

腦卒中症에 있어서 血小板凝集의 역할에 관한 研究

釜山大學校 醫科大學 藥理學教室

洪 起 煥 · 李 元 石

= Abstract =

Study on the Role of Platelet Aggregation in Cerebrovascular Disease

Ki Whan Hong, M.D. and Won Suk Lee, M.D.

Department of Pharmacology, College of Medicine, Busan National University, Busan Korea

It was undertaken to investigate the factors involved in the micro thrombus formation in the plasma from the patients with cerebrovascular disease(CVD) and the *in vitro* actions of sodium nitroprusside on the platelet aggregate formation.

1) The microthrombus formation in the plasma from CVD was significantly enhanced, in comparison with that from the healthy volunteers.

2) Both lipid peroxide and cathepsin D in the plasma from CVD were higher than those levels from the healthy volunteers.

3) Whereas the platelets from healthy individuals showed less aggregation activity in response to ADP in the second phase, those from CVD revealed the enhanced aggregating response to ADP.

4) When the bovine basilar artery, rabbit aorta and human umbilical artery were pretreated with K⁺-free PSS, ouabain, 13-hydroperoxylinoleic acid(13-HPLA) and cadmium they markedly enhanced the platelet aggregability respectively.

5) Platelet aggregation induced by K⁺-free PSS-treated bovine basilar artery was decreased by sodium nitroprusside in a dose-dependent manner, but not by either hydralazine or diazoxide.

6) Both dibutyryl cyclic AMP and 8-bromo cyclic GMP had the inhibitory action on the platelet aggregation. However, the latter had more prominent action than the former. The antiaggregating effect by sodium nitroprusside was antagonized by pretreatment with methylene blue, but not by hemoglobin.

These results provide the evidences for the therapeutic use of sodium nitroprusside in the emergency of cerebrovascular disease and it remains the further study of the clinical therapy with it.

* 이 논문은 1981년도 產學協同財團 學術研究費에 의하여 수행되었음.

緒 論

近來에 李 및 金¹⁾이 報告한 바에 의하면 韓國에서 成人 死亡率의 原因으로서 腦血管疾患(腦卒中症)이 首位를 차지하고, 그 다음이 腫瘍이라 할 만큼 韓國에서는 중요한 위치를 차지하고, 韓國을 包含하여 東洋에서는 腦卒中症이 頻發하고^{2~4)} 腦卒中症의 前疾患으로서는 高血壓이 主要原因이란 點도 많은 報告들에 의하여 이미 周知하는 바이다^{5~7)}.

最近에 prostaglandins에 對한 많은 研究結果로 動脈硬化症의 機轉이 점차 밝혀지고 있다. 卽 prostaglandins 代謝物中에서 血少板凝集과 血管收縮에는 prostaglandin endoperoxide 및 thromboxane A₂가 關여하고^{8~10)} 血管擴張 및 抗血少板凝集에는 prostacyclin이 關여한다는 사실^{11,12)}이 알려져 있다. 動脈硬化症의 初期에는 血管內皮細胞의 損傷이 主要原因이 된다는 內皮細胞損傷說^{13~16)}이 血管壁 특히 內皮細胞에서 生成되는 prostacyclin^{11,17)}과 밀접한 關連이 있다는 사실이 크게 觀心을 끌고 있다.

Dembinska-Kieč 등¹⁸⁾ 및 Gryglewski¹⁹⁾등은 高脂質血로 過酸化脂質이 增加하고 이는 血管壁 특히 內皮細胞에서 prostacyclin synthetase를 억제하여 혈관에서 prostacyclin/thromboxane A₂의 比가 變動되어 血少板의 活性이 증가하고 結果의으로 遊離反應이 亢進하고 이로 因하여 血少板凝集과 動脈硬化症이 誘發된다는 점에서 血少板凝集이 重要な 役割을 함을 알 수 있다.

한편 Schultz 등²⁰⁾에 의하여 sodium nitroprusside가 非血管平滑筋인 원위 精管에서 cyclic GMP를 증가시키는 報告한 以來 nitrogen oxide를 含有한 末梢血管 擴張劑가 血管平滑筋에서도 cyclic GMP를 증가시키고 筋弛緩을 惹起한다는 事實등은 그 作用이 서로 連關되어 일어난다고 하였다^{21,22)}.

著者は 本研究에서 韓國에서 頻發하는 腦卒中症 患者에 對한 觀察과 이를 토대로 하여 in vitro로 sodium nitroprusside의 應急時 治療의 應用의 可能性에 대한 檢討를 다음과 같이 行하였다.

1) 腦卒中症患者의 血漿에서 血少板의 活性도를 보기 爲하여 微細血栓形成 및 adenosine diphosphate (ADP)에 對한 反應도를 觀察하고 또 이들 患者의 血漿에서 過酸化脂質 및 lysosomal enzyme를 測定하여 健康人의 것과 比較하였다.

2) 소의 腦底動脈, 토끼 大動脈 및 사람 臍帶動脈을

使用하여 ADP에 대한 血少板의 活性도를 증가시키는 方法을 考案하고 이 方法을 使用하여 sodium nitroprusside의 抗凝集效果 및 急性 腦卒中症에 있어서 治療의 應用價値를 檢討하고 考案하였다.

實驗 方法

이 실험은 1981년 6월부터 1982년 5월 사이에 行하였다. 健康人의 血液은 釜山大學校 醫科大學 在學生中 aspirin 등 抗炎症藥物을 최근 1~2週間에 服用하지 않은 學生으로부터 얻었고 腦卒中症 患者의 血液은 醫科大學附屬病院 및 釜山市內 鎭례병원 응급실에 腦卒中症으로 來院한 환자로부터 다른 藥物을 處置하기 前에 우선 採血하고 微細血栓形成과 ADP에 對한 反應도를 조사하고 그후 臨床經過와 檢査소견에 의하여 腦卒中症이 아니라고 진단된 경우에는 이 成績에서 除外하였다.

1) 微細血栓形成에 對한 實驗

Mehta 및 Mehta²³⁾의 方法에 따라 血漿內의 微細血栓의 形成에 대한 實驗을 하였다.

