

온열적용이 대퇴사두근의 허혈-재관류 후 SOD 발현에 미치는 영향

강릉영동대학 물리치료과
최진호
대구대학교 재활과학대학 물리치료학과
김진상

The Effect of Heat Application on Ischemia-Reperfusion Injury to Quadriceps Femoris Muscle of the Rats

Choi, Jin-Ho, P.T., Ph.D.
Department of Physical Therapy, Ganneung Yeongdong College
Kim, Jin-Sang, D.V.M., Ph.D.
Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science Taegu University

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of heat application on ischemia-reperfusion injury to quadriceps femoris muscle of the rats. Nine weeks old male Sprague-Dawley white rats were divided into five groups: 1) control(only reperfusion following ischemia), 2) heat application before reperfusion following ischemia(PreHeat), 3) heat application after reperfusion following ischemia(PostHeat). All groups were 30 minute, 1 hour, 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia with clamping abdominal artery, and investigate superoxide dismutase(SOD) immunohistochemical reactions for quadriceps femoris muscle of the rat.

SOD immunohistochemical reaction of experimental groups were more than the control group.

I. 서론

조직에 혈액공급이 차단되거나 상실되어 갑작스런 허혈이 발생하면, 결과적으로 허혈된 조직의 기능장애와 괴사 등 일련의 병리적인 변화가 일어나기 시작하며, 일정기간의 허혈상태 후 재관류하였을 경우 허혈기간에 발생한 손상보다 조직손상이 더 심하게 일어나는 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)이 발생한다(Haimovici, 1960).

골격근의 허혈-재관류 손상은 혈관의 외상, 근육이식수술, 동맥의 혈전·색전증 또는 동맥의 폐색을 치료하기 위한 사지의 재접합술 및 절단술 등 여러 수술과정 중 발생할 수 있고, 수술 후 골격근에서 발생한 손상에 의해 심부전, 호흡부전 및 신장기능부전 등 치명적인 후유증을 야기할 수 있다(Haimovici, 1979; Wright et al., 1988; Smith et al., 1989b). 이러한 골격근의 손상은 허혈시간이 길수록 증가하고, 허혈 후 재관류로 근육손상이 더욱 심해지며, 재관류시 근육의 원위부가 근위부보다 재관류되는 혈류량이 적어서 근육손상이 상대적으로 적게 나타난다(Blebea et al., 1987). 그리고 허혈 및 재관류에 의해 나타나는 간질조직의 부종과 내피세포의 팽창이 근육의 원위부에서는 동맥의 분포양상에 따라 산소의 공급이 지연됨으로 적게 나타나고, 허혈로 인한 골격근의 손상은 근육의 중심부에서 주로 관찰된다(Labbe et al., 1987). 이러한 허혈-재관류 손상은 산소 유도성 자유기(oxygen derived free radical)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

한편, 심근, 신장, 뇌, 위장 등에서 일어나는 허혈-재관류 손상에 관한 연구들이 이루어져 왔는데(Jolly et al., 1984; Baker et al., 1985; McCord, 1985; Stein et al., 1990), 초산소기(superoxide radical)와 과산화수소(hydrogen peroxide) 및 반응성 수산화물과 같은 산소자유기(oxygen free radical)의 작용으로 나타나는 손상은 항산화효소 또는 항산화물을 투여하여 손상을 감소시킬 수 있다(Rice-Evans & Diplock, 1993). 최근 골격근을 대상으로 허혈-재관류 손상에 대한 연구에서, Woitaske와 McCarter(1998)는 허혈-재관류 손상 후 골격근의 근섬유변화를 관찰하여, 해당성 근섬유(glycolytic muscle fiber)가 산화적 근섬유(oxidative muscle fiber)보다 근수축력이 더 느리게 회복되었고, 구조적으로 붕괴가 더 심하였다고 보고하였다. Libonati 등(1997)은 허혈 전 운동이 허혈 후 재관류로 인한 심근에서 산소자유기의 활동을 감소시켜 허혈-재관류 손상이 감소하였다고 보고하였다.

Natio 등(1999)은 인간의 외측광근(vastus lateralis muscle)에서 표본을 적출하여 42°C 또는 37°C의 항온기(incubator)에 20분간 처리 후 과산화수소에 의한 근육의 산화적 손상(oxidative damage)을 관찰하였는데, 열적용군(42°C 항온기)과 비열적용군(37°C) 모두 근수축력이 유의하게 감소하였지만 비열적용군보다 열적용군에서 사립체의 손상이 적었다고 보고하여, 산화적 손상에서 초기 열적용이 효과가 있다고 보고하였다. Wilson 등(1997)은 토끼의 골격근을 대상으로 열적용에 대한 허혈-재관류 손상을 관찰하였는데, 미약한 체온변화에 따른 근손상에는 유의한 차이가 없었지만, 근육의 온도가 낮으면 허혈-재관류 손상이 감소됨을 보고하였다.

