

급성 저산소성 허혈성 뇌손상이 유발된 신생자돈에서 재산소-재관류기 동안 NG-monomethyl-L-arginine과 L-arginine이 뇌의 혈역학 및 에너지 대사에 미치는 영향

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 소아과, 삼성생명과학연구소*,
이화여자대학교 의과대학 소아과학교실[†], 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 소아과[‡]

고선영 · 강 샘* · 장윤실[‡] · 박은애[†] · 박원순[‡]

Effects of NG-monomethyl-L-arginine and L-arginine on cerebral hemodynamics and energy metabolism during reoxygenation-reperfusion after cerebral hypoxia-ischemia in newborn piglets

Sun Young Ko, M.D., Saem Kang*, Yun Sil Chang, M.D.[‡]
Eun Ae Park, M.D.[†] and Won Soon Park, M.D.[‡]

Department of Pediatrics, Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine,
Samsung Biomedical Institute*, Department of Pediatrics, College of Medicine,
Ewha Womans University[†], Department of Pediatrics, Samsung Medical Center[‡],
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : This study was carried out to elucidate the effects of nitric oxide synthase(NOS) inhibitor, NG-monomethyl-L-arginine(L-NMMA) and nitric oxide precursor, L-arginine(L-Arg) on cerebral hemodynamics and energy metabolism during reoxygenation-reperfusion(RR) after hypoxia-ischemia(HI) in newborn piglets.

Methods : Twenty-eight newborn piglets were divided into 4 groups; Sham normal control(NC), experimental control(EC), L-NMMA(HI & RR with L-NMMA), and L-Arg(HI & RR with L-Arg) groups. HI was induced by occlusion of bilateral common carotid arteries and simultaneously breathing with 8 percent oxygen for 30 mins, and followed RR by release of carotid occlusion and normoxic ventilation for one hour. All groups were monitored with cerebral hemodynamics and cytochrome aa₃ (Cyt aa₃) using near infrared spectroscopy(NIRS). Na⁺, K⁺-ATPase activity, lipid peroxidation products, and tissue high energy phosphate levels were determined biochemically in the cerebral cortex.

Results : In experimental groups, mean arterial blood pressure, PaO₂, and pH decreased, and base excess and blood lactate level increased after HI compared to NC group(P<0.05). These variables subsequently returned to baseline after RR except pH. There were no differences among the experimental groups. In NIRS, oxidized hemoglobin(HbO₂) decreased and hemoglobin(Hb) increased during HI(P<0.05) but returned to base line immediately after RR; 40 min after RR, the HbO₂ had decreased significantly compared to NC group(P<0.05). Changes of Cyt aa₃ decreased significantly compared to NC after HI and recovered at the end of the experiment. Significantly reduced cerebral cortical cell membrane Na⁺, K⁺-ATPase activity and increased lipid peroxidation products(P<0.05) were not improved with L-NMMA or L-Arg.

Conclusion : These findings suggest that NO is not involved in the mechanism of HI and RR brain damage during the early acute phase of RR. (Korean J Pediatr 2006;49:317-325)

Key Words : NG-monomethyl-l-arginine, L-arginine, Hypoxia, Ischemia, Perfusion, Injury, Energy metabolism, Brain

접수 : 2005년 9월 20일, 승인 : 2005년 10월 26일

책임저자 : 박은애, 이화여자대학교 의과대학 소아과학교실

Correspondence : Eun Ae Park, M.D.

Tel : 02)2650-5574 Fax : 02)2653-3718 E-mail : pea8639@ewha.ac.kr

서 론

최근 신생아 치료 및 주산기 관리의 눈부신 발전에도 불구하고 주산기 가사에 의한 저산소성 허혈성 뇌손상은 높은 사망률과 뇌성마비, 경련, 지능저하, 발달지하, 학습 장애 등의 심각한 신경학적 후유증을 보이는 중요한 원인이다¹⁻³⁾. 그러나 신생아 저산소성 허혈성 뇌손상의 예후를 향상시키는 효과적인 치료 방침이 확립되어 있지 않으며, 병인과 발병 기전 및 영구적인 뇌손상의 기전도 아직 밝혀져 있지 않다.

신생아 저산소성 허혈성 뇌손상이란 분만 전 또는 분만 과정 동안에 저산소성 허혈(hypoxia-ischemia, HI)이 일어나고, 심폐소생술에 의해 재산소-재관류(reoxygenation-reperfusion, RR)되어 정상 기능으로 회복되는 과정에서 발생하는 뇌손상이다. 따라서 뇌손상은 저산소성 허혈증 동안에 발생하는 뇌손상, 재산소-재관류 시기 초기에 발생하는 뇌손상, 뇌손상 후 수 시간에서 수일의 잠복기 이후에 나타나는 뇌손상의 3단계에 걸쳐서 진행된다^{4, 5)}.

저산소성 허혈성 뇌증 유발 동물 실험에서 저산소성 허혈, 재산소-재관류 후에 뇌조직에서 nitric oxide(NO)의 양이 증가하는 것으로 알려져 있다⁶⁻⁸⁾. 그러나 NO 매개 신경 독성을 줄이려는 시도로 nitric oxide synthase(NOS) 억제제를 투여한 실험 결과는 일치되지 않은 소견을 보이고 있어, 뇌손상을 호전시킨다는 보고^{9, 10)}, 특별한 영향을 미치지 않는다는 보고^{11, 12)} 등 상반된 결과들이 보고되고 있다. 한편 Sadoshima 등¹³⁾은 NO 생성 전구물질인 L-arginine(L-Arg)이 뇌혈류 저항을 감소시켜 뇌혈류를 증가시킴으로써 뇌 에너지 대사를 호전시킨다고 보고하였다.

이에 본 연구자들은 저산소성 허혈성 뇌손상 및 초기 재산소-재관류 동안에 있어서 NO의 역할을 규명하기 위하여, 저산소성 허혈이 유도된 신생 자돈에서 재산소-재관류 동안 NOS 억제제인 NG-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)와 NO 생성 전구물질인 L-Arg를 투여하여 NO 생성을 억제 혹은 촉진을 유발하여 뇌의 혈액학적 및 에너지 변화를 살펴 NO가 뇌 혈액학 및 뇌세포 에너지 대사에 미치는 영향을 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물 및 외과적 처치

실험 동물로는 생후 3일 이내의 신생 자돈(체중 1.2-1.5 kg)을 사용하였다. 동물은 에테르를 흡입 시킨 후 전신 마취를 위해 5 mg/kg의 thiopental을 정주하고, 1% lidocane으로 국소 마취한 후 기관 절개를 실시하였다. 0.1 mg/kg의 pancuronium bromide를 정주하여 마비시킨 후 압력 제한 환기법(Sechrist Infant Ventilator, IV-100B, Sechrist Industries Co., Anaheim, CA, USA)으로 인공 환기를 시키면서, 흡기시 동맥혈 산소 분압은 50-80 mmHg, 동맥혈 이산화탄소 분압은 35-45

mmHg 유지되도록 조절하였다.

