

재관류가 허혈 심근세포의 미세구조에 미치는 영향: 재관류 손상에 관한 연구

이 종 욱* · 조 대 윤* · 손 등 섭 · 양 기 민* · 라 봉 진** · 김 호 덕**

=Abstract=

Effect of Reperfusion after 20 min Ligation of the Left Coronary Artery in Open-chest Bovine Heart: An Ultrastructural Study

Jong Wook Lee, M.D. *, Dai-Yun Cho, M.D. *, Dong Suep Sohn, M.D. *, Ki Min Yang, M.D. *,
Bong-jin Rah, M.D. **, and Ho-dirk Kim, M.D. **

Background: It has been well documented that transient occlusion of the coronary artery causes myocardial ischemia and finally cell death when ischemia is sustained for more than 20 minutes. Extensive studies have revealed that ischemic myocardium cannot recover without reperfusion by adequate restoration of blood flow, however, reperfusion can cause long-lasting cardiac dysfunction and aggravation of structural damage. The author therefore attempted to examine the effect of postischemic reperfusion on myocardial ultrastructure and to determine the rationales for recanalization therapy to salvage ischemic myocardium. **Materials and methods:** Young Holstein-Friesian cows(130~140 Kg body weight; n=40) of both sexes, maintained with nutritionally balanced diet and under constant conditions, were used. The left anterior descending coronary artery(LAD) was occluded by ligation with 4-0 silk snare for 20 minutes and recanalized by release of the ligation under continuous intravenous drip anesthesia with sodium pentobarbital(0.15 mg/Kg/min). Drill biopsies of the risk area (antero-lateral wall) were performed at just on reperfusion(5 minutes), 1-, 2-, 3-, 6-, 12-hours after recanalization, and at 1-hour assist(only with mechanical respiration and fluid replacement) after 12-hour recanalization. The materials were subdivided into subepicardial and subendocardial tissues. Tissue samples were examined with a transmission electron microscope (Philips EM 300) at the accelerating voltage of 60 KeV. **Results:** After a 20-minute ligation of the LAD, myocytes showed slight to moderate degree of ultrastructural changes including subsarcolemmal bleb formation, loss of nuclear matrix, clumping of chromatin and margination, mitochondrial destruction, and contracture of sarcomeres. However, microvascular

* 중앙대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, College of Medicine, Chung-Ang University

** 중앙대학교 의과대학 조직학교실

Department of Histology, College of Medicine, Chung-Ang University

논문접수일 : 98년 3월 11일 심사통과일 : 98년 4월 21일

책임저자 : 조대윤, (140-757) 서울특별시 용산구 한강로 3가 65-207, 중앙대부속 용산병원 흉부외과. (Tel) 02-748-9566, (Fax) 02-794-4319
본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

structures were relatively well preserved. After 1-hour reperfusion, nuclear and mitochondrial matrices reappeared and intravascular plugging by polymorphonuclear leukocytes or platelets was observed. However, nucleoli and intramitochondrial granules reappeared within 3 hours of reperfusion and a large number of myocytes were recovered progressively within 6 hours of reperfusion. Recovery was apparent in the subepicardial myocytes and there were no distinct changes in the ultrastructure except narrowed lumen of the microvessels in the later period of reperfusion. **Conclusion:** It is likely that the ischemic myocardium could not be salvaged without adequate restoration of coronary flow and that the microvasculature is more resistant to reversible period of ischemia than subendocardium and subepicardium. Therefore, thrombolysis and/or angioplasty may be a rational method of therapy for coronarogenic myocardial ischemia. However, it may take a relatively longer period of time to recover from ischemic insult and reperfusion injury should be considered.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:739-48)

Key word : 1. Reperfusion
2. Myocardium
3. Reperfusion injury

서 론

혈전이나 연축(spasm) 등으로 관상동맥이 폐쇄되면 폐쇄이 하 부위는 국소 허혈 상태에 빠지게 된다. 국소 허혈이 일어나면 심근세포에서는 모든 세포소기관의 미세구조적 변화는 물론 심근세포 주위의 미세혈관손상, 미소혈전형성, 혈관주 위의 부종, 혈장단백의 혈관의 유출, 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocyte, 이하 PMN) 침윤 등의 염증반응이 일어남은 주지의 사실이나¹⁾, 심장전체가 허혈에 빠지는 전체 허혈(global ischemia)과는 달리 국소 허혈 시에는 허혈기간과 심근세포나 주위 조직의 형태학적 변화가 반드시 일치하는 것은 아니며²⁾ 관상동맥의 폐쇄정도, 부행로(collateral)나 신생 혈관의 형성유무에 따라 위험부위 심근세포의 변화에는 정도의 차이가 있음이 알려져 있다³⁾. 이와 같이 관상동맥 폐쇄 시 재관류 없이 허혈에 빠진 심근세포의 기능이나 형태학적 변화를 원래의 상태로 회복시킬 수 없음을 자명한 사실이지만^{4~6)} 동물실험중 일부에서는 재관류시 장기간에 걸쳐 부정맥이 나타나는 등, 오히려 심근 이상이 악화되는 소위 “재관류에 의한 심근세포 손상”이라는 실험결과들도 제시되고 있다⁷⁾. 재관류시 나타나는 심근기능 이상의 발생기전에 대하여는 칼슘 순환주기의 부분적 결손, 세포독성 산소 자유 라디칼, 칼슘과부하 등 여러 가지 가설들이 제시되고 있으나 실험동물의 종에 따라 차이가 나타나므로 아직도 이론이 많다. 그러나 허혈에 따른 심근세포의 기능이나 형태학적 변화에 대한 연구 결과는 허혈성 심장병의 병태생리에 대한 이해나 개심술시 사용되는 심정지와도 깊은 관계가 있으며, 특

히 심근세포 미세구조의 변화에 대한 관찰은 허혈에 의한 심근세포의 손상 정도를 정확히 파악할 수 있을 뿐만 아니라 전향적인 치료방법의 결정에 있어서도 하나의 중요한 지표로 이용될 수 있음 또한 주지의 사실이다^{1,5,6,8~11)}.

