국소 뇌허혈에서 뇌저온 요법의 허혈 손상 및 Matrix Metalloproteinase에 대한 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

이 경 열

국소 뇌허혈에서 뇌저온 요법의 허혈 손상 및 Matrix Metalloproteinase에 대한 영향

지도교수 허 지 회

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
이 경 열

이경열의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 항상 바쁘신 와중에도 아낌없는 지도와 배려를 베풀어 주신 허지회 교수님께 깊은 감사를 드리며, 자상한 지도 편달을 해주신 선우일남 교수님, 이병인 교수님, 허승곤 교수님과 김동구 교수님께 감사를 드립니다. 또한 실험을 진행하는데 많은 도움을 주신 김경환 선생님과 김은희 연구원에게도 감사 드립니다.

언제나 곁에서 큰 힘이 되어 부모님과 가족 그리고 아내에게 깊은 감사와 애정을 드립니다.

저자 씀

차 례

그림 차례

표 차례

-국문요약-

국소 뇌허혈에서 뇌저온 요법의 허혈 손상 및 matrix metalloproteinase에 대한 영향

뇌졸중은 크게 뇌출혈과 뇌경색으로 나누어지는데 단일 질환으로서는 가장 흔한 사망 원인이며 생존하는 경우에도 많은 후유 장애를 남긴다. 뇌경색의 치료와 관계된 연구는 뇌허혈시에 발생하는 뇌손상의 기전을 밝혀 이를 억제하여 치료에 응용하고자 하는 시도와 함께 막힌 뇌혈관을 빠른 시간 내에 재관류 시킴으로써 허혈에 빠진 뇌조직을 회복시키고자 하는 방향으로 이루어지고 있다. 그러나 아직까지는 급성기의 혈전 용해술 이외에는 효과적인 치료법은 거의 없는 상태이다. 뇌저온 요법은 뇌경색에서 뇌손상을 감소시키는 목적으로 시도되고 있는데 동물 실험에서는 뇌경색 및 뇌부종의 크기를 감소시키고 신경학적 장애를 호전시키는 것으로 알려졌고 임상적으로는 일부에서 심한 뇌경색의 환자에서의 유용성이 보고되었다. 뇌저온 요법은 여러 가지 다양한 기전에 의하여 뇌 보호 효과를 나타내는 것으로 생각되는데 그 기전 중의 하나가 혈액-뇌 관문의 보호작용이다. 한편 뇌경색에서 세포외 기질을 파괴하는데 관여하는 MMP-2 및 MMP-9 활성도가 증가하며 또한 혈액-뇌 관문을 손상시키는데 관계하는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직까지는 뇌경색에서 MMP-2 및 MMP-9 와 뇌저온 요법과의 관계는 밝혀진 바가 없다.

이번 연구에서는 실험동물에서 중뇌동맥 폐색 및 재관류 방법으로 뇌경색을 유발하여 MMP-2 및 MMP-9 의 활성화와 뇌경색의 크기와의 상관 관계를 알아보고 뇌저온 요법이

뇌경색의 크기, 혈액-뇌 관문의 손상 및 MMP-2 및 MMP-9 의 활성도에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

실험동물은 자발성 고혈압 쥐를 이용하였는데 2 시간 동안 중뇌동맥을 폐색한 후 18 시간 재관류한 후에 희생하였다. 실험대상은 대조군, 정상 체온군, 허혈중뇌저온 요법군, 허혈후 뇌저온 요법군으로 나누었으며 뇌저온 요법군의 경우에는 체온을 섭씨 32 도까지 낮추어서 2 시간 동안 유지하였다. 각 군에서 적출된 뇌를 triphenyltetrazolium chloride 으로 염색하여 뇌경색의 크기를 측정하고, gelatin zymography 를 이용하여 뇌조직에서의 MMP-2 및 MMP-9 의 활성도를 측정하였다. 혈액-뇌 관문의 손상 정도는 허혈중뇌저온 요법군과 정상 체온군에서 에반스 블루의 혈관외 유출 정도를 측정하였다.

허혈중 뇌저온 요법은 정상 체온을 유지한 경우에 비하여 뇌경색의 크기를 55.1% 통계적으로 유의하게 감소시키는 효과를 보였다. 허혈후 뇌저온 요법은 정상 체온에 비하여 뇌경색의 크기를 11.9% 감소시켰으나 통계적인 유의성은 없었다. 허혈중 뇌저온 요법은 정상 체온 및 허혈후 뇌저온 요법에 비하여 허혈 대뇌반구에서의 MMP-2 및 MMP-9 활성도를 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 허혈 대뇌반구에서의 MMP-2 및 MMP-9 활성도는 뇌경색의 크기와 통계적으로 유의한 양의 상관관계를 보였다. 허혈중 뇌저온 요법은 정상 체온을 유지한 경우에 비하여 혈액-뇌 관문의 손상을 통계적으로 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과를 종합할 때 허혈중 뇌저온 요법은 뇌허혈 및 재관류시에 발생하는 뇌경색의 크기를 감소시키며 혈액-뇌 관문의 손상도 억제하는 효과를 보였는데 이러한 보호 효과에는 MMP-2 및 MMP-9 의 억제가 중요한 기전으로서 작용한다고 생각한다. 허혈후 뇌저온 요법의 경우에는 통계적으로 유의한 뇌경색 억제 효과를 나타내지는 못하였으나 임상적인 적용에 있어서의 중요성을 고려할 때 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

핵심되는 말 : 뇌경색, 뇌저온 요법, matrix metalloproteinase, 혈액 - 뇌 관문

국소 뇌허혈에서 뇌저온 요법의 허혈 손상 및 matrix metalloproteinase에 대한 영향

<지도 교수 허지회 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

이 경 열

I. 서 론

뇌졸중은 단일장기 질환으로는 가장 흔한 사망원인으로 알려져 있으며 또한 장애의 가장 흔한 원인 중의 하나이기도 하다. 뇌졸중은 크게 뇌경색과 뇌출혈로 나눌 수 있는데 서양에서는 뇌출혈에 비해서 뇌경색이 더 많은 비중을 차지하고 있으며 최근에는 국내에서도 생활형태 및 식생활이 서구화 됨에 따라 뇌경색의 빈도가 점점 증가하는 추세이다. 최근 10 여년 간에 걸친 뇌경색의 치료와 관계된 중요한 연구는 뇌허혈 부위에서의 역동적으로 일어나는 생화학적인 뇌손상의 기전을 밝혀 이를 치료에 응용하고자 하는 시도와 함께 막힌 뇌혈관을 빠른 시간 내에 재관류함으로써 감소되었던 뇌혈류를 정상으로 복구하여 허혈에 빠진 뇌조직을 회복시키고자 하는 방향으로 이루어지고 있다. 뇌손상의 기전과 관련된 대표적인 것으로는 저산소증에 의한 세포괴사 이외에도 칼슘과 흥분성 아미노산에 의해 매개되는 세포손상, 산소 유리기에 의한 손상, 염증세포에 의한 허혈 조직에서의 염증반응 등이 알려져 있다.[1,2] 또한 이런 기전들을 적용하여서 개발된 치료약제들은 많은 동물

실험에서 그 효과가 인정되어 실제 환자에게 임상에서 치료가 시도되었다. 그러나 현재까지 이들을 이용한 치료약제가 임상에서 급성기 뇌경색에 효과가 있는 것으로 밝혀진 바는 없어 새로운 접근방법이 요구되는 상태이다.[3-6]

뇌혈관 기저막(basement membrane)은 type IV collagen, laminin, fibronectin 등의 세포외 기질로 구성되어 있으며 혈액-뇌 관문(blood-brain barrier)의 중요한 구성성분으로서 뇌혈관의 모습을 유지하는데 필수적이다. 뇌경색이 발생하면 뇌혈관 기저막도 함께 파괴되는데, 이는 뇌경색 발생시에 동반되는 뇌부종과 출혈전환의 일차적인 원인으로 생각되어져 왔다.[7,8] 기저막을 파괴시키는 물질 중 가장 대표적이고 중요한 것이 matrix metalloproteinase (MMP)이다.[9] MMP 는 모든 종류의 세포외 기질을 파괴할 수 있는 단백분해 효소로, 현재까지 여러 종류의 MMP 가 각기 다른 여러 종류의 세포외 기질을 파괴하는 것으로 알려져 있다.[10-12] MMP 는 정상적으로는 세포와 조직의 분화, 발달 및 이동, 상처조직의 재생 등에 필요하다.[13] 그러나 비정상적으로 분비되거나 활성화되는 경우 암의 성장, 염증성 질환 및 동맥경화증 등에서 중요한 역할을 한다.[14,15] 여러 종류의 MMP 중에서 MMP-2 와 MMP-9 는 각기 gelatinase A (72 kDa type IV collagenase) 또는 gelatinase B (92 kDa type IV collagenase)라고도 불리운다. 이들은 뇌의 기저막을 구성하는 주요한 세포외 기질인 type IV collagen 이나 laminin 등을 주로 파괴하기 때문에 여러 중추신경계 질환의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 지금까지 신경계 질환과 연관하여서는 뇌막염, 다발성 경화증, 뇌종양 등에서 MMP-2 또는 MMP-9 가 증가한다고 보고되어 있다.[16-22] 뇌경색에 있어서는 뇌경색 후에 발생하는 출혈전환 및 뇌부종에 관한 실험적 연구에서 MMP-2 및 MMP-9 의 관련성이 알려져 있으며 일부 연구에서는 MMP 억제제를 투여함으로써 뇌경색의 크기를 감소시켰다.[23-29]