대퇴부 동맥과 정맥에 외경 3.5 mm 폴리비닐 카테터를 삽입하여 헤파린 1 mL당 1 unit 섞인 0.9% 생리 식염수를 1 mL/hr의 속도로 관류시키고 이를 혈압 변환기(Hewlett Packard Model M1276A, Hewlett Packard Co., MA, USA)로 연결시켜 지속적으로 체동맥압을 측정하였다. 정맥관을 통해 4-5 µg/kg/hr의 fentanyl과 함께 10% 포도당 용액을 3 mL/hr의 속도로 주입하였다. 동맥혈 채취는 저산소성 허혈성 뇌손상 유발 30분 후, 재산소-재관류 1시간 후에 실시하여 동맥혈 산소 분압, 이산화탄소 분압, pH, 포도당, 젖산치를 측정하였다.

신생아 집중 감시 장치(Hewlett Packard Model M1276A, Hewlett Packard Co., MA, USA)를 이용하여 심전도, 산소 포화도 등을 지속적으로 측정하였다. 4번째 경추 부위에서 양쪽 경동맥을 분리하여 실크 4.0번 실로 걸어두었다. 실험 내내 자돈은 수술대 위에 놓고 자동 온도 조절되는 신생아 가온기(Airchields Inc., Harboro, PA, USA) 아래에서 항문 체온을 38.0-39.0°C로 유지하였다(정상 자돈의 평균체온은 38.5±0.6°C).

2. 실험 과정

신생 자돈 28마리를 무작위로 4군으로 나누었다. 실험 과정은 Fig. 1에 도식화하였다. 마취, 인공 환기 및 도관 삽관을 실시하고 수술적 처치 후 30분간 안정시켰다. 속임 수술(sham surgery) 정상 대조군(n=9)에서는 저산소성 허혈성 뇌손상을 유도하지 않고, 1.5시간의 정상 혈액 가스 수치가 유지되도록 인공 호흡기를 계속하면서 안정화 시기만 거치는 것을 원칙으로 하였다. 실험 대조군(n=7)에서는 안정화 시킨 후 저산소성 허혈성 뇌손상 유도 30분 후에 재산소-재관류시켜 1시간 동안 관찰하였다.

L-NMMA군(n=6)과 L-Arg군(n=6)에서는 HI 유도 30분 후 RR 직전에 각각 L-NMMA 30 mg/kg, L-Arg 300 mg/kg를

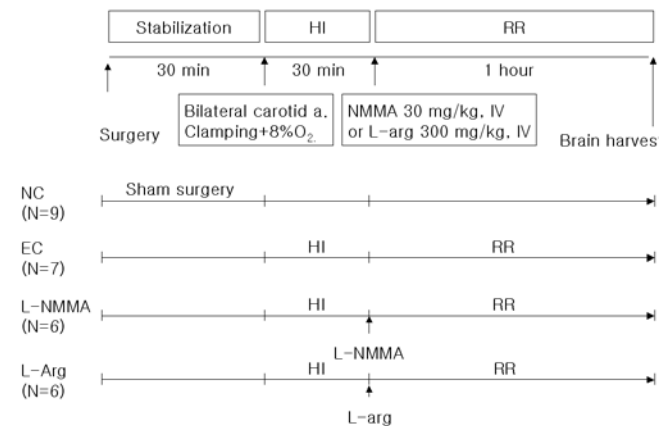


Fig. 1. Diagram of experimental protocol. HI: hypoxia-ischemia, RR: reoxygenation-reperfusion, L-NMMA: N^G-monomethyl-L-arginine, L-Arg: L-arginine, NC: normal control group (Sham surgery group), EC: experimental control group, L-NMMA: experimental L-NMMA group, L-Arg: experimental L-arginine group.

정맥 주사하고, 재산소-재관류시켜 1시간 동안 관찰하였다.

저산소성 허혈성 뇌손상 유발은 양쪽 경동맥을 일시적으로 완전히 폐쇄하고 8% 산소로 30분간 호흡시켰다. 양쪽 경동맥은 기관 절개술시에 찾아 놓고 잠시 동안의 경동맥 폐쇄에는 외과용 클립을 이용하였다. 재산소-재관류는 저산소성 허혈성 뇌손상 유발 30분 후 경동맥 폐쇄를 풀고 흡입 산소 농도를 60%로 올렸고, 이후 동맥혈 산소 분압을 정상화 시킬 정도로 감소시켰다. 재산소-재관류 시키면서 1시간까지 신생아 중환자 관리를 실시하며 지속적으로 관찰하였다. 이와 같이 관찰 후 신생아 돈을 희생시켜 뇌조직을 적출하여 액체 질소에 담가 쾌속으로 얼린 후 -70℃의 냉장고에 보관하였다.

3. 생리적 변수

동맥혈 가스분석은 혈액 가스 분석기(Ciba-Corning Diagnostics Corp, Medfield, MA, USA)로 측정하였다. 혈액 내 포도당, 젖산의 농도는 YSI model 2300 dual analyzer(Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA)를 이용하여 측정하였다. 이들 검사는 100 μL의 혈액으로도 가능하며, 7% 이내의 변이 계수를 갖는다.

4. Near Infrared Spectroscopy(NIRS)

NIRS는 NIR 500(Hamamatsu Photonics KK, Hamamatsu, Japan)을 이용하였다. 779.0 nm에서 907.8 nm 사이의 영역에 있는 4가지 파장으로 이루어진 자외선이 fiberoptic bundle을 통해 자돈의 두정부에 위치시킨 하나의 optode를 통해서 뇌조직을 통과하여 약 4 cm 떨어진 또 하나의 optode에 모여서 spectrometer의 photomultiplier tube에 전해지도록 만들어져 있다. 자돈의 두정부에 위치시킨 두 optode 사이의 길이는 칼리퍼로 측정하였고 주위 빛의 간섭을 피하기 위해 자돈의 머리를 빛이 차단되는 테이프로 감싸주었다(Fig. 2).

