

급성 일산화탄소 중독 후 해마에서 Parvalbumin 양성 중간뉴론의 변화에 대한 N-acetylcystein의 효과

김선태 · 유수진

원광대학교 의과대학 응급의학교실

Effects of N-acetylcystein on changes in parvalbumin-positive interneurons in the hippocampus after carbon monoxide poisoning

Seon Tae Kim, M.D., Su Jin Yoo, M.D., Ph.D.

Department of Emergency Medicine, Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Korea

Purpose: The purpose of this study was to investigate effect of N-acetylcysteine (NAC) on the injury of putative parvalbumin positive interneurons defined by molecular marker and hippocampal long-term potentiation (LTP), a marker of neural plasticity following acute carbon monoxide (CO) poisoning.

Methods: Adult Sprague-Dawley rats were exposed to 1100 ppm CO for 40 minutes followed by 3000 ppm CO for 20 minutes. Animals received daily intraperitoneal injection of NAC (150 mg/kg) for 5 days after CO exposure. Changes in learning and spatial memory were evaluated by Y-maze test 5 days after the poisoning. In vivo LTP in hippocampal CA1 area was evaluated by using extracellular electrophysiological technique. Immunohistochemical staining were adopted to observe expressional damages of parvalbumin (PV) immunoreactive interneurons in the hippocampus following the poisoning.

Results: Acute CO intoxication resulted in no changes in memory performance at Y-maze test but a significant reduction of LTP in the in hippocampal CA1 area. There was also a significant reduction of PV (+) interneurons in the hippocampal CA1 area 5 days after CO poisoning. Daily treatment of NAC significantly improved hippocampal LTP impairment and reduced immunoreactivity for PV in the hippocampus following the acute CO poisoning.

Conclusion: The results of this study suggest that reduction of hippocampal LTP and PV (+) interneurons in the hippocampus is sensitive indicator for brain injury and daily NAC injections can be the alternative therapeutics for the injury induced by acute CO poisoning.

Key Words: CO poisoning, hippocampus, long-term potentiation (LTP), parvalbumin (PV), N-acetylcystein (NAC)

서 론

일산화탄소는 무색, 무취, 무자극성 기체로 체내에 흡입 시 혈색소와의 결합능이 산소보다 200배 이상 높아 일산화탄소혈색소(carboxyhemoglobin, COHb)를 형성함으로써 조직로의 산소 해리를 방해하여 각 조직의 저산소성 손상을 유발한다. 급성 일산화탄소(carbon monoxide, CO) 중독은 전세계적으로 보고되는 여러 유형의 치명적인 중독환자 중에서 절반 이상을 차지하며¹⁾, 미국의 경우 급성 CO 중독으로 매년 약 5만 명 이상이 응급실에 내원하고, 연간 약 1천 명 이상의 사망자가 발생한다²⁾. 우리나라에서는 급성 CO 중독에 의한 자살 사례의 증가와 함께 최근 캠핑 인구가 증가하면서 텐트 내에서 사용하는 난방기구의 불완전 연소 및 환기 장애로 급성 CO 중독 환자 수가 증가하고 있는 추세이다³⁾.

CO 중독은 노출 정도와 기간에 따라 다양한 신경학적 증상들을 유발하는데, 급성기에는 저산소증으로 인하여 에너지 대사가 높은 뇌에서 세포 손상이 유발되고 두통, 어지럼증, 의

책임저자: 유 수 진
전라북도 익산시 무왕로 895
원광대학교 의과대학 응급의학교실
Tel: +82-63-859-1150
Fax: +82-63-859-2129
E-mail: ysoojin58@gmail.com

투고일: 2021년 8월 20일
1차 심사일: 2021년 9월 6일
게재 승인일: 2021년 10월 20일

식적하, 실신, 경련과 같은 증상이 나타날 수 있으며 사망에까지 이를 수 있다⁴⁾. 또한 지연성 뇌손상에 의해 파킨슨 증후군, 치매, 인지장애, 보행장애, 운동 및 감각 장애, 우울 및 불안장애 등의 지연성 신경학적 후유증(delayed neurologic sequelae, DNS)이 발생할 수 있다⁵⁾.

임상적으로 아세트아미노펜 중독환자의 해독제로 알려진 N-acetylcysteine (NAC)은 glutathione의 전구물질인 cysteine 대사체로서, 아세트아미노펜의 대사물질이며 간세포의 손상을 유발하는 N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)의 결합을 억제하고, 체내 주요 항산화제인 glutathione의 생성을 증가시켜 간 손상을 예방한다^{6,7)}. 한편 최근 다양한 실험연구에서 NAC은 항산화제인 glutathione의 합성을 증가시키고 반응성 산소종(reactive oxygens species, ROS)을 제거함으로써 신경세포의 산화성 스트레스 손상(oxidative stress injury)에 대한 보호작용을 나타냈으며, 정신질환 및 퇴행성 뇌질환의 치료 보조제로 유효성을 보였고, 뇌경색, 뇌출혈, 외상성 뇌손상과 같은 급성기 뇌질환의 기능장애에서도 치료 효용성이 확인되었다^{8,9)}.

Parvalbumin (PV)은 세포 내 칼슘을 결합한 단백질로 억제성 중간뉴런의 세포내 이온 항상성 조절에 관여하며, 특정 억제성 중간뉴런들의 일부에서 선택적으로 발현하여 신경해부학적 표지자로 이용된다. PV 양성 중간뉴런은 시냅스 회로를 통해 흥분성 신경세포를 효과적으로 억제하고 활성을 적절히 조절하기 위해 전기생리학적으로 자발 흥분성이 피라미드 뉴런보다 빨라서 요구되는 adenosine triphosphate (ATP) 양이 많으며 에너지 대사가 더 높은 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 이에 따라 여러 선행연구에서 PV 양성 중간뉴런은 저산소증과 스트레스 같은 환경에 취약하고 조현병, 양극성장애, 알츠하이머 치매나 간질과 같은 다양한 신경정신과적 질환들에서 병태생리학적 변화가 관찰되었으며 결핍 및 기능장애가 나타났다¹¹⁾. 그러나 급성 CO 중독으로 인한 허혈성 뇌손상 모델에서 뉴런의 변화와 이에 대한 NAC의 효용성에 대해 구체적으로 연구한 사례는 보고된 바가 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 급성 CO 중독 후 해마에서 PV 양성 중간뉴런의 손상 정도와 항산화제인 NAC에 의한 신경세포의 보호 효과를 확인하고자 한다.

대상과 방법

1. 실험동물

실험동물로 성숙한 Sprague-Dawley계 수컷 쥐(250-300 g, Samtako, Osan, Korea)를 사용하였다(n=27). 이때 동물실험에 관련된 모든 절차는 원광대학교 실험동물관리위원회 규정에 의거하여 시행하였다(승인번호 WKU20-11). 실험 7일 전에 동물을 구입하여 실험실 환경에 적응시켰고, 사육실 평균온도는 22±1°C, 습도는 55%로 유지하였다. 12시간 간격으로 명암을 조절하여 07:00부터 19:00까지 조명을 제공하였고 필터한 물을 섭취는 제한하지 않았다.

