

심정지 허혈 모델에서
신경조절물질에 의한 뇌손상 및
회복 변동

연세대학교 대학원

의과학과

송근정

심정지 허혈 모델에서
신경조절물질에 의한 뇌손상 및
회복 변동

지도교수 이 한 식

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2004 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

송 근 정

송근정의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2004년 12월 일

감사의 글

논문이 완성되기까지 많은 분들의 조언과 배려에 감사 드리며, 저를 하나의 응급의학과 전문의로 가르쳐 주신 응급의학교실 이한식 교수님께 감사 드립니다. 또한 심사위원 교수님들 그리고 실험과정을 지도해 주신 약리학 교실 김동구 교수님께 감사드립니다. 약리학교실의 김건태 선생님, 박재우 선생님께도 감사드립니다.

헌신적인 지원 뿐 아니라 충실한 사람이 되라는 가르침으로 키워오신 송태원, 현풍섭 부모님께 가장 큰 감사를 드리며 저의 세 아들들인 정화, 규현, 규민도 충실한 사람으로 키워낼 것입니다.

저자 씀

차례

그림 및 표 차례	iii
국문요약	vi
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. In-vitro 연구	5
가. 마우스 뇌세포 일차배양	5
나. 배양 뇌세포에서 Oxygen glucose deprivation (OGD)과 재관류	5
다. 세포 사망 평가	6
라. Propidium iodine(PI)염색	7
2. In-vivo 연구	7
가. 실험동물	7
나. 약물처치 및 실험 과정	8
다. I.C.V. 카테터 삽관수술	8
라. 심정지 유도 수술	9
마. 행동검색	11
(1) Righting reflex, Placing reaction Test	11
(2) Rota-rod Test	11
바. 조직염색	12
(1) Cresyl violet 염색법	12

3. 통계학적 분석	12
III. 결과	14
1. In-vitro 결과	14
가. Anaerobic chamber 내의 세포배양액 OGD 에 따른 산소 포화도 변화	14
나. In vitro 허혈 모델 확립	15
다. In vitro 허혈 모델에서 Apoptosis 확인	18
라. In vitro 허혈 모델에서 5-HT _{1A} agonist(8-OH-DPAT)와 casepase-3 inhibitor(z-DEVD.fmk) 효과	21
2. In-vivo 결과	25
가. 심정지 전 후의 실험동물 군의 몸무게 변동	25
나. 행동 변동	26
(1) Righting reflex, Placing reaction Test	26
(2) Rota-rod Test	27
다. 조직검색	30
(1) Cresyl violet 염색 결과	30
IV. 고찰	33
V. 결론	38
참고문헌	39
영문요약	45

그림 차례

그림 1.	Occluding device 를 이용한 랫드의 심정지 유발 방법.	10
그림 2.	Anaerobic chamber 안에서의 세포 배양액 OGD.	14
그림 3.	OGD 시간에 따른 세포사망의 정도.	16
그림 4.	동일한 24 시간 재관류에서 OGD 시간에 따른 세포사망의 정도.	17
그림 5.	동일한 24 시간 재관류에서 OGD 시간에 따른 LDH 값에 의한 세포 사망의 정도.	18
그림 6.	OGD 90 분 군에서 재관류 12 시간 후에 시행한 propidium iodine 염색 결과에 의한 세포사망 판정.	19
그림 7.	OGD 90 분 군에서 재관류 12 시간 후에 시행한 propidium iodine 염색 결과에 의한 apoptosis 판정.	20
그림 8.	OGD 90 분 군에서 재관류 24 시간 후에 시행한 propidium iodine 염색 결과에 의한 세포사망 판정.	20
그림 9.	OGD 90 분 군에서 재관류 24 시간	

	후에 시행한 propidium iodine 염색 결과에 의한 apoptosis 판정.	21
그림 10.	In vitro 허혈 모델에서 5-HT _{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT 과 casepase-3 inhibitor(z-DEVD- fmk) 효과.	22
그림 11.	In vitro 허혈 모델에서 5-HT _{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT 과 casepase-3 inhibitor(z-DEVD.fmk) 투여에서 LDH 유리값 측정에 의한 세포사망 정도.	23
그림 12.	심정지 유도 1 일 전을 기준으로 한 실험동물군의 몸무게 변동.....	25
그림 13.	전일 대비 기준으로 한 실험동물의 몸무게 변동.	26
그림 14.	심정지 6 일 후 시행한 righting reflex 와 placing reaction test 결과.	27
그림 15.	심정지 6 일 후 시행한 Rota-rod test 결과.	28
그림 16.	심정지 6 일 후 시행한 Rota-rod	

	test 결과에서 8-OH-DPAT 투여군 비교.	28
그림 17.	심정지 6 일 후 시행한 Rota-rod test 결과에서 z-DEVD.fmk 투여군 비교.	29
그림 18.	심정지 6 일 후 시행한 Rota-rod test 결과에서 8-OH-DPAT 와 z- DEVD.fmk 병용 투여군 비교.	30
그림 19.	해마부위의 CA1 지역의 Cresyl violet 염색소견.	31
그림 20.	해마부위의 CA1 지역의 Cresyl violet 염색의 100 배 확대 관찰소견.	32
그림 21.	해마부위의 CA1 지역의 Cresyl violet 염색의 200 배 확대 관찰소견.	32

국문요약

심정지 허혈 모델에서 신경조절물질에 의한 뇌손상 및 회복 변동

심폐소생술은 심정지에 대한 유일한 치료이며, 가장 즉각적인 치료가 필요하지만, 50년 동안의 많은 연구와 발전된 치료지침에도 불구하고 자발순환회복률이나 생존퇴원률이 뚜렷하게 향상되지 않았으며, 생존 후의 매우 불량한 신경학적 예후의 개선을 위한 치료방법의 제시에도 많은 논란이 있다. 따라서 현재로는 심폐소생술 과정에서 신경학적 치료를 위한 어떠한 치료도 지침에 제시되지 못하고 있다. 이에 임상적인 심정지 상황과 비슷한 연구환경에서 심정지에 의한 허혈성 손상이 일어난 후 심폐소생술 단계에서 신경보호작용이 있는 두 가지 약물을 병용 투여하면서 in-vitro 연구와 in-vivo 연구를 시행하여 이러한 신경보호물질에 의한 뇌손상의 회복을 알아보려고 하였다.

In-vitro 연구에서는 마우스 뇌세포를 배양하여 Oxygen glucose deprivation(OGD) 환경 후 재관류하였으며, 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT과 caspase-3 의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk를 투여한 후 세포 사멸을 평가하기 위하여 lactate dehydrogenase(LDH) 유리값 측정을 하였고, Propidium

iodine(PI)염색을 하여 관독하였다. In-vivo 연구에서는 Sprague-Dawley종 수컷 랫드에서 심정지를 일으킨 후 심폐소생술 후 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT를 피하주사하고 caspase-3의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk를 뇌실내 투여한 후 신경학적 검사를 위하여 Righting reflex Test, Placing reaction Test, Rota-rod Test를 하였으며, 랫드의 뇌를 적출하여 Cresyl violet 염색을 하여 관찰하였다.

실험결과의 통계분석은 State View (version 5.01, The SAS Institute, CA, USA) 프로그램을 사용하였고 일분산분석, Fisher PLSD test, Scheffe's F Test를 이용하였다.

In vitro 연구 결과에서 OGD 90분 군을 24시간 재관류하여 5-HT_{1A} agonist인 8-OH-DPAT과 caspase-3 inhibitor인 z-DEVD.fmk를 처치하였을 때 각각 투여와 병용투여군에서 control군과 OGD 90분 군의 24시간 재관류 군에 비하여 세포사망을 유의있게 억제하였으나 병용투여군과 각각 투여군 사이의 통계학적인 차이는 없었다. In-vivo 연구 결과에서 righting reflex와 placing reaction test에서는 각 실험군 간의 통계적 유의성은 없었다. Rota-rod test에서는 3회째의 결과에서 8-OH-DPAT와 z-DEVD.fmk를 병용투여한 군에서 saline과 vehicle을 처치한 군에 비하여 통계적 유의성을 보였다. 랫드의 해마 CA1지역을 Cresyl violet 염색하였으며 병용 투여군에서 Saline+ Vehicle 처치 군에 비하여

조밀한 세포분포를 보였다. 따라서 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT과 caspase-3 의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk를 랫드의 허혈성 손상 후에 병용 사용하여 in-vitro 연구에서는 신경보호효과가 없었으나 in-vivo 연구에서는 뇌조직 및 기능향상에 효과가 있었다.

이러한 in-vitro 연구와 in-vivo 연구에서의 결과의 차이는 신경보호물질이 신경세포에 대한 직접적인 효과 뿐 아니라 가소성을 기초로 한 보상작용이 활발함을 알 수 있다. 즉 신경보호물질을 병용함으로써 효과를 기대할 수 있는데, 이 연구로서는 확실하지 않으나 약물 상호간의 화학적 관계 또는 신호전달과정의 중복 및 길항작용 등을 원인이라고 할 수 있다. 따라서 심정지라는 임상적인 허혈성 손상에서 신경보호물질을 후처치함으로써 허혈성 뇌손상을 줄일 수 있다고 사료된다.

핵심되는 말 : 허혈성 손상, 심정지, 신경보호물질,

심정지 허혈 모델에서 신경조절물질에 의한
뇌손상 및 회복 변동

<지도교수 이 한 식>

연세대학교 대학원 의과학과

송 근 정

I. 서론

심폐소생술(Cardiopulmonary Resuscitation)은 심정지에 대한 유일한 치료이며, 응급의학과 영역에서 가장 즉각적인 치료가 필요한 부분이다. 현대적인 심폐소생술은 1950년대부터 발전하였다. 1956년에 제세동(defibrillation)에 의한 심실세동(ventricular fibrillation) 처치¹, 1958년에 구강대구강 호흡법(mouth-to-mouth ventilation)², 1960년에 심장마사지(cardiac compression)방법³이 발표되면서 현재 시행되고 있는 기도유지-호흡유지-순환유지 순서의 심폐소생술이 완성되었다.

이후 50년 동안 응급치료로서의 심폐소생술의 결과를 향상시키기 위하여 많은 연구가 이루어졌고 이에 따라 교육과 치료지침이 수정되었다. 그럼에도 불구하고 심폐소생술의 초기 결과를 나타내는

자발순환회복(Return of Spontaneous Circulation)률은 증가되었지만, 이후의 결과인 자발순환회복 후 24시간 생존을 나타내는 심폐소생술 성공률이나 생존퇴원률은 뚜렷하게 향상되지 않았다⁴. 더욱이 생존퇴원한 환자들에서의 신경학적 예후는 매우 나빠서 심각한 신경학적 결함을 가지는 경우가 더 많고, 뚜렷한 치료방법의 제시에도 아직도 많은 논란이 있다⁴. 현재의 심폐소생술은 심장과 폐로의 혈류를 회복시키는 것이 치료목표이며, 자발순환회복이 이루어지기 전의 심폐소생술 과정에서 신경학적 치료를 위한 어떠한 치료도 지침에 제시되지 못하고 있는 것이 현실이다.

허혈성 손상과정에서 hippocampus에서의 5-HT가 신경보호에 중요한 역할을 한다고 밝혀져 있으며 이는 G protein-coupled 수용체인 5-Hydroxytryptamine_{1A}(5-HT_{1A}) 수용체가 활성화되어 cAMP 신호전달을 저해하여 ion channel의 phosphorylation을 감소시키고, NMDA에 의한 Ca⁺⁺의 유입을 방해하여 결국 NMDA-induced caspase-3 활성화를 방해함으로써 신경 세포의 생존을 향상시키며, 특히 설치류에서는 운동기능을 향상시킨다^{5,6,7}. 이러한 허혈성 손상과정에서의 신경보호작용은 용량에 비례하여 나타나기 때문에 수용체 중재에 의한 신경보호 효과가 있다는 것을 의미한다^{8,9,10}.

