

한냉이 흰쥐 대퇴사두근의 허혈 - 재관류 후 SOD 발현에 미치는 영향

영동전문대학 물리치료과

최진호

대구대학교 대학원 재활과학과 물리치료전공

남기원

대구대학교 재활과학대학 물리치료학과

김진상

The Effect of Cold Application on Ischemia-Reperfusion Injury to Quadriceps Femoris Muscle of the Rats.

Choi, Jin-Ho, P.T., Ph.D.

Department of Physical Therapy, Yeongdong Junior College

Nam, Ki-Won, P.T., M.S.

Major in Physical Therapy, Dept of Rehabilitation Science, Graduate School, Taegu University

Kim, Jin-Sang, D.V.M., Ph.D.

Department of Physical Therapy, College of Rehabilitation Science, Taegu University

<Abstract>

The purpose of this study was to investigate the effect of cold application on ischemia-reperfusion injury to quadriceps femoris muscle of the hindlimbs of the rats. Nine weeks old male Sprague-Dawley white rats were divided into three groups : 1) control(only ischemia-reperfusion), 2) cold application before reperfusion(PreCold), 3) cold application after reperfusion(PostCold). All groups were 30 minute, 1 hour, 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia with clamping abdominal artery, and investigate superoxide dismutase(SOD) immunohistochemical reaction for quadriceps femoris muscle of right hindlimb.

SOD immunohistochemical reaction of experimental groups were more than the control group. Especially, SOD immunohistochemical reaction of PreCold were less than the PostCold.

I. 서론

조직에 혈액공급이 차단되거나 상실되어 갑작스런 허혈이 일어나면, 결과적으로 허혈된 조직의 기능장애와 피사가 일어나는 일련의 화학적인 변화가 일어나기 시작하는데, 허혈된 조직에 산소와 영양분을 공급하고 재생

을 위해 혈액을 다시 공급하는 것이 필수적이다. 그러나 일정기간의 허혈상태 후 재관류하였을 경우 조직손상이 일어나게 되는데, 허혈기간에 발생한 손상보다 조직손상이 더 심하게 일어날 수 있다. 이것을 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)라고 하고, 이런 증상은 Haimovici(1960)에 의해 처음 소개되었다.

이 논문은 2001년도 두뇌한국 21사업에 의하여 지원되었음

골격근의 허혈 및 재관류 손상은 혈관의 외상, 근육이 식수술, 동맥의 혈전색전증 또는 동맥의 폐색을 치료하기 위한 사지의 재접합술 및 절단술 등 여러 수술에 의해 발생할 수 있고, 수술 후 골격근에서 발생한 손상에 의해 심부전, 호흡부전 및 신장기능부전 등 치명적인 후유증을 일으킬 수 있으며 사망에 이르기까지 한다(Haimovici, 1979; Wright 등, 1988; Smith 등, 1989). 이러한 골격근의 손상은 허혈시간이 길수록 증가하고, 허혈 후 재관류로 근육손상이 더욱 심해지며, 재관류시 근육의 원위부가 근위부보다 재관류되는 혈류량이 적어서 근육손상이 상대적으로 적다(Blebea 등, 1987). 그리고 허혈 및 재관류에 의해 나타나는 간질조직의 부종과 내피세포의 팽창이 근육의 원위부에서는 동맥의 분포양상에 따라 산소의 공급이 지연됨으로 적게 나타난다고 하였고, 허혈로 인한 골격근의 손상은 근육의 중심부에서 주로 볼 수 있다(Labbe 등, 1987). 이러한 허혈-재관류 손상은 산소유도성 자유기(oxygen derived free radical)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

한편, 초산소기(superoxide radical)와 과산화수소 및 반응성 수산화기와 같은 산소자유기(oxygen free radical)의 작용으로 나타나는 손상은 항산화효소 또는 항산화물을 투여하여 손상을 감소시킬 수 있다(Rice-Evans와 Diplock, 1993). Libonati 등(1997)은 허혈 전 운동이 허혈 후 재관류로 인한 심근에서 자유산소기의 활동을 감소시켜 허혈-재관류 손상이 감소하였다고 보고하였다. An 등(1997)은 토끼의 하지를 대상으로 허혈 전에 한냉팩을 15분간 적용한 후 재관류시킨 결과, 골격근의 허혈-재관류 손상이 감소하였다고 주장하였다.