재관류 손상에 대한 개념은 Tenant와 Wiggers가 잡종 개를 대상으로 관상동맥의 가지를 결찰한 결과 결찰한 가지를 따라 산소와 영양을 공급받는 심장 벽에서는 운동이상이 일어나며 결찰을 풀어주면 심장운동은 원래의 상태로 회복됨을 관찰함으로써 처음 소개되었는데, 관상동맥 가지의 결찰 기간과 심장운동 이상의 회복 사이에는 불가분의 관계가 있어서 결찰 기간이 짧을 경우에는 심장운동 이상이 거의 원래의 상태로 회복되지만 일정 기간 이상이 경과되면 비가역적인 변화, 즉 심근경색으로 발전됨을 관찰하고 가역-비가역적 변화를 일으키는 결찰기간의 경계선은 대략 20분 내외가 될 것이라고 추정하였다¹²⁾. 이후 이들의 가설은 많은 동물 실험으로 확립되었으며 실험실에서 자주 사용되는 실험동물에서 가역적인 변화를 일으키는 허혈기간은 종에 따라 차이가 있으나 보통 15~20분 정도인 것으로 알려지고 있다⁸⁾. 더욱이 가역적 손상을 받은 심근세포에 대한 것은 심근기능의 수복이라는 관점에서 임상가뿐만 아니라 기초연구자들에게도 관심의 대상이 되고 있다^{2,4,5,7,11)}.

이상으로 저자는 사람과 비교하면 20세 전후에 해당하는 성숙한 홀슈타인 종 소(cow)를 실험동물로 사용하여 일과성으로 관상동맥을 결찰하여 국소 허혈을 유도하고 재관류를 실시하여 심근세포 및 세포간질, 미세혈관의 미세구조를 관찰, 재관류에 의한 심근세포나 주변 구조물들의 형태학적 변

화양상을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 재료

일정한 환경(실온 18°C, 습도 40~45%) 아래에서 하루 동안 필요한 표준열량에 의거, 복합 사료와 물을 제한 없이 주어 사육한 생후 12개월 내외의 소(Holstein-Friesian cow; n=40; 130~140 Kg body weight)를 실험동물로 사용하였다. 실험동물은 각각 독립된 사육사에서 길러졌으며 생후로부터 실험에 사용하기까지 건강을 유지하기 위하여 예방접종 및 질병에 대하여 철저히 관리되었다. 실험 24시간 전부터는 실험동물에게 사료를 제외하고 물만 주었다.

2. 실험 protocol

실험동물에게 마취 30분전에 azaperone(2 mg/kg)을 근육주사하여 안정상태를 유도한 후 sodium pentobarbital(30 mg/kg)을 정맥내 투여하여 마취를 유도하였다. 외과적 마취가 유도되었다고 판단되면 기관을 절개하여 고무관을 삽관하고 인공호흡기에 연결하여 1분당 약 2리터의 산소와 실내공기를 혼합한 가스로 기계적 호흡을 모든 실험과정중에 실시하였다. 양쪽의 내경정맥에 polyethylene catheter를 삽관하여 한쪽으로는 sodium pentobarbital(0.15 mg/kg/min)을 적절한 속도로 투여하여 마취상태를 유지하였으며 다른 한쪽으로는 수액이나 다른 약물의 투여경로로 사용하였다. 오른쪽 대퇴동맥(femoral artery)에도 위와 같은 방법으로 catheter를 삽관하여 대동맥 중간지점까지 이르게한 후 동맥혈압측정과 혈액 sample의 채취로 사용하였다. 이를 통하여 매 10분마다 인공호흡기를 setting하거나 생리학적 범위내에서 혈중 가스분압을 조절하기 위하여 동맥혈의 혈중산소 분압, 탄산가스 분압 및 pH를 측정하였다. 이와 함께 적절한 순환혈액량의 유지를 위하여 좌심방에 catheter를 삽관하고 내압을 측정하였다.

흉부를 정중절개하여 심장을 노출시키고 pericardial cradicle에 고정시킨 후 왼쪽 관상동맥의 전하행지(left anterior descending branch, 이하 LAD)의 기시부에서 4~5 cm 떨어진 곳을 혈관이 다치지 않도록 주의하면서 봉합사(0-4 silk ligature)를 넣고 봉합사의 양쪽 끝을 polyethylene 관 안으로 넣어 이를 조심스러이 당겨 혈관폐쇄(허혈)를 유도하였으며 이를 풀어 재관류를 유도하였다.

심장노출과 혈관처리후 약 45분 동안의 회복기간을 거쳐 LAD를 20분 동안 결찰하여 국소 허혈 유도하고 1시간에서 12시간 동안 재관류하였다. 즉, 실험동물을 대조군(n=5)과 실험군(n=35)으로 나누고 실험군은 다시 7개의 소실험군(n=5

each)으로 나누어 허혈후 임의로 각각 재관류 5분후(Group 1), 1시간(Group 2), 2시간(Group 3), 3시간(Group 4), 6시간(Group 5), 12시간(Group 6) 동안 재관류하였으며, 12시간 동안 재관류 후에는 심전도 기록장치, 인공호흡기와 수액공급 catheter를 제외한 모든 생리학적 측정기구들을 제거하고 1시간 동안 방치하였다(Group 7).

3. 위험(허혈)부위의 추정

위험부위는 예비실험(n=5)에서 실험 시작후 약 30초동안 LAD를 결찰한 후 좌심실에 형광물질을 함유한 2% nitroblue 용액을 주입하고 1분이 지난 후에 0.9% NaCl 250ml, EDTA 18.6mg, KCl 279.5mg으로 조성된 심정지액을 투여하여 심정지를 유도하였다. 심장을 적출하여 좌심실(심실중격 포함)만을 취한 후 심장의 장축과 직교하는 방향으로 두께 7~10 mm의 절편으로 잘라 자외선 아래에서 관찰하여 푸른빛을 가진 형광이 나타나지 않는 부위를 위험부위로 간주하였다.

4. 전자현미경관찰

각 실험이 끝나면 바로 좌심실에 심정지액을 투여하여 심장의 수축-이완 운동을 완전히 멈추게 한 후 생검침(내경 1.5 mm)이 장치된 drill을 사용하여 위험부위의 심근조직을 생검하였다. 각 실험동물에서 위험부위로 나타난 곳은 같은 개체의 위험부위가 아닌 곳의 심근조직을 대조부위로 하여 비교하였다.