세포의 파괴는 괴사(necrosis), apoptosis, autophagocytosis의 세 가지 종류의 과정으로 나눌 수 있다. 괴사는 외부로부터의 손상에

의하여 일어나지만 apoptosis와 autophagocytosis는 정상적인 생리학적 과정에 의하여 유발된다. 허혈 과정에 의하여 NMDA-type glutamate receptor channel이 열리면서 세포질 안으로 칼슘이온이 들어오고 nitric oxide synthetase(NOS)가 활성화되어 nitric oxide(NO) free radical gas를 생산하여 미토콘드리아를 파괴함으로써 괴사가 일어난다. 이러한 괴사는 손상의 정도가 심할 때 손상 초기에 나타난다. Apoptosis는 세포의 발생과정에서 불필요한 세포를 없애는 정상적인 과정이지만, 보다 심한 허혈성 손상에 의하여 일어나며 cytochrome C 단백질을 분비하여 caspase를 활성화하여 DNA 분절과 염색질의 농축을 일으킴으로써 일어난다¹¹. 1993년에 랫드의 허혈성 모델에서 처음으로 apoptosis를 보고하였다¹².

Caspase는 cysteine protease군으로서 신경세포의 손상과정이 일어나는 신경외상이나 신경질환에서 활성화되며, 특히 caspase-3는 가장 효능이 있는 caspase이다. caspase-3는 apoptosis에 의한 세포사망에서 나타나는 genomic DNA fragmentation와 염색질 농축을 주도한다. 따라서 caspase-3 inhibitor는 proteolysis substrate, DNA fragmentation을 방해함으로써 apoptosis를 억제하여 경색 부피를 감소시킨다. 이러한 작용은 국소성 또는 전체적인 허혈 과정 모두에서 일어난다^{13,14,15,16,17}.

허혈성 손상에 의한 apoptosis를 감소시키기 위한 연구에서 5-

HT_{1A} 수용체 효현제인 8-Hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin hydrobromide(8-OH-DPAT)와 caspase-3 억제제인 z-DEVD.fmk 는 in-vitro연구와 in-vivo 연구 모두에서 신경보호작용이 있다고 알려져 있다. 그러나 대부분의 연구에서는 허혈성 손상 유도 전에 이러한 신경보호물질을 전처치함으로써 신경보호효과를 보고하고 있다¹⁸.

심정지에 의한 손상도 허혈성 손상이므로 신경보호 효과가 있는 이러한 물질을 투여함으로써 같은 효과를 기대할 수 있다. 그러나 심정지라는 임상적인 상황은 돌발적으로 발생하기 때문에 신경보호물질을 전처치할 수 없다는 한계가 있다. 이와 같은 이유로 심정지 후 신경보호물질을 투여하여야 하지만 허혈성 손상후 신경보호물질 투여에 관한 연구는 적고 그 결과 또한 다양하다. 따라서 이 연구에서는 허혈성 손상인 심정지 후 신경보호물질에 의한 뇌손상의 회복을 알아보기 위하여, 임상적인 심정지 상황과 비슷한 연구환경으로서 허혈 유발 방법을 심정지로 정하고, 허혈성 손상이 일어난 후 심폐소생술 단계에서 신경조절물질을 투여하였으며, 신경보호작용이 있는 두 가지 약물을 병용 투여하면서 in-vitro연구와 in-vivo 연구를 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. In-vitro 연구

가. 마우스 뇌세포 일차배양

마우스 cortical cell 배양은 임신 14-15일의 ICR mouse(대한바이오링크, 음성, 한국)를 사용했다. 태아의 cortex를 분리하여 large pore의 pasteur pipette으로 분쇄한 후 small pore의 pasteur pipette으로 3-4회 분쇄하였다. 분쇄된 뇌조직을 1000×g에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 걸어내고 100µg/ml poly-D-lysine 와 4µg/ml laminin으로 전처리한 100mm dish 또는 24 well plate(5개 hemispheres/plate, $\sim 2.4 \times 10^6$ cells/plate)에 분주하여 5% fetal bovine serum, 2mM glutamine, 21mM glucose가 포함된 Earle's minimal essential medium(PM)에서 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 배양 7일 후에 Cytosine arabinoside(Final Con. 10µM)를 처리하여 정상세포의 성장을 중지시켜 배양하고 Growth medium(2mM glutamine, 21mM glucose가 포함된 Earle's minimal essential medium, GM)으로 교체한 후 12-14일에 실험에 사용하였다.

나. 배양 뇌세포에서 Oxygen glucose deprivation(OGD)과 재관류

OGD는 준비된 세포에서 산소와 포도당을 포함한 모든 영양분 및 에너지를 제거하는 것이고, 재관류는 OGD 후에 산소와 포도당을 재공급하는 과정이다. Balanced salt solution(BSS₀, NaCl 116mM, CaCl₂ 1.8mM, MgSO₄ 0.8mM, KCl 5.4 mM, NaHCO₃ 26.2mM, pH 7.4)은 영양분 및 에너지원이 없는 완충액이고, 여기에 포도당 5.5mM을 추가한 것이 BSS_{5.5}이다. BSS₀를 산소가 없는 혼합가스(CO₂ 5%, H₂ 10%, N₂ 85%)로 bubbling하여 산소를 제거한 것이 deoxyBSS₀이며, 세포의 배지를 deoxyBSS₀로 두 번 세척 후 deoxyBSS₀로 교체하여 anaerobic chamber(Forma scientific Inc, Marietta, OH, USA)에 넣어 37°C로 배양하는 과정을 OGD로 하였고, OGD 상태에 있던 세포를 anaerobic chamber에서 꺼내어 산소를 포함하고 있는 BSS_{5.5}로 배지를 교환해 주는 과정을 재관류로 하였다. 이후 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT과 caspase-3 의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk를 처치하였다.

다. 세포 사망 평가

세포막 손상에 의해 일어나는 lactate dehydrogenase(LDH) 유리는 24시간 재관류 후의 LDH 유리값을 500μM N-methyl-D-aspartate(NMDA) 또는 0.5% Triton-X 100을 처치하여 cell을 사멸 시킨 후의 값(Total LDH)으로 나누어 % cell death로 나타냈다. LDH 유리 값은 세포에 반응액으로 pyruvic acid와 β-nicotinamide

adenine dinucleotide(β -NADPH)를 넣어 β -NADPH의 산화도를 SOFTmax PRO multiplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 340nm에서 측정하였다.

라. Propidium iodine(PI) 염색

PI는 세포가 사멸하면 세포 안으로 이동하여 DNA에 결합, 붉은 형광을 내고 세포가 살아 있으면 세포 안으로 들어가지 못해 형광을 띄지 못한다. PI를 1.5 μ g/ml로 처리하여 20분 후 Zeiss Confocal microscope(LSM510)를 이용하여 재관류 후 12시간, 24시간에서 관찰하여 necrotic cell과 apoptotic cell을 구별하고자 하였다. Nuclear fragmentation이 있는 세포를 apoptotic cell로 하였다.

2. In-vivo 연구

가. 실험동물

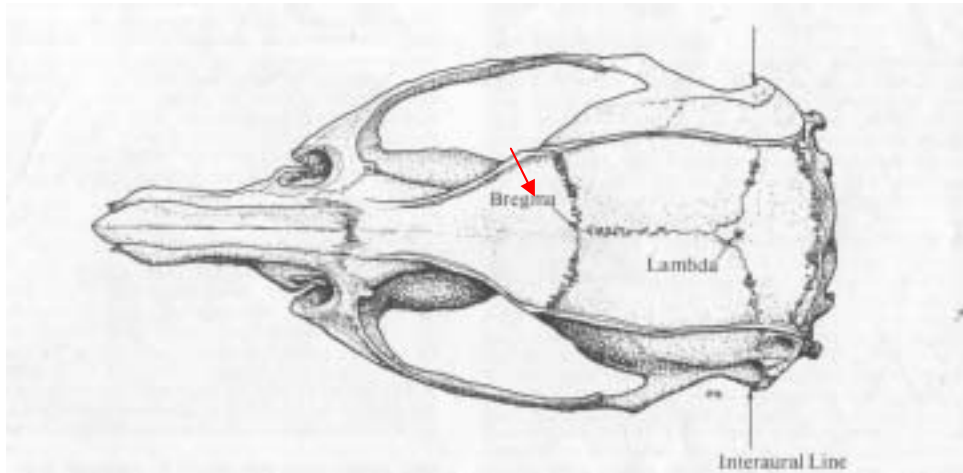
Sprague-Dawley종 수컷 랫드(무게 320 \pm 60g)를 사용하였다 (Daehan Biolink Co., LTD., Korea). 실험기간 동안 Specific Pathogen Free(SPF) 환경에서 동물을 유지하며, 실험에 들어가기 전 1주일 동안 물과 먹이를 자유롭게 공급하면서 실험실 환경에 적응시켰다. 실험군은 모두 5개였으며 saline투여군, 5-HT_{1A} 수용체

효현제인 8-OH-DPAT투여군, caspase-3 의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk 투여군, 8-OH-DPAT와 z-DEVD.fmk 병용투여군, Sham군이었으며 각각의 군은 4마리씩이었다.

나. 약물처치 및 실험 과정

실제 사람의 심정지 경우에 해당하는 환경을 조성하기 위하여 심정지 유도 후에 약물을 처치하였다. 이를 위하여 심정지 유도 1주일 전 뇌실을 통한 약물 투여를 위하여 intracerebroventricular (I.C.V.) injection을 위한 카테터 삽관수술을 실시하고 이 후 1주일 동안의 회복기간을 둔 뒤 Korpatchev(J. Cereb Blood Flow & Metab, 1992)의 방법을 응용하여 2분 30초간의 심정지를 유도하였다. 심정지가 일어난 후 24시간, 48시간, 72시간의 간격으로 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT (3 mg/kg/ml) (Tocris, Elisvile, USA)을 각 투여시간의 30분 전에 피하주사 하였고, 이후 I.C.V. 카테터를 통하여 apoptosis를 통한 세포고사 과정에서 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 caspase-3 의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk (1.5 μ g/2 μ l) (Calbiochem, Darmstadt, Germany)를 투여하였다.

다. I.C.V. 카테터 삽관수술



심정지 이후 caspase-3의 억제제인 z-DEVD.fmk를 우측 측뇌실에 직접 주사하기 위하여 길이 3cm, volume $2\mu\text{l}$ 의 polyethylene tube (Inside diameter 0.38mm, Outside diameter 1.09mm) (Bloton Dickinson, USA)를 bregma 기준으로 우측 1.3 mm, 후방 0.6 mm 지점에 깊이 3.4 mm 에 위치 시키고 dental cement를 이용하여 고정시켰다. 삽관이 끝나고 24시간 후 angiotensin II를 사용하여 삽관 위치의 정확성을 확인한 뒤 올바른 위치에 삽관이 이루어진 실험동물들을 6일 동안의 회복시기를 거쳐 심정지에 사용하였다.

라. 심정지 유도 수술

I.C.V. 삽관이 끝난 후 7일 동안의 회복시기를 거쳐 Korpatchev (J. Cereb Blood Flow & Metab, 1992)의 방법을 응용하여 2분

30초간의 심정지를 유도하였다. 심정지 유도 방법은 소형동물용 마취 system (Matrx, NY, USA)에서 70% N₂O, 30% O₂에 2% isoflurane을 이용하여 호흡마취를 유도하였으며, 충분한 마취심도를 유지한 상태에서 양와위에서 전흉부에 0.5cm 길이의 정중선으로 절개하여 2번째 오른쪽 늑간을 통하여 occluding device를 삽입하여 45도 틀어서 올리고 엄지 손가락을 이용하여 상부에서 2 - 3분 지속적으로 누른다. 심정지를 확인한 후 심장마사지를 30-40 회/분의 속도로 자발순환회복 확인 때까지 시행한다.

