

허혈 재관류 손상 실험의 쥐 생체 모델 작성

이원진* · 박희철* · 홍기우*

=Abstract=

Preparation of in Vivo Rat Lung Model for Ischemia-Reperfusion Injury

Won Jin Lee, M.D.*, Hee Chul Park, M.D.*, and Ki Woo Hong, M.D.*

Ischemia reperfusion injury occurs in various diseases. The role of oxygen free radicals in IR injury of the lung has been spotlighted and many studies have been performed.

In this study, we tried to prepare a stable rat lung model for IR injury, focusing on surrounding conditions as hilar stripped left lung, clamped left pulmonary artery and bronchus, and declamped after determined period was passed, and right main pulmonary artery was clamped. Arterial blood gas analyses were performed at 1, 10, 20, 30, minutes after reperfusion.

Before clamping, PaO₂ was 95 to 120 mmHg in all animals.

There were six groups; Group I: temperature 15°C, and 120 minutes clamping, Group II: 20°C, and 120 minutes clamping, Group III: 25°C, and 120 minutes clamping, Group IV: 15°C, 90 minutes clamping, Group V: 20°C, 90 minutes clamping, Group VI: 20°C, 75 minutes clamping. Each groups contained 10 Sprague Dayley rats. The humidity was maintained 100% as circulation imerged isotonic Hartmann's solution of the pleural cavity.

In group IV, V, and VI, PaO₂ decreased significantly in all animals immediately after reperfusion, but 43% survived till 10 minutes after reperfusion, it was 74.0 ± 5.7 , 73.3 ± 10.8 , and 88.2 ± 17.7 mmHg.

Pulmonary edema was observed histologically in 2/10 animals in group IV, 6/10 in group V, 3/10 in group VI, 9/10 in group I, and the other lungs showed all edema.

We established a stable model by setting ischemic time, and temperature, between 75 to 90 minutes, 15 to 20°C, and isothermperature Hartmann's solution immersion of the pleural cavity.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 28: 963-6)

Key words : 1. reperfusion injury
2. Disease model, animal

서론

허혈-재관류에 의한 손상은 여러가지 질환에 의해 일어날 수 있다. 근육, 간, 심장, 신장, 소장 폐 등과 같은 여러

장기에 대한 허혈-재관류의 기전과 치료에 대해서는 여러 기관에서 실험적으로 연구되어 왔다¹⁻⁶⁾. 허혈-재관류의 손상은 아직까지 정확한 기전이 밝혀져 있지 않으나 재관류 시 공급되는 산소에서의 자유유리기의 발생, 세포에서의

* 한림대학교 의과대학 흉부외과학교실

* Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Hallym University

† 본 논문은 한림대학교의료원 실험연구비 지원에 의해 이루어졌음.

논문접수일: 1995년 6월 26일 논문통과일: 1995년 8월 11일

통신저자: 이원진, (150-071) 서울 영등포구 대림 1동 948-1, Tel. (02) 833-3781 Fax. (02) 849-4469

칼슘 역류, 백혈구의 작용, Arachidonic acid의 작용 등에 대해 일어난다고 보고있으며 세계적으로 연구되고 있는 실정이다.

허혈 재관류 손상의 판단의 기준으로는 조직학적으로 미세혈관의손상에 의한 간질의 부종, 반응성 대사산물의 억제제의 투여로 산소 유래 자유기의 역할을 억제하는 물질 (superoxide dismutase, catalase, mannitol, allopurinol 및 dimethylsulfoxide 등)의 투여로 보호 작용을 밝히는 방법, 세포내 칼슘의 농도 측정, 기타 작용하는 약제의 투여로 재관류 장기의 보호효과를 추정하는 방법으로 혈관 저항의 측정, 조직학적 검사 등이 있다⁷⁻¹¹⁾. 폐에서는 폐의 재관류 전후의 저항을 보는 것과 산소 교환을 동맥혈의 산소 분압 측정, 동위 원소를 이용한 방법 등으로 허혈 재관류 손상의 지표로 하였다^{2,3,6,8,9)}.

본인들은 다양한 조건중 온도, 습도, 시간 등을 일부 정하여 허혈-재관류에 의한 조직의 손상을 연구하는데 기본이 되는 모델을 쥐를 이용해서 만들어 보고자 본 실험을 하였다.

재료 및 방법

실험에 쓰이는 동물은 Sprague Dayley 쥐로 생후 2~3개월되는 170~230 gm의 쥐를 대상으로하였다. 쥐는 한림대학교 동물 실험실에서 계대 배양한 것으로 이동후 약 2주간의 사육 후 실험에 사용되었다.

