

백서 복직근관의 허혈-재관류 손상에 대한 Erythropoietin의 영향

김은기 · 홍준표

울산대학교 의과대학 서울아산병원 성형외과학교실

The Effect of Erythropoietin on Ischemia-Reperfusion Injury: An Experimental Study in Rat TRAM Flap Model

Eun Key Kim, M.D., Joon Pio Hong, M.D.

Department of Plastic Surgery, Asan Medical Center,
University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Erythropoietin is traditionally known to regulate erythropoiesis, but recently its protective effect against ischemia-reperfusion injury has been studied mainly in cardiovascular and neuronal systems. This study was planned to investigate the effects of recombinant human erythropoietin on ischemia-reperfusion injury in rat TRAM flap model.

Methods: Superiorly based TRAM flap was elevated and ischemic insult was given for four hours. Thirty minutes before reperfusion, single dose recombinant human Erythropoietin(5000 IU/kg) was injected via intraperitoneal route in the treatment group. At 24 hours postoperatively, systemic neutrophil count, tissue myeloperoxidase activity, malonyldialdehyde amount, nitric oxide content, tissue water content and histologic finding of inflammation was evaluated. On 10 days postoperatively, flap survival rate, angiogenesis and change in hematocrit level was evaluated.

Results: Tissue nitric oxide level was significantly higher and myeloperoxidase activity was significantly lower in the treatment group 24 hours after reperfusion. Tissue water content was significantly lower in the treatment group. Perivascular neutrophil infiltration and intravascular adhesion was marked in the control group. Mean flap survival after ten days was 69% in the treatment group, and 47% in the control group, demonstrating a significant difference. Neovascularization in the treatment group also outnumbered the control group.

Received April 3, 2006

Revised June 29, 2006

Address Correspondence: Joon Pio Hong, M.D., Department of Plastic Surgery, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, 388-1 Poongnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea. Tel: 02) 3010-3600 / Fax: 02) 476-7471 / E-mail: joonphong@amc.seoul.kr

No significant hematocrit rise was noted ten days after erythropoietin administration.

Conclusion: Recombinant human Erythropoietin improved flap survival in ischemia-reperfusion injured rat TRAM flaps, at least partially owing to suppressed inflammation, increased nitric oxide, and enhanced angiogenesis.

Key Words: Erythropoietin, Ischemia-reperfusion, Flap survival, Angiogenesis

I. 서 론

Erythropoietin은 성인 신장에서 주로 생산되는 호르몬으로, 전통적으로 적혈구 조혈인자로 알려져 왔다. 그러나 erythropoietin 수용체가 조혈기관 이외의 장기에도 널리 존재한다는 사실이 밝혀지며 주로 심혈관계와 신경계에서 erythropoietin의 보호 효과가 집중적으로 연구되었다.¹ 동물실험에서 재조합 인간 erythropoietin은 *in vitro*와 *in vivo* 모두에서 허혈-재관류 손상을 받은 심근 경색을 줄이고 심실기능을 개선하는 일관적인 결과를 보였다.^{2,4} 심근과 뇌 이외에도 척수, 망막, 소장, 간, 신장 등 여러 장기의 동물모델에서 단일 용량의 erythropoietin이 허혈-재관류 손상으로부터 조직을 보호하고 경색의 양을 줄인다는 결과가 보고되었다.⁵ 창상치유와 관련해서는, Haroon 등⁶은 동물모델에서 국소 주입한 erythropoietin이 혈관신생을 촉진하였으며 육아조직 형성을 촉진하였다고 발표하였고, Saray 등⁷은 백서의 임의 피부판 모델에 대한 상반된 효과를 보였는데, 단기간(7일)의 투여는 피부판의 생존을 증가시켰으나, 고용량으로 장기간(3주) 투여한 경우 피부판의 생존이 오히려 감소하였다고 보고하였다. 그러나 이제까지 허혈-재관류 손상을 받은 근피판 모델에서 erythropoietin의 효과에 대한 연구는 없었다.

