

고압산소 전처치의 심근 항산화효소 활성 증가 및 허혈-재관류손상 보호 효과

오동진¹ · 김영훈 · 김찬형 · 박종완 · 김명석

¹한림대학교 의과대학 내과학교실 및 서울대학교 의과대학 약리학교실

Pretreatment of Hyperbaric Oxygenation Increases the Activities of Myocardial Antioxidant Enzymes and Protects the Ischemia-Reperfusion Injury of the Heart. Dong Jin Oh¹, Young-hoon Kim, Chan-hyung Kim, Jong-wan Park, and Myung-suk Kim ¹Department of Internal Medicine, Gangdong Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University; Department of Pharmacology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-799, Korea

Myocardial ischemia-reperfusion injury is known to be mediated by reactive oxygen species. The myocardial cell is equipped with endogenous antioxidant defensive system which can be adaptively stimulated by various oxidative stress. It is postulated that an increased oxygen partial pressure induced by hyperbaric oxygenation impose an oxidative stress on the cells, resulting alterations in the endogenous antioxidant system. In this study we investigated the effect of hyperbaric oxygenation on the activities of myocardial antioxidant enzymes and observed whether the hyperbaric oxygenation could protect the ischemia-reperfusion injury of heart. Rats or rabbits were pretreated with hyperbaric oxygenation(2~3 atm O₂/1~3 hrs/1~10 days). The changes in activities of major antioxidant enzymes(superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase), functional recovery and infarct size were observed in the experimentally induced ischemia-reperfused hearts. In the hearts isolated from rats pretreated with 2 atm O₂/1~2 hrs for 5 days, the functional recovery after reperfusion(20 min) following global ischemia(25 min) was significantly increased without any observable oxygen toxicity. Lactate dehydrogenase release was also significantly reduced in this hyperbaric oxygenated rat hearts. In *in vivo* regional ischemia(30 min) model of rabbit hearts, pretreatment with 2 atm O₂/1 hr for 5 days significantly limited the infarct size. Among the myocardial antioxidant enzymes of rat hearts pretreated with the hyperbaric oxygenation, the activities of catalase, superoxide dismutase and glucose-6-phosphatase dehydrogenase were increased, while those of glutathione peroxidase and reductase were not changed. There were lethal cases in the groups of rats exposed to 3 atm O₂/2~3 hrs for 5 days. A lipid-peroxidation product, malondialdehyde was increased in brains and livers of the rats exposed to 2 atm O₂/2~3 hrs/5 days and 3 atm O₂/1 hr/5days. The present results suggest that the pretreatment of hyperbaric oxygenation can protect the post-ischemic reperfused hearts in association with a stimulation of the activities of myocardial antioxidant defensive enzymes, and that the hyperbaric oxygenation of 2 atm O₂/1 hr for 5 days would be a safe condition which does not produce any oxygen toxicity.

Key Words : Hyperbaric oxygen, Ischemia-reperfusion injury, Myocardial antioxidant enzyme

서 론

심근의 허혈-재관류손상 발생에 있어서 중요한 병태생

책임저자 : 김명석, ☎ 110-799 서울 종로구 연건동 28, 서울대
학교 의과대학 약리학교실

리기전의 하나는 반응성 산소라디칼에 의한 산화성 세포 손상이다. 생체에는 반응성 산소라디칼을 제거하는 효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등이 내인성 항산화 방어체계의 하나로 존재하며, 이들은 반응성 산소라디칼에 의한 산화성 세포 손상

을 방지하거나 경감하는데 일차적으로 중요한 역할을 한다. 따라서 허혈 및 허혈/재관류 심근손상을 예방, 치료하기 위한 방법으로 항산화 효소를 포함한 다양한 항산화 약물들의 투여가 실험적으로 시도되었다(Hess & Manson, 1984; Jolly et al, 1984). 그러나 이러한 항산화 약물요법은 이미 비가역적으로 손상을 받은 세포에 대하여는 효과적이지 못하며, 또한 관상혈류가 차단된 허혈 부위로는 약물의 침투가 원활치 못할 뿐 아니라 특히 항산화효소들은 생체내 반감기가 짧기 때문에 임상적으로 효과를 기대하기 어렵다는 부정적인 면이 있다(Omar et al, 1991).

모든 생물체는 내,외부 환경의 급격한 변화에 따른 스트레스성 자극에 대하여 자기 스스로를 방어하는 능력을 갖고 있다. 자기방어(self-defence) 능력은 가해진 자극이 치명적이지 않는 한 그 자극에 적응할 수 있도록 항진되며, 이는 차후에 가해지는 보다 강력한 동일 또는 유사 자극에 대하여 내성을 갖게 한다. 이러한 자기방어 능력의 항진이 어떠한 기전에 의하여 나타나는지 구체적으로 밝혀진 바는 없으나 그 유해자극에 의하여 유도되는 내인성 방어물질들의 증가가 하나의 기전이 될 수 있으리라 여겨진다(Meerson, 1991). 이와같은 가설에 근거하여 최근에는 외부로부터 항산화 약물을 투여하기 보다 산화성 손상에 대하여 내인성으로 갖고 있는 자기방어 능력을 항진시킴으로서 심장의 허혈 및 재관류손상에 대처하고자 하는 연구들이 시도되고 있다(Yellon & Latchman, 1992). 실제로 경미한 허혈/재관류(또는 저산소/산소재공급) 및 다양한 종류의 자극 조건들에 의하여 항산화 효소의 활성 증가가 유도되고 허혈 내성이 획득됨이 알려졌다. 즉 짧은 기간의 허혈/재관류를 반복 실시하여 허혈 전처치한 동물 심장에서 SOD 및 catalase 활성이 증가할 뿐 아니라 계속되는 장시간의 허혈후 재관류시 심근손상이 감소된다는 보고가 있으며(Hoshida et al, 1993; Kim et al, 1994; Park, 1994), 또한 고온자극(Currie et al, 1988; Karmazyn et al, 1988; Liu et al, 1992), 박테리아의 내독소(Bensard et al, 1990; Brown et al, 1989), TNF (Wong & Goedde, 1988) 및 IL-1(Nogae et al, 1995) 등 cytokine 그리고 UV, X-ray(Oberley et al, 1987), 산화 화합물 등의 다양한 산화성 자극이 항산화효소를 증가시킨다는 동물실험 결과들이 있다.

