KISEP Experimental Research J Korean Neurosurg Soc 26 : 335-346, 1997

고양이에서 국소 뇌혈류의 지속적 및 반복 차단시 Nimodipine과 21-aminosteroid(U74389G)가 뇌혈류와 뇌경색에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 신경외과학교실
박현선 · 주진양 · 김선호 · 이규창

= Abstract =

The Effect of Nimodipine and 21-aminosteroid(U74389G) on Cerebral Infarction and Cerebral Blood Flow during the Continuous and Repeated Interruptions of the Focal Cerebral Blood Flow in Cats

Hyeon Seon Park, M.D., Jin Yang Joo, M.D.,
Sun Ho Kim, M.D., Kyu Chang Lee, M.D.

Department of Neurosurgery, College of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Temporary interruption of cerebral blood flow is an effective maneuver to prevent and/or to control excessive bleeding during cerebrovascular procedures. Despite the benefits of temporary arterial occlusion, there is still a risk of ischemic neuronal damage associated with this procedure. It remains controversial whether it is safer to use brief periods of interrupted temporary occlusion separated by reperfusion periods or single continuous temporary occlusion. Two injury mechanisms, disturbed calcium homeostasis and lipid peroxidation, participate in the neuronal damage caused by temporary occlusion but their contributions to the two different types of temporary occlusion are presumed to be different in some degrees. The authors investigated the effect of nimodipine(calcium channel blocker) and U74389G(21 - aminosteroid, lipid peroxidation inhibitor) on the focal cerebral blood flow and the size of cerebral infarction in two different types of temporary occlusion(a single, one hour continuous occlusion or three 20 - minute repeated occlusions during a 40 - minute interval) using the cat focal ischemic model.

Results are as follows :

1) Intermittent, repeated occlusion caused lesser cerebral infarction than single continuous occlusion.

2) Postischemic hypoperfusion was more severe in intermittent repeated occlusion group but it was not statistically significant.

3) Nimodipine and U74389G reduced the size of cerebral infarction caused by two types of temporary occlusions significantly but there was no difference between two treatments.

4) U74389G ameliorated the postischemic hypoperfusion caused by both types of temporary occlusion but nimodipine did not.

5) Nimodipine protected caudato - putamen from the ischemic injury more effectively than U74389G.

On the basis of the above findings, both types of injury mechanism(disturbed calcium homeostasis and lipid peroxidation) seemed to contribute to the two types of temporary occlusion(single continuous and intermittent repeated), in the similar extent. It is presumed that nimodipine has a preventive effect during the ischemic period and U74389G has a protective effect during reperfusion period.

KEY WORDS : Continuous and internittent occlusion · Focal cerebral blood flow · Postischemic hypoperfusion · Nimodipine · U74389G.

서 론

일시적인 뇌혈류 차단은 뇌 동맥류나 뇌혈관 기형에 대한 수술이나 뇌동맥 문합술 등과 같은 어려운 뇌혈관 수술시에 불가피하게 시행하게 되며 차단 시간이 길면 뇌손상을 유발하게 된다. 일시적 뇌혈류 차단시 유발되는 뇌손상은 혈류 차단 중 발생되는 뇌손상(ischemic injury)과 혈류 복원 뒤 재관류시 발생 되는 뇌손상(reperfusion injury)[22] 두 가지에 의하여 유발 된다. 지속적인 뇌혈류 차단시 허혈로 유발되는 뇌조직 손상은 주로 칼슘 항상성(calcium homeostasis) 장애로 인한 세포 내 Ca^{++}의 증가와 혐기성 해당작용(anaerobic glucolysis)에 의해 유발되는 acidosis에 의하여 발생된다[36]. 재관류에 의한 뇌조직 손상 기전은 혈류역동학적(hemodynamic)인 면과 대사적인(metabolic related) 관점에서 생각할 수 있다[14]. 혈류역동학적 기전으로 일시적 과혈류(hyperemia)후에 초래되는 허혈 후 저관류 현상(post-ischemic hypoperfusion)이 있고[40], 대사와 관련되는(metabolic related)것으로는 혈류가 차단되었던 구역의 재관류(reperfusion)로 생성된 자유기(free radical)에 의해 유발되는 지질과산화(lipid peroxidation)현상을 들 수 있다[10)19)41]. 즉, 혈류 차단으로 인한 허혈(ischemia)시 voltage sensitive calcium channel(VSCC)이나 흥분성 아미노산(excitatory amino acids)에 의하여 개방되는 agonist operating calcium channel(AOCC)을 통하여 세포 내로 Ca^{++}이 유입되면, phospholipase, xanthine oxidase, nitric oxide(NO) synthetase 등의 효소가 세포내 Ca^{++}의 증가로 활성화 되며 유리 지방산 대사물(free fatty acid metabolite, 특히 arachidonic acid)과 퓨린 대사물(purine metabolite, 특히 hypoxathine) 및, 산화질소(nitric oxide)의 생성이 증가되고[4)34)35], 혈류의 복원으로 재관류가 일어나면서 자유기의 생성이 증가되어, 지질의 과산화를 유발함으로써 세포막의 지질을 공격하여 세포막을 파괴하고 세포의 괴사를 일으키게 된다[10)41]. 뇌조직 손상에 영향을 미치는 정도는 차단 시간에 비례하나 전체적으로는 같은 시간 일지라도 차단 방법에 따라 차이가 있을 수 있다. 일부 신경외과 의사들은 이러한 일시적 혈류 차단시 발생되는 뇌손상을 최소화 하기 위해 혈류 차단중 중간에 재관류를 시도하고 있으나[30)38], 이에 대한 반론 또한 많다[15)33]. 동물 실험에서도 어떤 형태의 혈류 차단이 조직 손상을 줄이는데 유리한 지에 대한 논란이 많고, 그 기전에 대해서도 여러 보고가 있다[9)16)32)37)40].

국소 뇌혈류의 일시적 차단시 유발되는 뇌손상을 막기 위하여 Ca^{++} 경로 차단제(Ca^{++} entry blocker)와 지질과산화 억제제(lipid peroxidation inhibitor)의 사용을 고려할 수 있는데, 그 대표적인 것으로는 dihydropyridine계통의 VSCC blocker인 nimodipine과 철 의존성 지질과산화 억제제(iron dependent lipid peroxidation inhibitor)로 알려진 21-aminosteroid가 있다. 본 연구에서는 nimodipine과 21-aminosteroid(U74389G)가 지속적 뇌혈류 차단과 간헐 반복 차단 시 발생되는 뇌경색 및 혈류 복원 뒤의 국소 뇌혈류 변화에 미치는 영향을 알아보아 세포 내 칼슘의 유입(intracellular calcium influx)과 지질과산화(lipid peroxidation)가 각 형태의 국소 뇌혈류 차단시 뇌손상에 관여하는 정도를 알아보려고 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 실험군

체중 2.5 3.5kg 되는 성숙한 한국산 고양이를 실험 대상으로 하였다. 고양이 36마리를 Table 1과 같이 7군으로 나누었다. A-1군은 대조군으로 중대뇌동맥을 1시간 동안 지속적으로 결찰하였고, A-2군은 역시 대조 군으로 중대뇌동맥을 20분씩 40분 간격으로 3회 결찰 하였으며, A-3군은 중대뇌동맥을 20분간 1차례 결찰하였다. B-1, B-2군은 A-1, A-2군과 같은 방법으로 결찰하고 nimodipine(dihydropyridine)을 투여하였고, C-1, C-2군은 A-1, A-2군과 같은 방법으로 결찰하고 U74389G(21-aminosteroid)를 투여하였다(Table 1).