NIRS에 측정되는 인자들은 산화 헤모글로빈(oxidized hemoglobin, HbO₂), 환원 헤모글로빈(hemoglobin, Hb), 환산 헤모글로빈(deduced Hb, HbD), 싸이토크롬 aa₃(Cyt aa₃) 등의 변화 등이다. 이중 환산 헤모글로빈은 산화 헤모글로빈과 환원 헤모글로빈의 차이로 계산된다.

뼈를 비롯한 뇌조직은 산화 헤모글로빈, 환원 헤모글로빈, 싸이토크롬 aa₃만을 제외하고, 자외선 영역의 모든 빛이 그대로 투과되므로, 산화 헤모글로빈, 환원 헤모글로빈, 싸이토크롬 aa₃ 등이 chromophore로 작용하고¹⁴⁾, 따라서 수정된 Beer-Lambert 법칙¹⁵⁾을 이용, 흡수의 변화로부터 뇌속에 존재하는 이러한 물질들의 농도 변화를 계산해 낼 수가 있다. 이러한 측정들은 저산소성 허혈성 뇌손상 유발 전, 유발 동안 그리고 재산소-재관류 동안 지속적으로 이루어졌으며, 결과 자료는 RS 232C port 통해 컴퓨터 디스켓에 자동 저장하였다.

5. 뇌조직의 생화학적 검사

뇌세포막을 분리하는 방법과 대뇌 피질 세포의 Na⁺, K⁺-

ATPase 활성도, conjugated dienes의 수치, 뇌조직 내 포도당과 젖산의 농도와 ATP와 PCr의 뇌중 농도를 재는 방법에 대해선 이전의 논문에 자세히 기술되어 있다¹⁶⁾. 세포막들은 Harix 등¹⁷⁾이 기술한 방법에 따라 분리하였다.

Na⁺, K⁺-ATPase 활성도는 ouabain없이 측정된 값에서 ouabain 있는 측정된 값의 차이로 산출하였다. Conjugated dienes는 Recknagel과 Glende법으로 측정하였다. Adenosine triphosphate(ATP), phosphocreatine(PCr) 농도는 Lamprecht 등¹⁸⁾의 방법을 이용한 coupled enzyme assay로 구하였다.

6. 통계학적 분석

결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 각 군간의 평균비교는 one-way ANOVA와 Mann-Whitney U test를 실시하였다. 통계적 처리는 SPSS version 10.0을 사용하였고, P값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 생리적 변수

정상 대조군과 실험대조군, L-NMMA군, L-Arg군의 생리적 변수들의 변화는 Table 1과 같았다. 정상 대조군에서는 1시간 30분 동안 생리적 변수의 유의한 변화가 없었다. 실험군 모두에서는 동맥압과 동맥혈 산소 분압은 저산소성 허혈성 뇌손상 유발 후 정상 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고(P<0.05), 재산소-재관류 1시간 후에는 모두 기저 수준으로 회복되었다. 혈액의 pH는 실험군 모두에서 저산소성 허혈성 뇌손상 유발 후 유의하게 감소하였고(P<0.05), 재산소-재관류 후에도 회복되지 않았으며(P<0.05), 혈액의 젖산농도는 저산소성 허혈성 뇌손



Fig. 2. Application of near infrared spectroscopy to newborn piglet.

Table 1. Physiological Data in each Group of Newborn Piglets

Group(number)	NC(n=9)	EC(n=7)	L-NMMA(n=6)	L-Arg(n=6)
MABP(mmHg)				
Baseline	65±17	78±12	78±14	76±25
HI-30	69±14	37±12*	43±10*	48±27*
RR-1hr	77±17	75±16	80±13	67±18
Arterial O₂(mmHg)				
Baseline	134±32	106±22	113±8	117±33
HI-30	111±22	31±22*	23±7*	23±2*
RR-1hr	109±31	123±40	100±35	106±30
Arterial CO₂(mmHg)				
Baseline	38±15	36±6	37±6	45±16
HI-30	37±12	40±7	37±15	36±14
RR-1hr	40±15	52±20	36±14	51±21
Arterial pH				
Baseline	7.4±0.2	7.4±0.1	7.4±0.1	7.4±0.2
HI-30	7.4±0.1	7.2±0.1*	7.1±0.2*	7.2±0.1*
RR-1hr	7.4±0.1	7.2±0.2*	7.2±0.2*	7.3±0.2*
Base excess(mEq/L)				
Baseline	0.8±4.7	-1.6±1.9	0.7±7.1	0.4±5.5
HI-30	0.1±2.5	-12.2±6.8*	-10.6±10.8	-13.4±3.8*
RR-1hr	2.1±3.4	-8.1±6.7	-4.6±11.1	-4.6±6.4
Blood glucose(mg/dL)				
Baseline	85±21	92±21	110±38	110±13
HI-30	97±41	120±35	127±43	170±67*
RR-1hr	96±38	108±28	110±46	151±32
Blood lactate(mmol/L)				
Baseline	2.6±0.7	1.6±0.7	2.1±0.5	1.2±0.5*
HI-30	2.4±0.6	7.8±2.7*	8.1±3.5*	8.5±1.6*
RR-1hr	1.9±0.7	5.0±4.8	4.7±4.0	3.6±2.3

Values given present means±SD
 NC: normal control group(Sham surgery group), EC: experimental control group, L-NMMA: experimental L-NMMA group, L-Arg: experimental L-arginine group
 HI-30 means 30 minutes after hypoxia-ischemia, RR-1hr means 1 hour after reoxygenation-reperfusion
 *P<0.05 vs NC

상 유발 30분 후 대조군에 비하여 유의하게 증가하였고(P<0.05), 재산소-재관류 이후 기저치로 회복되었고, 각 실험군간 유의한 차이는 없었다.

2. NIRS 모니터 소견

뇌의 산화 헤모글로빈, 환산 헤모글로빈의 변화는 실험군 모두에서 급성 저산소성 허혈성 뇌손상 유도 시작과 함께 정상 대조군에 비하여 의미있게 감소하였다(P<0.05)가 재산소-재관류 직후 다시 증가하여 기저치로 회복되었다(Fig. 3). 산화 헤모글로빈 변화는 재산소-재관류 후 40분경부터 다시 감소하여 정상 대조군과 유의한 차이를 보였다(P<0.05). 이러한 변화 양상이 실험군간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 환원 헤모글로빈 변화는 실험군 모두에서 급성 저산소성 허혈성 뇌손상 유도 시작과 함께 유의하게 증가하였으며(P<0.05), 이후 재산소-재관류 되면서 기저치로 회복되었고, 실험군간에 차이는 없었다.