Wilson 등(1997)의 연구는 토끼의 골격근을 대상으로 열적응에 대한 허혈-재관류 손상을 관찰하였는데, 미약한 체온변화에 따른 근손상에는 유의한 차이가 없었지만, 근육의 온도가 낮으면 허혈-재관류 손상이 감소됨을 보고하였다. Skjeldal 등(1993)은 허혈 초기의 한냉적용이 재관류 동안의 한냉적용보다 허혈 후 골격근 조직의 괴사를 효과적으로 감소시킬 수 있다고 보고하였다. 그러나 Wright 등(1989)과 Cornejo 등(1998)의 연구에서는 허혈기간보다 재관류 기간의 한냉적용이 허혈-재관류 손상을 더욱 효과적으로 감소시켰다고 보고하여 Skjeldal 등(1993)의 주장과 상반되었다.

이에 본 연구는 흰쥐 뒷다리 골격근을 대상으로 한냉이 허혈-재관류 손상에 미치는 영향에 대하여 관찰하고자, 실험동물의 대퇴사두근을 허혈한 다음 재관류 전 또

는 후에 한냉을 적용하여 자유산소기 제거효소 중 하나인 SOD(superoxide dismutase)의 면역조직화학적 반응을 비교관찰하여 물리치료에서 사용하고 있는 한냉 치료의 분자생물학적 효과를 제시하고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험동물 및 실험기간

본 연구에 이용된 실험동물은 체중 200~250g의 건강한 9주령의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하여 2000년 12월부터 2001년 3월까지 실시하였다. 실험기간 중 실험동물은 케이지 안에 보온을 위해 깔짚(대패밥)을 깔아주었고, 먹이와 물은 제한없이 공급하였으며 사육실 내 실내온도는 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

2. 연구설계

허혈-재관류 손상에 대한 한냉의 효과를 관찰하기 위해 실험동물은 대조군과 실험군으로 나누었으며, 각 군은 단순확률추출법에 의해 무작위로 8마리씩 사용하였다. 대조군은 허혈-재관류군으로 실험기간 중 아무런 처치를 하지 않았고 허혈 후 재관류만 시행하여, 재관류 후 30분, 1시간, 3시간 경과 직후에 관찰하였다. 실험군은 허혈-재관류 한냉적용군으로, 모든 대조군과 실험군들은 2시간 허혈한 후 재관류하였다.

한냉적용군은 다시, 재관류 전 적용군과 재관류 후 적용군으로 세분하였으며, 허혈-재관류 후 경과시간에 따라 30분, 1시간, 3시간 경과 직후에 실험동물의 대퇴사두근(quadriceps muscle)을 적출하여 허혈-재관류 손상을 관찰하였다.

3. 연구절차

모든 실험동물은 케타민과 럼폰을 1대 1로 혼합한 마취제를 복강 주사(5~10mg/kg)하여 마취한 다음, 복부와 오른쪽 뒷다리를 삭모하였다. 70% 알콜을 이용해 삭발한 복부를 소독한 후 수술용 칼을 사용하여 정중선 절개로 개복한 후 흰쥐용 혈관집게(vascular clamp)를 사용하여 총장골동맥 상방 복대동맥을 결찰하여 뒷다리를 허혈하였으며, 허혈 2시간이 경과하면 혈관집게를 제거

하여 재판류하였다. 재판류 후 경과시간에 따라 30분, 1시간, 3시간 직후 오른쪽 뒷다리의 대퇴사두근을 적출하여 근육의 중간부위를 시료로 사용하였다.

한편, 한냉적용군의 처치는 한냉팩(cold pack)을 이용하여 2시간 동안 허혈 후 재판류 직전 또는 직후에 흰쥐 오른쪽 뒷다리에 5분간 적용하였다. 한냉팩은 흰쥐의 오른쪽 뒷다리 전체에 적용하였으며, 뒷다리에 압박을 가하지 않도록 부드럽게 감싼 후 온도 유지를 위해 적용 시간 동안 비닐로 감쌌다.

4. 조직표본 작성

시료적출 전 0.9% 염화나트륨(NaCl)과 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 이용해 관류고정한 후 시료를 적출하였고, 4% 파라포름알데하이드에 2시간 후고정한 다음, 에탄올(ethanol) 농도 상승 순으로 탈수(dehydration)를 하여 파라핀 포매를 실시하였다. 제작된 파라핀 블록은 미세절단기를 이용해 10 μ m 두께로 횡단면 절편을 만들었다.