수술 시간은 약 10분 가량이 소요 되었다. 호흡 유지를 위하여 2ml, 60stroke/min으로 유지 시켰으며, 체온 유지를 위하여 heating pad를 이용하여 37℃로 체온을 유지하였다. 심정지가 있을 후 lamp를 이용하여 실험동물이 깨어날 때까지 체온유지를 하였으며, 이후 cage에 격리하여 물과 먹이를 자유롭게 공급하였다.

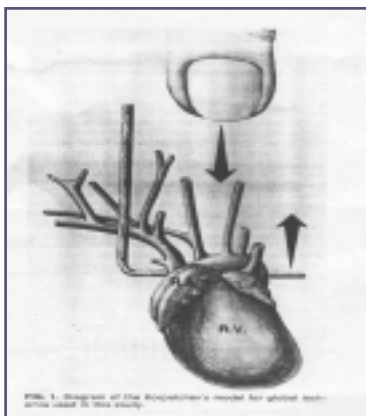


그림1. Occluding device를 이용한 랫드의 심정지 유발 방법. 마취한 랫드를

양와위로 위치한 후 전흉부의 정중선 절개를 한 후 오른쪽 2번째 늑간을 통하여 occluding device를 삽입한 후 엄지손가락 누르기를 이용하여 심정지를 일으킨다.

마. 행동검색

(1) Righting reflex, Placing reaction Test

실험동물은 rota-rod test를 실시하기 15분 전에 신경기능 손상 정도의 측정을 위하여 righting reflex, placing reaction test를 실시하였다. righting reflex test는 실험동물을 등이 바닥을 향하는 상태를 유지시키고, 왼쪽 복부를 고정시킨 상태에서 상체를 반대방향으로 비틀며 일어나려고 하는가를 측정하였고, placing reaction test는 왼쪽 하지만을 테이블 밑으로 내려 놓았을 경우 왼쪽 하지를 테이블 위로 위치시키는가를 측정하였다.

(2) Rota-rod Test

심정지 후 6일째 되는 날 3회에 걸쳐 실시하였다. 1회당 최고 300초 동안 속도가 시간에 따라 증가하는 rod (4-40 rpm)위에 랫드를 올려놓은 후 랫드의 운동조화능력과 운동학습을 평가하였다. 각 실험동물당 3번의 평가를 실시하였으며, 각 시기의 평가는 15분간의 휴식을 취하게 한 후 실시하였다.

바. 조직염색

(1) Cresyl violet 염색법

cresyl violet 염색은 실험이 종료되는 날인 심정지 이후 7일째 되는 날에 랫드의 뇌를 적출하여 실시하였다. 이를 위해 랫드의 복강에 pentobarbital chloral hydrate 혼합액을 과용량 주사하여 신속히 마취시킨 후, 심장관류법을 이용하여 헤파린이 첨가된 0.9% saline 용액으로 혈액을 제거하고, 냉장고정액(Bouin's fixative)을 주입하여 조직을 고정하였다. 고정한 뇌는 두개골을 열어 적출한 다음, 동일한 고정액으로 3시간 동안 4℃에서 후 고정을 하였다. 연세대학교 의과대학 실험동물부에 paraffin 블록 제작을 의뢰하여 블록 제작 후 lottery microtome을 이용하여 조직을 6 μ m의 두께로 박절한 후 젤라틴을 입힌 슬라이드에 얹어 공기 중에서 건조시켰다. 슬라이드 표면에 얹어진 조직절편은 알코올을 통한 탈수 과정을 거쳐 ethanol:chloroform 1:1 용액에 20분동안 담가 조직으로부터 지질을 제거하였다. 조직은 알코올 탈수 과정을 반대로 반복하여 다시 수화시킨 후, cresyl violet 염색액에서 30초간 염색하였다. 염색된 조직은 다시 알코올 탈수과정을 거친 다음 permount를 이용하여 덮개유리를 씌웠다.

3. 통계학적 분석

실험결과는 평균±표준오차로 나타냈으며, 통계분석을 위하여

State View (version 5.01, The SAS Institute, CA, USA) 프로그램을 사용하였다. In-vitro 실험의 LDH유리의 차이는 일분산분석(one-way ANOVA)후 multiple comparison test로 Fisher PLSD test로 분석하였다. In-vivo 실험의 Rota-rod Test에서의 결과는 일분산분석(one-way ANOVA)을 사용하였고 군간의 차이는 multiple comparison test로서 Scheffe's F Test를 이용하였다.

III. 결과

1. In-vitro 결과

가. Anaerobic chamber 내의 세포배양액 OGD에 따른 산소포화도 변화

Anaerobic chamber에 배양세포를 넣고 산소가 없는 혼합가스를 주입하여 배양액의 OGD를 유도하였고, 시간에 따른 산소 포화도를 dissolved oxygen meter(Corning, NY, USA)로 측정하였다. 공기를 제거한 후 산소가 없는 혼합가스를 주입한 순간부터 배양액의 산소포화도가 감소하였고, 30분이 지나면 1% 정도로 감소하였으며 1시간 이후의 배양액의 산소 포화도는 0.1% 이하로 감소하였다(그림2).

O₂ saturation (%)

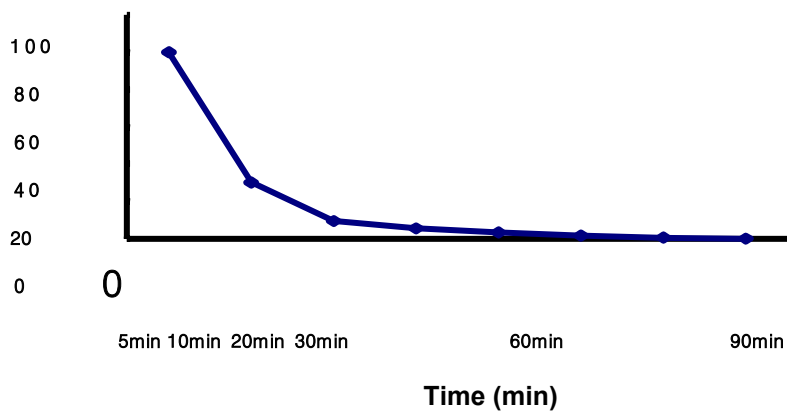
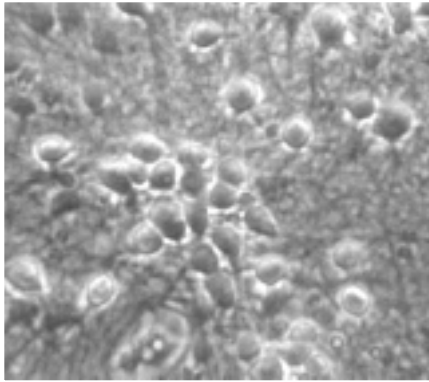


그림 2. Anaerobic chamber 안에서의 세포 배양액 OGD. 세포 배양액을 OGD를 위해 anaerobic chamber 에 넣은 후 chamber 내 공기를 빼고 산소가 없는 혼합가스로 교체한 직후를 0분 으로 하였으며, 각각의 시간마다 dissolved oxygen meter 를 이용하여 산소 포화도를 측정하였다. 산소가 없는 혼합가스를 주입한 직후부터 산소포화도가 감소하여 30 분이 지나면 1%로 감소하였으며, 1 시간 후에는 0.1%로 감소하였다.

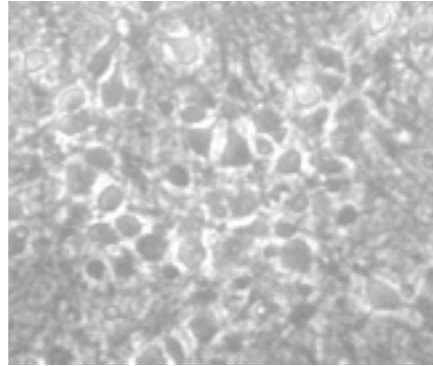
나. In vitro 허혈 모델 확립

배양액의 OGD 정도에 따른 세포사망의 정도를 관찰하기 위하여 OGD 시간을 60 분 군, 90 분 군, 120 분 군으로 나누어 유도하였다. OGD 60 분 군은 60% 이하의 세포사망이 일어났고, OGD 120 분 군은 많은 세포사망이 일어났다. 따라서 적절한 허혈성 실험을 위해서 OGD 정도는 세포사망이 75% 일어난 90분 군으로 정하였다(그림3). OGD 상태에 있던 배양세포를 anaerobic chamber에서 꺼내 산소를 포함하고 있는 BSS_{5.5}로 배지를 교환해 주는 과정을 재관류로 하였다. OGD 각각의 시간에 따라 재관류 시간을 동일하게 24시간을 유도한 후에 세포사망을 확인하였다. 동일한 24시간 재관류 후에 세포사망은 OGD 90분 군에서 가장 적절하였다(그림4). 동일한 24시간 재관류에서 OGD 시간에 따른 LDH 값에 의한 세포사망의 정도를 측정하였다. OGD 시간에 따라 동일하게 24시간 재관류 후에 LDH 유리에 의한 세포사망의 정도를 측정하였으며, OGD 90분 군에서 LDH값에 의한 세포사망의 정도는 75%로

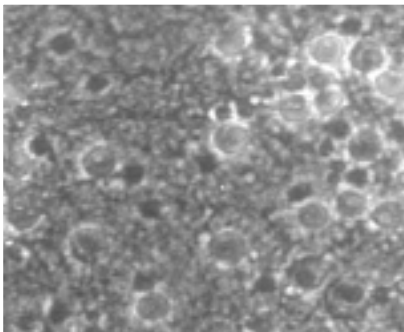
허혈실험에 가장 적절하였다(그림5).



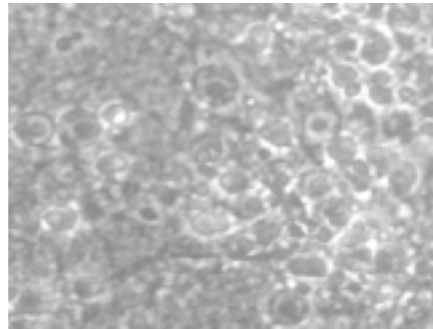
Control



OGD 60 min

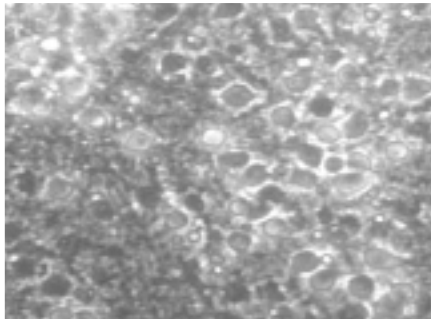


OGD 90 min

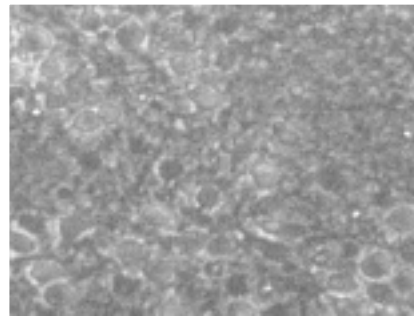


OGD 120 min

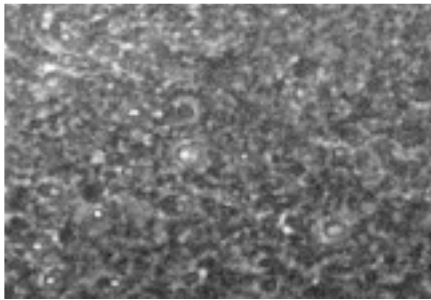
그림3. OGD 시간에 따른 세포사망의 정도. Anaerobic chamber에 배양세포를 넣고 OGD 환경을 만들어 세포사망을 일으켰다. 60분 군은 적은 양의 세포사망이 일어났고 120분 군은 많은 양의 세포사망이 일어나서 세포사망이 75% 일어난 90분 군을 허혈실험에 적절한 OGD 시간으로 정하였다.