허혈병변 발생의 일차적인 원인은 산소 공급의 중단이다. 따라서 허혈병변 부위에 대한 산소 공급의 증가는 비가역적인 괴사로의 진행을 지연시킬 수 있으리라는 가정하에 허혈 심장의 동물 모델이나 급성 심근경색증 환자에서 고압산소 요법을 시도한 예가 있으며 유효한 결과를 얻었다는 보고들도 있다(Jain, 1990). 한편 고압산소에

의한 조직 세포의 산소분압 증가는 반응성 산소라디칼의 생성을 촉진하고 그로 인한 산화적 스트레스를 증가시킬 수도 있다(Sterling et al, 1993). 따라서 심한 조건의 고압산소 처치는 산화성 조직손상을 야기할 뿐 아니라, 더욱이 산화성 손상을 주로 하는 허혈-재관류 심장에서는 세포손상을 악화시킬 가능성도 있다. 그러나 산화적 스트레스가 세포 손상을 일으킬 정도로 심한 경우가 아니라면 오히려 내인성 항산화 방어체계의 활성을 증가시키는 유도자극으로서 후속 되는 보다 강력한 산화적 스트레스에 대하여 자기방어 능력을 항진시킬 수도 있으리라 여겨진다. 지금까지 허혈성 심장 질환에 있어서 고압산소 요법에 관한 연구는 상기한 바와 같이 허혈병변의 산소공급 증가라는 관점에서 이루어진 것이 대부분이고 내인성 항산화 방어체계의 유도라는 면에서 시도한 연구는 없다. 따라서 본 연구에서는 산화성 조직 손상을 초래하지 않는 안전한 고압산소 처치조건을 찾고, 그러한 고압산소 처치가 심장 조직 항산화효소들의 활성 증가를 유도하고 허혈후 재관류 심근손상 및 기능 저하를 방지할 것이라는 가설을 검증하고자 하였다. 이를 위하여 흰쥐 및 토끼에 여러 조건의 고압산소를 전처치한 후 허혈-재관류 모델 심장에서 SOD, catalase, glutathione 관련 효소 등 내인성 항산화효소들의 활성 변화를 검토하고 심기능 회복 및 심근경색 부위의 축소 여부 등을 관찰하였다.

방 법

실험 동물 및 실험군

체중 200 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 정상 대조군, 고압 대조군 및 고압산소 전처치군으로 나누었다. 고압 대조군(A3-1)은 3기압 공기를 1일 1회 1시간씩 5일간 처치하였으며, 고압산소 전처치군은 2기압, 100% 산소를 1일 1회 1시간(O2-1), 2시간(O2-2), 3시간(O2-3)씩 5일간 처치한 군과 3기압 산소를 1일 1회 1시간(O3-1), 2시간(O3-2), 3시간(O3-3)씩 5일간 처치한 군 그리고 2기압 산소를 1일 1회에 1시간씩 1일, 5일, 10일간 처치한 10개 군으로 나누었으며, 각 군당 6~12마리의 동물을 사용하였다. 각 군에서 동물의 치사율을 구하고 뇌 및 간 조직에서 지질 과산화 산물인 malondialdehyde(MDA) 농도를 측정하여(Ohkawa et al, 1979) 산소독성 여부 및 그 정도를 관찰하였다. 전처치가 끝난 각 군의 흰쥐로부터 심장을 적출한 후 즉시 Langendorff심장 관류 장치를 이용하여 실험적 허혈-재관류손상을 유도하고 재관류시 심기능 회복율과 심근세포의 손상 정도(LDH 유리)를 관찰하였다. 또한 각 군의 적출심장 조직에서 SOD, catalase,

glutathione peroxidase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성을 측정하였다. 고압산소 전처치의 *in vivo* 허혈손상 보호효과를 검토하기 위한 실험에서는 체중 2 kg 내외의 웅성 New Zealand White계 가토를 대조군과 고압산소 전처치군으로 나누었다. 고압산소군의 동물들에는 2기압, 100% 산소를 1일 1회 1시간씩 5일간 전처치하였다. 마지막 전처치 후 개흉하여 심장을 노출시킨 다음 관상동맥 좌전하행지를 30분 동안 결찰하였다가 재관류시켜 *in vivo* 국소허혈-재관류손상을 유도하였으며, 24시간 후 심장을 적출하여 위험부위와 괴사부위를 계측하였다.

실험 방법

고압산소 처치: 자체 제작한 중소 동물용 고압산소 장치에 실험 동물을 넣고 분당 0.2기압의 속도로 서서히 100% 산소(고압대조군은 공기)를 주입하여 2 또는 3기압까지 압력을 증가시켰다. 호기 중의 이산화탄소를 제거하기 위하여 일단 적정 기압에 도달한 후 주입 속도와 같은 속도로 gas를 배출하여 통속을 환기시켰다. 정해진 시간 동안 고압산소에 노출시킨 후 감압병에 주의하여 분당 0.2기압의 속도로 감압하였다. 고압산소통내에는 ice pack을 넣어 통내의 온도와 대기온도의 차이를 3°C 이내로 유지시켰다.

적출심장의 허혈-재관류손상 및 심기능 측정: 흰쥐를 sodium pentobarbital(30 mg/kg, I.P.)로 마취시킨 후 인공호흡 하에서 흉부를 절개하였다. 심장을 적출한 후 즉시 Langendorff 관류장치에 대동맥을 연결시켜 역방향 관류를 시행하였다. 관류액은 95% O₂~5% CO₂로 포화시킨 Krebs-Henseleit(K-H) 완충용액 (NaCl 118 mM, NaHCO₃ 27.2 mM, KCl 4.8 mM, MgSO₄ 1.2mM, KH₂PO₄ 1 mM, CaCl₂ 1.25 mM, Glucose 10 mM, pH 7.4)을 사용하였으며, 80 Cm H₂O의 일정 압력으로 관류하고, 심장 온도를 37°C로 일정하게 유지하였다. 약 15분 동안 관류하여 심기능이 안정화된 후 대동맥 삽입관을 막아 심장의 전체허혈(global ischemia)을 25분 동안 유도하였고 이후 다시 20분간 재관류시켰다. 심기능의 지표로 심박수와 좌심실압을 측정하였다. 좌심실압은 끝에 latex balloon을 부착한 20G의 plastic catheter를 좌심실에 삽입하고 압력변환기(P23XL)에 연결한 후 생리기록계(Harvard)를 이용해서 측정하였다. 이때 안정화된 심장의 좌심실 이완기말압(LVEDP)이 5 mmHg 내외가 되도록 balloon을 팽창시켰다. 좌심실 수축기말압(LVESP)과 이완기말압의 차이인 좌심실 발생압(LVDP)에 심박수를 곱하여 심기능 지수를 산출하였다. 허혈후 재관류시 심기능 지수를 허혈전 지수와 비교하여 심기능 회복율을 평가하였다. 세포질 효

소인 lactate dehydrogenase(LDH)의 유출을 심근세포 손상의 지표로 측정하였다. 허혈 후 재관류 초기 5분간 관류액을 받아 효소 측정 시료로 사용하였으며, LDH 활성도는 UV-spectrophotometry방법에 의하여 측정하였다(Bergmeyer & Bernt, 1974).