생검한 심근조직을 심내막하 및 심외막하의 두개의 부위로 나누어 1 mm² 크기로 잘게 자른 후 각각 4°C하에서 3% glutaraldehyde로 2시간 동안 침적하여 전고정하고 7% sucrose 침출과정을 거쳐 veronal acetate 완충액으로 15분 동안 씻어 준 후 1% osmium tetroxide로 후고정하였다. 이후 50~100%에 이르는 ethanol로 탈수하고 propylene oxide 침투과정을 거쳐 Epon 812에 포매하였다. 중합후 1 μm 두께의 준박절편을 만들어 toluidine blue로 염색하고 광학현미경으로 관찰하여 심근세포를 확인한 후 50~70 nm 두께의 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(Philips EM300)으로 accelerating voltage 60 KeV하에서 관찰하였다.

심근세포 미세구조의 변화 정도에 대한 관정은 Schaper의 기준에 따랐다¹³⁾.

결 과

1. 20분 국소허혈후 위험부위의 미세구조 변화(대조군)

심근세포: 심내막 및 심외막의 심근세포에서 미세구조의 변화에는 거의 차이를 볼 수 없었다. 대부분의 심근세포는



Fig. 1. Subendocardial risk area of the control (ischemic heart). Clumping of chromatin, its margination close to nuclear membrane(arrow), and CBs are seen. Scale bar=2.4 μ m. CB, contracture band

경도에서 중등도, 드물게는 심한 정도에 이르기까지의 다양한 미세구조적 변화들이 혼재되어 관찰되었으나 비가역적인 손상은 관찰할 수 없었다(Fig. 1). 세포막은 국소적으로 파괴되었으며 세포막하에서 큰 수포의 형성을 자주 관찰할 수 있었다. 핵에서는 핵질의 소실, 염색질의 응집, 이들의 핵막 주위로 이동 등이 관찰되었으며 핵주위 세포질에서는 Golgi 장치 등 소기관이나 당원과립 등의 포함물 등은 관찰되지 않았다. 근육분절은 대부분 수축되어 Z선의 비후로 생기는 수축대를 자주 관찰할 수 있었으며 간혹 수분의 축적으로 인하여 근원섬유들이 파괴된 곳도 관찰되었다. 사립체에서는 다소의 기질 소실이나 사립체능의 병치(tapering) 등이 관찰될 뿐 대부분 대조부위와 같이 비교적 잘 보존되어 있었다. 세포사이 연결에서는 미약하나마 근세사의 호트러짐(loosening)이 관찰되었을 뿐 세포사이 연결의 분리를 보이는 곳은 드물었다.

세포간질: 세포사이의 공간(간극)이 다소 넓어져 있었으며 간혹 미세혈관 내피세포의 종창으로 혈관내강이 좁아져 있는 곳이 관찰되었다. 내피세포의 핵에서 염색질의 응집, 이들의 핵막주위로 이동 등이 관찰되었고 세포막하에서 많은 소수포를 관찰할 수 있었다. 특히 수축대가 나타나는 심내막하 세포간질의 혈관에서는 내강이 PMN 이나 혈소판 등으로 폐쇄되어 상당히 좁아진 부분들이 자주 관찰되었으나 내피세포의 파괴는 거의 찾아 볼 수 없었다.

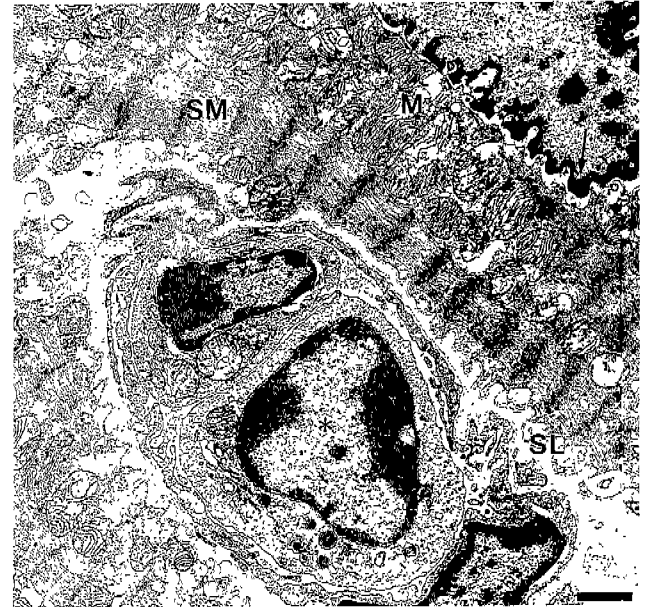


Fig. 2. Subendocardial risk area, 5-minute reperfusion after 20-minute LAD ligation. SL is scalloped and partially damaged; SMs are contracted; myofibrils are partially loosened; mitochondria are swollen and cristae were tapered; chromatin are clumped and margined(arrow). Microvessel is occluded by PMNs(asterisk). Scale bar=1.1 μ m. LAD, left anterior descending coronary artery; PMN, polymorphonuclear leukocyte; SL, sarcolemma; SM, sarcomere.

2. 재관류 직후 위험부위의 미세구조 변화(Group 1)

심근세포: 거의 모든 심근세포는 20분 동안 국소허혈후의 심근조직에서 관찰된 것과 같이 중등도의 미세구조적 변화를 나타내었다(Fig. 2). 세포막은 국소적으로 파괴되었으며 세포막하에서 수포의 형성을 관찰할 수 있었다. 핵에서는 핵질의 소실, 염색질의 응집, 이들의 핵막주위로 이동 등이 관찰되었는데 특히 심내막하 심근세포에서 자주 관찰되었다. 근육분절은 대부분 수축되어 Z선이 비후되어 있었으나 수축대는 자주 관찰되지 않았으며 곳곳에서 국소적으로 근원섬유들이 파괴된 곳이 관찰되었다. 사립체에서는 대부분이 종창 되었으며 기질의 소실, 사립체능의 병치 등이 관찰되었다. 세포사이연접은 대조군에서와 거의 같은 양상으로 나타났을 뿐 특이한 변화는 나타나지 않았다. 이와 같은 변화들은 심내막하 심근세포에서 보다 뚜렷한 양상으로 나타났다.

