

흰쥐 골격근의 허혈-재관류 손상 후 생화학적 변화에 미치는 Melatonin의 효과

박혜준¹ · 범진식²

인제대학교 의과대학 일산백병원 성형외과학교실¹, 이화여자대학교 의과대학 성형외과학교실²

The Effect of Melatonin on Biochemical Changes after Ischemia-Reperfusion Injury of Rat Skeletal Muscle

Hye June Park, M.D.¹, Jin Sik Burm, M.D.²

¹Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Ilsan Paik Hospital, Inje University College of Medicine, Kyunggi, Korea, ²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea

The ischemia-reperfusion injury of the skeletal muscles is caused by generation of reactive oxygen during ischemia and reperfusion. Melatonin or N-Acetyl-5-methoxy-tryptamine is suggested to have antioxidant effects in several tissues. In present study, we examined the protective effect of melatonin in a rat hind limb ischemia-reperfusion injury. Dimethyl-sulfoxide(DMSO) was also tested for comparison. Ischemia was induced for 4 hours by vascular clamping and followed by 1 hour or 24 hours of reperfusion. Muscle injury was evaluated in 4 groups such as single laparotomy group(control), ischemia-reperfusion group, DMSO group, melatonin group. Eedema ratio and malondialdehyde(MDA) of muscle tissue and serum level of creatine kinase(CK), were measured at the end of reperfusion. DMSO and melatonin group showed significant amelioration of edema and serum CK compared with ischemia-reperfusion group. The decreasing effect was more prominent in melatonin group. The muscle tissue MDA concentration is significantly lower in melatonin group than in ischemia-reperfusion group. The results show that melatonin prevents and improves ischemia-reperfusion injury more effectively in a rat hind limb than DMSO dose. Thus, clinically the melatonin may be used for a beneficial treatment of such injuries.

Key Words: Skeletal muscle, Ischemia-reperfusion injury, Melatonin, DMSO

Received July 28, 2005

Revised September 12, 2005

Address Correspondence: Hye June Park, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Ilsan Paik Hospital, 2240 Daewha-dong, Ilsan-gu, Koyang-si, Kyunggi-do 411-706, Korea. Tel: 031) 910-7320 / Fax: 031) 910-7814 / E-mail: hjparkps@hanmail.net

1. 서론

조직의 갑작스런 허혈상태는 최종적으로 세포의 기능장애 및 괴사에 이르게 하는 일련의 화학적 변화를 일으키는데, 허혈조직 내의 독성 대사물을 제거함으로써 세포를 구제하고 재생시키기 위해서 혈류를 재개시켜야 한다. 일정기간의 허혈상태가 지속되면 재관류 후에 허혈기간에 있었던 손상보다 조직손상이 더 심하게 일어나는 것을 허혈-재관류 손상(ischemia reperfusion injury)이라고 한다. 골격근의 허혈-재관류 손상은 유리이식수술, 사지절단 후 재접합술, 지혈대 허혈손상, 급성 구획 증후군 및 동맥 폐색 후 혈관 재개통 등과 같은 임상 상황에서 발생할 수 있고, 손상 후 골격근에서 발생된 여러 독성물질에 의해 심부전, 호흡부전 및 신장기능부전 등 치명적인 후유증을 일으킬 수 있다. 이러한 손상의 기전은 산소 유도성 자유기(oxygen-derived free radical)의 생성과 이로 인한 자유기연쇄반응(free radical chain reaction)이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.¹

송과선(pineal gland)의 주요 생산물인 멜라토닌(melatonin)은 자유기 제거 기능과 항산화효과가 있는 것으로 보고되고 있다.² 멜라토닌은 전자공여작용을 통해 수산화(OH-)와 같은 세포독성이 매우 강한 산화자유기를 직접적으로 해독하는 것으로 알려졌다. 이전의 다른 저자들의 소장, 신장, 심근, 폐의 허혈-재관류 손상에 대한 멜라토닌 효과에 대한 보고가 있었으나,^{3,4} 아직까지 골격근에 대한 효과는 입증되지 않은 상태이다. 급성 상하지 허혈에 대한 수술 후 성공적인 혈류개통에도 불구하고 재관류 후의 전체사망률이 15-22%, 사지절단률이 3-25%에 이르는 것은 골격근의 허혈-재관류 손상에 따른 독성물질의 발생 때문으로, 이를 효과적으로 방지할 수 있는 약물이 있다면 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