In vivo 심장의 허혈-재관류손상 및 경색부위 측정: 토끼를 sodium pentobarbital(30 mg/kg, I.V.)로 마취시킨 후 인공호흡 하에서 4th intercostal space 부위에서 개흉하여 심장 전벽을 노출시키고 심낭을 절개한 다음 좌심실 관상동맥의 중전하행분지를 심방으로부터 약 5~10 mm 밑에서 결찰하였다. 동맥의 폐색 여부는 심첨부의 pallor 및 akinesia로 확인하였다. 30분 후 결찰을 풀어 재관류를 시행하고 흉벽 절개 부위를 복원하였다. 재관류 24시간에 토끼를 희생시켜 심장을 적출한 후 Langendorff 관류장치에 연결하여 조직내의 혈액을 세척하였다. 수술시 결찰하였던 관상동맥 분지를 다시 결찰하고 0.1% Evans blue를 5분간 관류시켜 염색한 다음 심장을 관류장치에서 떼어내어 2~3 mm 두께의 횡단 절편을 만들었다. 각 절편의 무게를 측정하고 다음 triphenyl tetrazolium chloride(TTC) 용액(1% TTC in 20mM phosphate buffer, pH 8.5)에 30분간 incubation(37°C)하여 염색하였다. 염색이 완료된 후 각 절편을 촬영하여 color slide를 제작한 다음 위험부위(Evans blue non-staining area)와 괴사부위(TTC non-staining area)를 planimetry하고 무게를 계측하였다.

항산화효소 활성도 측정: 심장조직을 잘게 찢은 다음 4배(vol/wt) 용량의 균질화용액(30mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM potassium phosphate, pH 7.4)에 넣고 Polytron homogenizer와 초음파 조직분쇄기를 이용하여 균질화하였다. 얻어진 균질액을 10,000 g에서 15분간 원심 분리한 후 상청액을 취하여 효소활성 측정의 시료로 사용하였다. 위의 모든 조작은 4°C 이하에서 시행하였다. Superoxide dismutase(SOD) 활성도는 epinephrine에서 adrenochrome으로의 자가산화물을 억제하는 방법을 이용하여 측정하였다(Misra & Fridovich, 1972). Catalase 활성도는 H₂O₂ 분해시 발생되는 산소의 양을 oxygen monitor로 측정하는 Karmazyn등(1990)의 방법으로 측정하였다. Glutathione peroxidase(GSHPx) 활성도는 t-butyl hydroperoxide를 기질로 사용한 DelMaestro & McDonald(1985)의 방법으로 측정하였다. Glutathione reductase (GSSGRd) 활성도는 Goldberg & Spooner(1983)의 방법을 이용하여 측정하였다. Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)의 활성도는 Deutsch(1983)의 방법에 따라 측정하였다.

통계 처리

모든 측정치는 평균값±표준오차로 표시하였다. 대조

군과 각 실험군간 차이의 유의성은 Student's two-tailed unpaired t-test로 검정하였으며 p값 0.05이하일 때 유의하다고 판정하였다.

결 과

고압산소 전처치의 안전성

정상대조군과 고압대조군(A3-1)에서는 치사례가 없었다. 여러 조건의 고압산소를 5일 동안 전처치한 고압산소군 중 2기압 산소 1일 1회 1시간(O2-1), 2시간(O2-2), 3시간(O2-3) 및 3기압 산소 1일 1회 1시간(O3-1) 군들에서는 치사례가 없었던 반면, 3기압 산소 1일 1회 2시간(O3-2)군에서는 실험동물 12마리 중 4마리, 그리고 3시간(O3-3)군

Table 1. Fatality rate during the application of hyperbaric oxygenation(for 5 days) in rats

Condition			Number of Rats	Number of Death	Fatality Rate(%)
Air	3 atm	1 hr/day	12	0	0
		1 hr/day	12	0	0
	2 atm	2 hr/day	12	0	0
O ₂	3 atm	3 hr/day	12	0	0
		1 hr/day	12	0	0
	3 atm	2 hr/day	12	4	33
		3 hr/day	12	10	83

Table 2. Lipid peroxidation in brains and livers of rats treated with hyperbaric oxygenation for 5 days

Condition	MDA ^a , nmole/g wet wt			
	Brain	Liver		
Control	149.2 ± 12.0	171.4 ± 13.0		
Air	3 atm 1 hr/day	160.3 ± 8.70	137.3 ± 15.0	
		1 hr/day	179.1 ± 38.0	170.8 ± 10.0
	2 atm	2 hr/day	277.5 ± 36.0*	209.2 ± 13.0
		3 hr/day	359.4 ± 51.0*	263.0 ± 32.0*
	3 atm 1 hr/day	315.6 ± 24.0*	259.5 ± 16.0*	

^a: malondialdehyde, a lipid peroxidation, *: p < 0.05 vs control

에서는 12마리 중 10마리가 사망하여 각각 33%와 83%의 치사율을 보였다(Table 1). 사망시기는 O3-2군에서 고압산소 처치 2일과 4일째 각각 2마리씩, O3-3군에서는 고압산소 처치 2일째 3마리, 3일째 5마리, 4일과 5일째 각각 1마리씩 사망하였다. 치사례가 있는 O3-2와 O3-3군을 제외한 실험군들의 뇌 및 간 조직에서 지질과산화산물, MDA를 측정하여 산화성 조직 손상을 검토하였다. 고압대조군의 MDA함량은 정상대조군과 차이를 보이지 않았다. 고압산소군의 경우 O2-1군에서는 정상대조군에 비해 MDA생성의 의미있는 증가가 없었으나 O2-2, O2-3, 및 O3-1군들에서는 뇌 와 간조직 모두에서 대조군에 비하여 유의한 증가를 보였다(Table 2). 한편 MDA증가를 보이지 않는 2기압 산소 1일 1회 1시간 조건(O2-1) 중 처치기간을 5일에서 1일 또는 10일로 변경시킨 경우 1일 처치군에서는 뇌 및 간조직 모두에서 대조군과 차이를 보이지 않았다. 그러나 10일 처치군의 경우 MDA생성이 뇌조직에서 의미있게 증가하였으며 간조직에서도 통계적 의미는 없지만 증가하는 경향을 보였다(Table 3).