싸이토크롬 aa₃은 저산소성 허혈성 뇌손상 유도 30분 후 각 실험군에서 정상 대조군에 비하여 유의하게 감소하였고(P<0.05),

이후 재산소-재관류 1시간 후에는 실험군 모두에서 증가하여, 정상 대조군과 차이는 없었다. 이러한 변화는 실험군 각 군간에 유의한 차는 없었다(Fig. 4).

3. 대뇌피질의 생화학적 소견

대뇌피질 세포막의 Na⁺, K⁺-ATPase는 실험군에서 각각 45.3±1.4, 44.4±2.0, 47.8±2.1 μmol Pi/mg protein/hr로 모두 정상 대조군의 53.7±2.9 μmol Pi/mg protein/hr보다 유의하게 감소하였고(P<0.05), 실험군간에는 유의한 차이는 없었다(Fig. 5). 대뇌 세포막 지질 과산화물의 지표의 하나인 conjugated dienes의 값은 실험군에서 1.10±0.10, 1.00±0.10, 1.00±0.10 μmol/g로 정상 대조군 0.82±0.02 μmol/g보다 유의하게 증가하였고(P<0.05), 실험군 간에는 차이는 없었다(Fig. 6). 대뇌 피질의 ATP와 PCr의 농도는 정상 대조군과 차이가 없었고, 각 실험군간에도 유의한 차이가 없었다(Fig. 7, 8).

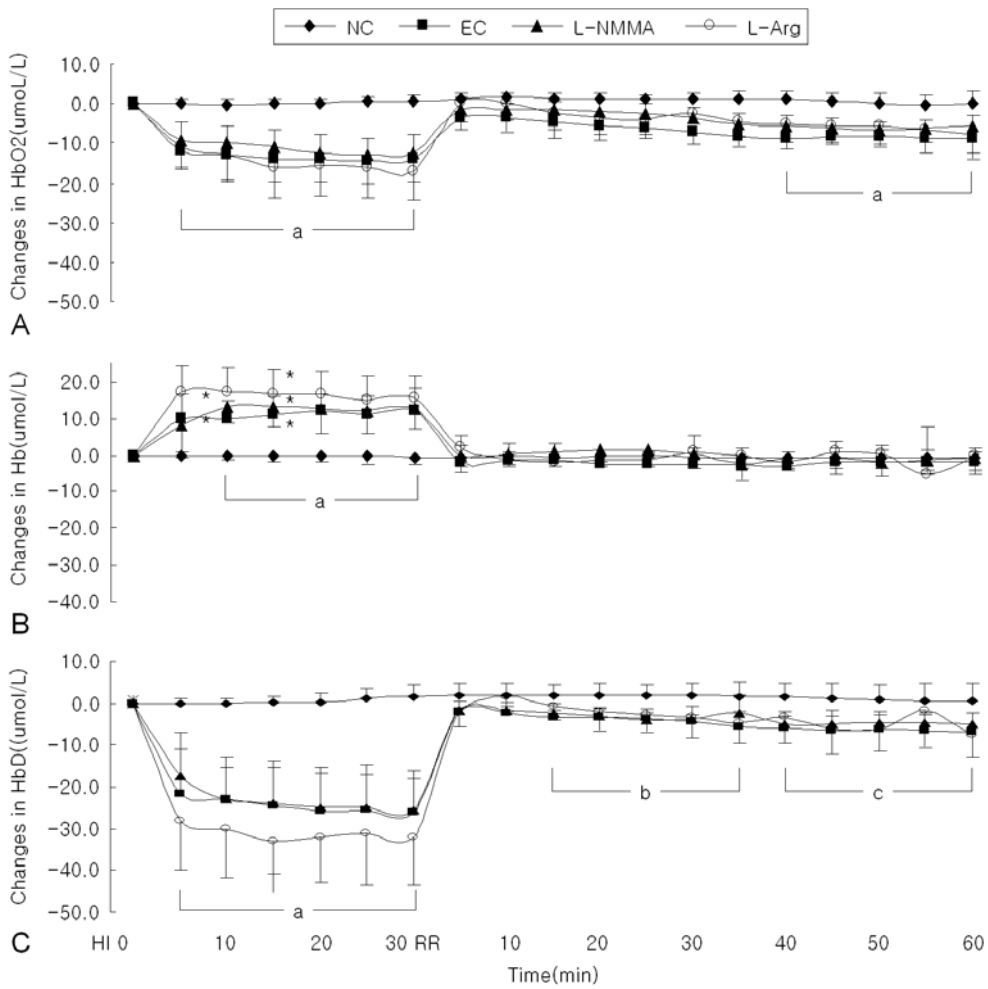


Fig. 3. Time course of changes in oxidized hemoglobin(HbO₂), reduced hemoglobin(Hb), and deduced hemoglobin(HbD) measured with near infrared spectroscopy. NC : normal control group, EC : experimental control group, L-NMMA : L-NMMA experimental group, L-Arg : L-arginine experimental group. ^aP<0.05 in EC, L-NMMA, L-Arg vs NC. ^bP<0.05 in EC, L-NMMA vs NC. ^cP<0.05 in EC, L-Arg vs NC.

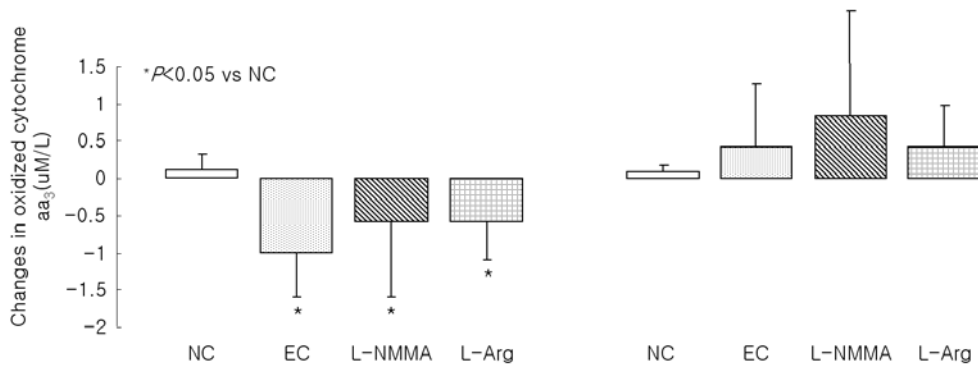


Fig. 4. Changes in oxidized cytochrome aa₃ measured with near infrared spectroscopy. Values given present means ± SD. NC : normal control group, EC : experimental control group, L-NMMA : experimental L-NMMA group, L-Arg : experimental L-arginine group. HI-30 means 30 minutes after hypoxia-ischemia, RR-1hr means 1 hour after reoxygenation-reperfusion.

