

만성폐쇄성폐질환 환자의 혈청 및 유도객담에서의 항산화제

전남대학교 의과대학 내과학교실

박형관, 유영권, 김규식, 임성철, 김영철, 박경옥

= Abstract =

Antioxidants in Serum and Induced Sputum of COPD Patients

Hyeon-Kwan Park, M.D., Young-Kwon Yu, M.D., Kyu-Sik Kim, M.D.,
Sung-Chul Lim, M.D., Young-Chul Kim, M.D., Kyung-Ok Park, M.D.

Departments of Internal Medicine, College of Medicine, Chonnam National University, Kwangju, Korea

Background : Although an oxidants and antioxidants imbalance has been considered in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), there is a paucity of reports focussing on the smoking-induced changes of oxidants and antioxidants in COPD.

Method : The concentration of antioxidants (ascorbic acid, uric acid, retinol, and α - & γ -tocopherol) was measured in the serum and induced sputum of 30 healthy controls and 34 stable COPD patients using high performance liquid chromatography (HPLC). The inhibition of lipid peroxidation as an index of antioxidant capacity was measured in the serum by a TBA assay.

Results : The serum concentration of ascorbic acid, α -tocopherol, and retinol were significantly lower in the patients with COPD than in healthy controls (484.8 ± 473.3 vs 1497.8 ± 819.2 pmol/L, $p < 0.001$, 48.38 ± 17.34 vs 73.96 ± 26.29 pmol/L, $p < 0.001$, and 9.51 ± 8.33 vs 15.01 ± 5.88 pmol/L, $p < 0.05$, respectively, mean \pm SD). However, there were little differences in the ascorbic acid and uric acid concentrations in the induced sputum between the COPD patients and the controls. The induced sputum to serum ratio of ascorbic acid was significantly higher in COPD patients compared with healthy control (0.375 vs 0.085 , $p < 0.05$). In the normal con-

¹이 논문은 1999년도 전남대학교 학술연구비/연구년교수연구비 지원에 의하여 연구되었음.

Address for correspondence :

Kyung-Ok Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Chonnam University Hospital

8 Hakdong, Dong-gu, Kwangju 501-757, Korea

Phone : 82-62-220-6573 Fax : 82-62-225-8578 E-mail : kopark@chonnam.ac.kr

trols, the serum ascorbic acid concentration was lower in smokers than in nonsmokers (1073 ± 536 vs 1757 ± 845 pmol/L, $p < 0.05$), but the level was still higher than that of the COPD patients ($p < 0.05$). The serum retinol levels were correlated with FEV₁ in COPD patients ($r = 0.58$, $p < 0.05$). The products of lipid peroxidation were increased in normal smokers and COPD compared with normal nonsmokers (115.56 ± 19.93 and 120.02 ± 24.56 vs 91.87 ± 20.71 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol Pi}$ of liposome, $p < 0.05$).

Conclusion : Cigarette smoking may induce the depletion of serum antioxidants and this depletion of antioxidants is suggested to play a role in the pathogenesis of COPD. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 158-170)

Key words : Chronic obstructive pulmonary disease, Antioxidant, Sputum.

서 론

폐기종을 중심으로 단백분해효소와 항단백분해효소에 집중되어 있던 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease, 이하 COPD)의 병태생리 연구에 최근에는 산화제와 항산화제간의 불균형기전이 중요시되고 있다¹. 인체내에서 산화제의 독성과 항산화제 기전의 방어효과간에는 정교한 균형이 유지되는데 이는 정상적인 폐기능을 유지하는데 매우 중요하다. 만약 이 균형이 깨져 산화제의 독성효과가 우세해지는 경우를 산화 스트레스(oxidative stress)라고 하며 반복적인 산화 스트레스에 의해 폐손상이 거듭되면 중국에는 정상적인 폐기능을 유지할 수 없게 된다고 설명하고 있다².

현재까지의 연구는 대부분 흡연이 산화 스트레스로 작용하며 동시에 항산화제의 농도를 약화시켜 이들간의 불균형을 야기하는 것에 주안점을 두어왔으나, 대부분의 원인이 흡연에 의한 것으로 알려져 있는 COPD 환자에서 산화 스트레스의 정도나 여러 항산화제들의 변화에 대해서는 정상인들과 비교되어 있는 연구가 그리 많지 않다. 또한 최근 각종 호흡기질환의 병태생리를 규명하는데 활발히 이용되고 있는 유도객담에서의 산화제나 항산화기능의 정도에 대한 연구는 아직까지 없는 것으로 알려져 있다.

이에 저자는 COPD 환자의 혈청 및 유도객담에서 현재까지 알려진 주요한 항산화제들을 측정하여 정상

인과 비교하고 흡연이 이들에 미치는 영향을 검토하고 여러 폐기능 검사들과의 상관관계를 알아보았으며 또한 산화 스트레스의 지표로 흔히 이용되는 지질과산화 정도를 측정하여 항산화제와의 불균형에 대해 알아보 고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

환자군은 전남대학교병원 호흡기내과에서 COPD로 진단받고 치료중인 34명을 대상으로 하였다. COPD 환자는 미국흉부학회에서 제시한 진단기준에 따라 FEV₁ (forced expiratory volume in one second), FEV₁/FVC (forced vital capacity) 가 각각 75%, 70% 이하로 감소되어 있고 베타 항진제의 흡입후에도 FEV₁이 12% 및 200ml 이상의 개선을 보이지 않으며 임상적으로 안정된 환자만을 대상으로 하였다³. 임상적으로 안정된 환자의 진단기준으로는 최근 1개월 동안 호흡곤란, 기침, 객담등의 주요증상에 유의한 변화가 없고 기존의 치료에 큰 변화가 없으며 폐렴등의 급성질환이 없었던 경우를 의미하였다. 환자군 34명의 평균 연령은 65세였으며 5명을 제외한 29명이 흡연자였고 평균 FEV₁은 1.14 ± 0.55 L (추정 정상치의 47.1 \pm 19.5%)였다. 정상 대조군은 총 30명이었으며 호흡곤란이나 급성 감염등의 병력이 없고 폐기