Table 1. Experimental paradigms

Group	Types of occlusion	Types of treatment	Number of cats
A-1	A single, one hour continuous occlusion	Vehicle	5
A-2	Three 20-minute repeated occlusions during a 40-minute interval	Vehicle	5
A-3	A single, 20-minute occlusion	Vehicle	4
B-1	A single, one hour continuous occlusion	Nimodipine	6
B-2	Three 20-minute repeated occlusions during a 40-minute interval	Nimodipine	5
C-1	A single, one hour continuous occlusion	U74389G	6
C-2	Three 20-minute repeated occlusions during a 40-minute interval	U74389G	5

2. 실험 동물 조작 및 뇌혈류 차단 방법

Ketamine hydrochloride(1mg/kg)를 고양이의 대퇴부에 근육주사하여 마취를 유도한 뒤, 기관 절개 후 내경 5mm 되는 도관을 삽입하고, mechanical ventilator(model 808, New England Medical Instrument Inc., Medway, MA, U.S.A.)에 연결하여, 대기중의 공기를 흡입시키면서, 호기 CO_2를 측정 감시(capnometer, model 2200, Traverse medical monitors, Saline, Michigan, U.S.A.)하였다.

대퇴동맥과 정맥에 각각 polyethylene 도관을 삽입하였으며, 동맥에는 헤파린 용액(heparin solution, 1,000unit/1,000ml 생리 식염수)을 채운후 P40 Statham pressure transducer에 연결하여 평균 동맥압(mean arterial pressure)을 측정하였다. 대퇴 정맥에 삽입한 도관은 정맥주사용 생리 식염수에 연결하고 약물 주입 통로로 이용하였다. 체온은 보온 장치(homeothermic blanket control unit Cat. No. 50-7503, Havard Apparatus, South Natik, MA, U.S.A.)를 이용하여 37.5 38.5℃로 유지하였다. 이상의 조작이 끝난 후 실험 동물용 정위 수술대에 고정하고 근 이완제인 pancuronium bromide(0.04mg/kg)를 정맥주사한 후 수술 조작을 시작하였으며, 간헐적인 ketamine hydrochloride 주사로 마취를 유지하였다.

국소 뇌혈류 측정을 위하여 고양이의 두피를 정중선에서 절개하여 벌리고, drill을 사용하여, 직경 3mm정도 되는 천공을 관상 봉합선 후방 약 1cm, 시상 봉합선 측방 약 1cm 지점에 좌우 양쪽으로 한개씩 모두 두개를 만들었다.

수술 현미경하에서 고양이의 좌측 안와를 통하여(transorbital approach)[25] 중 대뇌동맥의 기시부를 노출한 뒤 microvascular clamp(Microvascular clamp by Acland Art. 00462, S&T microlab AG, CH-8212 Neuhausen, Rheinfall, Switzerland)로 일시 결찰하였다. 중대뇌동맥의 결찰은 A-1, B-1, C-1군에서는 1시간씩 지속적으로 하였으며, A-2, B-2, C-2군에서는 20분간 40분 간격으로 3회 반복 시행하였다. 모든 군에서 최후 결찰을 제거하여 혈류를 복원시킨뒤 3시간 동안 재관류 시켰다.

3. 약물 투여

A군에게는 수술적 조작을 시행하면서 생리 식염수 1ml/kg를 대퇴부의 도관을 통하여 주입한 뒤 1시간 마다 생리 식염수 1ml/kg를 주사하였고, B군에게는 nimodipine(dihydropyridine)을 1.0㎍/kg/min의 속도로 광선으로부터 차단되는 polyethylene도관을 통하여 volumetric infusion pump(Harvard IV syringe pump Model 2681, MA, USA)로 수술 조작 시작부터 실험이 끝날 때까지 투여하였다. C군에게는 U74389G(21-aminosteroid)를 수술 조작을 시작하면서 5mg/kg을 10분에 걸쳐 서서히 주입한 뒤 1mg/kg/hour의 속도로 실험이 끝날 때까지 투여하였다.

4. 국소 뇌혈류의 측정

수술 현미경하에서 26G 주사침을 이용하여 경막을 절개한 후 전극(SNEX-200, Rhodes Medical Instruments, Inc., California, USA)을 ectosylvian gyrus의 피질 내에 삽입하고 수소 정화 기법(hydrogen clearance method)[27][29]을 이용하여 뇌혈류를 측정하였다. 실험 동물의 국소 뇌혈류 측정은 모든 군에서 중대뇌동맥 결찰전에 시행하고 A-1, B-1, C-1군의 경우 결찰후 10분 뒤와 결찰 제거후 15분, 1시간, 2시간, 3시간이 경과 할 때 측정하였다. A-2, B-2, C-2군의 경우 첫 번째 결찰후 10분 뒤와 세 번째 결찰 제거후 15분 뒤에 측정하였고, 세번째 결찰을 제거한 뒤 1시간, 2시간, 3시간이 경과할 때 측정하였다.

5. 뇌경색의 관찰

실험이 끝나면, 실험 동물에 2M KCL 을 정맥주사하여 심장마비를 일으킨 뒤 즉시 대뇌를 적출하여, ectosyvian gyrus를 잘 볼 수 있는 단면을 약 3mm의 두께로 관상 절편하였다. 그 절편을 증류수로 세척한 뒤 2% triphenyl tetrazolium chloride(T.T.C.)[21] 용액에 담근 상태에서 빛이 완전히 차단된 항온기에 넣어 37 42℃로 유지시킨 상태에서 15분 뒤 뇌 절편을 한번 뒤집어 주고 다시 15분간 항온기에서 유지시킨뒤 T.T.C.용액을 배액 하고 뇌절편을 10% formalin용액에 넣어 2 3일간 고정하였다. 뇌절편을 일정한 거리에서 사진을 찍어 경색된 부위(적색으로 변하지 않는 부분)의 면적을 컴퓨터로 산출하였다.

6. 통계 분석

우선 A-1, A-2, A-3군간의 경색 범위의 차이와 혈류량의 변화를 ANOVA test와 multiple range test로 비교하였고, 각군에서 미상 피각부(caudatoputamen) 경색의 발생 빈도를 chi square test로 검증하였다. A-1군과 B-1, C-1군간의 경색 범위의 차이와 혈류량의 변화와 A-2, B-2, C-2군간의 경색 범위의 차이 및 혈류량의 변화를 ANOVA test와 multiple range test로 비교 분석하였고, 미상 피각부(caudatoputamen) 경색의 발생 빈도를 chi square test로 검증하였다.

결 과

1. 실험 군의 생리적 변수의 변화

1) 체온의 변화

실험이 진행되는 동안 직장 체온은 모든군에서 37.5℃에서 38.5℃사이로 유지 되었다(Table 2).

2) 호기 가스 내의 탄산 가스 분압의 변화

혈류 차단전, 혈류 차단중, 그리고 혈류 복원후 15분, 1시간, 2시간, 3시간에 측정한 $PACO_2$ 값은 각 실험 군간에 유의한 차이를 보이지 않았고, 모두 26mmHg에서 30mmHg 사이에 유지되었다(Table 3).

3) 평균 동맥압의 변화

Nimodipine 투여군(B-1, B-2군)에서는 대조군(vehicle 투여군, A-1, A-2, A-3)에 비하여 전 측정 구간에서 의의있게 평균 동맥압의 감소가 관찰 되었으며, U74389G 투여군(C-1, C-2군)에서는 대조군과 비교하여 특히 혈류를 복원한 뒤 1시간 후부터 통계학적으로 의의있게 평균 동맥압이 증가 되었다(Table 4, Fig. 1).