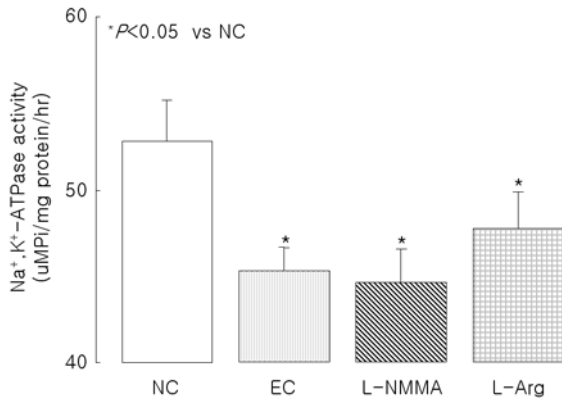


Fig. 5. Na⁺, K⁺-ATPase activity in the cerebral cortex. Values given present means±SD. NC: normal control group, EC: experimental control group, L-NMMA: experimental L-NMMA group, L-Arg: experimental L-arginine group.

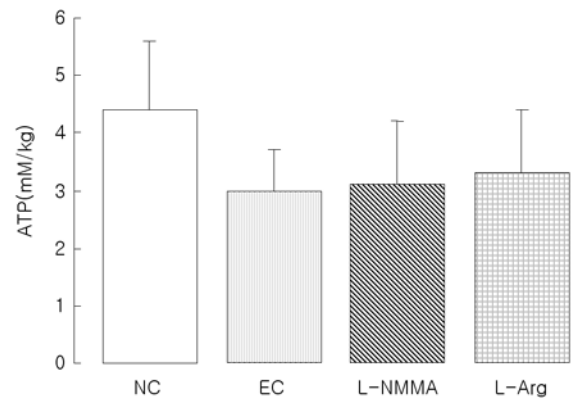


Fig. 7. Level of ATP in the cerebral cortex. Values given present means±SD. NC: normal control group, EC: experimental control group, L-NMMA: experimental L-NMMA group, L-Arg: experimental L-arginine group.

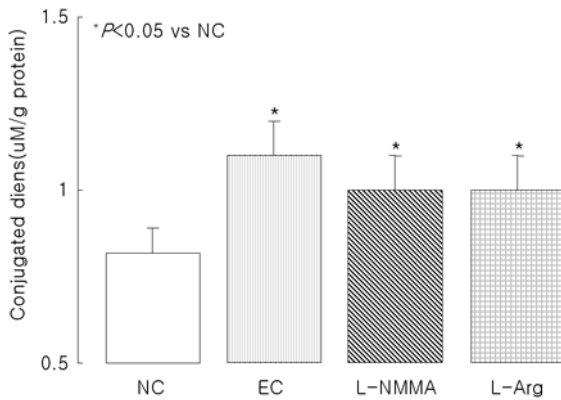


Fig. 6. Conjugated dienes in the cerebral cortex. Values given present means±SD. NC: normal control group, EC: experimental control group, L-NMMA: experimental L-NMMA group, L-Arg: experimental L-arginine group.

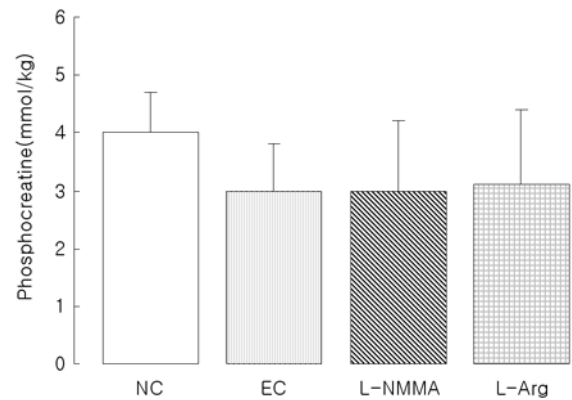


Fig. 8. Level of phosphocreatine in the cerebral cortex. Values given present means±SD. NC: normal control group, EC: experimental control group, L-NMMA: experimental L-NMMA group, L-Arg: experimental L-arginine group.

고찰

신생아 저산소성 허혈성 뇌손상은 주산기 사망률과 이환의 중요한 원인이며, 주산기 가사의 병인과 발병 기전, 특히 기본적인 생화학적 변화 등에 대한 기전 등이 밝혀져 있지 않기 때문에, 저산소성 허혈성 뇌손상의 빈도를 의미 있게 줄일 수 있는 방법이 아직 적은 실정이다.

뇌 저산소성 허혈증으로 유발되는 뇌손상의 기전은, 뇌 산소 공급이 급성으로 감소되면 수분 내에 뇌 에너지 대사가 붕괴되고¹⁹⁾, 세포막의 나트륨, 포타시움 이온펌프가 작동하지 않아 세포내로 나트륨과 칼슘 등의 이온이 과다하게 이동하게 되어, 여러 효소들을 활성화시키면서 세포가 파괴되는 과정을 거친다. 이렇게 되면 뇌신경세포에서 흥분성 신경 전달 물질인 글루타민을 재흡수가 안되고 과량 분비되어, 글루타민 수용체 중의 하나인 NMDA 아형 글루타민 수용체에 부착하게 된다^{20, 21)}.

신경세포 자극 전달 부위에서 글루타민의 농도가 증가하고, NMDA 수용체가 같이 활성화 되면서 뇌신경 세포내의 칼슘의 농도는 더욱 증가하게 되고 세포가 파괴된다^{22, 23)}. 또한 저산소성 허혈성 뇌증으로 에너지 고갈 상태가 되면 신경 세포막의 전위가 낮추어지면서 NMDA 통로가 수동적으로 열리게 되고²⁴⁾, 글루타민에 의한 뇌손상에 결정적 역할을 하게 된다. NMDA 수용체의 활성화는 다음 단계로 신경세포내에서 NO의 생성과 연관된다.

즉 NMDA 수용체가 열리면서 세포 내 칼슘이 증가하고 신경성 NOS를 활성화시켜 NO 전구 물질인 arginine을 citrulline으로 전환시키면서 NO가 생성되게 된다²⁵⁾.

신경성 NOS는 중추신경계 전체에 걸쳐 신경세포 일부, 즉 혈관 주변 신경과 신경교세포에 존재한다²⁶⁻²⁸⁾. 이 효소에 의해 생성되는 NO는 신경세포 자극 전달부위의 유연성과 신경전달을 담당하고²⁵⁾, 글루타민 분비작용에 있어 중요하다²⁹⁾.