세포간질: 세포사이의 공간(간극)이 넓어져 있었으며 미세혈관 내피세포의 종창으로 혈관내강이 좁아져 있는 곳이 관찰되었다. 내피세포의 핵에서 염색질의 응집, 이들의 핵막주위로의 이동 등이 국소적으로 관찰되었으나 특이한 변화는 나타나지 않았다. 심외막하 세포간질에 있는 혈관들은 대부

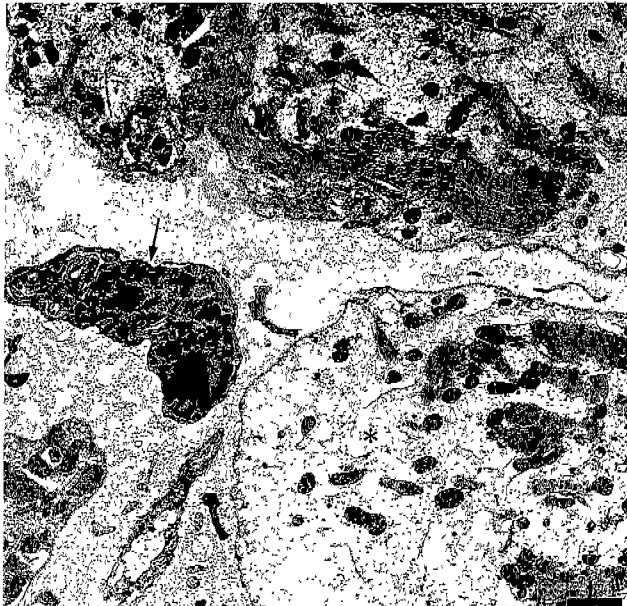


Fig. 3. Subendocardial risk area, 1-hour reperfusion after 20-minute LAD ligation. SMs are contracted and relatively larger area of SMs is lost due to fluid accumulation (asterisk). Fibroblast(arrow) is seen. Scale bar=1.6 μ m. LAD, left anterior descending coronary artery; SM, sarcomere.

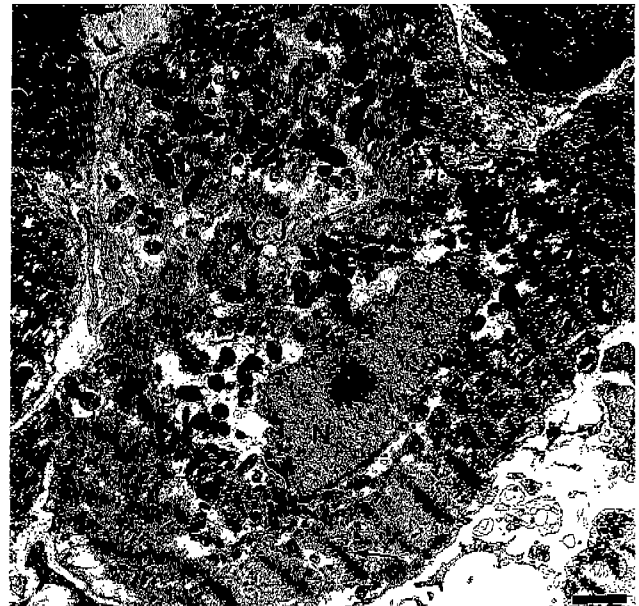


Fig. 4. Subendocardial risk area, 2-hour reperfusion after 20-minute LAD ligation. SL is partially deformed; SMs are contracted and partially show moth-eaten appearance (arrows); however, mitochondria, nucleus (N), and CJ are relatively intact. Scale bar=1.6 μ m. CJ, cell junction; LAD, left anterior descending coronary artery; SL, sarcolemma; SM, sarcomere.

분이 재소통으로 내강이 비어 있었으나 심내막하 세포간질에 있는 혈관에서는 내강이 PMN 이나 혈소판 등으로 폐쇄되어 좁아져 있는 곳을 자주 관찰할 수 있었다.

3. 1시간 재관류후 위험부위의 미세구조 변화(Group 2)

심근세포: 심근세포는 대부분 경도에서 중등도에 이르는 미세구조적 변화들이 혼재해 있었다(Fig. 3). 심근세포막은 비교적 보존 상태가 양호하였으나 세포막하에서 비교적 크기가 큰 수포와 세포질내 수분축적이 관찰되었다. 허혈로 소실되었던 핵질들이 나타났으며 핵질의 응집이나 핵막주위로 이동 등도 관찰되었으나 허혈직후 위험부위(Group 1)에 비하여 현저히 감소되어 있었다. 특히 심외막하 심근세포의 핵주위에서는 Golgi장치, 용해소체 등의 소기관을 비롯하여 당원 과립 등 포함물들이 관찰되었으며 핵주위에서는 특히 수분축적으로 유두륜(halo)을 나타내는 곳을 볼 수 있었다. 근육분절은 수축되어 Z선이 비후를 보이는 곳이 많았으며 국소적으로 파괴된 부분이 관찰되었으나 수축대는 거의 관찰되지 않았다. 사립체는 비교적 잘 보존되어 있었으나 심내막하 심근세포에서 나타나는 사립체에서는 종창이나 사립체능의 비후 등 경도의 변화들이 관찰되었다. 세포사이연접은 대부분에서 비교적 잘 보존되어 있었다.

세포간질: 세포사이 공간은 비교적 넓어져 있었고 간혹 세포파편(cell debris)이 관찰되었다. 미세혈관의 내강은 대부분

에서 개존성을 유지하고 있었으며 내피세포 등의 변화는 관찰되지 않았다.

4. 2시간 재관류후 위험부위의 미세구조 변화(Group 3)

심근세포: 대부분의 심근세포는 경도에서 중등도에 이르는 미세구조적 변화들이 혼재하여 있었다(Fig. 4). 심근세포막은 대부분 잘 보존되어 있었다. 핵내에는 핵인이 출현하였으며 핵질들이 비교적 균등하게 산재해 있었고 염색질의 응집이나 핵막주위로 이동 등은 비교적 드물게 관찰되었으나 심내막하 조직의 국소에서는 핵주위에서 유두륜의 형성이 관찰되었으며 세포질에서도 다소의 수분축적이 관찰되었다. 심외막하 조직과 비교하여 심내막하 심근세포의 대부분의 근육분절은 수축되어 있었으며 드물게 근세사의 흐트러짐이 관찰되었으나 유의할 만한 것은 아니었다. 심외막하 심근세포에서는 세포사이 연접에서 국소적으로 수축대가 관찰되었으나 세포사이 연접의 해리는 볼 수 없었다. 사립체에서는 사립체능이 곳곳에서 얇아져 있기는 하였으나 비교적 잘 보존되어 있었다.