5. 조직염색 및 계측

완성된 조직표본은 monoclonal anti-superoxide dismutase(Sigma immunochemicals. No S2147 mouse ascites fluid, Clone SD-G6, Sigma, St Louis, USA)와 ABC Kit(Vectorstain ABC Kit vectorlaboratories INC Burlingame USA)를 이용하여 조직내 세포질과 세포외액에 주로 분포하는 것으로 알려진 Cu,Zn-SOD의 분포를 면역조직화학적으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

본 연구에서 검출된 면역반응은 반응정도에 따라 음성반응(-), 미약한 양성반응(\pm), 경도의 양성반응(+), 중등도의 양성반응(++), 강한 양성반응(+++)으로 구분하였다.

IV. 결 과

1. 허혈 - 재판류 후 대조군의 SOD 면역조직화학적 소견

흰쥐의 뒷다리 대퇴사두근을 두 시간 동안 허혈-재판류 후 시간 경과에 따른 SOD 면역조직화학적 반응을 관찰한 대조군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군 모두에서 일부 근육세포에서 SOD의 항체에 대한 경미한 면역반응이 관찰되었다(Table 1, Figure 1a, 1b, 1c).

2. 허혈-재판류 직전 한냉을 적용 시킨 실험군의 SOD 면역조직화학적 소견

흰쥐의 우측 대퇴사두근에 두 시간 동안 허혈 후 재판류 직전에 5분간 한냉을 적용한 실험군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군 모두에서 SOD의 항체에 대한 경도의 양성 반응이 관찰되었으며, 대조군 보다 강한 면역반응이 관찰되었으나 시간대 별로는 큰 차이가 없었다(Table 1, Figure 1d, 1e, 1f).

3. 허혈-재판류 직후 한냉을 적용한 실험군의 SOD 면역조직화학적 소견

흰쥐의 우측 대퇴사두근에 두 시간 동안 허혈 후에 재판류 직후 5분간 한냉을 적용시킨 실험군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군 모두에서 SOD의 항체에 대한 면역반응이 강하게 관찰되었으며, 한냉 적용후 허혈-재판류 시킨 군보다 훨씬 강한 양성 반응을 보였다. 시간대 별로는 큰 차이가 관찰되지 않았다(Table 1, Figure 1g, 1h, 1i).

Table 1. SOD immunohistochemical reactions on control and experimental groups by reperfusion time.

Time after reperfusion	Control	Intervention	
		PreCold	PostCold
30 min	\pm	$\pm +$	+++
1 hr	$\pm -$	$\pm +$	+++
3 hrs	$\pm -$	$\pm +$	+++

- : no reaction, \pm : trace reactivity, + : weak reactivity
 ++ : moderate reactivity, +++ : strong reactivity.