2. 뇌경색의 정도

1) Vehicle 투여군에서 뇌혈류 차단 방법에 따른 뇌경색의 정도

1시간씩 지속적으로 혈류를 차단하였던 A-1군과 20분간씩 3회에 걸쳐 간헐적으로 차단하였던 A-2군에서는 5마

Table 2. Changes in rectal temperature(℃)

Group	Before occlusion	During occlusion	After recirculation			
			15 minutes	1hour	2hour	3hour
A-1	38.0±0.3	37.6±0.1	37.8±0.2	38.0±0.1	37.9±0.2	37.7±0.1
A-2	37.6±0.4	37.9±0.0	38.1±0.1	37.8±0.3	37.9±0.3	37.9±0.2
A-3	38.2±0.2	38.1±0.1	37.9±0.2	37.7±0.1	38.0±0.1	38.1±0.1
B-1	37.5±0.2	37.9±0.2	37.6±0.2	38.1±0.2	38.0±0.1	38.0±0.1
B-2	37.9±0.1	37.9±0.1	38.0±0.1	38.0±0.1	37.9±0.2	37.9±0.2
C-1	38.0±0.3	38.0±0.2	37.8±0.2	37.9±0.1	38.0±0.3	38.0±0.2
C-2	37.7±0.2	37.8±0.2	37.7±0.1	37.9±0.2	37.7±0.2	37.9±0.1

Values are mean±standard error(SE)

Table 3. Changes in $PACO_2$(mmHg)

Group	Before occlusion	During occlusion	After recirculation			
			15 minutes	1hour	2hour	3hour
A-1	28±2	30±1	26±2	29±1	27±2	29±1
A-2	27±1	28±1	27±3	28±2	28±1	28±1
A-3	28±2	29±2	28±2	30±2	29±2	26±2
B-1	29±2	27±1	26±1	28±2	28±1	27±1
B-2	28±2	29±2	30±2	30±1	29±2	26±2
C-1	27±3	28±2	27±1	28±1	28±1	28±1
C-2	29±1	30±1	29±2	29±2	27±2	29±1

Values are mean±standard error(SE)

Table 4. Changes in mean arterial pressure(mmHg)

Group	Before occlusion	During occlusion	After recirculation			
			15 minutes	1hour	2hour	3hour
A-1	108.33±4.89	111.06±6.99	116.67±6.91	111.67±3.16	108.61±2.95	105.33±3.74
A-2	103.14±4.13	102.70±3.14	106.16±5.17	113.50±4.41	108.17±2.79	100.98±0.99
A-3	104.29±0.10	105.97±0.88	102.87±1.74	102.87±1.74	111.41±0.74	102.87±1.74
B-1	94.44±6.92[a]	93.07±6.34[b]	100.88±3.55	98.83±5.66[a]	97.67±4.90	92.53±2.64[a]
B-2	94.25±0.33	97.00±1.33	95.07±0.85	101.91±3.13	100.59±3.62	97.98±1.50
C-1	111.41±8.06	105.33±3.22	117.44±7.24	123.77±2.91[c]	120.48±5.06	116.18±3.04[c]
C-2	108.09±3.18	114.70±4.25	124.98±7.68	127.23±5.68	116.63±10.4	118.85±4.29[d]

Values are mean±standard error(SE)
a : $p<0.05$ compared with group A-1 and C-1 b : $p<0.05$ compared with group A-1
c : $p<0.05$ compared with group A-1 and B-1 d : $p<0.05$ compared with group A-2 and B-2

리 모두에서 뇌경색이 생겼으며, 20분간 1회 결찰군(A - 3군)에서는 4마리 모두에서 뇌경색이 생기지 않았다. 한편 A - 1군에서는 뇌경색의 단면적이 전체 단면적의 21.39%를 차지하여, A - 2군의 10.96%에 비하여 뇌경색이 광범위하였음을 알 수 있었고, 이는 통계학적으로 유의한 차이($p<0.05$)를 보였다(Table 5, Fig. 2).

Ischemic core라고 생각되는 미상 피각부(caudatoputamen)의 경색은 A - 1군 중 3마리에서 발생되었으며, A - 2군에서는 2마리에서 발생되었다.

2) 투여 약물에 따른 뇌경색의 정도

Nimodipine 투여 군과 U74389G 투여 군에서는 1시간 지속적으로 뇌혈류를 차단한 경우(B - 1, C - 1군)와 20분씩 3회에 걸쳐 간헐 반복적으로 차단한 경우(B - 2, C - 2군) 모두에서 vehicle만을 투여한 군(A - 1, A - 2군)에 비하여 유의하게 뇌경색의 면적이 감소하였으며, 뇌경색의 발생 빈도도 적었다(Table 5).

1시간 지속 차단한 경우, nimodipine 투여 군과 U74389G 투여 군 사이에 뇌경색 발생 범위의 차이는 없었으며, 20분씩 3회 간헐적으로 차단한 경우에도 두 약물 투여 군간에 뇌경색 발생 범위의 차이는 없었다. 한편, 통계학적 의의는 없었지만 nimodipine 투여 군에서는 뇌경색의 발생이 모두 대뇌 피질에 국한되어 일어났으며 U74389G 투여 군에서는 1마리에서 미상 피각부를 침범한 뇌경색이 관찰되었다(Table 5).

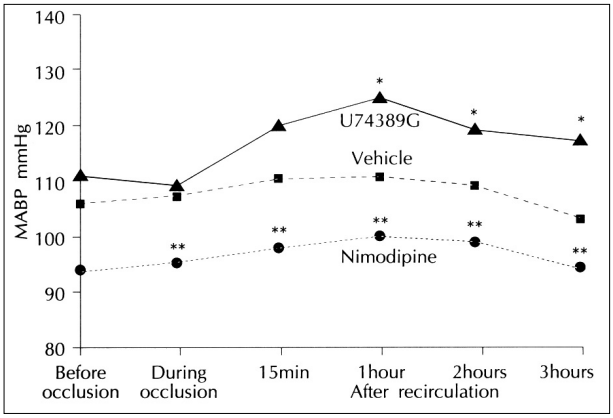

Fig. 1. Changes in mean arterial blood pressure according to the types of treatment. * : $p<0.05$ compared with vehicle and nimodipine treated group, ** : $p<0.05$ compared with vehicle and U74389G treated group.

3. 국소 뇌혈류의 변화

1) Vehicle 투여군에서 뇌혈류 차단 방법에 따른 국소 뇌혈류의 변화

중대뇌동맥의 혈류를 20분씩 3회에 걸쳐 간헐적으로 차단한 군(A - 2군)이 1시간 지속 차단 군(A - 1군)과 20분간 1회 차단 군(A - 3군)보다 혈류 복원 1시간 후 부터 다소 국소 뇌혈류가 감소되었으나 통계학적 의의는 없었다(Fig. 3, Table 6).

2) 1시간 지속적 차단 군에서 투여 약물에 따른 국소 뇌혈류의 변화

U74389G 투여 군(C - 1군)이 nimodipine투여 군(B - 1군)과 vehicle 투여 군(A - 1군)보다 혈류 복원 후 전 측정 구간에서 국소 뇌혈류의 증가가 관찰 되었다. U74389G 투여 군은 nimodipine투여 군(B - 1군) 및 vehicle 투여 군(A - 1군)에 비하여 혈류 복원 후 15분과 3시간대에서 통계학적으로 유의하게 국소 뇌혈류가 증가 되었으며, 혈류 복원 후 2시간 대에서는 nimodipine 투여군에 비하여 통계학적으로 유의하게 국소 뇌혈류가 증가 되었다.

Nimodipine 투여 군(B - 1군)은 vehicle 투여 군(A - 1군)에 비하여 혈류 복원 후 전 측정 구간에서 뇌혈류의 감소를 보였으나 통계학적 의의는 없었다(Fig. 4, Table 6).