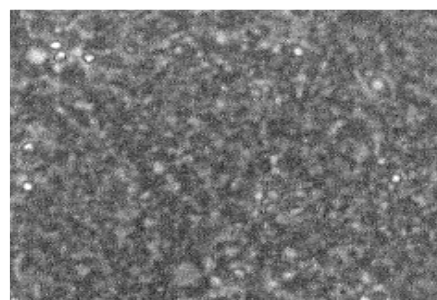
Control/Reperfusion 24hrs



OGD 60min/Reperfusion 24hrs



OGD 90min/Reperfusion 24hrs



OGD 120min/Reperfusion 24hrs

그림4. 동일한 24시간 재관류에서 OGD 시간에 따른 세포사망의 정도. 재관류 시간은 24시간으로 동일하게 유지하였으며 OGD 60분 군은 적은 양의 세포사망이 일어났고 OGD 120분 군은 많은 양의 세포사망이 일어나서 OGD 90분 군이 허혈실험에 가장 적절하였다.

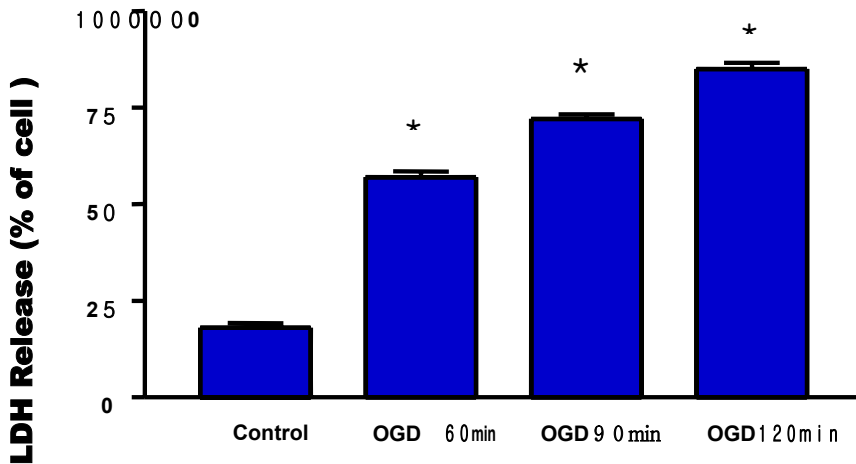


그림5. 동일한 24시간 재관류에서 OGD 시간에 따른 LDH 값에 의한 세포사망의 정도. OGD 시간에 따라 동일하게 24시간 재관류 후에 LDH 유리에 의한 세포사망을 측정하였으며, OGD 90분 군에서 LDH값에 의한 세포사망의 정도는 75%로 허혈실험에 가장 적절하였다.

다. In vitro 허혈 모델에서 Apoptosis 확인

적절한 in-vitro 허혈모델로 결정한 OGD 90분 군에서 재관류 12시간 후에 propidium iodine 염색을 시행하였으며 대물렌즈 20배로 관찰하였을 때 세포사망으로 DNA에 propidium iodine이 결합하여 붉은 형광을 나타낸다(그림6). 대물렌즈 60배로 확대하여 관찰하였을 때 붉은 형광으로 보이는 DNA분절이 확인되었으며

이는 apoptosis이다(그림7). OGD 90분 군에서 재관류 24시간 후에 시행한 propidium iodine 염색결과에 의하여 세포사망으로 DNA에 propidium iodine이 결합하여 붉은 형광을 나타낸다(그림8). 세포사망이 보이는 부분을 대물렌즈 60배로 확대하였을 때 apoptosis에 의한 DNA분절이 재관류 12시간에 비하여 보다 많이 관찰된다(그림9).

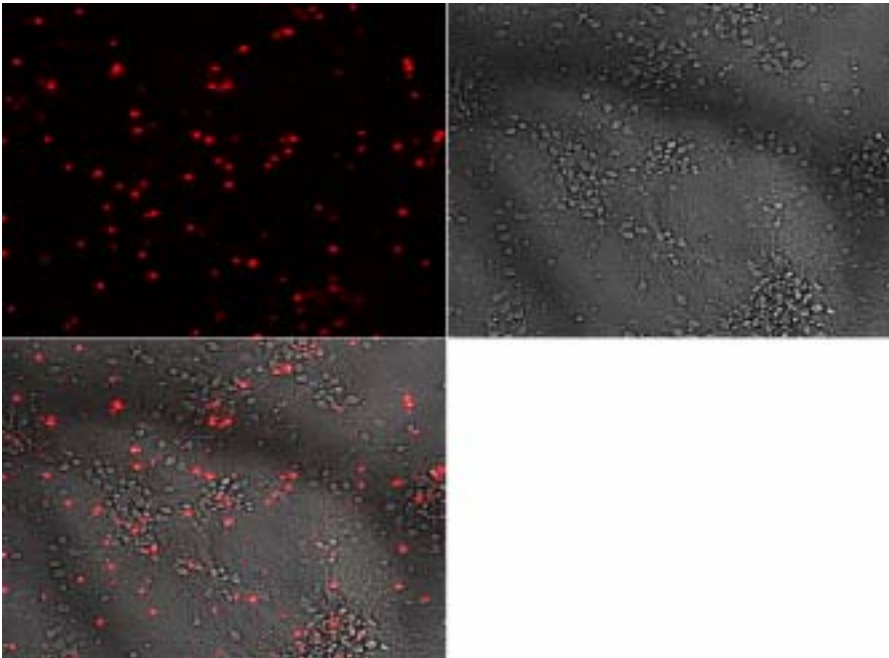


그림6. OGD 90분 군에서 재관류 12시간 후에 시행한 propidium iodine 염색결과에 의한 세포사망 판정. 12시간 재관류 후에 propidium iodine염색을 하였으며, 세포사망으로 DNA에 propidium iodine이 결합하여 붉은 형광을 나타낸다(대물렌즈 20 X).

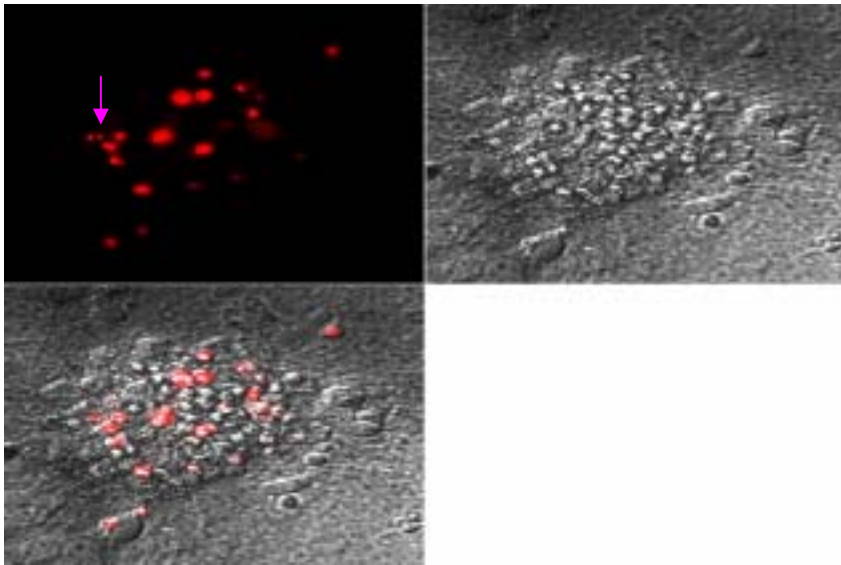


그림7. OGD 90분 군에서 재관류 12시간 후에 시행한 propidium iodine 염색결과에 의한 apoptosis 판정. 12시간 재관류 후에 propidium iodine염색을 하였으며, apoptosis에 의한 DNA분절이 관찰된다(대물렌즈 60 X).

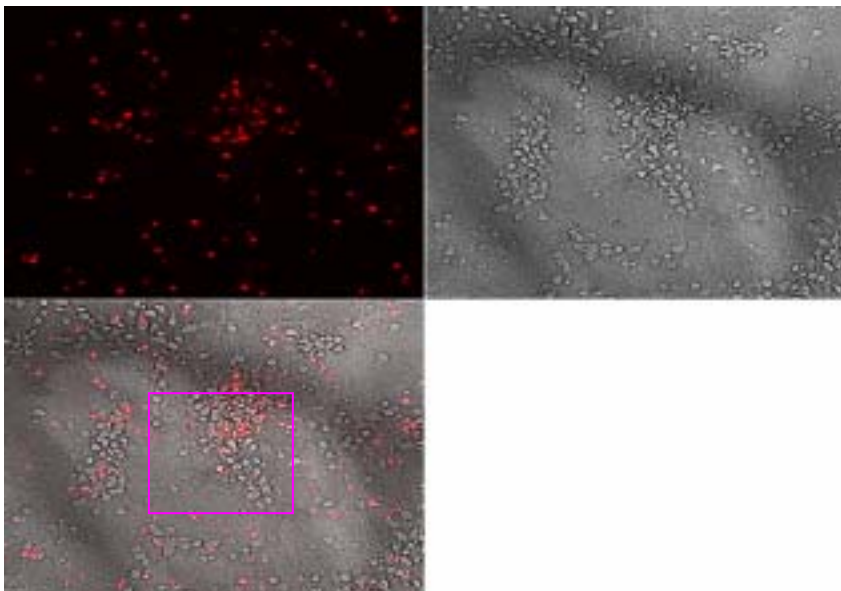


그림8. OGD 90분 군에서 재관류 24시간 후에 시행한 propidium iodine 염색결과에 의한 세포사망 판정. 24시간 재관류 후에 propidium iodine염색을 하였으며, 세포사망으로 DNA에 propidium iodine이 결합하여 붉은 형광을 나타낸다(대물렌즈 20 X).

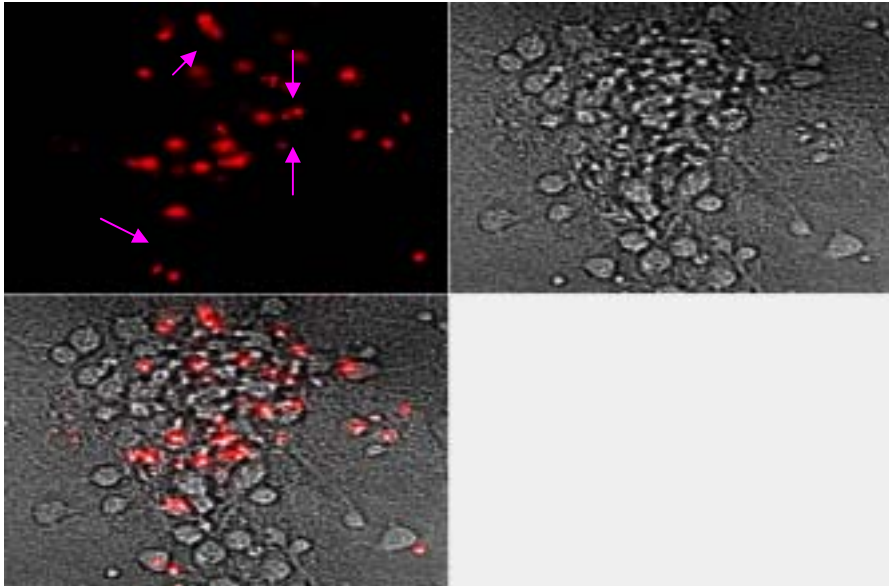
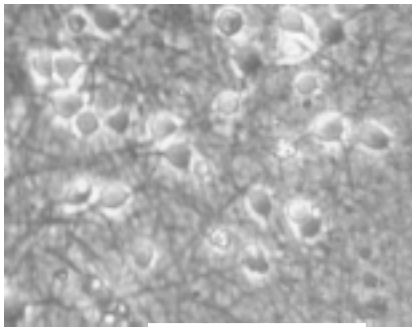


그림9. OGD 90분 군에서 재관류 24시간 후에 시행한 propidium iodine 염색결과에 의한 apoptosis 판정. 24시간 재관류 후에 propidium iodine염색을 하였으며, apoptosis에 의한 DNA분절이 관찰된다(대물렌즈 60 X).