실험동물은 다음과 같이 3개의 군으로 분류하였다. (1) 정상 공기를 호흡한 대조군(control, n=9), (2) CO 중독 후 생리식염수를 투여한 실험군(CO+saline, n=9), (3) CO 중독 후 NAC 투여군(CO+NAC, n=6)으로 구분하였다. 이때 대조군 및 실험군의 실험동물은 COHb 검사(n=3), 전기생리학적 검사(n=3), 조직학적 검사(n=3)를 각각 시행하였고, 투여군에서는 전기생리학적 검사(n=3), 조직학적 검사(n=3)를 각각 시행하였다. 한편 실험동물 3예는 CO 중독 유발 과정 중 3000 ppm 농도의 CO에 노출되었을 때 사망하였다.

2. 급성 CO 중독 유발

본 연구에서 흰쥐를 대상으로 급성 CO 중독 유발은 선행연구와 유사한 방법으로 다음과 같이 시행하였다¹²⁾. 투명한 아크릴로 제작한 밀폐 챔버(7 L, LifeTech Korea, Korea)를 이용하였으며, 실험군과 투여군의 쥐를 각각 밀폐 챔버에 위치시켜 밀폐한 후 CO 혼합 가스(0.3%, 3000 ppm, Hanshin Gas, Korea)를 분당 5 L 속도로 주입하였다. 토출용 밸브를 개방하고 일산화탄소 측정기(TPI 707A, TPI Inc., Korea)를 연결하여 CO 농도가 1100 ppm에 도달했을 때 CO 혼합 가스 주입을 중단하였다. CO 중독을 유발하는 동안 실험동물의 체온을 일정하게 유지하기 위해 밀폐 챔버를 분리한 후 항온 챔버(28°C) (SW-90S, Sangwoo Scientific Co., Korea)에 위치시켜 40분간 유지하였다. 이후 0.3% CO 혼합 가스를 추가적으로 주입하여 챔버 내 CO 농도를 3000 ppm에 도달하게 하였고, 실험동물을 20분 동안 추가적으로 유지시킨 후 밀폐 챔버로부터 빼내어 정상 공기호흡을 하도록 하였다. 이러한 CO 중독 유발 과정 중 외부 소음 자극에 반응이 없고 전혀 움직이지 않는 상태를 의식소실로 간주하였다.

한편 CO 혼합 가스가 실험자에서 독성을 유발할 수 있어 CO 혼합 가스를 주입하는 동안 밀폐 챔버는 외부와 연결되어 있는 흡후드 시스템(SHF 2011-4, Shinsegae airtech industry Co., Korea)내에 위치하였으며, CO 혼합 가스를 주입하는 과정을 포함한 전 실험과정 동안 후드내 공기가 외부로 강제 배출될 수 있도록 하였다. 또한 CO 분석기(single channel gas monitor GMS-3000, Woori system, Korea)을 후드내와 밖에 설치하여 CO 중독 실험이 진행되는 동안 흡후드 시스템 밖으로 CO 가스가 유출되는 것을 감시하였다.

CO 중독 유발 후 심장관류 뇌 고정을 실시하기 전에 좌심실에서 0.5 ml의 혈액을 채취하여 동맥혈 가스분석기(Cobasb 221 system, Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 통해 COHb 농도를 측정하였다. 대조군의 모든 실험절차는 일산화탄소 중독 절차와 같은 조건하에서 진행되었으나 CO 혼합가스 대신 정상 공기를 주입하였으며, 실험동물을 1시간 10분 동안 챔버에서 유지하였다.

3. NAC 투여

본 연구에서 NAC은 스파탐주 10%(명인제약, 한국)를 생리 식염수에 100 mg/ml 농도로 희석 후 사용하였으며, 급성 CO 중독 직후부터 150 mg/kg 용량으로 매일 1회, 5일간 복강내 투여하였다.

이때 NAC 투여량은 아세트아미노펜 중독에 의한 간독성의 표준 치료로 사용되는 NAC의 용량을 참고하였다.

4. Y-maze 검사

공간 인지 및 기억 능력을 객관적-정량적으로 측정하기 위해 선행연구에서 제시한 방법과 유사하게 Y-maze 검사를 시행하였다¹³⁾. Y-maze 검사에 이용되는 기구는 검정색 polyvinyl plastic으로 만들어진 3개의 가지로 구성되어 있으며, 가지의 길이는 42 cm, 넓이는 8 cm, 높이는 21 cm이고, 각각의 가지가 접하는 각도는 120°로 하였다(Fig. 1). 전체 Y-maze는 LED 램프(LED Circle Ceiling Light Lamp White Warm white 12 W)로 간접 조명을 해서 균일한 조도를 유지하고 각각의 미로를 A, B, C 영역으로 정한 후 하나의 영역에 실험동물을 조심스럽게 놓고 8분간 자유롭게 움직이도록 한 다음, 실험동물이 들어간 영역을 천정에 설치한 카메라를 통해 컴퓨터 프로그램(Ethovision 3.1)으로 관찰하여 기록하였다. 결과의 분석은 8분 동안 횡령이 Y-maze의 각 미로를 통과한 총 횟수 및 순서를 측정하여 자발적 교대 비율(spontaneous alternation %)을 평가

하였다. 세 곳의 다른 영역에 순차적으로 들어간 경우 1점(실제 교대: actual alternation, 즉 ABC, BCA, CAB 등의 순서)으로 인정하였다. 연속되게 들어가지 않은 경우는 점수로 인정하지 않았다. 따라서 자발적 교대 비율(spontaneous alternation %)은 다음의 계산식을 이용하였다.

$$\text{Spontaneous alternation \%} = (\# \text{ spontaneous alternations}) / (\text{total number of arm entries} - 2) \times 100.$$

5. 해마 신경망에서 장기강화(long-term potentiation, LTP)의 유발 및 기록

실험동물을 urethane (1.2 g/kg)으로 전신마취 후 두부정위 장치(stereotaxic instrument) (Narishige, Japan)에 두부를 고정하고 수술 현미경하에서 미세드릴로 두개골을 절단하여 뇌를 노출시켰다. 해마 CA1 영역(AP 2.5-3.5 mm, ML 1.5-2.5 mm, DV 2.5 mm from bregma)의 방사층(stratum radiatum, SR층)에 기록용 텅스텐 전극(impedance 5 M Ω , WPI, USA)을 삽입하였고 CA3 영역(AP 4.0 mm, ML 3.5 mm, DV 3.5 mm from bregma)에 자극용 양극성 금속전극(WPI, USA)을 삽입하였다.