세포간질: 세포사이 공간은 비교적 넓어져 있었으며 간질 세포를 비롯하여 세포파편들이 관찰되었다. 혈관의 개존성은 비교적 잘 유지되어 있었으나 수축대가 나타나는 부위에 존

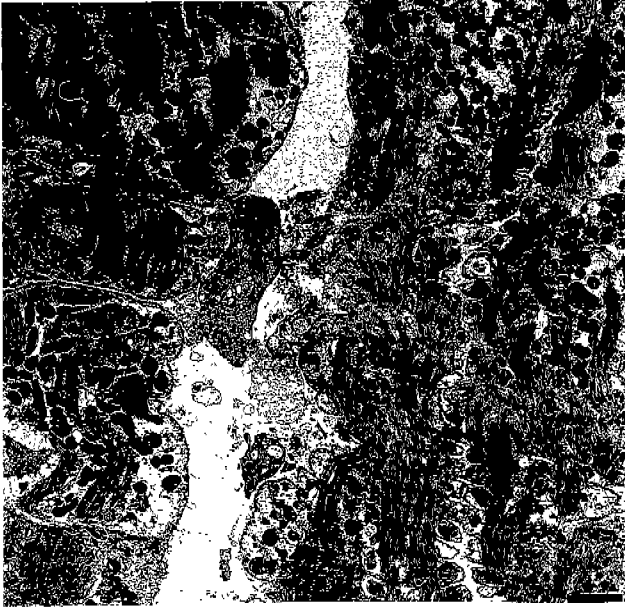


Fig. 5. Subendocardial risk area, 3-hour reperfusion after 20-minute LAD ligation. SMs are contracted and partially deformed; however, mitochondria, SL, and CJ are relatively intact. Cell debris and migrating connective tissue cells (asterisk) are seen in the interstitial space. Scale bar=2.4 μ m. CJ, cell junction; LAD, left anterior descending coronary artery; SL, sarcolemma; SM, sarcomere.

재하는 혈관에서는 내피세포의 종창으로 내강이 좁아져 있거나 PMN이나 혈소판 등과 유착되어 있는 곳이 관찰되었다. 그러나 혈관내피세포의 파괴는 볼 수 없었다.

5. 3시간 재관류후 위험부위의 미세구조 변화(Group 4)

심근세포: 대부분의 심근세포는 경도에서 중등도에 이르는 미세구조적 변화를 나타내었으나(Fig. 5) 경도의 변화를 보이는 심근세포들이 보다 자주 관찰되었다. 심근세포막은 대부분 잘 보존되어 있었으나 국소적으로 세포막하에서 수포 형성을 볼 수 있었다. 핵내에는 핵질이 비교적 균등하게 산재해 있었으며 핵인을 관찰할 수 있었으나 핵질의 응집이나 이들의 핵막주위로 이동은 드물었다. 근육분절은 대부분 수축되어 있었으며 국소에서 수축대의 형성으로 Z선이 비후되어 있거나 근세사의 호트리짐도 관찰할 수 있었다. 사립체는 국소적으로 종창을 보이거나 사립체능의 가늘어짐, 기질의 소실을 보이는 곳이 많았으나 심외막하 조직의 심근세포에서는 정상적인 형태학적 특징을 나타내는 곳도 자주 관찰되었다. 세포사이연접은 대부분 전형적인 Z자 형태를 갖추고 있었으며 분리를 보이는 곳은 매우 드물었다.

세포간질: 세포사이 공간은 다소 넓어져 있었고 세포파편이나 간질세포를 비교적 자주 볼 수 있었다. 미세혈관 내강

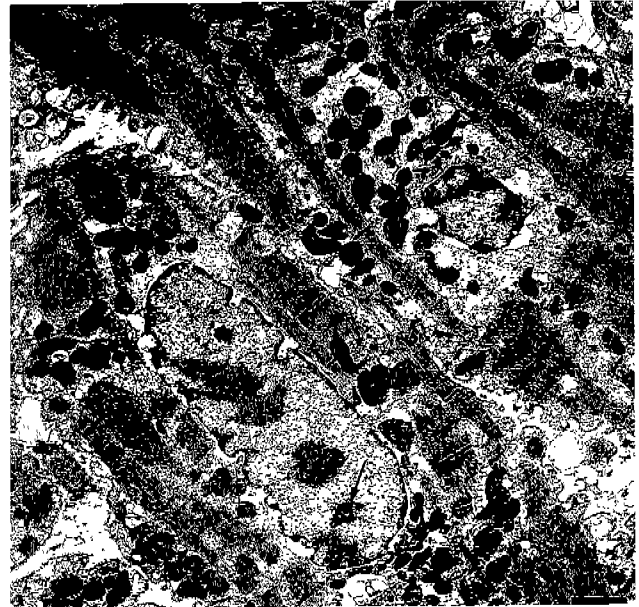


Fig. 6. Subepicardial risk area, 6-hour reperfusion after 20-minute LAD ligation. Ultrastructure is relatively well preserved. Nucleoli(arrow) are seen. Scale bar=1.6 μ m. LAD, left anterior descending coronary artery

의 개존성은 비교적 잘 보존되어 있었으며 간혹 혈액세포에 의한 혈전형성을 볼 수 있었다.

6. 6시간 재관류후 위험부위의 미세구조 변화(Group 5)

심근세포: 대부분의 심근세포는 경도에서 중등도에 이르는 미세구조적 변화를 나타내었으나 중등도 이상의 손상을 나타낸 심근세포는 상대적으로 적었다(Fig. 6). 심근세포막은 비교적 잘 보존되어 있었다. 핵내에는 핵질이 균등하게 산재해 있었으며 핵질의 응집이나 이들의 핵막주위로의 이동은 거의 찾아볼 수 없었고 핵인도 비교적 자주 관찰되었다. 국소에서 비교적 넓게 수분축적을 보이는 곳도 관찰할 수 있었으나 유의할만한 것은 아니었다. 근육분절은 수축 또는 이완되어 있었으며 수축대의 형성이나 근세사의 파괴, 호트리짐을 보이는 곳은 거의 찾아볼 수 없었다. 사립체는 비교적 잘 보존되어있는 곳이 많았으나 심내막하 조직의 심근세포에서 종창이나 약간의 기질 소실을 나타내는 사립체들이 관찰되었다. 세포사이연접은 대부분 비교적 잘 보존되어 있었으며 분리를 보이는 곳은 매우 드물었다.