EDTA-formalin 완충액 또는 EDTA 완충액 (pH 7.4)이 들어 있는 polypropylene 시험관에 각각 citrate 함유혈액을 0.5 ml씩 넣고 200×g로 10분간 원심 침전하였다. 그후 上層部の 血少板數를 位像差 顯微鏡下에서 헤아리고, 微細血栓指數(microthrombus index, MTI)를 다음과 같이 계산하였다.

$$MTI = \frac{\text{EDTA-formalin 용액에서의 血少板數}}{\text{EDTA 용액에서의 血少板數}}$$

이때 血少板凝集이 있을 경우에는 EDTA-formalin 완충액에 의해 固定되고 원심분리로 침전되어 MTI는 1.0이하로 되며 응집이 없을 경우는 1에 가깝게 된다.

2) 血清化學測定

사람 혈장에서 過酸化脂質의 定量은 thiobarbituric acid 螢光法^{24,25)}을 사용하였고 血漿中 cathepsin D는 Anson²⁶⁾의 方法에 따라 行하였다.

3) 動脈切片이 血少板凝集에 미치는 效果

健康人의 前肘皮靜脈을 通하여 3.8% sodium citrate 함유 혈액을 채취하고 이를 200×g로 10분간 원심분리시켜서 platelet-rich plasma (PRP)를 求하여 3시간이 內에 실험에 사용하였다. 이때 血少板의 數는 約 250,000/mm³이 되게 tris 완충액으로 조절하였다.

소의 腦底動脈, 토끼 大動脈 및 사람 臍帶動脈 切片

을 physiological salt solution(PSS)이 든 wax block에서 20~25 mg 무게로 절편을 만든 다음 37°C의 PSS에서 60분간 침수시켰다. 洪 등²⁷⁾이 행한 방법에 따라 100 μM sodium arachidonate(AA) 및 1 μM ADP가 동시에 함유된 tris 완충액에 PRP를 넣고 일어나는 응집반응에 대하여 動脈切片的 효과를 관찰하였다. 凝集反應은 AA 및 ADP를 투여하고 2분에 中斷하였다.

$$\text{凝集反應率(\%)} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

A: AA 및 ADP가 포함된 경우의 血少板의 數

B: AA와 ADP가 포함되지 않았을 경우의 血少板의 數

K⁺-free PSS는 PSS에서 KCl를 제외시킨 것이고, tris PSS는 PSS에서 NaHCO₃, NaH₂PO₄ 및 MgSO₄ 대신에 同 mmol의 tris로 대체하여 사용한 것이다.

4) 試藥 및 統計處理

이 實驗에 使用된 藥物들은 sodium arachidonate(AA; Sigma), 13-hydroperoxylinoleic acid (13-HPLA; Wellcome Research Lab.), sodium nitroprusside (SNP; Sigma), hydralazine HCl (Sigma), diazoxide B.P. (Allen & Hanburys LTD), dipyridamole(Boehringer Ingelheim), indomethacin(Sigma), ouabain (Sigma), cadmium acetate (Cd; Hayashi Chemical Co.), prostacyclin (PGI₂; Upjohn) 그리고 dibutyryl cyclic AMP(cAMP) 및 8-bromo-cyclic GMP (cGMP; Sigma) 등이다.

모든 測定値는 Mean±S.E.M.으로 나타내었고 各群 사이의 측정치는 paired 및 unpaired t-test로 통계처리하였고 p value가 0.05以下인 것을 有意하다고 하였다.

實驗成績

1) 腦卒中症 患者의 微細血栓形成

그림 1에서 보는 바와 같이 健康한 學生 53명에 대한 微細血栓指數는 0.92±0.02로서 1에 가까우나 腦血栓이나 腦出血등의 腦卒中症 患者에서는 0.81±0.01로서 健康인에 比하여 有意한 減少(p<0.001)를 나타내었다.

이들을 腦血栓症群과 腦出血症群으로 나누어서 比較하면 前者에 있어서는 0.79±0.02로서 대조군에 比하여 有意한 減少를 보였으나 後者に 있어서는 0.82±0.02로서 減少를 보이고는 있으나 통계학적 有意성은 없

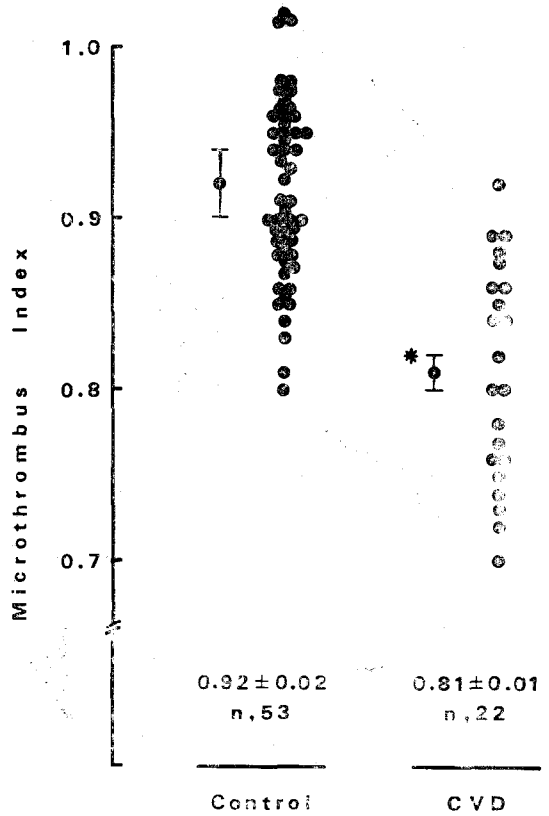


Fig. 1. Circulating microthrombus index in the healthy volunteers (Control) and the patients with cerebrovascular disease (CVD). n means the number of experiments. Asterisk (*, p<0.001) denotes the significant difference between two groups.

었다.

2) 過酸化脂質 및 Cathepsin D의 변동

健康人과 腦卒中症 患者의 血漿內 cathepsin D 및 過酸化脂質量을 比較하였을 때 그 성적은 그림 2에서 보는 바와 같다.