한편 뇌저온 요법은 외상성 뇌손상, 뇌출혈 환자에서 임상적으로 이용되고 있으며 일부에서 치료 효과가 있다.[30-32] 뇌경색의 경우에서는 동물 실험에서 뇌경색 및 뇌부종의 크기를 감소시키고 신경학적 장애를 호전시키는 효과가 알려졌고, 임상적으로도 일부에서 그 유용성이 보고되어 있다.[33-40] 이러한 뇌저온 요법의 치료효과에 관하여 제안된 기전들은 두개강내 압력(intracranial pressure)의 저하, 뇌대사의 억제, 글루타메이트(glutamate)의 유리억제, 세포고사(apoptosis)의 억제, 산소 유리기의 생성 억제 및 혈액-뇌 관문의 보호작용 등으로, 뇌저온 요법은 뇌경색 발생시에 뇌세포 손상을 유발하는 대부분의 기전에 대해 복합적인 보호효과가 있는 것으로 생각되고 있다.[34,41,42] 이중에서 혈액-뇌 관문의 보호작용은 앞서 언급한 뇌혈관 기저막의 파괴와 연관이 있으며 따라서 뇌저온 요법에 의한 MMP-2 및 MMP-9 의 억제와 혈액-뇌 관문의 보호작용과는 상관 관계가 있을 가능성이 있다.

이번 연구에서는 뇌경색에서의 뇌저온 요법의 효과에 MMP-2 및 MMP-9 가 관계되어 있다는 가설 하에서 중뇌동맥 폐색 및 재관류 모델을 이용하여 실험적으로 뇌경색을 유발한 후 뇌경색의 치료법으로서 뇌저온 요법을 적용하여 뇌저온이 뇌경색의 크기, 혈액-뇌 관문의 손상 및 MMP-2 및 MMP-9 의 활성화에 미치는 영향과 이들의 연관성을 알아보고자 하였다. 이와 동시에 뇌저온 요법을 적용하는 시기를 뇌경색 유발과 동시에 시작하는 경우와 재관류와 함께 시작하는 두 가지로 나누어서 뇌저온 요법을 적용하는 시기에 따른 치료 효과의 변화를 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에서는 250 - 340 그램의 웅성 자발성 고혈압 쥐(spontaneous hypertensive rat)를 사용하였다. 본 연구는 대한의학회가 제정한 동물실험지침에 근거하여 연세대학교 의과대학 실험동물 위원회로부터 윤리적 동물실험을 검증 받았다. 실험동물은 국소적 뇌허혈 및 재관류시 뇌저온 요법의 효과를 알아보기 위하여 대조군과 정상 체온군은 체온을 섭씨 36.5±0.5 도로 유지하였고 뇌저온 요법군은 두 군으로 나누어서 중뇌동맥을 폐색하는 기간 동안에 체온을 32.0±0.5 도로 낮추는 허혈중뇌저온(intra - ischemic hypothermia) 요법군과 재관류 후에 체온을 낮추는 허혈후뇌저온(postischemic hypothermia) 요법군으로 나누어 실험하였다. 실험동물은 온도(22.0±2.0 도), 습도(50±10%), 소음(40 - 50 phon 이하), 조명(12 시간 명/암)이 자동적으로 유지되고, 무균 음수 및 방사선 멸균 고형 사료가 충분히 공급되며, 정기적인 깔집 교환(주 2 회)과 미생물 모니터링을 실시하는 specific pathogen free (SPF) 동물을 위한 barrier system 에서 사육하였다. 실험동물은 수술 전날 밤부터 약 12 시간 정도 물만 공급하였으며 수술 후에는 물과 사료를 충분히 섭취할 수 있게 하였다.

2. 중뇌동맥 폐색 및 재관류 모델

뇌의 허혈 손상은 기존에 보고된 나일론을 이용한 중뇌동맥 폐색과 재관류법을 일부 변형하여 시행하였다.[43,44] 즉, 쥐를 아이소플루란(isoflurane)으로 흡입 마취를 시킨

상태에서 경부를 정중 절개하여 경동맥을 노출시키고 미주신경 등을 분리하였으며 총경동맥을 결찰한 다음, 내경동맥과 외경동맥의 분지들과 외경동맥을 전기소작 또는 결찰하였다. 다음으로 내경동맥을 일시적으로 혈관 clamp 로 결찰한 후 내경동맥 기시부에 작은 창을 내고, 이 창을 통해 미리 화염을 이용하여 끝을 둥글게 한 뒤 원위부 20 mm 를 poly - L - lysine 으로 처리한 4 - 0 나일론 사(Ethicon, Edinburg, UK)를 넣어서 내경동맥 쪽으로 들어간 것을 확인한 후 혈관 clamp 를 풀고 나일론 사를 총경동맥 분지부부터 23 mm 까지 밀어 넣어 중뇌동맥을 폐색하였다. 이러한 과정이 끝난 후 절개된 부분을 봉합하며, 나일론 사의 끝 부분은 피부 밖으로 나오도록 하였다. 수술이 끝난 후 실험동물을 마취에서 깨운 다음 신경학적 장애의 유무를 관찰하였다. 재관류는 아이소플루란 흡입 마취 상태에서 피부 밖에 남겨져 있던 나일론 사를 저항이 느껴질 때까지 잡아 뺀 후 나머지 끝 부분을 가위로 절단함으로써 시행하였다. 정상 체온군과 뇌저온 요법군 모두 2 시간 동안 중뇌동맥을 폐색한 후 18 시간 동안 재관류시킨 다음 희생시켰으며 대조군은 실험군과 마찬가지로 마취 후 경부의 정중부 절개술을 시행하고 총경동맥만 결찰한 후 중뇌동맥은 폐색하지 않고 20 시간 후에 희생시켰다.

3. 온도조절 및 뇌저온 요법

수술 기간 및 뇌저온 요법 기간 동안 지속적으로 체온을 측정하여서 일정한 온도를 유지하였다. 체온은 직장 체온(rectal temperature)과 뇌온(brain temperature)을 동시에 측정하였다. 직장 체온의 경우에는 체온계(temperature probe)를 직장 내로 삽입하여 측정하였으며 뇌온의 경우에는 허혈 대뇌반구의 반대측 측두근(temporalis muscle)에

체온계(Precision 4000A Thermometer, YSI, Japan)를 삽입하는 비침습적인 방법으로 측정하였다. 측두근 내의 온도는 뇌온을 반영하는 것으로 알려져 있다. 수술 기간 동안 체온은 직장 체온과 연계된 자동온도 조절장치(Homeothermic blanket control unit)를 이용하여 섭씨 36.5 도 내외로 일정하게 유지하였다. 뇌저온 요법시에는 실험동물의 전신에 알코올 스프레이로 알코올을 뿌리고 팬을 이용하는 방법으로 섭씨 32 도까지 감온하였으며 2 시간 동안의 뇌저온 요법이 끝난 후에는 마취를 중단하고 자동온도 조절장치와 온열 전등(heat lamp)을 이용한 상태에서 정상 체온으로 복온하였다.

4. 조직처리

재관류 후 18 시간이 지난 다음 우레탄(urethane)을 복강 내로 주사하여 마취한 상태에서 peristaltic pump 를 이용하여 헤파린이 섞인 차가운 생리 식염수를 우심방을 절개한 상태에서 좌심실을 통해 관류함으로써 실험동물을 희생시켰고 즉시 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 brain matrix 를 이용하여 관상면으로 전두부부터 2 mm 두께로 잘라 7 개로 관상 절편화 하였다. 각각의 절편 중 1, 3, 5, 7 번째 절편은 2% 2,3,5 - triphenyltetrazolium chloride (TTC)에 담가 섭씨 37 도에서 30 분간 배양하여 염색하였으며 후에 뇌경색의 크기를 측정할 때 이용하였다. 나머지 절편 중 4 번째(6 - 8 mm) 절편은 좌우 반구를 절단한 후 Tissue - Tek OCT compound (Miles, Inc., Elkhart, IN, USA)에 넣고 2 - methylbutane 과 드라이 아이스를 이용하여 급속 냉각한 후 섭씨 영하 80 도 냉동고에 보관하였다.