3) 20분간 3회 반복 간헐적 차단 군에서 투여 약물에 따른 국소 뇌혈류의 변화

U74389G 투여 군(C - 2군)은 혈류 복원 후 15분이 경과하면서 부터 전 측정 구간에 걸쳐 vehicle투여 군(A - 2군)과 nimodipine투여 군(B - 2군)에 비하여 통계학적으로

Table 5. Cerebral infarction according to the experimental paradigms

Group	Total number of cats	Number of cats developing cerebral infarction	Number of cats developing caudatoputaminal infarction	Total area of cerebral infarction (percentage of total coronal section area)
A-1	5	5	3	21.39±1.42[a]
A-2	5	5	2	10.96±1.15[b]
A-3	4	0	0	0
B-1	6	3[c]	0	6.23±3.97
B-2	5	2[d]	0	3.90±2.48
C-1	6	2[c]	1	5.49±3.25
C-2	5	2[d]	0	3.91±1.59

a : $p<0.05$ compared with group A-2, B-1, and C-1
b : $p<0.05$ compared with group A-1
c : $p<0.05$ compared with group B-2 and C-2
d : $p<0.05$ compared with group A-2

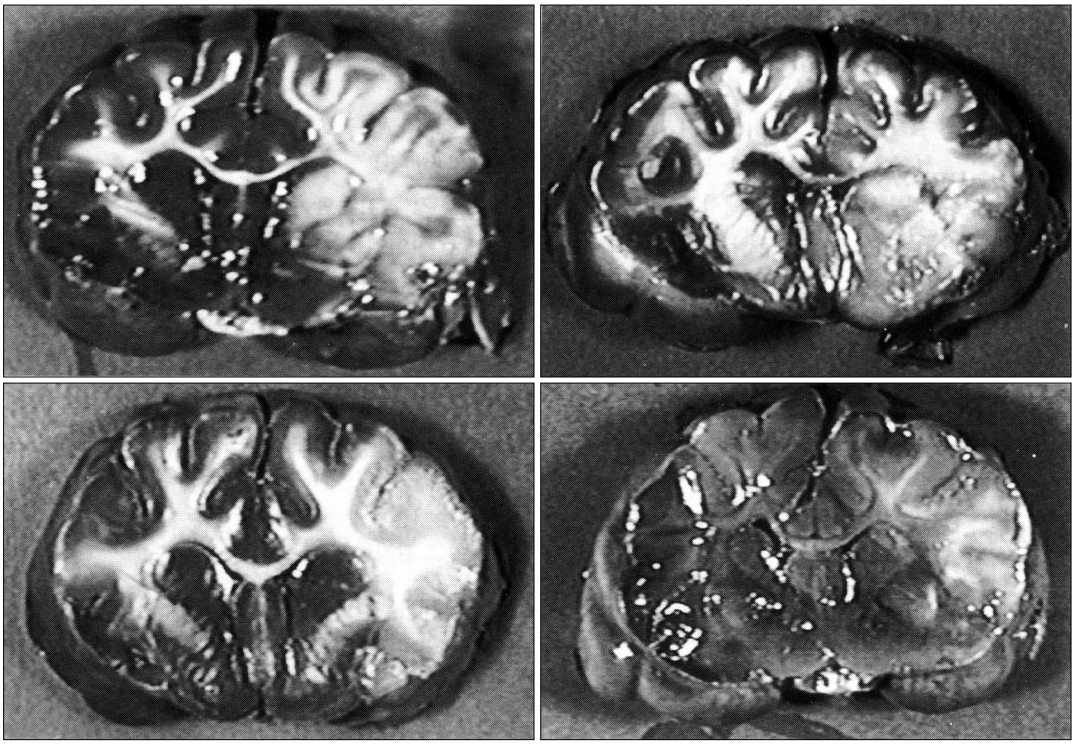

Fig. 2. 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC)-stained coronal cat brain slices. *Left upper* : A cat that was subjected to single one hour occlusion of the middle cerebral artery without medication. *Right upper* : Three 20minute repeated occlusions of the middle cerebral artery without medication. *Left lower* : Single one hour occlusion of the middle cerebral artery and treatment with nimodipine. *Right lower* : Single one hour occlusion of the middle cerebral artery and treatment with U74389G. Comparing with A, note marked reduction of the area of cortical cerebral infarction(area not stained with TTC) in B, C and D.

Table 6. Changes in regional cerebral blood flow according to the experimental paradigms(ml/100g/min.)

Group	Before occlusion	During occlusion	After recirculation			
			15 minutes	1hour	2hour	3hour
A-1	47.64±1.12	10.01±1.24	33.68±3.26	38.44±2.51	33.31±3.69	33.44±4.92
A-2	42.30±2.04	9.72±0.77	34.25±2.42	32.99±2.06	26.86±0.63	27.40±1.49
A-3	45.73±3.48	9.58±0.59	37.71±2.88	32.09±3.21	32.66±2.74	31.47±1.54
B-1	39.42±6.30	8.78±2.27	30.07±3.49	31.42±5.20	23.59±3.43	25.71±4.41
B-2	35.29±1.15	5.85±0.23	26.54±3.30	19.31±1.73[a]	16.85±0.81[a]	20.13±1.77
C-1	47.09±3.42	13.24±5.30	55.10±8.07[b]	43.45±5.41	40.18±4.41	47.40±4.61[b]
C-2	50.71±1.58	8.88±4.46	46.58±2.87	46.13±7.41[c]	41.54±5.36[c]	37.61±5.58[c]

Values are mean±standard error(SE)
a : $p<0.05$ compared with group A-2 and C-2 b : $p<0.05$ compared with group A-1 and B-1
c : $p<0.05$ compared with group A-2 and B-2

의의 있게 국소 뇌혈류가 증가 되었고, nimodipine 투여 군은 혈류 복원 후 1시간과 2시간에서 vehicle 투여 군에 비하여 유의한 국소 뇌혈류의 감소가 관찰되었다(Fig. 5, Table 6).

4) 투여 약물에 따른 국소 뇌혈류의 변화

U74389G 투여 군(C-1 및 C-2군)은 혈류 복원 후 전 측정 구간에서 vehicle투여 군(A-1 및 A-2군)과 nimodipine투여 군(B-1 및 B-2군)에 비하여 월등하게 국소 뇌혈류의 증가를 보였으며, 이는 통계학적으로 의의가 있었다(Fig. 6, Table 6).

고 찰

본 연구에서 혈류 차단 시간은 총 1시간으로 하였으며, 반복 차단의 경우 이것을 각 20분 씩으로 나누어 중간에 40분씩 재관류 시간을 갖고 3번에 걸쳐 시행 하였는데 간헐

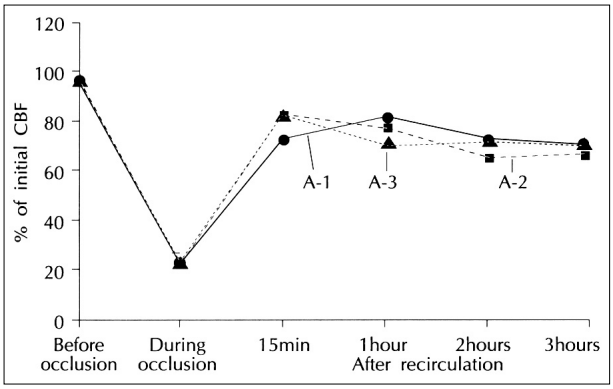

Fig. 3. Changes in local cerebral blood flow in the groups without treatment according to the types of occlusion. A-1 : single one hour continous occlusion, A-2 : three 20-minute repeated occlusions in a 40 minute interval, A-3 : single 20-minute occlusion.