Table 1. General characteristics of normal controls and patients with COPD*

	Control	COPD	p value
Numbers	30	34	NS [†]
Age(years)	61.1±8.1	64.5±6.4	NS
Sex(M/F)	14/16	29/5	<0.01
Smoking(Y/N)	13/17	28/6	<0.01
FEV ₁ (L)	2.46±0.76	1.14±0.55	<0.001
%FEV ₁ (%)	94.9±13.5	47.1±19.5	<0.001
FVC(L)	3.05±1.03	2.34±1.00	<0.01
%FVC(%)	94.8±13.8	68.1±23.2	<0.001
FEV ₁ /FVC(%)	81.9±10.5	50.1±15.6	<0.001

*The data are expressed as mean ± SD

[†]NS : nonspecific (p>0.05)

능 검사상 정상 범위에 해당되는 사람들을 대상으로 하였다. 대조군의 평균연령은 61세였으며 13명이 흡연자였고 평균 FEV₁은 2.46±0.76 L (94.9±13.5%)였다(Table 1). 대조군에서의 흡연자는 모두 20갑년 이상의 흡연력을 가진 이만을 대상으로 하였다. 양군 모두 고혈압, 당뇨, 고지혈증의 병력이나 최근 2개월동안 비타민 복용의 병력이 있는 경우는 제외하였다.

2. 객담 유도

기본적인 폐기능 검사(Vmax, Sensormedics, USA)를 시행한 후 3%의 고장성 생리 식염수를 10분간 연무기를 이용하여 흡입시켰다. 흡입후 다시 폐기능 검사를 시행하여 FEV₁이 20%이상 감소되지 않음을 확인하고 만약 20%이상 감소시에는 베타 항진제 흡입을 시행한 뒤 더 이상의 객담유도는 하지 않음을 원칙으로 하였다. 흡입이 끝나면 코를 풀고 입안을 물로 헹군 뒤 큰 기침을 하여 객담을 배출시키게 하였다. 이 과정에서 최대한 타액이 섞이지 않도록 주의하였다. 깨끗한 용기에 객담을 받아 냉장보관한 뒤 2시간 이내에 처리하였다. 만족스러운 정도의 적절한 객담이 받아질때까지 연무기를 이용한 식염수 흡입을 반복하

였다.

3. 유도된 객담 처리

먼저 객담의 양을 기록한 뒤 동량의 dithiothreitol (DTT, Sigma, USA)를 첨가하여 점액의 disulfide 결합을 끊어준 다음 점액성분이 완전히 풀리도록 vortex mixer로 충분히 섞어주었다. 15분간 37℃에서 반응시킨후 다시 동량의 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS, Life Technologies, USA)을 첨가하여 5분간 동질화시켰다. 10분간 1000g의 속도로 원심분리시킨 후 상층액을 떠서 Eppendorf tube에 담아 -70℃ 냉동고에 보관하였다. 침전된 부분은 hemocytometer를 이용, 현미경으로 관찰하여 상피세포가 전체 유헤세포의 50%이하인 경우만 적절한 시료로 평가하였다.

4. 항산화제 측정

고성능 액체 크로마토그래프(High Performance Liquid Chromatograph, 이하 HPLC)를 이용하여 수용성 항산화제인 아스코르빈산(ascorbic acid, vitamin C), 요산(uric acid)과 지용성 항산화제에 속하

는 레티놀(retinol, vitamin A), 알파 및 감마 토코페롤(α & γ -tocopherol, vitamin E) 등을 측정하였다. HPLC는 2150 HPLC pump (LKB Biotechnology, Sweden), 2152 HPLC controller (LKB, Sweden)와 CoulArray® detector (ESA, USA)를 사용하였다.

모든 시료는 HPLC 측정전에 불순물을 제거하기 위해 전처리하였는데 수용성 항산화제의 측정을 위해서는 200 μ L의 시료(혈청 및 유도객담 상층액)에 0.6M PCA와 1mM EDTA가 섞어진 동량의 용액과 혼합하여 4°C에서 12,000g의 속도로 30분간 원심분리한 뒤 얻은 상층액을 측정에 사용하였다. 지용성 산화제의 측정을 위해서는 200 μ L의 시료에 BHA (butylated hydroxyanisole)가 혼합된 0.2mL의 용액을 혼합하여 1분간 vortexing한 후 1mL의 hexan을 첨가하여 다시 10분간 vortex mixer를 이용하여 충분히 섞었다. 이를 10분간 4,000rpm의 속도로 원심분리한 뒤 0.8mL의 상층액을 얻어내어 N₂ 가스를 이용하여 hexan 성분을 증발시켰다. 증발후 남은 시료에 BHA 0.2mL의 희석액을 첨가한 후 다시 5분간 섞은 다음 측정을 시작하였다.

HPLC는 수용성 항산화제의 경우 PhaseSep® ODS₂, 3 μ m, 150×4.6mm 컬럼을 사용하였으며, Honegger등⁴의 방법을 약간 변형시켜 측정하였다. 이동상으로는 0.1M monobasic sodium phosphate에 5% 메탄올과 0.1mM EDTA를 섞은 후 o-phosphoric acid를 이용하여 pH 2.5로 적정한 용액을 사용하였다. 유속은 0.8mL/min으로 하였고 검출을 위한 각 채널의 전압은 채널 1부터 4까지 각각 200, 400, 600, 800mV로 설정하였다. 반응온도는 30°C로 하였고 측정에 쓰인 시료량은 20 μ L로 하였다.

지용성 항산화제의 측정은 수용성의 경우와 동일한 컬럼을 사용하였고 CoulArray사에서 제공한 지침서를 참조하였다⁵. 이동상으로는 A와 B의 2가지를 사용하여 미리 프로그램화된 시간에 따른 농도구배를 주었다. 이동상 A는 메탄올과 0.2M ammonium acetate를 9:1의 용적비로 혼합한 뒤 약염산을 이용하여

pH 4.4로 적정하였고, 이동상 B는 메탄올과 1-propanol, 1M ammonium acetate를 각각 78:20:2의 용적비로 혼합하여 pH 4.4로 적정한 뒤 사용하였다. 유속, 검출기, 각 채널의 전압, 온도, 시료량 등은 수용성의 경우와 같은 조건으로 하였다. 모든 이동상에 쓰이는 용액들은 진공여과시킨 후 사용하였다.