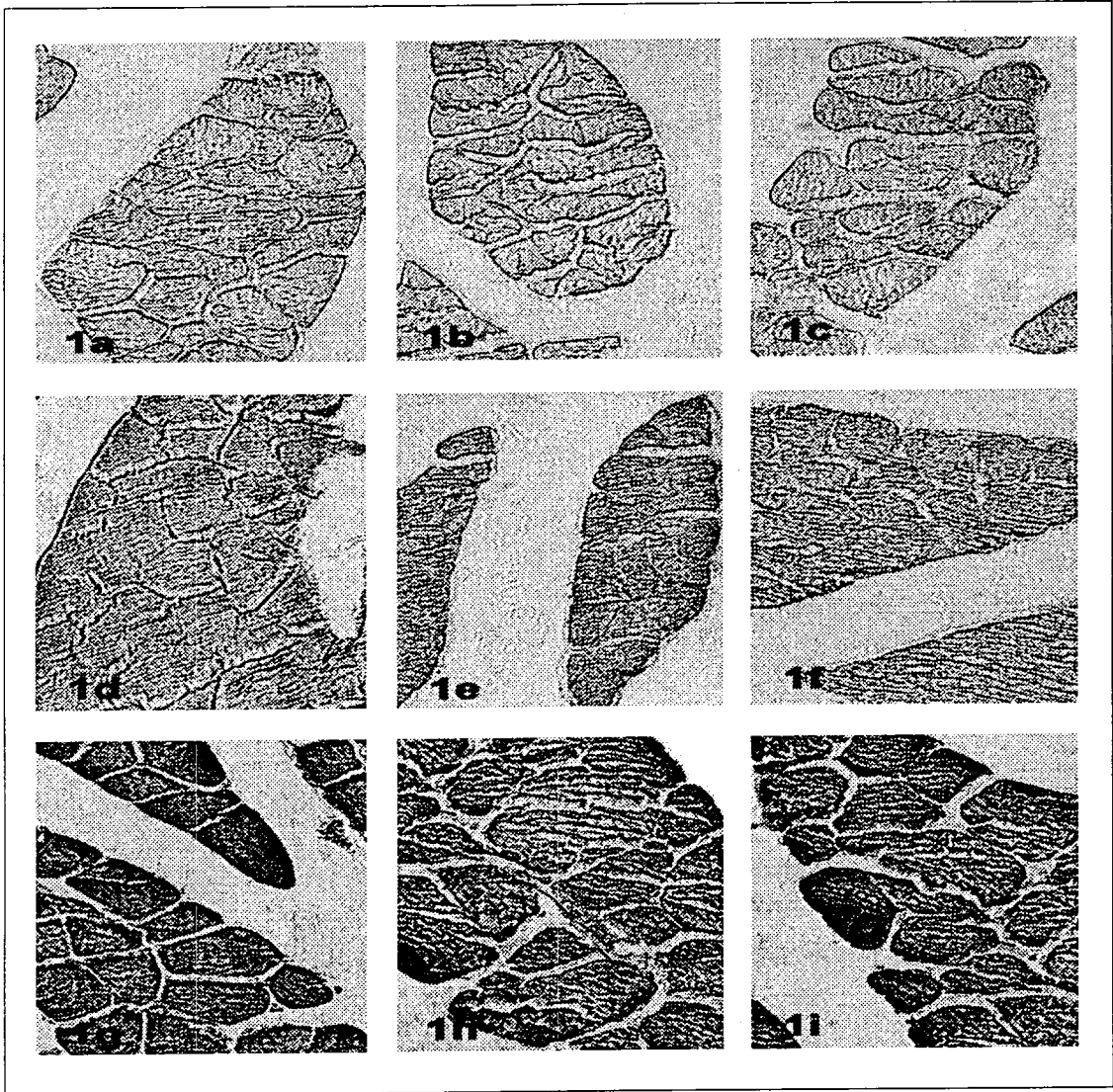


Fig 1. Superoxide dismutase(SOD) immunohistochemical reaction on the quadriceps femoris muscle in control and experimental group × 40

- 1a : control rat. 30 minutes reperfusion after 2 hours ischemia**
- 1b : control rat. 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia**
- 1c : control rat. 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia**
- 2d : precold rat. 30 minutes reperfusion after 2 hours ischemia**
- 2e : precold rat. 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia**
- 2f : precold rat. 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia**
- 3g : postcold rat. 30 minutes reperfusion after 2 hours ischemia**
- 3h : postcold. rat. 1 hour reperfusion after 2 hours ischemia**
- 3i : postcold. rat. 3 hours reperfusion after 2 hours ischemia**

V. 고 찰

골격근의 허혈-재관류 손상은 산화제(oxidant)의 생성, 염증전구매개체(proinflammatory mediator)의 생성, 백혈구의 침윤, Ca^{2+} 의 과부하, 인지질의 과산화와 고갈, ATP 생성의 감소와 같은 복합적인 요인에 의해 일어난다(Rubin 등, 1996).

Paletta 등(1960)은 국소 한냉 적용으로 개의 뒷다리에 5시간 허혈을 유발한 후 부종과 마비가 현저하게 감소하였다고 보고하였고, Hamel과 Moe(1964)는 개의 뒷다리에 18℃의 국소 한냉적용과 실온에서 각각 5시간 허혈을 유발한 결과, 실온보다 국소 한냉을 적용하였을 때 부종이 더욱 감소하였다고 주장하였다. Osterman 등(1984)은 핵자기공명분광검사장치(nuclear magnetic resonance spectroscopy)를 이용하여 절단된 고양이의 뒷다리를 22℃ 실온과 1℃의 한냉수에 담구어 pH와 ATP를 검사하였는데, ATP는 두 집단에서 동일한 비율로 소모되었지만, 한냉을 적용한 뒷다리에서 초기 알칼리증(initial alkalosis)이 나타나 이것은 한냉 적용이 허혈손상을 감소하는데 효과적이라고 시사하였다. Irving과 Noakes(1985)는 돼지 뒷다리를 대상으로 실온에서 허혈을 유발한 집단과 한냉을 적용하여 허혈을 유발한 집단으로 구분하여 재관류 후 허혈-재관류 손상을 비교관찰하였는데, 한냉을 적용한 집단에서 염증반응이 더욱 감소하였고, 회복속도가 더욱 빠르다고 보고하였다.

