

양에서 막형 산화기를 사용하여 심폐바이패스할 경우 백혈구격리 및 자유라디칼로 중재되는 폐손상

김 원 곤* · 신 윤 철** · 서 정 욱***

=Abstract=

Leukocyte Sequestration and Free Radical-Mediated Lung Injury in Ovine Cardiopulmonary bypass Using Membrane Oxygenator

Won Gon Kim, M.D.*. Yoon Cheol Shin, M.D.**. Jung Wook Suh, M.D.***

Background: Complement activation with transpulmonary leukocyte sequestration is considered a main mediator leading to ischemia-reperfusion lung(I-R) injury. We studied the role of leukocytes in the formation of I-R injury in ovine cardiopulmonary bypass(CPB) model with a membrane oxygenator. **Material and Method:** Five sheep were used. CPB circuitry consisted of a roller pump(American Optical Corp., Greenwich, CT, USA) and a membrane oxygenator(UNIVOX-IC, Bentley, Baxter Health Corp, Irvine, CA, USA). The CPB time was fixed at 120 min. Ten minutes after the start of CPB, total CPB was established. Thereafter a total CPB of 100 min was performed, followed by another 10 min of partial CPB. The CPB was discontinued and the animals were fully recovered. For measuring left and right arial leukocyte counts, blood samples were taken before thoracotomy, 5 min and 109 min after the start of CPB, and 30 min and 120 min after weaning. C3a was measured before thoracotomy, 109 min after the start of CPB, and 30 min and 120 min after weaning. Plasma malondialdehyde(MDA) was checked before thoracotomy, 109 min after the start of CPB, and 30 min after weaning. One to two grams of lung tissue were taken for water content measurement before thoracotomy, 109 min after the start of CPB, and 30 min after weaning. Lung biopsy specimens were examined by light and electron microscopy. **Result:** Of 5 animals, 4 survived the experimental procedures. Of these, 3 animals survived on a long-term basis. No significant differences in transpulmonary gradients of leukocyte were found and no significant complement activation was expressed by C3a levels. MDA level did not show significant changes related to lung reperfusion despite an increase after the start of CPB. On both light and electron microscopic examinations, mild to moderate acute lung change was observed. Interstitial edema,

*서울대학교병원 흉부외과, 서울대학교 의과대학 흉부외과학교실, 심장연구소

Department of Thoracic & Cardiovascular Surgery, Seoul National University Hospital, Heart Research Institute, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

**한림대학 강동성심병원 흉부외과

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kangdong Sacred Heart Hospital, Hallym University, Seoul, Korea.

***서울대학교병원 병리과

Department of Pathology, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

†본 연구는 서울대학교 발전기금 일반학술연구비 지원에 의해 이루어진 것임

논문접수일 . 99년 7월 5일 심사통과일 . 99년 9월 1일

책임저자 . 김원곤 (110-744) 서울특별시 중로구 연건동 28, 서울대학교병원 흉부외과 (Tel) 02-760-2346, (Fax) 02-764-3664

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

leakage of erythrocytes into the alveolar space and endothelial cell swelling were the main findings. Water content of the lung showed a slight increase after the start of CPB, but there was no statistical significance. *Conclusion:* These findings indicate that ischemia-reperfusion lung injury may not be from complement activation-leukocyte sequestration but from another source of oxygen free radicals related to CPB.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1999;32:978-83)

Key word : 1. Organ preservation
2. Cardiopulmonary bypass
3. Reperfusion injury

서 론

심폐바이패스후 어느 정도의 폐기능 장애는 임상에서 흔히 경험하게 되는데 폐허혈후 재관류로 인한 손상이 주된 요인중의 하나로 지적되고 있다^{1,2}. 이러한 폐재관류에 의한 폐손상의 기전으로는 일반적으로 보체활성화로 인한 백혈구 격리 때문으로 설명되어 오고있다^{3,4}. 즉 심폐바이패스시 보체활성의 주된 경로는 교대경로(alternative pathway)인데, 이로 인해 anaphylotoxin인 C3a, C5a가 생성되고 그 결과 활성화 백혈구의 페미세혈관 격리가 일어나면서 oxygen-free radical, granular substance, arachidonic acid metabolites 등이 분비되어 폐손상을 일으키게 되는 것이다. 이때 혈소판 역시 활성화되어 폐에 축적됨으로써 폐손상을 더욱 조장하게 된다. 그러나 근래에 와서 심폐바이패스때 막형 산화기를 사용하면 폐재관류손상의 정도를 감소시킬 수 있다는 연구 보고들과 함께^{2, 5}, 쥐를 이용한 폐재관류 손상 실험에서 백혈구의 매개가 필요없다는 연구 결과가 소개되고 있다⁶. 이에 본 연구에서는 양에서의 심폐바이패스 실험모델에서 막형산화기를 사용할 때 생기는 폐재관류손상의 양상과 백혈구의 역할에 대해 분석하고자 한다.

