

# Ischemic preconditioning 時の心筋間質内 noradrenaline 濃度上昇

— adenosine A1 receptor, protein kinase C の関与 —

湊口信也\*, 荻谷達也\*, 宇野嘉弘\*  
荒井正純\*, 大野道也\*, 大野嘉嗣\*  
橋本和明\*, 西田佳雄\*, 藤原久義\*

## 要 旨

ウサギにおいて ischemic preconditioning (PC) のメカニズムとして, adenosine A1 receptor, protein kinase C の他に, PC 中に交感神経末端より放出される noradrenaline (NA) による  $\alpha_{1B}$  receptor 刺激が重要である。これらのブロッカーは単独で, PC 効果をブロックできることから, 情報伝達系は, 心筋細胞レベルで相互に関連しているとされる。我々は, 交感神経レベルでもこれらのメカニズムが起こっているという仮説を考えた。日本白色種ウサギ (オス, 約 2 kg) の心臓前側壁枝の 5 分虚血・5 分再灌流の PC 前後に, microdialysis 法を用い, 心筋間質内 NA 濃度を HPLC と電気化学法にて測定した。PC 中に生ずる心筋間質内 NA 濃度の上昇が, adenosine A1 receptor および protein kinase C のブロッカー (8-p-sulphophenyl theophylline:8-SPT, 7.5 mg/kg, i.v., polymyxin B:PB, 24 mg/kg, i.v.) でブロックされるか否かを検討した。PC によって, 心筋間質内 NA 濃度は有意に上昇した ( $n=7$ ,  $p<0.05$ )。この上昇は, 8-SPT ( $n=6$ ) あるいは polymyxin B ( $n=6$ ) 前処置下では抑制された。PC 時の心臓交感神経からの NA 放出に, 心臓交感神経細胞の adenosine receptor および protein kinase C が関与している。

キーワード: Ischemic preconditioning, 心筋間質内ノルアドレナリン, プロテインキナーゼ C

## 緒 言

先行する短時間の虚血・再灌流が存在すると, 続発する長時間の虚血に対して心筋は耐性を獲得し, 梗塞サイズを縮小することが知られており, この現象を ischemic preconditioning (PC) と言い, イヌ, ウサギ, ブタ, ラットにおいて認められている<sup>1-4</sup>。ウサギにおいては, PC のメカニズムとして, adenosine A1 receptor<sup>2)</sup>, protein kinase C<sup>5)</sup> の他に, noradrenaline (NA) による  $\alpha_{1B}$  receptor 刺激が重要と考えられている<sup>6,7)</sup>。これらのブロッカー, すなわち非選択的 adenosine receptor blocker の 8-p-sulphophenyl theophylline (8-SPT), protein kinase C inhibitor の staurosporine, polymyxine B,  $\alpha_{1B}$ -receptor blocker の chloroethylclonidine (CEC) はそれぞれ単独で, PC による梗塞縮小効果を完全にブロックできることから, 情報伝達系は, 心筋細胞レベルで相互に関連しているとされる。そこで著者らは, 交感神経レベルでもこれらのメカニズムが起こっているという仮説を考え, PC による心筋間質内 NA 濃度上昇が, adenosine receptor 刺激, protein kinase C 活性化に関連しているか否かを検討した。

## 方 法

日本白色種ウサギ (オス, 約 2 kg) を sodium pentobarbital (30~40 mg/kg, i.v.) にて麻酔後, 機

\*岐阜大学医学部第二内科

械的人工呼吸下にて、左内頸動静脈をカニューレションし、左内頸動脈から動脈圧モニターを、左内頸静脈を薬物投与のルートとした。第3肋間を開胸、心膜を切除し心臓を露出した。冠動脈前側壁枝周囲にオクルーダーを装着し、虚血を生ぜしめることを可能とした。その後、図1に示すごとく、microdialysis probe (PNF 1700, 20 mm length, 0.31 mm outside diameter, 0.2 mm inside diameter, transverse type, 50,000 MW cut-off) を前側壁枝周囲の虚血領域に縦方向に心筋中層まで植え込

だ。Microdialysis は、 $10 \mu\text{l}/\text{min}$  の速度でリンゲル液を灌流し、透析液中ノルアドレナリン濃度を安定させるために、実験セット終了後60分の安静を保った。透析液は、虚血前10分間および5分虚血・5分再灌流の ischemic preconditioning (PC) の10分間にて採取し、測定を行うまで $-83^\circ\text{C}$ にて凍結保存した。心筋間質内ノルアドレナリン濃度測定は、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) と電気化学法により、検体を直接注入することにより行った。