세포간질: 세포사이 공간은 다소 넓어져 있거나 정상 대조부와 거의 유사하였으며 간질세포나 세포파편 등도 관찰되었다. 미세혈관의 내강은 대부분에서 비어 있었으며 내피세포도 잘 보존되어 있었으나 심내막하 조직에서 국소적으로 혈액세포와 유착된 곳이 관찰되었다.

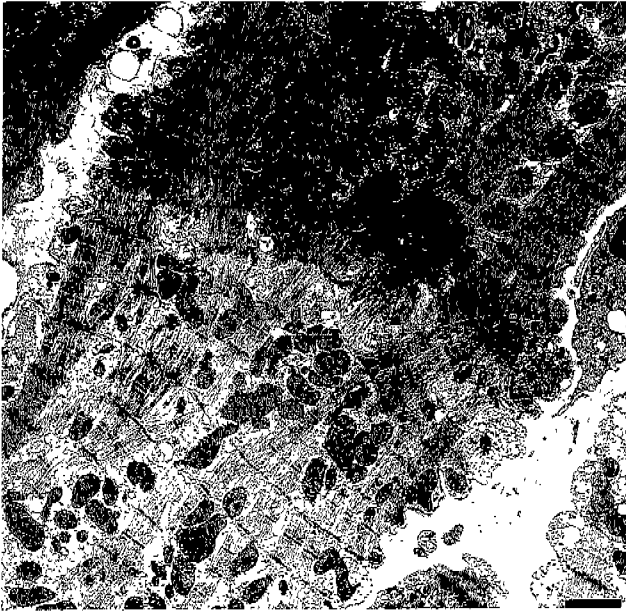


Fig. 7. Subepicardial risk area, 12-hour reperfusion after 20-minute LAD ligation. SMs are contracted to form CBs; however, other fine structures are relatively well preserved. Scale bar=1.6 μ m. CB, contracture band; LAD, left anterior descending coronary artery; SM, sarcomere.



Fig. 8. Subendocardial risk area, 1-hour after 20-minute LAD ligation and 12-hour reperfusion. SMs are contracted to form CB and myofibrils neighbouring CJ are loosened or separated (arrows); mitochondria contain tapered cristae; however, SL is intact and CJ is not separated. Scale bar=1.1 μ m. CB, contracture band; CJ, cell junction; LAD, left anterior descending coronary artery; SL, sarcolemma; SM, sarcomere.

7. 12시간 재관류후 위험부위의 미세구조 변화(Group 6)

심근세포: 대부분의 심근세포는 경도 또는 중등도의 미세구조적 변화를 나타내었으나 정상구조를 보이는 세포들도 다수 관찰되었다. 심근세포막은 비교적 잘 보존되어 있었으며 핵도 거의 정상적인 형태로서 핵인이 뚜렷하였다. 근육분절은 수축 또는 이완된 상태로 나타났으며 심내막하 조직의 심근세포에서는 세포질내 수분축적으로 근세사가 소실된 곳이 관찰되었으며 심외막하 심근세포에서는 국소적으로 수축대를 형성하는 곳도 관찰할 수 있었으나(Fig. 7) 근세사의 파괴를 보이는 곳은 찾아볼 수 없었다. 사립체는 대부분 잘 보존되어 있었으나 심내막하 심근세포에서 사립체능의 병치 등 경미한 변화가 관찰되었다. 세포사이 연결은 비교적 잘 보존되어 있었다.

세포간질: 세포사이 공간은 비교적 넓어져 있었으며 기질 세포나 세포파편 등을 관찰할 수 있었다. 미세혈관의 내강은 대부분 비어 있었으나 드물게 혈소판이나 PMN과 내피세포가 서로 유착되어 있었으며 간혹 내피세포의 파괴를 보이는 혈관도 관찰할 수 있었다. 그러나 대부분에서는 내피세포의 미세구조가 비교적 잘 보존되어 있었다.

8. 12시간 재관류후 삼관제거 1시간후 위험부위의 미세구조 변화(Group 7)

심근세포: 대부분의 심근세포는 경도 또는 중등도의 미세

구조적 변화를 나타내었으나 정상구조를 보이는 세포들이 상대적으로 다수 관찰되었다(Fig. 8). 심근세포막은 비교적 잘 보존되어 있었으며 핵도 거의 정상적인 형태로서 핵인이 뚜렷하였다. 근육분절은 수축 또는 이완된 상태로 나타났으며 심내막하 조직의 심근세포에서는 특히 세포사이 연결 부근에서 근세사가 소실된 곳이 관찰되었으나 심외막하 심근세포에서는 거의 정상을 회복하였다. 사립체는 대부분 잘 보존되어 있었으나 사립체능의 병치 등 경미한 변화들이 국소적으로 관찰되었으며 세포사이연접도 비교적 잘 보존되어 있었다.

세포간질: 세포사이 공간은 비교적 넓어져 있었으며 기질 세포나 세포파편 등을 관찰할 수 있었다. 미세혈관의 내강은 대부분 비어 있었으나 드물게 혈소판이나 PMN과 내피세포가 서로 유착되어 있었고 대부분에서는 내피세포의 미세구조가 비교적 잘 보존되어 있었다.