저자들은 백서 복직근관 모델에서 단일 용량 재조합 인간 erythropoietin의 피부판 생존에 대한 효과와 허혈-재관류 손상에 있어서의 보호 효과에 대해 알아보기 위하여 본 실험을 계획하였다.

II. 재료 및 방법

가. 실험동물 및 실험방법

실험동물로는 체중 170-220g의 수컷 Sprague-Dawley rat 24마리를 사료 및 생활조건을 1주간 일정하게 한 후 사용하였다. 각 실험동물은 처치군과 대조군 각 12마리씩 2군으로 나누었다. 각 군에서 ketamine(Ketalar, 유한양행) 80 mg/kg을 근주하여 전신마취한 후 복부의 털을 제거하고 가급적 무균적 조건 하에서 시행하였다. 피판은 검상돌기에서 1 cm 하부를 상연으로 하는 5 × 4 cm 크기의 복직근판으로 도안하였으며, 좌측 상복벽혈관을 피판경으로 하는 단일 유경피판으로 거상하고 동측 하복벽혈관은 결찰하여 절단하였다. 상복벽혈관을 검상돌기 직상부에서 근육으로부터 박리하였다(Fig. 1).

박리한 상복벽혈관에 미세문합용 혈관 겸자를 이용하여 4시간동안 허혈을 유도하였다. 재관류 30분 전, 처치군(n=12)에 recombinant human Erythropoietin(Epokine pre-filled inj. CJ제약) 5000 IU/kg을 생리식염수와 혼합하여 총 용적 1 mL을 복강내로 주입하였으며, 대조군(n=12)에서는 1 mL의 생리식염수만을 주입하였다. 재관류시에는 결찰한 하복벽혈관의 말단을 절제하여 출혈을 확인하였다. 피판을 봉합함에 있어 피판 바닥으로부터의 혈관의 재형성을 막기 위한 처치는 고려하지 않았다. 복직근의 하단을 분리한 곳에 4-0 vicryl로 봉합하였으며 피부판의 변연은 5-0 nylon으로 연속봉합하였다. 수술 직후 Gentamycin(젠타마이신, 대성미생물연구소) 4 mg/kg을 일회 근주하였다.

모든 실험동물은 실험기간 중 특별한 문제가 없이 생존하여 도중에 제외된 동물은 없었다.

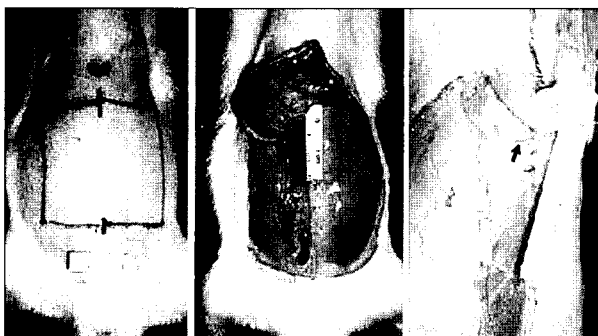


Fig. 1. (Left) 5 × 4 cm sized TRAM flap was designed with the superior margin 1 cm below the xiphoid process. (Center) The flap was elevated based on the superior epigastric artery. (Right) Isolated pedicle(arrow) was clamped with microvascular clamp for 4 hours.

나. 혈색소 수치의 측정

실험에 사용하지 않은 6마리 백서에 대하여 꼬리 동맥에서 채혈하여 혈액 가스 분석기를 이용하여 혈색소 수치를 구하였다. 재관류 24시간 후 실험에 사용된 모든 백서에 대하여 같은 방법으로 혈색소 수치를 측정하였다. 이후 재관류 10일째 같은 동물들에서 다시 혈색소 수치를 구하여 각 동물에서 혈색소의 변화량을 구하였다.