신경성 NOS에 의해 생성된 NO는 뇌혈류와 뇌대사, 그리고

과탄산혈증에 반응하는 뇌혈류에 대한 조절 작용을 가지고 있다^{30, 31)}. 내피 혈관성 NOS는 큰 혈관의 내피층에 존재하고, 이것에 의해 생성된 NO는 휴식 시 뇌 혈류 조절의 역할과 혈소판응집억제하고, 백혈구 부착을 억제한다^{32, 33)}.

Dalkara 등³⁴⁾은 허혈 동안 뇌혈관 내에서 NO 생성을 촉진할 경우는 뇌혈역학 기전을 통하여 뇌보호 효과를 보이고, 신경에서 NO가 과도하게 생성되게 될 경우는 신경 독성을 매개한다고 하였다.

본 연구는 저산소성 허혈 후 재산소-재관류하여 5분 간격으로 1시간에 걸쳐 뇌혈역학을 관찰하였으나 L-NMMA 혹은 L-Arg 모두에 영향을 받지 않았다.

NO의 허혈성 뇌손상 혹은 허혈 후 재관류 후의 뇌손상에 미치는 영향에 다양한 결과들을 보이고 있는 것은, 억제되는 혹은 촉진되는 NO의 정도와 억제되는 NOS의 선택성 여부 등과 또 손상 시기에 따라 여러 결과들을 보인다고 생각된다.

본 연구에서 사용한 NIRS는 뇌의 혈액학적인 변화와 에너지 상태를 지속적으로 침상 결에서 측정할 수 있는 기기인데³⁵⁾, 혈액학적 변화에서는 동맥혈 혈색소와 뇌내비 말초의 혈색소 비가 일정하기만 하다면 NIRS에서 측정된 총 헤모글로빈[total hemoglobin(HbT)]은 산화 헤모글로빈과 환원 헤모글로빈의 합과 관련 있으며, 이것의 변화는 뇌 혈액량에 정확히 비례한다³⁶⁾. 뇌세포 손상이 일어나는 동안 뇌의 혈액학적 변화를 지속적으로 관찰함으로써 주산기 가사 환아에서도 재관류기 뇌손상 동안에 뇌의 에너지 상태와 혈액학적인 변화에 대해 지속적인 감시가 가능하다는 것을 시사해 준다.

본 연구결과에서는 NO가 뇌혈역학 변화에서 재관류 직후에 혈관 이완을 통한 혈류를 호전시키는 작용을 나타내지 않을 것을 NIRS를 통하여 비침습적으로 관찰할 수 있었다.

또한 NIRS에서 측정되는 사이토크롬 aa₃의 변화는 대뇌의 미토콘드리아의 호흡 전자 전달 체계의 마지막 효소인 cytochrome C oxidase의 산화 환원 수준의변화를 반영하는 것으로 뇌세포 산화도를 상대적으로 측정할 수 있다³⁷⁾. Chang 등³⁸⁾은 저산소성 허혈증 동안 사이토크롬 aa₃의 감소와 뇌의 ATP와 PCr의 농도와 강한 상관 관계를 보고하였다. 본 연구에서는 1시간의 재산소 재관류 후 측정된 사이토크롬 aa₃의 변화에는 영향이 없었다.

Chang³⁸⁾의 보고에서도 급성 저산소성 허혈성 뇌손상 후 재산소-재관류 후 24시간 지나서 사이토크롬 aa₃가 감소하였으며, 이는 곧 대뇌의 고 에너지 인분자의 감소를 의미한다고 하였다. 본 연구에서 실험 종료 후 실시한 동결 대뇌 피질에서의 고에너지 인분자인 ATP와 PCr의 농도 변화에서도 정상 대조군과 차이가 없었고, L-NMMA나 L-Arg에도 영향을 받지 않았다. 따라서 뇌손상 급성기에는 에너지 부전상태가 주요한 뇌세포 손상 기전이 아닐 것임을 시사하며, 또한 이러한 뇌 에너지 상태 변화에 NO가 영향을 미치지 않는 결과를 보여주었다.

저소성 허혈증으로 인하여 뇌의 에너지 공급이 부족하면

Na⁺, K⁺-ATPase의 기능이 저하되어 세포막은 탈분극화되고 세포내 나트륨과 칼슘 이온은 증가되고 포타슘 이온은 감소되며, 세포외에서 이들 이온 농도는 이와 정반대로 변화한다.

또한 혐기성 당분해 작용으로 젖산의 농도는 증가하고, 세포 내외의 수소 이온 농도도 증가되며, pH 감소는 세포의 부종과 괴사 및 산소 유리 라디칼 생성을 촉진하면서 세포 손상을 유발한다. 본 연구의 결과에서 Na⁺, K⁺-ATPase의 활성도가 정상 대조군에 비하여 저산소성 허혈성 뇌손상 후 재산소-재관류 후에 의미있게 감소하였으며, 이는 재관류 손상에서 이온 농도의 변화에 의한 뇌부종 등이 뇌세포 손상의 주요 기전으로 작용할 것이라는 것을 시사해 준다. 그러나 L-NMMA나 L-Arg에 의해서 Na⁺, K⁺-ATPase의 활성도의 호전은 관찰되지 않았다.

또 다른 손상 기전인 산소 유리 라디칼에 의한 뇌손상은 특히 신생아기에 중요한데, 그 이유는 발달 과정의 뇌에는 다불포화 지방산의 농도가 훨씬 높아서 라디칼의 손상을 더 받기 쉽고, 라디칼의 생성이 다른 시기보다 더욱 증가되어 있고, 항산화 효소의 농도가 낮기 때문이다. 산소 유리 라디칼은 저산소성 허혈기 이외에도 재산소-재관류 동안에도 많이 발생한다³⁹⁾. 생성된 산소 유리 라디칼은 세포막의 지방을 과산화시키고, 효소와 단백을 불활성화시키며, 핵산을 변화시킴으로써 조직손상을 야기하게 된다⁴⁰⁾.

본 연구 결과에서 지질 과산화물의 지표인 conjugated dienes치는 저산소성 허혈성 뇌손상 유발 후 정상 대조군보다 의미 있게 증가하였고, L-NMMA에 의한 NO 합성 억제나 혹은 L-Arg 투여로 호전되지 않았다. 그러나 Chang 등³⁸⁾의 보고에서는 급성 저산소성 허혈성 뇌손상 후 재산소-재관류 후 48시간 후 뇌조직에서의 conjugated dienes치가 정상 대조군과 별 차이를 보이지 않았으며, 그들의 연구와 본 연구결과로 보았을 때 산소 유리기에 의한 뇌세포 손상이 저산소성 허혈성 뇌손상의 급성기에 주로 작용하고 이후 발생하는 이차적인 뇌손상에는 작용이 적다는 것을 시사해 준다.