プロトコルは図2のごとくであり、以下に示す3群において検討した。

- 1) saline を前処置した後に PC を加えた群
- 2) adenosine blocker の8-p-sulfophenyl theophylline (8-SPT,  $7.5 \text{ mg}/\text{kg}$ , i.v.) を前処置した後に PC を加えた群
- 3) protein kinase C の inhibitor の polymyxin B (PB,  $24 \text{ mg}/\text{kg}$ , i.v.) を前処置した後に PC を加えた群

### 結 果

#### 血行動態

実験経過中、8-SPT 投与により心拍数、平均血圧の変化を認めなかったが、polymyxin B 投与にて、心拍数は変化しなかったが、平均血圧は有意の低下を示した。

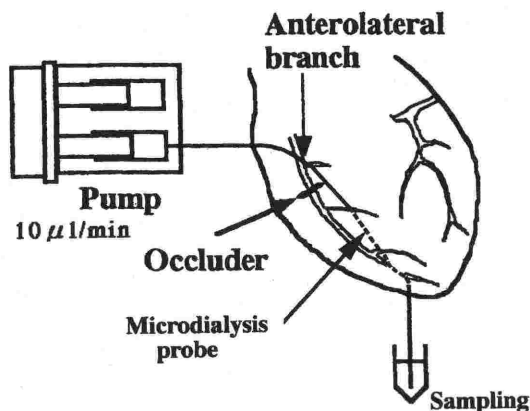


図1 心臓 microdialysis 法の実験セット

ウサギ冠動脈の anterolateral branch に occluder を装着し虚血を生ぜしめる。虚血領域の心筋に図に示すように microdialysis probe を挿入し、リンゲル液を  $10 \mu\text{l}/\text{min}$  の速度で灌流する。

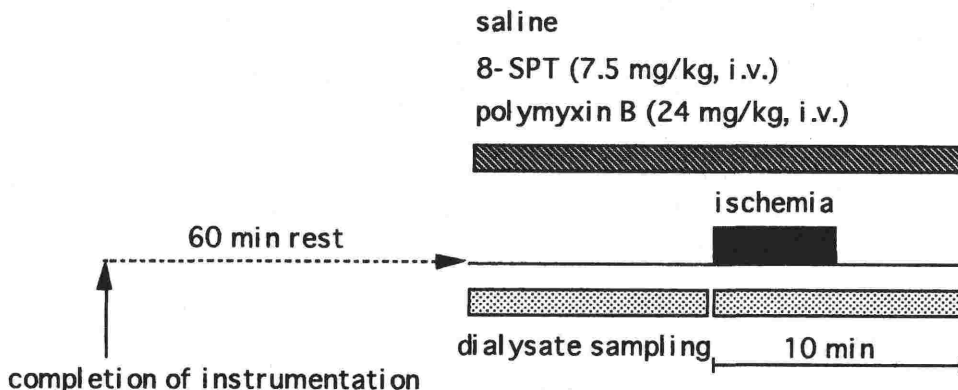


図2 実験プロトコル

実験セット終了後60分間の安静を保ち、図に示す薬物の存在下で、5分虚血・5分再灌流の ischemic preconditioning 前と中の10分間ずつにわたり、透析液を採取する。

表1 interstitial NA level (pg/ml)

group	n	before PC	during PC
saline+PC	7	99±10	189±48*
8-SPT+PC	6	97±14	94±15
PB+PC	6	92±9	112±17

\*p<0.05 vs before PC, NA=noradrenaline, PC=ischemic preconditioning

### 心筋間質内ノルアドレナリン濃度

表1は虚血領域におけるPC前後の心筋間質内ノルアドレナリン濃度を示す。表1のごとく、PCにて心筋間質内ノルアドレナリン濃度は有意の上昇を示したが、この上昇は、adenosine blockerの8-SPT, protein kinase C inhibitorのpolymyxin B前処置により抑制された。