대상 및 방법

모두 5마리의 면양(40~55 Kg)을 사용하여 심폐바이패스를 시행하였다. 실험동물은 실험 하루전 금식하였다. 전투약으로 아트로핀 2~3 mg을 정주한 후에, 할로탄으로 마스크에 의한 마취유도를 하였다. 마취유도후 10~12 mm의 튜브로 기관내 삽관을 시행하였다. 인공호흡기에 연결후 마취는 할로탄(0.25~1.0%)으로 유지하였다. 우경부 절개로 우경동맥과 우의정정맥을 노출시키고, 횡흉골개흉술로 심장을 노출시켰다. 헤파린 300 IU/kg 투여후 동맥캐놀라는 우경동맥에 삽관하였고, 정맥캐놀라는 우의정정맥을 통해 상대정맥에 그리고 우심방부속지를 통해 하대정맥으로 삽관하였다. 체외순환

펌프는 롤러펌프(AMERICAL OPTICAL Corporation, Greenwich, CT, U.S.A)를 사용하였으며 산화기로는 성인용 막형산화기(UNIVOX-IC, BENTLEY Laboratories Inc., Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, U.S.A))를 사용하였다. 펌프충전액은 하트만용액 0.7 리터, 펜타스판 또는 덱스트란 0.5 리터, 만니톨 0.5 리터, 증탄산나트륨 100 mEq, 세파게 항생제 3 gm을 기본으로 하고 필요에 따라 다른 양에서 미리 채혈해둔 전혈 100 ml를 첨가하였다. 수술중 관류속도는 40~60 ml/kg/min로 유지하였으며 체온하강은 직장 온도를 기준으로 섭씨 29~31도로 정도의 저체온법을 사용하였다.

총 심폐바이패스 시간은 120분으로 첫 10분간은 부분 심폐바이패스(partial cardiopulmonary bypass)로 운용하다 다음 100분 동안 기관지동맥에 의한 혈류외의 폐혈류를 차단시킴으로서 실제 임상 상황에서의 완전 심폐바이패스(total cardiopulmonary bypass) 즉 폐허혈-재관류 과정을 모방하였다. 완전 심폐바이패스후 나머지 10분간 다시 부분 심폐바이패스로 운용하였으며 이 기간중 제가온을 시행하였다. 실험검사로 개흉술전, 심폐바이패스 5분후, 심폐바이패스후 109분(폐재관류직전), 심폐바이패스후 30분, 120분에는 우심방과 좌심방의 백혈구 및 혈소판 수를 각각 측정하여 폐격리 여부를 조사하였다. 활성화 보체인 C3a 및 oxygen-free radical의 유리를 반영하는 malondialdehyde는 각각 개흉술전, 심폐바이패스후 109분, 심폐바이패스 종료 30분후와 120분후에 측정하였다. C3a는 radioimmunoassay에 의해 그리고 malondialdehyde는 thiobarbituric acid reaction에 의해 검사하였다. 그리고 개흉술전, 심폐바이패스 시작후 109분, 심폐바이패스 종료 30분후에 폐생검을 시행하여 광학현미경 및 전자현미경 검사를 시행하고 동시에 폐수분양 측정도 시행하였다. 폐수분양 검사는 조직 샘플을 dry vial에 넣어 먼저 wet weight를 측정한다음 80°C 건조기에 3~5일 동안 건조시킨 뒤 dry weight를 측정하였다. 최종 폐수분양(%)은 wet weight에서 dry weight를 뺀 다음 이를 wet weight로 나누어 계산하였다.

