

## 치주염 환자의 혈장과 적혈구내 S. O. D와 Catalase 활성도에 관한 연구

조선대학교 치과대학 치주과학교실

황승환 · 김병옥 · 한경윤

### I. 서 론

치주질환의 병인발생에 관련된 치태세균들은 치주낭상피면의 궤양이나 다형핵백혈구의 이주에 따라 형성된 통로를 통하여 보다 용이하게 심부 조직내로 침투될 수 있는데, 이러한 경로를 통해 기저막을 뚫고 결합조직내로 들어간 세균들은 증식하여 여러 가지 물질들을 분비하게 된다<sup>10</sup>. 이런 물질들 중 어떤 것은 숙주세포나 조직에 직접적으로 해를 끼칠 수 있으며, 또 다른 미생물의 분비물질들은 인간의 염증 체계를 활성화시켜 2차적으로 치주조직에 영향을 끼칠 수 있는데<sup>2,3</sup>, 염증세포들은 조직내로 침투한 세균이나 항원을 인식한 후 활성화되어 산소소비의 증가, hexose monophosphate shunt를 통한 당대사의 증가 및 반응성의 산소유리기( $O_2$ ,  $H_2O_2$ , OH)와 이들의 대사산물의 생성을 특징으로 하는 respiratory burst를 겪게 되며, 모든 호기성 세포들 또한 사립체 호흡 사슬을 통해 산소유리기를 생성할 수 있다<sup>20</sup>.

과산화물 음이온( $O_2^-$ )의 생성은 염증세포의 세포질내에 존재하는 nicotinamide adenin dinucleotide phosphate(NADP) 산화효소와 관련이 있으며<sup>22,24</sup>, 과산화수소( $H_2O_2$ )의 형성은  $O_2$ 의 spontaneous dismutation, 과산화물 분자변위 보효소(superoxide dismutase : SOD)에 의한 전환(dismutation), 그리고 glucose와 glucose oxidase 같은 각종 효소계에 의해서 이루어진다<sup>20</sup>. 또한 수산화기(OH)의 생성은

classic Haber - Weiss reaction, Fenton reaction 그리고 지질산화에 의해 형성된 lipid peroxide와  $O_2$ 와의 반응에 의해서 형성된다<sup>5</sup>.

반응성 산소유리기가 조직파괴에 미치는 영향에 관한 연구로는 적혈구<sup>40,61</sup>, 혈관내피세포<sup>6,57</sup>, 백혈구<sup>8,30</sup>, 혈소판<sup>16</sup>, 섬유아세포<sup>60</sup>, 종양세포<sup>15,20</sup>, 그리고 자가면역질환에서<sup>25</sup> 발생된 반응성 산소유리기의 유해작용에 관하여 연구되었으며, 치주질환에 이환된 환자들을 대상으로 한 연구로는 반응성 산소유리기가 치은의 주요기질인 당단백과 hyaluronic acid의 depolymerization을 야기하여 치주질환의 발생과 진행에 부분적으로 영향을 미칠 가능성이 있음을 시사한 Bartold 등(1984)<sup>9</sup>의 연구, 만성치주질환을 가진 환자의 다형핵백혈구로부터 생성된 lysosomal enzyme과 산소유리기의 방출로 치주조직이 손상될 수 있음을 제시한 Seymour 등(1986)<sup>50</sup>의 연구, 유년형 치주염 환자<sup>2</sup>, 성인형 치주염 환자<sup>60</sup>, 그리고 급속진행형 치주염 환자들에서<sup>59</sup> 말초혈액내 다형핵백혈구에 의하여  $O_2$  생성이 증가됨을 규명한 연구 등이 있으며, 최근 Kimura 등(1993)<sup>30</sup>은 성인형 치주염, 국소적 및 전반적 유년형 치주염 환자의 말초혈액내 다형핵백혈구에서의 증가된 반응성 산소유리기의 생성이 치석제거술 및 치근면 활택술에 의한 초기 치주 치료 후 정상으로 회복됨을 확인하고 반응성 산소유리기의 생성 정도가 치주조직의 염증상태를 반영할 수 있을 것이라고 보고하였다.

일상의 호기성 대사 과정중에 생성되는 산소유리기는 고도로 반응성이며 bactericidal activity와 virocidal effect를 나타내지만 조직내에 과잉축적된 경우 교원질, hyaluronic acid 그리고 단백질과 같은 세포의 기질 성분의 depolymerization에 영향을 끼칠 뿐만 아니라, 세포의 단백질, 핵산 그리고 막지질의 파괴에 활성을 나타내기 때문에<sup>20)</sup> 세포들이 호기성 환경에서 생존하기 위해서는 산소유리기의 생성과 대사의 균형을 유지할 수 있는 항산화계를 갖추어야만 한다.<sup>21)</sup>

항산화계는 크게 효소계, 비효소계, 소분자의 비효소계로 나뉘는데, superoxide dismutase(SOD)와 catalase는 효소계 항산화계에 속하며, SOD는  $O_2$ 가  $H_2O_2$ 와  $O_2$ 로 전환되는 것을 촉진하는 금속 함유 효소로 진행세포의 세포질내에 존재하는 CuZn-SOD, 그리고 영양류의 세포질내와 사립체의 내강 내에 국한되어 존재하는 Mn-SOD 두 종류가 있다<sup>25, 62)</sup>. 세포질내에 존재하는 catalase는 세포소기관인 peroxisome 내에서 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 효소로 cytochrome system을 가진 호기성 세포에 광범위하게 분포되어 있는데 포유동물의 간세포나 적혈구내에 고농도로 존재하여 과산화수소에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호해주는 중요한 역할을 한다<sup>23)</sup>.