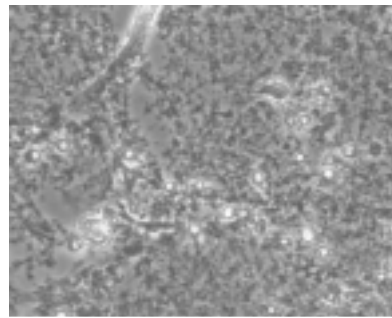
세포사망 판정. 24시간 재관류 후에 propidium iodine염색을 하였으며, 세포사망으로 DNA에 propidium iodine이 결합하여 붉은 형광을 나타낸다(대물렌즈 20 X).

라. In vitro 허혈 모델에서 5-HT_{1A} agonist(8-OH-DPAT)와 casepase-3 inhibitor(z-DEVD-fmk) 효과

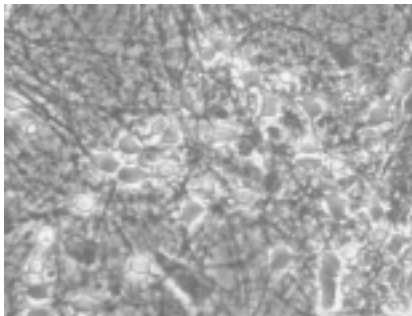
OGD 90분 군을 24시간 재관류하여 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT 2mM과 caspase-3 의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk 200mM을 처치하였다. 약물 처치군에서 control군과 약물처치를 하지 않은 OGD 90분과 재관류 24시간 군에 비하여 세포사망이 보다 적었다(그림10).



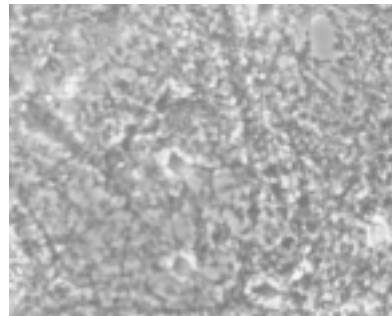
CONTROL



OGD 90min + Reperfusion 24hrs



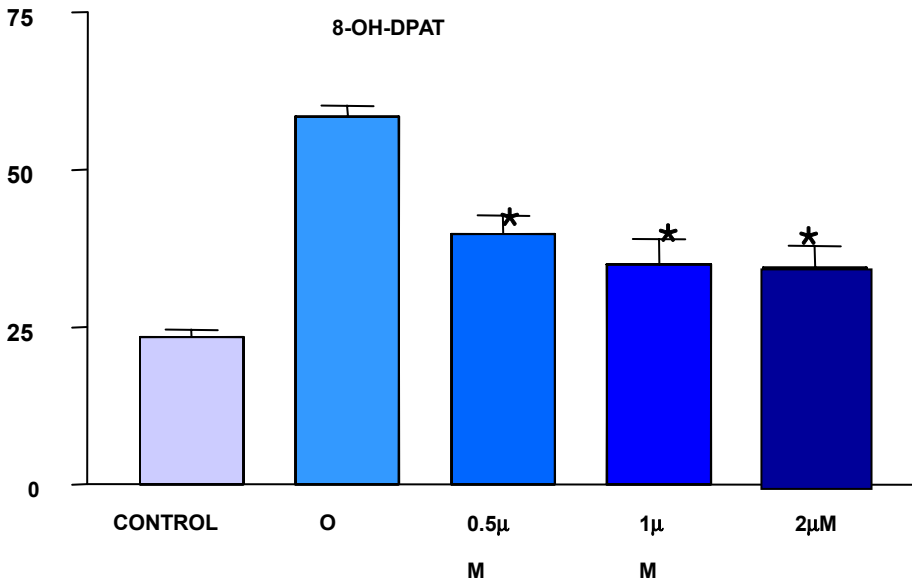
5-HT_{1A} agonist(8-OH-DPAT/2mM)



Caspase-3 inhibitor(z-DEVD-fmk./200mM)

그림10. In vitro 허혈 모델에서 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT과 caspase-3 inhibitor(z-DEVD-fmk) 효과. OGD 90분 군을 24시간 재관류하여 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT 200mM과 caspase-3 의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk 2mM을 처치한 결과 약물 처치군에서 세포사망이 보다 적었다.

OGD 90분 군을 24시간 재관류하여 과 z-DEVD.fmk를 투여한 후 LDH유리값을 측정하였다. 8-OH-DPAT을 투여하였을 때 control 군과 OGD 90분 군의 24시간 재관류 군보다 세포사망을 유의있게 억제하였으나 투여 용량에 비례하여 세포사망을 억제하지는 않았다. z-DEVD.fmk를 투여하였을 때 control군과 OGD 90분 군의 24시간 재관류 군보다 세포사망을 유의있게 억제 하였으나 투여 용량에 비례하여 세포사망을 억제하지는 않았다. 두 약물을 동시에 처치했을 때에도 control군과 OGD 90분 군의 24시간 재관류 군에 비하여 세포사망을 더 많이 억제하였으나 각각 처치한 군과의 차이는 없었다(그림11).



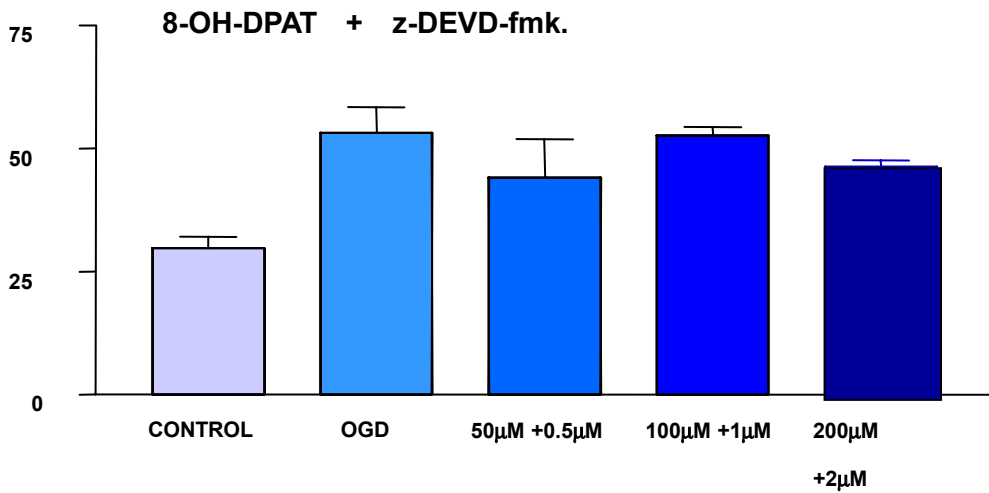
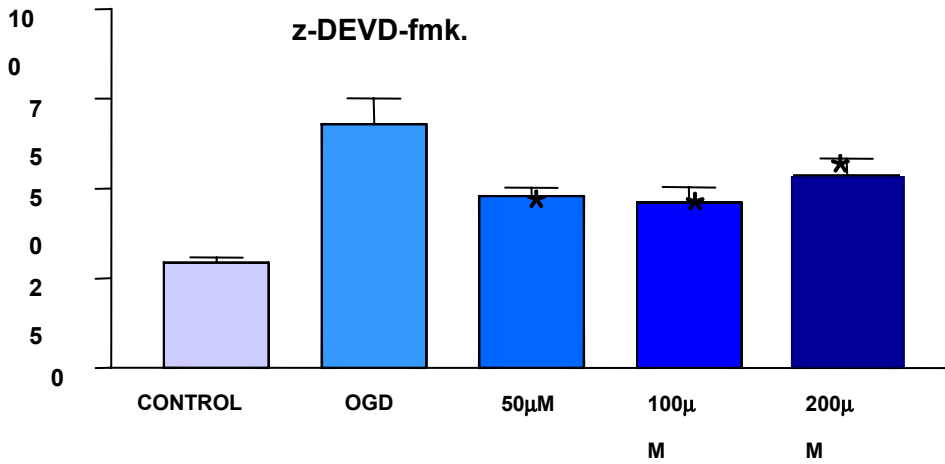


그림11. In vitro 허혈 모델에서 8-OH-DPAT과 z-DEVD.fmk)투여에서 LDH유리값 측정에 의한 세포사망 정도. OGD 90분 군을 24시간 재관류에서 8-OH-DPAT과 z-DEVD.fmk를 투여한 후 LDH유리값을 측정하였으며, 두 약물 모두 세포사망을 억제하였으나 투여 용량에 비례하여 세포사망을 억제하지는 않았다. 두 약물을 동시에 처치했을 때에도 세포사망을 억제하였으나 각각 처치한 군과의 차이는 없었다.

2. In-vivo 결과

가. 심정지 전 후의 실험동물 군의 몸무게 변동

심정지 유도 1일 전을 기준으로 실험동물군의 몸무게 변동에 있어서 각 실험군간에 통계적으로 유의한 차이는 발견 되지 않았으며, 심정지 이후 일시적으로 몸무게가 감소하는 경향이 모든 실험군에서 관찰 되었다(그림 12). 전일 대비 기준으로 실험동물의 몸무게의 증가경향을 관찰한 결과 심정지 1일 후 급격한 몸무게 감소의 경향이 관찰되었다. 이후 실험동물군의 몸무게는 실험동물을 희생하기 전까지 증가 경향이 나타났으나 실험군 간의 통계적인 유의성은 발견되지 않았다(그림13).

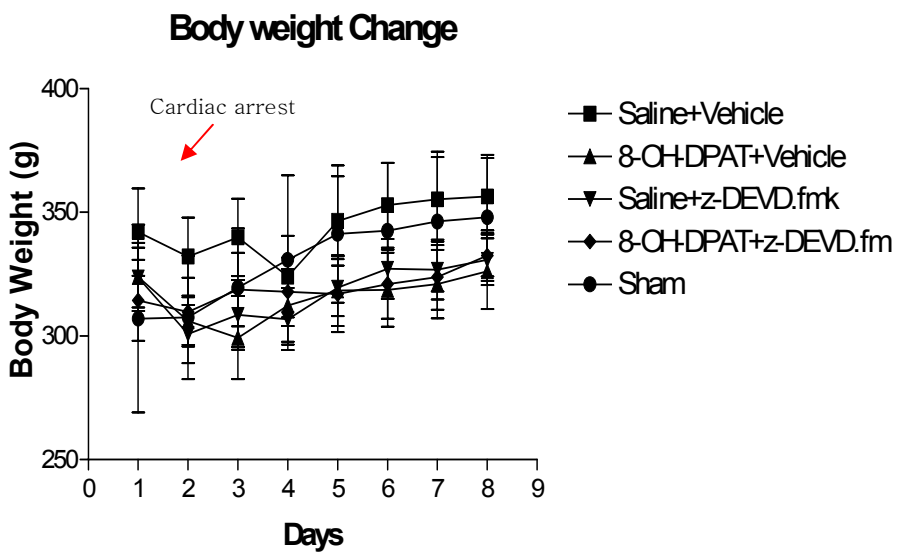


그림12. 심정지 유도 1일 전을 기준으로 한 실험동물군의 몸무게 변동. 각 실험군 간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으며 심정지 이후 일시적으로 몸무게가 감소하는 경향이 모든 실험군에서 관찰 되었다.