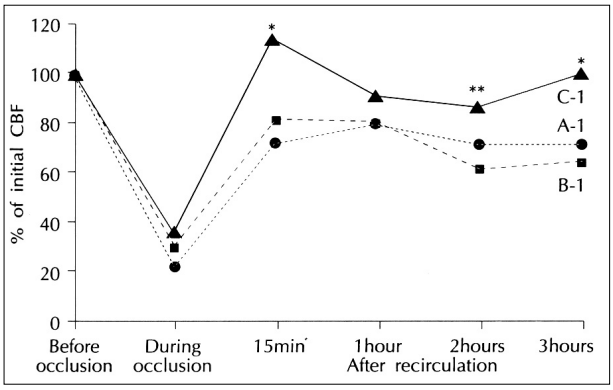

Fig. 4. Changes in regional cerebral blood flow in the groups with an one hour continuous occlusion according to the types of treatment. A-1 : treated with vehicle, B-1 : nimodipine, C-1 : U74389G. *p : <0.05 compared with A-1 and B-1 group, ** : p<0.05 compared with B-1 gruop.

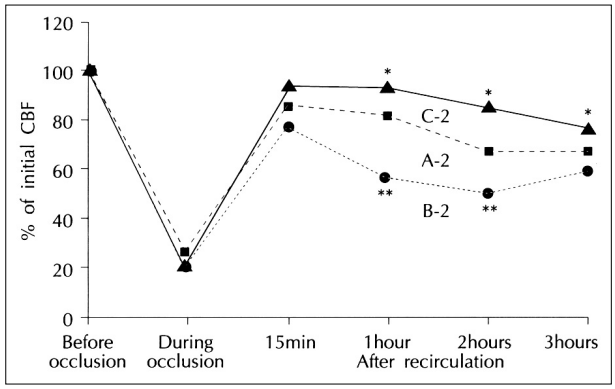

Fig. 5. Changes in regional cerebral blood flow in the groups with three 20-minute occlusions in a 40-minute interval according to the types of treatment. A-1 : treated with vehicle, B-1 : nimodipine, C-1 : U74389G. *p : < 0.05 compared with A-2 and B-2 group, ** : p<0.05 compared with A-2 and B-2 gruop.

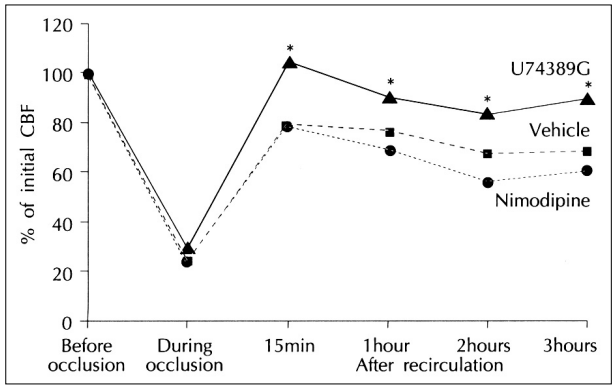

Fig. 6. Changes in regional cerebral blood flow in the according to the types of treatment. *p : <0.05 compared with vehicle and nimodipine treated group.

반복 차단의 경우 한번의 혈류 차단 시간을 20분간으로 정한 것은 20분간 한번의 국소 뇌혈류 차단으로는 뇌에 영구적인 손상을 일으키지 않음이 예비 실험과 다른 저자의 실험[32]을 통하여 알게 되었기 때문이었다. 혈관 결찰 조작이 종료된 후 3시간을 재관류 시켰는데 이것은 허혈기 후에 나타나는 지연성 저관류를 관찰하기에 충분한 시간이 필요하였고, T.T.C.를 이용한 뇌경색 판정시 뇌조직 손상이 일어나기 시작한 뒤 약 2시간이 경과되어야만 경색 범위를 비교적 정확히 알아 낼 수 있기 때문이었다[21].

뇌보호 효과를 비교하기 위하여 사용한 nimodipine(iso - propyl<2 - methoxyethyl> 1,4 - dihydro - 2,6 - dimethyl - 4 - <3 - nitrophemyl> - 3,5 - pyridine - dicarboxylate)과 U74389G(21 - <4 - (2,6 - di - 1 - Pyrrolidinyl - 4 - pyri - midinyl) - 1 - piperazinyl> - pregna - 1,4,9(11) - triene - 3,20 - dione(Z) - 2 - butenedioate)는 각각 허혈기와 재관류기에 신경 손상을 초래하는 기전으로 알려진 Ca^{++}의 세포내 유입과 지질의 과산화를 효과적으로 방지하는 것으로 알려졌다[3)8)23)27)]. Nimodipine은 dihydropyridine계열의 Ca^{++} 차단제로 L - type의 VSCC을 차단하는데 AOCC차단제의 임상적 응용이 대중화 되어 있지 않고, 실제 뇌동맥류 파열 환자에 있어 지연성 뇌허혈을 막기 위하여 수술 전 많은 환자에게 사용되고 있으므로 본 연구의 결과를 임상에 적용하기에 유리한 점이 있어 선택 되었다. U74389G는 21 - aminosteroid 계열로 스테로이드의 효과를 가지나 glucocorticoid와 mineralocorticoid 효과를 없앤 지질 과산화 길항제로 임상 적용이 시도되고 있는 U74006F와 유사하므로 선택되었다[3)11)].

20분간 한번의 혈류 차단으로는 뇌손상을 일으키지 않았으나 20분간 40분 간격으로 3회 반복 차단 하였을 때에는 뇌경색이 발생 하였는데 이는 한 번으로는 영구적인 뇌손상을 유발할 수 없는 단기간의 국소 뇌혈류 차단 이라도 반복

시행 하면 뇌손상이 유발될 수 있음[17)18)]을 검증 하는 것이다. 단기간의 반복적인 혈류 차단이 뇌손상을 일으키는 기전은 반복적 혈류 차단의 축적 효과라고 볼 수 있다[32)37)40)] 축적 효과의 원인으로는 허혈후 저관류 현상(postischemic hypoperfusion), 허혈후 단백질 합성(postischemic protein synthesis) 장애, 허혈후의 글루탐산(glutamate)에 의한 흥분성 손상(excitotoxicity)의 악화, 혈류 차단시 유도되는 산증(acidosis) 및 재관류 시기의 알칼리 증(alkalosis), 뇌 부종(cerebral edema), 반복 결찰로 인한 지연성 혈관 폐쇄, 미세 혈관의 재관류 손상(reperfusion injury)등이 거론되고 있으나[1)7)20)24)28)31)32)40)43)44)] 허혈후 저관류 현상이 가장 중요한 것으로 알려져 있다[32)40)].

1시간 지속적 혈류 차단 군은 중간에 40분씩 재관류 시간을 가지면서 20분씩 3회에 나누어 혈류 차단을 시도하였던 군보다 뇌경색의 범위가 넓어 뇌손상 정도가 심한 것으로 나타났다. 지금까지 보고된 실험 결과들을 보면 global ischemia의 경우 서로 상반된 결과들이 보고 되고 있기는 하나 일반적으로 간헐 반복 차단이 불리한 것으로 알려져 있으며[1)31)40)43)], 국소 뇌혈류 차단의 경우 간헐 반복 차단이 유리한 것으로 보고되고 있다[9)32)37)].

본 연구의 결과 역시 지금까지의 보고와 대체로 일치 하는 것인데, 이를 기초로 생각하여 볼 때 global ischemia와 focal ischemia 두 경우에서 일시적인 뇌허혈시 뇌손상을 일으키는 기전이 서로 다를 수가 있음을 추측할 수가 있다[9)36)]. Goldman 등과 Steinberg 등은 global ischemia의 경우 간헐 반복 차단시 뇌 부종의 심화가 있는 것과는 달리, 국소 뇌혈류의 반복 차단시 지속적 차단시와 비교하여 뇌 부종의 심화가 없음을 그 가능성의 하나로 제시하였다[9)36)].