흥분성 후시냅스 유발전위(field excitatory postsynaptic potentials, fEPSPs)를 유발하기 위하여 전기자극기(pulse generator, WPI, USA)를 이용하였으며, 단일 구형파(0.1 ms, -0.2 mA)로 Schaffer collateral fiber를 흥분시켰다. 1차 및 2차 신호증폭기(preamplifier, Cyber Amp 320, axon instrument)로 fEPSPs를 증폭한 다음 analogue/digital (A/D) 변환기(CED

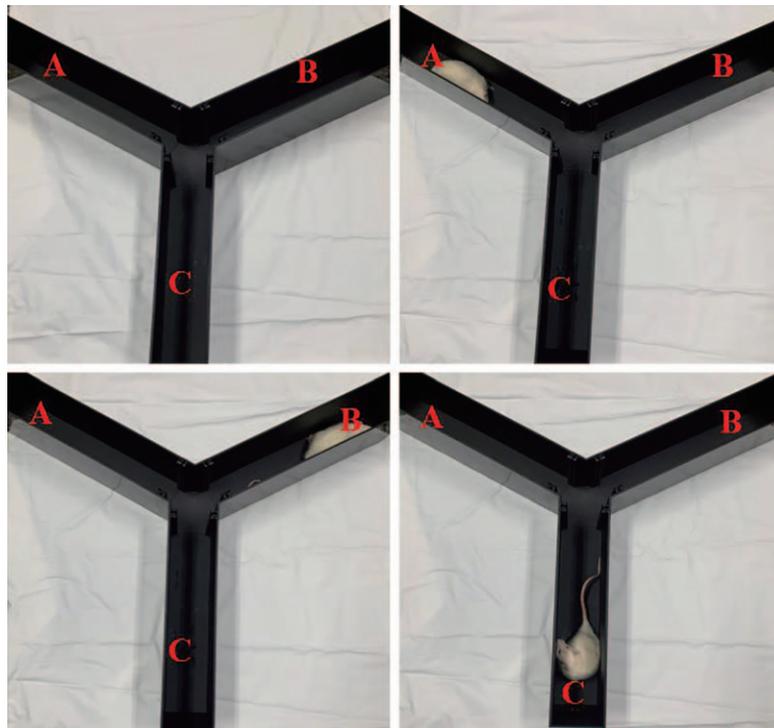


Fig. 1. Photographs showing the Y-maze apparatus with three identical plastic arms (same length) at a 120° angle from each other. In the sample phase, the rat is placed at the start arm (Arm A). Rat can walk each arm spontaneously during Y-maze test.

1401, UK)를 경유하여 Signal 프로그램(Cambridge Electronic Design Co., UK)으로 fEPSPs를 기록하고 컴퓨터에 저장하였다.

자극 강도의 변화에 따른 fEPSPs의 진폭 변화로 input-output curve를 산출하였으며, fEPSPs 최대 진폭의 50% 값을 유발하는 50% 자극강도(half maximal intensity)를 설정하였다. LTP 유발 전 기저기록(baseline recording)은 15-20분 동안 5분 간격으로 단일 구형파 자극을 시행하여 유발된 fEPSPs를 기록하였다. LTP 현상을 유발하기 위하여 theta burst 자극을 1분 간격으로 3회 실시하였는데, 이때 theta burst 자극은 10 ms 간격으로 4개의 구형파로 구성된 burst 파형(4 pulses, 100 Hz)을 200 ms 간격(5 Hz)으로 5회 반복하는 것으로 구성하였다.

결과적으로 모든 실험군의 3예에서 해마의 cornu ammonis (CA)3 영역을 자극하여 CA1 영역에서 기저 fEPSPs를 기록한 다음 theta burst 자극으로 LTP을 유도한 후 fEPSPs를 5분 간격으로 80분 동안 기록하였으며, fEPSPs의 기울기(slope)를 분석하여 LTP 현상의 변화를 관찰하였다.

LTP 현상의 분석은 기저기록 동안 기록된 각 fEPSPs의 기울기로부터 평균값(baseline mean slope)을 산출한 다음, theta burst 자극 후 기록된 fEPSPs의 기울기값을 기저 fEPSPs 평균 기울기값의 비(ratio)로 전환하여 %로 환산하였다. 즉, LTP (%)=(fEPSPs slope after theta burst)/(baseline fEPSPs mean slope)×100

6. 면역조직화학검사 및 영상분석

모든 실험동물을 urethane (1 g/kg)으로 마취 후 pH 7.4의 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 심장을 관류하여 혈액을 제거하였으며, 다시 4% paraformaldehyde로 관류시킨 후 뇌를 분리하였다. 분리된 뇌는 4% paraformaldehyde에서 3시간 동안 실온에서 고정된 후 30% sucrose에서 2일 이상 유지하였다.

Cryostat (Leica, Germany)를 이용하여 40 μm의 두께로 조직 절편을 만들어서, peroxidase의 활성을 억제하기 위하여 3% H₂O₂ 용액에서 30분 동안 진탕하였고, 이후 0.3% Triton-X 100으로 30분간 진탕하였다. 그 후 1% 정상 염소 혈청 용액으로 실온에서 30분간 처리한 1차 항체(NeuN (neuronal nuclear protein), 1:2000, Parvalbumin, 1:1000, Abcam, USA)를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰으며, 그 후 2차 항체인 Polymer HRP anti-rabbit IgG (GBL Labs, USA)을 실온에서 40분간 처리하여 chromogen인 0.05% diaminobenzidine+0.1% nickel 용액으로 발색하였다. 조직을 슬라이드글라스에 부착하여 건조, 탈수과정을 거쳐 커버글라스를 덮어 광학현미경 하에서 100배율로 암갈색의 면역 양성 뉴런을 관찰하고 디지털 카메라로 촬영하여 그 영상을 컴퓨터에 저장하였다.

해마에서 NeuN 또는 PV 양성 뉴런들을 정량적으로 분석하기 위하여 자동영상분석 프로그램인 Image J (NIH, USA) 프로그램을 사용하여 모든 디지털 칼라영상들은 8-bit 흑백영상(gray

scale image)으로 전환하였다. 8-bit 흑백영상은 pixel의 밝기를 0-256 수준으로 분류할 수 있으며 이때 pixel 밝기가 어두울수록 256 값에, 밝을수록 0 값에 근접할 수 있도록 세팅하였다.

Image J 프로그램의 'threshold' 기능을 이용하여 일정 gray scale 값 이상을 갖는 pixel 영상만 분석되도록 하였다. 현미경 대물렌즈 100배율에서 촬영한 해마 영상에서 대상을 선택하여 특정 영역으로 설정한 다음 분석 프로그램의 'Measurement' 기능을 이용하여 이들 영역의 평균 gray scale 값을 산출하였다. 또한 분석 프로그램의 'Analyze Particles' 기능을 이용하여 일정 gray scale 값 이상을 갖는 세포체의 수를 분석하였다.

7. 통계의 분석

각 실험군의 값은 평균과 표준편차로 기술하였고, 통계처리는 Kruskal-Wallis test을 이용하여 사후 검증으로 Bonferroni 보정에 의한 Mann-Whitney test를 통해 다중비교를 시행하였다. *p* 값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 급성 CO 중독 후 행동학적 변화 및 COHb농도변화

실험군(n=3)에서 CO 중독 후 30분 내에 좌심실에서 채취한 혈액의 COHb 농도는 45.1±4.5%을 보였다. 한편 정상 공기를 호흡한 대조군(n=3)의 좌심실에서 채취한 혈액의 COHb 농도는 0.2±0.3%이었다.

CO 중독을 유발하는 동안 1100 ppm의 CO 농도에 40분간 노출시킨 이후부터 움직임이 현저하게 감소하였으며, 추가적으로 3000 ppm의 CO 농도에서 20분간 노출시킨 후 실험 동물들(n=18)에서 의식소실이 초래되었고, 이중 3예가 사망하였다.