5. 지질과산화(lipid peroxidation) 억제능 측정

금속 촉매 산화계(metal-catalyzed oxidation system)로 리포솜(liposome)을 산화시키는 과정에서 혈청의 지질과산화 억제능을 구하여 혈청의 항산화능을 알아보았다. 50mM potassium phosphate 완충액(pH 7.4), 100nmol Pi/mL의 리포솜, 0.2mM 아스코르빈산 및 50 μ M FeSO₄를 포함하는 반응액에 1mg의 단백질을 포함한 혈청을 가한후 37°C 진동수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 때 반응액의 총 부피는 1.0mL로 하였다. 1시간후 2mM EDTA를 첨가하여 반응을 정지시키고 여기에 TBA(thiobarbituric acid, 0.375% (w/v) TBA-15% (w/v) TCA-0.25 N HCl) 시약을 가한후 잘 섞었다. 이를 100°C에서 15분간 가열한 뒤 수돗물에 담궈서 식히고 원심분리하여 그 상층액을 얻었다. 이를 535nm의 파장에서 분광광도계(Spectronic 601, Milton-Roy, USA)로 측정하였다. 지질과산화물의 양은 MDA(malondialdehyde)의 분자흡광계수($E_{535}^{MDA} = 1.53 \times 10^6$)를 이용하여 계산하였다⁶.

6. 자료 분석

통계 처리는 SPSS WIN 7.5를 이용하였으며 결과는 평균 ± 표준편차로 표현하였다. 평균치간의 차이는 정규분포를 따르는 경우는 Student's T test를, 정규분포를 따르지 않는 경우는 Mann-Whitney U test를 사용하였고 상관관계는 Spearmann's rank correlation test를 이용하였다. 세 군 이상의 평균 비교는 ANOVA를 이용하였다. 모든 p값은 0.05이하를 통계적으로 유의한 값으로 간주하였다.

Table 2. The concentrations of antioxidants in serum in normal controls and patients with COPD

	Control (n=30)	COPD (n=34)	p value
Ascorbic acid(pmol/L)	1497.8±819.2	484.8±473.3	<0.001
Uric acid(mg/dL)	4.85±1.49	4.51±1.56	NS
Retinol(pmol/L)	15.01±5.88	9.51±8.33	<0.05
α-tocopherol(pmol/L)	73.96±26.29	48.38±17.34	<0.001
γ-tocopherol(pmol/L)	56.27±11.66	50.56±12.01	NS

Table 3. The concentrations of antioxidants in induced sputum in normal controls and patients with COPD

	Control (n=30)	COPD (n=34)	p value
Ascorbic acid(pmol/L)	151.76±72.85	175.32±100.62	NS
Uric acid(mg/dL)	0.40±0.32	0.41±0.32	NS

Table 4. The antioxidant ratio of induced sputum to serum in normal controls and patients with COPD

	Control (n=30)	COPD (n=34)	p value
Ascorbic acid	0.085±0.081	0.375±0.491	<0.05
Uric acid	0.097±0.059	0.070±0.055	NS

결 과

1. 혈청에서의 항산화제 농도

혈청내 아스코르빈산의 농도는 COPD 환자군에서 484.8±473.3 pmol/L로 정상대조군의 1497.8±819.2 pmol/L에 비해 유의하게 감소되어 있었다(p<0.001). 또한 알파 토크페롤과 레티놀의 농도도 환자군에서 유의하게 감소되어 있었다(각각 48.38±17.34 vs 73.96±26.29 pmol/L, p<0.001, 9.51±8.33 vs 15.01±5.88 pmol/L, p<0.05). 그러나 감마 토크페롤의 농도는 환자군에서 정상인에 비해 낮은 경향을 보이기는 했으나(50.56±12.01 vs 56.27±11.66 pmol/L) 통계학적으로 의의가 없었고, 요산농도는 양군에서 거의 비슷한 결과를 나타내었다(4.51±1.56 vs 4.85±1.49 mg/dL) (Table 2).

2. 유도객담에서의 항산화제 농도

유도객담내 아스코르빈산과 요산 농도는 정상인과 COPD간에 유의한 차이를 보이지 않았다(각각 151.76±72.85 vs 175.32±100.62 pmol/L, 0.40±0.32 vs 0.41±0.32 mg/dL) (Table 3). 그러나 객담내 아스코르빈산 농도를 혈청내 농도로 나눈 값은 정상인에 비해 COPD 환자군에서 유의하게 증가되어 있었다(0.085±0.081 vs 0.375±0.491, p<0.05). 반면 요산의 경우는 양군간에 유의한 차이를 보이지 않았다(0.097±0.059 vs 0.070±0.055) (Table 4). 지용성 항산화제들은 검사상 거의 검출되지 않을 정도의 낮은 농도를 보여 제외하였다.

3. COPD에서 항산화제 농도와 폐기능과의 상관관계

COPD에서 FEV₁이 낮을수록 혈청 레티놀의 농도도

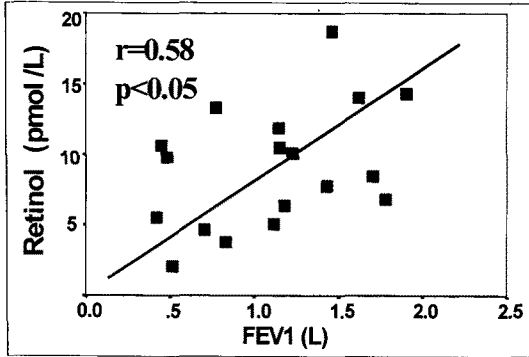


Fig. 1. The correlation between FEV₁ and serum retinol in COPD.

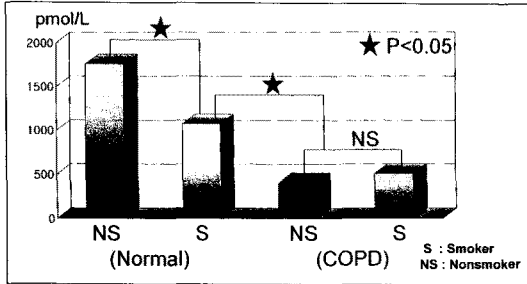


Fig. 2. The smoking effects on serum ascorbic acid in normal and COPD.