이에 저자는 4시간 허혈 후 1시간 및 24시간 재관류시 나타나는 근조직의 생화학적 변화를 관찰하고, 골격근에서 허혈-재관류 손상을 유발시키는 것으로 알려진 반응성 수산화기를 제거하는 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 항산화 효과를 가진 멜라토닌을 전처치한 경우를 비교하여, 멜라

토닌이 허혈 후 재관류시킨 골격근에 미치는 영향에 대해 알아보려고 본 실험을 시행하였다.

II. 재료 및 방법

가. 실험재료

1) 실험동물 및 실험군의 분류

실험동물로는 230 - 320 g 무게의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐 64마리를 사용하였으며, 실험기간 중 먹이와 물은 제한없이 공급하였다. 64마리의 실험동물을 16마리씩 4군으로 나누어 허혈-재관류 손상을 가하지 않은 군(대조군, I군), 허혈-재관류 손상만을 가한 군(II군), 허혈-재관류 손상과 함께 DMSO를 투여한 군(III군), 허혈-재관류 손상과 함께 멜라토닌을 투여한 군(IV군)으로 분류하였다.

각 군은 4시간 허혈손상 후 1시간 재관류시킨 군(II-1, III-1, IV-1)과, 24시간 재관류시킨 군(II-24, III-24, IV-24)으로 8마리씩 다시 분류하였다. 허혈-재관류 손상이 없는 대조군(I군)은 재관류 1시간군과 같은 5시간의 마취 후 측정된 I-1군과, 재관류 24시간군과 같은 4시간의 마취 후 24시간이 경과한 후 측정된 I-24군으로 나누었다.

2) 시약

DMSO, 멜라토닌, Butylhydroxytoluene(BHT), 1,1,3,3-Tetraethoxypropane, Aceto-nitrile은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)로부터 구입하였으며, pure ethanol은 E. Merk Co.(NJ, USA) 제품을, 그 밖에 BIOXYTECH LPO-586 Assay kit(OXIS Health Products, Portland, OR, USA)를 사용하였다.

나. 연구방법

1) 실험전개

a. 마취 및 실험준비

실험동물은 ketamine hydrochloride(90 mg/kg)와 xylazine (Rompun, 10 mg/kg)을 섞어서 복강 내 주사하여 마취하였다. 4시간의 허혈시간 동안 시간당 0.2 ml/kg의 생리 식염수를 복강 내 투여하여 탈수를 방지하였다. 재관류 1시간 군은 5시간 동안 마취를 유지하였으며, 재관류 24시간 군은 허혈 기간인 4시간 동안 마취를 유지한 후 24시간 후 다시 마취를 유도하였다. 모든 동물은 시료 채취 후 경추탈구법으로 희생시켰다.

b. 허혈-재관류 모델

허혈 후 재관류 실험군 흰쥐는 왼쪽 뒷다리의 살부위(inguinal region)를 면도기로 털을 제거한 후 포타딘으로 소독하고 살인대의 아래부분에서 살인대와 나란히 피부를 절개하고 대퇴혈관집(femoral sheath)을 노출시킨 다음,

loupe 확대 시야에서 대퇴동맥과 대퇴정맥을 분리하였다. 이때에 나타난 대퇴동맥의 가지를 확인하면서 깊은 대퇴동맥(deep femoral artery) 이외의 가지들은 결순환(collateral circulation)을 고려하여 결찰 또는 절지하였다. 그리고 깊은 대퇴동맥이 시작하는 바로 위쪽에서 대퇴동맥을 흰쥐용 혈관집계(vascular clamp, FSTIN Co. Fostericity, U.S.A)를 사용하여 왼쪽 뒷다리에 허혈을 일으킨 후 4시간 경과 즉시 혈관 집계를 제거하여 재관류를 시킨 다음 1시간 혹은 24시간 경과 후 시료를 채취하였다. 대조군은 마취와 절개만을 시행하였다.