### 考 案

本研究において、ウサギモデルにて、5分虚血・5分再灌流のischemic preconditioning (PC)により、虚血領域の心筋間質内noradrenaline (NA)濃度は有意の上昇を示し、この上昇はadenosine blockerの8-SPT, protein kinase C inhibitorのpolymyxin Bにより抑制されることが明らかとなった。ウサギ<sup>8)</sup>およびラットモデル<sup>9)</sup>において $\alpha_1$ 受容体刺激により梗塞サイズは縮小し、また、交感神経末端においてNAを枯渇させるレセルピン処置によりPC効果が消失するという報告<sup>10)</sup>がある。しかしながら、一方で、ラット<sup>10)</sup>およびウサギ<sup>12)</sup>において $\alpha_1$ 受容体遮断薬のphenoxybenzamine, BE2254の前投与がPC効果をブロックしないことから、 $\alpha_1$ 受容体刺激は梗塞縮小効果はあるが、PC効果発現には関与しないとされてきた。しかし、最近になって、 $\alpha_{1B}$ 受容体刺激がラットの左室機能に対するPC効果に関与していることが報告<sup>6)</sup>され、また、我々もウサギにおいてPCによる梗塞縮小効果に、PC中の $\alpha_{1B}$ 受容体刺激が関与していることを報告<sup>7)</sup>し、PC中のNA遊離がPC効果発現に重要な役割を演じていることを確認した。したがって、本研究で認められたように、PC中の心臓交感神経末端からのNA遊離亢進すなわち心筋間質内NA濃度の上昇が、adenosine blockerの8-SPTあるいはprotein kinase C inhibitorのpolymyxin Bによって抑制されたという結果は、8-SPTあるいはpolymyxin Bによる

PCの梗塞縮小効果抑制作用には、直接的なadenosine A1 receptorの遮断、protein kinase C活性化の抑制以外にNAによる心臓 $\alpha_{1B}$ 受容体刺激が抑制された結果による部分も含まれている可能性を有する。

虚血によりadenosineが産生される<sup>13)</sup>が、adenosineのNA遊離に対する作用はbiphasicであり、10 nMから1  $\mu$ Mの低濃度のadenosineは、transmitter releaseを促進し、1  $\mu$ M以上の高濃度のadenosineは、transmitter releaseを抑制するという報告<sup>14)</sup>から、一つの可能性として、本研究におけるPC中のadenosine上昇は低濃度であり、そのためadenosineがNA遊離を促進しているため、adenosine blockerの8-SPT前処置により、NA遊離が抑制されたと考えられる。しかし、PC中にはadenosineの濃度は1  $\mu$ M以上に達するとする報告<sup>15)</sup>も認められるため、この考え方にも矛盾は存在する。しかし、最近、adenosine A1 receptorの刺激は交感神経末端からのNA遊離を抑制するが、adenosine A2 receptorの刺激はNA遊離を促進することが報告<sup>16,17)</sup>されており、この考え方から、本研究の結果を解釈すると、本研究で認められたnon-selectiveなadenosine blockerの8-SPTによるPC中のNA遊離抑制には、PC中に増加したadenosineによる交感神経末端のadenosine A2 receptorの刺激によるNA遊離促進が強く関与し、adenosine A1 receptorの刺激によるNA遊離抑制の関与は少ないものと考えられる。

Protein kinase Cのinhibitorであるpolymyxin Bは、PC中のNA上昇を抑制したが、このことは、protein kinase Cの活性化がNA遊離促進に強く関与していることを示している。実際、種々の動物における種々の臓器において、protein kinase Cの活性化がNA遊離を促進させることが確認されている<sup>18-20)</sup>。

### 結 論

ウサギモデルにおいて、5分虚血・5分再灌流のischemic preconditioning時に心筋間質内noradrenaline濃度は上昇するが、この上昇には心臓交感神経細胞のadenosine receptorおよびprotein kinase Cの刺激が関与していることが示された。