이에 본 연구는 흰쥐 뒷다리 골격근을 대상으로 온열적용이 허혈-재관류 손상에 미치는 영향에 대하여 관찰하고자, 실험동물을 허혈한 다음 재관류 전 또는 후에 온열을 적용하여 자유기 제거효소(free radical scavenging enzyme) 중 하나인 SOD(superoxide dismutase)의 면역조직화학적 반응을 비교 관찰하고, 재관류 경과시간과 각 실험군 간의 골격근의 손상정도를 비교 관찰하고자 시도되었다.

II. 연구방법

1. 실험동물 및 실험기간

본 연구에 이용된 실험동물은 체중 200-250g의 건강한 9주령의 옹성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 실험기간 중 실험동물은 케이지 안에 보온을 위해 깔짚(대패밥)을 깔아주었고, 먹이와 물은 제한없이 공급하였으며 사육실 내 실내온도는 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다.

2. 연구방법

허혈-재관류 손상에 온열적용의 효과를 관찰하기 위해 실험동물은 대조군과 실험군으로 나누었다. 대조군은 실험기간 중 아무런 처치를 하지 않고 허혈 후 재관류만 시행하였고, 실험군은 재관류 전 온열적용군과 재관류 후 온열적용군으로 구분하였다. 모든 대조군과 실험군들은 2시간 허혈한 다음 재관류 후 경과시간에 따라 30분 경과직후, 1시간 경과직후, 3시간 경과직후에 실험동물의 대퇴사두근(quadriceps muscle)을 적출하여 허혈-재관류 손상을 관찰하였다. 대조군과 각 실험군의 실험동물은 무작위로 8마리씩 사용하였다.

모든 실험동물은 케타민과 럼폰을 1대 1로 혼합한 마취제를 몸통에 주사(5-10mg/kg)하여 마취한 다음, 자동털깎기를 이용해 복부와 오른쪽 뒷다리를 1차 삭발한 후 일회용 면도칼로 2차 삭발하였다. 70% 알콜을 이용해 삭발한 복부를 소독한 후 수술용 칼로 정중선 절개로 개복하여 복대동맥(abdominal aorta)에서 총장골동맥(common iliac artery)이 분기하는 지점을 노출하였다. 그리고 흰쥐용 혈관집게(vascular clamp)를 사용하여 총장골동맥 상방 복대동맥을 결찰하여 뒷다리를 허혈하였으며, 허혈 2시간이 경과하면 혈관집게를 제거하여 재관류하였다. 재관류 후 경과시간에 따라 30분, 1시간, 3시간 직후 오른쪽 뒷다리의 대퇴사두근을 적출하여 근육의 중간부위를 시료로 사용하였다.

실험군은 파라핀욕(paraffin bath)을 이용하였는데, 파라핀을 60°C 로 가열하여 재관류 전 또는 재관류 후에 붓을 사용하여 흰쥐 오른쪽 뒷다리에 초막이 $\frac{1}{2}$ -1 인치 정도 형성될 때까지 칠하여 15분간 적용하였다. 파라핀욕의 보온을 유지하기 위해 오른쪽 뒷다리에 적용하는 동안 비닐로 감싸두었다.

3. 조직표본 작성

실험동물에서 시료를 적출하기 전 0.9% 염화나트륨(NaCl)과 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 이용해 관류고정한 후 시료를 적출하였다. 적출된 각 시료는 4% 파라포름알데하이드에 2시간 후고정한 다음, $\times 50\%$, $\times 70\%$, $\times 80\%$, $\times 90\%$, $\times 95\%$, $\times 100\% \text{ I}$, $\times 100\% \text{ II}$ 에탄올(ethanol)에 순서대로 90분씩 탈수(dehydration)를 하였고 xylene으로 투명화한 후 대퇴사두근의 파라핀 블록

(paraffin block)을 제작하였다. 제작된 파라핀 블록은 절편기를 이용해 10 μ m 두께로 횡단면 절편을 만들었고, 그 중 가장 큰 절편을 육안으로 선정하여 10-15개의 조직표본을 만들었다.

4. 조직염색 및 계측

완성된 조직표본은 monoclonal anti-superoxide dismutase 항체(Sigma immunochemicals. No S2147 mouse ascites fluid, Clone SD-G6, Sigma, St Louis, U.S.A.)와 ABC Kit(Vectorstain ABC Kit Vectorlaboratories INC Burlingame U.S.A)를 이용하여 조직내 세포질과 세포외액에 주로 분포하는 것으로 알려진 Cu,Zn-SOD의 분포를 면역조직화학적으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

본 연구에서 검출된 면역조직화학적 반응은 반응정도에 따라 음성반응(-), 미약한 양성반응(\pm), 경도의 양성반응(+), 중등도의 양성반응(++)과 강한 양성반응(+++)으로 구분하였다.

III. 결과

1. 허혈-재관류 후 대조군의 SOD 면역조직화학적 소견

흰쥐의 뒷다리 대퇴사두근을 두시간 동안 허혈-재관류 후 시간 경과에 따른 SOD 면역조직화학적 반응을 관찰한 대조군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군 모두에서 일부 근육세포에서 SOD의 항체에 대한 경미한 면역반응이 관찰되었고, 시간대별로 큰 차이가 없었다.(Table 1, Figure 1a, 1b, 1c).