2. 급성 CO 중독 후 기억력과 학습능력의 변화에 대한 NAC의 효과

각 실험군의 실험동물을 대상으로 급성 CO 중독 후 기억력과 학습능력의 변화를 확인하기 위하여 Y-maze 검사를 실시하였다. 8분 동안 Y-maze의 각 미로를 통과한 총 횟수의 평균이 대조군(n=6)은 21회, 실험군(n=6)은 20회, 투여군(n=6)은 21.2회로 각 실험군 간에 유의한 차이가 없었다(*p*=0.12).

자발적 교대 비율(spontaneous alternation %)에서도 대조군은 74.2±2.2%, 실험군은 68.1±5.2%, 투여군은 75.15±2.2%으로 실험군이 감소하는 경향을 보였으나 대조군, 투여군에는 통계적 유의성을 보이지 않았다(*p*=0.09) (Fig. 2).

3. 급성 CO 중독 후 해마 LTP에 대한 NAC의 효과

CO 중독을 유발하지 않은 대조군(n=3)에서 fEPSPs의 기울기를 이용한 LTP 유발율(%)을 분석하였을 때 theta burst 자극 직후 각 실험예에서 164.7%, 182.0%, 162.9% (169.9±10.5%, Mean±SD%)였으며, 30분 후에는 143.2% 149.1%, 158.8% (150.3±7.8%)로 측정되었고, 80분 후에 LTP 유발율은 각 실험예에서 156.9%, 155%, 126.9% (146.2±16.7%)로 관찰되었

다. 실험군(n=3)의 LTP 유발율은 theta burst 자극 직후 156.9%, 155.2%, 124.8% (145.62±18.1%)였으며, 자극 30분 후에 126.0%, 125.1% 117.4% (122.8±4.7%)이었고, 80분 후에는 109.1%, 100.2% 106% (105.1±4.5%)로 관찰되었다. 투여군(n=3)에서 각 실험예의 LTP유발율은 theta burst 자극 직후 166.4%, 163.4%, 133.6% (154.5±18.1%)였으며, 자극 30분 후에 137.6%, 129.4%, 139.1% (135.3±5.2%), 80분 후에는 121.2%, 127.8%, 124.3% (124.4±3.3%)로 LTP 변화가 관찰되

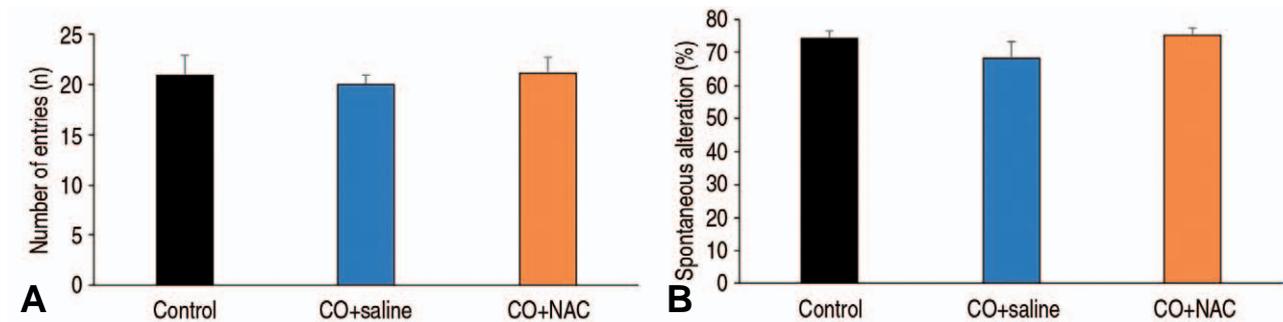


Fig. 2. Changes in working memory performance in Y-maze test. (A) Total number of arm entry under the same experimental condition was represented as mean ± SD. (B) Spontaneous alteration (%) was calculated as follows. Spontaneous alteration %=(# spontaneous alternations)/(total number of arm entries-2)×100. SD: standard deviation, NAC: N-acetylcystein, CO: carbon monoxide.

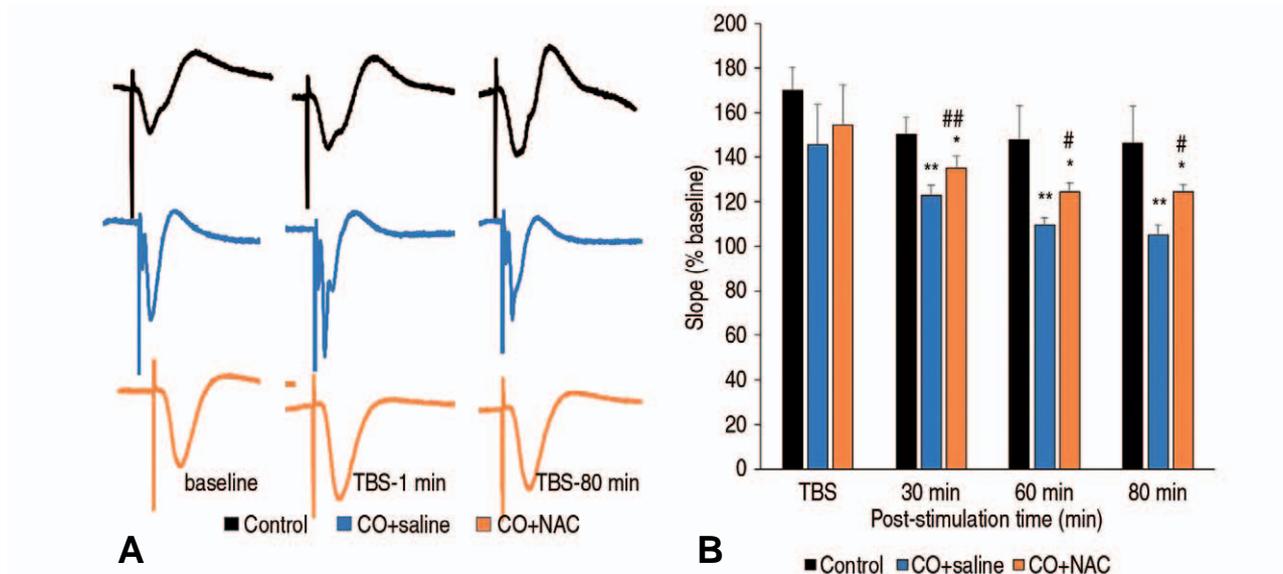


Fig. 3. Induction of LTP. (A) Representative examples for potentiation of fEPSPs traces from hippocampal CA1 area following TBS of Schaffer collateral axons in CA3 area of three experimental groups. LTP was evoked by three TBS that consisted of 5 trains of 4 pulses at 100 Hz delivered at 200 ms intervals. (B) Time-dependent changes in the slope (%) of fEPSPs potentiation in hippocampal CA1 area of three experimental groups following LTP induction. Values at data points are means ± SD of normalized slope of fEPSPs. Number of rats in each groups is 3. * Represent significant difference between control and CO+saline or CO+NAC (*p<0.05, **p<0.01). # Represent significant difference between CO+saline and CO+NAC (#p<0.05, ##p<0.01). LTP: long-term potentiation, fEPSPs: field evoked excitatory post-synaptic potentials, CA: cornu ammonis, TBS: theta burst stimulation, CO: carbon monoxide, NAC: N-acetylcystein

었다(Fig. 3).

비모수통계 및 사후 검증을 통하여 LTP 유발을에서 대조군과 실험군 간에 theta burst 자극 후 30분과 80분에서 유의한 차이를 보였으며($p < 0.01$), 또한 실험군과 투여군의 비교 시에도 30분($p < 0.01$)과 80분($p < 0.05$)에서 유의한 차이가 관찰되었다(Fig. 3).