낮아지는 순상관관계를 보였다($r=0.577$, $p<0.05$) (Fig. 1). 또한 FEV₁과 FEV₁/FVC가 낮을수록 요산의 농도도 낮아지는 순상관관계를 보였다(각각 $r=0.411$, $p<0.05$, $r=0.397$, $p<0.05$). 그러나 정상에 비해 COPD에서 유의하게 낮은 농도를 보였던 혈청 아스코르빈산은 FEV₁이나 FEV₁/FVC, PaCO₂농도

와의 사이에 유의한 상관관계를 보이지 않았다. 동맥혈 이산화탄소 분압은 모든 항산화제의 농도와 유의한 상관관이 없었다. 흡연량과 여러 항산화제와의 의미있는 상관관계도 관찰되지 않았다.

4. 흡연유무에 따른 항산화제 농도

정상인만을 대상으로 했을 때 흡연자에서 비흡연자에 비해 혈청 아스코르빈산의 농도가 유의하게 낮았으나 (1073 ± 536 vs 1757 ± 845 pmol/L, $p<0.05$) 기타 항산화제간에는 유의한 차이를 보이지 않았다(Table 5). 그러나 정상 흡연자의 혈청 아스코르빈산 농도는 COPD의 흡연자(507.9 ± 458.9 pmol/L), 비흡연자(404.2 ± 286.3 pmol/L) 모두에 비해서 여전히 유의하게 높았다($p<0.05$, Fig. 2). COPD 환자군만을 대상으로 했을 때는 모든 항산화제의 농도에서 흡연유무에 따른 유의한 차이를 관찰할 수 없었다(Table 6). COPD 환자군에서 현재 흡연자와 과거 흡연자간의 항산화제들의 농도에는 모두 유의한 차이가 없었다.

5. 지질과산화(lipid peroxidation) 억제능 측정

MDA농도로 측정한 지질과산화도는 정상인 비흡연자에서 정상인 흡연자와 COPD 흡연자군에 비해 유의하게 낮았다(91.87 ± 20.71 vs 115.56 ± 19.93 and 120.02 ± 24.56 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol Pi}$ of liposome, $p<0.05$). 이는 정상인 비흡연자에서 혈청내 지질과산화를 억제

Table 5. The concentration of serum antioxidants in smokers and nonsmokers with normal controls

	Smoker (n=13)	Nonsmoker (n=17)	p value
Ascorbic acid(pmol/L)	1073 \pm 536	1757 \pm 845	<0.05
Uric acid(mg/dL)	5.01 \pm 1.48	4.76 \pm 1.56	NS
Retinol(pmol/L)	17.17 \pm 5.17	13.83 \pm 6.13	NS
α -tocopherol (pmol/L)	78.42 \pm 29.70	71.52 \pm 25.54	NS
γ -tocopherol (pmol/L)	60.08 \pm 12.78	54.19 \pm 10.79	NS

Table 6. The concentration of serum antioxidants in smokers and nonsmokers with COPD patients

	Smoker (n=28)	Nonsmoker (n=6)	p value
Ascorbic acid(pmol/L)	507.9±530.2	404.2±286.3	NS
Uric acid(mg/dL)	4.74±1.96	3.74±0.54	NS
Retinol(pmol/L)	10.17±8.81	8.56±4.71	NS
α-tocopherol(pmol/L)	47.37±17.56	54.43±15.85	NS
γ-tocopherol(pmol/L)	48.23±7.04	64.59±16.21	NS

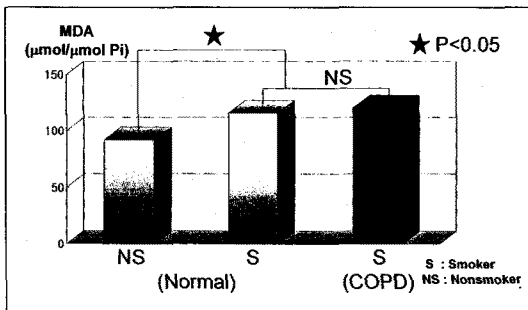


Fig. 3. The products of lipid peroxidation measured as MDA (malondialdehyde) in normal and COPD.

하는 항산화능이 나머지 두 군보다 더 높음을 의미한다. 하지만 흡연자만을 대상으로 했을 때 정상인과 COPD군간에 유의한 차이는 보이지 않았다(Fig. 3). 그리고 각 개인에서 아스코르빈산을 비롯한 항산화제들의 농도와 지질 과산화도 사이의 유관성을 조사하였으나 유의한 상관관계는 관찰되지 않았다. 대상 COPD 환자들 중 비흡연자 6명의 자료는 적절한 실험 성적을 얻기 어려워 자료로써 사용하지 못하였다.

고 찰

1986년 Taylor등¹은 “항산화제의 결핍이 만성 폐쇄성 폐질환과 관련이 있는가?” 라는 의문과 함께 흡연으로 인한 산화-항산화 불균형 이론을 만성 폐쇄성 폐질환에서도 제안하기 시작하였다. 그간 이 질환의 병태생리를 밝히기 위한 많은 연구들이 특히 폐기종에

서 단백분해효소(protease)와 단백분해효소 억제제(protease inhibitor)에 집중이 되어왔으나⁷ 산화제와 항산화제간의 불균형에 대한 연구는 많지 않다. 흡연이 만성 폐쇄성 폐질환의 발생에 가장 중요한 안자이며 담배를 1번 흡입하였을 때 그 속에 10¹⁴개 이상의 활성산소가 함유되어 있다는 점을 감안하면 산화제의 역할에 대한 연구가 필요하겠다⁸⁻¹⁰. 흡연외에도 호흡기계에 반응성 산소종(reactive oxygen species)들의 기원이 될 수 있는 것들로써는 여러 가지가 있는데, 정상적인 세포의 대사과정에서도 생성될 수 있고, 감염증이 있을 때 기도내의 식균세포들에 의해 형성될 수도 있으며 오존이나 이산화질소등의 대기오염의 결과로 외부 환경으로부터 직접 흡입되어 만들어질 수도 있다고 알려져 있다¹¹⁻¹².