고압산소 전처치의 적출심장 허혈-재관류손상 보호효과

흰쥐 적출심장의 허혈(25분)후 재관류(20분)시 정상대조군의 심기능 회복률은 허혈 전의 약 60%를 보였고, 고압대조군의 회복률은 정상대조군 보다 높았으나 통계적 유의성은 없었다. 한편 고압산소 전처치의 경우 O2-1과 O2-2군에서 심기능 회복률이 약 93%로 현저히 향상되었고, O2-3군에서는 정상대조군의 회복률보다 약간 높았으나 통계적 유의성은 없었으며, O3-1군에서는 대조군보다 오히려 낮은 회복률을 보였다(Fig. 1). 2기압 산소/1일 1회 1시간씩 1일, 5일(O2-1, 회복률: 93%) 및 10일 전처치한 군들 중 1일과 10일 처치군은 대조에 비하여 회복률이 낮거나(1일 처치군) 차이가 없었다(10일 처치군)(Fig. 2).

Table 3. Lipid peroxidation in brains and livers of rats according to the duration of hyperbaric oxygenation

Condition	MDA ^a , nmole/g wet wt		
	Brain	Liver	
Control	149.2 ± 12.0	171.4 ± 13.0	
O ₂ -2 atm, 1 hr/day	1 day	175.8 ± 8.00	172.6 ± 13.0
	5 days	179.1 ± 38.0	170.8 ± 10.0
	10 days	209.0 ± 9.0*	179.2 ± 10.0

^a: malondialdehyde, a lipid peroxidation, *: p < 0.05 vs control

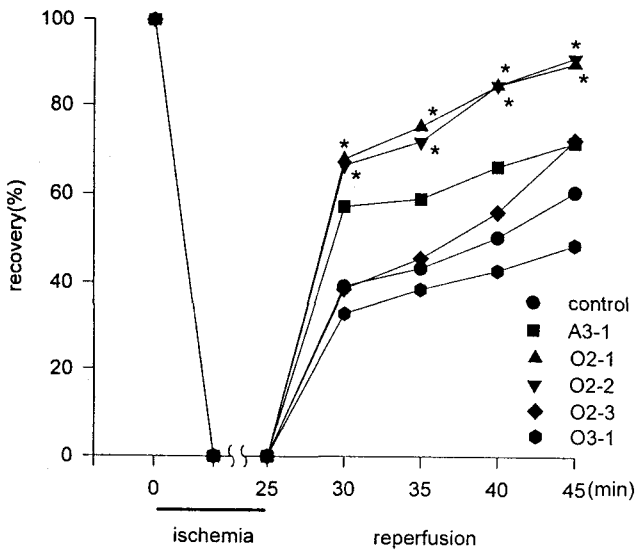


Fig. 1. Functional recovery in the ischemic-reperfused hearts isolated from hyperbaric oxygenated rats. As for the cardiac functional index, the product of left ventricular developed pressure multiplied by heart rate was calculated, and was expressed as a percent of the preischemic value. Hyperbaric oxygenation was applied for 5 days under the various conditions. A3-1: Air 3 atm-1 hr/day, O2-1: O₂ 2 atm-1 hr/day, O2-2: O₂ 2 atm-2 hr/day, O2-3: O₂ 2 atm-3 hr/day, O3-1: O₂ 3 atm-1 hr/day. *: p<0.05 vs control.

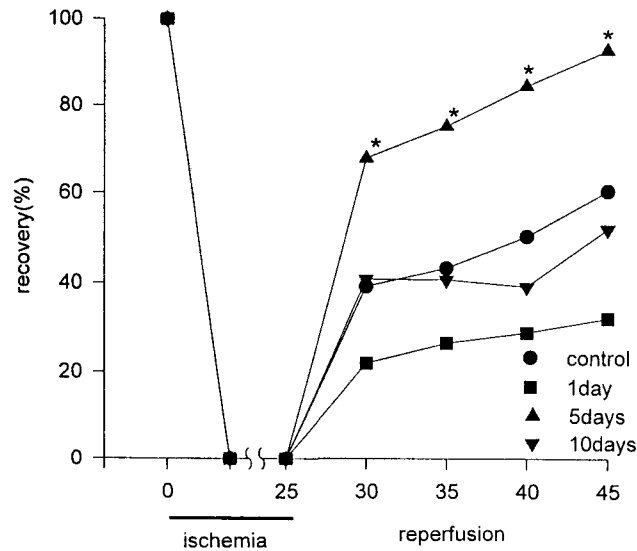


Fig. 2. Functional recovery in the ischemic-reperfused hearts according to the duration of hyperbaric oxygenation. Hearts were isolated from rats treated with hyperbaric oxygen under the conditions of 2 atm-1hr/day for 1, 5 and 10 days. Cardiac functional indexes were measured as same as in Fig. 1. *: p<0.05 vs control.

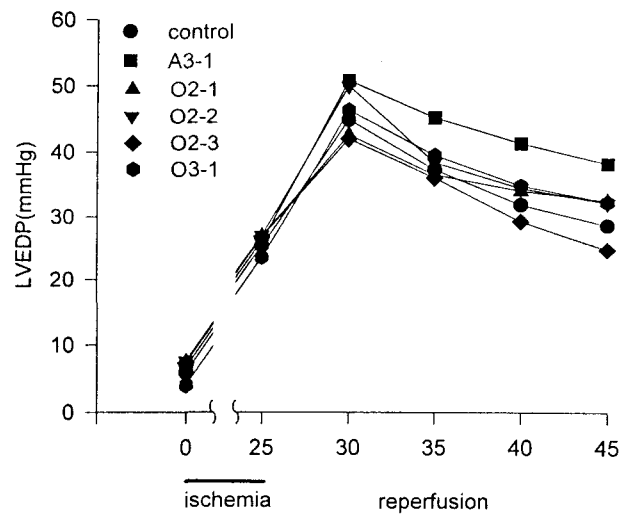


Fig. 3. Left ventricular end-diastolic pressure(LVEDP) of the ischemic-reperfused hearts isolated from the hyperbaric oxygenated rats. The conditions of hyperbaric oxygenation were as same as in Fig. 1.