<Table 1> SOD immunohistochemical reactions on control and experimental groups by reperfusion time.

Times after reperfusion	Control	Intervention	
		PreHeat	PostHeat
30 min	\pm	+	+ \pm
1 hr	\pm -	\pm +	\pm +
3 hrs	\pm -	\pm +	\pm

-: no reaction, \pm : trace reactivity, +: weak reactivity

++: moderate reactivity, +++: strong reactivity

2. 허혈-재관류 직전 온열을 적용시킨 실험군의 SOD 면역조직화학적 소견

흰쥐의 오른쪽 대퇴사두근에 두시간 동안 허혈 후 재관류 직전에 온열을 적용한 실험군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군에서 모두 SOD의 항체에 대한 미약하거나 정도의 양성반응이 관찰되었으며, 대조군 보다 강한 면역반응이 관찰되었으나, 시간대별로는 큰 차이가 없었다(Table 1, Figure 1d, 1e, 1f).

3. 허혈-재관류 직후 온열을 적용시킨 실험군의 SOD 면역조직화학적 소견

흰쥐의 오른쪽 대퇴사두근에 두시간 동안 허혈 후 재관류 직후에 온열을 적용한 실험군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군에서 모두 SOD의 항체에 대한 미약하거나 정도의 양성반응이 관찰되었으며, 재관류 직전 온열을 적용한 군에 비해 큰 차이가 관찰되지 않았으나, 대조군 보다 강한 면역반응이 관찰되었으며, 시간대별로는 큰 차이가 없었다(Table 1, Figure 1g, 1h, 1i).

IV. 고찰

허혈과 저산소증으로 인해 가장 먼저 공격을 받는 부위는 호기성 호흡을 관장하는 사립체(mitochondria)로, 산소의 공급량이 감소하여 세포내 산소분압이 떨어지면 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)가 상실되어 ATP(adenosine triphosphate)의 생산이 점차 감소하거나 중단된다. 세포내 ATP가 감소되고 상대적으로 AMP(adenosine monophosphate)가 증가하면 phosphofructokinase가 활성화되어, 저장되어 있던 당원을 혐기성 해당작용(anaerobic glycolysis)의 증가로 당원으로부터 ATP가 생산되어 세포내 당원이 급속히 소모된다(Cotran et al., 1994). 해당작용이 증가하면 젖산(lactic acid)이 축적되고 phosphate ester가 가수분해(hydrolysis)를 일으켜 무기인(inorganic phosphate)이 증가되어 세포내의 pH 감소를 일으킨다(McGee et al., 1992). 허혈성 손상에서 최초의 영향 중 하나는 급성세포 종창(acute cellular swelling)으로 Na^+ 펌프의 기능장애로 유발되는 원형질막에 의한 세포부피조절의 결함이다. 저산소증으로 인해 ATP와 ATPase의 감소는 능동운반에 장애가 발생하여 Na^+ 이 세포내에 저류되고 K^+ 은 세포밖으로 확산되어 나가 전해질양이 증가하고 세포내 수분이 저류되어 세포종창이 일어나며, 세포내로 수분 및 전해질의 이동으로 내형질세망(endoplasmic reticulum)의 조기확장이 일어난다(Halliwell & Gutteridge, 1999). 그 이후 일어나는 현상은 과립형내형질세망으로부터 리보솜이 탈락(detachment)되고 폴리솜(polysome)이 모노솜(monosome)으로 해리(dissociation)된다. 이것은 내형질세망막과 거기에 부착되어 있는 리보솜 사이의 접착이 끊어지기 때문인 것으로 생각된다. 허혈성 원인이 제거되면 세포는 원상 회복될 수 있는데, 이것을 가역성 손상(reversible injury)이라고 한다. 그러나 허혈이 지속되면 비가역성 손상(irreversible injury)이 일어나는

데, 사립체의 심한 공포(vacuolization)가 생기고, 원형질막의 광범위한 손상 및 리보솜의 증창이 나타난다. 세포사망 이후에 세포성분은 점차 변질되고 세포 내 효소가 세포밖으로 광범위하게 새어나오는 반면, 세포사이에 있는 고분자물질들이 죽은 세포 내로 유입되어 죽은 세포는 인지질 덩어리로 변하게 된다. 이들은 다른 세포에 의해 탐식되거나 지방산에 의해 붕괴되기도 한다. 이 시점에 도달하면 비정상적인 투과성을 가진 세포막을 통해 세포내의 효소가 세포밖으로 새어나와 혈청내로 들어가게 되는데, 이것이 세포사망을 인정하는 중요한 지표이다(McGee et al., 1992; Cotran et al., 1994).