산화제의 독성과 세포내외의 항산화제의 방어효과간에는 정교한 균형이 유지되는데 이는 정상적인 세포의 기능을 유지하기 위해서 매우 중요하다. 만약 이 균형이 깨져 산화제의 독성효과가 우세해지는 경우를 산화 스트레스(oxidative stress)라고 하며 이로 인해 정상적인 세포의 기능이 파괴되어 여러 질환을 야기할 수 있다고 한다².

항산화능을 평가하기 위해 여러 지표들이 쓰이는데 대표적인 것으로는 trolox equivalent antioxidant capacity(이하 TEAC)가 있다. 이는 혈청내의 항산화능을 trolox의 그것에 비교하여 나타낸 지표로써, 혈청내 TEAC를 이루는 구성요소로는 알부민이 43%, 요산염이 33%, 아스코르빈산이 9%, 알파 토크페롤이 3%, 빌리루빈이 2% 정도를 차지하며 기타 항

산화제들이 나머지 10% 정도를 차지하는 것으로 알려져 있다¹³. 흡연자에서의 TEAC 감소는 쥐를 담배연기에 노출시켰을 때 혈청내 단백질의 SH기가 현저히 감소되는 기전과 같은 것으로 생각된다¹⁴⁻¹⁵.

개별적인 항산화기능 방어기전은 크게 효소기전과 비효소기전으로 나눌수 있다. 폐에서 주요한 항산화효소로 작용하는 것들로써 superoxide dismutase (SOD)와 glutathione redox system이다¹⁶. 비효소적인 주요물질들로는 레티놀, 아스코르빈산, 토코페롤 등이 있다. 항산화능을 단지 포괄적으로만 평가할 수 있는 TEAC는 개개의 항산화제들이 전체적인 항산화능에 미치는 영향을 알 수 없는 단점이 있는 반면, 저자의 연구에서는 주요한 항산화제들의 변화를 개별적으로 측정한 결과 COPD에서 항산화능의 감소는 주로 아스코르빈산과 토코페롤이 정상인에 비해 현저히 감소되어 있는데 기인하는 것임을 알 수 있었다.

Cross등¹⁷⁻¹⁸은 쥐를 담배연기에 노출시 혈청내 단백질의 SH기, 빌리루빈, 아스코르빈산의 농도는 의의있게 감소하였으나 요산과 알파 토코페롤은 약간만 감소한다고 하였다. 혈청내 주요한 항산화제들을 흡연자에서 직접 측정한 연구들은 많이 있는데 만성 흡연자들의 혈청내 아스코르빈산²⁰⁻²³, 토코페롤¹⁹⁻²¹, 베타 카로틴²³과 셀레늄²⁴등이 비흡연자에 비해 유의하게 감소되어 있다고 보고되고 있다. 비록 연구자마다 유의한 차이를 보이는 항산화제들의 종류가 조금씩 다르게 나타나기는 하였으나 혈청 아스코르빈산과 토코페롤의 농도가 감소하는 것에 대해서는 대체적으로 일치된 견해를 보이고 있으며 이는 본 연구의 결과와 매우 유사하다.

또한 흡연자의 혈액세포내의 항산화제에 관한 연구들도 있는데 백혈구내에서 아스코르빈산과 토코페롤의 농도가 감소되어 있었다는 보고²⁵가 있는가 하면, 반면 흡연자의 적혈구내에서 항산화제로 작용하는 글루타티온은 과산화효소의 농도는 비흡연자와 비슷하나 SOD와 catalase의 농도는 오히려 증가되어 있다는 보고²⁶도 있다. 이에 대해서는 과산화수소에 대한 내피세포의 방어력을 더 증강시킬 수 있기 때문이라는

주장²⁶도 있으나 이에 대한 연구는 더 필요할 것으로 생각된다.

혈청내 아스코르빈산은 특히 중요한 항산화제로 알려져 있는데 이는 동물실험에서 흡연으로 야기된 지질과산화를 지연시킬 수 있는 것으로 알려져 있기 때문이다¹². 그리고 Britton등²⁷에 의하면 아스코르빈산과 토코페롤은 상호 도움을 주며 항산화기능을 하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 여러 항산화제중 아스코르빈산과 토코페롤의 농도가 COPD에서 정상인에 비해 가장 의의있게 감소되었는데 이러한 점을 고려할 때 이들 비타민의 치료적 응용을 신중히 검토해 볼 필요가 있겠다. 최근의 한 연구에서는 18세부터 71세의 성인 2633명을 대상으로 설문조사와 폐기능 검사를 시행한 결과, 아스코르빈산과 토코페롤의 하루 평균 섭취량이 많을수록 FEV₁, FVC가 유의하게 높았다고 보고하여 이들의 섭취가 COPD 발생에 예방적인 효과를 줄 수 있음을 시사하였다²⁷.

또 다른 항산화제인 dihydrolipoic acid와 글루타티온 역시 흡연으로 인한 지질과산화를 억제시킬 수 있으나 빌리루빈이나 요산, 알파 토코페롤 등은 그러지 못했다는 연구들이 있다¹². 담배내의 여러 산화제들이 생체내에서나 생체외에서 모두 혈청내 저분자 항산화제들의 농도를 현저히 감소시키는 것은 분명한 것으로 보인다. 이러한 항산화제들이 계속 고갈되면 될수록 흡연으로 야기될 수 있는 세포막의 과산화에 대한 방어효과는 갈수록 떨어질 것으로 생각되지만, 담배내의 어떤 성분이 주된 작용을 하는지에 대해서는 아직도 명확히 밝혀져 있지 않다.

한편, 호흡기도의 내층에 있는 용액내에도 여러 항산화제들이 발견되는데 여기에는 뮤신, 글루타티온, 요산, 아스코르빈산 등이 주된 항산화제로 작용하고 있다고 알려져 있다²⁹⁻³⁰. 뮤신은 금속에 잘 결합하는 속성을 가지고 있고 구조상 SH기가 풍부하여 수산화기를 효과적으로 제거하는 기능을 가지고 있다³¹⁻³². 흡연자에 있어 호흡기 상피세포내 항산화 방어기전에 대해서는 충분히 연구된 바가 없으며 COPD의 경우에 있어서도 현재까지 거의 알려진 바가 없다. 다만

몇몇 연구에서 환원형 글루타티온이 만성 흡연자의 기관지폐포 세척액(bronchoalveolar lavage fluid, 이하 BALF)에서 증가되어 있다는 연구들이 있다³³⁻³⁵.

Pacht 등³⁶은 흡연자의 BALF내에서 토코페롤이 비흡연자에 비해 감소되어 있다고 하였으나 반면 Bui 등³⁷은 아스코르빈산의 경우 흡연자의 BALF에서 오히려 약간 더 증가되어 있다고 하여 서로 상반된 결과를 보였다. 또 McGowan 등³⁸은 흡연자들의 폐포 대식세포내에 아스코르빈산이 증가되어 있으며 아스코르빈산의 흡수력 또한 증가되어 있다고 하였다. 젊은 흡연자의 폐포 대식세포내에서 항산화 효소들(SOD, catalase)이 증가되어 있다는 보고도 있고³⁹, 이와 반대로 Kondo 등⁴⁰의 연구에 의하면 나이든 흡연자에서 폐포 대식세포에 의한 superoxide의 생성 증가는 비흡연자에 비해 항산화 효소들이 감소된 것과 연관된 것이라고 하였다. 이와 같이 혈청에서의 대체로 일관된 실험결과들과는 달리, 호흡기도내에서의 항산화능에 대한 증감은 보고자에 따라 상반된 결과들을 보여 아직도 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

상기한 연구들과는 달리 본 연구에서는 유도객담을 이용하여 객담내 항산화제들의 농도를 측정하였는데 정상인과 환자군간에 아스코르빈산과 요산 농도의 의미있는 차이를 관찰할 수 없었다. 다만 객담내 아스코르빈산의 농도를 혈청내 농도로 나눈 값에 있어서는 환자군에서 현저히 증가되어 있음을 알 수 있었는데 이는 비타민류의 항산화제들은 체내에서 따로 생성될 수 없고 단지 외부에서의 섭취를 통해서만 보충되기 때문에 아마도 반복적인 산화 스트레스에 대한 방어작용으로 정상인에 비해 더 많은 비율의 항산화제들이 호흡기도쪽으로 동원된 일종의 보상적인 결과가 아닌가 생각된다.

저자는 유도객담을 이용하여 항산화제들의 농도 측정을 처음으로 시도하였는데 이는 객담내의 농도가 혈청에 비해 낮은 점 외에도 객담을 처리하는 과정에서 대개 DTT와 PBS로 4배 정도의 희석을 다시 가하기 때문에 많은 종류의 항산화제들이 측정가능한 범위에 도달하지 못한 관계로 아스코르빈산과 요산의 농도만

이 측정가능 하였으며 아스코르빈산도 상당수에서 검출되지 않는 범위에 있어 여러 번 반복측정을 해야하는 어려움이 있었다. 그러나 COPD 환자들을 대상으로 기관지내시경을 통한 BAL이나 조직검사는 환자나 시술자 모두에게 매우 부담스러운 일이며 전체적인 기도내 상태를 포괄적으로 평가하는데는 오히려 유도객담을 이용한 평가가 더 좋다는 보고들이 많기 때문에 유도객담을 이용한 항산화제의 측정법에 좀 더 수정을 가해 보완한다면 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다⁴¹.

산화 스트레스의 정도를 평가하기 위해서도 여러 가지 방법들이 있는데 가장 먼저 생각할 수 있는 것은 폐조직이나 호기가스에서 직접 oxygen radical을 측정하는 방법이다. 그러나 oxygen radical은 반응성이 매우 높은 물질이며 반감기가 짧아 이러한 직접적인 방법들은 쉽게 적용하기 힘든 단점이 있다. 이런 이유로 간접적인 측정법들이 예로부터 많이 이용되고 있는데, oxygen radical에 의해 손상을 받게되는 여러 물질들-즉 지질, 단백질, DNA 등-의 손상정도를 평가하는 방법들이 이에 해당된다⁶. 이 중에서도 지질과산화(lipid peroxidation)의 산물을 측정하는 다가 불포화 지방산 산화과정의 부산물인 MDA를 분광광도계로 측정하는 방법이 가장 널리 이용되고 있다⁶. 이는 간편하면서도 nmol 단위의 검출도 가능한 높은 민감도를 가지고 있으나 생체 내에는 간섭인자가 많아 특이성이 떨어지는 단점이 있으므로 HPLC로 MDA를 직접 측정하는 것이 더 정확하다는 의견도 있다⁴²⁻⁴³.

정상인을 대상으로 했을 때 흡연자에서 비흡연자에 비해 혈액내 지질과산화의 산물이 증가되어 있다는 연구들이 많이 보고되었다^{17, 44-46}. 흡연으로 인한 산화-항산화 기능간의 불균형에 대한 연구는 활발히 진행되어왔던 반면, COPD 환자를 대상으로 한 연구는 최근 들어 보고되고 있다. Petruzzelli 등⁴⁷은 COPD 환자에서 혈청내 지질과산화의 산물이 증가되어 있고 이는 소기도 폐쇄의 정도와 상관관계를 보인다고 하였다. Morrow 등⁴⁸은 혈장내 프로스타글란딘의 일종인

F₂-isoprostane(iP)이 흡연자에서 비흡연자에 비해 증가되어 있음을 밝히고 이를 지질과산화의 새로운 지표로 제시하기도 하였다. 또한 Pratico등⁴⁹은 iPF_{2a}-III를 소변에서 측정된 결과 COPD 환자에서 정상인에 비해 증가되어 있다고 하였다. Rahman등⁵⁰의 연구에 의하면 건강한 성인을 대상으로 흡연유무에 따른 산화능과 항산화능을 비교한 결과 흡연자에서의 TEAC가 비흡연자에 비해 현저히 감소되어 있고 반대로 지질과산화의 산물은 의외있게 증가되었다고 하였다. 또한 COPD의 급성악화시에는 TEAC가 감소되었다가 임상증상이 호전되어 퇴원할 시점에서는 약간 증가되기는 하지만 여전히 정상인에 비해서는 낮은 반면, 지질과산화 산물은 악화초기에는 증가되었다가 호전된 뒤에는 정상인과 거의 같은 정도로 감소되었다는 연구도 있다⁵¹.

본 연구에서는 정상인과 환자군의 혈청 모두에서 지질과산화도가 측정할 수 없을 정도로 낮았다. 이 때문에 금속 촉매 산화제인 아스코르빈산 -Fe²⁺ 시스템으로 인지질의 과산화를 유도한 다음, 혈청의 지질과산화 억제능을 측정하여 보았다. 그 결과 건강한 성인 흡연자의 지질과산화도가 비흡연자에 비해 높게 나와 흡연에 의해 혈청의 항산화능이 감소되었음을 알 수 있었다. 그러나 흡연자만을 대상으로 했을 때 COPD 환자의 혈청내 아스코르빈산 농도는 정상인 흡연자에 비해 유의하게 낮았으나 지질과산화도에 있어서는 양군간에 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 이와 같은 결과의 이유로 본 연구에서는 지질과산화의 유도를 37°C에서 1시간 동안 시행하였는데, 이 시간이 너무 길어 혈청내 항산화능이 대부분 소실된 결과 항산화능의 미세한 차이를 구별하기 힘들었을 가능성이 있다. 이에 관해서는 추후 더 면밀한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

향후 COPD의 급성 악화시에도 본 실험에서의 방법을 이용하여 이들의 증감여부를 연속적으로 측정한다면 이 질환이 병인을 밝히는 데 도움이 될 것으로 생각한다. 또한 무엇보다도 COPD는 만성적으로 서서히 진행되는 질환인 점을 감안할 때 많은 사람들을 대

상으로 하는 장기적인 연구가 필수적일 것으로 생각된다.

요 약

만성 폐쇄성 폐질환(COPD)의 병태생리에 산화제와 항산화제간의 불균형이 관여하는 것으로 알려져 있으나 COPD에서 흡연으로 인한 산화제나 항산화제의 변화에 대한 연구는 많지 않다. 저자는 안정상태의 COPD 34명과 정상 대조군 30명을 대상으로 고성능 액체 크로마토그래프를 이용하여 혈청 및 유도객담에서의 항산화제들을 측정하였고, 혈청에서 산화스트레스의 지표로 지질과산화산물을 함께 측정하였다.

혈청 아스코르빈산의 농도는 COPD군에서 정상대조군에 비해 유의하게 감소되어 있었다(484.8 ± 473.3 vs 1497.8 ± 819.2 pmol/L, $p < 0.001$). 혈청 알파토코페롤과 레티놀의 농도도 COPD군에서 대조군에 비해 유의하게 감소되어 있었다(각각 48.38 ± 17.34 vs 73.96 ± 26.29 pmol/L, $p < 0.001$, 9.51 ± 8.33 vs 15.01 ± 5.88 pmol/L, $p < 0.05$). 유도객담에서의 항산화제 농도는 양군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 아스코르빈산의 객담/혈청 비는 COPD군에서 정상인에 비해 유의하게 높았다(0.375 vs 0.085 , $p < 0.05$).

정상인만을 대상으로 했을 때 흡연자에서 혈청 아스코르빈산의 농도가 비흡연자에 비해 유의하게 낮았으나(1073 ± 536 vs 1757 ± 845 pmol/L, $p < 0.05$) COPD 환자에 비해서는 여전히 유의하게 높았다($p < 0.05$). COPD 환자에서 혈청 레티놀의 농도는 FEV₁에 비례하여 증가하였다($r = 0.58$, $p < 0.05$). 그러나 흡연자들을 대상으로 지질과산화도를 측정한 결과 정상인과 COPD 환자간에 유의한 차이를 보이지 않았다(115.56 ± 19.93 vs 120.02 ± 24.56 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol Pi of liposome}$).

혈청에서 항산화제들의 농도가 COPD 환자와 정상 흡연자에서 감소된다는 사실은 흡연 등의 산화 스트레스로 인해 항산화제의 농도가 감소되고 COPD의 병인에도 중요한 역할을 할 것임을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Taylor JC, Madison R, Kosinska D. Is antioxidant deficiency related to chronic obstructive pulmonary disease? *Am Rev Respir Dis* 1986;134:285-9.
2. Sies H. Oxidative stress : from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991;30:31-8.
3. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease(COPD) and asthma. *Am Rev Respir Dis* 1987;136:225-43.
4. Honegger CG, Langemann H, Krenger W, Kempf A. Liquid chromatographic determination of common water-soluble antioxidants in biological samples. *J Chromatogr* 1989;487:463-8.
5. Lanvers C, Hempel G, Blaschke G, Boos J. Simultaneous determination of all-trans-, 13-cis- and 9-cis-retinoic acid, their 4-oxo metabolites and all-trans-retinol in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;685:233-40.
6. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radicals Biol Med* 1990;9:515-40.
7. Stockley RA. Proteases/antiproteases : pathogenesis and role in therapy. *Clin Pulm Med* 1998;5:203-10.
8. Bluhm AC, Weistein J, Sonsa JA. Free radicals in tobacco smoke. *Nature* 1971;229:500-9.
9. Repine JE, Bast A, Lankhorst I, and the oxidative stress study group. State of the art : Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Resp Crit Care Med* 1997;156:341-57.
10. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung disease. *Free Radical Biol Med* 1996;21:669-81.
11. Buckeley RD, Hackeney JD, Clark K, Posin C. Ozone and human blood. *Arch Environ Health* 1975;30:40-3.
12. Cross CE, Van de Vliet A, O'Neill CA, Eiserich JP. Reactive oxygen species and the lung. *Lancet* 1994;343:930-33.
13. Miller NJ, MJ Davies, V Gopinathan, A Milner. A novel method of measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature babies. *Clin Sci* 1993;84:407-12.
14. O'Neill CA, Halliwell B, van der Vliet A, Davis PA, Packer L, Tritschler H, et al. Aldehyde-induced protein modifications in human plasma : Protection by glutathione and dihydrolipoic acid. *J Lab Clin Med* 1994;124:359-70.
15. Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safdi A, et al. Modification of plasma proteins by cigarette smoke as measured by protein carbonyls formation. *Biochem J* 1992;286:607-11.
16. Heffner JA, JE Repine. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:531-54.
17. Cross CE, O'Neill CA, Reznick AZ, Hu ML, Marcocci L, Packer L, et al. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. *Amm NY Acad Sci USA* 1993;686:72-90.
18. Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. *Biochem J* 1991;277:133-8.
19. Duthie GG, Arthur JR, James WPT. Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant sta-