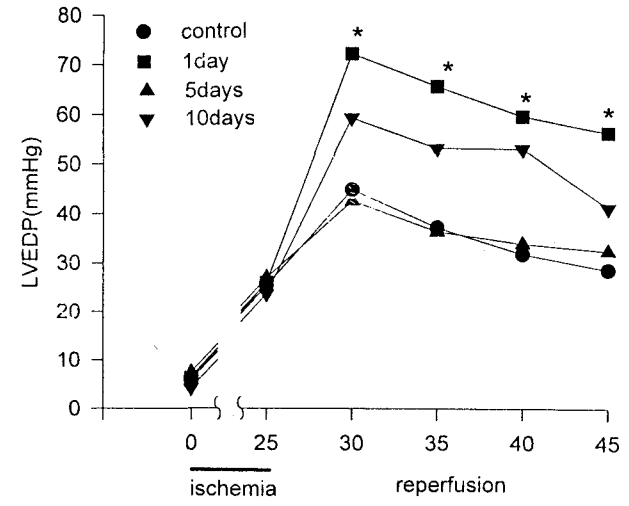


Fig. 4. Left ventricular end-diastolic pressure(LVEDP) of the ischemic-reperfused hearts according to the duration of hyperbaric oxygenation. Hyperbaric oxygenation was applied for 1, 5 and 10 days under the condition of 2 atm-1hr/day. *: p<0.05 vs control.

좌심실 이완기말압(LVEDP)은 허혈후 재관류 초기에 현저히 증가하였다가 시간 경과에 따라 점차 감소하는 회복 양상을 보였는데 고압대조군 및 고압산소군 전부에서 정상대조군과 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 그러나 2기압 산소/1일 1회 1시간씩 1일 또는 10일 처치군에서는 대조군에 비하여 회복이 저조하였다(Fig. 4). 허혈후 재관류

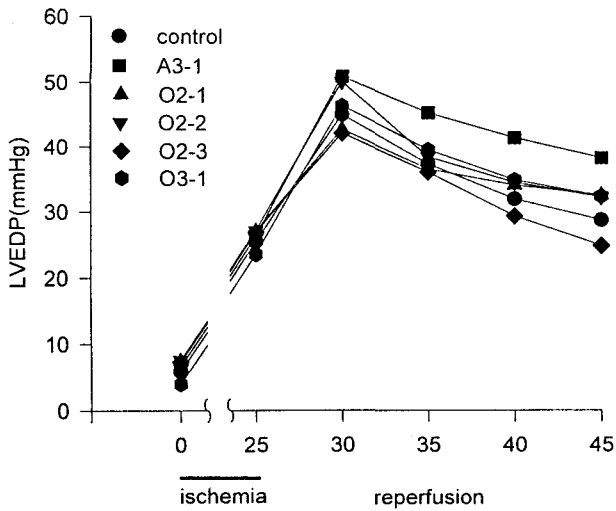


Fig. 5. Left ventricular end-diastolic pressure(LVEDP) of globally ischemic(25min)-reperfused(20min) hearts isolated from hyperbaric oxygenation are the same as in Fig. 1.

시 LDH유출은 처음 수분 이내에 급격한 증가를 보인 후 점차 감소하였다. 정상대조군과 고압대조군의 재관류 초기 5분간 LDH유출은 약 0.3 U/min/g wet wt이었다. 고압 산소 전처치의 경우 O2-1, O2-2 및 O2-3군들에서는 대조군과 비교할 때 통계적 의미는 없지만 LDH유출이 감소하는 경향을 보였으며, 반면에 O3-1군에서는 대조 및 다른 고압산소군에 비하여 증가하는 양상을 보였다(Table 4). 2기압 산소/1일 1회 1시간 조건의 1일, 5일, 10일 처치 시 5일 처치군에 비하여 1일 및 10일 처치군에서 LDH유출이 통계적으로 의미있게 증가하였다(Table 5).

고압산소 전처치에 의한 항산화효소 활성도 변화

SOD의 정상대조군 활성도는 13.7 U/mg prot이었으며 고압 대조군에서도 차이를 나타내지 않았다. 고압산소 처치시 O3-1군의 활성도가 17.0 U/mg prot으로 유의한 증가를 보인 외에 다른 처치군들에서는 대조에 비하여 의미있는 변화를 보이지 않았다. Catalase 활성도는 정상대조군에서 49.8 U/mg prot으로 고압대조 및 O3-1군과는 차이를 나타내지 않았으나 O2-1, O2-2 및 O2-3군들에서는 모두 유의한 활성도 증가를 보였다. GSHPx와 GSSGRd의 정상대조군 활성도는 각각 1.2 U/mg prot 과 29.8 U/mg prot이었으며 고압대조 및 모든 고압산소 처치군들에서 유의한 활성도 변화를 나타내지 않았다. G6PDH 활성도는 정상대조군의 5.49 U/mg prot에 비하여 O3-1군에서 6.95 U/mg prot으로 유의한 증가를 보인 이외에 다른 모든 군들에서는 대조군과 차이를 나타내지 않았다. 한편 2기압 산소/1일 1회 1시간씩 1일, 5일, 10일 처치한 군들

Table 4. LDH release in the ischemic-reperfused hearts isolated from the hyperbaric oxygenated rats^a

Condition			LDH ^b , U/min/g wet wt
Control			0.31 ± 0.02
Air	3 atm	1 hr/day	0.30 ± 0.02
		1 hr/day	0.23 ± 0.06
O ₂	2 atm	2 hr/day	0.25 ± 0.04
		3 hr/day	0.20 ± 0.01
	3 atm	1 hr/day	0.36 ± 0.05

^a : Isolated hearts were made globally ischemic for 25 min and reperfused for 20 min. Rats were treated with hyperbaric oxygenation under the various conditions for 5 days.

^b : lactate dehydrogenase

Table 5. LDH release from the ischemic-reperfused rat hearts according to the duration of hyperbaric oxygenation^a

Condition		LDH ^b , U/min/g wet wt
Control		0.31 ± 0.02
O ₂ -2 atm, 1 hr/day	1 day	0.41 ± 0.05*
	5 days	0.23 ± 0.06
	10 days	0.46 ± 0.05*

^a: Isolated hearts were made globally ischemic for 25 min and reperfused for 20 min.

^b: lactate dehydrogenase. *: p < 0.05 vs control

의 경우 catalase 활성도가 모든 군에서 대조에 비하여 현저한 증가를 보였으나 다른 효소들의 활성도에는 변화가 없었다(Table 6).