다. 중성구 수치의 측정

실험에 사용된 모든 백서에서 재관류 24시간 후 꼬리동맥에서 채혈하여 항응고 처리하지 않은 신선한 혈액을 슬라이드 유리에 도말하여 Wright-Giemsa 염색하고 200배 시야에서 각 도말표본 당 5개의 필드를 관찰하여 중성구 개수의 평균치를 구하여 이를 1000배 하여 말초혈액 중 중성구 수치를 추정하였다.

라. 조직 내 myeloperoxidase 활성

재관류 24시간 후 각 실험군에서 6마리씩의 동물을 안락사시켜 각 동물의 근육 원위부와 피사되지 않은 피부판 원위부에서 약 100 mg 정도의 조직을 한 개씩 취하여 조직의 myeloperoxidase 활성을 구하였다. 약 100 mg의 신선 동결조직을 1.5 mL의 50 mM/L potassium phosphate buffer 용액에 균질화하고 1 mL를 취하여 10000 × g에서 10분간 원심분리하여 침전을 0.5% hexadecyl-trimethylammonium bromide(Sigma)를 포함하는 1 ml의 potassium phosphate buffer에 재부유하였다. 3차례 동결-해동하고 0도에서 10초간 sonicate한 후 12000 × g에서 10분간 원심분리하여 상층액에서 myeloperoxidase 활성을 측정하였다. 상층액 0.1 mL를 기질로서 0.19 mg/mL의 o-dianisidine chloride와 0.0005% H₂O₂를 포함하는 2.9 mL potassium phosphate buffer와 혼합하여 2분간 460 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 용액으로는 과량의 H₂O₂를 포함하는 o-dianisidine을 이용하였다. Myeloperoxidase 활성의 1 표준단위는 섭씨 25도에서 1 μM의 H₂O₂를 분해하는데 필요한 양으로 정의하였다. 조직의 단백질 함유량을 Bradford 법⁸을 이용하여 측정하여 중성구 침윤 지표로서 효소의 활성을 단백질 1 mg당 μM/min으로 나타내었다.

마. 조직 내 malonyldialdehyde의 정량화

재관류 24시간 후 앞의 실험에서 안락사시킨 각 동물 근육과 피부판 원위부에서 약 100 mg의 조직 한 개씩을 취하여 조직 내 malonyldialdehyde의 양을 구하였다. 약 100 mg의 조직을 1 mL의 180 mM/L KCl과 10 mM/L EDTA를 포함하는 50 mM/L Tris-HCl buffer와 혼합하여 균질화하였다. 이 용액 0.5 mL에 0.5 ml의 1% thiobarbituric acid

를 혼합하여 10분간 중탕하였다. 혼합액을 식힌 후 3 ml의 butanol을 가하고 2000 × g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다. 표준 용액은 1,1,3,3-tetramethoxypropane(Sigma)을 이용하였다. 조직의 단백질 함유량을 Bradford 법⁸을 이용하여 측정하였다. 조직내 과산화 지질 지표로서 malonyldialdehyde의 양을 단백질 1 mg당 thiobarbituric acid-reactive substance(MDA equivalent) nM로 나타내었다.

바. 조직내 일산화질소의 정량화

재관류 24시간 후 전과 동일한 각 동물 피부관 원위부에서 약 100 mg의 조직 한 개씩을 취하여 조직내 nitric oxide를 정량하였다. 우선 nitrate reductase를 이용하여 조직내의 nitrate를 nitrite로 환원하였다. 이를 위하여 세포 용해액 300 μl를 10 μl의 nitrate reductase 용액(0.1 U/mL nitrate reductase from *Aspergillus Niger*, 5 mM FAD, 30 mM NADPH)과 혼합하고 15분간 섭씨 37도에서 배양하였다. 혼합액에 10 μl의 lactate dehydrogenase 용액(Sigma)을 가하여 5분간 배양하여 NADPH를 산화시켰다. 이후 cadmium-based Griess reagent kit(Oxford Biomedical Research)을 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 진행하였다. 일산화질소의 양은 조직 1 mg당 μM 단위로 나타내었다.