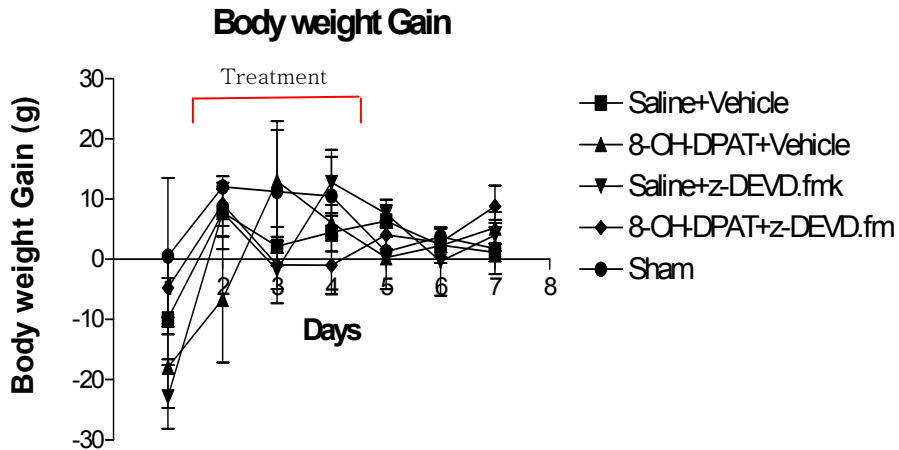


그림13. 전일 대비 기준으로 한 실험동물의 몸무게 변동. 몸무게의 증가경향을 관찰한 결과 심정지 1일 후 급격한 몸무게 감소의 경향이 관찰되었다. 이후 실험동물군의 몸무게는 실험동물을 희생하기 전까지 증가 경향이 나타났으나 실험군 간의 통계적인 유의성은 없었다.

나. 행동변동

(1) Righting reflex, Placing reaction Test

심정지 6일 후 rota-rod test 에 앞서 righting reflex와 placing reaction test를 실시하였다. 모든 실험군의 동물이 정상적인 반응을 보였으며, 각 실험군 간의 통계적 유의성은 없었다(그림14).

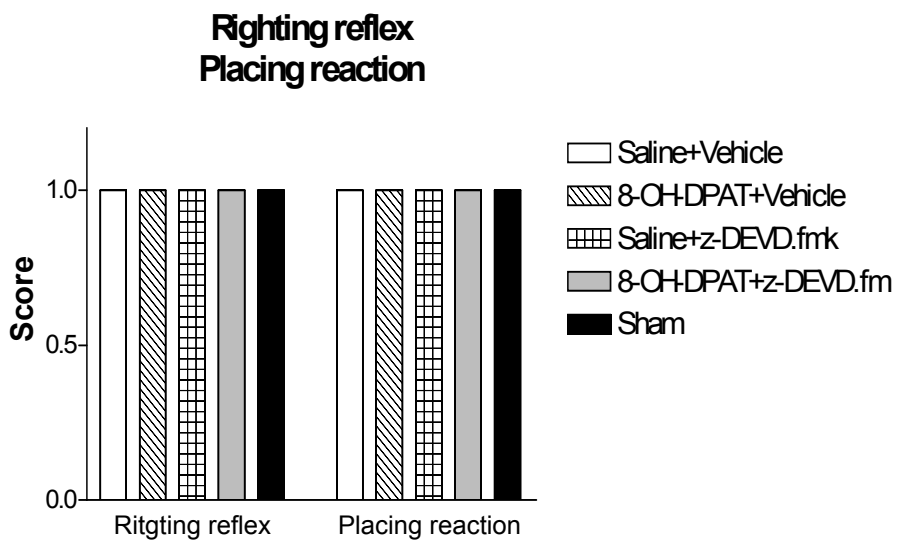


그림14. 심정지 6일 후 시행한 righting reflex와 placing reaction test 결과. Rota-rod test 에 앞서 시행한 righting reflex와 placing reaction test 결과 모든 실험군의 동물이 정상적인 반응을 보였으며, 각 실험군 간의 통계적 유의성은 없었다.

(2) Rota-rod Test

심정지 6일 후에 실시한 Rota-rod test는 3차례 시행하였으며, 3회째의 결과에서 8-OH-DPAT와 z-DEVD.fmk 를 병용투여한 군에서 saline과 vehicle을 처치한 군에 비하여 통계적 유의성을 보였다 (* $p < 0.05$; vs Sham, + $p < 0.05$; vs Saline+ Vehicle)(그림 15).

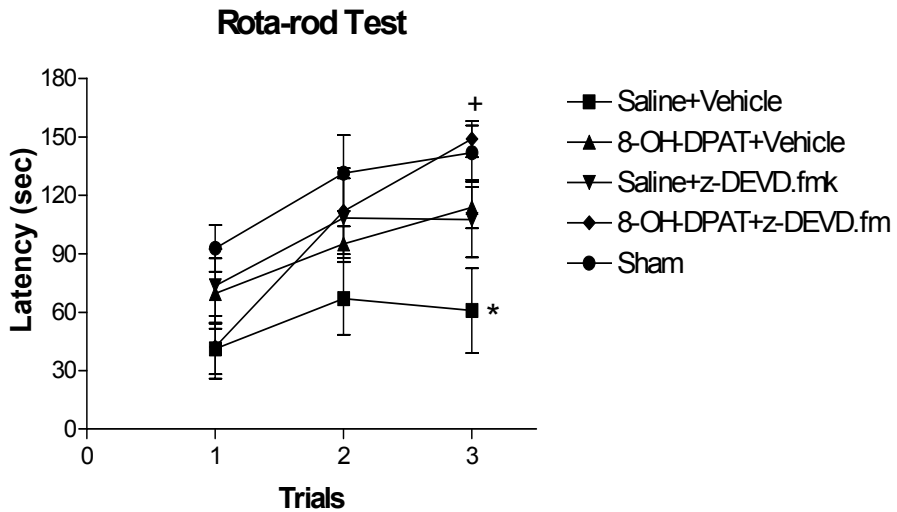


그림15. 심정지 6일 후 시행한 Rota-rod test결과. 심정지 6일 후에 실시한 Rota-rod test에서는 3회에 걸친 test중 3회째의 결과에서 심정지 이후 5-HT_{1A} 수용체 효현제인 8-OH-DPAT 과 caspase-3 의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk 를 모두 처치한 군이saline과 vehicle을 처치한 군에 비하여 통계적 유의성을 보였다(* p<0.05; vs Sham, + p<0.05; vs Saline+ Vehicle).

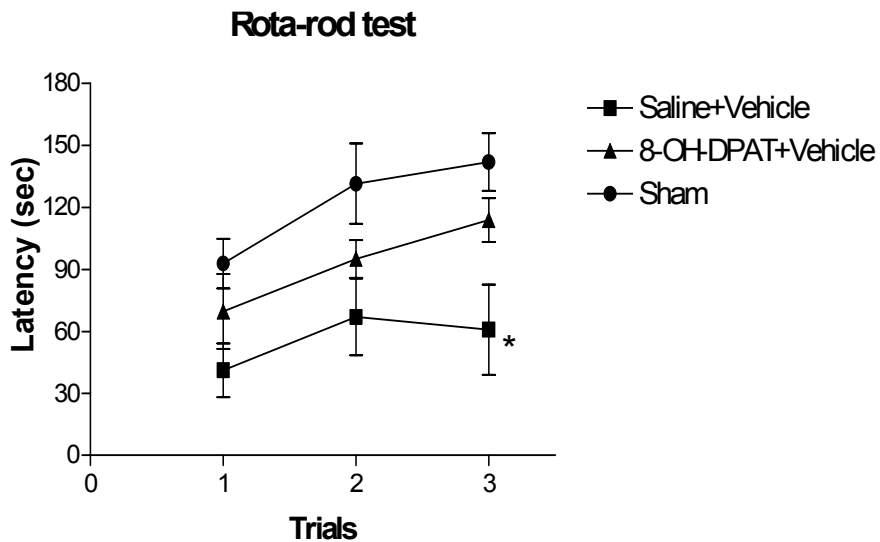


그림16. 심정지 6일 후 시행한 Rota-rod test결과에서 8-OH-DPAT 투여군 비교. 심정지 6일 후에 실시한 Rota-rod test에서는 3회에 걸친 test중 3회째의 결과에서 8-OH-DPAT를 투여한 군은 Saline+ Vehicle 군에 대해 통계적 유의성이 있었다(* $p < 0.05$; vs Saline+ Vehicle).

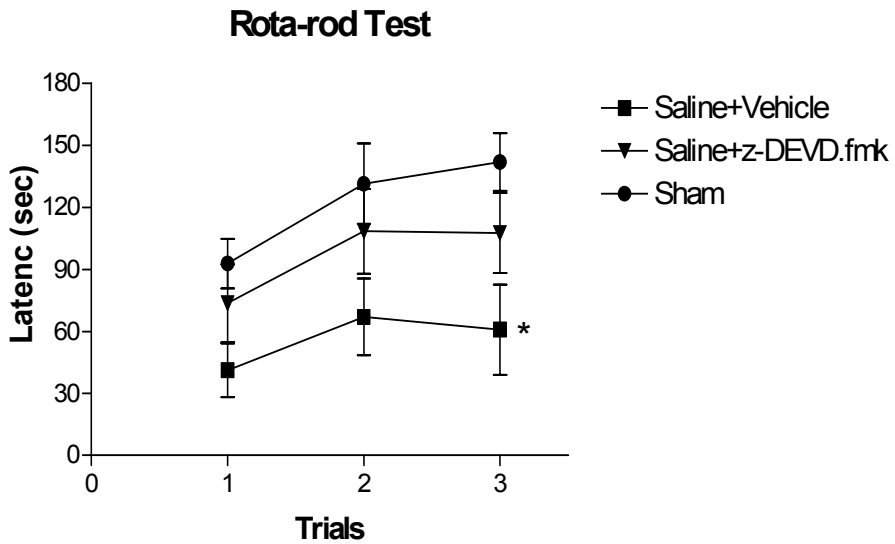


그림17. 심정지 6일 후 시행한 Rota-rod test결과에서 z-DEVD.fmk 투여군 비교. 심정지 6일 후에 실시한 Rota-rod test에서는 3회에 걸친 test 중 3회째의 결과에서 z-DEVD.fmk를 투여한 군은 Saline+ Vehicle 군에 대해 통계적 유의성이 있었다(* $p < 0.05$; vs Saline+ Vehicle).

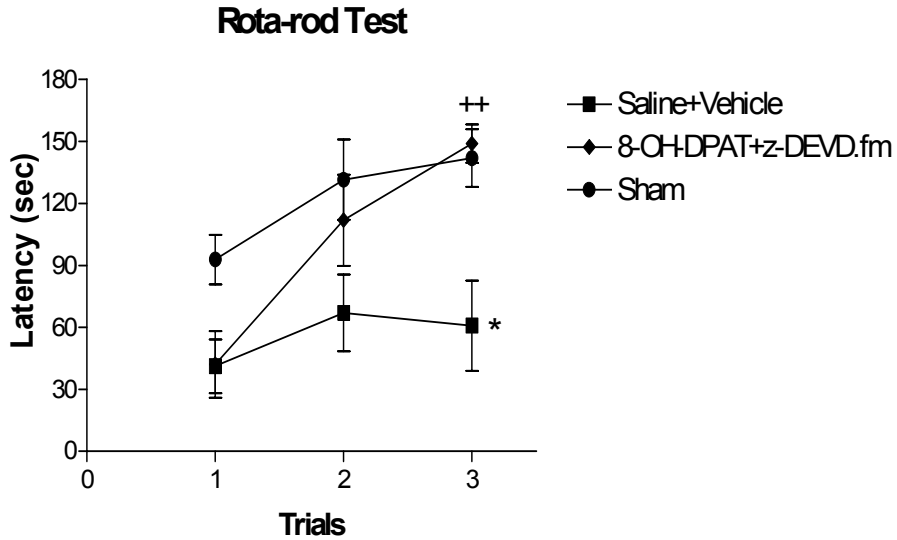


그림18. 심정지 6일 후 시행한 Rota-rod test결과에서 8-OH-DPAT와 z-DEVD.fmk 병용 투여군 비교. 8-OH-DPAT와 z-DEVD.fmk 를 병용투여군은 saline+ vehicle 군과 비교하여 통계적 유의성을 보였다. 또한 saline+ vehicle 군과 sham 군과의 비교에서도 통계적인 유의성이 나타났다(* p<0.05; vs Sham, ++ p<0.01;vs Saline+ Vehicle).