골격근은 혐기성 상태에서도 해당작용이 활발하게 이루어져 ATP의 생산능력이 뛰어나며 ATP와 함께 creatine phosphate와 같은 높은 에너지를 갖는 인산화합물을 다량 함유하고, 허혈상태에 대하여 비교적 강하게 대응할 수 있는 조직으로 알려져 있다(Harris et al., 1986). 이러한 근육의 대사적 특성에도 불구하고, 장기간 허혈상태가 지속되어 근육의 손상이 발생하는 것은 오래 전부터 알려진 사실로 골격근에서 허혈상태가 4시간 지속되면 ATP의 양이 감소하고 근육이 잘 수축되지 못하며, 조직내 물의 양이 증가하고 조직에서 산과다증이 관찰된다(Beyersdorf et al., 1991). 또한 근육의 허혈 이후 재관류하게 되면 산소자유기가 발생하여 내피세포가 손상되고(Idstrom et al., 1990), 불안정한 허혈 상태가 지속되면 재관류에 의한 손상이 더욱 심해진다(Yokota et al., 1989).

한편, 대부분 원자의 전자궤도는 서로 반대방향으로 회전하는 쌍으로 이루어진 전자로 이루어져 있는데, 이로 인해 서로의 물리화학적 반응성이 중화되고 있다. 자유기는 그 외측의 궤도에 쌍을 이루지 않은 1개의 전자만을 가진 화학적인 종속(chemical species)을 말하는 것으로, 매우 반응성이 높고 불안정하여 무기성 또는 유리성 화학물질, 특히 세포막과 핵산내의 중요한 분자들과 반응한다. 자유기와 반응한 분자도 자유기로 변하여 조직에 손상을 주기 때문에 자유기는 자가촉매반응(autocatalytic reaction)을 일으킨다(McGee et al., 1992; Cotran et al., 1994; Halliwell & Gutteridge, 1999).

조직에서 산소자유기와 같은 산화계의 형성과 방어계인 항산화계가 균형을 이루고 있는데, 항산화계에는 SOD, catalase, glutathione peroxidase, ascorbic acid, 비타민 E 등이 있으며, 이들의 균형이 깨어지면 자유산소기에 의해 세포손상이 일어난다(Baud & Ardailou, 1986; Storz & Imlay, 1999). 장기간 허혈상태에서 생긴 독성물질은 재관류에 의해 제거되지만, 재관류로 대사의 장애가 유발되어 산과다증, 고칼슘혈증, 마이오글루빈뇨(myoglobulinuria), 신부전 및 치명적인 부정맥을 일으킬 수 있으며(Haimovici, 1979), 장기간 허혈상태 이후 재관류시 발생한 산소자유기의 작용으로 골격근에서는 세포막과 세포소기관의 파괴, 부종형성, 모세혈관의 허탈 등이 관찰되고, 이런 환자에서 급성신부전, 호흡기능부전 및 패혈증 등이 발생할 가능성이 높아진다(Granger et al., 1986). 급성동맥폐색증으로 색전제거술 등의 방법으로 혈류가 성공적으로 재개되어도 사망률, 이완율 및 사지절단율이 높

아, 재관류 후의 전체사망율은 15-22%, 사지절단율은 3-25%에 이르며, 이것은 허혈-재관류 손상 때문이다(Eriksson & Holmberg, 1977; Cambria & Abbott, 1984; Dale, 1984).

Parks와 Granger(1986)는 3시간동안 허혈상태 후 1시간동안 재관류하였을 경우에 나타나는 조직의 손상이 4시간 동안의 허혈기간 동안 야기되는 손상보다 더 심하였다고 보고하였는데, 허혈 자체가 세포의 손상을 일으키고 세포의 괴사를 초래하지만, 재관류되면서 더 많은 산소분자(molecular oxygen)를 공급하게 되어 대부분의 손상이 허혈기간 보다 재관류 후에 더 심하게 발생한다고 보고하였고(McCord, 1985; Odeh, 1991), Ikezawa 등(1993)의 연구도 이와 유사하였다.

허혈-재관류 손상의 기전에 대해 아직 확실하게 알려져 있지 않지만, 과거에는 비특이성 독소, 혈관운동성아민(vasoactive amine), 젖산 등에 의해 유발된다는 이론이 발표되었으나, 실제 임상치료에서 이러한 이론이 효과적으로 활용되지 못하였고, 최근에는 신장, 심장, 위, 소장, 뇌 및 간 등에서 산소자유기가 허혈-재관류 손상에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Jolly et al., 1984; Baker et al., 1985; McCord, 1985; Stein et al., 1990).