c. 약물의 투여

멜라토닌 투여군(IV군)은 재관류 30분전 10 mg/kg의 멜라토닌을 복강 내 투여하였다. 멜라토닌은 순수 에탄올에 녹인 후(용해도; 8 mg/ml) 생리식염수를 섞어 10% 에탄올로 희석하여 투여하였다. 허혈-재관류 손상군(II군)은 재관류 30분 전에 12.5 ml/kg의 10% 에탄올을, DMSO 투여군(III군)은 재관류 30분 전 1.5 gm/kg의 DMSO를 10% 에탄올 12.5 ml/kg와 함께 복강내로 투여하였다.

2) 근육부종의 측정

각 실험동물에서 좌측 전경골근을 1 g 정도 적출하여 즉시 무게(wet weight)를 재고 그 후 80°C의 convection oven에서 48시간 건조시킨 후 다시 무게(dry weight)를 재어 wet-to-dry weight ratio를 구하였다.

3) 혈청 creatine kinase(CK)의 측정

각 군에 따라 재관류 1시간 혹은 24시간 후에 심장을 천자하여 2 cc정도의 혈액을 채혈하였으며 3,000 × g에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 CK 측정시까지 -70°C 냉동고에 보관하였다. CK의 측정은 TBA-30FR automated analyzer(Toshiba Corporation, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

4) 근육 내 malondialdehyde(MDA)의 측정

a. 실험군의 조직시료 준비

각 실험동물에서 좌측 비복근 1 g 정도를 적출하여 차가운 생리식염수에서 혈액을 제거하고 조직의 무게를 측정하였다. 조직 약 1 g당 5 ml의 phosphate buffer(20 mM pH 7.4)를 넣고 ULTRA-TURRAX T25(Jank & Kunkel, IKA-Labortechnik, STAUFEN, Germany)를 이용하여 4°C에서 분당 12,000 rpm으로 30초간 분쇄하였다. 이때 조직의 산화를 막기 위하여 조직이 담긴 용액 1 ml당 10 µl의 acetonitrile에 녹인 0.5 M BHT를 넣어주었다. 분쇄된 조직 시료를 4°C에서 10분간 3,000 × g의 속도로 원심분리한 후 상층액만을 취하여 단백질 측정과 MDA 분석을 위하

여 -70°C에서 보관하였다.

b. 단백질 정량(Determination of Protein in Tissue)

각 실험군의 조직에서의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 이용하여 표준곡선을 측정하고 Bradford 방법을 시행하였다.⁵

c. MDA 측정(Lipid Peroxidation Assay)

유리 MDA 농도는 BIOXYTECH LPO-586 Assay Kit (OXIS Health Products, Portland, OR, USA)를 이용하여 측정하였다.

먼저 200 µl의 조직시료에 650 µl의 N-methyl-2-phenylindole을 첨가하여 잘 섞고, 다시 12N HCl 150 µl를 첨가하여 45°C에서 60분간 유지시켰다. 15,000 × g로 10분간 원심분리하고 상층액을 취하여, 파장 586 nm에서 spectrophotometer(Uvikon 860, Kontron Instrument, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 1,1,3,3-Tetramethoxypropane를 이용하여 외부 표준화 곡선을 얻은 후 정량화하였으며, 한 조직 시료를 2회 측정하여 얻은 평균값을 단백질 mg당 MDA량(nmol)으로 나타내었다.

5) 통계 분석

모든 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였으며, 실험군 간의 변화양상을 비교하기 위하여 Kruskal-Wallis test를 이용하여 통계분석을 하였으며 사후 분석(post HOC test)은 Dunnett 검정을 하여 p value가 0.05미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 정의하였다.

III. 결 과

가. 근육부종

근육의 wet-to-dry ratio는 I-1군에서 4.08 ± 0.04, I-24군에서 4.14 ± 0.06, II-1군에서 5.15 ± 0.06, II-24군에서 6.05 ± 0.08, III-1군에서 4.85 ± 0.07, III-24군에서 5.43 ± 0.11, IV-1군에서 4.33 ± 0.07, IV-24군에서 4.54 ± 0.05였다(Fig. 1).