5. 단백질 정량 및 MMP 분리

허혈 및 비허혈 반구의 10 μm 두께의 cryostat 절삭 절편 45-50 개를 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride 가 포함된 400 μl 의 working buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0,05% BRIJ-35, 0.02% NaN_3, 1% Triton X-100)에 넣고 균질화 한 후 섭씨 4 도에서 20 분간 9000 rpm 으로 원심분리 하였다. 이중 상층액을 취하여 섭씨 영하 80 도에 보관하였다. 단백농도는 보관된 샘플의 일부(10 μl)를 가지고 bovine gamma globulin standard 를 이용하여 Bradford 방법(Bio-Rad Laboratories, Herculus, CA, U.S.A.)에 기초한 키트를 이용하여 정량하였다. Gelatin zymography 를 통한 MMP 활성도의 검출 정도를 높이기 위하여 기존에 보고된 gelatin-sepharose 4B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용한 MMP 분리법을 이용하였다.[45] Gelatin-sepharose 4B 를 working buffer 200 μl 로 3 회 세척한 후 단백질 정량을 마친 상층액 260 μl 를 50 μl 의 gelatin-sepharose 4B 와 함께 저온실에서 흔들어 주면서 1 시간 동안 배양하였다. 다음 단계로 7000 rpm 으로 5 분간 원심분리 후 상층액을 버리고 working buffer 200 μl 로 세척 후 침전물에 elusion buffer (10% DMSO 를 첨가한 working buffer)를 70 μl 씩 넣고 30 분간 흔들어 주면서 배양하였다. 원심분리 후 상층액을 모아서 섭씨 영하 80 도에 보관하여 gelatin zymography 에 사용하였다.

6. Gelatin zymography

Gelatin zymography는 이미 보고된 방법에 따라 시행하였다.[26] 즉, 70 μg이 포함된

샘플을 같은 양의 샘플 완충액(80 mM Tris-HCl [pH 6.8], 4% sodium dodecyl sulfate [SDS], 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue)과 섞은 후 전기영동 하였다. 이 때 표준화된 정량을 위해 각각의 겔마다 recombinant MMP-2와 MMP-9 (Gelatinase zymography standards, Chemicon International Inc, CA, U.S.A.)을 1 μg 넣어서 시행하였다. 표준화를 위한 샘플들은 일회 사용량을 미리 분주하여 섭씨 영하 80도에 냉동하여, 해동과 냉동이 반복되지 않고 모두 동일한 조건의 상태에서 사용되도록 하였다. 전기영동은 1% gelatin이 함유된 8% SDS-polyacrylamide 겔을 사용하여 실시하였다. 전기영동이 끝난 겔은 증류수에 잠깐 세척 후 150 ml의 2.5% Triton X-100 용액에 담가 shaker에서 15분씩 3차례 세척하였다. 세척이 끝난 겔은 250 ml의 50 mmol/L Tris-HCl 배양 완충액(pH 7.5, 10 mM $CaCl_2$, 0.02% NaN_3)에 넣고 섭씨 37도에서 42시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 겔을 아세트산, 메탄올 및 증류수가 1:3:6으로 들어 있는 0.1% amido black 용액에 넣고 1시간 동안 염색하였다. 염색이 끝난 후에는 amido black을 제외한 같은 용액을 수 차례 바꾸어 주면서 130분간 탈색하였다. 탈색 후 증류수에서 20분간 세척하였다. 이렇게 하면 MMP에 의해 젤라틴이 파괴된 부분은 염색되지 않아 푸른색 바탕에 흰색을 띤 띠가 나타나게 된다. 세척이 끝난 겔은 스캐너(Scanmaker 9600XL, Microtek, Taiwan)를 이용하여 600 dpi로 스캔하였고 Scion Image program의 gel plotting macro를 이용하여 하얀 띠 부분을 정량 하였다. 측정된 값은 integrated density로 표시하였다.

7. 뇌손상의 평가

뇌경색의 크기는 TTC 로 염색을 한 1, 3, 5, 7 관상 절편의 전체 면적과 경색부위 면적을 Scion Image program 을 이용하여 측정하여 합산하여서 전체 면적에 대한 경색부위의 면적을 비율로서 구하였다. 또한 gelatin zymography 를 시행하는 4 번째 관상 절편에서의 MMP 의 활성도와 뇌경색의 크기와의 상관 관계를 알아보기 위하여 4 번째 관상 절편의 뇌경색의 크기는 3 번째 관상 절편의 뒷면과 5 번째 관상 절편의 앞면에서의 뇌경색의 크기를 합한 값의 평균값으로 간접적으로 정하여 구하였다. 이와 같은 방법은 8 마리의 실험동물을 이용한 예비 실험에서 3 번째 관상 절편의 뒷면과 5 번째 관상 절편의 앞면의 뇌경색의 크기의 평균값과 4 번째 관상 절편에서의 뇌경색의 크기는 상관계수가 0.961 로서 높은 상관관계를 보임을 확인하였다.

8. 혈액-뇌 장벽 손상의 평가

혈액-뇌 장벽의 손상은 기존의 보고에서와 같이 정맥내로 투여한 에반스 블루가 뇌실질 내로 혈관외 유출되는 정도를 이용하여 평가하였다. 정상 체온군과 허혈중뇌저온요법군 각각 3 마리씩 같은 방법으로 중뇌동맥 폐색을 유도한 후에 재관류와 동시에 에반스 블루(10% in normal saline, 3 ml/kg)를 경정맥으로 주입하였다. 재관류 후 18 시간이 지난 다음 우레탄을 복강 내로 주사하여 마취한 상태에서 peristaltic pump 를 이용하여 헤파린이 섞인 차가운 생리 식염수 150 ml 를 우심방을 절개한 상태에서 좌심실을 통해 관류한 후 3.7% 포름알데하이드를 관류함으로써 실험동물을 희생시켰고 즉시 뇌를 적출하였다. 적출한

뇌는 3.7% 포름알데하이드에 고정하여 보관한 후 vibratome 을 이용하여 50 μm 두께로 관상 절편화 한 후에 만들어진 관상 절편을 슬라이드 글라스에 놓고 붉은색 필터를 이용한 형광현미경(Olympus BX21, x200, coolsnap cf camera system)으로 사진을 만든 후 이미지 분석 소프트웨어(Metamorph V5.01)를 이용하여 허혈 반구 및 비허혈 반구의 기저핵, 피질에서 에반스 블루의 optical density 를 구하였다.

9. 통계처리

각 실험군간의 뇌경색의 크기, MMP-2 및 MMP-9 의 활성도의 차이는 ANOVA 검정에서 post hoc test 를 이용하였으며, 에반스 블루의 혈관외 유출의 차이는 비모수검정 방법으로 Mann Whitney U 검정을 이용하였다. 전체 실험군에서의 뇌경색의 크기와 MMP-2 및 MMP-9 활성도의 상관관계는 Pearson 검정을 이용하였다. 실험 결과값은 평균±표준오차로 표시하였으며 각각의 검정에서 유의수준이 0.05 미만일 경우에 통계적으로 의의가 있는 것으로 정하였다.

III. 결 과

1. 실험동물군의 체온 변화

허혈 대뇌반구의 반대측 측두근에서 측정한 온도는 직장 체온에 비하여 약간 낮은 경향을 보였으나 두 가지 측정온도는 전체 실험기간 동안 밀접한 상관관계를 보였다. 또한 마취시작부터 중뇌동맥 폐색 후 뇌저온을 유도하기 전까지의 실험기간 동안 직장 체온 및 측두근 내의 온도는 각 실험군 간에 차이를 보이지 않고 일정하게 유지되었다. 뇌저온을 유도하기 시작한 후부터 목표 온도까지 도달하는 데에는 허혈중뇌저온 요법군의 경우에는 약 30 분 정도의 시간이 소요되었으며 허혈후뇌저온 요법군에서는 약 45 분 정도의 시간이 소요되었다 (Figure 1).