사. 조직 함수율의 측정

재관류 24시간 후 전과 동일한 각 동물의 근육 원위부와 피사되지 않은 피부관 원위부에서 한 개씩의 조직을 취하여 각 조직의 총 중량을 측정하고 동결 건조기를 이용하여 함수율 0.5% 미만이 되도록 48시간 동안 건조하였다. 이후(총 중량-건조중량)/총중량을 구하여 조직 내 함수율(%)로 하였다.

아. 조직표본의 염증반응 관찰

재관류 24시간 후 전과 동일한 각 동물의 근육과 피부관 원위부에서 한 개씩의 조직을 취하여 파라핀 포매하고 Hematoxylin-eosin 염색하여 조직 내 중성구의 침윤과 조직 부종을 관찰하였다.

자. 피부관 생존률

재관류 10일째 피부관의 생존 면적을 측정하였다. 피부관의 생존 여부는 색과 가피의 형성, 출혈을 근거로 판단하였다. 생존 부분을 투명한 종이에 투사하여 스캔하였다. 스캔한 부분의 면적은 ImageTool[®](ver 3.00, University of Texas Health Science Center at San Antonio)을 이용하여 구하였다. 이를 최초의 전체 면적인 20 cm²로 나누어 생존

면적의 백분율을 구하였다.

차. 조직표본의 혈관신생 정량화

재관류 10일째 피부관 생존률을 측정한 동물을 안락사시켜 각 동물의 피사되지 않은 피부관 원위부에서 한 개씩의 조직을 취하여 파라핀 포매하고 Hematoxylin-eosin 염색을 하여 조직 내 혈관 신생을 관찰하였다. 혈관 개수의 정량적 비교를 위하여 각 피부관 표본에서 6곳을 임의로 취하여 200배 시야에서 구별되는 내강의 숫자를 세어 평균치를 구하여 미세혈관 밀도=200배 시야당 혈관 내강의 개수로 나타내었다.

카. 통계적 검증

수치화된 자료에 대하여 결과를 평균 ± 표준편차로 나타내었고, 처치군과 대조군간의 차이를 paired t-test를 이용하여 통계적으로 검증하여 *p*값이 0.05보다 작은 경우 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다. 재관류 24시간째 조직 표본에서 관찰한 염증반응에 대해서는 통계적 처리를 시행하지 않았다.

III. 결 과

가. 혈색소의 변화

Erythropoietin 처치군에서 혈색소는 평균 2.4 ± 0.59 감소하였으며, 대조군에서는 2.9 ± 1.1 감소하였다. 처치군과 대조군간에 통계적으로 유의한 차이가 존재하지 않았다 ($p=0.207$)(Table I).

나. 말초혈액 중 중성구 수치

아무 처치도 하지 않은 동물 6마리의 평균 중성구 수치는 $4100 \pm 870/\mu\text{l}$ 이었다. 처치군에서는 $25300 \pm 1300/\mu\text{l}$ 이었으며, 대조군에서는 $23600 \pm 1840/\mu\text{l}$ 으로 처치군과 대조군간에 통계적으로 유의한 차이가 존재하지 않았다 ($p=0.515$).

다. Myeloperoxidase 활성

조직 내 myeloperoxidase 활성의 평균치는 처치군에서 $0.039 \pm 0.015 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$, 대조군에서는 $0.090 \pm 0.025 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg protein}$ 으로 통계적으로 유의한 차이가 존재하였다($p < 0.01$).