이러한 기전을 응용한 연구로 SOD와 catalase에 의해서  $O_2$ 와  $H_2O_2$ 에 의한 적혈구의 용혈이 억제됨이 보고되었었으며<sup>30)</sup>, 혈관내피세포의 손상에 의한 폐부종의 완화에 catalase가 효과적임이 보고되었고<sup>35)</sup>, 또한 SOD가 염증제거 수단으로<sup>40)</sup>, Arthus 반응의 억제 수단으로<sup>54)</sup>, 랑거한스섬의  $\beta$  세포의 기능유지 수단으로<sup>12, 30)</sup>, 그리고 폐암치료의 수단으로<sup>65)</sup> 이용될 수 있음이 보고되었다. 최근 김 등(1994)<sup>1)</sup>은 치주질환의 심도와 치은조직내 SOD 및 catalase의 활성간에 상관 관계가 있음을 보고하였다.

그러나 치주질환에 이환된 환자의 혈액내 반응성 산소유리기 및 항산화효소의 활성변화에 관한 연구는 아직 미미한 실정이다. 이에 치주질환에 이환된 환자의 다형핵백혈구에서 반응성 산소유리기가 증가되며 이로 인하여 치

주조직이 파괴될 수 있고, 치주질환의 심도와 항산화효소의 활성간에 밀접한 관계가 있다는 여러 선학들의 연구 보고를 토대로 치주염환자들의 혈장과 적혈구내에서 생성된 반응성 산소유리기를 소거하는 SOD와 catalase의 활성도를 평가함으로써 치주조직의 염증에 따른 SOD와 catalase의 활성도 변화를 규명하는데 목적을 두고 본 연구를 시행하였다.

## II. 연구대상 및 방법

### 1. 연구 대상

조선대학교 부속 치과병원 치주과에 내원한 치주질환 환자들 중 치주건강을 제외한 전신 건강상태가 양호하다고 인정되며 최근 1년 이내에 항생제 복용이나 치주치료의 경험이 없으며 심한 치은의 염증, 6mm 이상의 부착상실 및 치조골의 소실을 보이는 치아가 10개 이상인 25세에서 35세 사이의 남자 환자 19명을 치주염군으로 선정하고, 치주 및 전신건강상태가 양호하다고 인정되는 22세에서 29세 사이의 남자 자원자 13명을 정상군으로 선정하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 치주조직 상태의 평가

치주염군과 정상군 모두 초진시 탐침깊이, 부착소실, 치은지수 및 치간유두출혈지수를 각각 측정하여 비교하였다.

#### 2) 혈장 및 적혈구 분리

연구대상자의 주정중피정맥(antecubital vein)으로부터 말초혈액을 2ml 채혈한 후 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장과 적혈구를 분리하고 각각을 실험시까지 영하 20°C에 냉동 보관하였다. 단백질 정량 전에 냉동된 혈장을 실온에서 5분간 방치하여 해동시킨 후 4°C에서 13,000rpm으로 30분간 원심분리하여 변성된 단백질이나 침전물을 제거하였다. 냉동된 적혈구의 경우 실온에 5분간 방치하였다가 증류수를 첨가하여 용혈시킨 다음 헤모글로빈의 제거를 위하여 ethanolchlorform(2:1)을 처리하고 37°C에서 15분간 배양한 후 원심분리하여 헤모글로빈이 제거된 적혈구성분인 상층 부유

액을 본 연구에 이용하였다.

### 3) 단백질 정량

단백질 정량은 Bradford(1976)<sup>7)</sup>의 방법을 따랐으며, 표준단백질로는 bovine serum albumin(Sigma)을 사용하였다.

### 4) Superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정

혈장과 적혈구내 SOD 활성도는 Paoletti 등(1994)<sup>20)</sup>의 방법에 의해 측정되었는데, 반응용액으로 100mM Triethanolamine - diethanolamine - HCl buffer(pH 7.4)에 0.2mg/ml의 NADH(reduced nicotinamide adenin dinucleotide), 2.5mM의 EDTA, 1.25mM의 MnCl<sub>2</sub>, 1mM β-Mercapthanol을 첨가하였다. 반응용액에 O<sub>2</sub>에 의해서 NADH가 산화되는 정도를 흡광도 340nm에서 UV - spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 측정하였고, NADH의 산화를 50% 저해하는 SOD 활성을 1 Unit으로 하였다.

### 5) Catalase 활성도 측정

적혈구내 catalase 활성도는 효소의 기질인 과산화수소가 감소하는 정도를 감지하여 효소 활성을 측정하는 Beers 등(1951)<sup>10)</sup>의 방법에 따랐는데, 과산화수소가 240nm에서 흡광하는 특징을 이용하여 catalase 활성으로 인한 흡광도 감소를 240nm에서 UV - spectrophotometer(Shimadzu, Japan)로 관찰함으로써 catalase의 활성도를 측정하였고, catalase의 활성단위는 1분당 1μM의 과산화수소를 분해하는 catalase의 양을 1 Unit으로 하였다.

전기 영동에는 Davis(1964)<sup>21)</sup>의 방법을 변형하여 비변성 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 불연속 완충용액 체계로 상단 겔을 3%, 하단 겔을 6%를 사용하였다. 시료에 0.02% bromophenol blue와 20% glycerol을 섞어 겔에 부하한 후 시료가 상단 겔을 통과할 동안은 60V, 하단 겔을 통과할 동안은 200V의 전압으로 전기 영동을 시행하였다.

Native gel 상에서의 catalase 활성 염색은 Clare 등(1984)<sup>19)</sup>의 음성 염색방법을 이용하였는데 Horseradish peroxidase(Sigma) 용액에 약 45분간 겔을 담구었다가 과산화수소수를 10

mM까지 첨가하면 catalase 활성이 있는 부분에서는 과산화수소가 제거되고 나머지 부분에서는 과산화수소가 잔존하게 된다. 10분 후 잠깐 세척하여, diaminobenzidine 용액에 담가두면 peroxidase가 과산화수소와 diaminobenzidine을 기질로 이용하여 발색반응을 일으키는 반면 catalase가 위치한 부분에서는 과산화수소가 결핍되어 발색이 되지 않고 투명한 띠로 나타나는 부분의 크기로써 catalase의 활성도를 평가하였다.