Fish 등(1989)은 쥐의 뒷다리를 대상으로 허혈을 1시간, 2시간, 3시간, 4시간으로 구분한 후 유발한 다음 재관류하여 2주후에 비복근의 등척성 수축력을 측정하였는데, 허혈시간이 길수록 골격근의 수축력이 감소한다고 보고하였다. Fish 등(1993)은 쥐의 뒷다리를 대상으로 2시간 허혈 후 재관류하여 비복근의 등척성 수축력을 측정하였는데, 허혈기간에 한냉을 적용한 집단과 실온에서 허혈을 유발한 집단으로 구분하여 연구한 결과, 실온에서 허혈을 유발한 집단이 한냉을 적용한 집단보다 허혈-재관류 손상으로 인한 근수축력 감소가 현저하게 관찰되어, 한냉적용이 허혈-재관류 손상에 효과적이라고 주장하였다.

Wright 등(1989)은 골격근의 허혈-재관류 손상으로 인해 발생하는 부종을 감소시키기 위해 개의 박근을 대상으로 6시간 허혈 후 1시간 재관류하여 미세전극(microelectrode)를 이용하여 간질성 근육의 pH를 측정

하였고, 알부민(albumin)을 분석하여 혈관 투과성을 측정하였다. 그 결과 한냉의 적용으로 pH의 증가와 근육의 부종감소가 유의하게 나타났다고 보고하였다. Awerbuck 등(1994)은 쥐의 뒷다리를 대상으로 4시간 허혈 후 재관류하여 허혈-재관류 손상을 연구하였는데, 실험동물은 실온에서 허혈을 유발한 집단과 허혈기간동안 5~8℃의 한냉을 적용한 집단으로 구분하였다. 허혈 후 재관류하여 6주 후에 비복근의 등척성 수축기능을 검사한 결과, 허혈기간 동안 한냉을 적용한 집단보다 실온에서 허혈을 유발한 집단에서 근수축력의 감소가 현저하게 증가하였다.

Bolognesi 등(1996)은 쥐의 장지신근을 대상으로 4℃의 한냉 또는 23℃의 조건에서 90분, 3시간, 5시간 허혈을 유발한 후 재관류하여 근수축력을 검사하였는데, 허혈시간이 길수록 근수축력은 감소하였고, 한냉을 적용한 집단이 실온에서 허혈을 유발한 집단보다 근수축력이 약 3배 증가하였다고 주장하였다. An 등(1997)은 토끼 뒷다리를 대상으로 허혈-재관류 손상을 연구하기 위해 허혈을 유발하기 전에 한냉팩을 15분간 적용하거나 실온에서 4시간 또는 5시간 허혈 후, 1시간 또는 2시간 재관류하였다. 그 결과 한냉을 적용한 집단에서 대조군보다 SOD가 높게 관찰되어 허혈-재관류 손상이 감소하였다고 보고하였다.

골격근에 허혈 재관류 손상은 근육의 형태(muscle type)에 따라 다르게 나타날 수 있다. 서근(slow twitch muscle)과 속근(fast twitch muscle)은 내형질세망(sarcoplasmic reticulum) 막의 분포, Ca^{2+} ATPase의 동종(isoform)의 성분량, Ca^{2+} 섭취 특성이 다르기 때문에, 허혈 재관류는 Ca^{2+} ATPase 활동에 다르게 영향을 미칠 수 있다(Wu와 Lytton, 1993; Dux, 1993). Green 등(1996)은 쥐를 대상으로 1시간, 2시간, 3시간 허혈시킨 후 2시간을 재관류시켜 장지신근과 가지미근에서 내형질세망 Ca^{2+} ATPase의 활동을 관찰하였는데, 장지신근에서는 허혈시간이 증가할수록 내형질세망 Ca^{2+} ATPase의 활동이 감소하였으나, 가지미근은 허혈시간이 증가하더라도 내형질세망 Ca^{2+} ATPase의 활동이 감소하였지만 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이러한 허혈 재관류로 인한 내형질세망 Ca^{2+} ATPase의 감소원인은 명확히 밝혀지지 않았지만, ATP와 결합하는 뉴클레오타이드 결합지점(nucleotide-binding site)에 효소변화 때문이거나(Dux, 1993), 허혈 재관류 동안 내형질세망 기능장애로 허혈로 인해 단

백분해효소(proteolytic enzyme)의 활성화로 내형질세망이 분해될 수 있다(Konno 등, 1987 ; Kukreja 등, 1988). 또는 재관류로 인해 발생한 자유기의 공격을 내형질세망이 쉽게 받기 때문에 Ca^{2+} 이동에 장애가 온 것으로 생각된다(Hess 등, 1981). Gurke 등(2000)은 속근이 서근보다 허혈에 잘 견디고, 근육의 온도를 낮추면 허혈 재관류 손상을 감소시킬 수 있다고 하였다.

허혈로 인한 골격근의 손상은 크게 두 단계로 나누는데, 허혈 동안 이온평형과 항상성(homeostasis)을 유지하기 위해 세포는 무산소 대사과정을 통해 에너지를 이용하고, 효소체계에 손상으로 세포는 사망하게 된다. 재관류 동안 자유기의 생성, 화학반응물(chemoreactant substance)의 유리(release), 그리고 백혈구들의 유착이 증가하여 조직을 손상시킨다. 수산화기(hydroxyl radical)가 세포손상에 가장 큰 영향을 미치는 자유기로 지방과산화(lipid peroxidation)를 일으킨다(Chabel 등, 1990).

본 연구는 골격근의 허혈-재관류 손상에서 한냉 적용의 효과를 관찰하기 위해 Sprague-Dawley계 흰 쥐를 사용하여 대조군과 실험군으로 나누어 총장골동맥 기시부 상방 복대동맥을 2시간 결찰 후 재관류하여 재관류 후 30분, 1시간, 3시간 경과시에 흰 쥐 오른쪽 뒷다리의 대퇴사두근을 적출하여 SOD 면역조직화학적 반응의 변화를 비교 관찰하였다. 재관류 후 경과시간대별 SOD 면역조직화학적 반응을 관찰한 결과, 대조군보다 실험군에서 SOD 면역조직화학적 반응이 높게 관찰되었으며, 재관류 전 한냉적용군 보다 재관류 후 한냉적용군에서 훨씬 강한 면역반응이 관찰되었다. 이는 대조군보다 실험군에서 허혈-재관류 손상이 감소할 것임을 시사하는 것이다. 또한 재관류 전 한냉적용보다 재관류 후 한냉적용이 허혈-재관류 손상을 감소시키는데 효과적인 것으로 사료되며, 토끼의 귀(ear)를 대상으로 허혈-재관류 손상을 감소시키기 위한 한냉적용은 허혈 기간의 한냉적용보다 재관류 기간의 한냉적용이 더 효과적이라고 주장한 Cornejo 등(1998)의 연구 결과와 일치하였고, 개의 박근(canine gracilis muscle)을 대상으로 재관류 후 한냉적용으로 허혈-재관류 손상이 감소하였다는 Wright 등(1989)의 연구결과와 토끼의 대퇴직근(rectus femoris muscle)을 대상으로 허혈 및 재관류 동안 한냉을 적용한 결과 허혈-재관류 손상이 감소하였다는 Wilson 등(1997)의 연구결과와 유사하였다. 그러나 흰 쥐의 전경골근(anterior tibialis muscle)을 대상으로 재관류 기

간의 한냉적용보다 재관류 전 한냉적용이 허혈-재관류 손상을 감소시키는데 효과적이라고 주장한 Skejeldal 등(1993)의 연구결과와 상반되었다.

이와 같이 재관류 전 또는 재관류 후에 한냉적용이 허혈-재관류 손상을 감소시킨 것은 한냉이 혈관을 수축시키고 허혈된 골격근의 대사율과 산소요구를 감소시켜 산소자유기(oxygen free radical)의 형성을 감소시킴으로써 허혈-재관류 손상이 감소된 것으로 사료된다. 허혈-재관류 손상은 재관류시키기 전 허혈기간 동안의 손상보다 재관류 기간 동안의 손상이 더 심하게 나타나는데(Haivovici, 1960), 이는 재관류 전보다 재관류 후에 산소자유기가 많이 생성되기 때문이다. 그러므로 재관류 전 또는 재관류 후에 한냉을 적용함으로써 혈관수축이 일어나지만, 산소자유기가 많이 생성되는 재관류 후에 한냉을 적용함으로써 혈관이 수축하고 혈류량이 감소되며, 반응성 산소 종속의 반응을 감소시켜 허혈-재관류 손상이 감소된 것으로 사료된다. Erdogan 등(1999)은 흰 쥐 비복근(gastrocnemius)을 대상으로 허혈 재관류 손상에서 한냉적용의 효과를 관찰하였는데, 한냉적용이 조직의 산화적 스트레스(oxidative stress)를 감소시키는데 효과적이라 하였고, 국소 한냉적용이 국소 골격근의 대사율을 감소시키고, 허혈로 인한 부종을 감소시키며 미세혈관의 변화를 감소시킨 것으로 생각된다고 주장하여 본 연구 결과와 일치하였다.