허혈-재관류군(II군)은 모두 대조군(I군)에 비해 유의하게 증가하였다. DMSO 투여군(III군)과 멜라토닌 투여군(IV군)은 유의한 증가를 보였지만, II군에 비해서는 유의하게 낮았다. 또한 IV군이 1시간과 24시간 재관류 모두에서 III군보다 유의하게 낮았다. 전체적으로 재관류 1시간 군보다는 재관류 24시간 군에서 부종률이 증가하는 양상을 보였으며, IV군에서 부종률의 증가가 가장 작았다.

나. 혈청내 CK 농도

혈청 내 CK 농도는 I-1군에서 165 ± 10 IU/L, I-24군에서 176 ± 9 IU/L, II-1군에서 6182 ± 415 IU/L, II-24군에

서 8012 ± 937 IU/L, III-1군은 4792 ± 266 IU/L, III-24군은 3130 ± 530 IU/L, IV-1군은 1765 ± 80 IU/L, IV-24군은 789 ± 49 IU/L였다(Fig. 2).

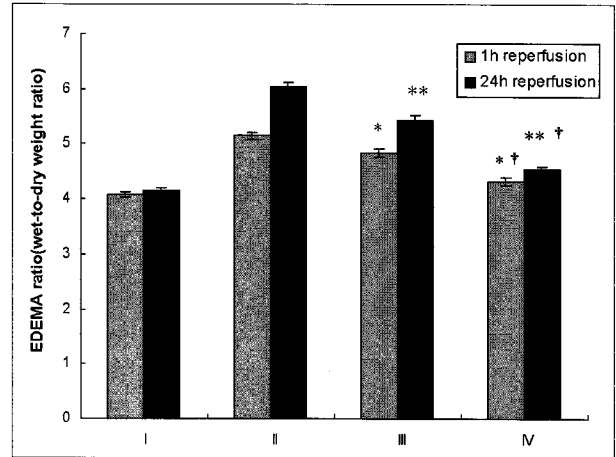


Fig. 1. Edema ratio (wet-to-dry weight ratio) of left anterior tibialis muscles. Conditions of the respective groups are as follows. I: control, II: four-hour ischemia, III: four-hour ischemia and DMSO intraperitoneal injection at 30 minutes before reperfusion, IV: four-hour ischemia and melatonin intraperitoneal injection at 30 minutes before reperfusion. (* indicates significant differences compared with four-hour ischemia one-hour reperfusion group. ** indicates significant differences compared with four-hour ischemia 24-hour reperfusion group. † indicates significant differences compared with DMSO-treated group II.)

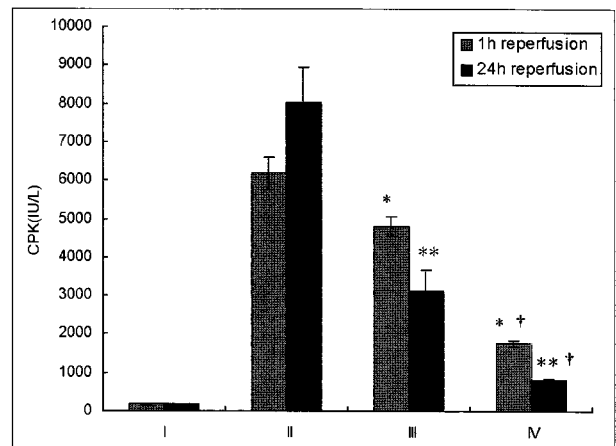


Fig. 2. Serum CK concentration. The conditions of the respective groups are as follows. I: control, II: four-hour ischemia, III: four-hour ischemia and DMSO intraperitoneal injection at 30 minutes before reperfusion, IV: four-hour ischemia and melatonin intraperitoneal injection at 30 minutes before reperfusion (* indicates significant differences compared with four-hour ischemia one-hour reperfusion group. ** indicates significant differences compared with four-hour ischemia 24-hour reperfusion group. † indicates significant differences compared with DMSO-treated group III.)

약물의 투여여부와는 관계없이 허혈-재관류 손상을 가한 군(II군, III군, IV군)은 1시간이나 24시간 재관류군 모두가 대조군(I군)에 비해 유의한 보였다. DMSO 투여군(III군)과 멜라토닌 투여군(IV군) 모두에서 허혈-재관류군(II군)에 비해 유의한 감소를 보였다. II군은 II-24군에서 II-1군과 비교해서 CK의 증가 양상을 보인 반면 III군나 IV군은 24시간 재관류 군에서 농도의 감소 양상을 보였다. III군과 IV군을 비교할 때, IV군에서 II군에 비해 CK 농도의 감소가 III군보다 더 뚜렷했고, IV-24군에서 CK 농도 감소율이 더 컸다.

다. 근육 내 MDA 농도

근육내 MDA 농도는 I-1군에서 0.611 ± 0.103 nM/mg, I-24군에서 0.638 ± 0.128 nM/mg, II-1군에서 1.320 ± 0.176 nM/mg, II-24군에서 1.411 ± 0.200 nM/mg, III-1군에서 1.193 ± 0.137 nM/mg, III-24군에서 1.124 ± 0.188 nM/mg, IV-1군에서 1.080 ± 0.121 nM/mg, IV-24군에서 0.973 ± 0.150 nM/mg이었다(Fig. 3).

재관류 1시간 후의 MDA 농도 증가는 II-1군, III-1군, IV-1군에서 모두 대조군(I-1군)보다는 유의하게 증가된 양상을 보였지만 대조군을 제외한 각 군 사이에 유의한 차이는 없었다. 허혈-재관류군 중 II-24군에서 I-24군에 비해 유의하게 증가하였고, III군에서 III-1군이나 III-24군의 유의한 농도 차는 없었다. 그러나, IV군에서는 IV-24군에서 IV-1군보다 유의하게 그 수치가 감소하였다. III-24군은 II-24군과 비교할 때 유의한 감소를 보이지 않았으나 IV-24군에서 유의한 농도의 감소를 보였다. III-24군과 IV-24군 사이

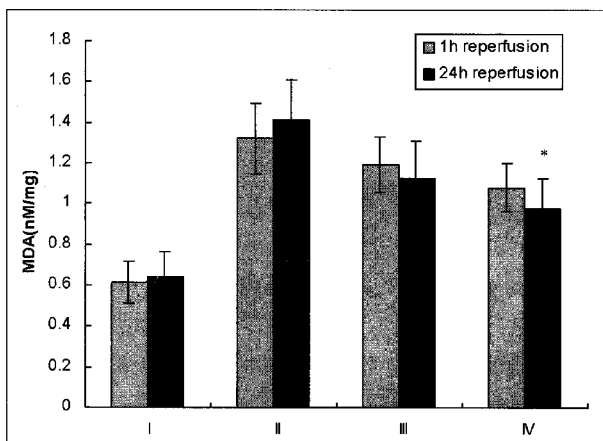


Fig. 3. Muscle MDA concentration. The conditions of the subjected muscles groups are as follows: I: control, II: four-hour ischemia, III: four-hour ischemia and DMSO intraperitoneal injection at 30 minutes before reperfusion, IV: four-hour ischemia and melatonin intraperitoneal injection at 30 minutes before reperfusion. (* indicates significant differences compared with four-hour ischemia 24-hour reperfusion group.)

의 비교에서는 유의한 차이는 보이지 않았다.

IV. 고찰

골격근은 ATP 생산능력이 뛰어나며 creatinine phosphate와 같은 높은 에너지를 갖는 인산화합물을 다량 함유하는 생물학적 특성으로 허혈상태에 대하여 내성을 가지고 있다. 그러나, 장시간의 지혈대 사용, 동맥 폐쇄 혹은 사지절단과 같은 장시간 혈류저하 상태가 지속되면 손상이 일어나고 허혈 후 재관류에 의한 손상이 복합적으로 유발되어 근육에서 회복불능의 장애를 유발할 수 있을 뿐 아니라 치명적 후유증을 일으키는 경우도 있다. 이러한 허혈-재관류 손상의 기전은 정확히 밝혀지지 않았으나, 수산화기(hydroxyl radical), 초산기(peroxyl radical), 과산화 음이온(superoxide anion), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2) 등과 같은 반응성 산소종(reactive oxygen species)이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 골격근의 허혈-재관류 손상에 대한 여러 연구에서 비타민 E(α -tocopherol), iloprost(PGE1의 유사물질), superoxide dismutase(SOD), catalase, taurine, vasoactive intestinal peptide(VIP), allopurinol, mannitol, desferoxamine, DMSO, glutamine 등이 골격근의 허혈-재관류 손상을 효과적으로 방지하는 것으로 보고되고 있다.⁶

DMSO는 비효소성 유리 산소기 해독자로 골격근의 허혈 재관류 손상, 간 허혈 재관류 손상, 뇌허혈 손상 방지와 도서형 피부 피판 생존률 증가에 효과가 있음이 보고되어 왔다.⁷ DMSO는 잘 알려진 효과적인 항산화제로 실험 모델의 유효성과 멜라토닌의 상대적 효과의 비교를 위해 선택하였다.

멜라토닌(N-acetyl-5-methoxytryptamine)은 모든 척추동물의 송과선(pineal gland)에서 합성되고 밤 동안 분비되는 indole인데, 임상적으로 수면 증강제로 널리 사용되고 있고, 일부 압 증식 억제 용도로 관심을 끌고 있다. 1993년 Tan 등²에 의해 멜라토닌의 새로운 특성인 항산화 능력이 증명되었고, 수산화, 단관체 산소(singlet oxygen), 초산기, 과산화 음이온의 독성을 중화하는 자유기 제거자로 알려져 있다.⁸ 다양한 원인에 의한 일시적인 혈류 차단이 임상적으로 빈번히 발생하기 때문에 허혈-재관류에 의해 초래되는 분자 손상을 강력하게 방지할 수 있는 약물에 대한 높은 관심 속에 멜라토닌을 이용한 많은 실험과 보고가 이루어지고 있다. Joo 등⁹은 뇌의 허혈-재관류 손상시 송과선을 절제한 쥐에서 신경 손상이 더 심하다고 하였고, 멜라토닌을 외부에서 투여하였을 때 30~60%까지 경색 부위를 줄일 수 있음을 보고하였다. 최근에는 경색부위를 줄이는 효과이외에도 DNA 나선의 파괴를 줄이고 Bcl-2와

핵 절단 복구에 중요한 유전자 발현을 증가시켜 경계부위의 세포 생존률을 높임이 밝혀졌다.¹⁰ Tan 등³은 심장의 조기 심실수축과 심실 세동을 유의하게 감소시키며 500배 이상의 용량을 투여한 비타민 C보다 더 효과적이라고 하였다. Chen 등⁴은 소장의 허혈-재관류 후 멜라토닌을 투여하였을 때 폐의 지질과산화에 의한 세포막 손상과 내피세포에서 발견되는 호중구 분질의 증가를 방지하며 DNA 변형에 의한 세포소멸을 중지시키고 세포회복을 유도하는 p21이 증가하는 양상을 관찰하고 멜라토닌이 재관류 손상 후 발생하는 원격장기의 손상, 급성 폐손상의 진행을 멈추게 하고 조직의 회복 주기를 강화시키는 효과가 있다고 하였다. 이와 같은 장기 이외에 장, 간, 신장, 췌장, 고환, 방광, 말초 신경의 허혈-재관류 손상에도 장기의 분자적, 형태학적 손상을 줄이고 정상 생리를 유지하는 데 효과적이라는 실험적인 보고가 이루어지고 있다.^{11,12} 그러나, 아직까지 골격근의 허혈-재관류 손상에 미치는 멜라토닌의 효과에 대한 보고가 없어 본 실험에서는 골격근의 허혈-재관류 손상에 효과가 입증된 DMSO와 비교하여 그 효과를 알아보고자 하였다.

미세혈관 손상과 정맥 유출 울혈 때문으로 생각되는 조직 부종은 허혈-재관류 손상의 중요한 요소이다. 본 실험에서 부종률은 모든 군에서 1시간 재관류보다 24시간 재관류 시 더욱 증가하는 소견을 보였는데, 각 군내 비교에서는 II군은 17%, II군은 11%, IV군은 4% 증가하여 증가율이 IV군에서 가장 작았다. 또 24시간 재관류 후 부종률의 증가를 대조군과 비교하였을 때 각각 46%, 31%, 9%로 II군과 비교할 때 DMSO와 멜라토닌이 유의하게 부종을 억제하는 효과를 보였고, 그 효과는 멜라토닌이 DMSO보다 강했다.

자유 산소기는 지질 과산화 반응을 일으켜 세포막의 손상을 가져오므로 지질 과산화 대사물질은 조직 손상과 세포 사망의 지표이다. 본 실험에서는 골격근의 조직 손상과 세포 사망의 초기 지표로 MDA의 조직 농도를 측정하고 횡문근융해(rhabdomyolysis)의 표지로서 혈장 CK를 측정하였다. CK 농도는 II군에서는 1시간 재관류 후보다 24시간 재관류 후 29% 정도 증가한데 반해 III, IV군에서는 감소했는데, 감소율이 각각 34%, 55%로 IV군에서 더욱 많이 감소했다. II군과 비교할 때 III, IV군에서 CK 농도 증가가 유의하게 억제되고 그 효과는 DMSO보다 멜라토닌이 더 컸다. 근육내 MDA 농도도 비슷한 양상을 보였다.

종합적으로 허혈-재관류 손상을 받은 군에서는 부종율, CK, MDA 수치의 증가 소견을 나타내었으나 멜라토닌 투여군에서는 이러한 수치가 유의하게 감소하였다. 수치적인 비교에서 DMSO 투여군의 손상정도는 재관류 24시간을 기준으로 했을 때 허혈-재관류군의 56% 정도였는데 멜

라토닌 투여군은 24% 정도의 손상을 보여 멜라토닌이 DMSO에 비해 매우 뛰어난 손상보호 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

멜라토닌의 작용기전은 자유기 제거 기능을 통해, 자유기로부터 산화 손상을 받는 탄수화물, 지방, 단백질, DNA와 같은 고분자를 보호하며, 반응성 산소종을 제거할 뿐만 아니라 생성을 방지하고 다른 항산화 기전을 유도하는 것이다. 멜라토닌은 사립체의 산화적 인산화의 효율을 증가시켜 사립체 전자 전달 사슬로부터 전자의 누출을 감소시켜 자유기 생성을 감소시키고, 자유기와 반응성 산소 중간물을 대사시켜 항산화 방어에 중요한 몇 가지 효소들 중 잘 알려진 SOD, glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione reductase(GSH-Px)와 같은 효소의 활성에도 영향을 미친다. 또한 손상된 조직으로의 중성구 침윤을 억제하며, cytokine의 생성과 염증 반응을 억제하여 독성 반응물질의 생성을 감소시키는 작용을 한다. 혈관에 미치는 영향으로는 endothelin converting enzyme-1(ECE-1)을 방해하여 허혈 후 혈관확장을 개선시켜 조직을 보호하고, 혈관투과성 증가를 방지하고, 소장벽에 부착하는 백혈구 수를 감소시키며, 관류 모세혈관 길이의 급격한 감소를 방지하여 미세혈액 순환을 보존하는 작용과 내피세포 장벽을 보호하는 작용이 있다.

멜라토닌의 주요 간 대사물질인 6-hydroxymelatonin sulfate와 자유기 제거과정에서 생기는 대사물질인 cyclic 3-hydroxymelatonin(cyclic 3-OHM), N¹-acetyl-N²-formyl-5-methoxy-kynuramine(AFMK)와 N¹-acetyl-5-methoxykynuramine(AMF)도 효과적인 제거자로서 멜라토닌의 2세대, 3세대 대사물질이 산화적 스트레스로부터 보호하는 모분자(parent molecule)의 능력에 기여한다.¹³

비타민 E와 같은 지용성 항산화제는 세포막과 같은 지방이 풍부한 환경에서 직접적으로 유리기를 해독하는 데 효과적인 반면 핵내의 수용성 환경 때문에 DNA를 산화적 절단(multilation)으로부터 보호하는 데 덜 효과적이고, 반대로 수용성인 비타민 C는 세포의 수성 부분, 특히 세포질에서는 매우 유효하지만 세포막에서는 효과가 떨어진다. 그러나, 멜라토닌은 지용성 물질이지만 세포의 수성 환경에도 잘 들어가는 양호성(amphiphilic nature)을 가지고 있어 어떠한 경로로 투여해도 잘 흡수되고 모든 형태생리학적 장벽(즉 혈액뇌장벽이나 태반)을 쉽게 통과하며 세포와 세포내 구획의 모든 부분에 들어가서 세포막, 세포질 분자, 핵 DNA를 자유기로 인한 손상으로부터 보호할 수 있고, 기존의 항산화제인 비타민 C, E, glutathione과 상승 작용을 한다는 특성도 가지고 있다.

이와 같은 멜라토닌의 효과, 특성, 실험 결과에 근거하여 임상적으로 골격근의 허혈-재관류 손상이 예상되는 경

우에 멜라토닌을 적절히 투여한다면 이상적인 약물로서 허혈-재관류 손상을 효과적으로 방지할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 많은 연구에서 인간에게 과도한 약리학적 용량인 하루 1g씩의 멜라토닌을 한달간 투여해도 부작용이 없음을 보고할 만큼 안전하며,¹⁴ 구조적으로 안정하고 비싸지 않다는 장점도 가지고 있어 향후 임상적 사용에 대한 전망은 밝다고 할 것이다.

V. 결 론

본 연구의 목적은 4시간 허혈 후 1시간 및 24시간 재관류 시 나타나는 근조직의 손상을 측정하고, 근육에서 허혈-재관류 손상을 야기시키는 것으로 알려진 반응성 산소기를 제거하는 DMSO와 항산화효과를 가진 멜라토닌을 전 처치한 경우를 서로 비교하여 멜라토닌이 허혈 및 재관류 시킨 근육에 미치는 영향과 효과를 규명하고자 본 실험을 시행하였다.

실험결과 멜라토닌은 흰쥐 골격근의 허혈-재관류로 인한 손상을 효과적으로 약화시키는 것을 알 수 있었으며, 임상적으로 허혈 골격근의 재관류 전에 멜라토닌을 투여하면 근육의 허혈-재관류 손상을 최소화하는 데 도움이 될 것으로 생각된다.

REFERENCES

- McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159, 1985
- Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR: The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole *in vivo*. *Cancer Lett* 15: 65, 1993
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Kim SJ, El-Sokkary GH: Ischemia/ reperfusion induced arrhythmias in the isolated rat heart; prevention by melatonin. *J Pineal Res* 25: 184, 1998
- Chen YY, Kim MC, Ko YG, Baik HH, Cho YH: Effect of melatonin during recovery of tissue injury after intestine ischemia-reperfusion. *Kor J Emer Medi* 14: 264, 2003
- Bradford MM: A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248, 1976
- Bozkurt AK: α -tocopherol(vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg* 43: 693, 2002
- Feller AM, Roth AC, Russell RC, Eagleton B, Suchy H, Debs N: Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury to skeletal muscle. *Ann Plast Surg* 22: 321, 1989
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS: Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 29: 363, 1997
- Joo JY, Uz T, Manev H: Opposite effects of pinealectomy and melatonin administration on brain damage following cerebral focal ischemia in rat. *Restor Neurol Neurosci* 13: 185, 1998
- Cheung RTF: The utility of melatonin in reducing cerebral damage resulting from ischemia and reperfusion. *J Pineal Res* 34: 153, 2003
- Sener G, Sehirli AO, Paskaloglu K, Dulger GA, Alican I: Melatonin treatment protects against ischemia/reperfusion-induced functional and biochemical changes in rat urinary bladder. *J Pineal Res* 34: 226, 2003
- Sayan H, Ozacmak VH, Ozen OA, Coskun O, Arslan SO, Sezen SC, Aktas RG: Beneficial effects of melatonin on reperfusion injury in rat sciatic nerve. *J Pineal Res* 37: 143, 2004
- Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sainz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolin I: Antioxidant properties of N¹-acetyl-5-methoxy-kynuramine(AMK); scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rept* 8: 205, 2003
- Nordlund JJ, Lerner AB: The effects of oral melatonin on skin color and on the release of pituitary hormones. *J Clin Endocrinol Metab* 45: 768, 1977