### 6) 통계처리

본 연구에서 얻어진 측정치들에 대한 각 군간의 차이는 통계프로그램인 SPSS/PC를 이용하였는데, 치은지수와 치간유두출혈지수는 Mann - Whitney U 검정을, 그리고 치주낭 깊이와 부착소실 및 SOD와 catalase의 활성도 차이는 student t - test를 하였으며, p < 0.05 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

## III. 연구 성적

### 1. 치주조직의 상태 비교

치주염군의 경우 검사항목 각각의 평균치는 탐침깊이 4.79mm, 부착상실 5.99mm, 치은지수 2.08, 치간유두출혈지수 2.26이었으며, 정상군의 경우 검사항목 각각의 평균치는 탐침깊이 2.56mm, 부착소실 2.61, 치은지수 0.41, 치간유두출혈지수 0.39였고, 모든 검사항목에서 두 군간에 유의성있는 차이를 보였다(Table 1).

### 2. 혈장내 SOD 활성도

치주염군과 정상군의 혈장내 SOD 활성도(U/mg)는 Table 2와 Fig. 1과 같이 나타났는데, 치주염군의 SOD 활성도(1.986 ± 0.893)는 정상군의 SOD 활성도(3.324 ± 1.044)에 비하여 통계학적으로 유의성있게 낮게 나타났다(P < 0.05).

### 3. 적혈구내 SOD 활성도

치주염군과 정상군의 적혈구내 SOD 활성도(U/mg)는 Table 2와 Fig. 1과 같이 나타났는데

Table 1. Comparison of periodontal status between normal and periodontitis group (mean± S.D.)

Group	periodontitis(n=19)	normal(n=13)	significance
probing depth(mm)	4.79± 1.29	2.56± 0.46	p<0.05
attachment loss(mm)	5.99± 1.77	2.61± 0.34	p<0.05
gingival index	2.08± 0.47	0.31± 0.43	p<0.05
papillary bleeding index	2.26± 0.73	0.39± 0.47	p<0.05

Table 2. Comparison of superoxide dismutase activity in plasma and red blood cells (mean± S.D.) (Unit : U/mg)

Group	periodontitis(n=19)	normal(n=13)	significance
Plasma	1.986± 0.893	3.324± 1.044	p<0.05
RBC	7.753± 3.206	8.116± 1.192	p<0.05

Table 3. Comparison of Catalase activity in red blood cells(mean± S.D.) (Unit : U/ml)

Group	normal(n=13)	Periodontitis(n=19)	significance
catalase	280.2± 32.6	242.8± 45.6	p<0.05

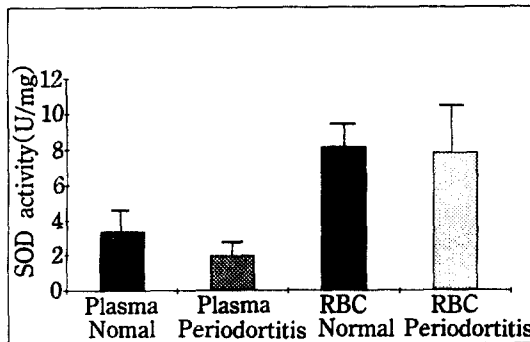


Fig. 1. Comparison of SOD activity in plasma and red blood cells.

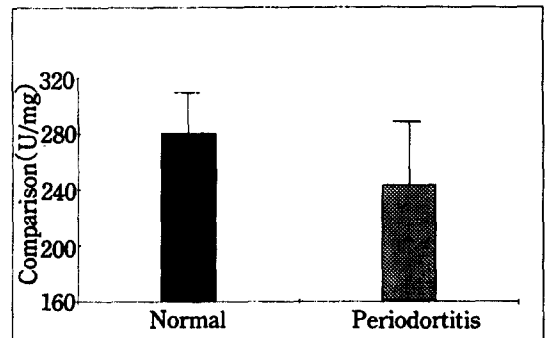


Fig. 2. Comparison of catalase activity in red blood cells.

데, 치주염군의 SOD 활성도(7.753± 3.206)가 정상군의 SOD 활성도(8.116± 1.192)에 비하여 낮게 나타났으나 통계학적인 유의성은 없었다(p<0.05).

#### 4. 적혈구내 Catalase 활성도

치주염군과 정상군의 적혈구내 catalase 활성도는 Table 3, Fig. 2와 같이 나타났는데, 치주염군의 Catalase 활성도(242.8± 45.6)가

정상군의 catalase 활성도(280.2± 32.6)에 비해서 통계학적으로 유의성있게 낮게 나타났다 (p<0.05). 전기영동 후 catalase 활성 염색 결과는 Fig. 3과 같이 정상인의 catalase 활성 띠의 크기는 치주염을 가진 환자의 catalase 활성 띠의 크기에 비해 크게 나타난 것으로 보아 치주염을 가진 환자에서의 catalase 활성도가 낮음을 보여주고 있다.

Fig. 3. Electrophoretogram of catalase in RBCs on 6% nondenaturing polyacrylamide gel.  
Lane A : Periodontitis patient  
Lane B : Normal subject

#### IV. 총괄 및 고안

치태 세균의 활성으로 인하여 발생하는 치주질환은 치아주위 조직을 파괴하여 치아 상실을 야기하는데 이는 치태세균의 심부조직으로의 침투에 따른 조직내 염증 반응으로부터 시작된다. 조직내 염증이 발생되면 활성화된 염증세포들로부터 반응성 산소유리기가 발생된다<sup>43</sup>.