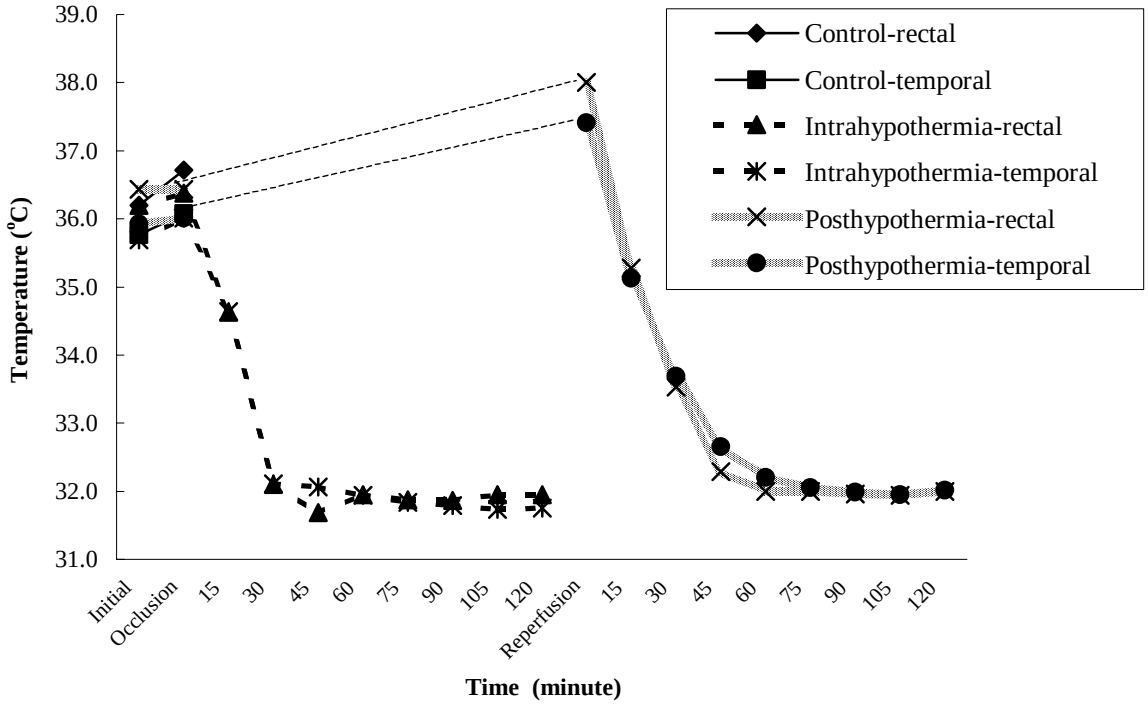
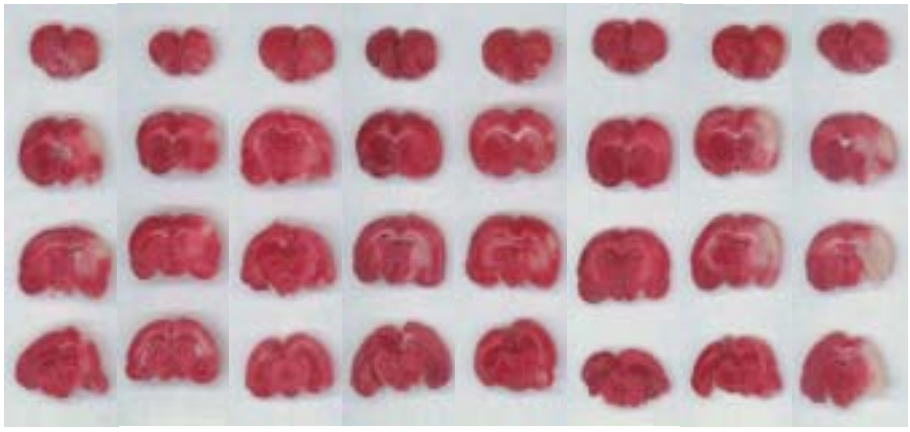


Figure 1. Temperature changes during the ischemia and reperfusion in different study groups.

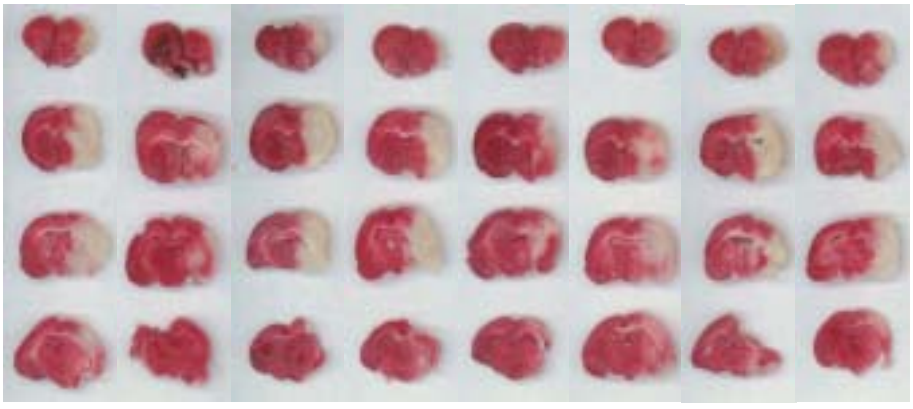
2. 뇌경색의 크기

대조군에서는 TTC 로 염색한 결과 뇌경색이 발생하지 않았으며 나머지 모든 실험군에서는 뇌경색이 발생하였다 (Figure 2). 1, 3, 5, 7 번째 관상 절편합에서 발생한 뇌경색의 크기에 비하여 4 번째 관상 절편에서의 뇌경색 크기의 대표값이 더 커지는 경향을 보였으나 두 가지 측정방법에 의한 뇌경색의 크기는 밀접한 상관관계를 보였다 (r=0.934). 1, 3, 5, 7 번째 관상 절편에서의 뇌경색의 크기는 허혈중뇌저온 요법군(10.2±1.5%)에서 가장 작았으며 다음으로 허혈후뇌저온 요법군(20.0±2.0%)과 정상 체온군(22.7±2.2%)의 순서였다. 허혈중뇌저온 요법군에서 뇌경색의 크기는 정상 체온군에 비하여 통계적으로 의미있게 감소하였다 (P <0.01) (Figure 3). 마찬가지로 4 번째 관상 절편에서의 뇌경색의 크기도 허혈중뇌저온 요법군(15.7±2.2%)에서 가장 작았으며 허혈후뇌저온 요법군(27.9±3.4%)과 정상 체온군(30.9±3.1%)의 순서였다. 정상 체온군과 허혈후뇌저온 요법군 간에는 허혈후뇌저온 요법군에서 뇌경색의 크기가 작았으나 통계적인 의의는 없었다.

Normothermia group



Intra-ischemic hypothermia group



Postischemic hypothermia group

Figure 2. TTC stains of brain coronal sections. The infarcted areas remained unstained (white color).

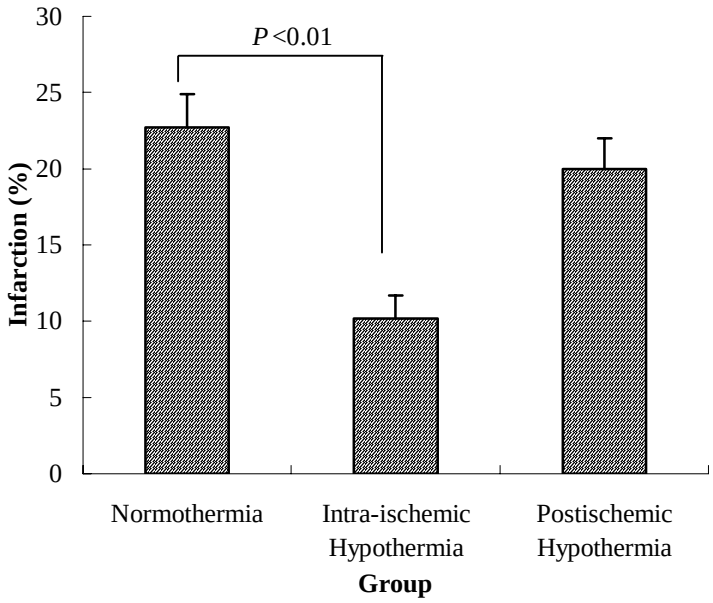


Figure 3. Infarction size of the different study groups. The percent of infarctions in ischemic hemispheres was significantly decreased in intra-ischemic hypothermia group compared to normothermia group.

3. 뇌허혈 조직에서의 MMP-2 및 MMP-9 활성도

대조군과 뇌허혈군의 허혈 대뇌반구 및 비허혈 대뇌반구의 조직을 가지고 시행한 gelatin zymography 결과 MMP-2 및 MMP-9 에 의해 gelatin 이 파괴되어 생긴 띠가 관찰되었다 (Figure 4). 분자량 68 kDa 부근의 위치에서 발견되는 띠는 비활성화 상태의 MMP-2 에 의한 것으로 대조군 및 뇌허혈군의 허혈 및 비허혈 대뇌반구 모두에서 나타났다. 반면에 92 kDa 의 위치에서 발견되는 비활성화 상태의 MMP-9 에 의한 띠는 대조군의 일부와 허혈중뇌저온 요법군의 일부 비허혈 뇌반구에서는 관찰되지 않았다. 허혈 대뇌반구와 비허혈 대뇌반구에서의 MMP 활성도를 비교하였을 때 MMP-2 와 MMP-9 모두 허혈 대뇌반구에서 증가되어 있었다. 뇌허혈군에서 뇌저온 요법에 따른 허혈 대뇌반구의 MMP

활성도를 비교하면 MMP-2 와 MMP-9 모두 정상 체온군에서 가장 높고 다음으로 허혈후뇌저온 요법군, 허혈중뇌저온 요법군의 순이었다. 허혈중뇌저온 요법군의 경우 MMP-2 와 MMP-9 활성도는 허혈후뇌저온 요법군과 정상 체온군에 비하여 통계적으로 의의 있게 감소하였다. 한편 허혈후뇌저온 요법군은 정상 체온군에 비하여 MMP-2 활성도의 경우에만 통계적으로 의의 있게 감소하였다 (Table 1).