VI. 결 론

골격근의 허혈-재관류 손상에서 한냉적용의 효과를 관찰하기 위해 실험동물로 Sprague-Dawley계 흰 쥐를 사용하여, 실험동물을 대조군과 실험군으로 나누었다. 대조군은 허혈-재관류군으로 실험기간 중 아무런 처치를 하지 않았고 2시간 허혈 후 재관류만 시행하였고, 실험군은 2시간 허혈 후 재관류 직전에 한냉을 적용시킨 군 그리고 2시간 허혈 후 재관류 직후에 한냉을 적용시킨 군으로 구분하였다.

대조군과 실험군은 총장골동맥 기시부 상방 복대동맥을 2시간 결찰 후 재관류시켰다. 재관류 후 30분 경과시, 1시간 경과시, 3시간 경과시에 흰 쥐 뒷다리의 대퇴사두근을 적출하여 SOD 면역조직화학적 반응의 변화를 관찰한 결과는 다음과 같다.

1. 흰쥐의 뒷다리 대퇴사두근을 두 시간 동안 허혈-재

관류 후 시간 경과에 따른 SOD 면역조직화학적 반응을 관찰한 대조군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군 모두에서 일부 근육세포에서 SOD의 항체에 대한 경미한 면역반응이 관찰되었다.

2. 흰쥐의 우측 대퇴사두근에 두 시간 동안 허혈 후 재관류 직전에 5분간 한냉을 적용한 실험군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군 모두에서 SOD의 항체에 대한 정도의 양성 반응이 관찰되었으며, 대조군 보다 강한 면역반응이 관찰되었으나 시간대 별로는 큰 차이가 없었다.

3. 흰쥐의 우측 대퇴사두근에 두 시간 동안 허혈 후에 재관류 직후 5분간 한냉을 적용시킨 실험군의 경우, 30분, 1시간, 3시간 경과군 모두에서 SOD의 항체에 대한 면역반응이 강하게 관찰되었으며, 한냉 적용후 허혈-재관류 시킨 군보다 훨씬 강한 양성 반응을 보였다. 시간대 별로는 큰 차이가 관찰되지 않았다.

따라서 본 연구의 결과로 볼 때, 허혈-재관류로 인한 조직의 2차적인 손상은 한냉을 적용함으로써 어느 정도 줄일 수 있으며, 또한 본 연구를 통해 현재 임상에서 적용하고 있는 다양한 한냉치료의 효과를 분자생물학적으로 접근하여 증명할 수 있으리라 사료된다.