다. 조직검색

(1) Cresyl violet 염색 결과

심정지 후 지연 뇌세포 사멸을 보이는 해마부위의 CA1 지역을 관찰하기 위하여 Cresyl violet 염색 후 bregma로부터 -3.30mm 에서 -3.60mm 지점의 해마부위(CA 1 지역)를 관찰하였다(그림19). 100배 확대하여 관찰하였을 때 8-OH-DPAT 과 z-DEVD.fmk 병용 투여군에서 Saline+ Vehicle 처치 군에 비하여 조밀한

세포분포를 보이고 있다(그림20). 이러한 소견은 같은 슬라이드의 200배 확대 관찰에서도 동일하였다(그림21).



그림19. 해마부위의 CA1지역의 Cresyl violet 염색소견. 심정지 후 지연 뇌세포 사멸을 보이는 해마부위의 CA1 지역을 관찰하기 위하여 bregma로부터 -3.30mm 에서 -3.60mm 지점의 해마부위(CA 1 지역)를 Cresyl violet 염색 후 관찰하였다.

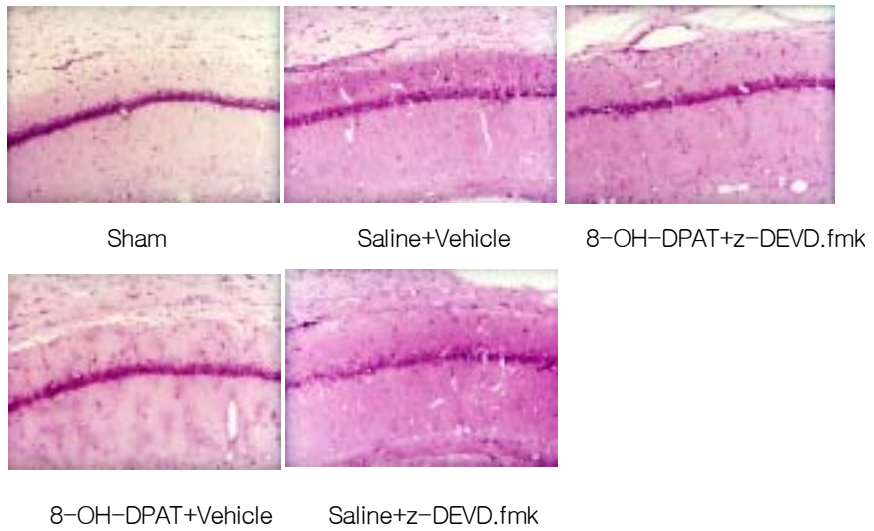


그림20. 해마부위의 CA1 지역의 Cresyl violet 염색의 100배 확대 관찰조건. 8-OH-DPAT와 z-DEVD.fmk 병용투여 군에서 Saline+ Vehicle 처치 군에 비하여

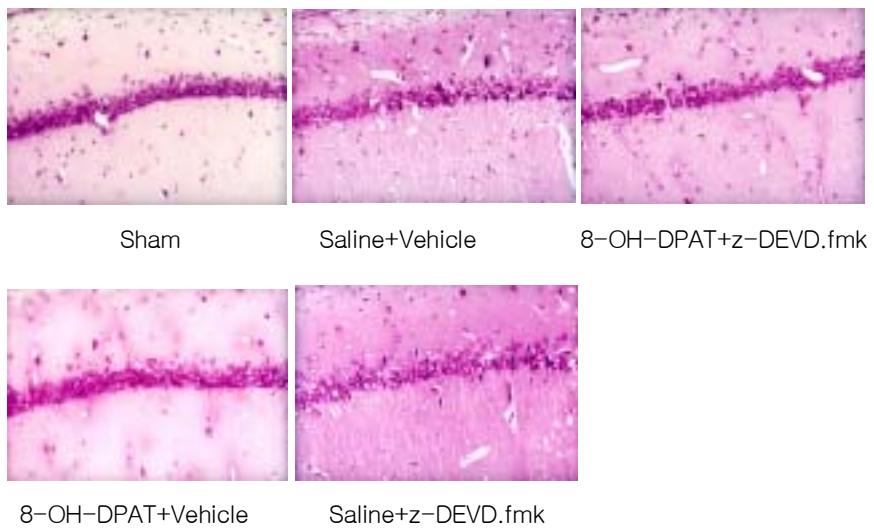


그림21. 해마부위의 CA1 지역의 Cresyl violet 염색의 그림20의 200배 확대 관찰조건. 8-OH-DPAT와 z-DEVD.fmk 병용투여 군에서 Saline+ Vehicle 처치 군에 비하여 조밀한 세포분포를 보이고 있다.

IV. 고찰

5-HT_{1A} 수용체효현제인 8-OH-DPAT 과 caspase-3 반응억제제인 z-DEVD.fmk 를 랫드의 허혈성 손상 후에 병용 사용하여 in-vitro 연구에서는 신경보호효과가 없었으나 in-vivo 연구에서는 뇌조직 및 기능향상에 효과가 있었다.

5-HT 수용체 중에서 특히 5-HT_{1A} 수용체는 glutamate 에 의한 excitotoxicity 를 감소시켜서 허혈성 뇌세포 손상을 예방한다^{6,7}. 손상을 예방하는 기전이 완전히 밝혀져 있지는 않지만 G protein-coupled 수용체인 5-Hydroxytryptamine 1A(5-HT_{1A}) 수용체가 활성화되어 Gβγ subunit 가 신호전달경로를 통하여 cAMP 신호전달을 저해하여 ion channel 의 phosphorylation 을 감소시키고, NMDA 에 의한 Ca⁺⁺의 유입을 방해하여 결국 NMDA-induced caspase-3 활성화를 방해함으로써 세포 증식과 변형을 유도한다¹⁰. 그러나 같은 glutamate 효현제라 하더라도 N-methyl-D-aspartate(NMDA) analog quinolinic acid 는 세포괴사(necrosis)를 주로 일으키고 kainic acid 는 세포고사(apoptosis)를 주로 일으키는 것으로 보아 서로 다른 작용기전을 갖고 있다¹⁹. 랫드의 질식에 의한 허혈성 심정지에 의한 저산소성 뇌손상에서 caspase-1 과 caspase-3 가 증가한다²⁰. 이 중에서 caspase-3 는 가장 효능이 있는 caspase 로서 apoptosis 에 의한 신경세포사망에서 나타나는 genomic DNA fragmentation 과

염색질 농축을 주도하며 apoptosis 에서만 나타나고 괴사에 의한 세포사망에서는 나타나지 않는다²¹. 허혈성 손상 후에 미토콘드리아에서 cytochrome C 가 분비되어 ced4 analog APAF3 에 부착하여 procaspase 를 절단하여 caspase-3 를 활성화시키는데 caspase-3 like mRNA 는 허혈성 손상의 8-24 시간 사이에 최고농도로 나타나서 caspase-3 단백질도 비교적 초기인 8-24 시간 동안에 활성화된다. 그럼에도 불구하고 caspase 반응억제제를 이보다 앞서 허혈성 손상 후 12 시간 또는 2 시간 후에 사용하여 효과적이었던 보고가 있다^{23,24}. 그러나 cortical layer 2,5 에서는 이보다 더 초기인 허혈 후 15 분 안에 caspase-3 mRNA 가 증가한다²⁵. 그렇지만 caspase-3 반응억제제는 apoptosis 를 억제하면서도 저칼륨에 의한 apoptosis 에는 영향을 주지 않는다²². In-vivo 허혈 연구에서 caspase-3 가 아닌 calpain 같은 다른 protease 가 apoptosis 에 관여한다는 보고도 있다²⁶. OGD 유발에 의한 in-vitro 연구에서도 calpain 과 caspase-3 가 서로 유기적인 관계를 갖고 apoptosis 과정에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다²⁷. 또한 혈관을 생성하는 vascular endothelial growth factor(VEGF)는 신경보호효과도 가지고 있는데 바로 caspase-3 의 활성화를 방해함으로써 허혈성 손상과정에서 내성적인 신경보호인자의 역할을 한다²⁸. 자연적으로 나타나는 apoptosis 억제제인 inhibitors of apoptosis(IAP)의 일종인 XIAP 가

질식성 심정지 후 대뇌피질, hippocampus, 소뇌에서 나타난다. Caspase 억제제에 의하여 XIAP 가 감소하는 것으로 보아 이는 caspase 활성화와 관련이 있다.

In-vitro 연구에서는 5-HT_{1A} 수용체효현제인 8-OH-DPAT 과 caspase-3 의 반응억제제인 z-DEVD.fmk 를 각각 사용하여 뇌조직 및 기능향상에 효과가 있었으나 병용투여에서는 효과가 없었다. 그러나 in-vivo 연구에서는 8-OH-DPAT 과 z-DEVD.fmk 를 각각 사용했을 때와 병용투여 했을 때 모두에서 뇌조직 및 기능향상에 효과가 있었다.

In-vitro 연구에서 8-OH-DPAT 과 z-DEVD.fmk 를 각각 사용하였을 때는 신경보호효과가 있었는데 병용투여에서는 효과가 없었다. 이는 뇌세포 배양과 실험방법에서는 차이가 없었기 때문에 이 두 가지 물질의 상호작용 즉, apoptosis 를 일으키는 기전에서 8-OH-DPAT 에 의한 glutamate 억제과정과 z-DEVD.fmk 의 caspase 억제과정이 길항작용을 나타내거나 두 가지 약물의 투여 합계량이 과도했음을 의미할 수 있다.