쥐는 복강내 Pentobarbital sodium 을 체중 kg 당 25mg을 주사하고 근육에 0.01 mg의 atropine sulfate와 0.1 mg의 pancuronium bromide를 주사하였다. 17 gauge의 plastic 바늘을 기도에 넣어 고정된 후 본인이 제작한 인공 호흡기로 대기를 이용하여 분당 60~80회의 호흡수로 일회 호흡량 2~3ml 로하여 호흡을 유지하였다. 수술은 Zeiss Quadrascope를 이용하여 5배율하에 시행하였다.

마취된 쥐는 양와위로하고 사지를 바늘로 고정된 후 하경부에 횡절개를 넣어 우경동맥을 노출 시킨 후 23 gauge의 plastic 바늘을 넣고 Siemens SIRACUST 401 MONITOR를 이용하여 동맥압을 측정하고 혈액 채취용으로 사용하였다. 흉부 절개는 흉골의 제 4 늑간과 연결되는 부위로 횡절개하고 이를 상하로 견인한 후 폐 및 심장을 노출시켰다. 좌측 폐문부를 박리하여 기관지 동맥, 신경, 그리고 주변조직들을 제거하였다. 양측 늑막강에는 먼저 각군의 조건과 온도를 갖춘 Hartmann's 용액을 분당 20~50cc로 흘러 흉강내의 온도를 조건에 맞게 유지하였다. Heparine 을 체중 1kg 당 2mg 을 주사한 후 우경동맥을 통해

혈액을 채취하였다. 좌폐동맥, 좌주기관지, 우폐정맥을 박리한 후 좌측 폐를 손으로 눌러 허탈시킨 후 좌폐동맥과 좌기관지를 clamp로 차단하였다. 각군에서 정한 일정한 시간이 지난 후 좌폐동정맥과 좌주기관지의 차단을 해소하고 우폐동맥을 차단한 후 1분, 10분, 20분 그리고 30분에 혈액을 경동맥으로부터 채취하여 동맥혈 가스분석을 하였다.

실험쥐는 각 조건에 따라 6군으로 나누었다. 각군은 10마리씩으로하고 도중 사망한 것은 조직 검사를 하여 폐부종 여부를 확인하였다.

I군은 15도에 120분간의 폐동맥 차단, II군은 20도의 120분 차단, III군은 25도의 120분 차단, IV군은 15도의 90분 차단, V군은 20도의 90분 차단, VI군은 20도의 75분 차단군으로 하였다.

실험을 하고 난 후 쥐는 희생 시켜 폐를 절제한 후 일부는 조직검사를 위한 피검물로 하였다.

각 검사치는 평균 ± 표준편차로 표시하고 각군의 비교는 Student's test를 하고 p치는 0.05이하를 유의한 것으로 하였다.

결 과

1) 동맥혈의 산소분압

각군의 폐동맥 차단 전의 산소 분압은 95에서 120mmHg (105.1 ± 18.0)으로 특별한 변화는 없었다. Group I은 120분 차단에 15도의 낮은 온도를 유지한 군으로 재관류 1, 10, 20, 30분에 각각 67.0 ± 41, 59.3 ± 33.4(6마리), 84(1마리), 70(1마리)mmHg였다. Group II는 20도에서 120분 차단을 한 군으로 재관류 시작전에 4마리가 죽고 13분까지 1마리만 남기고 다 죽었다. 또한 Group III는 25도에 120분 차단을 한 군으로 재관류 2, 3분에 전부 사망하였다.

Group IV는 15도의 온도로 90분간의 차단을 한 군으로 재관류 10분에 4마리가 살고 30분까지도 2마리의 생존을 보였다. 이때의 동맥혈 산소의 분압은 차단전 107.4 ± 20.8, 차단 후 1분에 78.3 ± 21.2, 10분과 30분에 74.0 ± 5.7, 75.5 ± 0.7mmHg를 보였다. Group V는 20도에 90분간의 차단을 하여 재관류 10분에 3마리의 생존을 보였다. 재관류 1, 10, 30분의 산소분압은 77.7 ± 27.1, 73.3 ± 10.8, 90mmHg였다. Group VI는 20도에 75분의 차단을 한 군으로 재관류 1, 10, 30분에 93.0 ± 12.0, 88.2 ± 17.7, 61.25 ± 47.2mmHg의 소견을 보였다(Table 1, 2).

각군에서 사망한 쥐와 실험이 끝난 쥐는 도살하여 폐의 조직학적 검사를 시행하였다.