통계 처리는 각 측정치의 시간에 따른 차이를 보기 위해

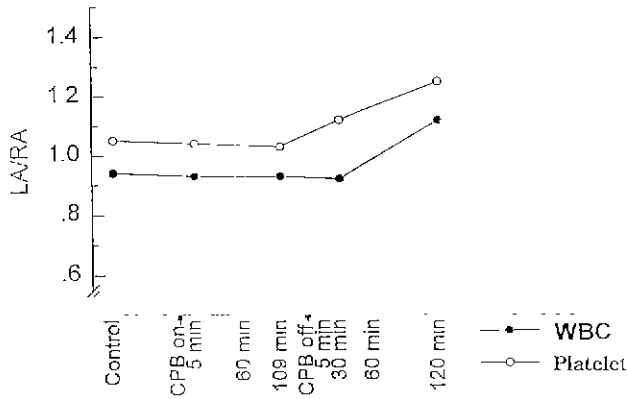


Fig. 1. Left to right ratio(LA/RA) of leukocytes and platelets during ovine CPB are shown. Results are expressed as mean \pm SEM (n=5). The time points of blood sampling are represented on the horizontal axis relative to CPB on and off.

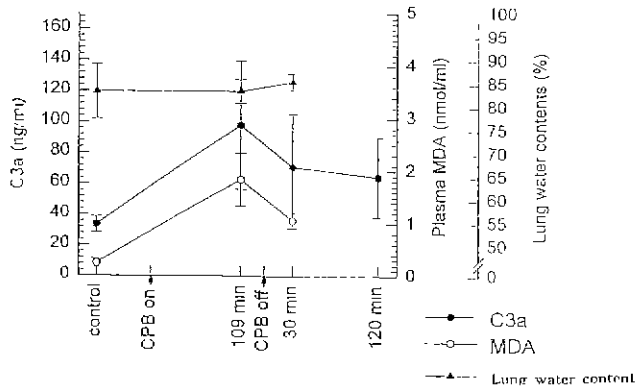


Fig. 2. C3a, MDA, and lung water content during ovine CPB are shown. Results are expressed as mean \pm SEM (n=5). The time points of blood sampling are represented on the horizontal axis relative to CPB on and off.

Kruskal-Wallis nonparametric test와 Wilcoxon signed rank test를 사용하였다. 유의 수준은 $p < 0.05$ 인 경우로 하였다.

결 과

심폐바이패스후 4마리의 양이 수술에서 회복되었으며 1마리는 수술전의 기도분비물 과다로 인한 기도폐색으로 수술 5시간 후에 사망하였다. 실험에서 회복된 4마리 중 3마리는 장기 생존하였다. 실험검사상 폐재관류 이후 30분 및 120분에 좌우심방간 백혈구 수에 통계학적으로 의미있는 차이가 없었다(Fig. 1). C3a 수치로 표현되는 보체활성의 의미있는 변화도 폐재관류 전후에 관찰되지 않았다(Fig. 2). MDA는 심폐바이패스 시작후 시작전에 비해 유의하게 증가하였지만 폐재관류의 전후에 의미있는 변화를 보이지는 않았다. 폐수