산소자유기의 중요한 생물학적 근원으로 사립체, 활성화된 백혈구, xanthine oxidase, prostaglandin synthetase 등이 있는데(Freeman & Crapo, 1982; van Gilst, 1989), xanthine oxidase가 활성화된 산소 대사물의 일차적 근원으로 제시되고 있다. 이 xanthine oxidase의 90% 이상이 xanthine dehydrogenase 형태로 존재하고 있으며 허혈기간 동안 xanthine oxidase로 전환되고, 간, 뇌, 소장 같은 장기에서는 hypoxanthine-xanthine oxidase가 Haber-Weiss 반응 또는 Fenton 반응을 거쳐서 superoxide anion을 유도하고, 더욱 활동성인 hydroxyl radical을 생성한다(Hammond et al., 1985). Xanthine dehydrogenase가 xanthine으로 전환되는데 소요되는 시간은 장기에 따라 차이가 있는데, 소장조직에서는 10초, 심근에서는 8분, 간, 비장, 신장, 및 폐 등에서는 30분으로 알려져 있다(Hammond et al., 1985; McCord, 1985; Smith et al., 1989a). 이러한 장기들과는 달리 골격근에서는 허혈기간 동안 xanthine dehydrogenase가 산화효소로 거의 전환되지 않아 일반적으로 골격근이 허혈에 잘 견디기 때문에, 골격근에서 일어나는 허혈-재관류 손상에서 산소기(oxygen radical)가 수행하는 역할에 대해서는 확실하지 않으나 재관류동안 세포내 칼슘(cytosolic calcium)이 증가하여 xanthine dehydrogenase에서 xanthine oxidase로 전환하게 한다고 하였다(Walker et al., 1987). 이러한 산소자유기는 정상상태에서도 소량으로 생성되지만, SOD, catalase, glutathione peroxidase와 같은 세포 내 자유기 제거효소들에 의해 효과적으로 제거되고(McCord, 1985; Walker et al., 1987; Korthuis et al., 1988), 이렇게 정상적으로 작용하는 제거계(scavenging system)는 허혈기간이 길어지면서 재관류 후에 형성되는 다량의 산소자유기를 제거하지 못하게 되어 광범위한 조직의 손상이 일어난다(Imlay, 1995; Halliwell & Gutteridge, 1999). 또한, 산소자유기의 작용기전은 허혈이 진행되는

동안 세포막이 형태를 온전하게 유지하지 못하고 Ca^{2+} 와 phospholipase A_2 같은 효소를 활성화시켜 세포막의 파괴를 더 가중시키고 다불포화성 지방산 (polyunsaturated fatty acid)의 생성을 증가시키며, 허혈기간 후 일단 혈류가 재개 되면 지방산자유기(fatty acid radical)가 산소와 쉽게 반응하여 지질과산화물(lipid peroxide)을 생성한다. 다불포화성 지방산도 산소자유기와 반응하여 지질과산화물을 생성하는데, 이러한 연속반응 때문에 세포막이 제기능을 유지하지 못하고 세포괴사가 일어나며, 세포독성 종속(cytotoxic species)은 허혈기간 동안 살아남은 다른 세포를 공격하여 광범위한 골격근의 괴사가 일어난다(Ikezawa et al., 1993; Storz & Imlay, 1999).

온열의 적용으로 허혈-재관류 손상이 감소하는 것은 열충격 단백질(heat shock protein, HSP)의 작용으로 설명할 수 있다. 열충격단백질은 생명체들이 정상적인 범위 이상의 온도 상승에 반응하여 주로 세포질에서 광범위하게 발현되는 일군의 단백질이다(Lindquist, 1986; Bienz & Pelham, 1987). 그 중 특히 열충격단백질 70(HSP70)은 온도변화에 가장 민감하게 반응하는 열충격단백질로 세포가 온도상승의 조건에 처했을 때 수 분 이내에 세포내에서 합성되고, 세포에 스트레스가 주어졌을 때 세포를 보호하고 세포의 생존력을 증가시켜 주는 물질이다(Laudry et al., 1982).

또한, 열충격단백질은 열충격인자(heat shock factor)에 의해 발현된다. 열충격을 받지 않을 때 열충격인자는 세포질과 핵내에 단량체 형태로 존재하는데, 이때에는 DNA와 결합하지 않고 열충격인자와 1대 1로 결합하고 있다. 그러나 온열이 적용되면, 열충격인자는 열충격단백질에서 떨어져 나와 삼합체로 뭉쳐 핵내로 이동하고, 핵내로 이동한 열충격인자는 열충격유전자촉진제(heat shock gene promotor) 내에 위치한 특이한 DNA 인지 부위인 열충격요소(heat shock element)에 결합하고 인산화되면서 활성화된다. 열충격 유전자의 전사활성(transcriptional activation)은 열충격단백질의 발현을 증가시켜 열충격인자와 열충격단백질의 복합체 형성을 증가시키고 이로 인해 열충격인자는 DNA에서 떨어지고 단량체 상태로 되돌아오게 된다(Morimoto & Richard, 1993).

열충격단백질70의 중요한 기능은 변성된 효소 단백질과 결합하여 세포손상을 최소화하고 세포막을 통한 단백질의 이동이나 단백질의 합성과 같은 세포내 항상성을 유지하는데 기여한다(Moseley, 1998). 그리고 Polla 등(1996)은 열충격을 적용한 세포는 과산화수소에 의한 사립체의 막변화와 돌기(cristase)의 형성을 감소시켜, 조직손상의 감소와 열충격단백질70의 발현과 상관관계가 있다고 보고하였다.

골격근의 허혈-재관류 손상은 산화제(oxidant)의 생성, 염증전구매개체(proinflammatory mediator)의 생성, 백혈구의 침윤, Ca^{2+} 의 과부하, 인지질의 과산화와 고갈 및 ATP 생성의 감소와 같은 복합적인 요인에 의해 발생한다(Rubin et al., 1996).