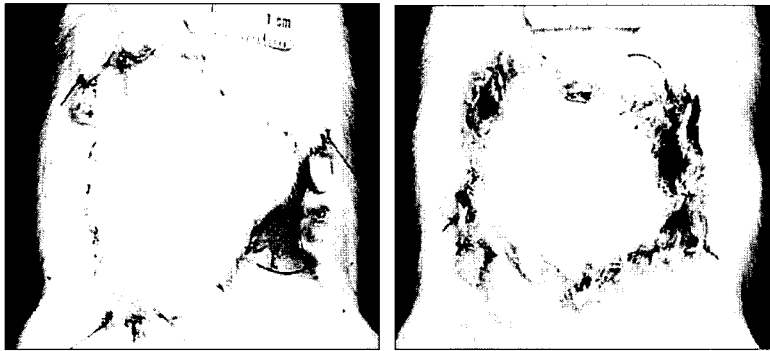
라. Malonyldialdehyde 정량

조직 내 malonyldialdehyde 수치의 평균은 처치군에서 $0.749 \pm 0.144 \text{ nM}/\text{mg protein}$, 대조군에서 $1.071 \pm 0.258 \text{ nM}/\text{mg protein}$ 으로 처치군에서 낮았으나, 통계적으로 유

Table 1. Results Comparing Erythropoietin-treated Group and the Control Group

Measurement (unit)	Treatment group	Control group	p value
Hemoglobin decrease	2.4 ± 0.59	2.9 ± 1.1	0.207
Neutrophil count (/μl)	25,300 ± 1,300	23,600 ± 1,840	0.515
Myeloperoxidase activity (μM/min/mg protein)	0.039 ± 0.015	0.090 ± 0.025	< 0.01*
Malonyldialdehyde (nM/mg protein)	0.749 ± 0.144	1.071 ± 0.258	0.08
Nitric oxide (μM/mg tissue)	42.9 ± 6.37	28.3 ± 1.86	< 0.05*
Tissue water content (%)	67 ± 6.2 (skin) 74 ± 2.8 (muscle)	82 ± 2.9 (skin) 84 ± 4.0 (muscle)	< 0.001* < 0.001*
Flap survival rate (%)	69.2 ± 9.5	46.8 ± 8.2	< 0.01*
Microvessel density (/× 200 field)	37.0 ± 5.7	20.4 ± 5.9	< 0.05*

*statistically significant difference

**Fig. 2.** Gross appearance of flaps in each group at 10 days after reperfusion. (Left) Erythropoietin-treated group. (Right) control group.

의하지 않았다($p=0.08$).

마. 일산화질소 정량

피부판에서의 일산화질소 수치와 평균은 처치군에서는 $42.9 \pm 6.37 \mu\text{M/mg tissue}$, 대조군에서는 $28.3 \pm 1.86 \mu\text{M/mg tissue}$ 로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이가 존재하였다($p < 0.05$).

바. 조직 함수율

피부판과 근육에서의 조직 함수율을 각각 구하여 비교하였다. 피부판의 함수율은 처치군에서 $67 \pm 6.2\%$, 대조군에서 $82 \pm 2.9\%$ 로 통계적으로 유의한 차이가 존재하였다($p < 0.001$). 근육 함수율은 처치군에서 $74 \pm 2.8\%$, 대조군에서 $84 \pm 4.0\%$ 로 통계적으로 유의한 차이가 존재하였다($p < 0.001$).

사. 피판 생존률

처치군에서 피판의 평균 생존률은 $69.2 \pm 9.5\%$ 로 대부분의 동물에서 구역 4의 원위부와 구역 2의 일부가 괴사되었다. 대조군에서 피판의 평균 생존률은 $46.8 \pm 8.2\%$ 로 모

든 경우 구역 4의 거의 전체와 구역 2, 구역 3의 일부가 괴사되었다. 처치군과 대조군의 피판 생존률 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 존재하였다($p < 0.01$)(Fig. 2).