두 형태의 허혈 손상에서 가장 큰 차이는 국소 뇌혈류 차단 시에는 ischemic penumbra가 존재한다는 것이다[36)]. 중대뇌동맥의 폐쇄로 일어나는 뇌허혈의 경우 허혈기에는 is - chemic core와 ischemic penumbra가 존재하는데 ischemic core에서 발생되는 뇌손상은 global type의 뇌허혈에서 일어나는 기전과 같다[36)]. 허혈에 의한 뇌조직 손상은 energy failure로 ATP 감소가 오게 되어 전달 물질(transmitter) 유리나 수용체(receptor) 활성화에 이은 세포내 Ca^{++}의 증가로 인한 일련의 반응에 의하여 일어나게 된다. 이 경우 dense ischemic core에서는 Ca^{++}의 세포내 유입과 동시에 에너지와 산소 공급이 고갈된 세포내 사립체(mito - chondria)와 소포체(endoplasmic reticulum)에서 Ca^{++}를 축적하는 기능이 손상 받아 Ca^{++}의 세포내 결합력이 저하되므로 단기간 허혈의 영향에 의해서도 Ca^{++}의 세포내에서의 유리가 지속되어 비가역적인 뇌손상이 초래되게 된다.

하지만 ischemic penumbra zone의 경우 에너지와 산소의 공급이 어느 정도 유지되기 때문에 세포내 Ca^{++} 증가가 주로 외부에서 유입되는 Ca^{++}에 의하여 일어나고 세포 내 Ca^{++}의 결합력이 보존되게 되므로 이 구역 세포들은 비록 손상 위험에는 놓이게 되나 아직 생존력이 있게 된다. 이 구역 세포의 생존 여부에 영향을 미치는 것은 그 외의 여러가지 인자에 의해서라고 생각된다[36)]. 즉 acidosis의 정도, free radical의 생성 정도에 따라, 그리고 얼마나 빨리 뇌혈류가 복원될 수 있느냐에 따라 손상 정도가 결정된다고 할 수 있다. 따라서 forebrain type 이나 global type에서 일시적 뇌허혈로 인한 뇌손상은 세포 내로의 Ca^{++} 유입을 차단하는 약제나 free radical을 제거하는 약제에 의하여 방지될 수 없지만[13)] 국소 뇌혈류 차단 시에는 상기 약제들이 ischemic penumbra에 대하여 보호 효과를 발휘할 수 있어 손상을 경감시킬 수 있으며[36)], 중간에 재관류를 갖는 간헐 반복 차단이 유리할 것으로 생각된다.

20분씩 3회에 걸쳐 혈류를 차단한 군에서 20분간 한번의 뇌혈류를 차단하였던 군과 1시간씩 지속적으로 혈류를 차단하였던 군에 비하여 통계학적 의의는 없었으나 뇌혈류의 감소가 재관류 2시간 3시간 대에서 다소 심함을 알 수 있었다. 이것은 허혈후 저관류 현상이 반복적으로 혈류를 차단하는 경우 더욱 심해지고[32)40)] 1시간 지속적으로 차단한 경우 20분간 3회 반복 차단 군에서 보다 한번의 혈류 차단 기간이 길어 혈류 복원 후의 과혈류(hyperemia) 현상이 길어지기 때문인 것으로 생각되었다[39)]. 허혈후 저관류 현상의 원인으로는 혈류 차단중 일어나는 주위 조직의 부종, 혈관 결찰중 일어나는 혈액 점도(viscosity)의 증가, 그리고 미세 혈관에서의 지질 과산화 현상등이 알려져 있다[32)40)43)].

20분간 3회 반복 차단시 U74389G 투여 군에서는 허혈후 뇌혈류 감소를 극복할 수 있음이 관찰 되어 허혈후 저관류 현상을 개선 함으로서 뇌보호의 효과를 발휘하였을 것으로 생각 되었다. 1시간 지속적 차단 군에서도 U74389G 투여로 역시 허혈 후 저관류 현상이 극복 됨을 보았을 때 일시적 혈류 차단 후 발현하는 저관류 현상에는 자유기에 의한 미세 혈관에서의 지질 과산화(oxygen - free - radical - induced microvascular lipid peroxidation)현상이 주된 역할을 함을 간접적으로 알 수 있었다.

20분씩 3회 반복 혈류 차단시 nimodipine 투여 군에서도 의의 있게 뇌경색의 범위를 줄일 수 있었다. Nimodipine의 뇌허혈에 대한 보호 효과는 뇌혈관 평활근에 대한 작용으로 뇌혈류를 증가시켜 유도된다는 주장과 세포 내로의 Ca^{++} 유입을 막아 Ca^{++} 유입으로 야기되는 일련의 병적 현상(pathologic cascade)을 차단한다는 주장이 있다[2)5)23)43)]

Uematsu 등(1989)은 고양이를 이용한 국소 뇌혈류 차단 실험에서 본 실험과 같은 용량의 nimodipine을 혈류 차단 후 5분 뒤 부터 투여하여 허혈기 및 재관류기에서 세포 내로의 자유 Ca^{++}의 유입 증가가 억제되고 재관류기에서 뇌혈류가 증가됨을 보고하여 nimodipine이 허혈기와 재관류기 모두에 작용함을 보고하였다[42].

이는 본 연구에서 nimodipine의 뇌보호 효과가 뚜렷하였던 것과는 일치하는 것이나 허혈 후 저관류 현상이 개선되지 못하였던 점과는 상반되는 결과이다. 허혈기 이후 뇌혈류 증가가 보이지 않았던 것을 약물 투여 시기가 Uematsu등의 실험(1989)에 비하여 훨씬 빨라 약물의 축적 효과로 재관류 기간 중 평균 동맥압의 저하가 있었기 때문이라고 생각할 수도 있으나, nimodipine이 고양이의 중대뇌동맥 결찰시 뇌피질내 저항(intracortical resistance) 및 뇌피질외 저항(extracortical resistance)을 모두 감소 시켜 뇌혈류의 증가가 일어나지 않았다는 보고[6]로 미루어 nimodipine은 재관류기 보다는 허혈기에 주로 작용하여 Ca^{++}의 세포 내 유입을 막음으로써 그 효과를 발휘하는 것으로 생각되었다.

즉 nimodipine 투여 군에서 허혈기 후의 저관류 현상을 막을 수 없었음에도 불구하고 뇌경색의 범위를 줄일 수 있었음을 볼 때 반복적인 단기 뇌혈류 차단시 유발되는 축적 효과가 허혈 후의 저관류현상에 의한 것만은 아니라고 생각되며, Ca^{++} 항상성의 장애가 깊이 관련되어 있을 것으로 생각된다.

1시간 지속적 차단 군에서 nimodipine과 U74389G는 모두 뇌경색 범위를 의의있게 감소시켜 뚜렷한 뇌보호 효과를 보였다. Nimodipine은 간헐 반복 차단 군에서와 마찬가지로 혈류의 일시적 차단 후에 나타나는 저관류의 현상을 막지 못하였음에도 불구하고 뇌경색의 발생 범위를 줄여 그 작용이 주로 재관류기 보다는 허혈기에 작용하였음을 알 수 있었고 그 작용 기전은 ischemic penumbra에 대한 Ca^{++}의 세포 내 유입을 막았기 때문이라고 생각된다. 1시간 지속적 혈류 차단 시 U74389G 투여 군에서 뇌경색의 범위를 감소 시킬 수 있었던 원인은 반복 차단하였을 경우와 같이 허혈 후 저관류 현상을 개선 함으로서 이루어진 것으로 생각된다. 이는 고양이에서 압박 대(tourniquet)를 이용하여 global ischemia를 5분간 유발한 뒤 발생하는 저관류 현상을 역시 21 - aminosteroid 계열인 U74006F로서 효과적으로 막을 수 있었다는 Hall 및 Yonker의 보고[12]와 일치하였다.