〈 참고 문헌 〉

- An H, Jiang D, Ni W : Experimental study prevention of reperfusion injury of skeletal muscle by local hypothermia and its clinical application, *Chung Kuo Hsiu Fu Chung Wai Ko Tsa Chih*, 11(1), 52-55, 1997.
- Awerbuck D, Luong V, Plyley M et al : Skeletal muscle form and function after 4 hr ischemia-hypothermia, *J Surg Res*, 57, 480-486, 1994.
- Blebea J, Kerr JC, Hobson RW et al : The effects of oxygen free radical scavengers on skeletal muscle ischemia and reperfusion injury, *Curr Surg*, 44, 396-398, 1987.
- Bolognesi MP, Chen L, Seaber A et al : Protective effect of hypothermia on contractile force in skeletal muscle, *J Orthop Res*, 14, 390-395, 1996.
- Chabel C, Russel LC, Lee R : Tourniquet-induced limb ischemia, neurophysiologic animal model, *Anesthesiology*, 72, 1038-1044, 1990.
- Cornejo CJ, Kierney PC, Vedder NB et al : Mild hypothermia during reperfusion reduces injury following ischemia of the rabbit ear, *Shock*, 9(2), 116-120, 1998.
- Dux L : Muscle relaxation and sarcoplasmic reticulum function in different muscle types, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 122, 69-147, 1993.
- Erdoggan D, Omeroglu S, Sarban S et al : Prevention of oxidative stress due to tourniquet application analysis of the effects of local hypothermia and systemic allopurinol administration, *Acta Orthop Belg*, 65(2), 164-169, 1999.
- Fish JS, McKee NH, Pynn BR et al : Isometric contractile function recovery following tourniquet ischemia, *J Surg Res*, 47(4), 365-370, 1989.
- Fish JS, McKee NH, Kuzon WM et al : The effect of hypothermia on changes in isometric contractile function in skeletal muscle after tourniquet ischemia, *J Hand Surg(Am)*, 18(2), 210-217, 1993.
- Green HJ, McKee NH, Carvalho AJ et al : Ischemia induced alterations in sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity in rat soleus and EDL, *Am J Physiol*, 271, 1942-1948, 1996.
- Gurke L, Marx A, Sutter PM et al : Function of Fast- and Slow-Twitch Rat Skeletal muscle following Ischemia and Reperfusion at Different Intramuscular Temperature, *European Surgical Research*, 32(3), 135-141, 2000.
- Haimovici H : Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria : Evaluation of a hitherto nureported syndrome with report of two cases, *Surgery*, 47, 739-747, 1960.
- Haimovici H : Metabolic complication of acute arterial occlusions, *J Cardiovasc Surg*, 20,

- 349-355, 1979.
- Hamel AL, Moe J : Effect of total ischemia on hind limbs of dogs subjected to hypothermia, *Surgery*, 55, 274-280, 1964.
- Hess MI, Okabe F, Kontos HA : Proton and free radical interaction with the calcium transport system of cardiac sarcoplasmic reticulum, *J Mol Cell Cardiol*, 13, 767-772, 1981.
- Irving GA, Noakes TD : The protective role of local hypothermia in tourniquet-induced ischemia of muscle, *J Bone*, 1985.
- Konno N, Yanagishita T, Geshi F et al : Degradation of cardiac sarcoplasmic reticulum in acute myocardial ischemia, *Jpn Circ J*, 51, 411-420, 1987.
- Kukreja RG, Okabe E, Schrier GM et al : Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca^{2+} - ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum, *Arch Biochem Biophys*, 261, 447-457, 1988.
- Labbe R, Cindsay T, Walker PM : The extent and distribution of skeletal muscle necrosis after graded periods of complete ischemia, *J Vasc Surg*, 6, 152-157, 1987.
- Libonati JR, Gaughan JP, Hefner CA et al : Reduced ischemia and reperfusion injury following exercise training, *Med Sci Sports Exerc*, 29(4), 509-516, 1997.
- Osterman AL, Heppenstall RB, Sapega AA et al : Muscle ischemia and hypothermia : a bioenergetic study using phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J Trauma*, 24, 811-817, 1984.
- Paletta FX, Willman V, Ship AG : Prolonged tourniquet ischemia of extremities, *J Bone Joint Surg*, 42(A), 945-948, 1960.
- Rice-Evans CA, Diplock AT : Current status of antioxidant therapy, *Free Radic Biol Med*, 15, 77-96, 1993.
- Rubin BB, Romaschin A, Walker PM et al : Mechanisms of postischemic injury in skeletal muscle : intervention strategies, *J Appl Physiol*, 80(2), 369-387, 1996.
- Skjeldal S, Torvik A, Nordsletten L et al : Local hypothermia during ischemia or reperfusion in skeletal muscle, *Res Exp Med(Berl)*, 193(2), 72-80, 1993.
- Smith JK, Carden DL, Grisham MB et al : Role of iron in postischemic microvascular injury, *AM J Physiol*, 256, 1472-1477, 1989.
- Wilson YT, Lepore DA, Riccio M et al : Mild hypothermia protects ischaemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle, *Br J Plast Surg*, 50(5), 343-348, 1997.
- Wright JG, Araki CT, Belkin M et al : Postischemic hypothermia diminishes skeletal muscle reperfusion edema, *J Surg Res*, 47(5), 389-396, 1989.
- Wright JG, Kerr JC, Valeri CR et al : Regional hypothermia protects against ischemia-reperfusion injury in isolated canine gracilis muscle, *J Trauma*, 28(7), 1026-1031, 1988.
- Wu K, Lytton J : Molecular cloning and quantification of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isoforms in rat muscles, *Am J Physiol*, 204, 333-341, 1993.