아. 조직병리학적 소견 및 미세 혈관 밀도

재관류 24시간째 대조군에서는 중성구의 혈관벽 유착과 혈관주의 침윤이 현저하였다. Erythropoietin 처치군에서는 이러한 소견이 덜 뚜렷하였으나 정량적인 분석은 시행하지 않았다(Fig. 3). 재관류 10일째 200배 시야에서 관찰하여 구한 미세혈관 밀도의 평균값은 처치군에서 $37.0 \pm 5.7/\text{field}$, 대조군에서 $20.4 \pm 5.9/\text{field}$ 로 유의한 차이가 존재하였다($p < 0.05$)(Fig. 4).

IV. 고 찰

Erythropoietin은 여러 장기의 허혈-재관류 손상에 대하여 세포, 조직 및 장기 수준에서 보호 효과를 가짐이 보고되어 왔다.^{5,9} Erythropoietin의 이러한 효과는 여러 하위 신호전달 경로를 통하는 것으로 생각되며, p38, p42/44 MAP kinase, JAK1/2, STAT3, STAT 5A, MEK1/2 및

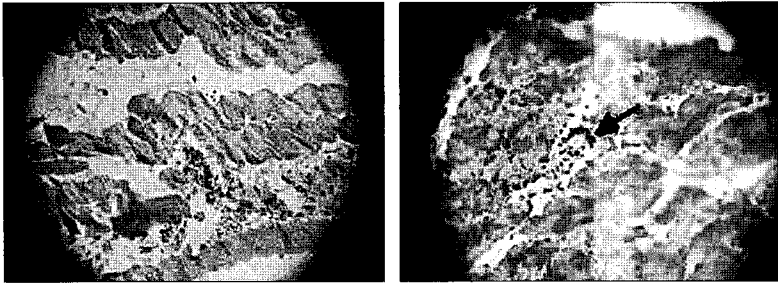


Fig. 3. Microscopic findings at 24 hours after reperfusion. (Left) Erythropoietin-treated group. (Right) Control group. Intravascular adhesion (arrow) and perivascular infiltration of neutrophils are noted (Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$).

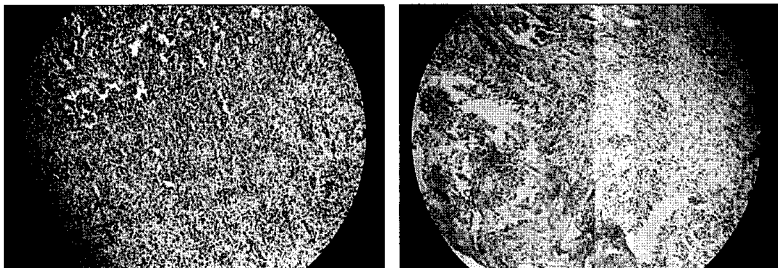


Fig. 4. Microscopic findings at 10 days after reperfusion. (Left) Erythropoietin-treated group. At the tip of the survived skin, granulation tissue formation was noted and dense population of fibroblast and crowded neovessel formation was observed. (Right) Control group. Fibroblast population is less dense and neovessel density is significantly lower (Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$).