본 연구에서는 신생아 가사에서 보이는 급성 저산소성 허혈성 뇌병증의 일차성 재관류 손상의 임상 경과를 똑같이 실험 동물 모델에서 성공리에 재현하였으며, 저산소성 허혈증 및 재산소-재관류 초기 동안의 뇌혈역학 및 뇌에너지 대사의 변화관찰에 NIRS와 생화학적 검사를 이용하여, 저산소성 허혈성 뇌손상 후 재산소 재관류 직후 뇌손상 기전에는 NO가 이들의 변화에 뚜렷하게 영향을 미치지 않는 것을 관찰하였다.

본 연구의 제한점은 NO의 대사산물인 Nitrite/Nitrate와 NO 합성제 활성도를 측정하지 않아 과연 NO의 합성의 억제나 유발이 적절하였는가와 사용한 제제의 용량, 투여시기 및 선택적 억제제의 사용 등이 적절인지에 대한 문제점 등이다. 그리고 재관류기가 1시간 정도로 짧은 시간을 관찰한 것이므로 그 이후의 지연된 뇌손상에 대한 효과에 대하여는 관찰할 수 없었다.

요 약

목적 : 주산기 저산소성 허혈성 뇌손상의 병태 생리에서 nitric oxide(NO)가 급성 저산소성 허혈(hypoxia-ischemia, HI) 후 재산소-재관류기(reoxygenation-reperfusion, RR)에 대뇌의 혈역학 및 에너지 대사에 미치는 영향을 규명하기 위하여, NO 합성 억제제인 NG-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)와 NO 합성 촉진제인 L-arginine(L-Arg) 투여를 통하여 뇌신경 세포에 어떠한 영향을 주는지 알아보려고 하였다.

방법 : 생후 3일 이내의 신생자돈 28마리를 대상으로 무작위로 나누어, Sham 처치만 받은 정상 대조군(n=9), HI와 RR만 유발한 실험 대조군(n=7), HI 이후 RR 직전에 L-NMMA 투여군(n=6)과 L-arginine 투여군(n=6) 등 4군으로 구분하였다. 실험은 ether을 흡입 시킨 후 thiopental을 정주하고, 기관 삽관 후 인공호흡기 등의 처치를 끝낸 후, HI를 유발하기 위하여 실험군에서 수술 검자로 양측 경동맥을 폐쇄한 후 8% 산소로 30분간 흡입하였고, RR을 시행하기 위하여 경동맥 폐쇄를 풀고 흡입 산소농도를 60%로 올려 1시간까지 투여하면서 관찰하였다. 생리적 변수로 혈압과 동맥혈 가스 소견을 관찰하였고, 뇌의 혈역학적 변화와 에너지 상태는 near infrared spectroscopy (NIRS)를 이용하여 대뇌의 산화 헤모글로빈(HbO₂), 환원헤모글로빈(Hb), 환산 헤모글로빈(HbD), 싸이토크롬 aa₃(Cyt aa₃) 등을 지속적으로 관찰하여 비교하였다. 또한 실험 종료 시 얻은 뇌조직에서 Na⁺, K⁺-ATPase의 활성도 및 지질 대사산물인 conjugated dienes, 고에너지 인분자인 ATP(adeninetriphosphate)와 phosphocreatine(PCr)을 비교하였다.

결과 : 생리적 변수의 변화에서는 실험군 모두에서 정상 대조군에 비하여 혈압, 동맥혈 산소 분압, pH, base excess 등이 유의하게 감소하였고($P<0.05$), 젖산은 유의하게 증가하였다($P<0.05$). L-NMMA와 L-Arg군에서 실험 대조군과 유의한 차이는 없었다. 실험군에서 RR 1시간 후 pH를 제외한 혈압, 동맥혈 산소 분압, base excess 등의 이상소견은 모두 기저치로 회복되었고, 실험군간에 유의한 차이가 없었다. NIRS 조건에서 HbO₂와 HbD는 HI 동안 정상 대조군에 비하여 실험군 모두에서 유의하게 감소하였으나($P<0.05$), RR 직후 기저치로 회복되었으며, HbO₂는 RR 40분 이후 정상 대조군에 비해 유의하게 감소하였다($P<0.05$). Hb은 정상 대조군을 제외한 모든 실험군에서 HI 동안 유의하게 증가하였다($P<0.05$), RR 직후 기저치로 회복되었다. 산화 Cyt aa₃는 HI 동안 실험군 모두에서 감소하는 경향을 보였고, RR 이후 다시 증가하였다. 정상 대조군과 각 실험군간에 유의한 차이는 없었다. 뇌의 Na⁺, K⁺-ATPase 활성도와 conjugated dienes은 실험군 모두에서 정상 대조군(제1군)에 비하여 유의하게 감소하였다($P<0.05$). 뇌의 ATP, phosphocreatine은 실험군 모두에서 정상 대조군과 차이가 없었고, 또한 실험군간에도 유의한 차이가 없었다.

결론 : 신생 자돈에서 급성 저산소성 허혈 이후 재산소-재관류기 동안 NO 합성 억제제인 L-NMMA나 NO 생성 촉진제인 L-arginine이 뇌 혈역학이나 뇌의 에너지 대사에는 특별한 변화를 일으키지 않았다. 따라서 급성 저산소성 허혈성 뇌손상에서 재산소화 재관류기 초기에는 NO가 뇌손상의 주요한 기전으로 작용하지 않을 것으로 사료된다. 또한 뇌혈역학 및 생화학적 검사 결과 등에서 급성기에는 에너지 부진 상태가 주요한 세포손상 기전이 아니고, 이온 농도의 변화에 의한 뇌부종, 산소유리기에 의한 뇌세포 손상이 저산소성 허혈성 뇌손상의 급성기에 주로 작용하는 뇌세포 손상의 주요 기전임을 시사한다. 따라서 NO 생성 억제제 혹은 생성 전구물질인 L-Arg은 뇌신경 세포 보호 효과를 보이지 않아 급성 주산기 가사의 치료제로서 제한이 됨을 알 수 있었다. 그러나 좀 더 명확한 효과를 보기 위하여 선택적 억제제의 사용, 제제의 용량 및 투여시기, 손상 후 좀 더 긴 시간 이후의 변화에 대한 연구가 필요하다.