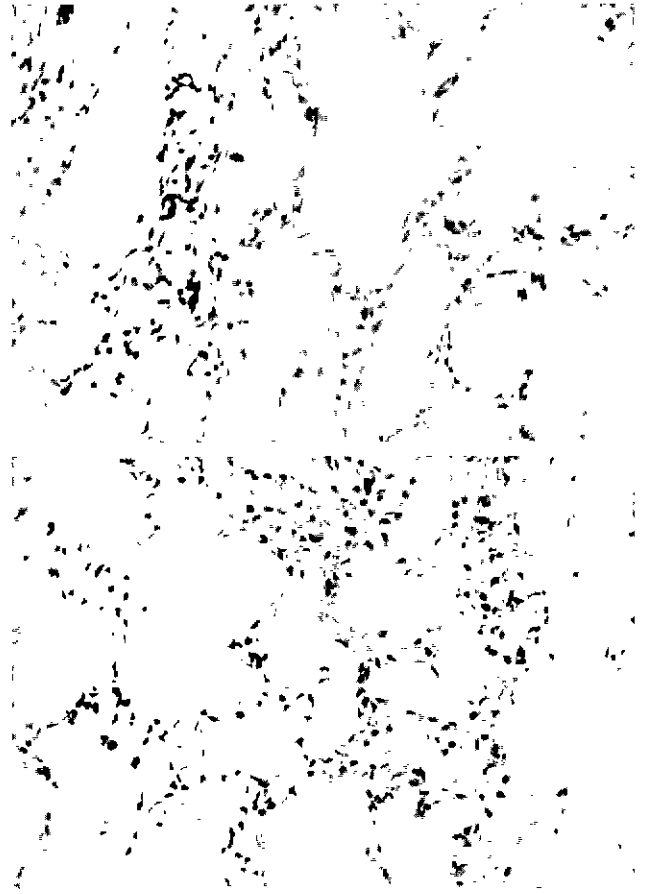


Fig. 3. Light microscopic findings before and after cardio-pulmonary bypass(CPB). The lung in this control group shows very well preserved alveolar structure(H&E stain, X200) (Fig. 3-A). On the other hand, the alveolar wall is diffusely wide and edematous with patchy hemorrhage in the alveolar spaces in Fig. 3-B taken after CPB(H&E stain, X200).

분양 역시 폐재관류 전후에 의미있는 변화를 보이지 않았다. 광학 현미경 소견상 심폐바이패스후 경도에서 중등도 사이의 급성 폐손상 소견이 관찰되었다(Fig. 3). 폐재관류 이후에는 폐간질 조직에서 더 많은 부종이 관찰되었다(Fig. 4). 그러나 폐내에 유의한 백혈구 격리 소견은 관찰되지 않았다. Transmission 전자현미경 소견에서도 심폐바이패스후 간질 부종 및 모세혈관 내피세포의 팽창이 관찰되었으나 역시 백혈구나 혈소판의 유의한 침착은 관찰되지 않았다(Fig. 5).

고 찰

심폐바이패스를 이용한 수술을 받는 환자들은 거의 모두에서 심폐바이패스에 연유된 특이한 생리적 변화를 경험하게 된다. 이 경우 대부분의 환자들은 임상적으로 특별한 문

