glutamate-induced cell death in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1997; 69: 1570-9.

17. Galvan M: Potassium channels in mammalian neuron: their properties and prospects for pharmacological manipulation Potassium channel modulators: pharmacological, molecular and clinical aspects, Edited by Weston AH, Hamilton TC Oxford. Blackwell Science Publications. 1992, pp207.
 18. Jiang C, Haddad GG: Effect of anoxia on intracellular and extracellular potassium activity in hypoglossal neurons in vitro. *J Neurophysiology* 1991; 66: 1-9.
 19. Haddad GG, Jiang C: Mechanisms of neuronal survival during hypoxia: ATP-sensitive K^+ channels 1994; 65: 160-5.
 20. Reid JM, Paterson DJ: Role of K^+ in regulating hypoxic cerebral blood flow in the rat: effect of glibenclamide and ouabain. *Am J Physiol* 1996; 34: 123-42.
 21. Galvan MP: Potassium channels in mammalian neurons: their properties and prospects for pharmacological manipulation Potassium channel modulators, pharmacological, molecular and clinical aspects, Edited by Weston AH, Hamilton TC London. Blackwell scientific publications. 1992, pp216.
 22. Politi DMT, Suzuki S, Rogawski MA: BRL34915 (cromakalim) enhances voltage-dependent K^+ current in cultured rat hippocampal neurons *European J Pharm* 1989; 168: 7-14.
 23. Hansen AJ: Ion homeostasis in cerebral ischemia, Cerebral ischemia and resuscitation. Edited by Schurr A. unknown publisher. 1989, pp83.
 24. Benveniste H, Jorgensen MB, Diemer NH, Hansen AJ: Calcium accumulation by glutamate receptor activation involved in hippocampal cell damage after ischemia. *Acta Neurol Scand* 1988; 78: 529-31.
 25. Bari F, Louis TM, Meng W, Busija DW: Global ischemia impairs ATP-sensitive K^+ channel function in cerebral arterioles in piglets. *Stroke* 1996; 27: 1874-80.
-