본 연구에서도 그들의 보고에서와 마찬가지로 U74389G 투여 군에서 심맥 관계 장기에 대한 보호 효과로 평균 동맥압이 높게 유지되어 허혈 후의 저관류 현상을 개선할 수 있었던 것으로도 생각되나, 그 주된 기전은 미세 혈관에 대한 보호 효과라고 생각된다. 뇌허혈로 인하여 아라키돈 산의 대사 과정에 관여하는 prostacyclin synthetase와 thromboxane synthetase 모두가 활성화하게 되나 허혈기에 발생한 자유기에 의해 혈관 확장 효과를 가진 prostacyclin sythetase가 억제되어 thromboxane synthetase의 활성도가 상대적으로 높아지므로 혈관의 수축(vasoconstriction)과 혈소판의 응집이 유발되는데[36] 본 연구 결과로 볼 때 이것이 허혈후에 초래되는 저관류 현상과 밀접한 연관이 있는 것으로 생각된다.

미상 피각부에서 경색의 발생 빈도가 1시간 지속 차단 군과 20분씩 3회 반복 차단 군 사이에서 큰 차이가 없었던 것은 한번의 차단으로 영구적 뇌손상을 유발하지 않는 기간이라도 반복 차단 시 ischemic core를 형성할 수 있는 가능성을 제시하여 다른 저자들의 보고[9][37]와 일치하였다. 그러나 nimodipine 투여 군에서 ischemic core 라고 생각되는 미상 피각부(caudatoputamen)에 뇌경색의 발생이 전혀 없었던 것과 U74389G 투여 군에서도 미상 피각부의 경색의 발생이 현저히 적었던 것은 이 부위에서 일어나는 허혈성 손상이 global ischemia의 기전과 같아 Ca^{++}길항제 등이나 지질과산화 억제제에 의하여 개선되기 어려움을 고려할 때 의외의 결과였다.

글루탐산(glutamate)의 유리로 인한 AMPA(amino - 3 - hydroxy - 5 - methyl - 4 - isoazole propionic acid) 수용체의 활성화로 세포 내로의 Na^{+} 유입이 이루어져 그에 따른 탈 분극(depolarization)이 VSCC나 AOCC를 통한 Ca^{++}의 세포내 유입의 전단계임을 고려하고, AMPA 수용체 차단제가 global ischemia나 forebrain type의 허혈에 효과가 있음을 고려하면, 본 연구에서 마취제로 사용한 ketamine이 미약하지만 NMDA(N - methyl - D - aspatate)수용체의 일부를 차단할 수 있으므로[36], nimodipine을 투여한 경우 허혈 초기에 세포내로의 Ca^{++} 유입이 완전히 차단되었기 때문이라고 해석할 수 있고, nimodipine의 ischemic core에 대한 뇌손상에 대한 보호효과가 U74389G에 비하여 우수하다고 할 수 있다. 또한 global ischemia의 경우에도 Ca^{++} 길항제나 지질과산화 억제제의 효과가 비교적 장시간 혈류를 차단한 경우 보고되는 것을 보면[5][11], 이러한 결과가 두 약제의 뇌보호 효과로 인한 것이라고도 생각할 수 있다. 뇌경색의 정도를 판정하는데 이용한 T.T.C.가 재관류가 일어나지 않은 부위의 확인에는 상당히 제한적 요소가 많음을 생각할 때[21] 일시적인 혈류 차단이 미상 피각부에 분포하는 미세한 관통 동맥들의 완전한 폐쇄를 가져왔기 때문일 가능성과 개체간 변이로 미상 피각부에 분포하는 관통 동맥이 중

대뇌동맥에서 기시하는 위치에 차이가 있어 미상 피각부에 대한 효과적인 혈류 차단이 이루어지지 않았을 가능성도 배제할 수는 없을 것이다.

본 연구에서는 비록 nimodipine과 U74389G를 동물 조작의 초기부터 투여를 시작하여 두 약물의 정확한 작용 시기를 밝히는데 어려움이 있었고, 지속적 혈류 차단과 간헐 반복적 혈류 차단 시 두 약물의 뇌보호 효과에 대한 차별화에 실패하여 Ca^{++}의 세포내 유입과 지질의 과산화 중 어느 것이 두 형태의 일시적 혈류 차단시 유발되는 뇌손상에 있어 각각의 주된 기전인지를 명확히 밝히지 못하였다.

그러나 지속적 혈류 차단 군에서 보다 간헐 반복 차단 군에서 허혈후 저관류 현상이 다소 심하였음에도 실질적인 뇌경색 범위는 간헐 반복 차단 군에서 적었다는 점이 관찰되었고, 허혈후 저관류 현상이 지질과산화 억제제인 U74389G에 의해 효과적으로 차단될 수 있었으며, nimodipine이 뇌혈류를 증가 시키지 못함에도 불구하고 뇌보호 효과를 보였음을 알게 된 것은 만족할 만한 실험 결과로 생각된다.

즉, 단기간의 반복 혈류 차단시 유발되는 축적 효과의 주된 요인으로 허혈후 저관류 현상 외에 지속적 혈류 차단 시에서와 같이 Ca^{++} 항상성의 장애가 존재함이 부각되었고, 간접적이나마 nimodipine은 주로 허혈기에 U74389G는 재관류기에 작용함을 밝혀 낸 것은 가치가 있는 것으로 생각된다. 국소 뇌혈류의 일시적 차단시 두 약물을 투여하는 경우, nimodipine은 뇌허혈 손상의 예방적 차원에서 U74389G는 재관류에 의한 손상을 최소화하는 관점에서 그 투여 시기를 결정해야 할 것으로 사료된다.

결 론

국소 뇌혈류 차단시 전체적인 차단 시간은 같더라도 지속적 차단 또는 간헐 반복 차단하는 두 형태의 혈류 차단 방법에 의해 생기는 뇌손상 기전에 차이가 있는지를 알아보기 위하여 Ca^{++} 경로 차단제인 nimodipine과 지질과산화 억제제인 21 - aminosteroid(U74389G)가 고양이의 중대뇌동맥을 1시간 지속적으로 차단 또는 중간에 40분씩의 재관류 시간을 갖고 20분간 3회에 나누어 반복적으로 차단한 후 혈류 복원뒤의 뇌혈류 변화와 뇌경색에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

국소 뇌혈류의 지속적 및 간헐 반복 차단시 발생되는 뇌손상에 있어 Ca^{++} 항상성의 장애와 자유기에 의한 지질과산화현상이 각각에 관여하는 정도는 같은 것으로 판단 되었으며, nimodipine은 주로 혈류 차단중의 허혈기에 U74389G는 혈류 복원 뒤의 재관류기에 주로 작용하여 뇌손상을 경감 시키는 것으로 생각되었다. 따라서, nimodipine은 뇌허혈 손상의 예방 목적으로, 21 - aminosteroid(U74389G)는 재관류시의 손상을 방지하는 목적으로 치료제의 선택이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

본 연구에 사용된 21 - aminosteroid(U74389G)를 제공하여 주신 미국 Upjohn 연구실의 David C. Zimmermann께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 약품을 제공 받는데 도움을 주신 한국 업죤 주식회사 여러분께 감사 드립니다.