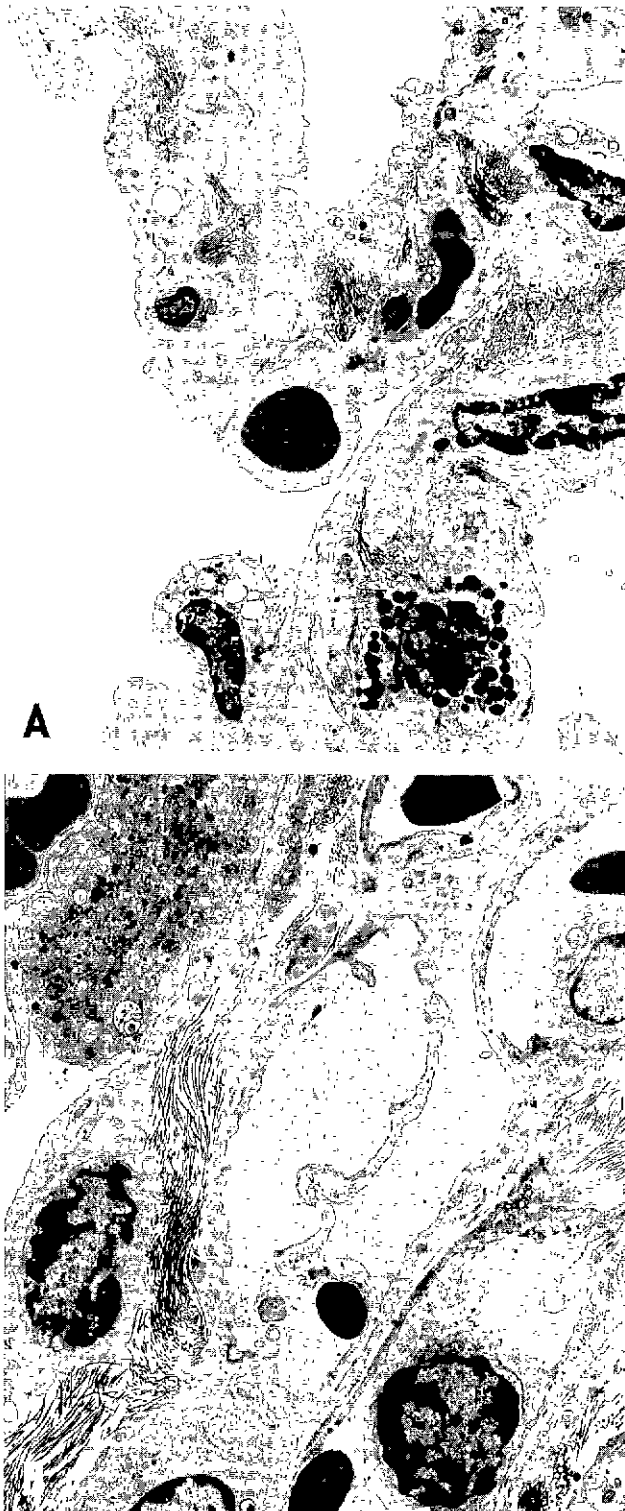


Fig. 4. Transmission electron micrograph from the lung, before cardiopulmonary bypass(CPB) (Fig 4-A) and 30 minutes after the weaning of CPB(Fig 4-B). Compared with Fig 4-A($\times 7500$), endothelial cell blebbing and interstitial edema without leukocyte sequestration were observed($\times 8600$) in Fig. 4-B.

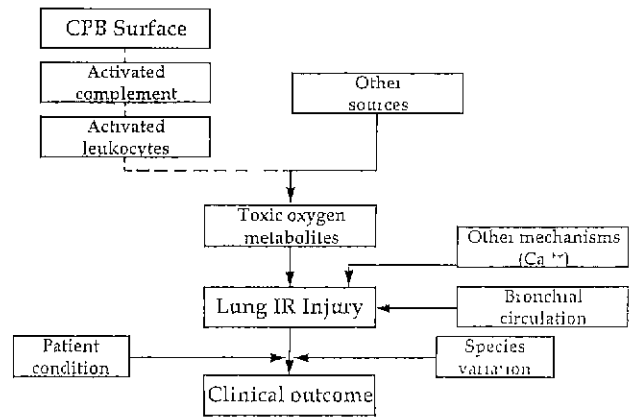


Fig. 5. The schematic diagram showing a possible mechanism of lung injury in ovine cardiopulmonary bypass with a membrane oxygenator - the most probable pathway of lung ischemia-reperfusion(I-R) injury according to this experiment).

제가 없이 회복되나 일부 환자들에서는 심한 병태생리 현상을 보이기도 하는데 이를 관류후 증후군(postperfusion syndrome) 이라고 부른다¹⁾. 현재 어떤 환자군이 관류후 증후군에 취약한가에 대해서는 구체적으로 규명되어 있지는 않다. 관류후 증후군은 정상적으로는 손상부위에서 국소적으로 일어나는 염증반응이 몸 전체로 확산되어 생기는 현상 즉 전신 염증반응(whole body inflammatory reaction)으로 볼 수 있다. 이런 전신 염증반응은 우리 몸의 혈액이 심폐바이패스라는 비정상 표면과 접촉함으로써 혈액내 체액증폭계(humoral amplification system)들을 활성화하여 생긴다. 이러한 관류후 증후군중 폐손상에 관한 현상을 특별히 펌프폐(pump lung)라고 부르기도 한다. 실제 심폐바이패스에 연관된 장기 기능장애 중 폐기능장애가 가장 흔히 발생하는데, 펌프폐는 병리학적으로 충격폐(shock lung)와 비슷한 소견을 보이는 성인형 호흡부전증후군의 일종으로 볼 수 있다.

이러한 심폐바이패스때 발생하는 폐손상의 기전에 관해서는 과거에는 주로 미세색전이 주된 원인으로 생각하였으나^{7,8)}, 최근에는 보체 활성화(complement activation)가 심폐바이패스에 의한 폐손상의 주된 원인으로 생각하고 있다^{5,9)}. 즉 심폐바이패스시에는 혈액이 거대한 이표면과 접촉함으로써 교대 경로(alternative pathway)에 의해 보체 활성화가 일어나는데 그 결과 아나필로독신인 C3a, C5a 등이 생성되게 된다. C5a 등은 다시 백혈구들을 활성화하고 활성화된 백혈구는 폐 미세혈관에 격리되면서 oxygen-free radical, granular substance(lysosomal enzyme), arachidonic acid metabolites 등을 분비하여 폐손상을 일으킨다는 것이다. 그러나 근래에 와서 심폐바이패스때 막형 산화기를 사용하면 폐재관류손상의 정

도를 감소시킬 수 있다는 연구 보고들과 함께²⁵⁾, 쥐를 이용한 폐재관류 손상 실험에서 백혈구의 매개가 필요없다는 연구 결과가 소개되고 있다⁶⁾. 막형 산화기의 이러한 특성은 기포형 산화기에 비해 직접적인 혈액-가스 접촉이 없을 뿐만 아니라 기계학적 혈액손상도 적기 때문일 것으로 이들 연구 논문들에서는 추정하고 있다.

이런 관점에서 본 연구는 양을 실험동물로 하여 실제 임상 심폐바이패스와 같은 실험모델을 확립한 다음 막형산화기를 사용할 때의 보체활성화 및 백혈구격리 양상을 측정 분석하고 이들 측정치와 연관하여 폐조직검사를 통하여 광학 및 전자현미경 분석을 시행함으로써 심폐바이패스시 폐손상 기전의 일단을 규명해 보자는데 그 기본 목적이 있다. 심폐바이패스시 폐손상에 관한 연구는 폐의 일부분을 절제하는 조직검사가 필요하기 때문에 어떤 면에서는 임상연구보다는 동물실험을 통하는 것이 더 큰 장점을 제공해 줄 수 있다. 연구 결과 폐재관류 이후 좌우심방간 백혈구 수에 통계학적으로 의미있는 차이가 없어 백혈구의 폐격리 증거는 관찰되지 않았으며 이는 현미경 검사로도 확인이 되었다. 또 백혈구 활성화의 선행 조건으로 C3a 수치로 표현되는 보체활성의 의미있는 변화도 폐재관류 전후에 관찰되지 않았다. 한편 산소자유라디칼 유리의 한 증표가 되는 MDA는 심폐바이패스 전보다 후에 증가하였지만 폐재관류의 전후에는 의미있는 변화를 보이지는 않았다. 이는 양에서 막형 산화기로 심폐바이패스를 할 경우 산소자유라디칼은 증가하지만 보체활성화-폐격리로 이어지는 폐재관류 손상 기전은 증명되지 않음을 나타내고 있다. 이와 관련하여 폐수분양 역시 폐재관류 전후에 의미있는 변화를 보이지 않았다. 광학 현미경 소견상 심폐바이패스후 경도에서 중등도 사이의 급성 폐손상 소견이 관찰되어 산소자유라디칼에 의한 폐손상이 추정되었으나 전술한대로 폐내에 유의한 백혈구 격리 소견은 관찰되지 않았다(Fig. 3). Transmission 전자현미경 소견에서도 심폐바이패스후 간질 부종 및 모세혈관 내피세포의 팽창이 관찰되었으나 역시 백혈구나 혈소판의 유의한 침착은 관찰되지 않았다(Fig. 4). 이상과 같은 소견을 종합할 때 양에서 막형산화기로 심폐바이패스할 경우 발생하는 폐손상의 기전은 보체활성화로 인한 백혈구 격리 보다는 심폐바이패스와 관련된 산소유리 라디칼의 생성으로 추정된다(Fig. 5). 본 연구의 의미로는 폐재관류 손상에 관한 기존의 논란에서 아직까지는 비록 소수 의견이기는 하지만 백혈구의 역할에 관한 문제점을 제기한 연구결과라는 점이다. 본 연구의 한계로는 대동물을 사용한 실험이긴 하지만 5차례의 실험수가 충분히