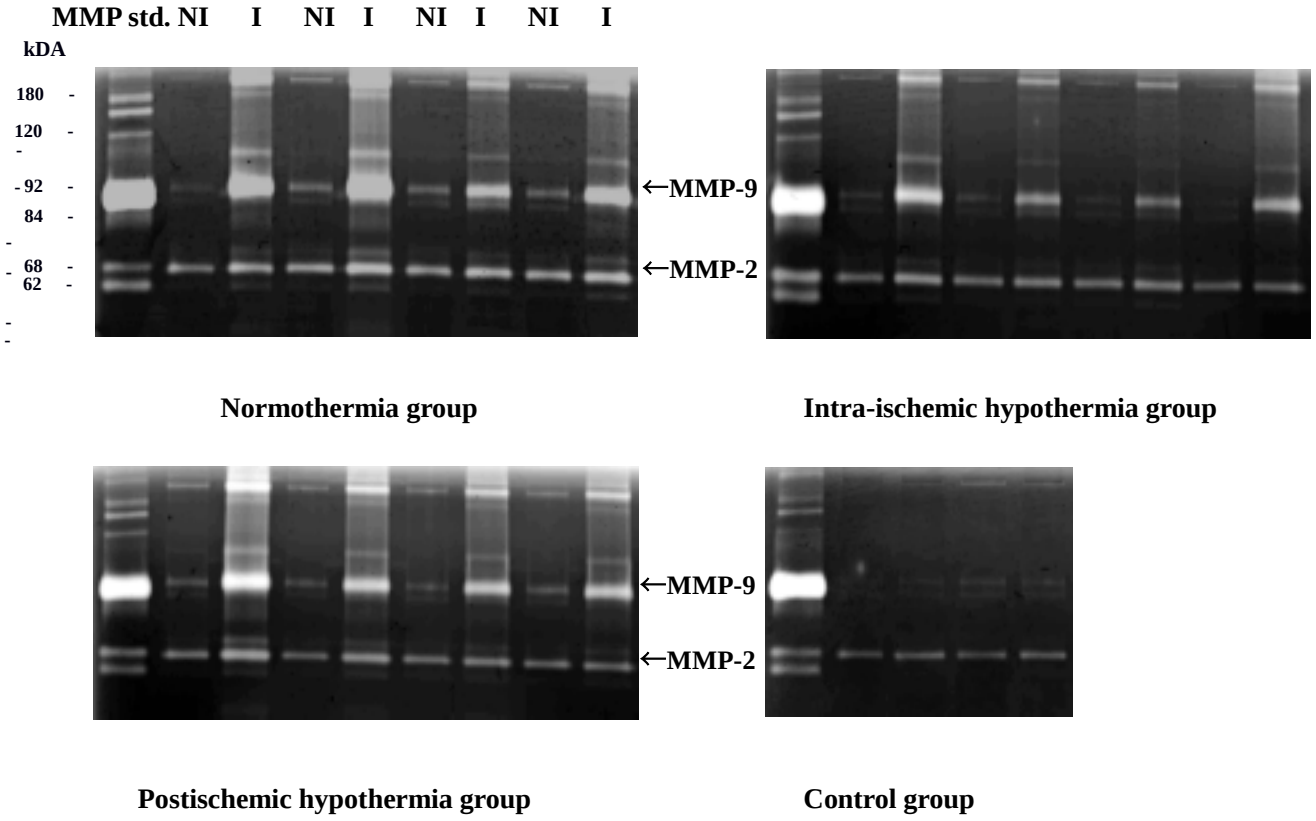


Figure 4. Gelatin zymograms of brain tissues. The MMP-2 and MMP-9 activities were increased in the ischemic hemisphere compared to the non-ischemic hemisphere. MMP std: recombinant MMP-2 and MMP-9 standard, NI: non-ischemic, I: ischemic

Table 1. MMP-2 and MMP-9 activities of the groups.

	MMP-2		MMP-9	
	I	NI	I	NI
Control	505.3±55.1	450.0±53.2	90.9±26.6	69.0±26.0
Normothermia	1447.9±108.8	1053.3±102.8	2090.1±103.1	511.4±77.0
Intra-ischemic Hypothermia	587.0±67.8*	391.0±20.2	990.7±211.0*	111.7±33.1
Postischemic Hypothermia	1019.7±89.4**	580.2±51.3	1642.5±154.2	351.8±80.9

The MMP-2 and MMP-9 activities are expressed as integrated density. In the control group, ischemic and non-ischemic hemispheres represent the left and the right hemispheres, respectively. * : P <0.01 compared to normothermia, ** : P <0.05 compared to normothermia

I : ischemic hemisphere, NI : non-ischemic hemisphere

4. 뇌경색의 크기와 MMP-2 및 MMP-9 활성도와의 관계

4 번째 관상 절편의 허혈 대뇌반구에서의 MMP-2 및 MMP-9 활성도의 값과 4 번째 관상 절편면에서의 뇌경색의 크기는 통계적으로 의미 있는 양의 상관관계를 보였다 (r=0.747 for MMP-2, r=0.853 for MMP-9) (Figure 5).

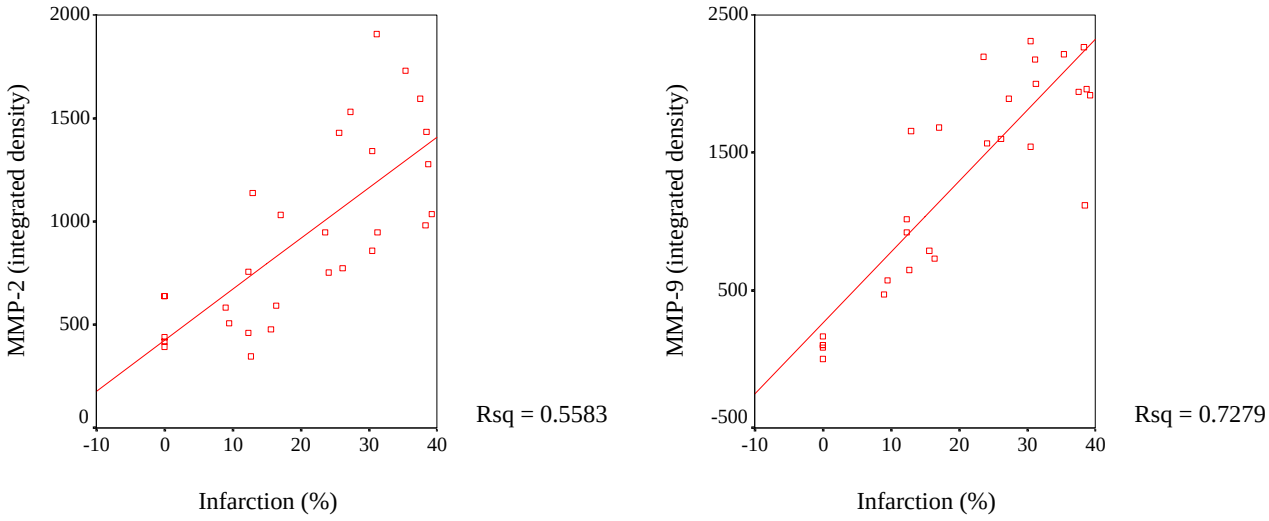
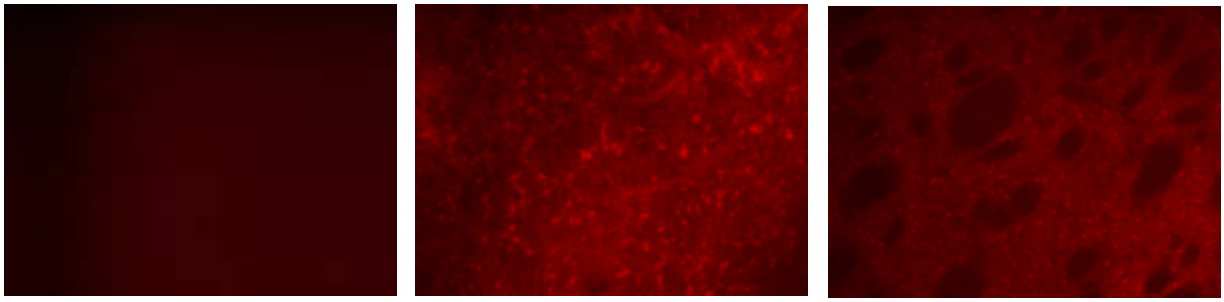


Figure 5. Correlation between the infarction size of the 4th coronal slice and MMP-2 or MMP-9. The MMP-2 and MMP-9 activities of the 4th coronal slice of the ischemic hemisphere showed positive correlations with the percent infarction of the 4th coronal slice.