산소유리기는 체내 방어세포들의 세균 탐식에 도움을 주는 항세균요소로 작용하여 이로써 역할을 하기도 하는 반면 조직세포를 파괴하는 유해한 역할을 하기도 한다<sup>40</sup>.

산소유리기의 항세균요소로서의 작용에 관한 연구로 Quie등(1967)<sup>50</sup>은 만성 육아종성 질환의 경우 염증세포의 respiratory burst와 O<sub>2</sub> 생성 이상으로 세균감염에 민감하게 되어 전반적인 입파선증과 거비증이 자주 나타나게 된다고 보고하였으며, Klebanoff 등(1969)<sup>41</sup>은 만성 육아종성 질환 환자의 다형핵백혈구 bactericidal activity가 정상인에 비하여 현저히 감소됨을

보고하였고, Petrone등(1980)<sup>54</sup>은 산소유리기가 화학주성인자의 생성을 촉진시킨다고 보고하였으며, Miyaskai등(1986)<sup>49</sup>은 중성구가 호기성 및 혐기성 환경하에서 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*를 탐식할 수 있는데 이 중 산소유리기가 관여된 산소의존형 세균탐식이 주를 이룬다고 보고하여 bactericidal activity에 산소유리기가 주요하게 작용함을 제시하였다.

반응성 산소유리기의 세포 및 조직에 미치는 유해 작용에 관한 연구로 Carddock(1977)<sup>17</sup>과 Rinaldo등(1982)<sup>56</sup>은 화상이나 외상 환자에서 중성구에 의한 산소유리기의 방출이 혈관내피 세포의 손상을 초래하여 다양한 양상의 respiratory distress syndrome이 야기된다고 하였으며, Crap등<sup>13</sup>과 Matheson등(1979)<sup>45</sup>은 염증세포에서 유래된 산소유리기가 leukocytic protease inhibitor를 억제하여 elastin과 같은 조직구조 성분을 파괴한다고 하였으며, McCord등(1974)<sup>46</sup>, Parellada등(1978)<sup>53</sup>, Greenwald등(1980)<sup>55</sup>은 hyaluronate, glycosaminoglycan, 연골 단백질, 교원질과 같은 세포 및 조직의 구성성분을 직접적으로 파괴한다고 보고하였다.

호흡시 기저상태의 산소분자는 산소가 쉽게 1가의 환원과정을 거치게 되는 전자구조를 가지고 있는데, 이러한 일련의 1가 환원 동안에 호기성 세포들내에서 산소의 불완전한 환원에 기인되어 O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 그리고 OH와 같은 반응성 산소유리기로 중간산물이 발생된다<sup>2, 31, 43, 62</sup>.

생성된 산소유리기는 숙주세포와 조직이 지니는 산소유리기 해소 능력에 따라 이의 조직에 대한 손상 영향이 결정되므로 산소유리기의 생성과 숙주 세포 및 조직에 의한 대사의 균형이 숙주의 생물학적인 안정성을 얻는데 아주 중요한 의미를 지니게 된다<sup>40</sup>.

호기성 세포들은 이러한 산소유리기로부터의 위협을 막기 위하여 다층의 방어계를 가지게 되는데, 첫번째 방어는 cytochrome oxidase와 같은 효소가 담당하는데 산소를 직접 물로 환원시키는 것으로 호흡하는 세포에서 산소 환원의 90% 이상을 담당하며, 두번째 방어기전은

금속함유효소인 superoxidase dismutase (SOD)로  $O_2$ 를  $H_2O_2$ 와 산소로 환원시키는 것이고( $O_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ), 세번째 방어 기전은 catalase로  $O_2$ 의 전환(dismutation)에 의하여 또는 환원형 flavoenzyme의 재산화에 의하여 생성되는 과산화수소를 물과 산소로 환원시키는 것이다<sup>29, 62)</sup>( $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ ).

Britton등(1970)<sup>11)</sup>과 Forrman등(1980)<sup>27)</sup>은 과산화수소 상태에 있는 쥐에서 disulfiram으로 SOD를 억제할 경우 과산화수소증과 연관된 폐 손상에 대한 감수성이 증가되고, 인위적으로 외부에서 SOD와 catalase의 주입시 산소유리기로부터의 조직과 세포의 손상을 막을 수 있었다고 보고하였다. 또한 alloxan과 streptozotocin과 같은 당뇨 유도 약제들은 산소유리기의 발생을 매개로 하여 췌장의 랑게르한스섬  $\beta$ -세포를 손상시키는 것으로 알려졌는데, Grankvist등(1981)<sup>30)</sup>은 이러한 당뇨 유도 약제로 인한  $\beta$ -세포의 손상은 SOD와 catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소의 양이 상대적으로 적어 반응성 산소유리기에 의한 손상 가능성을 동물 실험을 통하여 확인함으로써 항산화효소의 방어적 역할을 규명하였다.

항산화계는 크게 효소계, 비효소계, 소분자의 비효소계로 나뉘는데, SOD와 catalase는 효소계 항산화물에 속하며<sup>62)</sup>, Lactoferrin과 Transferrin은 비효소계의 대표적인 항산화물로서 이온 금속이온이 개재되는 지질의 과산화를 방지하는 것으로 알려지고 있고<sup>4)</sup>, Ascorbic acid는 소분자의 비효소계 중 가장 대표적인 수용성 물질이며 정확한 기전은 알려지지 않았지만 다양한 산소유리기를 소거하는 주요한 역할을 한다고 보고되었으며<sup>62)</sup>,  $\alpha$ -Tocopherol은 소분자의 비효소계 중 가장 대표적인 지용성 물질로 이는 지질의 과산화에 의한 세포막의 손상을 방지하고 Ascorbic acid와  $\alpha$ -Tocopherol이 함께 작용하여 상승효과를 나타낸다고 알려져 있다<sup>62)</sup>.