고 찰

소 심장에서 LAD를 결찰하여 실험적으로 20분 동안 허혈 상태를 지속시킨 후 결찰을 풀고 5분후, 재관류를 시작하여

1, 2, 3, 6, 12시간후, 그리고 12시간 재관류후 심전도, 수액 보충로, 인공호흡장치 등을 제외한 모든 기능 측정 기구들을 제거하고 1시간이 지난 후 위험부위로부터 심근조직을 생검하여 그 미세구조를 관찰하였다. 재관류를 시작하여 5분후의 위험부위에서는 20분 동안 국소허혈후의 위험부위와 비교하여 큰 변화는 없었다. 재관류 1시간후의 심근세포에서는 소실되었던 핵질과 사립체내 기질들이 재출현하였으며 핵주위의 세포질에서는 Golgi장치 등의 소기관과 당원과립들을 관찰할 수 있었는데 이러한 변화들은 전 심근층에 걸쳐 비교적 균등하게 나타났다. 그러나 핵주위에서는 수분의 축적으로 유두를 형성한 곳이 관찰되었고, 특히 심내막하 심근조직에 있는 모세혈관에서는 내피세포의 종창과 내강에서 PMN이나 혈소판 등으로 혈전형성을 이루고 있는 곳이 종종 관찰되었으며 인접한 심근세포의 근질 과수축으로 수축대를 동반하는 경우가 잦았으나 심근세포막이나 세포사이 연결에서는 특별한 변화를 찾아볼 수 없었다. 재관류를 시작하여 2시간후의 심근세포에서는 염색질의 응집이나 이들의 핵막주위로 이동 등도 드물게 관찰되었고 사립체내에서는 정상상태에서 나타나는 전자밀도가 높은 과립들이 재출현하였다. 그러나 미세혈관에서는 PMN이나 혈소판 등에 의하여 혈전을 형성할 뿐만 아니라 내피세포와 혈액세포들과 유착을 보이는 곳을 볼 수 있었다. 재관류를 시작하여 3시간후의 심근세포에서는 회복을 보이는 심근세포들이 다수 관찰되었으나 심내막하 세포간질에서는 간혹 세포파편이나 간질세포를 관찰할 수 있었다. 재관류를 시작하여 6시간 또는 12시간후의 심근세포에서는 대부분에서 경도의 미세구조적 손상 정도를 나타냈으나 심내막하 심근세포중 일부에서는 중증도의 미세구조적 변화가 관찰되었고 세포간질에서도 종종 혈관으로부터 유출한 것으로 보이는 대부분이 PMN인 혈액세포를 관찰할 수 있었다. 재관류를 시작하여 12시간후 보조호흡과 수액만을 공급하고 1시간이 지난 후의 심외막하 심근세포에서는 특이한 변화가 관찰되지는 않았으나 심내막하 심근세포의 일부에서는 수축대 형성, 세포사이 연결 가까이에 위치하는 심근세사의 국소적 파괴 등이 관찰되었다. 이상으로 20분 동안의 국소적인 일과성 허혈후 재관류를 시행하면 기능적 혹은 형태학적 손상 등이 서서히 회복되며 심내막하보다 심외막하 심근세포에서 회복속도가 빠르고 심내막하 심근세포의 일부에서는 재관류에 의한 손상으로 판단되는 미세구조적 변화들이 나타남을 알 수 있다.

허혈시 형태학적으로 가장 먼저 변화를 나타내는 세포소기관은 핵이지만 가장 민감하게 반응하는 것은 사립체이다 3). 따라서 재관류 1시간후에 나타난 핵질이나 사립체기질의 재출현 등은 허혈로 소실되었던 심근세포의 기능이 재관류에 의하여 회복되기 시작하였음을 의미하는 것이다. 허혈이

지속될 경우 가역적인 변화를 초래하는 관상동맥의 폐쇄기간인 가역역은 15~20분 정도이며⁸⁾ 가역역을 넘으면 재관류를 실시했음에도 불구하고 심근세포의 기능이나 형태학적 변화들은 개선되지 않음이 관찰되고 있다. 이와는 대조적으로 Jakob와 Kaschewa는¹⁴⁾ 재관류를 시작하여 30~60분 사이에 segment shortening이나 관상혈류 장애가 개선됨을 관찰하였고 Schaper 등은¹⁵⁾ 심근세포의 비가역적 변화는 허혈부위의 산소 요구량이나 부행로를 통한 허혈부위의 관류량에 크게 영향을 받으며 특히 국소허혈시 혈관폐쇄후 적어도 6시간 동안에는 비가역적인 변화가 일어나지 않음을 관찰하였다. 그러나 본 실험에서도 재관류를 시작한 후 3시간 이내에서는 미세혈관 내강에서 PMN이나 혈소판들이 혈전을 형성하며 때에 따라서는 혈관내피세포와 유착되어 있었을 뿐 아니라 내강이 좁아진 미세혈관을 자주 관찰할 수 있었는데, 미세혈관내 혈전형성은 일과성 허혈후 재관류시 초기에 나타나는 현상으로서 혈관의 개존에도 불구하고 불완전한 관류상태가 지속되는 소위 "no-reflow phenomenon"¹⁰⁾와 관련이 있는 것으로 생각된다^{16,17)}. 또한 혈전형성 주변부의 심근세포에서는 특이하게 수축대의 형성이 관찰된 것은 재관류에 의한 미세혈관의 변화로 심근세포 기능이상 초래 가능성을 시사하는 것이다. PMN은 세포막이나 지질 단백질에 손상을 주는 free radical의 원천이며¹⁷⁾ elastin 분해효소를 증가시킬 뿐 아니라 심근세포에 유해한 독성물질들을 분비하고¹⁶⁾ 혈소판은 thromboxane A2와 같은 생물학적 활성물질을 분비함으로 혈관의 내강이 좁아지거나 혈액세포와 내피세포사이에 유착을 일으켜 미세혈관의 혈류를 감소시킴으로서 심근세포 손상이 일어날 것으로 추측하고 있으나 이들 물질에 대한 길항물질을 사용한 동물실험에서는 상이한 결과들이 나타나고 있어서 위에 열거한 재관류로 나타나는 현상들이 단순히 심근기능 회복 전에 일과성으로 나타나는 현상("stunning")인지 혹은 허혈 심근세포에 대하여 더 큰 손상을 초래하는 것인지에 대하여는 논란의 여지가 있다. 본 실험중 12시간 재관류 후 1시간 동안 방치한 심장조직에서 관찰된 소견들을 기능 회복 이전에 장시간 나타나는 것으로 본다면 진정한 의미에서 재관류 손상이라는 용어는 재고되어야 할 여지가 다소 있다고 생각된다.

이상과 같이 재관류후의 형태학적 변화를 종합하면, 미세혈관은 허혈에 대한 저항력이 심근보다 크며 일과성 허혈손상을 입은 심근세포는 재관류 없이는 회복이 불가능할 뿐만 아니라, 정상으로 회복되기까지에는 장시간이 소요될 것으로 보이며, 특히 허혈기간이 가역역에 있을 때는 혈전용해물 우선 실시하고 경과를 살피면서 혈관성형술 등을 시행하는 치료방법은 타당성이 충분히 있다고 생각되나 일부에서는 재관류 유발성 세포손상도 발생하는 만큼 이에 대한 보다 적

극적인 주의가 요망된다.