PKC ϵ 경로와 phosphatidylinositol-3-kinase 경로, 세포질 내의 KATP channel 및 미토콘드리아 내 KCa channel 등이 관여하는 것으로 보고되었다.² 한편 산소 분압에 따른 erythropoietin 발현의 조절은 hypoxia-inducible transcription factor(HIF-1 α)에 의한 것으로 생각되며 저산소증에 의한 erythropoietin의 유도과 관련된 하위 신호전달 경로에는 kinase A와 C, phospholipase A2, 그리고 전사인자인 ATF-1과 CREB-1 등이 관련된 것으로 알려져 있다.¹⁰ 보호 기전은 아마도 허혈 전처치와 유사한 것으로 생각되며, 단기적으로는 세포막의 안정성 및 DNA 자체에 관여하여 apoptosis를 억제하고, 중성구의 혈관벽 유착 및 침윤과, 염증반응을 억제하며, 혈관의 수축을 억제하고,³ 장기적으로는 혈관 신생과 줄기세포 동원을 통한 조직 장기의 리모델링을 유도하는 등의 설명이 제안되었다.^{2,4} 본 실험에서는 염증반응의 지표로 전신 중성구 수치를 측정하고, 조직 내 중성구 침윤을 나타내는 myeloperoxidase 수치를 측정된 결과 erythropoietin 처치군에서 전신 중성구 수치의 감소 없이 조직 내 중성구 침윤의 유의한 감소를 관찰할 수 있었다. 막 지질 과산화산물인 malonyldialdehyde는 일련의 유리 라디칼 반응을 대변하는 수치로, 처치군에서 통계적으로 유의하지는 않았으나 낮은 값을 나타내었다. 이상에서 erythropoietin은 전신 중성구 수치의 유의한 변화 없이, 주로 중성구의 국소 혈관벽 유착 및 조직내 침윤을 억제하고, 이후 일련의 유리 라디칼 반응을 감소시키는 것으로 나타났다.

기존 허혈-재관류 손상 모델에서 일산화질소의 생산에 대해서는 실험 모델에 따라 상반된 보고들이 있었으며, 이것은 일산화질소 자체가 혈관 확장제와 유리 라디칼이라

는 두 가지 상반되는 측면을 가지는 것과 관련된 것으로 생각된다. Erythropoietin과 관련된 연구에서, Haroon 등⁶은 inducible nitric oxide synthase의 역할을 강조하였다. 반면 Shi 등²은 erythropoietin의 심장 보호 효과는 nitrite 및 nitrate수준의 변화와는 무관하다는 연구결과를 발표하였고, Squadrito 등⁹은 오히려 inducible nitric oxide synthase 활성 억제가 허혈-재관류 손상으로부터의 보호를 매개한다고 하였다. Santhanam 등¹¹은 신경계의 혈관 경련(vasospasm) 모델에서 erythropoietin의 투여가 혈관의 수축을 억제하고 직경을 증가시킴을 보였으며, 이와 관련해서는 일산화질소의 매개에 의한 것이라는 주장과 혈관 수용체에 erythropoietin이 직접 작용한다는 가설이 존재한다. 본 연구결과 Erythropoietin의 투여는 조직의 일산화질소를 유의하게 증가시켰고, 이는 증가된 일산화질소가 허혈-재관류 손상으로부터의 보호를 매개하였음을 시사하는 바, 아마도 손상 과정에서 일산화질소의 감소가 중성구의 혈관벽 유착 및 혈관의 수축에 기여함과 관련이 있을 것으로 생각된다.

한편, 창상치유 및 육아조직 형성 등과 관련된 erythropoietin의 역할은 주로 혈관신생과 관련하여 설명된다. 혈관신생 인자로서의 erythropoietin의 역할에 대한 연구는 혈관과 혈구가 CD31, CD34 등 공통의 마커를 가진다는 점에 착안하여 시작되었으며, Jaquet 등¹²은 erythropoietin이 VEGF와 대등한 혈관신생 효과를 가진다고 주장하였다. *In vitro* 모델에서 erythropoietin은 내피세포에 그 수용체가 발현되며 직접적, 간접적 혈관신생 인자로서 VEGF와 상승효과를 나타낸다.¹³ 또한 erythropoietin은 VEGF와 마찬가지로 산소 분압이 낮은 조건에서 발현이 증가된다.

Galeano 등¹⁴과 Buemi 등¹³은 각각 당뇨 마우스의 창상모델과 백서의 허혈 창상모델에서 erythropoietin을 10-12일 간 투여한 경우 VEGF가 유의하게 상승하였으며, 혈관신생과 조직재생이 촉진되었다고 하였다. 본 연구에서는 erythropoietin을 단일 고용량으로 투여하였을 때 처치군의 피부관 원위부에서 신생혈관 밀도가 유의하게 높은 것으로 나타났다.