고압산소 전처치의 in vivo 허혈손상 보호효과

토끼의 관상동맥 좌전하행지를 결찰(30분) 후 재관류(24시간)한 심장에서 허혈병변의 위험부위와 괴사부위를 계측하였다. 대조군의 위험부위와 괴사부위는 각각 1600 ± 105 mg 과 666 ± 151 mg이었다. 이에 비해 고압산소 전처치(2기압 산소/1일 1회 1시간씩 5일)군에서는 위험부위 와 괴사부위가 전부 감소하였는데 특히 괴사부위가 273 ± 98 mg으로 현저히 감소하였으며, 좌심실 전체 및 위험부위에 대한 괴사부위의 비율도 대조군에서보다 통

Table 6. Changes in the activities of myocardial antioxidant enzymes after treatment of hyperbaric oxygenation in rats

Condition			Enzyme, U/mg protein ^a				
			SOD	Catalase	GSHPx	GSSGRd	G6PDH
Control			13.7±0.5	49.8±3.7	1.20±0.11	29.8±2.3	5.49±0.37
Air	3 atm	1 hr/day, 5days	14.0±0.9	45.1±2.2	1.18±0.10	35.1±0.8	5.32±0.28
		1 hr/day, 1days	16.0±0.4	77.9±12.7*	1.20±0.08	32.4±2.7	6.13±0.21
O ₂	2 atm	1 hr/day, 5days	15.1±1.1	78.9±16.0*	1.25±0.07	35.1±3.0	6.04±0.58
		1 hr/day, 10days	14.9±0.8	75.5±9.2*	1.24±0.11	32.4±4.4	6.47±0.83
	2 hr/day, 5days	13.8±0.9	62.0±4.4*	1.22±0.07	30.6±3.7	5.52±0.64	
	3 hr/day, 5days	16.3±1.4	81.0±5.0*	1.15±0.09	33.7±2.4	6.05±0.37	
	3 atm	1 hr/day, 5days	17.0±0.9*	48.1±3.6	1.20±0.10	28.3±3.1	6.95±0.44*

SOD: superoxide dismutase, GSHPx: glutathione peroxidase, GSSGRd: glutathione reductase, G6PDH: glucose-6-phosphate dehydrogenase

^a: Mean±SEM of 6 experiments, *: p<0.05 vs control

Table 7. Myocardial infarct size after 30 min-LAD occlusion followed by 24 hr-reperfusion in the hearts isolated from hyperbaric oxygenated rabbits

	LV(mg)	Inf(mg)	RA(mg)	Inf/LV(%)	RA/LV(%)	Inf/RA(%)
Control	2950±244	666±151	1600±105	21.9±3.9	55.4±4.9	41.4±10.2
Hyperbaric O ₂ , 2 atm, 1hr/day/5 days	3094±121	273±98*	1118±328	8.5±2.7*	35.1±8.7	23.8±3.3*

LAD: left anterior descending artery, LV: left ventricular mass, Inf: infarct mass, RA: mass of risk area, *: p<0.05 vs control

계적으로 의미있는 감소를 보였다(Table 7).

고 찰

고압산소는 조직에 대한 산소공급을 효과적으로 증가시키기 때문에 일산화탄소 중독, 감압병을 비롯하여 혐기성 세균감염에 의한 근괴사, 당뇨병성 괴양 그리고 허혈성 병변 등 다양한 질환의 치료에 병행요법으로 이용되고 있다. 그러나 고압산소요법에 의한 산소공급의 증가는 동시에 조직세포의 산소분압을 증가시키므로서 산소독성을 또한 동반할 수 있다(Sterling et al, 1993; Tibbles & Edelsberg, 1996). 고압산소에 의한 산소독성은 산소압이 높을수록 그리고 노출 시간이 길수록 그 출현 빈도가 증가하며 심한 경우 전신 경련 유발과 함께 사망에

까지 이른다. 이러한 산소독성의 출현은 동물의 종에 따라 차이가 있는데 흰쥐의 경우 2.8기압 하에서 지속적인 고압산소에 노출시킬 경우 4~6시간에 경련이 나타나고 6~14시간에 사망한다는 보고가 있다(Harabin et al, 1990). 본 연구에서도 3기압 산소를 하루에 2 또는 3시간씩 5일 동안 처치한 흰쥐들에서는 처치 2일 부터 치사례를 보이는 경우가 있었다. 이러한 고압산소의 독성은 주로 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등 반응성 산소라디칼의 과다한 발생에 의한 산화성 세포손상 때문에 나타난다(Jamieson, 1989). 반응성 산소라디칼은 조직 세포의 지질, 단백질 및 핵산 등에 광범위한 산화성 변성을 초래하는데 특히 불포화 지질의 과산화반응이 쉽게 유발되기 때문에 지질 과산화는 반응성 산소라디칼에 의한 산화성 손상의 지표로 널리 이용되고 있다. 본 연구에서는 산소 독성에 예민한 표적 장기인 뇌 와 전신적인

산화성 손상을 대변할 수 있는 간 조직에서 지질과산화 산물인 MDA를 측정함으로써 고압산소에 의한 산화성 손상을 검토하였다. 그 결과 치사례가 없는 실험군들 중에서도 2기압 2~3시간 그리고 3기압 1시간씩 5일간 처치한 흰쥐들에서는 이들 조직의 MDA함량이 증가하였다. 이러한 결과는 허혈성 심장질환에서 심근보호효과를 얻기 위하여 시행하려는 고압산소요법은 이보다 낮은 용량으로 실시해야 안전할 것임을 시사하는 것으로 본연구의 경우 2기압 산소를 1일 1시간씩 5일 동안 처치시에는 산소독성의 출현을 관찰할 수 없었다.