결론

국소적으로 일과성 허혈을 유도하여 심근세포에서 일어나는 형태학적 변화를 관찰하고 재관류가 허혈심근에 미치는 영향을 알아보고자 하여 생후 12개월 내외의 홀슈타인종 소의 왼쪽 관상동맥 전하방 가지를 20분 동안 결찰하여 국소허혈을 유도하고 결찰을 풀어 재관류를 유도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

20분 동안의 국소허혈로 심근세포는 경도에서 중등도에 이르는 미세구조적 변화들이 나타났는데 특히 세포막하, 핵, 사립체, 심근원섬유 등의 소기관에서 많은 변화들이 관찰되었다. 그러나 재관류를 시작하여 1시간이 지나면 허혈심근세포에서는 회복을 시사하는 소견들이 나타나기 시작하였으며 미세혈관 내에서 혈전형성이나 내강의 협착 등이 관찰되었으나 재관류가 계속됨에 따라 심근세포의 미세구조적 변화들은 서서히 회복되어 가는 양상을 나타내었다. 그러나 시간이 경과함에 따라 심내막하 심근세포의 일부에서는 재관류 손상으로 추측되는 미세구조적 변화들이 관찰되었다.

이상의 결과로 미루어 미세혈관은 허혈에 대한 저항력이 심근세포보다 강하며 허혈 심근세포는 재관류 없이는 회복될 수 없고, 회복에는 비교적 장시간이 요구되어 재관류 유발성 세포손상에 대한 주의가 요망된다.

참고 문헌

1. Kloner RA, Ganote GE, Whalen DA Jr, Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow. *Am J Pathol* 1974;74:399-422.
2. Schaper J, Meis M, Froede R. *Morphologische Untersuchungen am Myokard von Patienten mit koronarer Herzkrankheit*. In: *Herzhypertrophie*, Mall G, Otto HF (eds), Berlin, Springer-Verlag, 1985;89-111.
3. 김효덕: 허혈 심근세포의 미세구조. *중앙의대지* 1992; 16:1-18.
4. Ferrari R, Albertini A, Curello S, Ceconi C, Di Lisa F, Raddino R, Visioli O: *Myocardial recovery during post-ischemic reperfusion: effects of nifedipine, calcium and magnesium*. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18:487-98.

5. Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E. *Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage*. *Circulation* 1983;68 (Suppl 1):I8-I15.
6. Schaper J, Mulch J, Winkler B, Schaper W. *Ultrastructural, functional, and biochemical criteria for estimation of reversibility of ischemic injury: A study on the effects of global ischemia on the isolated dog heart*. *J Mol Cell Cardiol* 1979;11:521-41.
7. Van der Vusse GJ, Bilsen MV, Reneman RS. *Ischemia and reperfusion induced alterations in membrane phospholipids: An overview*. *Ann NY Acad Sci* 1994;723: 1-14.
8. Jennings RB, Schaper J, Hill HL, Steenbergen C Jr, Reimer KA. *Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury*. *Circ Res* 1985;56:262-278.
9. Kim HD, Rah BJ. *Effects of diltiazem on isoproterenol or Ca-induced ventricular myocardial cell injuries in isolated perfused rabbit heart: an electron microscopic study*. *Anat Rec* 1988;222:260-71.
10. Kloner RA, Ganote GE, Jennings RB. *The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog*. *J Clin Invest* 1974;54:1496-508.
11. Schaper J, Scheld HH, Schmidt U, Hehrlein F. *Ultrastructural study comparing the efficacy of five different methods of intraoperative myocardial protection in the human heart*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986;92:47-55.
12. Tenant R, Wiggers CJ. *Effects of coronary occlusion on myocardial contraction*. *Am J Physiol* 1935;112:611-617.
13. Schaper J. *Regional myocardial ischemia*. In: *The Pathophysiology of Myocardial Perfusion*, Schaper W(ed), Amsterdam, Elsevier, 1979;636-62.
14. Schaper W, Binz K, Sass S, Winkler B. *Influence of collateral blood flow and variations in MVO2 on tissue-ATP content in ischemic and infarcted myocardium*. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19:19-37.
15. De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Fioravanti A, Bramucci, E, Angoli L, Stefano G, Specchia G. et al. *Granulocyte activation after coronary angioplasty in humans*. *Circulation* 1990;82:140-146.
16. Engler RL, Covell JW. *Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15-minute ischemia in the dog*. *Circ Res* 1987;61:20-28.

=국문초록=

연구배경: 재관류 없이 허혈 심근세포의 기능이나 형태학적 변화를 원래의 상태로 회복시킬 수 없음을 주지의 사실이나 재관류가 반드시 유익하지만은 않다는 실험결과들이 있으므로 국소적으로 일과성 허혈을 유도하여 심근세포에서 일어나는 형태학적 변화를 관찰하고 재관류가 허혈심근에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. **재료 및 방법:** 생후 12개월 내외의 홀슈타인종 소를 사용하여 정맥 마취하에서 흉부를 열고 왼쪽 관상동맥의 전하방 가지를 20분 동안 결찰하여 국소허혈을 유도하고 결찰을 풀어 재관류를 유도하였다. 위험 부위의 심근조직을 재관류 직후, 재관류후 1, 2, 3, 6, 12시간 및 재관류 12시간후 1시간동안 보조호흡과 수액 공급만을 한 후 각각 생검하여 통상적인 방법으로 처리하여 투과전자현미경으로 관찰하였다. **결과:** 20분 동안의 국소허혈로 심근세포는 경도에서 중등도에 이르는 미세구조적 변화들이 나타났는데 특히 세포막하, 핵, 사립체, 심근원섬유 등의 소기관에서 많은 변화들이 관찰되었다. 그러나 재관류를 시작하여 1시간이 지나면 허혈심근세포에서는 회복을 시사하는 소견들이 나타나기 시작하였으며 미세혈관 내에서 혈전형성이나 내강의 협착 등이 관찰되었으나 재관류가 계속됨에 따라 심근세포의 미세구조적 변화들은 서서히 회복되어 가는 양상을 나타내었다. 그러나 시간이 경과함에 따라 심내막하 심근세포의 일부에서는 재관류 손상으로 추측되는 미세구조적 변화들이 관찰되었다. **결론:** 이상의 결과로 미루어 미세혈관은 허혈에 대한 저항력이 심근세포보다 강하며 허혈 심근세포는 재관류 없이는 회복될 수 없고, 회복에는 비교적 장시간이 요구되며, 따라서 혈관폐쇄로 인한 허혈시 혈관성형술이나 혈전용해를 촉진하는 물질을 이용한 치료는 타당성이 있는 것으로 생각되나 재관류 유발성 세포손상에 대한 주의가 요망된다.

중심단어: 심근, 재관류, 재관류 손상