4. 급성 CO 중독 후 해마에서 NeuN, Parvalbumin 양성뉴론의 변화에 대한 NAC의 효과

NeuN 단백질은 중추신경계 대부분의 뉴론에서 핵과 원형질에 위치하고 있으며 뉴론의 핵 항원 표지자로 NeuN 면역양성세포는 신경세포를 의미한다¹⁴⁾. 이에 따라 해마에서 NeuN 면역양성반응은 뉴론의 세포체가 위치하고 있는 영역에서 강하게 관찰되는데, 본 실험에서 해마 CA1 영역의 피라미드층(stratum pyramidale, SP층)에서 저명하게 관찰되었다.

실험동물의 해마 CA1 영역에서 항체를 통한 면역조직화학

염색 후 자동영상분석 프로그램을 통해 분석한 NeuN 면역양성세포의 수는 대조군($n=3$)의 실험예에서 각각 18개, 15개, 18개(17.2 ± 1.7)였으며, 실험군($n=3$)에서는 12개, 13개, 13개(12.7 ± 0.6 개), 투여군($n=3$)에서는 13개, 14개, 16개(14.1 ± 1.5)로 분석되었다. 통계분석결과 실험군에서 NeuN 면역양성세포가 감소하는 경향을 보였으나 대조군과 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 또한 투여군에서 NeuN 면역양성반응은 실험군과 유사하였으며 대조군과는 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

해마의 CA1 영역에서 PV 단백질 면역양성반응은 지행층(stratum oriens, SO층)에서 관찰되었으며, 특히 SO층 주변에 피라미드 뉴론보다 크기가 작은 뉴론들의 원형질에서 관찰되어 중간뉴론에 대한 PV 단백질 면역양성반응을 보였다. 또한 방사층(stratum radiatum, SR층)의 일부 첨부수상가지에서도 PV 단백질 면역양성반응을 보였다. PV 단백질 면역양성세포의 수는 대조군($N=3$)의 실험예에서 각각 96개, 100개, 89개(95 ± 5.6)였으며, 실험군($n=3$)에서는 74개, 46개, 66개(62 ± 12.7), 투여군

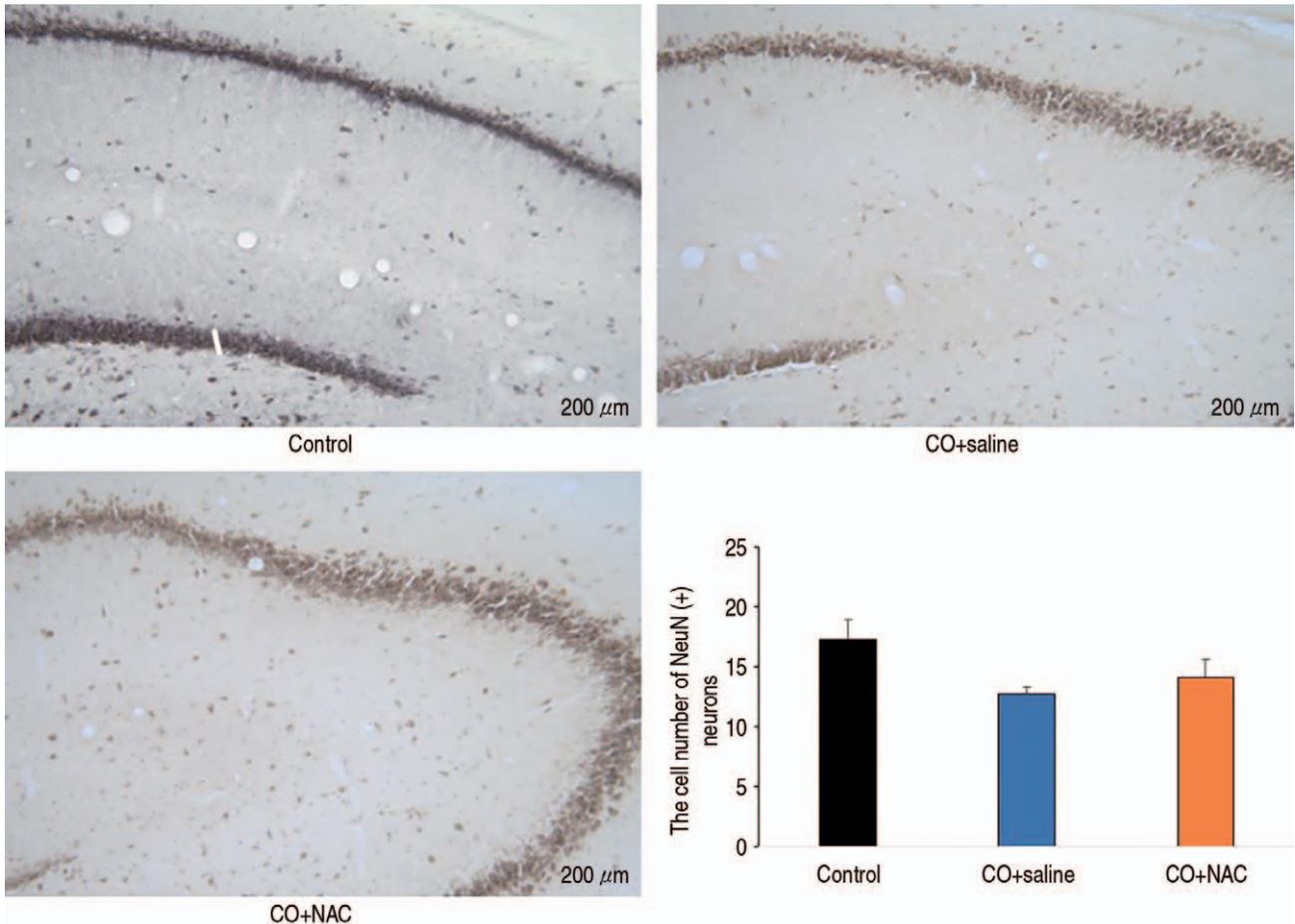


Fig. 4. Changes in NeuN (+) immunoreactivity in hippocampal region of 3 experimental groups.

Three images shows representative sections of NeuN (+) immunostaining in hippocampal sections.(immunohistochemistry, $\times 100$) Bar histogram represents stereologic quantification of NeuN (+) neurons numbers in the hippocampus CA1 subfields. Values represent the mean \pm SD. Number of rats in each groups is 3.

NeuN: neuronal nuclear protein, CA: cornu ammonis, SD: standard deviation, CO: carbon monoxide, NAC: N-acetylcystein

(n=3)에서는 93개, 71개, 91개(85±12.1)로 측정되었으며, 대조군과 비교하여 실험군의 해마 CA1 영역 SO층에서 중간뉴론들의 PV 단백질 면역양성반응이 유의하게 감소하였을($p < 0.05$) 뿐만 아니라 SR층의 침부수상가지에서도 PV 단백질 면역양성반응이 감소하였다. 그러나 SO층에서 투여군은 실험군과 비교하여 PV 단백질 양성 중간뉴론의 수가 유의하게 증가하였으나($p < 0.05$), SR층에서는 PV 단백질 면역양성반응의 차이는 없었다(Fig. 5).