건강인 血漿에서 cathepsin D는 3.10±0.35 unit 이고 腦卒中症患者에 있어서는 4.34±0.36 unit 로서 後者에서 上昇되어 있었고(p<0.001), 過酸化脂質量은 健康人에서는 2.28±0.13 nmol MDA/ml 이고 腦卒中症 患者에서는 4.68±0.49 nmol MDA/ml 로서 後者에서 현저히 增加되어 있었다.

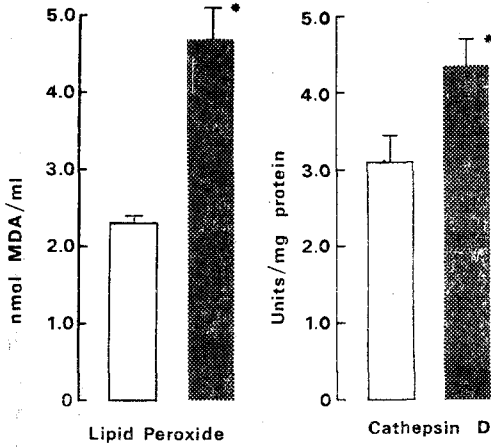


Fig. 2. Lipid peroxide and cathepsin D in the plasma obtained from control (open bars) and the patient with CVD (dotted bars). Plasma cathepsin D activity is expressed in units (mM tyrosine $\times 10^{-2}$ /mg protein). Asterisk (*, $p < 0.001$) denotes the significant difference between two groups.

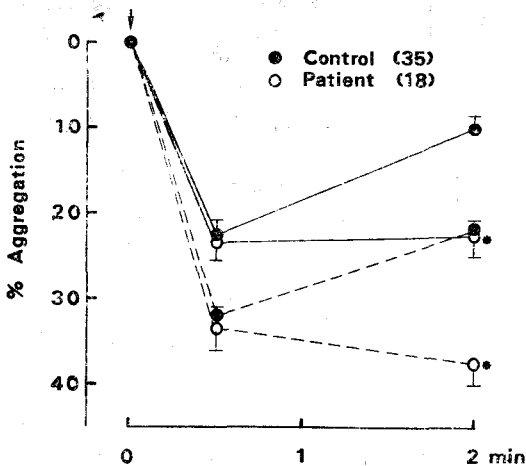


Fig. 3. Responses of the platelets of plasma from healthy volunteers (Control) and the patients with cerebrovascular disease (Patient) to 1 μ M (—) and 2 μ M (---) adenosine diphosphate. Asterisks (*, $p < 0.001$), the responses of platelets from patients differ significantly from those obtained from control.

3) 血少板의 凝集反應度

腦卒中症 患者血液에서 PRP 를 얻어서 시험관내에 incubate 하고 1 및 2 μ M ADP 첨가에 의한 血少板凝

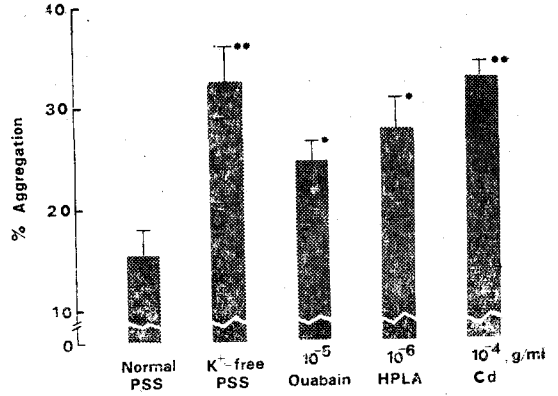


Fig. 4. Effects on the platelet aggregation of the bovine basilar arterial strips, which were incubated in the different conditions as shown above. Asterisks (*, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$) represent the significant differences from the levels from normal PSS group.

集을 30 秒 및 2분간 관찰하여 1次 및 2次反應으로 구분하였다. 그림 3에서 보는 바와 같이 健康人 血少板을 1 μ M ADP 에 폭로시켰을 때 凝集反應率은 22.8 \pm 1.2% (1次 反應) 및 9.9 \pm 1.1% (2次 反應)을 나타내었고, 2 μ M ADP 에 의하여는 38.0 \pm 1.4% 및 22.0 \pm 1.3%를 나타냄으로써 ADP 에 대한 凝集反應率이 2次 反應에서 減少되었다.

腦卒中症患者의 血少板은 1 μ M ADP 에 대하여 23.0 \pm 2.3% (1次 反應)와 22.5 \pm 2.6% (2次 反應), 2 μ M ADP 에 대하여는 33.5 \pm 2.6% 및 37.4 \pm 3.9%의 凝集率을 나타내었다. 卽 1次 反應에서는 腦卒中症 患者에서나 健康人에 있어서 큰 차이를 보이지 아니하나 2次 反應에 있어서는 健康인의 血少板에서는 1次 反應에 比하여 오히려 凝集反轉(disaggregation)이 일어났고 腦卒中症患者에서는 凝集이 오히려 強化되었다.

4) 動脈血管의 向凝集效果

動脈血管切片을 使用하여 各種藥物의 抗凝集效果를 觀察하는 方法을 檢索하였다. 이는 Hong 등²⁷⁾의 方法에 따라 動脈切片을 PSS 에 침수시킨 것과 K⁺-free PSS 또는 PSS 에 ouabain, 13-HPLA 또는 tris PSS 에 Cd 이 함유된 용액 속에 침수시킨 후 이를 tris 완충액에 씻고나서 이들 혈관이 血少板凝集의 2次反應에 미치는 影響을 관찰하였다(그림 4 및 표 1).

PSS 에 處理한 소의 腦底動脈片에 의한 凝集率은 15.5 \pm 2.5%로 나타났었다. 이들 切片을 K⁺-free PSS

Table 1. Comparison of the effects of arterial strips on the platelet aggregation

Aorta ring incubated in	% Aggregation (Mean±S.E.M.)		
	Bovine basilar artery (n)	Rabbit aorta (n)	Human umbilical artery (n)
PSS	15.5±2.5(6)	14.5±2.8(10)	23.4±4.0(19)
K ⁺ -free PSS	32.6±2.3(12) ^b	41.2±3.2(9) ^b	47.1±3.0(19) ^a
10 ⁻⁶ g/ml 13-HPLA	27.6±3.1(7) ^a	40.8±3.0(6) ^b	—
10 ⁻⁵ g/ml Ouabain	24.6±1.9(7) ^a	—	36.2±3.6(12) ^a
10 ⁻⁴ g/ml Cadmium (in tris-PSS)	32.6±1.4(7) ^b	39.9±2.4(6) ^b	—

1. Incubation for two minutes of arterial strips with 100 μM sodium arachidonate and 1 μM ADP in respective conditions.
2. n in parentheses means the number of experiments.
3. a (p<0.01) and b (p<0.001) represent the significant difference compared with the data from PSS group.
4. Tris-PSS; see the text.