5-HT_{1A} 수용체효현제인 8-OH-DPAT 과 caspase-3 의 반응억제제인 z-DEVD.fmk 를 병용하였을 때 in-vivo 연구에서만 신경보호효과가 관찰된 결과는 첫째 in-vitro 환경과 in-vivo 환경의 차이가 원인 중 하나라고 생각할 수 있다. In-vivo 환경에서는 혈류가 존재할 뿐 아니라 시냅스 전달 손상 정도, 세포에서의

형태학적 변화, 세포내 구조물의 파괴가 in-vitro 환경보다 적게 일어나므로 in-vitro 환경보다 허혈성 손상에 보다 강하다. In-vitro 환경에서는 free radical 과 peroxyxynitrite 가 cytochrome oxidase mRNA transcription 을 막아서 미토콘드리아의 DNA 에 작용하여 in-vivo 에서보다 더 많은 미토콘드리아 손상을 일으킨다. 둘째는 시간적인 차이이다. 허혈 지속 시간과 재관류 시간, 그리고 투여 시간, 평가 시간이 in-vitro 환경과 in-vivo 환경에서 서로 달랐다. In-vitro 연구에서는 OGD90 분과 재관류 24 시간 후에 apoptosis 를 평가한 반면에 in-vivo 연구에서는 2 분 30 초의 허혈성 손상 후 6 일 후에 운동 기능을 평가하고 apoptosis 는 7 일 후에 평가하였다. 따라서 in-vitro 연구 결과는 in-vivo 연구에 비하여 손상 초기의 결과라고 할 수 있다. 미토콘드리아에서 cytochrome C 가 분비되고 procaspase 분비는 4 시간에 증가하고 caspase-3 활성화도 8-12 시간에 증가하여 활성화된 caspase-3 fragment 는 24 시간에 나타나는데 이는 허혈성 손상의 초기 기간이다. Caspase-3 의 반응 억제제인 z-DEVD.fmk 는 손상 후 6 시간까지 효과가 있으며 18 시간 후에는 효과를 기대할 수 없다고 보고되어 있지만 이번 연구에서 z-DEVD.fmk 를 허혈성 손상 후 24 시간 간격으로 3 일까지 반복 투여함으로써 신경보호효과가 있었으므로 z-DEVD.fmk 의 작용시간에 대한 연구가 더 필요하다. 세번째는 약물 상호간의 작용이다. 5-HT_{1A} 수용체효현제인 8-OH-

DPAT 은 glutamate 에 의한 칼슘이온의 세포질안으로의 흡수를 방해함으로써 glutamate 수용체 차단은 4-8 시간동안의 세포사망을 나타낸다. 반면에 caspase-3 의 반응억제제인 z-DEVD.fmk 는 세포질안에 칼슘이온이 축적됨으로써 미토콘드리아에서 proapoptotic protein 인 BAX, Bcl-Xs 표현에 의한 caspase-3 활성화를 억제함으로써 효과를 나타내는데 이와 같은 각각의 기전은 전체적으로는 하나의 연결된 pathway 로서 신경보호물질이 신경세포에 대한 직접적인 효과 뿐 아니라 보상작용이 활발함을 알 수 있다. 네번째는 in-vivo 연구의 결과가 운동기능을 평가했다는 것이다. In-vitro 연구에서는 각각의 세포 단계에서의 형태학적 손상이 확인되었지만 in-vivo 연구에서는 세포 수준이 아니라 개체에서의 운동기능이라는 여러 요인에 의하여 조절되는 통합기능을 손상의 척도로 평가하였다.

이 연구에서 주목할 만한 결과의 첫째는 caspase-3 반응억제제를 심폐소생술과 동시에 사용하여 신경보호효과가 있다는 것이다. 이전의 연구와는 달리 재관류 시작과 동시에 신경보호물질인 8-OH-DPAT 과 z-DEVD.fmk 를 투여하여 신경보호효과가 있었다. 둘째로는 in-vivo 환경에서 보다 좋은 결과가 도출되었다는 것으로 궁극적으로는 이러한 신경보호물질의 투여가 임상적인 심정지 환자에서 심폐소생술과 동시에 적용할 수 있는 가능성을 시사한다.

V. 결론

심정지에 의한 허혈성 손상의 in-vitro 연구에서는 5-HT_{1A} 수용체효현제인 8-OH-DPAT 과 caspase-3 의 반응억제제인 z-DEVD.fmk 를 재판류 시작단계에서 각각 처치 하여 뇌조직 및 기능향상에 효과가 있었지만 병용투여에서는 효과가 없었고, in-vivo 연구에서는 각각 사용했을 때와 병용투여 했을 때 모두에서 효과가 있었다. 따라서 심정지라는 임상적인 허혈성 손상에서 신경보호물질을 심폐소생술 시작단계에서 처치함으로써 허혈성 뇌손상을 줄일 수 있다고 사료된다.

참고문헌

1. Zoll PM, Linenthal AJ, Gibson W, Paul MH, Normal LR. Termination of ventricular fibrillation in man by externally applied electrical countershock. *N Engl J Med* 1956;254:727-732.
2. Safar P, Escarraga LA, Elam JO. A comparison of the mouth-to-mouth and mouth-to-airway methods of artificial respiration with the chest-pressure arm-lift methods. *N Engl J Med* 1958;258:671-677.
3. Kouwenhoven W, Jude JR, Knickerbocker GG. Closed-chest cardiac massage. *1960;173:1064-1067.*
4. ILCOR. Guidelines 2000 for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care-An International Consensus on Science. *Resuscitation* 2000;46:1-447.
5. Strosznajder J, Chalimoniuk M, Samochocki M. Activation of serotonergic 5-HT_{1A} receptor reduces Ca²⁺ and glutamatergic receptor evoked arachidonic acid and No/cGMP release in adult hippocampus. *Neurochem Int* 1996;28:439-444.
6. Matsuyama S, Nei K, Tanaka C. Regulation of GABA release via NMDA and 5-HT_{1A} receptors in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res* 1997;761:105-112.

7. Madhavan L, Freed WJ, Anantharam V, Kanthasamy AG. 5-Hydroxytryptamine 1A receptor activation protects against N-Methyl-D-Aspartate induced apoptotic cell death in striatal and mesencephalic cultures. *2003;304:913-923.*
8. Nakata N, Suda H, Izumi J, Tanaka Y, Ikeda Y, Kato H, Itoyama Y, Kogure K. Role of hippocampal serotonergic neurons in ischemic neuronal death. *Behav Brain Res 1997;83:217-220.*
9. Harkany T, Mulder J, Horvath KM, Keijser J, van der Meeberg EK, Nyakas C, Luiten PG. Oral post-lesion administration of 5-HT(1A) receptor agonist repinotan hydrochloride(BAY x 3702) attenuates NMDA-induced delayed neuronal death in rat magnocellular nucleus basalis. *Neuroscience 2001;108-629-642.*
10. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *2001;92:179-212.*
11. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakajima W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res 2001;49:735-741.*

12. Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993;24:2002-2008.
13. Roberts-Lewis JM, Savage MJ, Marcy V, Pinsker LR, Simon R. Immunolocalization of γ -calpain mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in ischemic gerbil brain. *J Neurosci* 1994;14:3934-3944.
14. Bartus RT, Dean RL, Cavanaugh K, Eveleth D, Carriero DL, Lynch G. Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion: implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:969-979.
15. Du Y, Bales KR, Dodel RC, Hamilton-Byrd E, Horn JW, Czilli DL, Simmons LK, Ni B, Paul SM. Activation of a caspase-3 related cysteine proteases is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 1997;17:11657-11662.
16. Fink K, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Endres M, Ma J, Dalkara T, Yuan J, Moskowitz MA. Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1071-1076.

17. Himi T, Ishizaki Y, Murota S. A caspase inhibitor blocks ischemia-induced delayed neuronal death in the gerbil. *Eur J Neurosci* 1998;10:777-781.
18. Endress M, Namura S, Shimizu-sasamata M. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:238-247.
19. Portera-cailleau C, Price DL, Martin LJ. Non-NMDA and NMDA receptor mediated excitotoxic neuronal deaths in adult rat brain are morphologically distinct: further evidence for apoptosis necrosis continuum. *L Comp Neurol.* 1997;378:88-104.
20. Karz LM, Lotocki G, Wang Y, Kraydieh S, Dietrich WD, Keane RW. Regulation of caspases and XIAP in the brain after asphyxial cardiac arrest in rats. *NeuroReport* 2001;12:3751-3754.
21. Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, Gaur S, Bai X, Alnemri ES, Litwack G, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci* 1997;17:553-562.

22. D'Mello SR, Kuan CY, Flavell RA, Rakic P. Caspase-3 is required for apoptosis-associated DNA fragmentation but not for cell death in neurons deprived of potassium. *J Neurosci* 2000;59:24-31.
23. Chen J, Nagayama T, Jin K: Induction of caspase-3 like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1998;18:4914-4928.
24. Himi T, Ishizaki Y, Murata S: A caspase inhibitor blocks ischemia induced delayed neuronal death in gerbil. *Eur J Neurosci*. 1998;10:777-781.
25. Ni B, Wu X, Glinn M. Transient focal ischemia induces early caspase-3 mRNA expression and enzyme activation in cortical neurons. *Soc Neurosci Abstr* 1998;24:1789.
26. Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998;18:3659-3668.
27. Newcomb-Fernandez JK, Zhao X, Pike BR, Wang KK, Kampfl A, Beer R, DeFord SM, Hayes RL. Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen-glucose

deprivation in primary septo-hippocampal cultures. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:1281-1294.

28. Jin K, Mao O, Batteur SP, McEachron E, Leahy A, Greenberg A. Caspase-3 and the regulation of hypoxic neuronal death by vascular endothelial growth factor. *2001;108:351-358.*

Abstract

Ischemic cell death in brain neurons and neurologic function by neuroprotective agents in cardiac arrest

Keun Jeong Song

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Hahn Shick Lee)

Cardiopulmonary resuscitation(CPR) is the only treatment for cardiac arrest that requires most immediate treatment, despite of numerous studies and the improved treatment standards in the past 50 years, the return of spontaneous circulation(ROSC) or the rate of survival discharge has not been improved evidently, and the recommendations of treatment mode to improve the extremely poor neurological outcome after survival are controversial. Therefore, presently, the treatment standard for neurological therapy during the CPR procedure has not been

established yet. Hence, to examine the recovery of the brain neuron injury by neuroprotective substances, in vitro study and in vivo study was performed by under the experimental environment similar to the clinical cardiac arrest condition, administering two drugs with neuroprotective activity during CPR after the occurrence of ischemic injury by cardiac arrest.

In in vitro study, mouse brain neurons were cultured, subjected to oxygen glucose deprivation(OGD),underwent reperfusion, added the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT and the caspase-3 inhibitor z-DEVD.fmk, and to evaluate cell necrosis, the value of lactate dehydrogenase(LDH) release was measured and assessed by staining with propidium iodine(PI). In in vivo study, cardiac arrest was induced in Sprague-Dawley male rats, performed CPR, the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT was injected subcutaneously and the caspase-3 inhibitor z-DEVD.fmk was injected intracerebroventricular, and as neurological tests, Righting reflex Test, Placing reaction Test, and Rota-rod Test were performed, and the rat brain was extracted, stained with Cresyl violet, and assessed. The statistical analysis of experiment results were performed using the StateView program (version 5.01, The SAS Institute, CA,

USA), and one way ANOVA test, Fisher PLSD test, and Scheffe's F Test were applied.

The result of in vitro study showed when the treatment of OGD 90 minutes group underwent reperfusion for 24 hours and treated with the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT and the casepase-3 inhibitor z-DEVD-fmk, in the group treated with one agent and the group treated in combination, in comparison with control group and OGD 90 group underwent reperfusion for 24 hours, cell necrosis was suppressed significantly, however, the group treated with a single agent and the group treated in combination were not significantly different. The result of in vivo study showed that in the righting reflex test and placing reaction test, a statistically significant difference among experimental was not detected. The result of the 3rd Rota-rod test showed that in the group treated with the combination of 8-OH-DPAT and z-DEVD.fmk, in comparison with the group treated with saline and vehicle, a statistically significant difference was detected. In the staining of the hippocampus CA1 of rats with cresyl violet, cell distribution in the group treated with the combination was more dense than the group treated with saline + vehicle. Hence, in in vitro study that the 5-HT_{1A} receptor

agonist 8-OH-DPAT and caspase-3 inhibitor z-DEVD.fmk were added, neuroprotective effect was not detected, however, in in vivo study, it was effective on the improvement of brain neurons and neurologic function.

Such discrepancy between in vitro study and in vivo study shows not only the direct effect of neuroprotective substances on brain neuron but also the active compensation. In other words, the effect of the use of neuroprotective substances in combination can be expected, and although it is not clear in this experiment, it may be due to the mutual chemical relation of drugs or repetitive and antagonistic effect of neurotransmission. Therefore, it is conceivable that in clinical ischemic injury cardiac arrest, the posttreatment with neuroprotective agent may reduce ischemic brain injury.

Key Words : iscehmic injury, cardiac arrest, neuroprotective agent,