Table 1. Datas of each group

Group	Duration of ischemia (min)	Temperature (°C)	Survived			Histology	
			10	20	30(min)	Normal	Edema
I	120	15	6	1	1	1	9
II	120	20	1	0	0	0	10
III	120	25	0	0	0	0	10
IV	90	15	4	2	2	8	2
V	90	20	3	1	1	4	6
VI	75	20	6	4	4	7	3

Table 2. Arterial Oxygen Tension in each group

Group	Preclamp	Reperfusion			
		1 min	10 min	20 min	30 min
I	104.9±24.8	67.0±41.0(10)	59.3±33.4(6)	84	(1) 70 (1)
II	101.8±11.7	63.5±30.6(8)	51	(1)	
III	105.9±19.6				
IV	107.4±20.8	78.3±21.2(6)	74.0±5.7(2)	75.5	(2) 90 (1)
V	106.9±16.5	77.5±27.1(6)	73.3±10.8(3)	86	(1) 85 (1)
VI	103.7±17.8	93.0±12.0(6)	88.2±17.7(6)	85.5±16.5(4)	61.3±47.2(4)

2) 조직학적 검사

120분의 차단을 한 군에서의 폐는 Group I의 한 예를 제외하고 전부 폐부종을 보였으나 90분 이하의 차단에서는 20도의 경우 4/7, 15도에서는 1/7의 폐부종의 소견을 보였다. Group VI의 경우, 2/7에서 폐부종의 소견을 보였는데, 일단 폐부종을 보인 경우는 20분을 넘기지 못하고 사망하였다(Table 1, 2).

실험중 사망한 쥐의 폐에서는 전부 폐부종의 소견을 보였다.

고 찰

폐의 이식은 말기 폐질환 환자에서 생명을 얻게하는 방법이다. 그러나 장거리의 장기 이동은 수시간에 걸쳐 이루어지는 것이기 때문에 운반하는 폐에 많은 장애를 주게되며, 이의 대표적인 것은 허혈에 의한 것과 이를 사용하기 위한 재관류에 의한 것이다^{1~11)}. 이에 대한 손상의 기전은 아직 잘 알려져 있지않으나 허혈 상태로는 폐부종이 오지 않으나 재관류시 폐부종이 오게되며⁸⁾ 장기의 재관류 시 국소 장기뿐만이 아니라 타장기에도 손상을 일으키는 생화학적 및 세포학적 반응이 복잡하게 내부적으로 연관되

어 연쇄적으로 일어나기 때문이다. 이러한 허혈-재관류 손상을 허혈후 증후군(Postischemic syndrome), Legrain-Cormier-Heimovici 증후군, 지혈대 증후군이라고도한다^{9~11)}. 허혈-재관류손상은 산소 자유기(Oxygen free radical), 칼슘, 백혈구, Arachdonic Acid의 대사 등이 작용하게되며 이에 대한 작용기전은 현재 세계적으로 연구중이다.

허혈 재관류 손상의 실험을 하는데 현재까지는 일반적으로 체외의 모델을 주로 사용하여왔다. 체외 모델은 조건의 설정이나 장치가 비교적 쉽고 실험 방법이 쉬운점이 있으나, 반면에 체외에서 시행하기때문에 정상적인 조직의 대사과정을 무시하게되고 혈액의 공급이 사용중인 기구에 의해 파괴되거나 변형될 우려가 높다. 이러한 점이 어느 정도까지 실험에 영향을 주는지는 아직까지 알 수 없으나, 생체를 이용할 시에는 정상적인 대사를 통한 생체의 조절기능을 이용하기때문에 보다 이상적인 실험 방법으로 생각되어 이를 시도하였다. 체외형 모델로는 대개는 토끼 4나 개2 등을 사용하였으며 극히 일부에서 쥐를 사용한 바 있다⁶⁾.

허혈 재관류 손상은 주변조건에 의해 큰 영향을 받게되는데, 온도, 습도, 그리고 허혈 시간 등이다. 그러나 이에 대한 보고가 없는 실정이어서 본인은 이를 기준으로 실험에 임하였다.

허혈 재관류에 의한 쥐의 폐에 대한 손상을 판정하는데에는 폐혈관 저항의 측정, 조직화학적 검사방법이 흔히 이용되고 또 ¹²⁵I-bovine serum albumin 방법 등이 사용되고 있다. 이들은 폐기능에 대한 평가는 정확히 할 수 없으며 방사능에 오염된다는 문제를 지니고 있다. 또한 동맥중 산소분압의 정확한 측정에 대해 미비한 점을 보이고 있다.