고찰

본 연구에서 급성 CO 중독 후 기억력과 학습능력의 변화를 확인하기 위하여 흰쥐 모델을 대상으로 Y-maze 검사를 실시하였다. 8분 동안 흰쥐가 Y-maze의 각 arm을 통과한 총 횟수와 실험동물이 주변의 단서를 파악하여 순차적으로 미로를 들어가는 상대적 빈도를 측정된 자발적 교대 비율(spontaneous

alternation %)에서 실험군이 대조군보다 감소하였으나 유의한 차이가 없어, 본 급성 CO 중독 모델이 기억력과 학습능력의 현저한 저하를 초래하지 못했음을 확인하였다. 또한 NeuN 면역양성세포 수의 변화도 3 실험군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 Hiramatsu 등¹⁵⁾은 생쥐를 대상으로 급성 CO 중독 5일 후 시행한 Y-maze 검사에서 자발적 교대 비율이 유의미하게 감소하였다. 또한 Water maze 검사, passive avoidance 검사 등과 같은 다양한 연구기법을 이용한 기억력 장애를 보이는 연구들이 진행되었다^{16,17)}.

그리고 Xue 등¹⁸⁾의 연구에서는 흰쥐를 대상으로 급성 CO 중독 7일 후에 CA1 영역에서 NeuN 면역양성뉴론의 수가 현저하게 감소하였으며 행동검사에서 기억력 장애와 해마영역에서 유의미한 뉴론들의 손상이 동반되었다.

본 실험 모델에서는 선행 연구결과들과 달리 급성 CO 중독 후 기억력과 학습능력의 현저한 저하가 관찰되지 않았으며 이러한 상반된 차이는 급성 CO 중독 유발 과정에서 CO 가스의

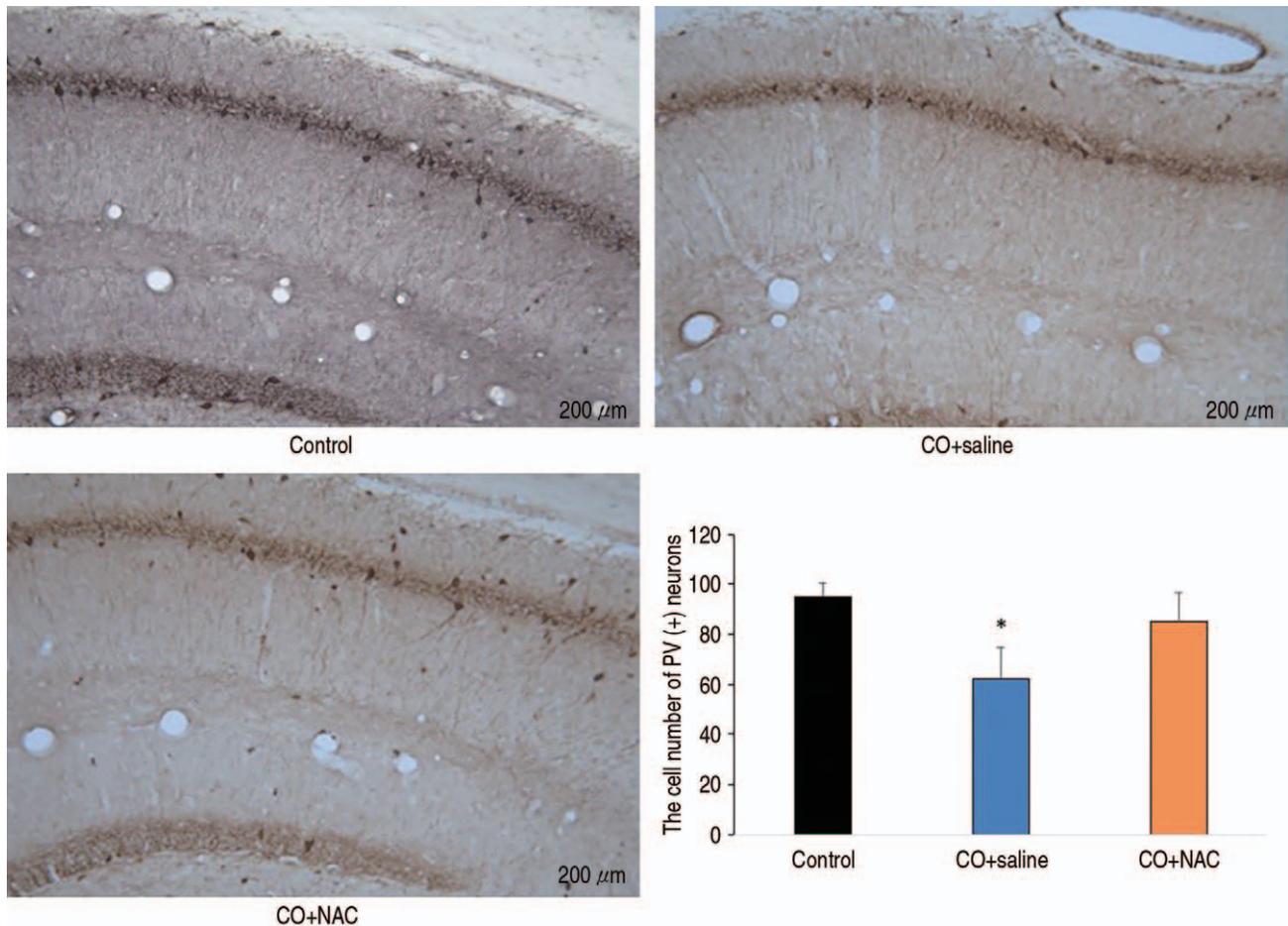


Fig. 5. Changes in PV (+) immunoreactivity in hippocampal region of 3 experimental groups.

Three images shows representative sections of PV (+) immunostaining in hippocampal sections. (immunohistochemistry, ×100) Bar histogram represents stereologic quantification of PV(+) neurons numbers in the hippocampus CA1 subfields. Values represent the mean±SD. Number of rats in each groups is 3.

* Represent significant difference between control and CO+saline (* $p < 0.05$).

PV: parvalbumin, CA: cornu ammonis, CO: carbon monoxide, NAC: N-acetylcystein

주입속도, 노출 시간과 횟수와 같은 실험조건의 차이로 인한 신경세포 손상 정도의 차이에서 기인할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 기억 및 학습에 관한 다른 평가방법을 사용하여 본 연구 모델에 적용하거나 추가적인 CO 노출을 통해 보다 심한 급성 CO 중독 모델을 제작하여 Y maze 검사를 시행하는 추가 연구들이 필요할 것으로 사료된다.

해마의 해부학적 구조는 cornu ammonis (CA), 치상핵(dentate gyrus), 해마이행부(subiculum)로 이루어져 있고 CA는 다시 CA1, CA2, CA3, CA4의 하위영역으로 구성되어 있다. 특히 치상핵, CA3, CA1 영역은 삼중 시냅스회로(trisynaptic loop)를 형성하여 신경세포들 간의 순차적인 전기화학적 신호전달을 통해 기억의 형성, 저장 및 회상하는데 중요한 역할을 한다¹⁹.