Erythropoietin은 현재 임상적으로 만성 신부전 환자의 빈혈을 치료하는 약제로써 사용되고 있으며, 많은 양의 실혈이 예상되는 수술 환자의 수혈을 줄이기 위하여 사용이 시도되기도 한다. Erythropoietin 투여시 혈색소 수치는 유의한 증가를 나타내지 않았다는 결과와,⁹ 유의한 증가가 2 일째부터 나타났다는 보고¹⁵와 10일 이후 나타났다는^{13,14}는 보고들이 있다. 혈색소 수치의 지나친 증가는 특히 유리피판에 부정적인 영향을 미칠 것으로 생각되며, 또한 장기간의 erythropoietin 투여는 응고 성향을 증가시키며, 혈압을 상승시키고 말초혈관 저항을 증가시키는 것으로 알려져 있다. Saray 등⁷은 백서 임의 피부관에서 erythropoietin의 용량과 치료기간에 따른 상반된 효과를 밝힌 바, 장기간의 지속적 투여는 프로스타글란딘에 의해 매개되는 혈관 수축과 endothelin에 의한 혈압 상승, 말초 저항 증가 및 점성도의 증가, 응고 촉진 효과 등 혈액 유동성(rheology)에 대한 역작용으로 인하여 피판 원위부의 괴사를 증가시킨다고 보고하였다. 본 연구에서는 erythropoietin의 단일 고용량 투여는 10일째까지는 혈색소 수치의 유의한 증가를 가져오지 않았으며, 피판의 생존을 증가시키는 것으로 나타났다. 이후의 연구를 통하여 부정적인 효과 없이 동물 및 인체에 적용할 수 있는 적절한 용량과 투여기간의 결정이 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

재조합 인간 Erythropoietin을 단일 용량으로 재관류 30분 전 투여한 경우, 허혈-재관류 손상을 받은 백서 근피판의 생존 면적을 증가시킬 수 있었다. 이것은 중성구에 의해 매개되는 조직 내 염증반응의 억제 및 일산화질소의 증가와 연관된 것으로 생각되며, 장기적으로는 혈관신생의 증진을 통한 것으로 설명할 수 있을 것이다.

REFERENCES

- Bogoyevitch MA: An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc Res* 63: 208, 2004
- Shi Y, Rafiee P, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE: Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels. *Basic Res Cardiol* 99: 173, 2004
- Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EC, Talan MI: Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 11612, 2003
- Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ: Cardio-protective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem* 279: 20655, 2004
- Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, Thiemermann C: Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney *in vivo*. *Kidney Int* 66: 983, 2004
- Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO: A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am J Pathol* 163: 993, 2003
- Saray A, Ozakpinar R, Koc C, Serel S, Sen Z, Can Z: Effect of chronic and short-term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: an experimental study. *Laryngoscope* 113: 85, 2003
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248, 1976.
- Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Quartarone C, Saitta A, Caputi AP: Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. *Br J Pharmacol* 127: 482, 1999
- Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE: Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol* 100: 187, 2005
- Santhanam AV, Smith LA, Akiyama M, Rosales AG, Bailey KR, Katusic ZS: Role of endothelial NO synthase phosphorylation in cerebrovascular protective effect of recombinant erythropoietin during subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *Stroke* 36: 2731, 2005
- Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH: Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res* 64: 326, 2002
- Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Ientile R, Crisafulli C, Parisi A, Catania M, Calapai G, Impala P, Aloisi C, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A, Tuccari G, Frisina N: Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 22: 169, 2004
- Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F: Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 53: 2509, 2004
- Bor-Kucukatay M, Yalcin O, Meiselman HJ, Baskurt OK: Erythropoietin-induced rheological changes of rat erythrocytes. *Br J Haematol* 110: 82, 2000