현재의 본인의 방법은 0.5cc의 적은 혈액량으로 동맥혈의 산소분압과 HCO₃ 등의 양을 여러번 측정하여 이를 손상의 판단 기준으로 삼을 수 있기에 보다 간편하고 유용한 방법이 아닐까 생각한다. 또한 이들 소량으로 4회의 혈액 채취는 쥐의 혈액학적인 변화를 초래하지 않으며 비교적 간편한 방법으로 이를 폐 손상의 지표로 삼았다. 그리고 동맥혈 산소분압은 가스 교환이 주기능인 폐기능을 보다 정확히 표시하는 방법이 아닐까 한다. 동맥혈의 산소분압을 측정하여 이를 폐기능의 지표로 삼는 것은 산소의 교환이 폐를 통해 이루어지는 것을 기초로하여 이의 기능판단에 도움을 주기에 사용한다^{6, 7)}. HCO₃의 양은 전체 보고에서 별다른 의미는 없는듯, 보고된 바가 없는 상황이나 현재의 실험을 통해 보면 무언가 의미가 있지 않을까 추정된다. 물론 저산소증에 의한 조직의 무산소대사로 인한 유산의 증가나 다른 효소치의 변화가 있을 것으로 생각되지만

검사를 하기위한 혈액의 양이 적어 이를 시행하기에는 무리인 점이 이 모델의 단점으로 보고있다.

실험의 주변 조건에 대한 문제로서, 본 실험은 허혈시간, 온도 그리고 습도를 주로한다는 보고에 대해 허혈시간과 온도가 대부분을 차지하며⁵⁾ 장기의 장시간 노출시 이 장기의 건조에 의한 손상을 간과해서는 안될 것으로 보고, 또 국소 적정 온도의 유지를 위해서는 등장성 용액을 일정한 온도로 유지 시켜 늑막강내에 넣어 순환을 시키는 방법을 고려함이 마땅하다고 생각한다. 이는 체외 실험에서 시행하는 방법의 기준을 개선시킬 수 있는 방법이 아닐까 생각한다.

결 론

이상의 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 재관류 손상이 일어나는 혈류의 차단 시간은 75분 이상으로 보이며, 이때 온도는 상당히 중요하게 작용하는 것으로 15~20도 사이가 폐에서의 한계라고 보인다.
2. 장기의 실험에서 습도가 중요한 요건이라하나 지속적인 관류를 통한 주변의 온도와 습도의 유지는 실험의 정확도를 높일 수 있을 것으로 보인다.
3. 이 허혈 재관류의 실험의 의의는 radical scavengers와 같은 것에 대한 약물 실험이나 허혈 재관류를 해야하는 장기 이식시의 보존 시간과 온도, 그리고 습도같은 주변 조건을 설정하는 실험의 기초가 될 것으로 보며 비교적 쉽고 실험 시간이 짧고, 쥐와 같은 작은 동물이기 때문에 사용되는 약도 적게들며 개개의 차이도 적은 관계로 경제적으로도 유용하리라고 생각하며 이를 보고하는 바이다.

참 고 문 헌

1. Larkan A, Mathieu P, Hellmer J, Fieve G. *Severe metabolic changes following delayed revascularization: Legrain-Cormier syndrome.* J Cardiovasc Surg(Torino) 1973; 14: 609-14
2. Jurmann MJ, Dammenhayn L, Schaeffers HJ, Haverich A. *Pulmonary reperfusion injury: evidence for oxygen free radical scavengers.* Europ J Cardio-Thorac Surg 1990; 4: 665-70
3. Hamvas A, Palazzo R, Kaiser L, et al. *Inflammation and oxygen free radical formation during pulmonary ischemia reperfusion injury.* J Appl Physiol 1992; 72: 621-8
4. Kuzuya T, Hoshida S, Kim Y, et al. *Detection of oxygen derived free radical generation in the canine postischemic heart during late phase of reperfusion.* Circ Res 1990; 66: 1160-5
5. Mai D, Dyke CM, Abd-elfattah AS, Lehman JD, Dignan RJ and Wechsler AS. *Efficacy of a hydroxyl radical scavenger (VF233) in preventing reperfusion injury in the isolated rabbit heart.* Ann Thorac Surg 1992; 53: 1091-5
6. Horgan MJ, Lum H, Malik AB. *Pulmonary edema after pulmonary artery occlusion and reperfusion.* Am Rev Res Dis 1989; 140: 1421-8
7. Parks DA, Bulkey GB, Granger DN. *Role of oxygen free radicals in shock, ischemia and oxygen preservation.* Surgery 1983; 94: 428-32
8. Steimle CN, Guynn TP, Morganroth ML, Bolling SF, Carr K, Deeb GM. *Neutrophils are not necessary for ischemia-reperfusion lung injury.* Ann Thorac Surg 1992; 53: 64-73
9. Yokomise H, Fukuse T, Hirata T, et al. *Effect of recombinant human adult T cell leukemia-derived factor on rat lung reperfusion injury.* Respiration 1994; 61: 99-104
10. Buchbinder D, Karmody AM, Leather RP, Shah DM. *Hyper-tonic mannitol. Its use in the prevention of revascularization syndrome after acute arterial ischemia.* Arch Surg 1981; 116: 414-21
11. Haimovici H. *Metabolic complications of acute arterial occlusions.* J Card Surg(Torino) 1979; 20: 349-57