허혈성 심장질환에서 고압산소 요법을 통하여 허혈부위에 대한 산소 공급을 증가시키므로써 치명적인 심근 괴사로의 진행을 방지코자 한 연구들이 있다(Sterling et al, 1993; Iwatsuki et al, 1994). 그러나 고압산소 요법을 실시한다 하더라도 관상혈류가 차단된 허혈병변 부위는 혈류를 통한 다량의 산소 공급이 이루어지지 못하고 확산에 의한 소량의 산소 밖에 공급될 수 없기 때문에 큰 효과를 기대하기 힘들며, 또 산소공급이 어느 정도 증가된다 할지라도 고압산소를 중단한 경우에는 허혈과정이 다시 진행되기 때문에 지속적인 효과를 볼 수 없다는 부정적인 보고들이 있다(Meijne et al, 1963; Mogelson et al, 1980; Trapp & Creighton, 1964; Whalen & Saltzman, 1968). 한편 다른 연구자는 토끼의 허혈/재관류 심장에서 허혈 또는 재관류기간에 각각 고압산소를 처치하는 경우 허혈기간에만 처치하는 것보다 재관류기간에 처치한 경우에 경색부위의 축소가 더 현저함을 관찰하고 고압산소는 혈전용해제등으로 혈류를 재개한 상태에서 보조요법으로 적용하는 것이 효과적일 것이라고 보고하였다(Sterling, 1993). 이와같이 산소공급의 증가라는 면에서 진행중에 있거나 이미 발생한 허혈병변에 대하여 고압산소요법을 시행하는 것은 그 유효성에 있어서 상반된 결과들이 있다. 이와는 달리 본연구는 고압산소를 전처치 하므로써 허혈병변 발생을 방지하거나 경감하는데 주안점이 있다. 본연구 결과 2기압 산소를 하루에 1시간씩 5일간 전처치한 흰쥐의 적출심장에서 산소독성의 출현 없이 허혈후 재관류시 심기능 회복이 현저히 향상되었으며, 토끼의 관상동맥 좌전하행지를 결찰하여 유도한 *in vivo* 국소허혈 심장에서도 위험부위에 대한 괴사부위의 비율이 고압산소 전처치군에서 대조군에 비해 약 60%정도 감소되었다. 이러한 결과는 과거에 규명되지 않았던 고압산소의 새로운 효능으로 현재 임상에서 시행 하고있는 용량(2.5~3기압, 2시간 이내) 또는 그 이하 용량의 고압산소를 간헐적으로 전처치 하므로써 허혈/재관류 심근손상 발생의 예방이 가능함을 시사하고 있다. 그러나 전처치 기간을 5일에서 1일 또는 10일로 변화시켰을 때

에는 오히려 심근손상이 증폭되는 결과를 보였다. 이같은 사실은 고압산소의 심독성과 허혈/재관류손상 보호효과가 매우 미묘한 차이에 의하여 나타나고 따라서 therapeutic window가 넓지 않음을 의미하는 것으로 여겨지는데, 고압산소의 독성에 있어서 심장이 일차적인 표적장기 가운데 하나라고 주장하는 보고도(Arieli et al, 1992) 있음을 감안할 때 고압산소 처치의 심독성과 허혈성 손상 보호효과에 대한 좀더 구체적인 kinetic parameter의 분석이 요구된다.

허혈/재관류손상의 주된 기전은 반응성 산소라디칼에 의한 산화성 세포 손상이다. 생체내에는 이같은 산화성 손상에 대한 내인성 방어 기전으로 각종의 항산화효소가 존재하며, 이들 효소의 활성은 다양한 산화적 스트레스에 의하여 증가됨이 알려져 있다. 본 연구에서는 고압산소 처치시 치명적이지 않은 산화적 스트레스가 생체내 항산화효소의 활성을 증가시키고 그러한 항산화효소의 활성 증가가 심근 보호 기전과 관련이 있을 것으로 가정하고 이를 검증 하였다. 연구 결과 내인성 항산화효소 중 SOD, G6PDH 및 catalase의 활성이 고압산소 전처치에 의하여 증가하였으며, 특히 catalase활성이 다른 효소들과는 달리 산소독성을 보이지 않으면서 허혈/재관류 손상 보호효과를 나타내는 2기압 산소/1일 1시간/5일 처치군에서도 현저히 증가하였다. 산소라디칼에 의한 산화성 세포손상의 발생에 있어서 superoxide anion 또는 H_2O_2 단독 보다는 이들의 상호작용에 의하여 발생하는 훨씬 강력한 산화물인 hydroxyl radical이 더욱 중요한 역할을 한다는 사실로 볼때 H_2O_2 를 제거하므로써 hydroxyl radical 생성을 차단할 수 있는 catalase 활성의 증가는 허혈/재관류 심근손상을 방지하는데 어느정도 기여할 수 있을 것으로 여겨진다. 그런데 이같은 항산화효소들의 활성 증가가 고압산소의 용량에 비례하지 않았으며, 모든 효소들에서 동등하지 않았다. 즉 SOD와 G6PDH는 3기압 이상의 비교적 높은 산소압에서만 활성이 약간 증가한 반면, catalase 활성은 2기압 처치에 의해서는 현저히 증가하나 3기압 처치시에는 오히려 변화되지 않았다. 이와같이 항산화효소들의 활성 증가가 일률적이지 않은 원인에 관하여 현 단계에서 명확한 결론을 내릴 수는 없으나, 항산화효소의 활성 증가가 산화적 스트레스를 유발하는 조건에 따라 다르며, 같은 유발조건이라 하더라도 모든 효소들에서 동등한 정도로 나타나지 않는다는 다른 연구자들의 보고(Das et al, 1995), 그리고 항산화효소들의 유전자 발현이 각각의 효소에 특이적인 transcription factor들에 의해, SOD는 superoxide anion에 의하여 활성화되는 Sox R/S; catalase는 H_2O_2 에 의하여 활성화되는 Oxy R-에 의하여 서로 다르게 조절(Pahl & Baeuerle, 1994)된다

는 사실을 감안한다면 고압산소 처치시에도 조건에 따라 모든 항산화효소들의 활성증가가 동등하게 나타나지 않을 수 있으리라 여겨진다. 한편 효소들의 활성증가는 유전자 발현의 유도에 따른 효소단백의 생합성 증가에 의하거나 또는 단백질 생합성의 전사후 활성화에 의할 수도 있는데 ozone이나 95% O₂를 전처치한 폐장에서 항산화효소의 mRNA 발현이 증가한다는 보고들이(Clerch & Massaro, 1993; Rahman et al, 1991) 있는 것으로 볼 때 고압산소 전처치에 의한 항산화효소의 활성 증가도 일차적으로는 유전자 발현의 유도에 따른 효소단백의 생합성 증가가 선행할 것으로 추측된다.

이상의 연구는 허혈성 심장질환의 예방, 치료에 있어서 지금까지 시도되었던 것과는 다른 각도에서 고압산소요법의 효용성을 타진한 것으로서 이같은 방법이 현실화될 수 있다면 허혈성 심장질환 초기 환자나 개심술 시행 예정 환자 또는 심장이식시 공여심장에 고압산소를 전처치함으로써 이후의 심근 허혈에 대한 내성 획득이 가능할 것으로 사료된다. 다만 고압산소 전처치에 의한 심근 보호작용이 어떠한 시간 경과를 보이는가 하는 점과 어느 정도 지속될 수 있는가에 대한 이후의 연구가 요구된다.

감사의 글

이 연구는 '95년도 서울대학교병원 임상연구비와 과학기술처 생명공학기술 개발사업 연구비(B-02-04-A-03)의 보조로 이루어졌음.

참 고 문 헌

- Arieli R, Ben-Haim SA, Hayam G, Edoute Y. Heart energetic efficiency in O₂-exposed rats studied in isolated working heart. *J Appl Physiol* 73(6): 2289-2296, 1992
- Bensard DD, Brown JM, Anderson BO, Banerjee A, Shanley PF, Grosso MA, Whitman GJR, Harken AH. Induction of endogenous tissue antioxidant enzyme activity attenuates myocardial reperfusion injury. *J Surg Res* 49: 126-131, 1990
- Bergmeyer HU, Bernt E. UV assay of lactate dehydrogenase activity with pyruvate and NADH. In: Bergmeyer HU ed, *Method of Enzymatic Analysis, 2nd ed*, Academic Press, New York, p574-579, 1974
- Brown JM, Grosso MA, Terada LS, Whiteman GJR, Banerjee A, White CW, Harken AH, Repine JE. Endotoxin pre-treatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *PNAS USA* 86: 2516-2520, 1989
- Clerch LB, Massaro D. Tolerance of rats to hyperoxia. *J Clin Invest* 91: 499-508, 1993
- Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K. Heat-shock response is associated with enhanced postischemic recovery. *Cir Res* 63: 543-549, 1988
- Das DK, Maulik N, Moraru II. Gene expression in acute myocardial stress. Induction by hypoxia, ischemia, reperfusion, hyperthermia and oxidative stress. *J Mol Cell Cardiol* 27: 181-193, 1995
- DelMaestro RF, McDonald W. Oxidative enzyme in tissue homogenate. In: Greenwald RA ed, *CRC handbook of methods for oxygen radical research*, CRC Press Inc, Florida, p291-296, 1985
- Deutsch J. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. In: Bergmeyer HU ed, *Methods of Enzymatic Analysis(vol 3), 3rd ed*, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, p190-197, 1983
- Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. In: Bergmeyer HU ed, *Methods of Enzymatic Analysis(vol 3), 3rd ed*, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, Florida, p258-265, 1983
- Harabin AL, Braisted JC, Flynn ET. Response of antioxidant enzymes to intermittent and continuous hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 69(1): 328-335, 1990
- Hess ML, Manson NH. Molecular oxygen: Friend and Foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 49: 892-900, 1984
- Hoshida S, Kuzuya T, Fuji H. Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *Am J Physiol* 264: H33-H39, 1993
- Iwatsuki N, Takahashi M, Ono K, Tajima T. Hyperbaric oxygen combined with nicardipine administration accelerates neurologic recovery after cerebral ischemia in a canine model. *Critical Care Med* 22(5): 858-863, 1994
- Jain KK. Hyperbaric oxygen therapy in cardiovascular diseases. In: Jain KK ed. *Textbook of hyperbaric medicine*, Hogrefe & Huber Pub. Canada, p283-307, 1990
- Jamieson D. Oxygen toxicity and reactive oxygen metabolites in mammals. *Free Rad Biol Med* 7: 87-108, 1989
- Jolly SR, Kane WJ, Bailie GD. Canine myocardial reperfusion injury: its reduction by the combined administration. *Circ Res* 54: 277-285, 1984
- Karmazyn M, Mailer K, Currie RW. Acquisition and decay of heat-shock enhanced postischemic ventricular recovery. *Am J Physiol* 259: H424-H431, 1990

- Kim MS, Park JW, Kim YH. Effect of ischemic preconditioning on the oxygen free radical production and antioxidant systems in the post-ischemic reperfused heart. In: Asada K and Yoshikawa T ed, *Frontiers of Reactive Oxygen Species in Biology and Medicine*. Elsevier, Amsterdam, p475–476, 1994
- Liu X, Engelman RM, Moraru I, Rousou JA, Flack JE, Deaton DW, Maulik N, Das DK. Heat shock: A new approach for myocardial preservation in cardiac surgery. *Circulation* 86: II358–II363, 1992
- Meerson FZ. Adaptive protection of the heart. In: *Protecting against stress and ischemic damage*. CRC Press, Boca Raton, 1991
- Meijne NG, Bulterijs A, Eloff SP, Boerema I. An experimental investigation into the influence of administration of oxygen under increased atmospheric pressure upon coronary infarction. *J Cardiovasc Surg* 4: 521–535, 1963
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247: 3170–3175, 1972
- Mogelson S, Cavidson J, Sobel B, Roberts R. The effect of hyperbaric oxygen on infarct size in the conscious animal. *Eur J Cardiol* 12: 135–146, 1980
- Nogae C, Makino N, Hata T. Interleukin 1-induced expression of manganous SOD reduces myocardial reperfusion injury in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 27: 2091–2100, 1995
- Oberley LW, St.Clair DK, Autor AP, Oberley TD. Increase in manganese superoxide dismutase activity in the mouse heart after X-irradiation. *Arch Biochem Biophys* 254: 69–80, 1987
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid-peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351–358, 1979
- Omar B, McCord J, Downey J. Ischemia-reperfusion injury of heart. In: Sies H ed, *Oxidative Stress*. Academic Press, New York, p493–527, 1991
- Pahl HL, Baeuerle PA. Oxygen and the control of gene expression. *BioEssays* 16: 497–502, 1994
- Park JW, Kim YH, Uhm CS, Bae JM, Park CW, Kim MS. The effect of ischemic preconditioning on the oxygen free radical production in the post-ischemic reperfused heart. *Korean Journal of Pharmacology* 30(3): 321–330, 1994
- Rahman I, Clerch LB, Massaro D. Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. *Am J Physiol* 260: L412–L418, 1991
- Sterling DL, Thornton JD, Swafford A, Gottlieb SF, Bishop SP, Stanley AWH, Downey JM. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo. *Circulation* 88(1): 1931–1936, 1993
- Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-oxygen therapy. *N Engl J Med* 334(25): 1642–1648, 1996
- Trapp WG, Creighton R. Experimental studies of increased atmospheric pressure upon coronary infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 47: 687–692, 1964
- Whalen RE, Saltzman HA. Hyperbaric oxygenation in the treatment of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis* 10: 575–583, 1968
- Wong GHW, Goedde DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: Possible protective mechanism. *Science* 242: 941–944, 1988
- Yellon DM, Latchman DS. Stress proteins and myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol* 24: 113–124, 1992