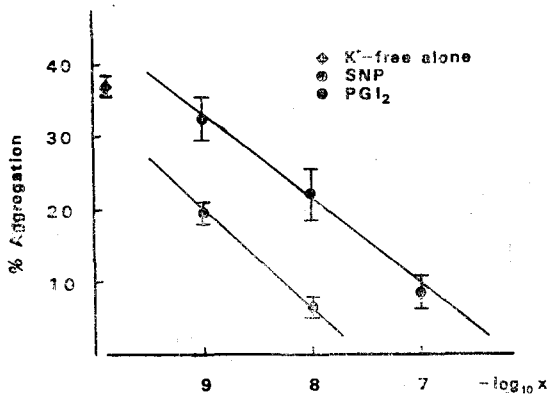


Fig. 5. Comparison of the antiaggregating effect of sodium nitroprusside (SNP) with that of prostacyclin.

에 처리하였을 때는 32.6±2.3%로 혈소판응집이 현저히 항진되었고 (p<0.01), 10⁻⁵g/ml ouabain에 의하여는 24.6±1.9%, 10⁻⁶g/ml 13-HPLA 및 10⁻⁴g/ml Cd이 함유된 PSS에 처리된 동맥편은 각각 27.6±3.1% (p<0.01) 및 32.6±1.4% (p<0.001)로서 응집율이 모두 증가되어 있었다.

이 실험성적으로 보아各種藥物的抗凝集效果를觀察하기 위하여는 K⁺-free PSS에 腦血管을處置하는 것이 가장 적합한 실험 model임을 알 수 있었다.

5) 各種藥物的抗凝集效果

(1) Sodium nitroprusside의 효과

K⁺-free PSS로 처리된 소의 腦底動脈의 向凝集效果를 基準으로 하고 sodium nitroprusside(SNP)를 含

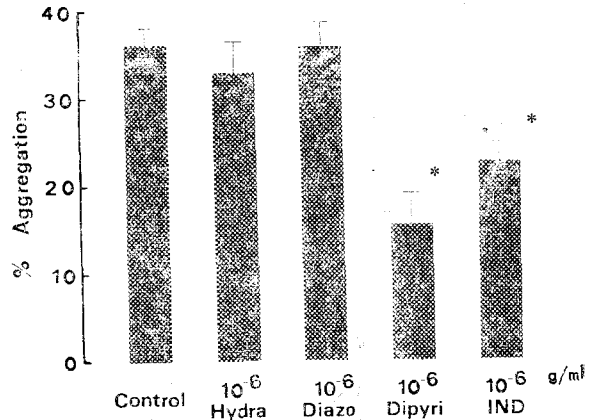


Fig. 6. Effects of vasodilators Hydra, hydralazine; Diazolazine, diazoxide; Dipyridamol and IND, indomethacin on the platelet aggregation induced by bovine basilar arteries, which were incubated in K⁺-free PSS (Control). Asterisk (*, p<0.001), significantly different from control.

有시킨 K⁺-free PSS溶液에 腦底動脈을 處置하고 이때 血少板凝集에 미치는 效果를 比較하였다(그림 5).

이 실험에서 K⁺-free PSS에 處置된 腦底動脈의 向凝集效果는 36.5±1.4%였다. SNP를 10⁻⁶g/ml을 첨가하여 처리하였을 때는 32.6±3.3%로서 현저한 차이가 없었으나, 10⁻⁸ 및 10⁻⁷g/ml SNP를 첨가 처리한 경우는 22.7±3.8% (p<0.005)와 8.7±2.0% (p<0.001)로서 대조군에 比較하여 有意하게 凝集率이 감소되었을 뿐 아니라 用量에 依存하여 현저한 抑制效果를 나타내었고, 이성적들의 直線回歸線을 구하였을 때 상관계수는 r=1.0 (p<0.01)이었다.

SNP의 이와같은 抗凝集效果를 PGI₂와 比較하였을 때 10⁻⁹ 및 10⁻⁸g/ml PGI₂에 의하여 曲線은 현저히 좌 軸으로 平行 移動하였고 PGI₂ 10⁻⁹g/ml 농도의 效과는 SNP 1.38×10⁻⁸g/ml의 效과에 해당하였다.

(2) 血管擴張藥物의 效果

SNP 대신에 다른 몇몇 血管擴張藥物을 使用하여 抗凝集效果를 比較하였다(그림 6).

Hydralazine 및 diazoxide 를 처치하였을 때는 抗凝集效果를 일으키지 아니하였고 10⁻⁶g/ml dipyridamole 을 처치시는 15.7±3.5% (p<0.001)로 抗凝集效果를 나타내었고 이는 indomethacin 10⁻⁶g/ml의 效과에 比하여 더욱 强하였다.

6) Sodium nitroprusside 의 作用機轉

(1) Cyclic AMP 및 Cyclic GMP 의 效果

이 실험에서는 SNP의 作用機轉을 규명하는 方法의 一環으로서 SNP가 조직내 cyclic GMP를 증가시킨다는 점²³⁾에서 8-bromocyclic GMP의 作用을 관찰하면서 dibutyryl cyclic AMP의 作用과 比較하였다(그림 7A).

이 實驗에서는 血管切片을 첨가하지 않고 血少板의 凝集反應度에서 시행한 方法과 유사한 方法을 使用하였다.

일정농도의 cyclic AMP나 cyclic GMP가 함유된 tris 완충액에 PRP를 가하여 incubate 한후 10 μM AA 및 1 μM ADP 첨가에 의한 凝集反應을 2분에 中止시켜 이들의 血少板凝集率에 미치는 效果를 觀察하였다.

