

SOD, DMTU 및 허혈양상화 처치가 허혈 및 재관류에 의한 흰쥐 넓다리곧은근의 미세구조 변화에 미치는 영향

백 두 진 · 임 재 현 · 정 호 삼
한양대학교 의과대학 해부학교실

Effects of DMTU, SOD and Ischemic Preconditioning on the Ultrastructural Changes of the Rectus Femoris Muscles in Rats after Ischemia and Reperfusion

Doo Jin Paik, Jae Hyun Lim and Ho Sam Chung
Department of Anatomy, College of Medicine, Hanyang University
(Received August 27, 1997)

ABSTRACT

The ischemia and reperfusion injury of the skeletal muscles is caused by generation of reactive oxygen during ischemia and reperfusion. It is well known that over 4 hours of ischemia injures the skeletal muscles irreversibly. The author has demonstrated the effects of SOD (superoxide dismutase), DMTU (dimethyl thiourea) and ischemic preconditioning on ultrastructural changes of the muscle fibers in the rectus femoris muscles after 4 hours of ischemia and 1 day and 3 days of reperfusion.

A total of 72 healthy Sprague-Dawley rats weighing from 200 gm to 250 gm were used as experimental animals. Under urethane(1.15 g/kg, IP, 2 times) anesthesia, lower abdominal incision was done and the left common iliac artery was occluded by using vascular clamp for 4 hours. The left rectus femoris muscles were obtained at 1 and 3 days after the removal of vascular clamp. The SOD (15,000 unit/kg) or DMTU (500 mg/kg) were administered intraperitoneally at 1 hour before induction of ischemia. The ischemic preconditioned group underwent three episodes of 5 minutes occlusion and 5 minutes reperfusion followed by 4 hours of ischemia and 1 day and 3 days of reperfusion. The specimens were sliced into 1 mm³ and prepared by routine methods for electron microscopic observation. All specimens were stained with uranyl acetate and lead citrate and then observed with Hitachi-600 transmission electron microscope.

The results were as follows:

1. SOD or DMTU alone did not affect the ultrastructure of muscle fibers in the rectus femoris muscles. The electron density of mitochondrial matrix was decreased by ischemic preconditioning.

2. Dilated cisternae of sarcoplasmic reticulum, triad, mitochondria and the loss of myofilament in the sarcomere were observed in the 4 hours ischemia and 1 day reperfused rectus femoris muscles. Markedly changed sarcoplasmic reticulum, triad, disordered or loss of myofilament, indistinct A-band and I-band, and irregular electron lucent M-line and Z-line are seen in the 4 hours ischemia and 3 days reperfused rectus femoris muscles.
3. SOD reduced the changes of organelles in the muscle fibers of the 4 hours ischemia and 1 day reperfused rectus femoris muscles of the rats, but SOD did not affect the changes of muscle fibers in the 4 hours ischemia and 3 days reperfused muscles. On the other hand, DMTU markedly attenuated considerably the ultrastructural change of the 4 hours ischemia and 1 day or 3 days reperfused rectus femoris muscles.
4. By the ischemic preconditioning, the change was attenuated remarkably in the 4 hours ischemia and 1 day reperfused rectus femoris muscles. As the ischemic reperfused changes of muscle fibers were regenerated or recovered by ischemic preconditioning, the ultrastructures of them were similar to those of normal control in the 4 hours ischemia and 3 days reperfused rectus formoris muscles.

Consequently, it is suggested that DMTU is stronger inhibitor to ischemic reperfused change than SOD. The ischemia and reperfusion-induced muscular damage is remarkably inhibited by ischemic preconditioning.

Key words : SOD, DMTU, ischemic preconditioning, ischemia and reperfusion

서 론

사지의 뼈대근육은 풍부한 측부순환이 존재할 뿐 아니라 혐기성 상태에서도 해당작용이 활발하게 일어나 허혈상태에 대하여 내성을 가지고 있으나 외과적 수술 시 장시간의 지혈대 사용, 쇼크상태, 동맥경화증 및 당뇨병 등 순환계의 폐쇄를 유발할 수 있는 질병 혹은 외상 등에 의하여 장시간 혈류저하 상태가 지속되면 뼈대근육이 손상되고(Moore *et al.*, 1956; Stenger *et al.*, 1962; Trivedi and Danforth, 1966; Pearce *et al.*, 1985), 허혈상태가 소멸된 후 재관류에 의한 손상이 복합적으로 유발되어 근육에서 회복불능의 장애를 유발할 수 있다(Fridovich, 1978; Del Maestro, 1980; Sexton *et al.*, 1990). Blebea 등(1987)은 허혈후 재관류시 관찰되는 근육손상은 반응성 수산화(hydroxyl radical, $\cdot\text{OH}$)에 의해 생기며 mannitol의 투여로 근육손상을 감소시킬 수 있다고 하였고, Becker 등(1994)은 재관류시 발생하는 superoxide기