● 논문접수일 : 1997년 2월 28일
● 심사완료일 : 1997년 3월 20일

References

1) Araki T, Kato H, Kogure K : *Neuronal damage and calcium accumulation following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil. Brain Res 528 : 114-122, 1990*
2) Barnett GH, Bose B, Little JR, et al : *Effect of nimodipine on acute focal cerebral ischemia. Stroke 17 : 884-890, 1986*
3) Braughler JM, Pregenzer JF, Chase RL, et al : *Novel 21-aminosteroids as potent inhibitors of iron dependent lipid peroxidation. J Biol Chem 262 : 10438-10440, 1987*
4) Buchan A : *Advances in cerebral ischemia : Experimental approaches. Neurol Clin 10 : 49-61, 1992*
5) Carceller F, Roda JM, Gutierrez-Molina M, et al : *Can nimodipine prevent ischemic reperfusion injury in the rat brain? Neurol Res 15 : 395-400, 1993*
6) Date H, Hossmann KA : *Effect of vasodilating drugs on intracortical and extracortical vascular resistance following middle cerebral artery occlusion in cats. Ann Neurol 16 : 330-336, 1984*
7) Deluga KS, Plotz FB, Betz AL : *Effect of indomethacin on edema following single and repetitive cerebral ischemia in the gerbil. Stroke 22 : 1259-1264, 1991*
8) Germano IM, Bartkowski HM, Cassel ME, et al : *The therapeutic value of nimodipine in experimental focal ischemia : Neurological outcome and histopathological findings. J Neurosurg 67 : 81-87, 1987*
9) Goldman MS, Anderson RE, Meyer FB : *Effects of intermittent reperfusion during temporal focal ischemia. J Neurosurg 77 : 711-716, 1992*
10) Gutteridge JMC, Halliwell B : *The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. Trends Biochem Sci 15 : 129-135, 1990*
11) Hall ED, Pazara KE, Braughler JM : *21-Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74006F protects against cerebral ischemia in gerbils. Stroke 19 : 997-1002, 1988*
12) Hall ED, Yonkers PA : *Attenuation of postischemic cerebral hypoperfusion by the 21-aminosteroid U74006F. Stroke 19 :*

340-344, 1988

13) Helfaer MA, Kirsch MD, Hurn PD, et al : *Tirilazard mesylate does not improve early cerebral metabolic recovery following compression ischemia in dogs. Stroke 23 : 1479-1486, 1992*
14) Hossman KA : *Ischemia-mediated neuronal injury. Resuscitation 26 : 225-235,1993*
15) Jabre A, Symon L : *Temporary vascular occlusion during aneurysm surgery. Surg Neurol 27 : 47-93, 1987*
16) Jun BY, Joo JY, Lee KC, et al : *The effect of continuous and intermittent interruption of the cerebral blood flow on brain edema and ischemic neuronal injury in gerbils. J Kor Neurosurg Soc 24 : 753-760, 1995*
17) Kato H, Kogure K : *Neuronal damage following non-lethal but repeated cerebral ischemia in the gerbil. Acta Neuropathol 79 : 494-500, 1990*
18) Kato H, Araki T, Kogure K : *Role of the excitotoxic mechanism in the development of neuronal damage following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil : Protective effects of MK-801 and pentobarbital. Brain Res 516 : 175-179, 1990*
19) Kirsch JR, Helfare MA, Lange DG, et al : *Evidence for free radical mechanism of brain injury resulting from ischemia/reperfusion-induced events. J Neurotrauma 9(suppl 1) : S157-S163, 1992*
20) Lin B, Globus MYT, Dietrich WD, et al : *Differing neurochemical and morphological sequelae of global ischemia : Comparison of single and mutiple insult paradigms. J Neurochem 59 : 2213-2223, 1992*
21) Liszczak TM, Hedley ET, Adams JF, et al : *Limitation of Tetrazolium salts in delineating infarcted brain. Acta Neuropathol 65 : 150-157, 1984*
22) McCord JM : *Mechanism of disease, oxygen derived free radicals in postischemic injury. N Egnl J Med 312 : 159-163, 1985*
23) Meyer FB, Anderson RE, Yaksh TL, et al : *Effect of nimodipine on intracellular brain PH, cortical blood flow, and EEG in experimental focal cerebral ischemia. J Neurosurg 64 : 617-626, 1986*
24) Nowak TS Jr, Tomida S, Pluta R, et al : *Cumulative effect of repeated ischemia on brain edema in the gerbil. Adv Neurol 52 : 1-9, 1990*
25) O'Brien MD, Waltz AG : *Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. Stroke 4 : 201-206, 1973*
26) Park SH, Lee KH, Lee KC : *The effect of nimodipine on neurological and pathological findings following experimental focal cerebral ischemia. J Kor Neurosurg Soc 19 : 5-13, 1990*
27) Park SK, Park HC, Park YG : *Measurement of cerebral cortical blood flow in 30 cats using a hydrogen clearance method. New medical J 29 : 83-88, 1986*
28) Paschen W, Widmann R, Weber C : *Changes in regional polyamine profiles in rat brains after transient cerebral ischemi (single versus repetitive ischemia) : evidence for release of polyamines from injured neuron. Neurosci Lett 135 : 121-124, 1992*
29) Pasztor E, Symon L : *The hydrogen clearance method in assessment of blood flow in cortex, white matter and deep nuclei of baboons. Stroke 4 : 556-567, 1973*
30) Peerless SJ, Drake CG : *Management of aneurysms of the posterior circulation. In Youmans JR, eds. Neurological surgery. Philadelphia, WB Sauders, 1974, pp1764-1806*
31) Pluta R, Tomida S, Ikeda J, et al : *Cerebral vascular volume after repeated ischemic insults in the gerbils. Comparison with changes in CBF and brain edma. J Cereb Blood Flow Metab 9 : 163-170, 1989*
32) Sakaki T, Tsunoda S, Morimoto T, et al : *Effect of repeated temporary clipping of the middle cerebral artery on pial arterial diameter, regional cerebral blood flow, and brain structure in cats. Neurosurgery 27 : 914-920, 1990*
33) Samson DS, Batjer HH, Bowman G, et al : *A Clinical study of the parameters and effects of temporary arterial occlusion in the management of intracranial aneurysm. Neurosurgery 34 : 22-28, 1994*
34) SiesjöBK : *Cerebral circulation and metabolism. J Neurosurg 60 : 883-908,1984*
35) SiesjöBK, Bengstsson F : *Calcium fluxes, calcium antagonist, and calcium related pathology in brain iischemia, hypoglycemia, and spreading depression : Unifying hypothesis. J Cereb Blood Flow Metab 9 : 124-140, 1989*
36) SiesjöBK : *Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. J Neurosurg 77 : 169-184, 1992*
37) Steinberg GK, Panahian N, Sun GH, et al : *Cerebral damage caused by interrupted, repeated arterial occlusion versus uninterrupted occlusion in a focal ischemic model. J Neurosurg 81 : 554-559, 1994*
38) Suzuki J, Kwak R, Okudairo Y : *The safe time limit of temporary clamping of cerebral arteries in the direct surgical treatment of intracranial aneurysms under moderate hypothermia. Tohoku J Exp Med 127 : 1-7, 1979*
39) Todd NV, Picozzi P, Crockad AH, et al : *Reperfusion after cerbral ischemia : Influence of duration of ischemia. Stroke 17 : 460-466, 1986*
40) Tomida S, Nowak TS, Vass K, et al : *Experimental model for repeated ischemic attack in thr gerbil : The cumulative effect of repeated ischemic insults J Cereb Blood Flow Metab 7 : 773-782, 1987*
41) Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC : *Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. J Appl Physiol 71 : 1185-1195, 1991*
42) Uematsu D, Greenberg JH, Hickey WF, et al : *Nimodipine attenuate both increase in cytosolic free calcium and histologic damage following focal cerebral ischemia and reperfusion in*

cats. Stroke 20：1531-1537, 1989

43) Vass K, Tomida S, Hossmann KA, et al：*Microvascular disturbances and edma formation after repetitive ischemia of gerbil brin. Acta Neuropathol 75：288-294, 1988*

44) Widmann R, Weber C, Bonnekoh P, et al：*Neuronal damage after repeated 5minutes of ischemia in the gerbil is preceded by prolonged impairment of protein metabolism. J Cereb Blood Flow Metab 12：425-433, 1992*