對照群에서는 40.8±1.2% (n=7)의 凝集率을 나타내었고 10⁻⁴g/ml cyclic AMP를 加하면 21.7±3.3% (p<0.001)로 억제되었다.

Cyclic GMP의 效과는 10⁻⁷, 10⁻⁶ 및 10⁻⁵g/ml을 添加時 응집율은 32.8±2.6, 26.2±1.9 및 18.3±0.6%로 濃度 증가에 따라 현저히 억제되었고 直線回歸線 (Y=-17.7-7.25X)上的 相關係數는 r=1.0으로 나타났다. 그리고 10⁻⁴g/ml cyclic AMP의 응집 억제效과와 比較하면 이때의 效과는 cyclic GMP 농도 3.63×10⁻⁶g/ml에 해당되었다.

(2) Methylene blue 및 Hemoglobin 의 效과

Nitrogen oxide(NO)基의 生化學的 拮抗藥物인 hemoglobin과 methylene blue를 使用하여 SNP에 의한

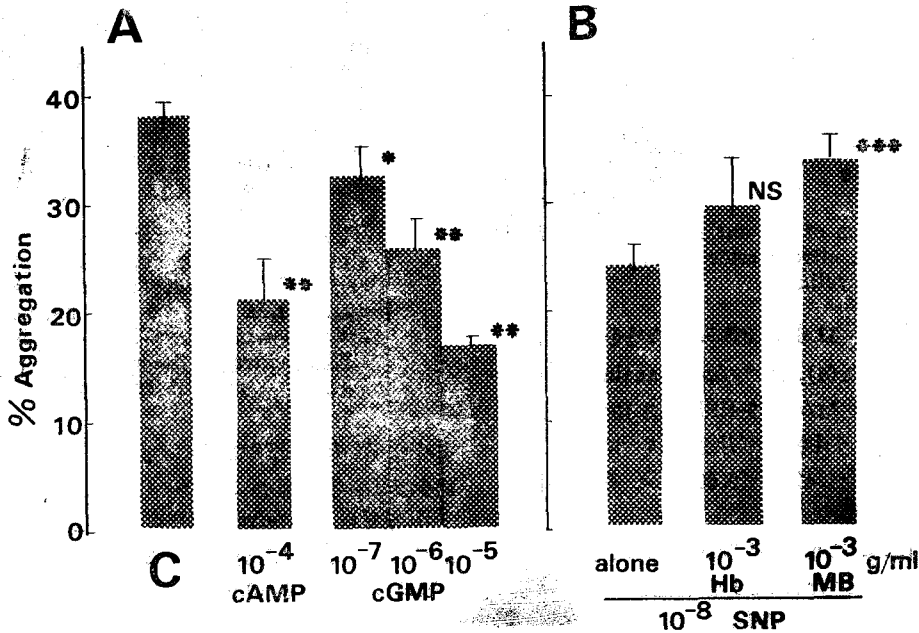


Fig. 7. A: Comparison of antiaggregating effects of dibutyryl cyclic AMP and 8-bromo cyclic GMP. C means control percent aggregation induced by arachidonic acid and ADP without blood vessels. B: Antagonizing effects of bovine hemoglobin and methylene blue on the antiaggregating effect of sodium nitroprusside alone. Asterisks *(p<0.05), ** (p<0.001) significantly different from control (C); *** (p<0.05) represents the significant difference from the level obtained by 10⁻⁸ g/ml sodium nitroprusside alone.

응집억제효과가拮抗되는지의 여부를 관찰하였다.

SNP 10^{-8} g/ml과 PRP가 함유된 tris 완충액에 hemoglobin 또는 methylene blue를加하고 5분후에 AA 및 ADP를 첨가하여 血少板응집물을 관찰하였다(그림 7 B).

SNP를加하지 아니한 對照群에서는 $42.0 \pm 1.3\%$ 의 응집물이 나타났고 이는 10^{-8} g/ml SNP 첨가에 의하여 $23.9 \pm 2.5\%$ 로 억제되었다.

Bovine hemoglobin 10^{-3} g/ml을 같이 處置하였을 때는拮抗효과가 없었으나 10^{-3} g/ml methylene blue를 처치한 경우는 $33.8 \pm 2.3\%$ 로 증가되었고, 이는 대조군치에는 도달하지 못하나 SNP 단독첨가군과 比較하면 현저히拮抗효과($p < 0.05$)를 나타내었다.

考 案

1979年度 國內 10大 死因中 腦血管疾患(cerebrovascular disease; CVD)이 總死亡者의 14.8%, 當年 日本統計는 23.1%로서 兩國 모두 首位를 차지하고 있다. 1976年度 美國統計는 CVD가 9.9%로서 虛血心臟疾患이나 惡性腫瘍 다음이었다. 國內 CVD에 관한 資料를 病理學的으로 分類한 것을 보면 腦出血症이 44.3%, 腦血栓症이 32.7% 그리고 蜘蛛膜下出血과 腦梗塞症의 順位이었다.^{1,2,4-6}

腦卒中症患者에서는 正常人에 比하여 高血壓 및 高脂血을 나타내는 頻도가 훨씬 높다고 하는 점은 大部分學者들^{2,6,28}이 共通된 見解를 가지고 있으나 腦出血症과 같은 腦卒中症의 病理學的 機轉에 對하여는 多少 例外的인 見解도 있다.

Ooneda 등²⁹, 그리고 Ooneda 및 Yoshida³⁰ 등이 報告한 바에 의하면 歐州나 美國人과는 달리 日本人에게 흔한 腦出血은 粥狀動脈硬化症이 아닌 腦動脈壞死에 基因하고 腦出血은 cholesterol이나 lard를 많이 供給하던 많이 줄어진다고 하였다. Tanaka 등³¹도 日本人에서 일어나는 腦出血은 血清 cholesterol과 逆關係가 있음을 強調한 점으로 보아 東洋人에서 腦血管疾患의 機轉이 粥狀硬化症에 基因하는 西洋人의 것과는 다른 點이 있음을 暗示하나 實際 韓國人에 있어서 腦血管疾患에 對한 특징은 아직 報告된 바가 없다.

血中 cholesterol 및 triglyceride가 血管壁의 代謝에 變動을 招來한다는 點에서 이들 物質 뿐아니라³²⁻³⁴ 過酸化脂質³⁵의 重要性을 無視할 수 없다.