- tus. *Am J Clin Nutr* 1991;53:1061-3.
20. Mazzetti A, Lapenna D, Pierdomenico S. Vitamin E, C, and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and nonsmokers. *Atherosclerosis* 1995;112:91-9.
21. Antwerpen LV, Theron AJ, Myer MS, Richards GA, Wolmarans L, Booysen U. Cigarette smoke-mediated oxidant stress, phagocytes, vitamin C, vitamin E and tissue injury. *Ann NY Acad Sci* 1993;686:53-5.
22. Pelletier O. Vitamin C status of cigarette smokers and nonsmokers. *Am J Clin Nutr* 1970;23:520-8.
23. Chow CK, Thacker R, Bridges RB, Rehm SR, Humble J, Turbek J. Lower levels of vitamin C and carotenes in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr* 1986;5:305-12.
24. Bridges RB, Chow CK, Rehm SR. Micronutrients and immune functions in smokers. *Ann NY Acad Sci* 1990;587:218-31.
25. Theron AJ, Richards GA, Van Rensburg AJ, Van der Merwe CA, Anderson R. Investigation of the role of phagocytes and antioxidant nutrients in oxidant stress mediated by cigarette smoke. *Int J Vitam Nutr Res* 1990;60:261-6.
26. Toth KM, Berger EM, Buhler CJ, Repine JE. Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers. *Am Rev Respir Dis* 1986;134:281-4.
27. Britton JR, Pavord ID, Richards KA, Knox AJ, Wisniewski AF, Lewis SA, et al. Dietary antioxidant vitamin intake and lung function in the general population. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1383-7.
28. Dawson EB, Evans DR, Harris WA, Teter MC, McGanity WJ. The effects of ascorbic acid supplementation on the blood lead levels of smokers. *J Am Coll Nutr* 1999;18:166-70.
29. Cross CE, Van der Viet A, O'Neill CA, Louie S, Haliwell B. Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect* 1994;102:185-91.
30. Cantin AM, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Antioxidant macromolecules in the epithelial lining fluid of the normal human lower respiratory tract. *J Clin Invest* 1990;86:962-71.
31. Cooper B, Creeth JM, Donald ASR. Studies of limited degradation of mucus glycoproteins: The mechanism of the peroxide reaction. *Biochem J* 1985;228:615-26.
32. Cross CE, Haliwell B, Allen A. Antioxidant protection: A function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1984;1:1328-30.
33. Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol* 1987;63:152-7.
34. Linden M, Hakansson L, Ohlsson K, Sjodin K, Tegner A, Tunek A, et al. Glutathione in bronchoalveolar lavage fluid from smoker related to humoral markers of inflammatory cell activity. *Inflammation* 1989;13:651-8.
35. Bridgeman MM, Marsden M, Selby C, Morrison D, MacNee W. Effect of N-acetyl cysteine on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue. *Thorax* 1994;49:670-5.
36. Pacht ER, Kaseki H, Mohammed JR, Cornwell DG, Davis WB. Deficiency of vitamin E of alveolar fluid of cigarette smokers. *J Clin Invest* 1988;77:789-96.
37. Bui MH, Sauty A, Collet F, Leuenberger P. Die

- tary vitamin C intake and concentration of body fluids and cells of male smoker and nonsmokers. *J Nutr* 1992;122:312-36.
38. McGowan SE, Parenti CM, Hoidal JR, Niewoehner DW. Differences in ascorbic acid content and accumulation by alveolar macrophages from cigarette smokers and nonsmokers. *J Lab Clin Med* 1984;104:127-34.
39. McCusker K, Hoidal J. Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophages from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters. *Am Rev Respir Dis* 1990;141:678-82.
40. Kondo T, Tagami S, Yoshioka A, Nishimura M, Kawakami Y. Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:178-82.
41. Fabbri LM, Durham S, Holgate ST, O'Byrne PM, Postma DS. Assessment of airway inflammation. *Eur Respir J* 1998;11:6-8.
42. Carbonneau MA, Peuchant E, Sess D, Canioni P, Clerc M. Free and bound malondialdehyde measured as thiobarbituric acid adduct by HPLC in serum and plasma. *Clin Chem* 1991;37:1423-29.
43. Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biologic systems. *Trends Biochem Sci* 1990;15:129-35.
44. Nadiger HA, Mathew CA, Sadasivudu B. Serum malondialdehyde (TBA reactive substance) levels in cigarette smokers. *Atherosclerosis* 1987;64:71-3.
45. Pre J, Lefloch A, Vassg R, Lenoble C. Increased plasma levels of fluorescent lipid peroxidation products in cigarette smokers. *Med Sci Res* 1989;17:1029-30.
46. Lapenna D, Mezzetti A, Giola SD, Pierdomenico S, Danielee F, Cuccurullo F. Plasma copper and lipid peroxidation in cigarette smokers. *Free Radicals Biol Med* 1995;19:849-52.
47. Petruzzelli S, Hietanen E, Bartsch H, Camus AM, Mussi A, Angeletti CA, et al. Pulmonary lipid peroxidation in cigarette smokers and lung cancer patients. *Chest* 1990;98:930-5.
48. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Oates JA, et al. Increased in circulating products of lipid peroxidation (F_2 -isoprostanes) in smokers: smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995;332:1198-203.
49. Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, Fitzgerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F_{2x} -III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1709-14.
50. Rahman I, Morrison D, Donaldson K, MacNee W. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1055-60.
51. Rahman I, Skwarska E, MacNee W. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1997;52:565-8.