가 조직손상을 일으키는 주된 중간물질이라 하였다. 반응성 산소기가 세포에서 형성되면 SOD, catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소들이 활성화되어, 반응성 산소기를 대사시키지만 반응성 산소기와 항산화효소 사이의 균형이 깨지면 세포에서 반응성 산소기에 의한 손상이 일어난다고 알려져 있다(Chance *et al.*, 1979; Baud and Aradaillou, 1986). Feller 등(1989)은 SOD (superoxide dismutase) 혹은 dimethyl sulfoxide의 전처치로 허혈에 의한 근육의 손상이 약화된다고 하였으며, Schoenberg 및 Beger (1993)은 허혈 및 재관류로 소장에서 반응성 산소기가 형성되어 지방의 과산화와 prostaglandin 및 leucotriene의 형성이 증가한다고 하고 SOD, catalase, dimethyl sulfoxide 및 deferoxamine 등의 투여로 이러한 현상이 약화된다고 하였다. 한편, Murry 등(1986)은 허혈 경험이 있는 심근은 장시간의 허혈에 대하여 내성을 가지게 된다고 하였고 이러한 현상을 '허혈양상화'(ischemic preconditioning)라고 하고 허혈전 짧은 시간의 허혈과 재관류를 3~4회 반복

하여 허혈후 재관류시 나타나는 근육의 손상을 약화시킬 수 있다고 보고하였다 (Neely and Grotyohann, 1984; Li et al., 1992; Li and Kloner, 1994).

이에 저자는 비가역적 손상이 일어나는 것으로 알려진 4시간의 허혈 (Labbe et al., 1985; Lindsay et al., 1990)을 시킨 다음 1일 및 3일 재관류후 나타나는 근조직의 변화와 근육에서 허혈 및 재관류 손상을 야기하는 것으로 알려진 superoxide기를 대사시키는 SOD 및 반응성 수산기를 제거하는 DMTU를 전처치한 경우와 허혈양상화 시킨 경우 4시간 허혈후 나타나는 근조직의 미세구조의 변화를 관찰하여, SOD, DMTU 및 허혈양상화 처치가 허혈 및 재관류시킨 근육에 미치는 영향을 규명하기 위하여 본 실험을 시도하였다.

재료 및 방법

실험동물로는 체중 200~250 gm 사이의 건강한 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였으며 실험기간중 먹이와 물은 제한 없이 공급하였다. 실험동물은 대조군과 실험군으로 나누어 실험군은 허혈 및 재관류군, DMTU 전처치후 허혈 및 재관류군, SOD 전처치후 허혈 및 재관류군과 허혈양상화 허혈 및 재관류군으로 구분하고 각각 4시간 허혈 및 재관류 1일 및 3일 경과군으로 세분하여 각군 모두 6마리씩 실험동물을 사용하였다.

모든 실험동물은 주사용 증류수에 희석한 urethane 용액 (1.15 g/kg)을 20분 간격으로 2회 복강내 주사하여 마취시킨 후 실험을 실시하였다. 허혈후 재관류 실험군의 흰쥐는 왼쪽 온영덩동맥을 흰쥐용 혈관집게 (vascular clamp, FSTIN Co. Foster city, U.S. A.)로 폐색시켜 좌측하지에 허혈을 일으킨 후 2시간 경과하면 혈관집게를 제거하여 재관류 시킨 다음 절개 부위를 봉합하였다. 24시간 및 72시간 경과후 경추탈구법으로 희생시키고 왼쪽 넙다리골은근을 적출하여 앞은쪽의 힘살부위를 시료로 사용하였다. DMTU 혹은 SOD 전처치후 허혈 및 재관류군은 허혈 개시 1시간전에 500 mg/kg의 DMTU (Sigma) 혹은 15,000 unit/kg의 SOD (Bovine Kidney Sigma)를 복강내 투여한 다음 허혈 및 재관류군과 같은 방법으로 진행

하였다. 허혈양상화 처치후 허혈 및 재관류군은 실험동물을 urethane 마취하에서 개복후 왼쪽 온영덩동맥을 5분간 허혈하고 5분간 재관류하는 과정을 3회 반복한 다음 연속하여 4시간 허혈시키고 1일 및 3일 재관류 시킨 다음 희생시켜 왼쪽 넙다리골은근에서 앞은쪽의 힘살부위를 절취하였다. 적출한 넙다리골은근을 즉시 1 mm³의 크기로 세절하고 Millonig 인산염 완충용액 (pH 7.2)으로 제작한 3% glutaraldehyde 용액에 4시간 전고정한 후 동일 완충용액에 8시간 침적시키고 동일 완충용액으로 제작한 1% osmium tetroxide에 2시간 후고정하여 탈수한 후 Epon 812에 포매하여 두께 2~5 μm의 박절편을 제작하고, methylene blue로 염색하여 적정부위를 확인한 후 두께 600~800Å의 초박절편을 제작하여 uranyl acetate (Watson, 1958) 및 lead citrate (Venable and Coggeshall, 1965)로 이중염색하고 Hitachi-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

실험 결과

1. 대조군 흰쥐 넙다리골은근의 전자현미경 소견

가) 정상대조군

정상대조군의 흰쥐 넙다리골은근에서는 근형질내 근육원섬유(myofibril)가 규칙적으로 배열되었고, 근육원섬유에서는 굵은 근육미세섬유(thick myofilament: myosin) 사이에 가는 근육미세섬유(thin myofilament: actin)가 삽입되어 있었으며, 중등도의 전자밀도를 나타내는 A띠, 가는 근육미세섬유로만 구성되고 전자밀도가 다소 낮은 I띠, I띠의 중간에 위치하며 전자밀도가 매우 높은 Z선, 가는 근육미세섬유만으로 구성되고 전자밀도가 중간정도인 H띠와 H띠의 중앙에 위치하며 약간의 가로근육미세섬유(transverse filament)를 포함하는 M선을 관찰하였다. 근육원섬유사이에서는 사립체류가 뚜렷하게 보이는 간형, 난원형 혹은 원형의 사립체, 근육세포질세망의 수조와 사립체와 근육세포질세망의 수조사이에서 집괴를 이루고 있는 당원과립이 나타났다. 근육세포질막에서 시작되어 근육원섬유사이로 침투한 가로소관과 양측에서 근육세포질세망의 종말수조가 구성하는 세동이를 관찰하였다 (Fig. 1).

나) DMTU 전처치 대조군

DMTU를 전처치한 대조군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 근육원섬유에서 A띠, I띠, M선, Z선 등이 뚜렷하게 나타났고, 근육원섬유사이에는 그물망형태로 연결되는 근육세포질세망의 수조가 근육원섬유의 A띠 주변에서 나타났으며, 근육원섬유사이에서는 사립체, 근육세포질세망의 수조, 집괴를 이루는 당원과립 및 근육원섬유의 A띠와 I띠 경계부위에서 근육세포질세망의 종말수조와 가로소관으로 구성되는 세동이를 관찰하였다(Fig. 2).

다) 허혈양상화 대조군

허혈양상화 대조군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 사립체에서 기질의 전자밀도가 감소하거나 사립체층이 팽대된 소견외에는 근육원섬유의 구조와 근육원섬유사이에서 나타나는 근육세포질세망의 수조, 당원과립 및 세동이가 정상대조군의 소견과 유사하게 나타났다(Fig. 3).

라) SOD 전처치 대조군

SOD를 전처치한 대조군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 근육원섬유, 사립체, 세동이, 당원과립이 대조군의 소견과 유사하게 나타났으나 일부 근육세포질세망의 수조가 팽대된 것을 관찰하였다(Fig. 4).

2. 4시간 허혈 및 재관류군 흰쥐 넓다리골은근의 전자현미경 소견

가) 4시간 허혈 및 재관류군

4시간 허혈 및 재관류 1일 경과군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 사립체가 팽대하고 사립체기질의 전자밀도가 감소하였으며 사립체층이 소실되었고 근육세포질세망의 수조는 팽대하였으며 종말수조가 팽대한 세동이가 나타났다. 근육원섬유는 정상과 유사하게 나타났으나 일부 근원섬유마디에서 근육미세섬유가 불규칙한 것을 관찰하였다(Fig. 5). 4시간 허혈 및 재관류 3일 경과군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 사립체가 팽대하였고 사립체기질의 전자밀도는 감소하고 사립체층이 나타나지 않았으며 근육세포질세망의 수조와 종말수조가 팽대하였고 주변의 전자밀도가 높아진 가로소관의 일부는 팽대하거나 단절되었다. 근육원섬유에서 근육미세섬유의 배열이 불규칙해지거나 소실되었으며 I띠와

A띠의 경계가 불분명해지고 M선과 Z선이 불규칙해지거나 전자밀도가 감소되었다(Fig. 9).

나) DMTU 전처치후 4시간 허혈 및 재관류군

DMTU 전처치후 4시간 허혈 및 재관류 1일 경과군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 팽대된 사립체에서 사립체기질의 전자밀도가 감소하고 사립체층이 소실된 곳이 나타났으며 근육세포질세망의 수조와 종말수조가 팽대하였다. 근육원섬유에서는 M선이 불규칙하거나 단절되었고 일부 근육미세섬유의 배열이 불규칙하였으며 A띠와 I띠의 경계가 불분명하게 관찰되었다(Fig. 6). DMTU 전처치후 4시간 허혈 및 재관류 3일 경과군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 팽대한 사립체에서 사립체기질의 전자밀도가 감소하고 사립체층이 불분명해지거나 소실되었으며 다수의 크기가 작은 사립체가 출현하였다. 근육세포질세망의 수조, 종말수조 및 가로소관이 팽대하였다. 근육원섬유에서는 M선이 불규칙하거나 단절되었고 Z선의 전자밀도가 감소하였으며 전반적으로 A띠와 I띠의 경계를 관찰할 수 없었으며 용해되는 근육원섬유를 관찰하였다(Fig. 10).

다) 허혈양상화 처치후 4시간 허혈 및 재관류군

허혈양상화 처치후 4시간 허혈 및 재관류 1일 경과군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 사립체가 팽대하고 사립체기질의 전자밀도는 감소하였으며 사립체층이 팽대하거나 소실된 곳을 관찰하였다. 근육세포질세망의 수조 및 종말수조가 팽대하였고 근육원섬유에서는 불규칙한 M선과 Z선을 관찰하였다(Fig. 7). 허혈양상화 처치후 4시간 허혈 및 재관류 3일 경과군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 작은 사립체가 나타났으며 종말수조가 팽대하였다. 근육원섬유는 정상대조군과 유사한 것을 관찰하였다(Fig. 11).

라) SOD 전처치후 4시간 허혈 및 재관류군

SOD 전처치후 4시간 허혈후 재관류 1일 경과군 흰쥐의 넓다리골은근에서는 사립체가 팽대하고 사립체기질의 전자밀도가 감소하였으며 일부 사립체층이 팽대하였고 근육세포질세망의 수조와 종말수조가 팽대하였다. 근육원섬유에서는 일부 근육원섬유마디에서 근육미세섬유가 불규칙하였으며 Z선이 불규칙하였고 A띠와 I띠의 경계가 불분명하였다(Fig. 8). SOD 전처치

후 4시간 허혈후 재관류 3일 경과군 흰쥐의 넓다리근은근에서는 가로소관이 분절되고 주변의 전자밀도가 증가하였으며 근육세포질세망의 수조가 팽대하였다. 근육원섬유는 단절되었으며 근육미세섬유가 단절되거나 불규칙하였다. M선은 불규칙한 곳이 나타났으며 Z선은 불규칙하거나 단절되었고 전자밀도가 현저히 감소하였다. A띠와 I띠의 경계를 구분할 수 없었으며 근육원섬유사이의 간격이 증가한 것을 관찰하였다 (Fig. 12).

고 찰

장시간 지속되는 허혈상태로 뼈대근육에서 손상이 야기되는 것은 오래전부터 알려진 사실이다. Beyersdorf 등(1991)은 뼈대근육에서 허혈상태가 4시간 지속되면 ATP의 양이 감소되고 근육이 잘 수축되지 못하며, 조직내 물의 양이 증가하고 조직에서 산중(pH 6.7)이 관찰되지만 사립체의 기능은 유지된다고 하였고, 4시간의 재관류로 비가역적 손상이 일어나지만 조절된 재관류로 근수축의 기능은 유지시킬 수 있다고 하였으며, Eckert 및 Schnackerz(1991)는 허혈로 근육세포내 ATP pool이 고갈되면 세포의 회복이 안 되는 것을 의미하는 것으로 사람의 경우 허혈로 ATP가 고갈되는 시간이 34°C에서 2.25시간이고 26°C 이하에서는 5시간이라고 하였다. Makitie 및 Teravainen(1977)은 공기지혈대를 이용하여 300 mgHg의 압력으로 2시간 이상 허혈시키고 재관류시킨 흰쥐의 앞정강근에서는 근육세포질내 사립체가 증창되면서 사립체층선이 불분명해졌으며 근육세포의 핵주위수조 및 근육세포질세망의 수조가 팽대하였고 근육원섬유에서 마디끝격막이 용해되거나 소실되었으며 허혈시간이 4시간 이하인 경우 재관류후 4일이 경과되면 근육섬유가 재생되었으나 허혈시간이 4시간 이상인 경우에는 근육섬유가 거의 재생되지 않는다고 하였고, Harris 등(1986)은 2시간동안 허혈시킨 개의 두덩정강근에서는 미세구조의 변화가 없었고 재관류로 근육섬유내 당원과립이 회복된다고 하였으며, 7시간 동안 허혈시키고 4시간 재관류시킨 뼈대근육에서는 당원과립이 해당작용으로 소실되었고 ATP가 감소하며 지질의 과산화이 일어나고 근육섬유에서 사립체는 증창을 일으키고

외막이 파괴되며 사립체층선이 소실되었고 핵은 형태가 불규칙해지고 부종을 일으켰으며 염색질이 집괴를 이루면서 핵막주변에 위치하게 된다고 하였다.

Blebea 등(1987)은 허혈후 근육에서 손상받지 않은 세포를 조사한 결과 4시간 허혈시 98%, 6시간 허혈시 59%, 8시간 허혈시 23%의 세포가 생존하였고, 6시간 허혈 및 재관류시키면 36%의 세포가 생존하고 재관류시 근육손상이 증가한다고 하였으며, Rubin 등(1992)은 5시간 허혈시킨 근육에서 재관류시간이 길수록 근육의 부종과 괴사는 증가한다고 하고 재관류동안 근육은 지속적으로 손상된다고 하였다. Anderson 등(1990)은 근육에서 허혈후 재관류 손상은 재관류시 형성되는 반응성 산소기가 근육세포내 항산화계의 기능을 능가하기 때문에 나타나는 현상으로 재관류시 혈류를 제한하여 주는 것이 좋으며 재관류 개시후 10초간 세포손상이 일어난다고 하였고, Lindsay 등(1990)은 허혈후 재관류시 나타나는 근육의 손상은 반응성 산소기에 의해 세포내 막구조에 있는 지질이 과산화되어 세포의 막구조물에서 비가역적 손상이 일어난 결과로 반응성 산소기의 형성은 재관류전 근육을 허혈시킨 시간에 비례한다고 하였다. Idström 등(1990)은 근세포에서 ATP의 대사물인 hypoxanthine이 수배 증가하지만 uric acid는 재관류시만 관찰된다고 하고 이러한 현상은 hypoxanthine을 대사시키는 xanthine oxidase가 허혈상태에서 축적된 후 재관류시 반응을 일으키기 때문이며, 재관류시 adenine nucleotide 구성성분이 혈관계로 흘러나가 모세혈관 내피세포의 xanthine oxidase에 의해 대사되면서 반응성 산소기를 발생시켜 허혈로 인한 근세포의 변화가 회복되어도 조직내 수분의 양이 증가하게 된다고 하였다. Ferarri 등(1991)은 심근에서 95%의 산소가 사립체에 있는 cytochrome oxidase에 의해 중간대사물없이 4가로 환원되어 대사되지만 나머지 5%의 산소가 1가로 환원되면서 비교적 반응성이 적은 superoxide 음이온을 형성하면 세포내 SOD의 작용으로 과산화수소와 산소분자가 되거나 혹은 산소의 2가 환원에 의하여 과산화수소가 생기게 되고, 이렇게 생성된 과산화수소는 고농도에서 독성이 있을 뿐 아니라 철이온을 매개로 반응성이 매우 높은 수산화기를 생성하며 반응성 수산화기는 특히 세포막의 중요구성성분인 다가불포화지방산을 공

격하여 반응성 지방기를 형성하고 반응성 지방기는 산소분자와 반응하여 과산화지방기가 되는 과정을 반복하게 되어 지질의 과산화가 이루어지며, 이러한 반응은 철과 구리의 이온이 있으면 증가된다고 하였다.

본 실험은 빠대근육에서 허혈 및 재관류시 비가역적 손상을 일으켜 근육이 괴사되는 것으로 알려진 4시간 동안 허혈 후 1일 및 3일 재관류시 나타나는 흰쥐 넙다리골은근에서 미세구조의 변화와 DMTU 및 SOD 전처치나 허혈양상화가 허혈 및 재관류손상으로 나타나는 흰쥐 넙다리골은근에서 미세구조의 변화에 미치는 영향을 비교하였다. 4시간 허혈 및 재관류군에서 흰쥐 넙다리골은근에서는 사립체와 근육세포질세망 구조의 변화가 심하게 나타났으며, 재관류시간이 긴 경우 근육원섬유사이의 간격이 넓어져 근세포내 부종이 일어나거나 근육원섬유의 용해(myofibrilolysis)가 일어나 근세포의 손상이 심해진 것으로 생각되나 여러 학자의 보고처럼 4시간 허혈로 비가역적 손상이 일어나는 지는 알 수 없었다. SOD는 제 1선에서 superoxide기를 대사하여 Haber-Weiss 반응 ($O_2^- + Fe^{+++} \rightarrow Fe^{++} + O_2$, $H_2O_2 + Fe^{++} \rightarrow \cdot OH + Fe^{+++} + OH^-$)으로 반응성 높은 반응성 수산기가 형성되는 것을 억제하는 항산화효소이며 모든 호기성 세포에 분포하는 금속이온을 포함하는 단백질이고 세포질에서 지속적으로 발현하는 Cu, Zn-SOD, 외부자극으로 발현되고 사립체에 분포하는 Mn-SOD와 세포외액에 존재하는 EC-SOD (McCord and Fridovich, 1969; Marklund, 1982; Hiraishi *et al.*, 1992; Steinkühler *et al.*, 1994)가 있으며, Feller 등(1989)과 Schoenberg 및 Beger (1993)는 허혈 및 재관류로 형성되는 반응성 산소기의 작용을 SOD의 투여로 약화시킬 수 있다고 하였다.

SOD 전처치후 허혈 및 재관류군에서 흰쥐 넙다리골은근에서는 4시간 허혈후 재관류 1일 경과시 사립체 및 근육세포질세망의 구조에서 나타나는 변화의 정도가 감소하였으나 재관류 3일 경과시에는 허혈 및 재관류군보다 근육손상의 정도가 심해진 것을 알 수 있었다. SOD 투여후 재관류시간이 길수록 근육의 손상이 심해지는 것은 SOD의 반감기가 짧다(Inoue *et al.*, 1989)는 것과 실험시행시 허혈기간이 끝날 때 SOD를 투여하는 것이 좋다는 Bulkley (1987) 보고와 관련하

여 SOD 투여시간에 문제가 있거나, 본 실험에서 투여한 SOD가 Cu, Zn-SOD라는 점에서 근육에서 허혈 및 재관류로 형성된 superoxide기가 Cu, Zn-SOD와 반응하면서 H_2O_2 를 형성하고 H_2O_2 가 Cu, Zn-SOD와 반응하여 반응성 수산기를 형성하게 되면 주변의 histidine residue와 반응하여 효소의 반응부위를 파괴함으로써 SOD는 구리이온과 결합하지 못하게 되어 주변의 H_2O_2 농도가 높을 경우 Cu, Zn-SOD가 세포의 손상을 더욱 심하게 한다는 Koningsberger 등 (1994)과 Ueda 등(1994)의 보고에서 원인을 찾을 수 있을 것으로 사료된다. 또, SOD가 세포막을 통과하지 못한다(Freeman *et al.*, 1983)는 것을 고려한다면 재관류 1일 경과군에서 나타나는 SOD의 손상감소 효과는 근육의 허혈 및 재관류 손상에 근육세포외에서 발생하는 반응성 산소기가 일부 원인을 제공하는 것으로 사료된다.

DMTU 전처치후 허혈 및 재관류시 흰쥐 넙다리골은근에서는 4시간 허혈과 재관류 1일 및 3일 경과군에서 근육손상의 정도가 현저히 감소하였다. DMTU는 실험실과 공장에서 항산화제로 쓰이고 있으나 그 작용기전은 알려져 있지 않으며 superoxide기, H_2O_2 , 반응성 수산기 및 차아염소산기의 제거에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 사용시 접촉성 피부염 혹은 폐기능장애가 나타날 수 있는 것으로 알려져 있다(McCutchan *et al.*, 1990; Beehler *et al.*, 1994). DMTU는 대부분의 반응성 산소기를 제거할 수 있어 허혈 및 재관류에 의한 근육손상에 효과적이라고 생각된다. 허혈양상화 처치후 허혈 및 재관류시 흰쥐 넙다리골은근에서는 4시간 허혈후 재관류 1일 및 3일 경과시 근육손상의 정도가 현저히 감소하였다. 재관류 3일 경과시에는 정상대조군과 유사하게 나타났으며 특징적으로 작은 크기의 사립체가 출현하여 근육손상에서 회복되는 것으로 생각된다. 허혈양상화처치로 나타나는 변화는 근육손상의 약화뿐 아니라 빠른 회복을 유도하는 것으로 사료된다. Neely 및 Grotyohann (1984)은 심근에서 10분 혹은 15분간의 허혈경험이 이어지는 30분간의 허혈시 기능의 회복에 도움이 된다고 보고한 후, Murry 등(1986)이 5분간의 허혈과 5분간의 재관류를 4회 반복한 후 40분간 허혈시킨 개의 심근에서 경색부위가 현저히 감소하는 것을 보고하고 짧은 허혈

의 경험이 장시간 허혈에 대해 내성을 갖게 되는 현상을 '허혈양상화'라고 명명한 이래 많은 학자들이 효과의 원인을 규명하고자 하였으나 그 정확한 기전은 알려지지 않고 있다. 원인으로서는 허혈시 근육에서 ATP 분해로 생기는 adenine에 의하여 A1 수용체가 자극되어 나타나는 protein kinase C의 활성화, A1 수용체 자극과 ATP의존성 K channel의 개구, heat shock protein과 SOD 등의 단백질합성, 심근에서 에너지대사의 지연, 사립체에서 ATPase의 활성을 억제하는 단백질의 합성 등이 알려져 있으며 이러한 현상은 대부분 심근에서 나타나는 것으로 뼈대근육에 대해서는 그 원인과 효과에 대하여 잘 알려져 있지 않다 (Murry et al., 1991; Pang et al., 1993; Mehta et al., 1994; Yamashita et al., 1994). 허혈양상화처치는 효과가 있더라도 비용과 순도가 문제가 되는 SOD, 독성이 문제되는 DMTU와 달리 임상적 시술이 간편하고 효과가 확실하여 장기간 허혈후 재관류시 나타나는 근육손상을 줄일 수 있는 최선의 선택이라 사료된다. 그리고 대조군 소견에서 SOD와 DMTU가 근육에 미치는 영향은 없으며 허혈양상화처치시에는 근육이 허혈을 경험하여 근육세포질세망의 종창이 일어났으나 정상대조군과 유사하게 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하면 흰쥐의 넓다리골은근에서 허혈후 재관류손상은 허혈양상화 처치와 DMTU 전처치로 손상의 정도가 약화되었으나, SOD 전처치는 허혈후 재관류손상을 약화시키지 못하는 것으로 사료된다.

결 론

본 실험은 허혈 및 재관류시 발생하는 반응성 산소기의 작용으로 나타나는 근육손상을 약화시키기 위하여 SOD 및 DMTU 전처치와 허혈양상화 처치가 허혈 및 재관류후 나타나는 근육의 미세구조변화에 미치는 영향을 비교 관찰하였다. 흰쥐에 SOD (15,000 unit/kg) 혹은 DMTU (500 mg/kg)를 허혈개시 1시간전에 투여하거나 허혈양상화처치 즉시 왼쪽 온엉덩뿔을 4시간 결찰시킨후 1일 및 3일 재관류시 나타나는 왼쪽 넓다리골은근의 미세구조를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대조군에서는 SOD 및 DMTU 투여로 흰쥐 넓다리골은근에서 미세구조의 변화는 없었으며 허혈양상화처치로 근육세포의 사립체에서 사립체기질의 전자밀도가 감소하고 사립체름이 팽대하였다.
2. 4시간 허혈 및 재관류 1일 경과시 넓다리골은근에서 근육세포질세망의 수조, 세동이 및 사립체가 팽대하였고 일부 근육원섬유마디에서 근육미세섬유가 소실되었다. 3일 경과시에는 근육세포소기관의 변화가 심해졌으며 근육원섬유에서 근육미세섬유의 배열이 불규칙해지거나 소실되어 I띠와 A띠의 경계가 불분명하고 M선과 Z선이 불규칙해지거나 전자밀도가 감소되었다.
3. 4시간 허혈 및 재관류시 SOD를 전처치하면 재관류 1일 경과시 흰쥐의 넓다리골은근에서 허혈 및 재관류 손상으로 나타나는 세포소기관의 변화를 약화시켰으나 재관류 3일 경과시에는 손상의 정도가 심해지거나 전처치하지 않은 경우와 유사하였다. DMTU를 전처치하면 4시간 허혈 및 재관류 1일 및 3일 경과시 근육손상으로 나타나는 미세구조의 변화를 현저하게 감소시켰다.
4. 허혈양상화 처치후 4시간 허혈 및 재관류시키면 흰쥐의 넓다리골은근에서 재관류 1일 경과시 근육손상으로 나타나는 미세구조의 변화가 약화되고 3일 경과시에는 근육손상이 회복되거나 세포소기관의 신생으로 정상대조군과 유사하게 나타났다.

이상의 결과를 종합하면 DMTU 전처치가 SOD 전처치의 경우보다 허혈 및 재관류시 나타나는 근육손상에 의한 미세구조의 변화를 약화시켰고 허혈양상화 처치는 DMTU 전처치의 경우보다 탁월한 근육손상 약화효과를 가지는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Anderson RJ, Cambria R, Kerr J, Hobson RW II, 1990. Sustained benefit of temporary limited reperfusion in skeletal muscle following ischemia, J. Surg. Res. 49, 271-275
- Baud L, Ardaillou R, 1986. Reactive oxygen spec-

- ies: Production and role in the kidney, *Am. J. Physiol.* 251, F765-F776
- Becker M, Menger MD, Lehr H, 1994. Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leucocyte adhesion to venular endothelium, *Am. J. Physiol.* 267, H925-H930
- Beehler CJ, Ely ME, Rutledge KS, Simchuck ML, Reiss OK, Shanley PF, Repine JE, 1994. Toxic effects of dimethyl thiourea in rats, *J. Clin. Lab. Med.* 123, 73-80
- Beyersdorf F, Unger A, Wildhirt A, Kretzer U, Deutschander N, Kruger S, Matheis G, Hanselmann A, Zimmer G, Satter P, 1991. Studies of reperfusion injury in skeletal muscle: Preserved cellular viability after extended periods of warm ischemia, *J. Cardiovasc. Surg.* 32, 664-676
- Blebea J, Kerr JC, Hobson RW II., Padberg FJ Jr., 1987. The effects of oxygen free radical scavengers on skeletal muscle ischemia and reperfusion injury, *Curr. Surg.* 44, 396-398
- Bulkley GB, 1987. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review, *Br. J. Cancer.* 55, Suppl VIII, 66-73
- Chance B, Sies H, Boveris A, 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, *Physiol. Rev.* 59, 527-605
- Del Maestro RF, 1980. An approach to free radicals in medicine and biology, *Acta. Physiol. Scand.* 492(Suppl), 153-168
- Eckert P, Schnackerz K, 1991. Ischemic tolerance of human skeletal muscles, *Ann. Plast. Surg.* 26, 77-84
- Feller AM, Roth AC, Russel RC, Eagleton B, Suchy B, Debs N, 1989. Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury to skeletal muscle, *Ann. Plast. Surg.* 22, 321-331
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, DeGiuli F, Albertini A, 1991. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium, *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 215S-222S
- Freeman BA, Young SL, Crapo JD, 1983. Liposome mediated augmentation of superoxide dismutase in endothelial cells prevents oxygen injury, *J. Biol. Chem.* 258, 12534-12542
- Fridovich I, 1978. The biology of oxygen radicals, *Science* 201, 875-877
- Harris K, Walker PM, Mickle DAG, Harding R, Gatley R, Wilson GJ, Kuzon B, McKee N, 1986. Metabolic response of skeletal muscle to ischemia, *Am. J. Physiol.* 250, H213-H220
- Hiraishi H, Terano A, Razandi M, Sugimoto T, Harada T, Ivey KJ, 1992. Role of cellular superoxide dismutase against reactive oxygen metabolite injury in cultured bovine aortic endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 267, 14812-14817
- Idström JP, Soussi B, Elander A, Bylund-Fellenius AC, 1990. Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle, *Am. J. Physiol.* 258, H1668-H1673
- Inoue M, Ebashi I, Watanabe N, Morino Y, 1989. Synthesis of a superoxide dismutase derivative that circulates bound to albumin and accumulates in tissues whose pH is decreased, *Biochemistry* 28, 6619-6624
- Koningsberger JC, van Asbeck BS, van Faassen E, Wiegman LJJM, van Hattum J, van Berge Henegouwen GP, Marx JJM, 1994. Copper, Zinc-superoxide dismutase and hydrogen peroxide; a hydroxyl radical generating system, *Clinica. Chimica. Acta.* 230, 51-61
- Labbe R, Romaschin A, Mickle D et al., 1986. Localization of damage to skeletal muscle following prolonged ischemia and its prevention, *Clin. Invest. Med.* 8, R1152 [abstract]. Cited from Walker. Walker PM, 1986. symposium on acute arterial insufficiency, 1, Pathophysiology of acute arterial occlusion, *Can. J. Surg.* 29, 340-342
- Lindsay TS, Liauws, Romashin AD, Walker PM, 1990. The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle, *J. Vasc. Surg.* 12, 8-15
- Li Y, Whittaker P, Kloner RA, 1992. The tran-

- sient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia, *Am. Heart. J.* 123, 346-353
- Li Y, Kloner RA, 1994. Cardioprotective effects of ischemic preconditioning can be recaptured after they are lost, *J. Am. Coll. Cardiol.* 23, 470-474
- Makitie J, Teravainen H, 1997. Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat, *Acta. Neuropathol.* 37, 101-109
- Marklund SL, 1982. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7634-7638
- McCord JM, Fridovich I, 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein, *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055
- McCutchan JH, Schwappach J, Enquist EG, Walden PL, Terada LS, Reiss OK, Leff JA, Repine JE, 1990. Xanthine oxidase-derived H₂O₂ contributes to reperfusion injury of ischemic skeletal muscle, *Am. J. Physiol.* 258, H1415-H1419
- Mehta JL, Yang B, Kerensky RA, Conti CR, 1994. Potential therapeutic implications of the phenomenon of ischemic preconditioning of the myocardium: Lessons from the animal and catheterization laboratories, *Am. J. Cardiol.* 74, 1270-1271
- Moore DH, Ruska H, Copenhaver WM, 1956. Electron microscopic and histochemical observation of muscle degeneration after tourniquet, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2, 755-764
- Murry CE, Jennings RA, Reimer KA, 1991. New insight into potential mechanisms of ischemic preconditioning, *Circulation* 84, 442-445
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA, 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium, *Circulation* 74, 1124-1136
- Neely JR, Grotyohann LW, 1984. Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium, *Cir. Res.* 55, 816-824
- Pang CY, Forrest CR, Mounsey R, 1993. Pharmacologic intervention in ischemia-induced reperfusion injury in the skeletal muscle, *Microsurgery* 14, 176-182
- Pearce FJ, Connett RJ, Drucker WR, 1985. Phase-related changes in tissue energy reserves during hemorrhagic shock, *J. Surg. Res.* 39, 390-398
- Rubin BB, Liauw S, Tittley J, Romaschin AD, Walker PM, 1992. Prolonged adenine nucleotide resynthesis and reperfusion injury in postischemic skeletal muscle, *Am. J. Physiol.* 262, H1538-H1547
- Schoenberg MH, Beger HG, 1993. Reperfusion injury after intestinal ischemia, *Crit. Care. Med.* 21, 1376-1386
- Sexton WL, Korhuis RJ, Laughlin MH, 1990. Microvascular injury after ischemia and reperfusion in skeletal muscle of exercise trained rats, *J. Appl. Physiol.* 68(6), 2329-2336
- Steink hler C, Carri MT, Micheli G, Knoepfel L, Weser U, Rotilio G, 1994. Copper dependent metabolism of Cu, Zn-superoxide dismutase in human K526 cells, lack of specific transcriptional activation and accumulation of a partially inactivated enzyme, *Biochem. J.* 302, 687-697
- Stenger RJ, Spiro D, Scully RE, Shanson JM, 1962. Ultrastructural and physiologic alterations in ischemic skeletal muscle, *Am. J. Pathol.* 40, 1-15
- Trivedi B, Danforth WH, 1966. Effect of pH on the kinetics of frog muscle phosphofructokinase, *J. Biol. Chem.* 241, 4110-4114
- Ueda J, Sudo A, Mor A, Ozawa T, 1994. Generation of hydroxyl radicals during dismutation of superoxide by SOD model compounds, *Arch. Biochim. Biophys.* 315, 185-189
- Venable JH, Coggshall R, 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy, *J. Cell. Biol.* 25, 407-417
- Watson ML, 1958. Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metals, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 475-478
- Yamashita N, Nishida M, Hoshida S, Kuzuya T,