이 實驗에서는 腦卒中症으로 入院한 直後에 患者의

血漿내 微細血栓形成이 健康人에 比하여 현저히 增加되고, 또 이들 患者의 血清에서 過酸化脂質이 有意하게 높았다는 點과 血少板의 活性度에 있어서 건강인과는 달리 2次反應에서 凝集反轉(disaggregation)이 消失하고 非可逆的으로 凝集亢進이 나타났다는 것은 이들 結果가 서로 附隨되어 腦卒中症發生에 重要한 誘發要因이 된 것이 아닌가 생각된다.

糖尿病患者에서 血少板凝集의 증가가 microangiopathy의 病因³⁶이 됨은 물론 急性心筋梗塞症 또는 急性末梢動脈不全症^{23,37}때도 循環血液中 凝集形成이 증가한다고 한 점들로 보아 이 실험의 結果는 腦血管疾患의 重要한 因子임을 示唆하고 있다.

이에 對하여는 Moncada 등¹⁰, Moncada 및 Vane³⁸, Dembinska-Kieć 등¹⁸, Glyglewski¹⁹, Stuart 등³⁹의 血管損傷-血少板의 附着 및 凝集亢進-血少板 thromboxane A_2 生成 촉진 등의 一連의 現象과 高 cholesterol-高脂質血-過酸化脂質의 增加-prostacyclin 生成抑制 등의 一連의 現象이 서로 連結되어 血管疾患을 일으키는 重要한 因子라는 點에서 볼때 이 실험에서 얻은 여러 成績들은 腦卒中症에 나타나는 重要한 誘發因子들이라 할 수 있다. 이들 腦卒中症에 血漿에서 lysosomal enzyme 중 蛋白分解酵素인 cathepsin D가 증가된 것은 그 出處와 血管 組織內 lysosome 活性度를 豫測하기는 어렵지만 微細血液循環器의 內皮細胞損傷을 反映하거나^{40,41} 腦出血 또는 血栓과 같은 血流力學的 異常으로 惹起된 現象이 아닌가 추측되며 이에 對하여는 앞으로 더 追求할 價値가 있을 것으로 생각된다.

以上の 報告들을 綜合하여 PGI₂와 같은 抗血少板凝集 효과가 크고 平滑筋 弛緩作用을 가지고 있으며 藥用量 조절로 恒常 可逆的으로 復歸할 수 있는 sodium nitroprusside를 擇하였다. SNP는 應急性 高血壓 治療藥으로서⁴² 뿐만 아니라 頭蓋腔內 動脈瘤切斷術時 低血壓麻酔用으로⁴³, 또 蜘蛛膜下出血時 腦動脈경련으로 지연성 허혈성 神經性缺損을 治療할 目的으로⁴⁴ SNP를 使用한다는 報告가 있다. 이 실험에서는 SNP를 腦卒中症 특히 腦血栓症 應急時 使用 可能性을 고려하여 SNP의 抗凝集作用과 그 機轉을 檢討하였다.

最近에 Hong 등²⁷은 사람 臍帶動脈을 K^+ -free 영양액에 處置한 後 이를 arachidonic acid, ADP 및 platelet-rich plasma가 함유된 tris緩衝液에 添加하여 血少板凝集이 亢進되는 것과 臍帶動脈이 K^+ -free PSS에서 收縮反應을 惹起하는 現象은 血管筋 및 內皮細胞

의 Na^+ -pump의 억제와 관련되어 prostacyclin생합성 억제제로惹起된 結果라고 하였다. 이 實驗에서는 그 方法을 利用하여 in vitro로 소의 腦底動脈, 토끼 大動脈 및 사람 臍帶動脈을 K^+ -free PSS 등 各種 조건에 처치하고 이들 血管의 向凝集作用을 比較하였을 때 소의 腦底動脈은 다른 두 血管과 마찬가지로 K^+ -free PSS 또는 ouabain과 같은 Na^+ -pump를 억제하는 조건, prostacyclin생성억제 물질인 13-HPLA 또는 重金屬 Cd에 處置時⁴⁵⁾ 血少板凝集이 현저히 亢進되었다. 이중 K^+ -free PSS가 가장 강하게 作用하였고 다른 두 혈관과 比較할 때는 PSS에서 뿐 아니라 여러 조건에서도 두 혈관 보다는 비교적 낮은 向凝集率을 나타내었으나 그 原因에 대하여는 짐작하기가 어렵다.

K^+ -free PSS에 처치한 向凝集性腦底血管에 hydralazine이나 diazoxide를 前處置한 경우에는 抗凝集效果를 나타내지 아니하였다. Dipyridamole은 高농도에서 抗응집 效果를 나타내었고 SNP와 比較하면 월전 弱한 편이었다. SNP의 效果를 PGI_2 와 比較하면 1 ng/ml PGI_2 에 해당되는 SNP 양은 13.8 ng/ml일 정도였다.

最近에 Schultz 등²¹⁾, Kukovetz 등²²⁾ 및 Ignarro 등⁴⁶⁾은 nitrogen oxide가 함유된 末梢血管 擴張藥物인 glyceryl trinitrate, SNP 등이 血管이나 非血管平滑筋에서 guanylate cyclase 活性도를 증가시켜 cyclic GMP를 증가시킴으로써 筋弛緩을 惹起한다고 하였다. 또 이는 有機 nitrate나 SNP가 組織內에서 活性이 크고 不安靜한 中間物質 s-nitrosothiol을 形成하여 이것이 重要한 役割을 한다고 하였다.

또 Gruetter 등⁴⁷⁾은 소 冠狀動脈에서 관찰한 바에 의하면 SNP에 의한 cyclic GMP생성이 血管弛緩作用을 先行하며 methylene blue 處置로 兩作用이 消失되므로 SNP에 의한 弛緩作用은 cyclic GMP의 中介에 基因한다고 하였다.