5. 에반스 블루의 혈관외 유출

편광현미경 하에서 에반스 블루의 혈관외 유출 정도는 허혈중뇌저온 요법군의 경우 허혈 대뇌반구 피질에서는 20610.37±11186.03 O.D., 기저핵에서는 167000.77±146726.12 O.D.로 측정되었으며 정상 체온군의 경우에는 허혈 대뇌반구 피질에서는 565933.40±83842.57 O.D., 기저핵에서는 834832.80±24732.69 O.D.로 측정되었다. 정상 체온군 및 허혈중뇌저온 요법군의 비허혈 대뇌반구에서는 에반스 블루의 혈관외 유출은 거의 관찰되지 않았다 (165.63±7.33 O.D.). 에반스 블루의 혈관외 유출 정도는 허혈중뇌저온 요법군에서 정상 체온군에 비하여 대뇌 피질과 기저핵에서 모두 통계적으로 의의 있게 감소하였다 (P<0.01) (Figure 6, 7).



Non-ischemic side **Normothermia** **Intra-ischemic hypothermia**

Figure 6. Fluorescent microscopic findings showing Evans blue extravasation. No interstitial expression of Evans blue was detected in the non-ischemic brain. The marked extravasation of Evans blue (orange red in color) was seen in the ischemic striatum of the normothermia group, whereas it was slightly extravasated in the intra-ischemic hypothermia group. (Striatum x 200)

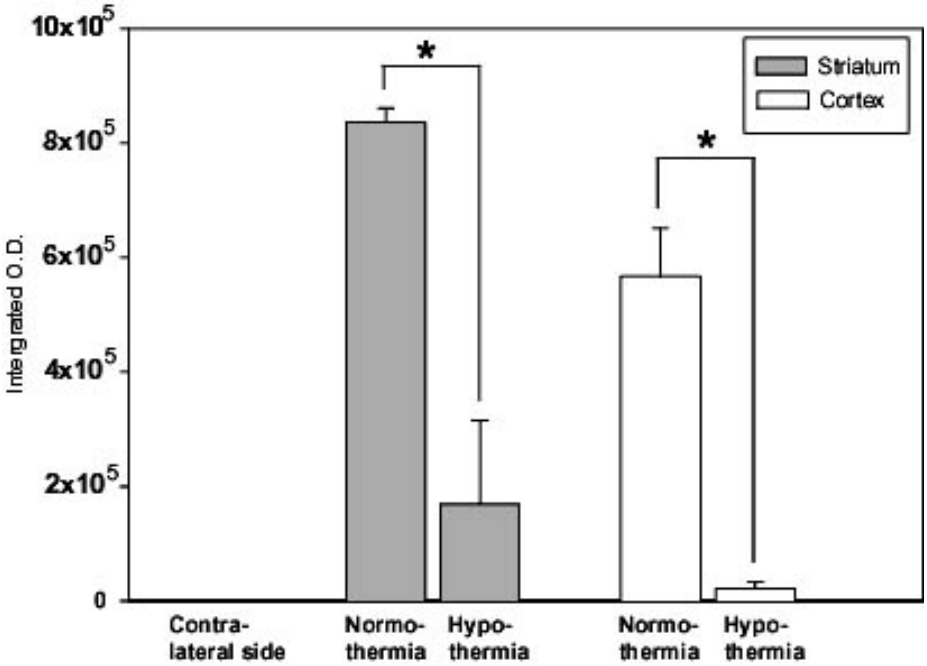


Figure 7. The effect of hypothermia on Evans blue extravasation. In the hypothermia group, Evans blue extravasation was significantly decreased in the both ischemic cortex and striatum. * : P <0.01

IV. 고 찰

본 연구에서 뇌저온 요법은 자발성 고혈압 쥐의 일시적 중뇌동맥 폐색 후의 뇌경색 크기를 감소시키는 효과가 있었다. 이는 기존의 보고와 일치한다.[34,36,37,40] 임상적으로는 중뇌동맥 폐색에 의한 뇌경색과 같은 심한 뇌경색 환자에서 급성기에 뇌부종과 출혈전환을 억제하고 사망률을 감소시키려는 목적으로 일부에서 뇌저온 요법이 시도되고 있다.[35,38,42] 이러한 뇌저온 요법은 치료효과 외에 면역기능 억제에 의한 감염, 부정맥, 호흡억제, 전해질 불균형, 출혈성 경향, 혈당상승, 간 및 신장장애 등의 합병증을 일으킬 수 있는 위험성이 있기 때문에 극히 일부의 심한 뇌경색 환자에서만 치료로서 시도되고 있다.[42] 이러한 합병증의 발생은 체온의 저하가 심할수록 더 잘 발생하는데 최근 들어서 경도의 뇌저온 요법의 경우에도 치료효과가 있다는 것이 알려지면서 임상적으로는 경도의 뇌저온 요법이 주로 사용되고 있다. 동물 실험에서 뇌저온 요법의 치료효과는 뇌저온을 유도한 시기에 따라 약간의 차이를 보이는데 뇌허혈과 동시에 치료를 시작한 경우에 뇌 보호 효과가 보다 크다.[41] 그러나 허혈 후 일정한 시간이 경과한 후에 뇌저온 요법을 시행한 경우에도 보호 효과가 있었는데, 이러한 사실은 뇌허혈 시에 후기 세포사에 관계하는 기전이 있으며 허혈후 뇌저온 요법이 이러한 기전을 억제함으로써 뇌 보호 효과를 나타냈을 가능성과 아직 완전히 경색으로 이행되지 않은 허혈 주변부(ischemic penumbra)에 대한 영향일 수 있다.[2,46] 이번 연구에서 허혈후뇌저온 요법군에서 정상 체온군에 비하여 뇌경색의 크기가 11.9% 감소하는 경향을 보였지만 통계적인 의의는 보이지 않아서 허혈후 뇌저온 요법의 효과를 보고한 일부의 보고들과는 차이를 보였다.[36,37,40] 이러한 차이점은 뇌저온을 유지하고 복온시키는 실험과정에서 있어서의 방법적 차이에 기인할 가능성이 있다. 즉 본 연구에서는 기존의

허혈후 뇌저온 요법 실험에 비하여 뇌저온을 유지한 시간이 두 시간으로 상대적으로 짧았으며 정상체온으로 체온을 올리는 단계에서도 체온을 조절하며 서서히 올리지 않고 비교적 짧은 시간인 1 시간 내외에 정상 체온으로 복온하였다는 차이점이 있다. 이러한 실험방법에 따른 결과의 차이는 뇌저온 요법의 임상적인 적용에서도 고려하여야 할 점이라고 생각된다.

뇌저온 요법이 허혈 손상을 감소시키는 기전은 정확히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 뇌저온 요법시 뇌경색의 크기가 감소함과 동시에 MMP-2 와 MMP-9 가 감소함을 밝힘으로써 뇌저온 요법의 신경보호 효과에 MMP 가 관계되어 있을 가능성이 큼을 처음으로 제시하였다. 특히 동일 실험동물에서 뇌경색 크기와 MMP 의 변화를 동시에 측정하여 이들 사이의 직접적인 연관관계를 알아보는 것이 가능하였다. 본 연구 결과만으로, MMP 의 감소가 뇌저온 요법에 의해 뇌경색이 감소함에 따라 나타난 이차적인 현상인지, 또는 뇌저온 요법에 의한 MMP 의 감소가 뇌경색을 감소시키는데 직접적인 역할을 한 것인지는 확실하지 않다. 그러나 최근 MMP 는 뇌허혈 손상에 직접적으로 관여한다는 것이 밝혀지고 있어 MMP 가 뇌저온 요법의 신경보호 기전에 관여되어 있을 가능성이 있다.

또한 지금까지 제시된 뇌저온 요법의 치료 기전 중 하나인 혈액-뇌 장벽의 손상 억제에 MMP 가 연관되어 있을 가능성이 크다. 지금까지 일부 동물실험에서 뇌저온에 의한 혈액-뇌 장벽의 보호효과가 보고되고 있지만 그 정확한 기전에 대하여는 아직까지 밝혀진 것은 없는 실정이다.[47-49] 혈액-뇌 장벽은 내피세포의 tight junction 과 type IV collagen, fibronectin, laminin, 여러 종류의 proteoglycans 과 heparan sulfates 등의 세포외 기질로 구성된 basal lamina 로 이루어진다. MMP 는 이러한 세포외 기질을 분해함으로써 혈액-뇌 장벽을 파괴하는데 관여하는 것으로 생각되고 있다.[25,27] 본 연구에서 뇌저온 요법시 혈액-뇌

장벽의 안정성 여부를 판단할 수 있는 에반스 블루의 유출이 현저히 감소하여 혈액-뇌 장벽의 안정이 뇌저온 요법에 의해 유도될 수 있음을 확인하였다. 혈액-뇌 장벽의 파괴에 MMP 가 가장 핵심적인 역할을 한다는 점을 고려하면,[25,28,50] 본 연구에서 나타난 MMP 의 감소가 뇌저온 요법시 보이는 혈액-뇌 장벽의 안정과 직접 연관이 있었음을 추정할 수 있다.