Fish 등(1989)은 쥐의 뒷다리를 대상으로 허혈시간을 1시간, 2시간, 3시간, 4시간

으로 구분한 다음, 재관류하여 2주 후에 비복근의 등척성 수축력을 측정하였는데, 허혈시간이 길수록 골격근의 수축력이 감소한다고 보고하였다.

Wilson 등(1997)은 토끼의 대퇴직근(rectus femoris muscle)을 대상으로 4시간 허혈 후 재관류하여 허혈-재관류 손상을 연구하였는데, 실험동물은 허혈기간동안 핵심온도(core temperature)를 36~38℃로 유지한 집단, 핵심온도를 31.5-33.5℃의 가벼운 저체온증이 되도록 유지한 집단 및 단지 근육의 온도를 29.5-31.5℃로 유지한 집단 등 3집단으로 구분하여, 허혈 후 24시간 재관류하여 근육의 생존력(muscle viability)을 검사하였다. 그 결과, 근육의 생존력은 단지 근육의 온도를 29.5-31.5℃로 유지한 집단이 가장 높았고, 핵심온도가 낮을수록 근육의 생존력이 높게 나타났다고 보고하였다.

허혈로 인한 골격근의 손상은 크게 두 단계로 나누는데, 허혈동안 이온평형과 항상성(homeostasis)을 유지하기 위해 세포는 무산소 대사과정을 통해 에너지를 이용하고, 효소체계에 손상으로 세포는 사망하게 된다. 재관류 동안 자유기의 생성, 화학반응물질(chemoreactant substance)의 유리(release), 그리고 백혈구들의 유착이 증가하여 조직을 손상시킨다. Hydroxyl radical이 세포손상에 가장 큰 영향을 미치는 자유기로 지방과산화(lipid peroxidation)를 일으킨다(Chabel et al., 1990).

본 연구는 골격근의 허혈-재관류 손상에서 온열적용의 효과를 관찰하기 위해 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하여 대조군과 실험군으로 나누어 총장골동맥 기시부 상방 복대동맥을 2시간 결찰한 다음 재관류하여 재관류 후 30분 경과시, 1시간 경과시, 3시간 경과시에 흰쥐 오른쪽 뒷다리의 대퇴사두근을 적출하여 SOD 면역조직화학적 반응의 변화를 비교 관찰하였다. 재관류 후 경과시간대별 SOD 면역조직화학적 반응을 관찰한 결과, 대조군보다 실험군에서 SOD 면역조직화학적 반응이 높게 관찰되었으나, 재관류 직전과 재관류 직후에는 큰 차이가 없었으며, 시간대별에도 큰 차이가 관찰되지 않았다. 그러므로 초기 열적용이 허혈-재관류 손상에 효과적이라고 주장한 Natio 등(1999)의 연구결과와 유사하며, 온열적용이 허혈-재관류 손상을 감소시키는데 효과적인 것으로 관찰되었다.

V. 결론

대퇴사두근의 허혈-재관류 손상에서 온열적용의 효과를 관찰하기 위해 실험동물로 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였고, 실험동물을 대조군과 실험군으로 나누었다. 대조군은 허혈-재관류군으로 실험기간 중 아무런 처치를 하지 않았고 허혈 후 재관류만 시행하였으며, 실험군은 재관류 전 온열적용군과 재관류 후 온열적용군으로 세분하였다.

대조군과 실험군은 총장골동맥 기시부 상방 복대동맥을 2시간 결찰 후 재관류하였다. 재관류 후 30분 경과시, 1시간 경과시, 3시간 경과시에 흰 쥐 오른쪽 뒷다

리의 대퇴사두근을 적출하여 SOD 면역조직화학적 반응의 변화를 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 흰쥐의 뒷다리 대퇴사두근을 두시간 동안 허혈-재관류 후 시간 경과에 따른 SOD 면역조직화학적 반응을 관찰한 대조군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군 모두에서 일부 근육세포에서 SOD의 항체에 대한 경미한 면역반응이 관찰되었고, 시간대별로 큰 차이가 없었다.

2. 흰쥐의 오른쪽 대퇴사두근에 두시간 동안 허혈 후 재관류 직전에 온열을 적용한 실험군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군에서 모두 SOD의 항체에 대한 미약하거나 정도의 양성반응이 관찰되었으며, 대조군 보다 강한 면역반응이 관찰되었으나, 시간대별로는 큰 차이가 없었다.

3. 흰쥐의 오른쪽 대퇴사두근에 두시간 동안 허혈 후 재관류 직후에 온열을 적용한 실험군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군에서 모두 SOD의 항체에 대한 미약하거나 정도의 양성반응이 관찰되었으며, 재관류 직전 온열을 적용한 군에 비해 큰 차이가 관찰되지 않았으나, 대조군 보다 강한 면역반응이 관찰되었으며, 시간대별로는 큰 차이가 없었다.