이 實驗에서는 SNP의 血少板抗凝集效果가 cyclic GMP의 생성增加와 관련하여 直接的으로 cyclic GMP를 측정하지는 아니하였으나 Bohme 등⁴⁸⁾이 SNP에 의하여 平滑筋 뿐만 아니라 血少板에서도 cyclic GMP가 증가된다고 한 報告를 참고하여 脂質溶解도가 높고 細胞透透性이 良好한 8-bromo cyclic GMP를 加하였을 때 強力한 抗凝集效果를 보였고 dibutyryl cyclic AMP와 比較할때 월등히 強하였다는 點에서 SNP의 抗凝集效果는 血少板에서 cyclic GMP의 生成에 기인한 것이 아닌가 추측되나 이는 또 血管에서 PGI_2 의 生成과도 관련이 있는지를 確認해 볼 價値가 있다고 생각

된다.

SNP의 抗凝集效果는 nitrog oxide에 結合親和性이 높은 hemoglobin에 의하여는 抑制되지 않고 強力한 酸化劑인 methylene blue⁴⁷⁾를 PRP에 前處置한 경우는 拮抗되는 點으로 보아 血少板에도 血管에서와 같이 SNP에 특이적인 receptor가 反應하는 것으로 생각된다.

以上的 結果를 綜合하여 보면 腦卒中症때 특히 腦血栓症의 應急治療時 SNP 微量을 點滴하여 血壓을 조절하며 투여함으로써 病的 經過 및 豫後를 好轉시킬 수 있을 것으로 看做되며 앞으로 이에 對한 臨床研究가 기대되는 바이다.

要 約

韓國에서 頻發하는 腦卒中症 患者의 血漿에서 血栓形成에 관계되는 因子들을 조사하고, in vitro로 sodium nitroprusside의 血少板응집에 對한 作用을 觀察하여 腦卒中症 應急時 治療的應用의 可能性을 檢討하였다.

1) 腦卒中症 患者의 血漿內 微細血栓形成은 健康人에 比하여 有意하게 ($p < 0.001$) 높았다.

2) 腦卒中症 患者의 血漿內 過酸化脂質 및 cathepsin D值는 健康人에서 보다 현저히 증가되어 있었다.

3) 健康人의 血少板은 1 및 2 μM ADP에 對하여 2次反應에서는 凝集率이 減少된데 反하여 腦卒中症患者에서는 凝集率이 亢進되었다.

4) K^+ -free PSS, ouabain, 13-HPLA 및 Cd으로 前處置한 소 腦底動脈, 토끼 大動脈 및 사람 臍帶動脈은 血少板凝集率을 增加시켰다. 그중 K^+ -free에 處置한 것이 가장 強하게 作用하였다.

5) Sodium nitroprusside로 前處置하였을 때 K^+ -free PSS에 處置된 血管에 의한 向凝集反應은 用量에 依存하여 顯著히 抑制되었으며 hydralazine이나 diazoxide에 의하여는 아무런 作用을 받지 아니하였다.

6) Dibutyryl cyclic AMP 및 8-bromo cyclic GMP 모두 血少板凝集率을 감소시켰고, 後者는 前者에 比하여 越等히 顯著하였다. sodium nitroprusside에 의한 抗凝集率은 methylene blue 前處置에 의하여 拮抗되었으나, bovine hemoglobin 전처치에 의하여는 影響을 받지 아니하였다.

以上的 成績을 綜合하면 腦卒中症때, 특히 腦血栓症의 應急治療時 sodium nitroprusside의 應用이 可能하다고 思料되며, 이에 對하여 臨床的 治療가 기대되

는 바이다.

(이 논문을 완성함에 있어서 健康人 血漿을 제공하여 준 釜山醫大 在學生들에게 감사하며, 實驗을 完成하는데 적극적으로 도와 준 藥理學敎室 宋喆秀先生, 李正允君과 全建雄君에게 감사한다.)

REFERENCES

- 1) 李元熙, 金貞順: 우리나라에서 研究發表된 腦血管疾患에 關한 文獻考察. 韓國疫學會誌 3:1, 1981.
- 2) 徐錫助: 腦卒中症. 大韓內科學會誌 6:45, 1953.
- 3) Stallone, R.A.: *Epidemiology of cerebrovascular disease. Rev. J. Chronic Dis. 18:859, 1965.*
- 4) 金大河: 腦卒中症에 對한 臨床的 考察. 大韓內科學會誌 14:607, 1971.
- 5) 盧英茂: 腦卒中의 臨床的 研究. 大韓內科學會誌 14:1, 1971.
- 6) 李相庸: 腦卒中症에서의 血清脂質에 關한 研究. 순환기 5:33, 1975.
- 7) Dustan, H.P.: *Vascular diseases of hypertension: Mechanisms, recognition, and control. In Atherosclerosis Rev., Vol. 2, pp. 1-25, edited by R.Paoletti and A.M. Gotto, Jr., Raven Press, New York, 1977.*
- 8) Hamberg, M., Svensson, J. and Samuelsson, B.: *Prostaglandin endoperoxides: A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 71:9824, 1974.*
- 9) Bunting, S., Moncada, S. and Vane, J.R.: *The effects of prostaglandin endoperoxides and thromboxane A_2 on strips of rabbit coeliac artery and certain other smooth muscle preparations. Br. J. Pharmacol. 57:461 p, 1976.*
- 10) Moncada, S., Needleman, P., Bunting, S. and Vane, J.R.: *Prostaglandin endoperoxide and thromboxane generating system and their selective inhibition. Prostaglandins 12:323, 1976.*
- 11) Bunting, S., Gryglewski, R.J., Moncada, S. and Vane, J.R.: *Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. Prostaglandins 12:897, 1976.*
- 12) Moncada, S., Gryglewski, R.J., Bunting, S. and Vane, J.R.: *A lipid peroxide inhibits the enzyme in blood vessel microsomes that generates from prostaglandin endoperoxides the substance (prostaglandin X) which prevents platelet aggregation. Prostaglandins 12:715, 1976.*
- 13) Ross, R. and Glomset, J.A.: *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. Science 180:1332, 1973.*
- 14) Ross, R. and Glomset, J.A.: *The pathogenesis of atherosclerosis. New Engl. J. Med. 295:369, 1976.*
- 15) More, S.: *Thromboatherosclerosis in normolipemic rabbits: A result of continued endothelial damage. Lab. Invest. 29:498, 1973.*
- 16) Friedman, R.J., Moore, S. and Singal, D.P.: *Repeated endothelial injury and induction of atherosclerosis in normolipemic rabbits by human serum. Lab. Invest. 32:404, 1975.*
- 17) Moncada, S., Gryglewski, R.J., Bunting, S. and Vane, J.R.: *Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. Thrombosis Res. 11:323, 1977.*
- 18) Dembinska-Kieć, A., Rucker, W. and Schönhofer, P.: *Atherosclerosis decreased prostacyclin formation in rabbit lungs and kidneys. Prostaglandins 17:831, 1979.*
- 19) Gryglewski, R.J.: *Prostacyclin and atherosclerosis. TIPS 1:164, 1980.*
- 20) Schultz, K.D., Schultz, K. and Schultz, G.: *Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. Nature (London) 265:750, 1977.*
- 21) Schultz, K.D., Bohme, E., Kreye, V.A.W. and Schultz, G.: *Relaxation of hormonally stimulated smooth muscular tissues by the 8-bromo derivatives of cyclic GMP. Naunyn-Schmiedeberg's*