이렇게 형성된 신경망에 전기 자극을 가하면 fEPSPs가 쉽게 잘 발생하는데, 이때 theta 파형의 전기자극을 반복하면 fEPSPs가 100% 이상 커지는 것이 지속되는 현상 즉, 장기강화(long-term potentiation, LTP) 현상이 관찰된다. 이러한 LTP 현상은 학습과 기억의 형성과 관련되어 해마에서 나타나는 신경가소성의 중요한 기전이다²⁰. 본 연구에서 실험군의 fEPSPs 기울기는 theta 전기자극 직후 $145.62 \pm 18.1\%$ 였으며, 30분과 80분 후에 각각 $122.8 \pm 4.7\%$, $105.1 \pm 4.5\%$ 로 LTP 현상이 대조군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 그러나 급성 CO 중독 모델을 대상으로 한 선행연구에서 해마 CA1 영역의 시냅스에서 신경가소성 지표인 LTP에 대한 연구는 거의 진행되지 않았다. 다만, Mereu 등²¹의 선행연구에서 임신한 어미 쥐에 150 ppm CO 농도로 20여 일간 노출시켰을 때 태어난 어린 쥐의 해마에서 LTP 장애가 관찰되었다.

본 연구에서는 급성 CO 중독 후 대조군과 비교하여 실험군에서 해마 CA1 영역 중간뉴론들의 PV 단백질 면역양성반응이 현저하게 감소하였다. 그러나 급성 CO 중독 모델에서 이들 뉴론의 변화를 관찰한 선행연구는 확인되지 않아 본 연구결과를 충분히 이해할 수 없는 실정이다. 다만 일과성 허혈 흰쥐 모델의 해마 CA1 영역에서 GABA 신경전달물질을 가지고 있는 중간뉴론의 사멸은 잘 나타나지 않았으나 PV 양성 중간뉴론과 neuropeptide Y (NPY) 양성 중간뉴론은 허혈성 손상 5일 이내에서 감소하였다²². 이밖에도 알츠하이머 질환, 혈관성 치매, 노화 및 경련 실험모델에서도 해마에서 PV 양성 뉴론의 수가 유의하게 감소하였으며, 이러한 감소는 인지기능 장애와 연관성이 있음을 추론하였다²³.

해마 CA1 영역에서 LTP 현상은 반복적 theta파 자극 후 뉴론들에서 단백질의 합성에 의한 시냅스의 기능적, 구조적 변화가 동반되어야 발생한다. 따라서 본 연구에서 급성 CO 중독 후 해마 CA1 영역에서 PV 단백질의 발현 감소는 뉴론들의 기능 장애로 기인할 수 있고, 이러한 뉴론들의 기능 장애 및 결핍이 LTP 현상의 저하를 초래했을 것으로 사료된다. 또한 해마에서 LTP와 같은 전기생리학적 지표가 다른 행동학적 지표 또는 분자생물학적 지표보다 민감하게 변화할 수 있어 급성 CO 모델에서 시냅스의 기능평가에 LTP 현상이 적합한 지표로 사용될 수 있을

것으로 사료된다. 따라서 추가 실험으로 급성 CO 중독 모델의 대뇌피질, 선조체 등과 같은 다른 영역에서도 신경가소성과 관련된 전기생리학적 연구들이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

PV 양성 중간뉴론의 전기생리학적 특징은 자발 발화성이 매우 높아서 대뇌 신경망에서 빠른 주파수의 뇌파를 형성하는데 매우 중요하다. 전기생리학적으로 빠른 자발 발화성을 유지하기 위해서는 많은 에너지 대사가 요구되고 이로 인해 많은 양의 ATP가 필요하여 PV 양성 중간뉴론의 수상가지 및 세포체에는 많은 미토콘드리아가 존재한다^{10,11}. 이때 미토콘드리아는 크기가 크고, 에너지 대사에 매우 중요한 cytochrome c oxidase의 활성이 매우 큰 것으로 알려져 있다. 세포에서는 미토콘드리아의 에너지 대사과정 및 세포막의 산화효소에 의해서 H_2O_2 , OH 및 O_2 등과 같은 ROS를 생성한다. 따라서 미토콘드리아의 에너지 대사과정으로 ROS의 발생량이 많은 것이 PV 양성 중간뉴론의 생리학적 특징이다. 이는 저산소증과 같은 병태생리적 상황 시 PV 양성 중간뉴론의 미토콘드리아에서 ROS의 발생량이 현저하게 증가할 수 있음을 의미한다.

한편 산화성 스트레스 손상은 세포의 항산화능력을 초과하는 과도한 ROS의 증가로 인해 발생하며, 비가역적으로 신경세포의 주요 구조물인 DNA, 세포막, 및 단백질의 손상을 초래하여 결국 세포사멸을 유발한다⁴. 특히, 신경세포는 평소 에너지 대사가 많기 때문에 ROS의 발생이 보다 쉽게 일어나고 항산화능력이 다른 세포보다 낮아 ROS에 의한 산화성 스트레스 손상이 쉽게 나타날 수 있다²⁴.

CO 중독으로 인한 뇌손상의 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았으나 급성 CO 중독 후 과량으로 발생한 ROS로 인해 신경세포의 사멸과 괴사가 유발되는 산화성 스트레스 손상이 주된 원인으로 알려져 있다⁴. 이에 따라 많은 선행연구들을 통해 급성 CO 중독의 치료로 산화성 스트레스 손상을 억제하기 위한 항산화제, monoamine oxidase 억제제, N-methyl-d-aspartate (NMDA) 차단제 및 고압산소치료 등이 가장 잘 알려져 있다²⁵. 또한 Mannaioni 등²⁶은 항산화제로 glutathione, acetylcysteine 및 tempol의 사용을 제안하였다.

본 연구 결과에서 급성 중독 후 5일간 NAC 투여에 의해 해마 CA1 영역에서 기억 형성에 관련된 전기생리학적 지표인 LTP 현상의 감소가 유의하게 호전되었으며, PV 단백질 면역양성 중간뉴론의 감소가 유의하게 억제되었다. Kekec 등²⁷은 흰쥐를 대상으로 한 실험에서 1000 ppm의 CO 농도로 120분간 노출한 후 3000 ppm에서 의식소실 및 느린호흡이 관찰될 때까지 유지하고 바로 공기에 노출한 다음 NAC (30 mg/kg)와 melatonin을 투여하였다. 본 연구와 유사하게 NAC을 투여한 동물에서 조직학적으로 CO 중독에 의한 뇌 손상을 70% 억제하였으나 melatonin 투여는 뇌 손상을 억제하지 못하여 NAC이 melatonin보다 급성 CO 중독에 의한 뇌 손상을 억제하는데 효과적이었다. 또한 허혈성 뇌손상 흰쥐들을 대상으로 NAC을 전 처치 및 후 처치하여 허혈성 손상이 억제되었으며 superoxide dismutase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 관련 효소

들의 활성이 증가된 반면 산화성 물질인 Malondialdehyde (MDA) 생성이 억제되었다. 뇌졸중 환자들을 대상으로 한 연구에서는 허혈성 손상 24시간 이내에 NAC을 3일간 투여하였을 때 90일 후 운동 장애가 보다 호전되고 혈액에서 염증 관련 분자들이 감소하고, 항산화 관련 효소들이 증가하였다²⁸⁾.