현재까지 MMP-2 는 허혈 반구의 뇌조직 뿐 아니라, 비허혈 반구 및 정상 대조군의 뇌조직에서도 검출되는 것으로 보고된 반면에, MMP-9 는 대부분의 보고에서 비허혈 반구 및 정상 대조군의 뇌조직에서는 검출되지 않는다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 정상 대조군의 일부에서도 MMP-9 가 소량이지만 존재함을 확인 하였다. 이는 MMP 검출 방법상의 차이 때문일 수 있다. 본 연구에서는 MMP 의 검출 민감도를 높이기 위해 gelatin sepharose 를 사용하여 순수한 MMP 를 추출한 후 gelatin zymography 를 시행하였다. 이 경우 정상 뇌에서도 MMP-2 에 비하여는 소량이지만 MMP-9 가 존재한다고 보고되기도 하였다.[27,45,51]

뇌저온 요법에 의해 MMP 가 감소하는 기전은 알려져 있지 않지만, MMP 발현과 뇌저온 요법시의 전사과정을 보면 서로 관련되어 있을 가능성이 크다. 즉, MMP-9 는 유전인자의 프로모터 부위에 NF-kappa B 와 AP-1 의 작용부위를 가지고 있으며 MMP-2 의 경우에는 AP-2 의 작용부위를 가지고 있다. 따라서 뇌허혈 시에 NF-kappa B 와 AP-1 과 같은 전사인자가 활성화되고 그 결과로서 MMP-2 및 MMP-9 의 합성이 증가되는 과정을 거치는 것으로 생각된다. 이러한 전사인자를 활성화하는 기전으로는 *c-fos*, *c-jun* 과 같은 immediate early gene, lipopolysaccharide, 산소 유리기, tumor necrosis factor-α, inerleukin-1β 등이 알려져 있다.[52-55] 뇌저온 요법 시에는 MMP 의 합성을 증가시키는 산소 유리기, NF-kappa B, AP-1 등이 감소된다고 보고되어 있다. 이러한 사실은 뇌저온 요법에

의해 MMP-2와 MMP-9의 합성이 감소될 수 있음을 시사한다.[56-59]

결론적으로 본 연구에서는 뇌저온 요법시 뇌경색이 감소하며, 이에는 혈액-뇌 장벽의 보호와 MMP 의 감소가 연관되어 있음을 밝혔다. 뇌저온 요법은 그 기전이 잘 알려져 있지 않음에도 불구하고, 일부 환자군에서 임상적으로 신경보호 효과가 입증된 유일한 치료 방법이다. 본 연구 결과는 이러한 기전에 MMP 가 일부 역할을 할 가능성이 큼을 제시한다. 앞으로의 뇌저온 요법에 관한 연구에서는 이번 실험에서는 효과를 밝히지 못하였지만 뇌저온 요법의 임상적 적용에 있어서 중요한 의미를 지니는 허혈후 뇌저온 요법에 대한 추가적인 연구 및 뇌저온 요법에 따른 온도 저하에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 억제에 관여하는 세부적인 기전을 밝히는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 지금까지 실험적 및 임상적으로 치료효과가 있는 것으로 알려진 뇌저온 요법의 치료 기전을 알아보고자 자발성 고혈압 쥐의 중뇌동맥 폐색 및 재관류 모델에서 뇌저온 요법을 적용하여 뇌경색 억제 효과와 MMP-2 및 MMP-9 활성도에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 허혈중 뇌저온 요법은 정상 체온을 유지한 경우에 비하여 통계적으로 유의하게 뇌경색의 크기를 감소시키는 효과를 보였다. 허혈후 뇌저온 요법은 정상 체온에 비하여 뇌경색의 크기를 일부 감소시켰으나 통계적인 의의는 없었다.
2. MMP-2 및 MMP-9 의 활성도는 모든 실험군에서 비허혈 대뇌반구에 비하여 허혈 대뇌반구에서 의의 있게 증가하였다.
3. 허혈중 뇌저온 요법은 정상 체온 및 허혈후 뇌저온 요법에 비하여 허혈 대뇌반구에서의 MMP-2 및 MMP-9 활성도를 통계적으로 유의하게 감소시켰다.
4. 허혈 대뇌반구에서의 MMP-2 및 MMP-9 활성도와 뇌경색의 크기와는 밀접한 양의 상관관계를 보였다.
5. 허혈중 뇌저온 요법은 정상 체온을 유지한 경우에 비하여 혈액-뇌 장벽을 파괴를 통계적으로 유의하게 감소시켰다.

이상의 실험 결과를 종합하여볼 때 허혈중 뇌저온 요법은 뇌허혈에 의한 뇌손상을 억제하는 효과를 나타내며 MMP-2 및 MMP-9 의 억제가 그 기전중의 하나로써 작용한다고 생각된다.

허혈후 뇌저온 요법의 경우에 통계적으로 의의 있는 뇌경색 억제효과를 나타내지는 못하였으나 향후 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Kato H, Kogure K. Biochemical and molecular characteristics of the brain with developing cerebral infarction. Cell Mol Neurobiol 1999;19:93 - 108.

2. Mostardini C, Vicenzini E, Altieri M, Di Stani F, Lenzi D, Di Piero V. Neuroprotection and stroke. Cerebrovasc Dis 2000;10(suppl 4):21 - 3.

3. Venti M. Parnetti L, Silvestrelli G, Gallai V. Role of neuroprotective drugs in acute ischemic stroke. Cerebrovasc Dis 2000;10(suppl 4):24 - 6.

4. Lutsep HL, Clark WM. Current status of neuroprotective agents in the treatment of acute ischemic stroke. Curr Neurol Neurosci Rep 2001;1:13 - 8.

5. Martinez - Vila E, Sieira PI. Current status and perspectives of neuroprotection in ischemic stroke treatment. Cerebrovasc Dis 2001;11(suppl 1):60 - 70.

6. Gladstone DJ, Black SE, Hakim AM. Toward wisdom from failure: lessons from neuroprotective stroke trials and new therapeutic directions. Stroke 2002;33:2123 - 36.

7. Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. Stroke 1995;26:2120 - 6.

8. Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. J Cereb Blood Flow Metab 1996;16:1373 - 8.

9. Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. Trends Genet 1990;6:121 - 5.

10. Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, et al. Regulation of matrix metalloproteinase activity. Ann N Y Acad Sci 1994;732:31 - 41.

11. Baramova E, Foidart JM. Matrix metalloproteinase family. Cell Biol Int 1995;19:239 - 42.

12. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biol Chem 1997;378:151 - 60.

13. Birkedal - Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. Curr Opin Cell Biol 1995;7:728 - 35.

14. Ahrens D, Koch AE, Pope RM, Stein - Picarella M, Niedbala MJ. Expression of matrix metalloproteinase 9 (96 - kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1996;39:1576 - 87.

15. Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R et al. HMG - CoA reductase inhibitors reduce MMP - 9 secretion by macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998;18:1671 - 8.

16. Nakagawa T, Kubota T, Kabuto M, Sato K, Kawano H, Hayakawa T, et al. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases - 1 by human brain tumors. J Neurosurg 1994;81:69 - 77.

17. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. Neuropathol Appl Neurobiol 1997;23:406 - 15.

18. Chandler S, Miller KM, Clements JM, Lury J, Corkill D, Anthony DC, et al. Matrix

metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. J Neuroimmunol 1997;72:155 - 61.

19. Friedberg MH, Glantz MJ, Klempner MS, Cole BF, Perides G. Specific matrix metalloproteinase profiles in the cerebrospinal fluid correlated with the presence of malignant astrocytomas, brain metastases, and carcinomatous meningitis. Cancer 1998;82:923 - 30.

20. Kolb SA, Lahrtz F, Paul R, Leppert D, Nadal D, Pfister HW, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in viral meningitis: upregulation of MMP - 9 and TIMP - 1 in cerebrospinal fluid. J Neuroimmunol 1998;84:143 - 50.

21. Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S, et al. Matrix metalloproteinase - 9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. Brain 1998;121:2327 - 34.

22. Matsuura E, Umehara F, Hashiguchi T, Fujimoto N, Okada Y, Osame M. Marked increase of matrix metalloproteinase 9 in cerebrospinal fluid of patients with fungal or tuberculous meningoencephalitis. J Neurol Sci 2000;173:45 - 52.

23. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. J Cereb Blood Flow Metab 1996;16:360 - 6.

24. Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP - 2) and gelatinase B (MMP - 9) activities in human brain after focal ischemia. Neurosci Lett 1997;238:53 - 6.

25. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase - 9 reduces infarct size. Stroke 1998;29:1020 - 30.

26. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 1999;19:624 - 33.

27. Gasche Y, Fujimura M, Morita - Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, et al. Early appearance of activated matrix metalloproteinase - 9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood - brain barrier dysfunction. J Cereb Blood Flow Metab 1999;19:1020 - 8.

28. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator) - induced hemorrhage after thromboembolic stroke. Stroke 2000;31:3034 - 40.

29. Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis - associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. Stroke 2002;33:831 - 6.

30. Marion DW, Penrod LE, Kelsey SF, Obrist WD, Kochanek PM, Palmer AM, et al. Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. N Engl J Med 1997;336:540 - 6.

31. Metz C, Holzschuh M, Bein T, Woertgen C, Frey A, Frey I, et al. Moderate hypothermia in patients with severe head injury: cerebral and extracerebral effects. J

Neurosurg 1996;85:533 - 41.

32. Clifton GL, Miller ER, Choi SC, Levin HS, McCauley S, Smith KR Jr, et al. Lack of effect of induction of hypothermia after acute brain injury. N Engl J Med 2001;344:556 - 63.

33. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. J Cereb Blood Flow Metab 1987;7:729 - 38.

34. Maier CM, Ahern K, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. Stroke 1998;29:2171 - 80.

35. Schwab S, Schwarz S, Spranger M, Keller E, Bertram M, Hacke W. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. Stroke 1998;29:2461 - 6.

36. Huh PW, Belayev L, Zhao W, Koch S, Busto R, Ginsberg MD. Comparative neuroprotective efficacy of prolonged moderate intraischemic and postischemic hypothermia in focal cerebral ischemia. J Neurosurg 2000;92:91 - 9.

37. Maier CM, Sun GH, Kunis D, Yenari MA, Steinberg GK. Delayed induction and long - term effects of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: neurological outcome and infarct size. J Neurosurg 2001;94:90 - 6.

38. Schwab S, Georgiadis D, Berrouschot J, Schellinger PD, Graffagnino C, Mayer SA.

Feasibility and safety of moderate hypothermia after massive hemispheric infarction. Stroke 2001;32:2033 - 5.

39. Yanamoto H, Nagata I, Niitsu Y, Zhang Z, Xue JH, Sakai N, et al. Prolonged mild hypothermia therapy protects the brain against permanent focal ischemia. Stroke 2001;32:232 - 9.

40. Kollmar R, Schabitz WR, Heiland S, Georgiadis D, Schellinger PD, Bardutzky J, et al. Neuroprotective effect of delayed moderate hypothermia after focal cerebral ischemia: an MRI study. Stroke 2002;33:1899 - 904.

41. Kataoka K, Yanase H. Mild hypothermia - a revived countermeasure against ischemic neuronal damages. Neurosci Res 1998;32:103 - 17.

42. Hayashi N. Brain hypothermia: pathology, pharmacology, and treatment of severe brain injury. 2nd ed. Tokyo: Springer - Verlag; 2000.

43. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 1989;20:84 - 91.

44. Wang LC, Futrell N, Wang DZ, Chen FJ, Zhai QH, Schultz LR. A reproducible model of middle cerebral infarcts, compatible with long - term survival, in aged rats. Stroke 1995;26:2087 - 90.

45. Zhang JW, Gottschall PE. Zymographic measurement of gelatinase activity in brain tissue after detergent extraction and affinity - support purification. J Neurosci Methods 1997;76:15 - 20.

46. Ginsberg MD, Busto R. Combating hyperthermia in acute stroke: a significant clinical

concern. Stroke 1998;29:529 - 34.

47. Karibe H, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR. Mild intraischemic hypothermia reduces postischemic hyperperfusion, delayed postischemic hypoperfusion, blood - brain barrier disruption, brain edema, and neuronal damage volume after temporary focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab 1994;14:620 - 7.

48. Smith SL, Hall ED. Mild pre - and posttraumatic hypothermia attenuates blood - brain barrier damage following controlled cortical impact injury in the rat. J Neurotrauma 1996;13:1 - 9.

49. Huang ZG, Xue D, Preston E, Karbalai H, Buchan AM. Biphasic opening of the blood - brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. Can J Neurol Sci 1999;26:298 - 304.

50. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood - brain barrier opening after reperfusion in rat brain. Stroke 1998;29:2189 - 95.

51. Planas AM, Sole S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase - 2 and - 9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. Neurobiol Dis 2001;8:834 - 46.

52. Mun - Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. J Cereb Blood Flow Metab 1998;18:1163 - 72.

53. Gabriel C, Justicia C, Camins A, Planas AM. Activation of nuclear factor - κB in the rat brain after transient focal ischemia. Brain Res Mol Brain Res 1999;65:61 - 9.

54. Schneider A, Martin - Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T, Schwaninger M. NF - κB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. Nat Med 1999;5:554 - 9.

55. Stephenson D, Yin T, Smalstig EB, Hsu MA, Panetta J, Little S, et al. Transcription factor nuclear factor - kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 2000;20:592 - 603.

56. Zhao W, Richardson JS, Mombourquette MJ, Weil JA, Ijaz S, Shuaib A. Neuroprotective effects of hypothermia and U - 78517F in cerebral ischemia are due to reducing oxygen - based free radicals: an electron paramagnetic resonance study with gerbils. J Neurosci Res 1996;45:282 - 8.

57. Sutcliffe IT, Smith HA, Stanimirovic D, Hutchison JS. Effects of moderate hypothermia on IL - 1β - induced leukocyte rolling and adhesion in pial microcirculation of mice and on proinflammatory gene expression in human cerebral endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab 2001;21:1310 - 9.

58. Hassoun HT, Kozar RA, Kone BC, Safi HJ, Moore FA. Intraischemic hypothermia differentially modulates oxidative stress proteins during mesenteric ischemia/reperfusion. Surgery 2002;132:369 - 76.

59. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MJ, Lentsch AB. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2002;282:G608 - 16.

= **Abstract** =

Effect of brain hypothermia on ischemic injury and matrix metalloproteinase in focal cerebral ischemia

Kyung Yul Lee

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Associate Professor Ji Hoe Heo)

Stroke is the leading cause of death and leaves much physical and mental disability. The principal goal of treatment is a rapid recanalization of the occluded artery and protection of brain tissues from the ischemic injury. The brain hypothermia has been effective in reducing infarction size and has improved neurologic deficits in experimental cerebral ischemia. The protection of blood - brain barrier (BBB) disruption is one of the proposed mechanisms of brain hypothermic effect. Matrix metalloproteinase (MMP) - 2 and MMP - 9, which are increased in ischemic brains, are known to be related to the destruction of the BBB by digesting extracellular matrix proteins. In this study, we investigated the effect of brain hypothermia on focal cerebral

ischemia in relation to the infarction size, the activity of MMP-2 and MMP-9, and BBB disruption.

Using an intraluminal nylon thread, spontaneous hypertensive rats were subjected to 2 hours of middle cerebral artery occlusion (MCAO) and 18 hours of reperfusion. The normothermia group was maintained at 36.5 °C during the procedure. Moderate hypothermia was induced by maintaining the temperature at 32 °C during MCAO in the intra-ischemic hypothermia group, and for 2 hours immediately after reperfusion in the postischemic hypothermia group. Two mm-thick coronal slices of brains were stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride solution to define the area of ischemic damage. By gelatin zymography, the activity of MMP-2 and MMP-9 was measured in frozen sections of ischemic and non-ischemic hemispheres. Evans blue extravasation methods were used to determine the BBB disruption.

The percent areas of infarctions were significantly reduced in the intra-ischemic hypothermia group by 55.1% compared to those in the normothermia group. Although the reduction of the percent areas was also observed in the postischemic hypothermia group (11.9% smaller than the normothermia group), it did not reach the

statistical significance. The integrated densities of MMP-2 and MMP-9 activities in ischemic hemispheres were significantly lower in the intra-ischemic hypothermia group than the normothermia or the postischemic hypothermia group. The size of infarctions was correlated with MMP-2 and MMP-9 activities. The disruption of BBB was significantly reduced in the intra-ischemic hypothermia group compared to the normothermia group.

The intra-ischemic hypothermia effectively attenuated the ischemic injury and BBB disruption in focal cerebral ischemia. Hypothermia-mediated inhibition of MMP-2 and MMP-9 activities might contribute to this protective effect.

Key Words : Cerebral infarction, Brain hypothermia, Matrix metalloproteinase, Blood-brain barrier