Hori M, Taniguchi N, Kamada T, Tada M, 1994. Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocyte increases toler-

ance to hypoxia 24 hours after preconditioning, *J. Clin. Invest.* 94, 2193-2199

FIGURE LEGENDS

- Fig. 1.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, a control rat. In the myofibrils, ordered myofilament, M-line (M), Z-line (Z), relatively dark A-band (A) and light I-band (I) are seen. Aggregated glycogen granules (Gly), cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR), rod shaped mitochondria (M) and triad (T) composed of transverse tubule and terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum are observed in the interfibrillar space. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 2.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, a control rat with the pretreatment of DMTU. M-line (M), Z-line (Z), A-band (A) and I-band (I) in the myofibrils and mitochondria (M), triad (T) and transverse tubule (t) in the interfibrillar space are seen. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 3.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, a ischemic preconditioned control rat. M-line (M), Z-line (Z), A-band (A) and I-band (I) in the myofibrils and triad (T), cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR) mitochondria (M) with electron lucent matrix and glycogen granule (Gly) in the interfibrillar space are seen. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 4.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, a control rat with the pretreatment of SOD. M-line (M), Z-line, A-band (A) and I-band (I) in myofibrils and triad (T), cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR) mitochondria (M) and glycogen granules (Gly) in the interfibrillar space are observed. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 5.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, 4 hours ischemia and 1 day reperfused rat. Mitochondria (M) with amorphous matrix density, dilated cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR), triad (T) with dilated terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum, disordered myofilament in some sarcomere (arrow), transverse tubule (t), I-band (I), A-band (A), M-line (M) and Z-line (Z) are seen. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 6.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, 4 hours ischemia and 1 day reperfused rat with the pretreatment of DMTU. Dilated mitochondria (M) with electron lucent matrix and loss of cristae, dilated cisternae and terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR), disordered myofilament (arrow), irregular M-line (M) and indistinct A-band (A) and I-band (I) are seen. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 7.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, 4 hours ischemia and 1 day reperfusion of ischemic preconditioned rat. Dilated mitochondria (M) with electron lucent matrix, loss of cristae, dilated cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR), triad (T) with dilated terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum and irregular Z-line (Z) and M-line (M) are seen. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 8.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, 4 hours ischemia and 1 day reperfused rat with the pretreatment of SOD. Mitochondria (M) with electron lucent matrix and dilated cristae, dilated cisterna of sarcoplasmic reticulum (SR), triad (T) with dilated terminal cisternae

of sarcoplasmic reticulum, disordered myofilament (arrow) irregular Z-line (Z) and indistinct A-band (A) I-band (I) are observed. Lead citrate and uranyl acetate stain.

- Fig. 9.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, 4 hours ischemia and 3 days reperfused rat. Dilated mitochondria (M) with amorphous matrix density, dilated cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR), triad (T) with dilated terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR) and transverse tubule (t) wrapped electron dense material, indistinct A-band (A) and I-band (I), disordered myofilament (arrow) and irregular Z-line (Z) and M-line (M) are seen. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 10.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, 4 hours ischemia and 3 days reperfused rat with the pretreatment of DMTU. Dilated mitochondria (M) with electron lucent matrix and loss of cristae, dilated cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR), dilated triad (T), myofibrilolysis (Mf), indistinct A-band (A) and I-band (I), fragmented M-line (M) and electron lucent Z-line (Z) are seen. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 11.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, 4 hours and 3 days reperfusion of ischemic preconditioned rat. Small sized mitochondria (M) and triad (T) with dilated terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum, cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR), I-band, A-band, Z-line (Z) and M-line (M) are observed. Lead citrate and uranyl acetate stain.
- Fig. 12.** An electron micrograph of rectus femoris muscles, 4 hours ischemia and 3 days reperfused rat with the pretreatment of SOD. Degenerative transverse tubule (t), dilated cisternae of sarcoplasmic reticulum (SR), triad (T) with dilated terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum, myofibrilolysis (Mf), irregular M-line (M), electron lucent Z-line (Z), indistinct A-band (A) and I-band (I) and widened intermyofibrillar space are seen. Lead citrate and uranyl acetate stain.