혈장내 SOD는 혈관내피세포에서 주로 분비된 것으로 Cu와 Zn을 함유하는 세포의 SOD이며, 적혈구내 SOD는 Cu, Zn 및 Mn을 함

유하는 세포내 SOD이다<sup>4, 62)</sup>. 혈장내 catalase는  $H_2O_2$ 에 의한 산화로부터 Ascorbic acid를 보호한다는 Frei등(1988)<sup>62)</sup>의 보고가 있었던 반면, 혈장내 catalase는 단지 채혈과정 중 적혈구의 용혈로 인해 방출된 것이라며 Goth등(1987)<sup>31, 62)</sup>은 혈장내 catalase의 존재에 의문을 제기하였다.

치주질환은 전신 및 급성 감염질환이라기보다는 국소적 및 만성적인 세균 감염에 속하는 질환이라는 점과 함께 치주질환 환자의 말초 혈액내 다형핵백혈구에서 산소유리기가 증가됨을 발견하고 이러한 산물들이 치주질환의 병인발생에 관여함을 시사한 Bartold등(1984)<sup>9)</sup>, Asman등(1986)<sup>3)</sup>, Whyte등(1989)<sup>60)</sup> 그리고 Shapira등(1991)<sup>59)</sup>의 보고들은 반응성 산소유리기를 소거하는 항산화효소의 활성도와 치주질환간의 상관관계에 의문점을 제기하는 바 이를 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

본 연구에서는 연령과 성별에 따른 차이를 고려하여 연구 대상으로 25세 이상 35세 이하의 치주염 환자와 22세에서 29세 사이의 건강한 지원자로 모두 남자로 국한하였는데, Christine등(1975)은 적혈구내 SOD의 활성도가 연령과 성별에 따라 큰 차이가 없다고 보고하였으나, 백혈구내의 SOD 활성도에서 연령에 따른 차이는 크지 않았으나 세포내  $O_2$ 의 생성을 유도하기 위해 인위적으로 Paraquat를 적용시켜 SOD를 생성정도를 비교한 경우 젊은이보다 고령군에서 현저히 낮게 나타났다는 Niwa등(1990)<sup>51)</sup>의 보고, 그리고 쥐에서 폐조직내 SOD와 glutathione의 활성도는 나이가 들에 따라 증가하나 catalase 활성도는 감소되었다는 Yam등(1978)<sup>67)</sup>의 상반된 보고는 논란의 여지를 남겼기 때문이다.

본 연구에서는 혈장으로부터 SOD 활성도를 측정하고, 적혈구로부터 SOD와 catalase 활성도를 측정하였는데, Paoletti등의 방법과 Beers등의 방법에 따라 SOD 활성도와 catalase 활성도를 각각 측정하여 치주염 환자와 정상인간의 차이를 비교한 결과 혈장내 SOD의 활성도가 정상군( $3.324 \pm 1.044$ )보다 치주염군( $1.986 \pm 0.893$ )에서 통계학적으로 유의성있게

낮게 나타났으며( $P < 0.05$ ), 적혈구내 SOD 활성도 또한 비록 통계학적인 유의성은 없었으나( $p > 0.05$ ) 정상군( $8.116 \pm 1.192$ )에 비하여 치주염군( $7.753 \pm 3.206$ )에서 낮게 나타났고, 적혈구내 Catalase 활성도 역시 정상군( $280.2 \pm 32.6$ )보다 치주염군( $242.8 \pm 45.6$ )에서 통계학적으로 유의성 있게 낮게 나타났는데( $p < 0.05$ ), 이러한 결과는 치주질환의 심도에 따라 치은조직내 항산화효소가 감소함을 관찰하고 치주질환의 심도와 항산화효소의 활성도 간에 밀접한 관련이 있다고 보고한 김 등(1994)<sup>1)</sup>의 보고와 일치하였고, 적혈구내 SOD 활성도의 경우 치주염군( $7.753 \pm 3.206$ )과 정상군( $8.116 \pm 1.192$ )간에 통계학적인 유의성이 없는 것으로 나타난( $p > 0.05$ ) 결과는 말초혈액내 SOD 활성도가 적혈구보다는 혈장내 SOD에 주로 영향을 받음을 시사하는 것으로 사료된다.

Kimura 등(1992, 1993)<sup>37, 38)</sup>은 국소 및 전신 유년형 치주염 환자의 50% 정도에서 말초 혈액내 다형핵백혈구의 탐식능력이 감소되어 있었고 치료 후에도 감소된 다형핵백혈구의 탐식능력의 변화가 없는 것을 근거로 다형핵백혈구의 탐식능력의 감소는 일시적인 현상이 아니고, 반면에 활성화된 다형핵백혈구에 의해 증가된 산소유리기는 치주치료 후 정상으로 회복된 것을 토대로 산소유리기의 생성증가는 치주조직 염증상태에 따른 일시적인 현상이라고 주장하였는데, 향후 치주염 환자에 대한 치주치료에 따른 항산화효소 활성도 변화여부를 확인함으로써 치주염군에서 항산화효소의 감소가 치주조직 파괴에 연관되어 나타난 것인지는 아니면 선천적으로 이미 결정되어 감소된 상태로 나타난 것인지를 규명하고 혈장과 적혈구내 SOD와 catalase 이외의 다른 항산화제와의 관련성에 대한 연구가 계속되어야 하리라 사료된다.

## V. 결 론

여러 호기성 세포들에서 발생하는 반응성의 산소유리기가 조직 보호기능 뿐만 아니라 조

직파괴에 관여한다는 보고와 함께 특히 치주 질환에 이환된 환자의 다형핵 백혈구에 의한 반응성의 산소유리기의 증가에 따른 치주조직의 파괴 가능성이 시사되었다.