- Arch Pharmacol.* 306:1, 1979.
- 22) Kukovetz, W.R., Holzman, S., Wurm, A. and Poch, G.: *Evidence for cyclic GMP-mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary smooth muscle.* *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 310:129, 1979.
- 23) Mehta, J. and Mehta, P.: *Platelet function studies in heart disease. VI. Enhanced platelet aggregate formation activity in congestive heart failure: Inhibition by sodium nitroprusside.* *Circulation* 60:497, 1979.
- 24) 호국환: *Thiobarbituric acid 螢光法による血漿または血清中の過酸化脂質定量法, 비타민* 49:408 1975.
- 25) 大石誠子: *過酸化脂質 測定法, 最新醫學* 33:660, 1978.
- 26) Anson, M.L.: *Estimation of cathepsin with hemoglobin and partial purification of cathepsin.* *J. Gen. Physiol.* 20:656, 1936.
- 27) Hong K.W., Lee, W.S., Rhim, B.Y., et al.: *Evidence for coupling of Na⁺-pump inhibition with contractile response and enhancement of platelet aggregation.* 8th IUPHAR Congress (Abstract) Tokyo Japan, 1981.
- 28) 劉世和, 李迎雨, 李聖浩: *正常韓國人 및 循環器疾患에서의 血清 過酸化脂質에 관한 研究.* *서울醫大學術誌* 22:513, 1981.
- 29) Ooneda, G. and Yoshida, Y.: *Atherosclerosis in Japan: Pathology.* In *Atherosclerosis Rev. Vol. 2. pp. 292-292*, edited by R. Paoletti and A.M. Gotto, Jr., Raven Press, New York, 1977.
- 30) Ooneda, G., Yoshida, Y., Suzuki, K., and Sekiguchi, T.: *Morphogenesis of plasmatic arterionecrosis as the cause of hypertensive intracerebral hemorrhage.* *Virchows Arch. (Pathol. Anat.)* 361:31, 1973.
- 31) Tanaka, H., Ueda, Y., Hayashi, M., et al.: *Risk factors for cerebral hemorrhage and cerebral infarction in a Japanese rural community.* *Stroke* 13:62, 1982.
- 32) McGandy, R.B., Hegsted, D.M. and Stare, F.J.: *Dietary fats, carbohydrates and atherosclerotic vascular disease.* *New Engl. J. Med.* 277:242, 1967.
- 33) Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C., et al.: *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease.* *Am. J. Med.* 62:707, 1977.
- 34) Tremoli, E., Folco, G., Agradi, E., et al.: *Platelet thromboxanes and serum cholesterol.* *Lancet* 1:107, 1979.
- 35) Glavind, J., Hartman, S., Clemunessen, J., et al.: *Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta.* *Acta Pathol. Microb. Scand.*, 30:1, 1952.
- 36) Segel, J., Colwell, J.A., Crook, L., et al.: *Increased platelet aggregation in early diabetes mellitus.* *Ann. Int. Med.* 82:733, 1975.
- 37) Wu, K.K. and Hoak, J.C.: *A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency.* *Lancet* 1:924, 1974.
- 38) Moncada, S. and Vane, J.R.: *Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls.* *New Engl. J. Med.* 300:1142, 1979.
- 39) Stuart, M.J., Gerradr, J.M. and White, J.G.: *Effect of cholesterol on production of thromboxane B₂ by platelets in vitro.* *New Engl. J. Med.* 302:5, 1980.
- 40) Wolinsky, H., Goldfischer, S., Schiller, B. and Kasak, L.E.: *Lysosomes in aortic smooth muscle cells.* *Am. J. Pathol.* 73:727, 1973.
- 41) Wolinsky, H. and Fowler, S.: *Participation of lysosomes in atherosclerosis.* *New Engl. J. Med.* 299:1173, 1978.
- 42) Blaschke, T.F. and Melmon, K.L.: *Antihypertensive agents and the drug therapy of hypertension.* In *The pharmacological basis of therapeutics. 6th Ed. pp. 793-818*, edited by Gilman, A.G., Goodman, L.S. and Gilman, A., Macmillan New York, 1980.
- 43) Taylor, T.H., Styles, M. and Lamming, A.J.: *Sodium nitroprusside as a hypotensive agent in general anesthesia.* *Br. J. Anesth* 42:859,

1970.

- 44) Allen, G.S.: *Cerebral arterial spasm: Part 8: The treatment of delayed cerebral arterial spasm in human beings. Surg. Neurol.*, 6:71, 1976.
- 45) Hong, K.W., Lee, W.S., Rhim, B.Y., et al.: *Enhanced platelet aggregate formation by cadmium poisoning. 8th IUPHAR Congress (Abstract), Tokyo Japan, 1981.*
- 46) Ignarro, L.J., Lippton, H., Edwards, J.C., et al.: *Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. J. Pharmacol. Exp. Ther* 218:739,

1981.

- 47) Gruetter, C.A., Gruetter, D.Y., Lyon, J.E., et al.: *Relationship between cyclic guanosine 3'.5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effect of methylene blue and methemoglobin. J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 181, 1981.
- 48) Bohme, E., Graf, H. and Schultz, G.: *Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9:131, 1978.