허혈/재순환 손상에 대한 NAC의 효과는 다음과 같이 3가지로 정리할 수 있다. 첫째, NAC은 cysteine의 전구체로 혈중 cysteine 농도를 증가시켜 세포 내 glutathione의 합성을 증가시킨다. 둘째, NAC 자체가 thiol 물질로 작용하여 항산화 특성을 가지고 있어 라디칼 또는 비-라디칼성 산화제를 직접 제거하는 효과가 있다. 셋째, thiol과 결합한 단백질에서 NAC은 단백질로부터 thiol을 유리하여 항산화 효과를 증대시킨다^{9,29)}. 한편 NAC을 경구투여 시 뇌척수액에서 NAC이 증가함으로써 뇌-혈관장벽을 통과하는 것으로 알려져 있다³⁰⁾. 따라서 선행 연구결과들을 종합하였을 때 본 실험의 급성 CO 중독 모델에서 NAC의 투여는 뇌혈관장벽을 투과하여 뇌에서 직접 항산화 효과를 유도할 수 있어 이를 통하여 해마 신경망의 신경가소성을 유지하고 PV 양성 중간뉴런의 손상을 억제하는데 도움을 주었을 것으로 사료된다.

결론

급성 CO 중독은 중독 정도에 따라 사망에까지 이를 수 있으며 지연성 신경학적 후유증으로 인해 급성기의 회복 후에도 개인의 삶의 질을 현저히 저하시키는 치명적인 중독질환이다.

본 연구에서는 급성 CO 중독 모델의 해마에서 LTP 현상의 감소를 확인함으로써 신경가소성의 장애를 확인하였고 PV 단백질면역양성 중간뉴런의 손상이 저명함을 관찰하였다. 또한 항산화제인 N-acetylcysteine을 5일간 투여하여 CO 중독에 의한 신경가소성의 장애와 중간뉴런의 손상을 억제할 수 있음을 확인하였다. 따라서 급성 CO 중독 시 치료제로서 NAC의 투여가 뇌손상의 예방에 도움이 될 것으로 기대할 수 있으며, 향후 대뇌피질, 선조체 등과 같이 뇌의 전반적인 영역에 대해 전기생리학적 및 병태생리학적 추가 연구가 뒷받침이 된다면 급성 CO 중독 후 발생하는 허혈성 뇌손상에 대한 더욱 효과적인 치료제가 등장할 수 있을 것으로 기대한다.

ORCID

Seon Tae Kim (<https://orcid.org/0000-0003-3247-5548>)

Su Jin Yoo (<https://orcid.org/0000-0002-4204-674X>)

REFERENCES

- Raub JA, Mathieu-Nolf M, Hampson NB, et al. Carbon monoxide poisoning--a public health perspective. *Toxicology*. 2000; 145(1):1-14.
- Rose JJ, Wang L, Xu Q, et al. Carbon Monoxide Poisoning:

Pathogenesis, Management, and Future Directions of Therapy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(5):596-606.

- Kim YJ, Sohn CH, Oh BJ, et al. Carbon monoxide poisoning during camping in Korea. *Inhal Toxicol*. 2016;28(14):719-23
- Weaver LK. Carbon Monoxide Poisoning. *N Engl J Med*. 2009;360(12):1217-25.
- Oh SH, Choi SC. Acute carbon monoxide poisoning and delayed neurological sequelae: a potential neuroprotection bundle therapy. *Neural Regen Res*. 2015;10(1):36-8.
- Hendrickson RG. What is the most appropriate dose of N-acetylcysteine after massive acetaminophen overdose?. *Clin Toxicol (Phila)*. 2019;57(8):686-91
- Millea PJ. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. *Am Fam Physician*. 2009;80(3):265-9.
- Deepmala, Slattery J, Kumar N, et al. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;55:294-321.
- Bavarsad Shahripour R, Harigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav*. 2014;4(2):108-22.
- Hu H, Gan J, Jonas P. Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin (+) GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science*. 2014;345:1255-63.
- Ruden JB, Dugan LL, Konradi C. Parvalbumin interneuron vulnerability and brain disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2021; 46(2):279-87.
- Lee MS, Yang SB, Heo JH. Application of Thallium Autometallography for Observation of Changes in Excitability of Rodent Brain following Acute Carbon Monoxide Intoxication. *J Korean Soc Clin Toxicol*. 2019;17(2):66-78.
- Kim MJ, Choi SJ, Lim ST, et al. Ferulic acid supplementation prevents trimethyltin-induced cognitive deficits in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2007;71(4):1063-8.
- Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta naturae*. 2015; 7(2):42-7.
- Hiramatsu M, Sasaki M, Nabeshima T, et al. Effects of dynorphin A (1-13) on carbon monoxide-induced delayed amnesia in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997;56(1):73-9.
- Hiramatsu M, Inoue K. Des-tyrosine(1) dynorphin A-(2-13) improves carbon monoxide-induced impairment of learning and memory in mice. *Brain Res*. 2000;859(2):303-10.
- Fan DF, Hu HJ, Sun Q, et al. Neuroprotective effects of exogenous methane in a rat model of acute carbon monoxide poisoning. *Brain Res*. 2016;1633:62-72.
- Xue L, Wang WL, Li Y, et al. Effects of hyperbaric oxygen on hippocampal neuronal apoptosis in rats with acute carbon monoxide poisoning. *Undersea Hyperb Med*. 2017;44(2):121-31.
- Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 1996;6(4):347-470.
- Gustafsson B, Wigström H. Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region: its induction and early temporal development. *Prog Brain Res*. 1990;83:223-32.
- Mereu G, Cammalleri M, Fà M, et al. Prenatal exposure to a low concentration of carbon monoxide disrupts hippocampal long-

- term potentiation in rat offspring. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294(2):728-34.
22. Johansen FF. Interneurons in rat hippocampus after cerebral ischemia. Morphometric, functional, and therapeutic investigations. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1993;150:1-32.
 23. Miettinen R, Sirviö J, Riekkinen P Sr, et al. Neocortical, hippocampal and septal parvalbumin- and somatostatin-containing neurons in young and aged rats: correlation with passive avoidance and water maze performance. *Neuroscience.* 1993;53(2):367-78.
 24. Cogley JN, Fiorello ML, Bailey DM. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol.* 2018;15:490-503.
 25. Akyol S, Erdogan S, Idiz N, et al. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in carbon monoxide toxicity: an in-depth analysis. *Redox Rep.* 2014;19(5):180-9.
 26. Mannaioni PF, Vannacci A, Masini E. Carbon monoxide: the bad and the good side of the coin, from neuronal death to anti-inflammatory activity. *Inflamm Res.* 2006;55(7):261-73.
 27. Kekec Z, Seydaoglu G, Sever H, et al. The effect of antioxidants (N-acetylcysteine and melatonin) on hypoxia due to carbon-monoxide poisoning. *Bratisl Lek Listy.* 2010;111(4):189-93.
 28. Sabetghadam M, Mazdeh M, Abolfathi P, et al. Evidence for a Beneficial Effect of Oral N-acetylcysteine on Functional Outcomes and Inflammatory Biomarkers in Patients with Acute Ischemic Stroke. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2020;16:1265-78.
 29. Aldini G, Altomare A, Baron G, et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res.* 2018;52(7):751-62.
 30. Katz M, Won SJ, Park Y, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of N-acetylcysteine after oral administration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2015;21(5):500-3.