## 文 献

- 1) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia - a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74 : 1124-1136, 1986
- 2) Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, et al : Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 84 : 350-356, 1991
- 3) Scott RJ, Rohmann S, Braun ER, et al : Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 66 : 1133-1142, 1990
- 4) Yellon DM, Alkhulaifi AM, Browne EE, et al : Ischemic preconditioning limits infarct size in the rat heart. *Cardiovasc Res* 26 : 983-987, 1992
- 5) Ytrehus K, Liu Y, Downey J : preconditioning ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 266 : H1145-H1152, 1994
- 6) Hu K, Nattel S : Mechanisms of ischemic preconditioning in rat hearts - involvement of  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptors, pertussis toxin-sensitive G proteins, and protein kinase C-. *Circulation* 92 : 2259-2265, 1995
- 7) Kariya T, Minatoguchi S, Ohno T, et al :  $\alpha_{1B}$ -antagonist can block infarct size limiting effect of ischemic preconditioning in rabbits (Abstract). *J Mol Cell Cardiol* 28 : A321, 1996
- 8) Bankwara Z, Hale SL, Kloner RA :  $\alpha$ -adrenoceptor stimulation with exogenous catecholamine or release of endogenous catecholamines mimics ischemic preconditioning. *Circulation* 90 : 1023-1028, 1994
- 9) Lock-Winter CR, Winter CB, Nelson DW, et al : cAMP stimulation facilitates preconditioning against ischemia-reperfusion through norepinephrine and alpha-1 mechanisms (Abstract). *Circulation* 84 [Suppl. 2] : II-433, 1994
- 10) Toombs CF, Wiltse AL, Shebuski RJ : Ischemic preconditioning fails to limit infarct size in reserpinized rabbit myocardium: implication of norepinephrine release in the preconditioning effect. *Circulation* 88[part 1] : 2351-2358, 1993
- 11) Bugge CF, Wiltse AL, Shebuski RJ : Ischemic preconditioning is protein kinase C dependent but not through stimulation of adrenergic or adenosine receptors in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 29 : 401-406, 1995
- 12) Thornton JD, Daly JF, Cohen MV, et al : Catecholamines can induce adenosine receptor-mediated protection of the myocardium but do not participate in ischemic preconditioning in the rabbit. *Circ Res* 73 : 649-655, 1993
- 13) Kitakaze M, Hori M, Tamai J, et al :  $\alpha_1$ -adrenoceptor activity regulates release of adenosine from the ischemic myocardium in dogs. *Circ Res* 60 : 631-639, 1987
- 14) Nishimura S, Mohri M, Okada Y, et al : Excitatory and inhibitory effects of adenosine on the neurotransmission in the hippocampal slices of guinea pig. *Brain Res* 525 : 165-169, 1990
- 15) Van Wylen DGL : Effect of ischemic preconditioning on interstitial purine metabolite and lactate accumulation during myocardial ischemia. *Circulation* 89 : 2283-2289, 1994
- 16) Goncalves J, Queiroz G : Purinoceptor modulation of noradrenaline release in rat tail artery: tonic modulation mediated by inhibitory P2Y- and facilitatory A2A-prinoceptors. *Br J Pharmacol* 117 : 156-160, 1996
- 17) Goncalves J, Queiroz G : Facilitatory and inhibitory modulation by endogenous adenosine of noradrenaline release in the epididymal portion of rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 344 : 286-296, 1991
- 18) Takata Y, Ozawa J, Kato H : A selective effect of protein kinase C activators on noradrenaline release compared with subsequent contraction in canine isolated saphenous veins. *Br J Pharmacol* 102 : 955-961, 1991
- 19) Balfagon G, Rosa de Sagarra M, Barrus MT, et al : Effect of phrbo1 esters on noradrenaline release from cerebral arteries. *Brain Res* 477 : 196-201, 1989
- 20) Ishac EJ, De Luca A : The influence of activation or inhibition of protein kinase C on the release of radioactivity from rat isolated atria labelled with [3H]-noradrenaline. *Br J Pharmacol* 94 : 713-720, 1988

## Cardiac Interstitial Noradrenaline Level during Ischemic Preconditioning in Rabbits -Role of Adenosine Receptor and Protein Kinase C-

Shinya Minatoguchi\*, Tatsuya Kariya\*, Yoshihiro Uno\*, Masazumi Arai\*, Michiya Ohno\*,  
Yoshitsugu Ohno\*, Kazuaki Hashimoto\*, Yoshio Nishida\*, Hisayoshi Fujiwara\*

\*Second Department of Internal medicine, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan

Many mechanisms such as  $\alpha_{1B}$ -adrenoceptor, adenosine A1 receptor and protein kinase C involve in the ischemic preconditioning (PC) effect. It is considered they are cross-talking each other at the level of myocytes. However, the cross-talk may occur at the level of sympathetic nerve endings. We hypothesized that the increase in cardiac interstitial noradrenaline (NA) by PC is modified by the activation of adenosin receptors and protein kinase C.

Methods: In 19 open chest Japanese white male rabbits anesthetized with pentobarbital, cardiac interstitial NA levels in the area at risk were measured

before and during PC of 5 min ischemia and 5 min reperfusion in the presence or absence of adenosine blocker (8-p-sulphophenyl theophylline, 7.5 mg/kg), protein kinase C inhibitor (polymyxin B, 24 mg/kg) using microdialysis technique and HPLC.

Results: PC increased cardiac interstitial NA levels and this increase was inhibited by adenosin blocker or protein kinase C inhibitor.

Conclusions: PC increases cardiac interstitial NA through activation of adenosine receptor and protein kinase C.

**Key words :** Ischemic preconditioning, Cardiac interstitial noradrenaline, Adenosine, Protein kinase C, Rabbit

(Circ Cont 19 : 225~229, 1998)