많은 증례라고는 보기 어렵고, 또 심폐바이패스시의 폐허혈은 기관지동맥에 의한 순환이 유지되고 있다는 측면에서 폐이식 등에서의 폐허혈과는 양상이 다를 수 있다는 점이다. 이러한 점들을 감안할때 향후 추가 연구를 통해 한결음 더 나아간 결론을 도출할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Sladen RN, Berkowitz DE. *Cardiopulmonary bypass and the lung*. In . Gravlee GP, Davis RF, Utley JR. *Cardiopulmonary bypass-principles and practice*. 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins 1993;468-87.
2. Gu YJ, Wang YS, Chiang BY, Gao XD, Ye CX, Wildevuur CRH. *Membrane oxygenator prevents lung reperfusion injury in canine cardiopulmonary bypass*. Ann Thorac Surg 1991;51:573-8.
3. van Oeveren W, Kazatchkine MD, Descamps-Latscha B, Mailliet F, Fischer E, Carpentier A, Wildevuur CRH. *Deleterious effects of cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg 1985;89:888-9
4. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. *Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg 1983;86:845-57.
5. Kirklin JK. *Prospects for understanding and eliminating the deleterious effects of cardiopulmonary bypass* Ann Thorac Surg 1991;51:529-31.
6. Steimle CN, Guynn TP, Morganroth ML, Bolling SF, Carr K, Deeb GM. *Neutrophils are not necessary for ischemia-reperfusion lung injury*. Ann Thorac Surg 1992;53:64-73
7. Jevcevic E, Weiss D. *Platelet microemboli associated with massive blood transfusion*. Am J Pathol 1964;45:313-21
8. Allardyce DB, Yoshida SN, Ashmore PG. *The importance of microembolism in the pathogenesis of organ dysfunction caused by prolonged use of the pump oxygenator*. J Thorac Cardiovasc Surg 1966;52:706-15.
9. Chenoweth D, Cooper S, Te H, et al. *Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins* New Engl J Med 1981;304:497-502.
10. Bando K, Pillai R, Cameron DE, Brawn JD, Winkelstein JA, Hutchins GM, Reitz BA, Baumgartner WA. *Leukocyte depletion ameliorates free radical-mediated lung injury after cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg 1990;99:873-7.
11. Flick MR, Perel A, Staub NC. *Leukocytes are required for increased lung microvascular permeability after microembolization in sheep* Circ Res 1981;48:344.

=국문초록=

서론: 보체활성화 및 그로 인한 활성화 백혈구의 폐미세혈관 격리는 폐허혈-폐재관류손상의 주된 기전으로 일반적으로 인정되어 오고 있다. 본 연구는 양에서 막형 산화기를 사용한 심폐바이패스 실험모델에서 폐재관류손상의 양상 및 이에 따른 백혈구의 역할을 분석하는데 그 목적이 있다. **대상 및 방법:** 모두 5 마리의 면양을 사용하여 심폐바이패스를 시행하였다. 심폐기 펌프로는 롤리펌프(American Optical Corp., Greenwich, CT, USA)를 사용하였으며 막형 산화기로는 UNIVOX-IC(Bentley, Baxter Corp, USA)를 사용하였다. 총 심폐바이패스 시간은 120분이었으며 중간 100분 동안 기관지동맥 혈류를 제외한 폐혈류를 차단시켜 실제 임상 상황의 폐허혈-폐재관류 과정을 모방하였다. 심폐바이패스 후 동물은 완전히 회복되도록 하였다. 개흉술전, 심폐바이패스 시작 5분후, 폐재관류직전(심폐바이패스 시작후 109분), 심폐바이패스 종료 후 30분과 120분에 우심방과 좌심방의 백혈구 및 혈소판 수를 각각 측정하여 폐격리 여부를 조사하였다. 활성화 보체인 C3a는 개흉술전, 폐재관류직전, 심폐바이패스 30분과 120분후에 그리고 malondialdehyde (MDA)는 개흉술전, 폐재관류직전, 심폐바이패스 30분후에 측정하였다. 그리고 개흉술전, 폐재관류 직전, 심폐바이패스 30분후에 폐생검을 시행하여 폐수분양 측정과 함께 광학현미경 및 전자현미경 검사를 시행하였다. **결과:** 심폐바이패스 후 4마리의 양이 수술에서 회복되었으며 이중 3마리는 장기 생존하였다. 좌우심방간 백혈구 수에 의미있는 차이가 없었다. C3a 수치로 표현되는 보체활성의 의미있는 변화도 관찰되지 않았다. MDA는 심폐바이패스 시작후 증가하였지만 폐재관류에 관련하여 의미있는 변화를 보이지는 않았다. 광학 및 전자 현미경 소견상 경도에서 중등도 사이의 급성 폐손상 소견이 관찰되었는데, 간질수종(interstitial edema), 폐포내 적혈구 누출, 내피세포 팽창 등이 주된 소견이었다. 폐수분양은 유의한 변화를 보이지 않았다. **결론:** 본 연구결과로 막형산화기를 사용한 심폐바이패스에서 폐재관류 손상은 보체활성화로 인한 백혈구 격리보다는 심폐바이패스와 관련된 산소유리 라디칼의 생성 때문일 가능성이 있을 것으로 추정된다.

- 중심단어 : 1. 폐재관류손상
2. 심폐바이패스
3. 양실험모델