참고문헌

- Baker G, Corry R, Autour A : Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion, *Ann Surg*, 202, 628-633, 1985.
- Baud L, Ardailou R : Reactive oxygen species: Production and role in the kidney, *Am J Physiol*, 251, 765-776, 1986.
- Beyersdorf F, Unger A, Wildhirt A, et al : Studies of reperfusion injury in skeletal muscle: Preserved cellular viability after extended periods of warm ischemia, *J Cardiovasc Surg*, 32, 664-676, 1991.
- Bienz M, Pelham HR : Mechanisms of heat-shock gene activation in higher eukaryotes, *Adv Genet*, 24, 31-72, 1987.
- Blebea J, Kerr JC, Hobson RW, et al : The effects of oxygen free radical scavengers on skeletal muscle ischemia and reperfusion injury, *Curr Surg*, 44, 396-398, 1987.
- Cambria R, Abbott W : Acute arterial thrombosis of the lower extremity, *Arch Surg*, 119, 784-789, 1984.
- Chabel C, Russel LC, Lee R : Tourniquet-induced limb ischemia: neurophysiologic animal model, *Anesthesiology*, 72, 1038-1044, 1990.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL : Robbins pathologic basis of disease. 5th ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company., 1994.
- Dale WA : Differential management of acute peripheral arterial ischemia, *Vas*

- Surg, 5, 901-903 1984.
- Eriksson H, Holmberg JT : Analysis of factors affecting limb salvage and mortality after embolectomy, *Acta Chir Scand*, 143, 237-240, 1977.
- Fish JS, McKee NH, Pynn BR, et al : Isometric contractile function recovery following tourniquet ischemia, *J Surg Res*, 47(4), 365-370, 1989.
- Freemann BA, Crapo JD : Biology disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47, 412-426, 1982.
- Granger DN, McCord JM, Parks, DA et al : Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine, *Gastroenterol*, 90, 80-84, 1986.
- Haimovici H : Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria: Evaluation of a hitherto nureported syndrome with report of two cases, *Surgery*, 47, 739-747, 1960.
- Haimovici H : Metabolic complication of acute arterial occlusions, *J Cardiovasc Surg*, 20, 349-355, 1979.
- Halliwell B, Gutteridge JMC : *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed, Oxford: Oxford University Press, 1999.
- Hammond B, Kontos HA, Hess ML, et al : Oxygen radicals in the adult respiratory distress syndrome, in myocardial ischemia and reperfusion injury, and in cerebral vascular damage, *J Physiol Pharmacol*, 63, 173-187, 1995.
- Harris K., Walker PM, Mickle DAG, et al : Metabolic response of skeletal muscle to ischemia, *Am J Physiol*, 250, 213-220, 1986.
- Idstrom JP, Soussi B, Elander A, et al : Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle, *Am J Physiol*, 258, 1668-1673, 1990.
- Ikezawa T, Nishikimi N, Oba Y : Lipid peroxides in the mechanism of ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle experimental studies, *Vasc Surg*, 27, 191-201, 1993.
- Imlay J : A metabolic enzyme that rapidly produces superoxide, fumarate reductase of *Escherichia coli*, *J Biol Chem*, 270, 19767-19777, 1995.
- Jolly S, Kane J, Baillie G, et al : Canine myocardial reperfusion injury: its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase, *Circulation*, 54, 277-285, 1984.
- Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN : Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle, *Am J Physiol*, 254, 823-827, 1988.
- Labbe R, Cindsay T, Walker PM : The extent and distribution of skeletal

- muscle necrosis after graded periods of complete ischemia, *J Vasc Surg*, 6, 152-157, 1987.
- Landry J, Bernier D, Chretien P, et al : Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance, *Cancer Res*, 42(6), 2357-2361, 1982.
- Libonati JR, Gaughan JP, Hefner CA, et al : Reduced ischemia and reperfusion injury following exercise training, *Med Sci Sports Exerc*, 29(4), 509-516, 1997.
- Lindquist S : The heat-shock response, *Annu Rev Biochem*, 55, 1151-1191, 1986.
- McCord JM : Oxygen-derived free radical in postischemic tissue injury, *N Engl J Med*, 312, 159-163, 1985.
- McGee JO, Isaacson PG, Wright NA : Oxford textbook of pathology. vol 1. Principles of pathology, Oxford: Oxford University Press, 1992.
- Morimoto RI, Richard I : Cell in stress: Transcriptional activation of heat shock genes. *Advancement of Science*, 259, 1409-1410, 1992.
- Moseley PL : Heat shock proteins and the inflammatory response, *Ann N Y Acad Sci*, 856, 206-213, 1998.
- Natio J, Hartung E, Schramm E, et al : Heat stress produces an early of protection against oxidative damage in human muscle, *Acta Anaesthesiol Scand*, 43(1), 77-81, 1999.
- Odeh M : The role of reperfusion-induced injury in the the pathogenesis of crush syndrome, *N Engl J Med*, 324, 1417-1422, 1991.
- Parks DA, Granger DN : Contribution of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation, *Am J Physiol*, 250, 749-754, 1986.
- Polla BS, Kantengwa S, Francois D, et al : Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury, *Proc Natl Acad Sci*, 93(13), 6458-6463, 1996.
- Rice-Evans CA, Diplock AT : Current status of antioxidant therapy, *Free Radic Biol Med*, 15, 77-96, 1993.
- Rubin BB, Romaschin A, Walker PM, et al : Mechanisms of postischemic injury in skeletal muscle: intervention strategies, *J Appl Physiol*, 80(2), 369-387, 1996.
- Smith JK, Carden DL, Korthuis RJ : Role of xanthine oxidase in postischemic microvascular injury in skeletal muscle, *Am J Physiol*, 257, 1782-1789, 1989a.
- Smith JK, Carden DL, Grisham MB, et al : Role of iron in postischemic microvascular injury, *Am J Physiol*, 256, 1472-1477, 1989.