이에 치주염 환자들의 혈장과 적혈구내에 생성된 반응성 산소유리기를 소거하는 superoxide dismutase(SOD)와 catalase의 활성도를 평가함으로써 치주조직의 염증에 따른 SOD와 catalase의 활성도 변화를 규명하는데 본 연구의 목적을 두고 조선대학교 부속 치과병원 치주과에 내원한 환자들 중 치주조직을 제외한 전신건강상태가 양호하다고 인정되며 심한 치은의 염증, 6mm 이상의 부착상실 및 치조골의 소실을 보이는 치아가 10개 이상인 25세에서 35세 사이의 남자 환자 19명을 치주염군으로 선정하고, 치주 및 전신건강상태가 양호하다고 인정되는 22세에서 29세 사이의 남자 자원자를 정상군으로 선정한 후 모든 연구대상자들의 주정중피정맥(antecubital vein)으로부터 말초혈액을 2ml 채혈하여 혈장과 적혈구로 각각 분리하고, Paoletti 등의 방법에 따라 혈장과 적혈구내 SOD 활성도를, Beers 등의 방법에 따라 적혈구내 catalase의 활성도를 측정 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 혈장내 SOD 활성도는 정상군( $3.324 \pm 1.044$ )보다 치주염군( $1.986 \pm 0.893$ )에서 유의성 있게 낮았다( $P < 0.05$ ).
2. 적혈구내 SOD 활성도에서 정상군( $8.116 \pm 1.192$ )과 치주염군( $7.753 \pm 3.206$ )간의 차이는 통계학적인 유의성이 없었다( $P > 0.05$ ).
3. 적혈구내 Catalase 활성도는 정상군( $280.2 \pm 32.6$ )보다 치주염군( $242.8 \pm 45.6$ )에서 유의성 있게 낮았다( $P < 0.05$ ).

이상의 제한된 실험내에서의 결과를 볼 때 혈장내 SOD와 적혈구내 catalase의 낮아진 활성도가 치주조직의 파괴와 관련이 있음을 시사하였다.

## 참고문헌

1. 김병옥: "치주질환 심도에 따른 치은조직

- 내 superoxide dismutase와 catalase의 활성변화에 관한 연구”, 치의학 박사학위 논문, 경희대학교, 1994.
2. 박동기 : 「Lehninger 생화학」, 유한문화사, 33-64, 505-549, 1986.
  3. Asman, B., Bergstörn, K., Wijkander, P and Lockowandt, B. : “Influence of plasma component on luminol - enhanced chemiluminescence from peripheral granulocytes in juvenile proiodontitis patients”, J. Clin. Periodontol., 13 : 850-855, 1986.
  4. Aruoma, O. I. and Halliwell, B. : “Superoxidase - dependent and ascorbate dependent formation of hydroxy radicals from hydrogen peroxide in the prescence of iron”, Bio. Chem. J., 241 : 273-278, 1987.
  5. Babior, B. M. : “Oxygen - dependent microbial killing by phagocytosis”, N. Engl. J. Med., 298 : 659-668, 1979.
  6. Baehner, R. L., Johnston, R. B. and Nathan, D. G. : “Comparative study of the metabolic and bactericidal characteristics of severely glucose - 6 - phosphate dehydrogenase deficient polymorphonuclear leukocytes and leukocytes from children with chronic granulomatous disease”, J. Reticuloendo. Soc., 12 : 150-169, 1972.
  7. Bradford, M. M. : “A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding”, Anal. Biochem, 72 : 248-252, 1976.
  8. Bahner, R. L., Boxer, L. A., Allen, J. M. and Davis, J. : “Autooxidation as a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes”, Blood, 55 : 347-350, 1977.
  9. Bartold, P. M., Wiebkin O. W., and Thonard J. C. : “The effect of oxygen - driven free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid”, J. Periodont. Res., 19 : 390-400, 1984.
  10. Beers, R. F. and Seizer, I. W. : “Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase”, J. Biol. Chem., 195 : 133-140, 1951.
  11. Britton, L., Malinkovsk, D. P. and Fridovich, I. : “Superoxide dismutase and oxygen metabolism in streptococcus fetalis and comparisons with other organism”, J. Biol. Chem., 245 : 4641-4646, 1970.
  12. Buse, M. G., Gandy, S. E. and Crouch, R. K. : SOD protects  $\beta$  - cells against diabetogenic drugs in rats and in isolated canine islets.(in Oxygen Radicals and Their scavenger systems, Vol. II : Cellular and Medical Aspects), Elsevier Science Pub. Co., Inc. 119-124, 1983.
  13. Carp, H. and Janoff, A. : “*In vitro* suppression of serum elastase inhibitory capacity by reactive oxigen species generated by phagocytting polymorphonuclear leukocytes”, J. Clin. Invest. 63 : 793-797, 1979.
  14. Carson, J., Vogin, E. F., Huber, W. and Schultz, T. L. : “Safety tests of orgotein and antinflammatory protein”, Toxicol. Appl. Pharmacol., 26 : 184-200, 1973.
  15. Clark, R. A., Klebanoff, S. J., Einstein, A. B. and Fefer, A. : “Peroxidase  $H_2O_2$  halide system : Cytotoxic effect on mammalian tumor cells”, Blood, 45 : 161-170, 1975.
  16. Clark, R. A. and Klebanoff, S. J. : “Myeloperoxidase - mediated platelet release reaction”, J. Clin. Invest., 63 : 177-183, 1979.
  17. Craddock, P. R., Fahr, J., Brigham, K. L., Kronenberg, R. S. and Jacobo, H. S. : “Complement and leukocyte mediated pulmonary dysfunction in hemodialysis”, N. Engl. J. Med. 296 : 769-774, 1977.



18. Carranza, F. A. : Glickman's Clinical Periodontology, 7th ed. Saunders, 342-372, 1990.
19. Clare, D. A. Doung, M. H., Darr, D., Archibald, F. and Fridovich, I. : "Effects of molecular oxygen detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium and on activity stains proteins", *Anal. Biochem.*, 140 : 532-537, 1984.
20. Clark, R. A. and Klebanoff, S. J. : "Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity : Role of the peroxidase system", *J. Exp. Med.*, 141 : 1442-1447, 1975.
21. Davis, B. J. : "Disc electrophoresis II. Method and application to humans serum proteins", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121 : 404-427, 1964.
22. Dechatelet, L. R. : "Oxidative bactericidal mechanisms of polymorphonuclear leukocytes", *J. Infect. Dis.*, 131 : 295-303, 1975.
23. Deisseroth, A and Dounce, A. L. : "Catalase physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role", *Physiological reviews*, 50 : 319-375, 1970.
24. Drath, D. B. and Karnovsky, N. L. : "Superoxide production by phagocytic leukocytes", *J. Exp. Med.*, 141 : 257-261, 1975.
25. Ehlenberger, A. G. and Nussenzweig, V. : Phagocytosis role of C3 receptors and contact inducing agents, *The Year in Hematology*. Edited by AS Gorden, R Silber, J LoBue. New York, Plenum publishing, 221-240, 1977.
26. Fantone, J. C. and Ward, P. A. : "Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions", *Am. J. Path.*, 107 : 397-418, 1982.
27. Forman, H. E., York, J. L. and Fisher, A. B. : "Mechanism for the potentiation of oxygen toxicity by disulfiram", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 212 : 452-455, 1980.
28. Freeman, B. A. and Crapo, J. C. : "Biology and tissue injury", *Lab. Invest*, 47 : 412-426, 1982.
29. Fridovich, I. : "Antioxidant defenses in the lung", *Ann. Rev. Physiol.*, 48 : 693-702, 1986.
30. Gandy, S. E., Buse, M. G. and Crouch, R. K. : "Protective role of superoxidase dismutase against diabetogenic drugs", *J. Clin. Invest.*, 70 : 650-658, 1982.
31. Goth, L. : "No catalase isoenzyme in serum", *Clin. Chem.*, 33 : 2302-2303, 1987.
32. Grankvist, K., Marklund, S. L., and Taljedal, I. B. : "CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse", *J. Biochem.*, 199 : 393-398, 1981.
33. Greenwald, R. A. and Moy, W. W. : "Effect of oxygen derived free radicals on hyaluronic acid", *Arthritis Rheum.* 23 : 455-463, 1980.
34. Hägglöf, B., Marklund, S. L. and Holmgren, J. : "CuZn superoxidase dismutase, Mn superoxidase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children", *Acta. Endocrinologica.*, 102 : 235-239, 1983.
35. Heflin, A. C. and Brigham, K. L. : "Prevention by granulocyte depletion of increased vascular permeability of sheep lung following endotoxemia", *J. Clin. Invest.*, 68 : 1253-1260, 1981.
36. Kellogg, E. W. and Fridovich, I. : "Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxidase", *J. Biol. Chem.*, 252 : 6721-6728, 1977.

37. Kimura, S., Yonemura, T. and Hiraga, T., Okada, H. : "Flow cytometric evaluation of phagocytosis by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases", Arch. Oral. Biol., 37 : 495-501, 1992.
38. Kimura, S., Yonemura, T. and Kaya, H. : "Increased oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases", J. Periodont. Res., 28 : 197-203, 1993.
39. Klebanoff, S. J. and Clark, R. A. : "Hemolysis and iodination of erythrocyte components by a myeloperoxidase-mediated system", Blood, 45 : 699-707, 1975.
40. Klebanoff, S. J. : "Antimicrobial mechanism in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes", Sem. Hematol., 12 : 177-142, 1975.
41. Klebanoff, S. J. and White, L. R. : "Iodination defect in the leukocytes of a patient with chronic granulomatous disease in childhood", N. Engl. Med. 280 : 460-466, 1969.
42. Lindhe, J. : Text book of clinical periodontology, 2nd ed. : Munssgaard, 129-192, 1989.
43. Loschen, P. C., Flohe, L. and Chance, B. : "Respiratory chain-linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria", FEBS Lett., 18 : 261, 1971.
44. Marklund, S. : "Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxidase in human tissue and extracellular fluids", Acta. Physiol. Scand., 492 : 19-23, 1980.
45. Matheson, N. R., Wong, D. S. and Travis, J. : "Enzymatically inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase", Biochem. Biophys. Res. Commun., 88 : 402-409, 1979.
46. McCord, J. M. : "Free radicals and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase", Science, 185 : 529-551, 1974.
47. McCord, J. M., Fridovich, I. : "An enzymatic function for erythrocyte", J. Biol. Chem., 244 : 6044-6055, 1969.
48. McCormic, J. R., Harkin, M. M., Johnson, K. J. and Wald, P. A. : "Suppression by superoxide dismutase of immune-complex induced pulmonary alveolitis and dermal inflammation", Am. J. Pathol., 102 : 55-61, 1981.
49. Miyasaki, K. T., Wilson, M. E., Brunetti, A. J. and Genco, R. J. : "Oxidative and nonoxidative killing of Actinobacillus actinomycescomitans by human neutrophils", Infect. Immun. 53 : 154-160, 1986.
50. Nilsson, R., Pick, F. M., and Bary, R. C. : "ESR study on reduction of oxygen to superoxide by some biochemical synthesis", Biochem. Biophys. Acta., 192 : 145-148, 1969.
51. Niwa, Y., Ishimoto, K. and Kanoh, T. : "Induction of SOD in leukocytes by paraquat : correlation with age and possible predictor of longevity", Blood, 835-841, 1990.
52. Paoletti, F. and Mocali, A. : Determination of SOD activity by Purely Chemical system based on NADPH oxidation, SOD assay based on NADPH oxidation. Oxygen radical in Biological systems : Oxygen radicals and antioxidants edited by Alexander, L. P., Glazer, N., Academic Press, INC., 209-221 : 1994.
53. Parellada, P. and Planas, J. M. : "Synovial fluid degradation induced by free radicals : *In vitro* action of several free radical scavengers and anti-inflammatory drugs", Biochem. Pharm., 27 : 535-537, 1978.

54. Pettrone, W. F., English, D. K., Wong, K. and McCord, J. M. : "Free radicals and inflammation : The superoxide dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma", Proc. Natl. Acad. Sci., 77 : 1159-1163, 1980.
55. Quie, P. G., White, J. G., Holmes, B. and Good, R. A. : "*In vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes : diminished activity in chronic granulomatous disease in childhood", J. Clin. Invest., 46 : 668-679, 1967.
56. Rinaldo, J. E. and Roger, R. M. : "Adult respiratory distress syndrome : Changing concepts of lung injury and repair", N. Engl. J. Med., 306 : 900-909, 1982.
57. Sachs, T., Molodow, C. F., Craddock, P. R., Bowers, J. K. and Jacob, H. S. : "Oxygen radical mediated endothelial cell damage by complement - stimulated granulocytes : An *in vitro* model of immune vascular damage", J. Clin. Invest., 61 : 1161-1167, 1978.
58. Seymour, G. J., White, G. J. and Powell, R. N. : "Chemiluminescence in the assessment of polymorphonuclear leukocyte function in chronic inflammatory periodontal disease", J. Oral. Pathol., 15 : 125-131, 1986.
59. Shapira, L., Borinski, R., Sela, M. N., and Soskolne, A. : "Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients", J. Clin. Periodontol., 18 : 44-48, 1991.
60. Simon, R. H., Scoggin, C. H. and Patterson, D. : "Hydroperoxide causes the fetal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals", J. Biol. Chem., 256 : 7181-7186, 1981.
61. Stendahl, O. and Lindgren, S. : "Functions of granulocytes with deficient myeloperoxidase mediated iodination in a patient with generalized pustular psoriasis", Scand. J. Haematol., 16 : 144-153, 1976.
62. Stocker, R. and Frei, B. : Endogenous antioxidant defences in human blood plasma (in Oxidative Stress and Antioxidants), Academic Press Ltd., 213-242, 1991.
63. Vidlakova, M., Erazimova, J., Horki, J. and Placer, Z. : "Relationship of serum antioxidative activity to tocopherol and serum inhibitor of lipid peroxidation", Clin. Chem. Acta., 36 : 61-66, 1972.
64. Winterbourn, C., Hawkins, R. E. and Carrell, M. B. : "The estimation of red cell SOD activity", J. Lab. Clin. Med., 85 : 337-341, 1975.
65. Wong, G. H. and Goeddel, D. L. : "Induction of manganous superoxidase dismutase by tumor necrosis factor, possible protective mechanism", Science, 242 : 941-944, 1988.
66. Whyte, G. J., Seymour, G. J., Cheung, K., and Robinson, M. F. : "Chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes from adult periodontitis patients", J. Clin. Periodontol., 16 : 69-74, 1989.
67. Yam, J., Frank, L. and Roberts, R. : "Age-related development of pulmonary enzyme in the rat", Proc. Exp. Biol. Med., 157 : 293-297, 1978.

## SUPEROXIDE DISMUTASE – AND CATALASE – ACTIVITY IN BLOOD PLASMA AND RED BLOOD CELLS IN PERIODONTITIS

Hwang, Seung - Hwan, Kim, Byung - Ok, Han, Kyung - Yoon

*Department of Periodontology, School of Dentistry, Chosun University*

It has been believed that the increased release of free oxygen radicals and their tissue damaging potency might be a contributing factor in the pathogenesis of periodontal disease.

Antioxidant enzymes such as superoxide dismutase(SOD) and catalase can protect the tissue damage from the free oxygen radicals( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , and  $OH^-$ )

In order to investigate the SOD - and catalase - activity in the blood plasma and red blood cells(RBCs) of the patients with perodontitis, 19 male periodontitis patients(25~35 years old) who had good general health, more than 10 teeth with severely inflamed gingiva, attachment loss more than 6mm and bone loss were selected as periodontitis group, and 13 male volunteers(22~29 years old) with good general and periodontal health were selected as normal group.

After blood plasma and RBC were separated from peripheral blood of 2ml collected from antecubital vein of each subject, SOD - activity in blood plasma and RBCs was measured by the same method that Paoletti et al. did, and catalase - activity in RBC was measured by the same method that Beers et al. did.

The difference of SOD - and catalase - activity between the normal and the periodontitis groups was statistically analyzed by Student t - test with SPSS/PC program.

The results were as follows :

1. SOD activity in blood plasma was significantly lower in the periodontitis group( $1.986 \pm 0.893$ ) than in the normal group( $3.324 \pm 1.044$ ) ( $p < 0.05$ ).
2. There was no statistical significance in the difference of SOD - activity in RBCs between the periodontitis group( $7.753 \pm 3.206$ ) and the normal group( $8.116 \pm 1.192$ ) ( $p < 0.05$ ).
3. Catalase activity in RBCs was significantly lower in the periodontitis group( $242.8 \pm 45.6$ ) than in the normal group( $280.2 \pm 32.6$ ) ( $p < 0.05$ ).

The results, within the limits of the present experiment, suggest that the lowered activity of SOD in blood plasma and catalase in RBCs may be related with periodontal destruction.