References

- 1) Freeman JM, Nelson KB. Intrapartum asphyxia and cerebral palsy. *Pediatrics* 1988;82:240-9.
- 2) Vannucci RC. Hypoxic-ischemic encephalopathy. *Am J Perinatol* 2000;17:113-20.
- 3) Volpe JJ. Hypoxic-ischemic encephalopathy: Clinical aspects, In: Volpe JJ, eds. *Neurology of the newborn*, 4th Edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders 2001, p331-96.
- 4) Hallenbeck JM, Dutka AJ. Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch Neurol* 1990;47:1245-54.
- 5) Lorek A, Takei Y, Cady EB, Wyatt JS, Penrice J, Edwards AD, et al. Delayed("secondary") cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in the newborn piglet: continuous 48-hour studies by phosphorus magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res* 1994;36:699-706.
- 6) Iadecola C, Xu X, Zhang F, el-Fakahany EE, Ross ME. Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:52-9.
- 7) Sato S, Tominaga T, Ohnishi T, Ohnishi ST. Electron paramagnetic resonance study on nitric oxide production during focal ischemia and reperfusion in the rat. *Brain Res* 1994;647:91-6.
- 8) Yoshida T, Waeber C, Huang Z, Moskowitz MA. Induction of nitric oxide synthase activity in rodent brain following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* 1995;194:214-8.
- 9) Buisson A, Plotkine M, Boulu RG. The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol* 1992;106:766-7.
- 10) Nagafuji T, Sugiyama M, Muto A, Makino T, Miyauchi T, Nabata H. The neuroprotective effect of a potential and selective inhibitor of type I NOS(L-MIN) in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neuroreport* 1995;6:1541-5.
- 11) Dawson DA, Kusumoto K, Graham DI, McCulloch J, Macrae IM. Inhibition of nitric oxide synthesis does not reduce infarct volume in a rat model of focal cerebral is-

- chaemia. *Neurosci Lett* 1992;142:151-4.
- 12) Buchan AM, Gertler SZ, Huang ZG, Li H, Chaundy KE, Xue D. Failure to prevent selective CA1 neuronal death and reduce cortical infarction following cerebral ischemia with inhibition of nitric oxide synthase. *Neuroscience* 1994; 61:1-11.
 - 13) Sadoshima S, Nagao T, Okada Y, Fujii K, Ibayashi S, Fujishima M. L-arginine ameliorates recirculation and metabolic derangement in brain ischemia in hypertensive rats. *Brain Res* 1997;744:246-52.
 - 14) Jobsis FF. Noninvasive infrared monitoring of cerebral and myocardial sufficiency and circulatory parameters. *Science* 1977;198:1264-7.
 - 15) Wray S, Cope M, Delpy DT, Wyatt JS, Reynolds EO. Characterization of the near infrared absorption spectra of cytochrome aa3 and hemoglobin for the noninvasive monitoring of cerebral oxygenation. *Biochem Biophys Acta* 1988; 933:184-92.
 - 16) Chang YS, Park WS, Lee MH, Kim KS, Shin SM, Choi JH. Delayed cerebral energy failure after acute hypoxia-ischemia in newborn piglet under 48 hours of continuous monitoring using near-infrared spectroscopy. *J Korean Pediatr Soc* 1998;41:1198-208.
 - 17) Harik SI, Doull GH, Dick AP. Specific ouabain binding to brain microvessels and choroid plexus. *J Cereb Blood Flow Metab* 1985;5:156-60.
 - 18) Lamprecht W, Stein P, Heinz F, Creatine phosphate. In Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press Inc, 1974:1777-81.
 - 19) Berger R, Jensen A, Krieglstein J, Steigelman JP. Effects of acute asphyxia on brain energy metabolism in fetal guinea pigs near term. *J Dev Physiol* 1991;16:9-11.
 - 20) Martin LJ, Brambrink MA, Lehmann C, Portera-Cailliau C, Koehler R, Rothstein J, et al. Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann Neurol* 1997;42:335-48.
 - 21) Riikonen RS, Kero PO, Simell OG. Excitatory amino acids in cerebral fluid in neonatal asphyxia. *Pediatr Neurol* 1992; 8:37-40.
 - 22) Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 1988;11:465-9.
 - 23) Delivoria-Papadopoulos M, Mishra OP. Mechanism of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 1998;132:S30-S34.
 - 24) Pang Z, Geddes JW. Mechanism of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci* 1997;17: 3064-73.
 - 25) Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991;14:60-7.
 - 26) Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, as calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:682-5.
 - 27) Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, et al. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci* 1993;16:323-8.
 - 28) Nazaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Bredt DS, et al. Possible origins and distributions of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13:70-9.
 - 29) Kano T, Shimizu-Sasamoto M, Huang PL, Moskowitz MA, Lo EH. Effects of nitric oxide synthase gene knockout on neurotransmitter release in vivo. *Neuroscience* 1998;86:695-9.
 - 30) Cholet N, Seylaz J, Lacombe P, Bonvento G. Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:1191-201.
 - 31) Iadecola C, Zhang F. Permissive and obligatory roles of NO in cerebrovascular responses to hypercapnia and acetylcholine. *Am J Physiol* 1996;271:R990-R1001.
 - 32) Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:4651-5.
 - 33) Ma J, Meng W, Ayata C, Huang PL, Fishman MC, Moskowitz MA. L-NNA-sensitive regional cerebral blood flow augmentation during hypercapnia in type III NOS mutant mice. *Am J Physiol* 1996;271:H1717-9.
 - 34) Dalkara T, Yoshida K, Irikura K, Moskowitz MA. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 1994;33:1447-52.
 - 35) Park WS. Clinical applications of near infrared spectroscopy. *J Korean Pediatr Soc* 1996;39:595-602.
 - 36) Wyatt JS, Cope M, Delpy DT, Richardson CE, Edwards AD, Wray S, et al. Quantitation of cerebral blood volume in human infants by near-infrared spectroscopy. *J Appl Physiol* 1990;68:1086-91.
 - 37) Kariman K, Hempel FG, Jobsis FF. In vivo comparison of cytochrome aa3 redox state and tissue pO₂ in transient anoxia. *J Appl Physiol* 1983;55:1057-63.
 - 38) Chang YS, Park WS, Lee M, Kim KS, Shin SM, Choi JH. Near infrared spectroscopic monitoring of secondary cerebral energy failure after transient global hypoxia-ischemia in newborn piglet. *Neurol Res* 1999;21:216-24.
 - 39) Erecinska M, Silver IA. ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:2-19.
 - 40) Cao W, Carney JM, Duchon A, Floyd RA, Chevion M. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury in brain. *Neurosci Lett* 1988;88:233-8.