- Stein HJ, Hinden RA, Osthuizen MMJ : Gastric mucosal injury caused by hemorrhage shock and reperfusion: Protective role of the antioxidant glutathione, *Surgery*, 108, 468-474, 1990.
- Storz G, Imlay JA : Oxidative Stress. *Current Opin in Microbiology*, 2, 188-194, 1990.
- van Gilst WH : Protection of the myocardium against postischemic reperfusion damage, *J Cardiovascular Pharmacol*, 14(9), S49-S54, 1989.
- Walker M, Lindsay TF, Labbe R : Salvage of skeletal muscle with free radical scavengers, *J Vasc Surg*, 5, 68-75, 1987.
- Wilson YT, Lepore DA, Riccio M, et al : Mild hypothermia protects ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle, *Br J Plast Surg*, 50(5), 343-348, 1997.
- Woitasko MD, McCarter RJ : Effects of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle, *Plast Reconstr Surg*, 102(6), 2052-2063, 1998.
- Wright JG, Kerr JC, Valeri CR, et al : Regional hypothermia protects against ischemia-reperfusion injury in isolated canine gracilis muscle, *J Trauma*, 28(7), 1026-1031, 1988.
- Yokota J, Minei P, Fantini GA, et al : Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia, *Am J Physiol*, 257, 1068-1075, 1989.

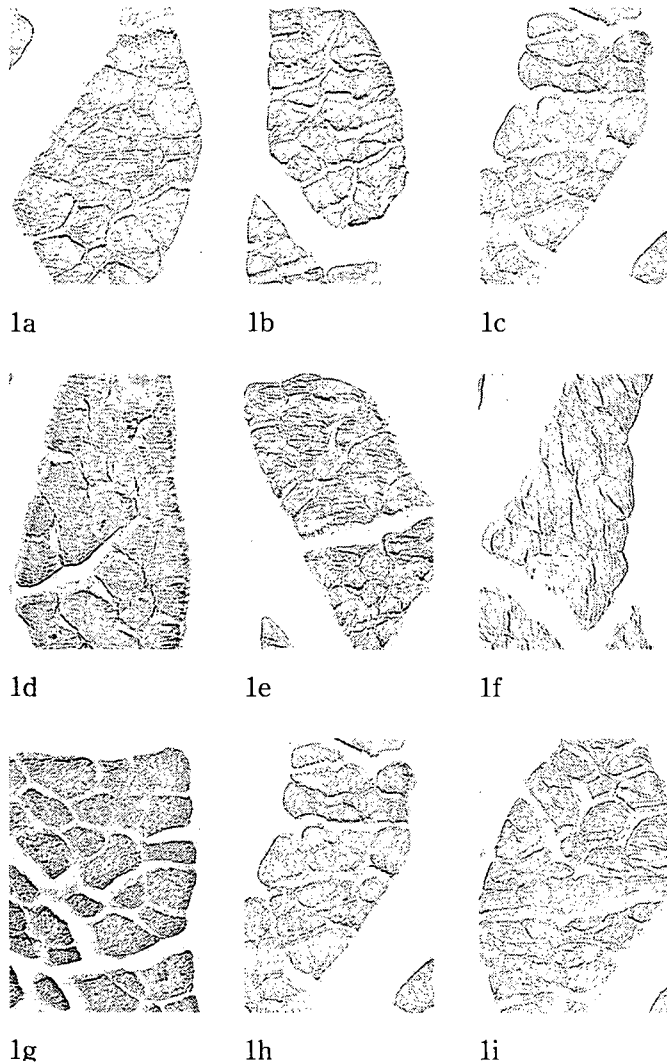


Fig 1. Superoxide dismutase(SOD) immunohistochemical reaction on the quadriceps femoris muscle in control and experimental group $\times 40$

- 1a : control rat : 30 minutes reperfusion after 2 hours ischemia
- 1b : control rat : 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia
- 1c : control rat : 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia
- 1d : preheat rat : 30 minutes reperfusion after 2 hours ischemia
- 1e : preheat rat : 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia
- 1f : preheat rat : 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia
- 1g : postheat rat : 30 minutes reperfusion after 2 hours ischemia
- 1h : postheat rat : 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia
- 1i : postheat rat : 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia