

멜라토닌이 허혈-재관류 손상에 의한 골격근의 형태학적 변화에 미치는 효과

박혜준¹ · 범진식²

인제대학교 의과대학 일산백병원 성형외과학교실¹, 이화여자대학교 의과대학 성형외과학교실²

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

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 effect of melatonin on morphological changes after ischemia-reperfusion injury was investigated in rat skeletal muscle. Dimethyl-sulfoxide(DMSO) was also tested for comparison. Muscle injury was evaluated in 4 groups as a single laparotomy group(control), ischemia-reperfusion group, DMSO group, melatonin group. Left hind limb ischemia was induced for 4 hours by vascular clamping of the common femoral artery and followed by 24 hours of reperfusion. The midportion of gastrocnemius muscle was taken for histological evaluation. In light microscopic study, ischemia-reperfusion group showed severe neutrophil infiltration, interstitial edema, and partial loss or degeneration of muscle fibers. The muscle tissue of melatonin group showed relatively normal architecture with mild inflammatory cell infiltration. In electron microscopic study, dilated cisternae of sarcoplasmic reticulum, dilated mitochondria with electron loose matrix and dilated cristae, disordered or loss of myofibril, indistinct A-band and I-band, intracytoplasmic vacuoles, and markedly decreased glycogen granules were observed in ischemia-reperfusion group. But relatively well maintained A-band, I-band, Z-line, M-line, and mildly dilated mitochondria with well preserved cristae were observed in melatonin group. The DMSO group showed intermediately attenuated ultrastructural changes. The results show that melatonin improves morphologically ischemia-reperfusion injury more effectively

than DMSO. In conclusion, melatonin seems to be a promising agent that can salvage the skeletal muscle from severe ischemia-reperfusion injury.

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

1. 서 론

동맥혈류의 갑작스런 차단으로 인하여 하지가 일정기간의 허혈상태에 이르는 경우, 혈류를 성공적으로 재개시켜도 광범위한 골격근의 괴사가 일어나고, 국소적 및 전신적 합병증으로 이병률 및 사망률이 높아질 수 있다. 이러한 사실은 일정기간의 급성허혈 상태 후 재관류 시켰을 때, 대부분의 조직손상이 허혈기간 동안에 일어나지 않고 재관류되면서 더 심한 손상이 일어나기 때문이다. Blebea 등¹은 허혈 후 재관류 시 관찰되는 근육손상은 반응성 산소기(hydroxyl radical)에 의해 생기며 mannitol의 투여로 근육손상을 감소시킬 수 있다고 하였고, Becker 등²은 재관류 시 발생하는 과산화기(superoxide radical)가 조직손상을 일으키는 주된 중간물질이라고 하였다. 단백질, 핵산, 막의 지질, 세포질의 분자, 교원질(collagen) 등과 반응하여 손상을 일으키는 것으로 알려진 반응성 산소기가 세포에서 생성되면 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소들이 활성화되어, 반응성 산소기를 대사시키지만 반응성 산소기와 항산화효소 사이의 균형이 깨지면 세포에서 반응성 산소기에 의한 손상이 일어난다. Walker³는 허혈상태에 의해 발생된 근육손상에서 근육세포의 ATP pool과 사립체의 기능이 유지되면 재관류 시 근육은 허혈 전 상태로 회복될 수 있다고 하였고, 허혈로 근육세포내 ATP pool이 고갈되면 세포회복이 안되는 것을 의미하는 것으로 사람의 경우 34°C에서 2.25시간이고 26°C 이하에서는 5시간이라고 하였다.

SOD, catalase, 비타민 E(α -tocopherol), iloprost(PGE1의 유사물질), taurine, vasoactive intestinal peptide(VIP), allopurinol, desferoxamine, dimethyl sulfoxide(DMSO), glutamine 등이 골격근의 허혈-재관류 손상을 효과적으로 방지하는 것으로 보고되고 있다.⁴ 솔방울샘(pineal gland)의

Received November 15, 2005

Revised December 2, 2005

Address Correspondence: Jin Sik Burm, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Mokdong Hospital, College of Medicine, Ewha Womans University, 911-1 Mok-dong, Yangcheon-gu, Seoul 158-710, Korea. Tel: 02) 2650-5149 / Fax: 02) 2651-9821 / E-mail: jsburm@ewha.ac.kr

주요 생신물인 멜라토닌(melatonin: N-acetyl-5-methoxy-tryptamine)의 소장, 신장, 심근, 폐의 허혈-재관류 손상에 대한 효과가 보고되었으며,⁵ 저자들은 골격근에 대한 효과를 생화학적 측면에서 실험적으로 입증한 바 있다.⁶

이에 저자는 4시간 허혈 후 24시간 재관류 시 나타나는 근조직의 변화를 관찰하고, 골격근에서 허혈-재관류 손상을 유발시키는 것으로 알려진 반응성 수산기를 제거하는 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 항산화효과를 가진 멜라토닌을 전처치한 경우를 비교하여, 멜라토닌이 허혈 후 재관류시킨 골격근의 미세구조 변화에 미치는 영향에 대해 알아보고자 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. 32마리의 실험동물을 8마리씩 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.

2) 시약

DMSO, 멜라토닌은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하였으며, pure ethanol은 E. Merk Co. (NJ, USA) 제품을 사용하였다.

나. 연구방법

1) 실험 전개

a. 마취 및 실험 준비

실험동물은 ketamine hydrochloride(90 mg/kg)와 xylazine(Rompun[®], 10 mg/kg)을 섞어서 복강내 주사하여 마취하였다. 4시간의 허혈 시간 동안 시간당 0.2 ml/kg의 생리 식염수를 복강 내 투여하여 탈수를 방지하였다. 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 재관류시킨 다음 24시간 경과 후 시료를 채취하였다. 대조군은 마취와 절개만을 시행하였다.

c. 약물의 투여

멜라토닌 투여군(IV군)은 재관류 30분 전 10 mg/kg의 멜라토닌을 복강내 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) 조직학적 검사

a. 광학현미경 표본 제작

재관류 24시간 후 좌측 장딴지근의 중앙 부위를 약 5 mm 정도의 폭으로 횡으로 절제하여 근육 조직을 채취하였다. 절제하여 취한 근육조직은 비접촉적 방법으로 마분지에 30초간 원형태로 올려놓아 근수축에 의한 변형을 방지한 후 10% 포르말린에 고정된 뒤 알코올로 탈수하고 파라핀으로 포매하였다. 포매된 표본은 마이크로톰으로 4 - 5 μ m의 절편으로 자르고 조직처리 과정을 거쳐 H & E(hematoxylin & eosin) 염색법으로 염색을 시행한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

b. 전자현미경 표본제작

전자현미경 관찰을 위하여 절제한 조직을 1 mm³ 내외의 크기로 작게 세절한 후 0.1 M 인산염(phosphate) 완충액(pH 7.4)으로 조정된 2.5% glutaraldehyde로 2시간 동안 전고정하였으며 동일 완충액으로 30분씩 3회 세척한 다음 1% osmium tetroxide(OsO₄)액으로 1시간 동안 후고정하였다. 후고정한 표본을 동일 완충액으로 세척한 후, 60, 70, 80, 90, 95% 에탄올로 각 10분씩, 100% 에탄올로 10분씩 2회 탈수하여 propylen oxide로 15분간 2회 치환하여 Epon812로 포매하였다. 포매한 표본을 중합시킨 후, Reichert-jung 초박절기(ultramicrotome)로 1 μ m 두께로 잘라 1% toluidine blue로 염색하여 먼저 광학현미경하에서 검경하여 부위를 관찰하고 60 - 70 nm 두께의 초박절편을 제작하였다. 초박절편은 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색하여 Hidachi H-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

c. 표본관찰

광학현미경 표본에서 일반적인 근세포의 모양, 핵의 변화, 근원섬유(myofibril)의 변화, 염증세포와 부종의 정도 등을 관찰하였다.

전자현미경 표본에서는 특히 사립체를 비롯한 세포질소기관(cytoplasmic organelles)의 변화 유무 및 Z선의 변화 등을 관찰하였다.

III. 결 과

가. 광학현미경 소견

1) 대조군(I군)

근육세포의 핵은 변연부에 위치하고 있었으며, 소수의 핵이 세포 안쪽에 위치하고 있었으나 정상 범주였다. 염증세포는 관찰되지 않았고, Z선이 규칙적으로 뚜렷하게 분

포하고 있었으며 간질조직은 부종이나 세포의 침윤 없이 깨끗하였다. 횡단면에서 근세포들은 다각형 모양으로 서로 무리를 이루어 분포하고 있었다(Fig. 1).

2) 허혈-재관류군(II군)

근육의 종단면에서 간질조직의 부종이 심하여 근섬유 사이의 간격이 많이 벌어져 있었고 다핵구, 호중구와 같은 급성 염증세포의 침윤이 미만성으로 관찰되었고, 다초점성으로 균질을 이루어 분포하고 있었다. 하나의 근섬유 전체, 혹은 하나의 근섬유 내에서 부분적으로 변성이 되어 근원섬유의 구분이 되지 않고 균질화(homogenization)된 소견이 많이 보였다. 근섬유의 직경이 불규칙했으며 Z선과 근원섬유의 배열도 불규칙하였다. 핵의 부종이 있었으며, 다소 눈에 띄는 핵소체(nucleoli)가 관찰되었다. 세포질소기관의 변형 및 소실로 인한 근세포질 내의 공포화 현상



Fig. 1. Light microscopic findings of normal gastrocnemius muscle of a rat(group I). (Left) In longitudinal section, the muscle tissue shows normal architecture. Regularly arranged muscle fibers, peripherally located nuclei, and fine Z lines are seen. (Hematoxylin and eosin stain, $\times 100$) (Right) In cross section, polygonal muscle fibers are arranged in groups. (Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$)

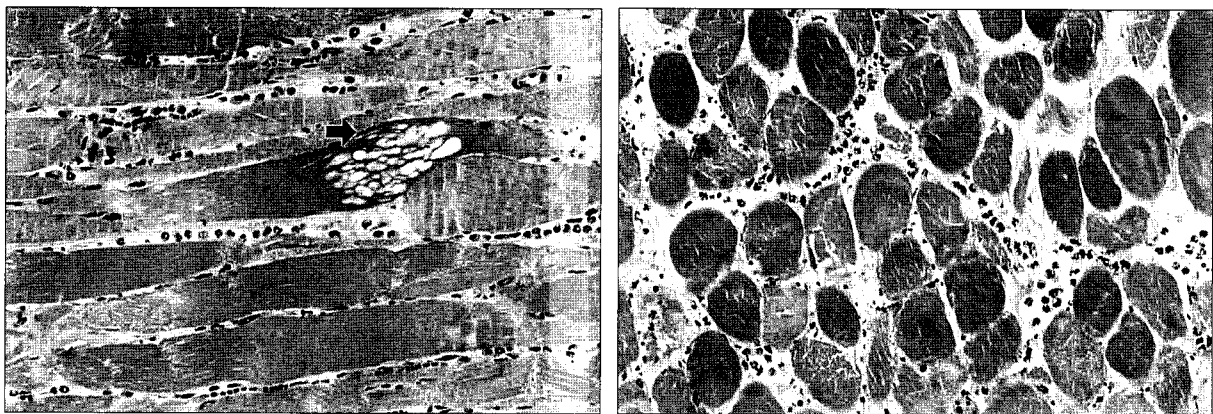


Fig. 2. Light microscopic findings of the gastrocnemius muscle after 4-hour ischemia and 24-hour reperfusion (group II). (Left) In longitudinal section, necrotic and disorganized muscle fibers, and prominent intracytoplasmic vacuolization (arrow) are noted. (Right) In cross section, severe inflammatory cell infiltration, interstitial edema, and rounded muscle fibers are noted. (Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$)

(vacuolization)이 관찰되었다. 횡단면에서 근섬유의 단면이 부종으로 인해 다각형이 아닌 원형에 가깝게 변해 있었고 근육의 중앙부와 변연부가 모두 변성(degeneration)되어 있었다(Fig. 2).

3) DMSO 투여군(III군)

간질 조직의 부종과 급성 염증세포의 침윤이 많이 관찰되었으나 그 정도가 II군에 비하여 약간 경미하였다. 핵의 부종과 함께 핵소체도 간혹 눈에 띄었다. 근세포질 내에서의 공포화현상도 관찰되었다. 근세포질 내의 근원섬유의 불규칙한 배열상태로 인해 Z선이 소실된 곳이 많았다. 근섬유가 전체적으로 혹은 부분적으로 변성되어 근섬유가 소실된 곳이 국소적으로 관찰되었다. 횡단면에서는 근육의 중앙부와 변연부 모두 변성되어 있었다(Fig. 3).

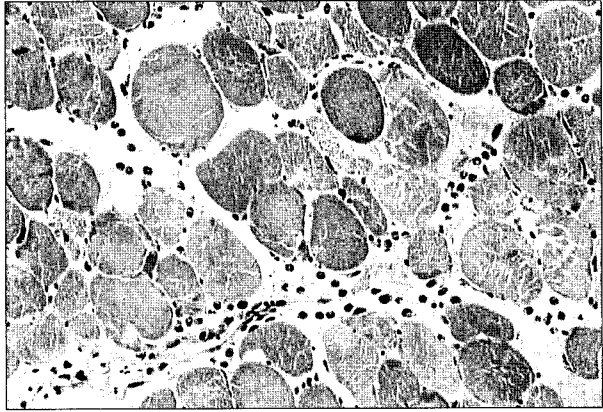


Fig. 3. Light microscopic findings of the gastrocnemius muscle after 4-hour ischemia and 24-hour reperfusion with DMSO treatment (group III). (Left) In longitudinal section, interstitial edema and inflammatory cell infiltration, and focally degenerated and irregularly arranged muscle fibers are noted. (Right) In cross section, many inflammatory cells are infiltrated in the connective tissue and intermittent necrotic muscle fibers are noted. (Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$)

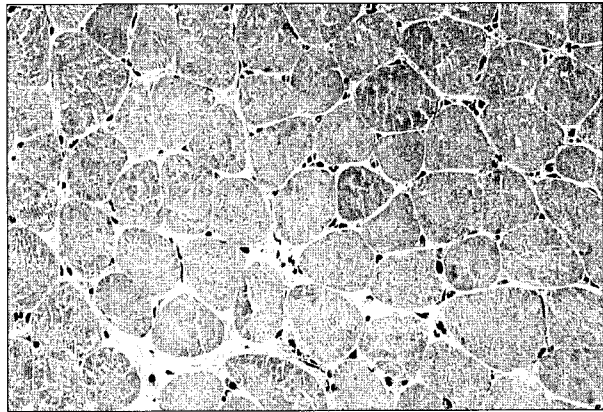


Fig. 4. Light microscopic findings of the gastrocnemius muscle after 4-hour ischemia and 24-hour reperfusion with melatonin treatment (group IV). (Left) In longitudinal section, mild interstitial edema, minimal inflammatory cells, and degenerated muscle fibers are rarely noted. (Right) In cross section, muscle tissue shows relatively normal architecture with polygonal muscle fibers but a few inflammatory cells are infiltrated. (Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$)

4) 멜라토닌 투여군(IV군)

근육의 간질조직에 경미한 부종과 염증세포의 침윤이 있었고, 근섬유의 부분적인 균질 화소견으로 관찰되는 변성이 있었다. 근원섬유가 일부 불규칙한 배열 상태를 보였으나 Z선은 잘 유지되고 있었다. 횡단면에서는 일부 근섬유의 단면이 원형으로 변화되었으나, 근육의 중심부와 다르게 근막에 가까운 변연부는 정상에 가까운 구조를 유지하고 있었다(Fig. 4).

나. 전자현미경 소견

1) 대조군(I군)

근형질내 근원섬유가 규칙적으로 배열되었고, 근원섬유에는 굵은 근미세섬유(thick myofilament: myosin) 사이에 가는 근미세섬유(thin myofilament: actin)가 삽입되어 있

었으며, 중등도의 전자밀도를 나타내는 A띠, 가는 근미세섬유로만 구성되고 전자밀도가 다소 낮은 I띠, I띠의 중간에 위치하며 전자밀도가 매우 높은 Z선, 가는 근미세섬유만으로 구성되고 전자밀도가 중간정도인 H띠와, H띠 중앙에 위치하며 약간의 가로미세섬유(transverse filament)를 포함하는 M선을 관찰하였다. 근원섬유사이에서는 사립체릉이 뚜렷하게 보이는 간형, 난원형 혹은 원형의 사립체, 근육세포질세망의 수조, 근육세포질세망 사이에서 집괴를 이루고 있는 당원과립이 다수 관찰되었다. 근육세포질막에서 시작되어 근원섬유 사이로 침투한 가로소관과 양측에서 근세포질세망의 종말수조가 구성하는 삼동이(triad)를 관찰하였다(Fig. 5).

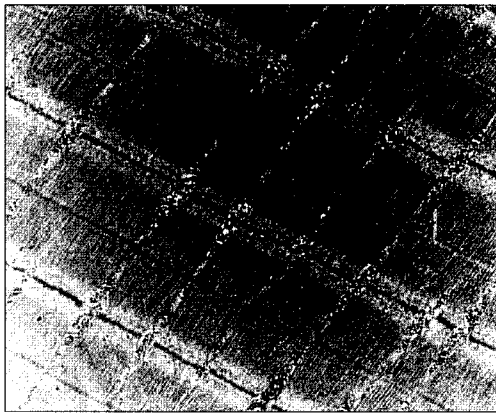


Fig. 5. Electron micrographs of the normal gastrocnemius muscle fibers (group I). In the myofibrils, ordered myofilament, M-line, Z-line, relatively dark A-band and light I-band are seen. Aggregated glycogen granules, cisternae of sarcoplasmic reticulum, rod shaped mitochondria and triad composed of transverse tubule and terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum are observed in the interfibrillar space. (× 20,000)

2) 허혈 재관류군(II군)

근세포질세망의 수조가 팽대되었고 팽대된 가로소관의 주변은 전자밀도가 높은 물질로 싸여있었다. 사립체의 부종이 매우 심하였으며 사립체릉(crista)의 비구조화(disorganization)와 팽대, 사립체기질의 전자밀도 감소를 관찰할 수 있었다. 당원과립은 거의 발견할 수 없었다. 대부분의 근원섬유가 용해되거나 변성되었고 배열이 불규칙해져 A 띠, I띠, M선, Z선을 구별할 수 없었으며, 세포질내의 공포화도 심하게 관찰되었다(Fig. 6).

3) DMSO 투여군(III군)

근세포질세망의 수조가 팽대되었으며 팽대된 사립체에서 사립체 기질의 전자밀도가 감소하였고, 사립체릉이 불분명해지거나 소실되었다. 당원과립도 드물게 관찰되었으며, 가로소관의 주변은 전자밀도가 높은 물질로 싸여 있는 것이 관찰되었다. 근원섬유에서 A띠, I띠의 구분은 희미하게 남아있었으나 M선, H띠는 알아보기 힘들었다. Z선은 거의 소실되었으나 일부 남아 있는 부분에서는 streaming 현상을 관찰할 수 있었다. 일부 근원섬유는 용해되었고, 일부 근원섬유마디에서는 근미세섬유가 절단되거나 소실되었으며 근원섬유사이의 간격이 넓어졌다. 세포질내 공포화 현상도 쉽게 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

4) 멜라토닌 투여군(IV군)

근세포질세망의 수조와 사립체의 약간의 팽대 소견은 있었으나 II군이나 III군과 비교하여 심하지 않았다. 사립체의 전자밀도는 약간 감소하였으나 사립체릉은 비구조화되지 않고 비교적 정상적으로 잘 유지되어 있었으며, 당원과립의 감소를 볼 수 있었다. 근원섬유는 정상대조군과 유사하게 근미세섬유의 변화가 미약하여 근원섬유마디에서

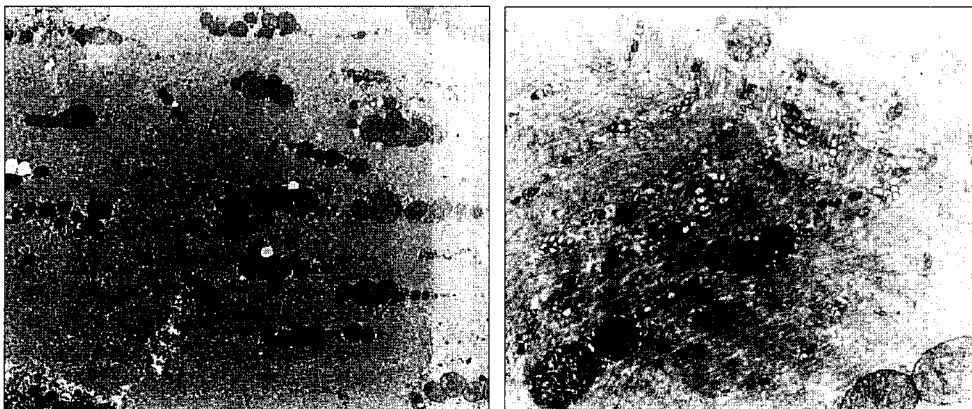


Fig. 6. Electron micrographs of the gastrocnemius muscle fibers after 4-hour ischemia and 24-hour reperfusion (group II). (Left) Mitochondrial swelling, cytoplasmic hydrophic vacuolizations and few glycogen granules are remarkable. Necrosis of myofibril is so severe that A-band, I-band, Z-line, M-line cannot be distinguishable. (× 7,000) (Right) Mitochondrial swelling, disorganizations of mitochondrial cristae and dilated endoplasmic reticulum are well noted. (× 20,000)

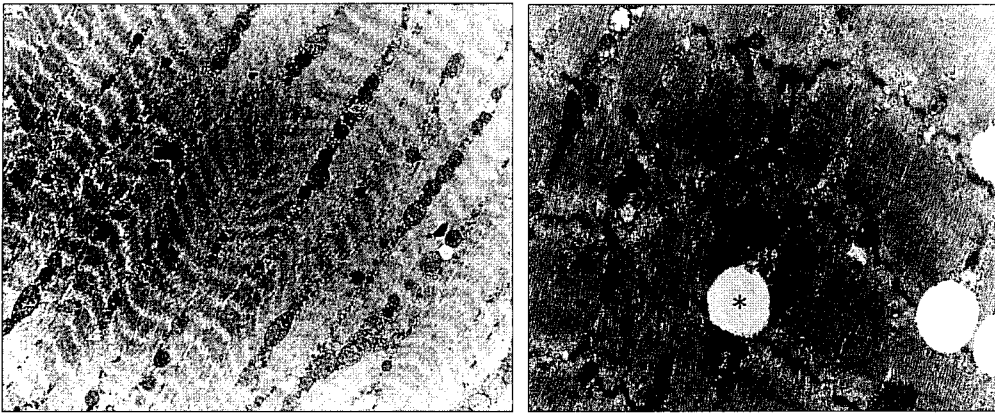


Fig. 7. Electron micrographs of the gastrocnemius muscle fibers after 4-hour ischemia and 24-hour reperfusion with DMSO treatment (group III). (Left) Streaming of Z-line (arrow), mitochondrial swelling, myofibrillar disorganization and widened inter-fibrillar space are remarkable. ($\times 7,000$) (Right) Advanced streaming leading to a disintegration of the Z-lines, indistinct A-band and I-band and cellular vacuoles (asterisk) are noted. ($\times 20,000$)

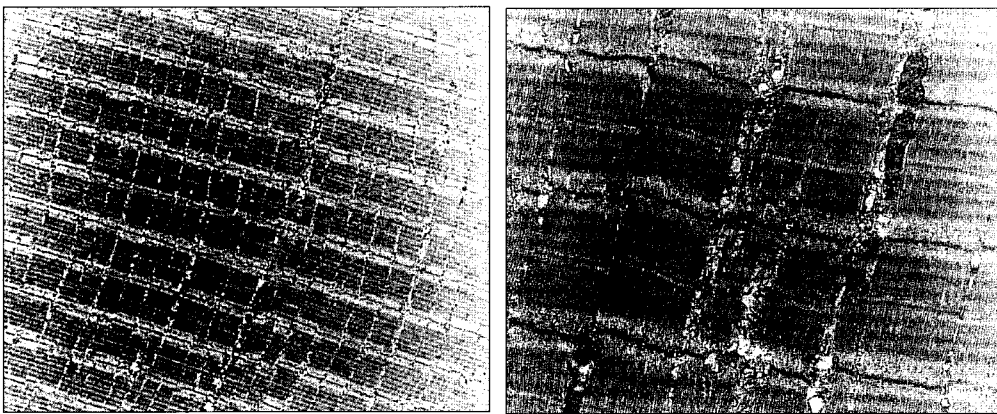


Fig. 8. Electron micrograph of the gastrocnemius muscle fibers after 4-hour ischemia and 24-hour reperfusion with melatonin treatment (group IV). (Left) Well preserved structures are noted. ($\times 7,000$) (Right) A-band, I-band M-line and Z-line in the myofibrils are observed. The mitochondria swells mildly but the cristae are not disorganized. The endoplasmic reticulum and triad show no specific changes. ($\times 20,000$)

A띠와 I띠의 경계는 잘 나타났으며 드물게 M선과 Z선이 분절되어 있었고 H띠는 명확히 보이지 않았다(Fig. 8).

IV. 고 찰

골격근은 혐기성 상태에서도 해당작용이 활발하게 이루어져 ATP 생산능력이 뛰어나며, 허혈상태에서 ATP가 ADP 및 AMP로 대사되면 AMP deaminase가 해당작용을 자극하고 ADP 또는 AMP와 반응하여 ATP를 형성하는 myokinase의 활성이 높을 뿐 아니라 다른 조직과 달리 inosine monophosphate가 adenylosuccinate synthetase에 의해 adenylo-succinate로 되어 adenine nucleotide pool을 유지시킬 수 있는 경로가 있어 허혈상태에 대하여 비교적 강하게 대응할 수 있는 조직으로 알려져 있지만, 이러한

근육의 대사적 특성에도 불구하고 장시간 지속되는 허혈상태로 근육의 손상이 야기된다. 또한 근육을 허혈 후 재관류시키게 되면 허혈 기간에 있었던 손상보다 조직손상이 더 심하게 일어난다.

이러한 허혈 후 재관류에 의한 골격근의 손상은 재관류시 형성되는 반응성 산소기에 의한 것으로 알려져 있다. Ratych 등⁷은 ATP의 대사물인 hypoxanthine과 xanthine oxidase에 의한 반응성 산소기의 형성은 허혈상태 후 산소의 공급이 있어야 생기며, 혈관내피세포에서 xanthine oxidase에 의하여 형성된 반응성 산소기가 백혈구에서의 반응성 산소기 형성을 자극시킨다고 하였다. Anderson 등⁸은 근육에서 허혈 후 재관류 손상은 재관류시 형성되는 반응성 산소기가 근육세포 내 항산화계의 기능을 증가하기 때문에 나타나는 현상으로 재관류시 혈류를 제한하여 주는 것이

좋으며 재관류 개시 후 10초간 세포손상이 일어난다고 하였고, Lindsay 등⁹은 허혈 후 재관류 시 나타나는 근육의 손상은 반응성 산소기에 의해 세포내 막구조물에서 비가역적 손상이 일어난 결과로 반응성 산소기의 형성은 재관류 전 근육을 허혈시킨 시간에 비례한다고 하였다.

골격근에서 허혈 후 재관류 시 나타나는 미세구조의 변화에 대하여 Eriksson 등¹⁰은 8시간 동안의 허혈 후 재관류시킨 실험에서 흰쥐 하퇴의 미세동맥과 정맥이 1시간 이내에 혈전덩어리에 의해 막힌다고 하였다. Blebea 등¹은 6시간 허혈 후 재관류시킨 개의 두덩정강근(*gracilis muscle*)에서는 근육섬유사이에 부종이 생기고 근육원섬유가 불규칙해지며 당원과립이 소실되고 사립체는 증창되며 사립체릉선이 불규칙해졌고, 근육의 손상은 근육의 근위부가 심하며 원위부에서는 혈류량이 감소하여 근육의 손상이 적다고 하였다.

허혈과 저산소증으로 인해 가장 먼저 공격을 받는 부위는 호기성 호흡을 하는 사립체로, 산소의 공급량이 감소하여 세포 내 산소분압이 떨어지면 산화적 인산화가 상실되어 ATP의 생산이 점차 감소하거나 중단된다. 세포 내 ATP가 감소하고 AMP가 증가하면 phospho-fructokinase란 효소가 자극되어 저장되어 있던 당원으로부터 혐기성 당분해 작용이 증가하여 아데노신삼인산을 생산하게 된다. 따라서 세포내 당원이 급속히 소모된다. 또한, 사립체는 반응성 산소기를 형성하기도 하지만 막구성 성분 중 구성비가 높은 다가불포화지방산이 반응성 산소기의 공격목표가 되어 과산화가 일어나게 되고 기능이 저하된다.

허혈성 손상에서 최초의 가장 중요한 소견 중 하나는 급성세포 증창으로 이것은 원형질막에 의한 세포부피조절의 손상인데, 나트륨 펌프의 기능장애로 나타난다. 이 나트륨 펌프는 능동적 운반체로 저산소증으로 인해 ATP와 ATPase의 감소는 능동운반에 장애가 생겨 나트륨이 세포내에 저류되고 칼륨은 세포밖으로 확산되어 나간다. 전해질 이동의 총합은 전해질 저류의 양이 증가하고 따라서 세포내 수분이 저류된다. 이로 인해 세포증창이 일어난다. 세포내로 수분 및 전해질이 이동하여 내형질세망의 조기 확장이 일어난다.

이후 일어나는 현상은 파립형내형질세망으로부터 리보솜의 탈락과 폴리솜이 모노솜으로 해리되는 것이다. 허혈이 지속되면 비가역적 손상이 일어나는데, 사립체의 심한 공포가 생기고 원형질막의 광범위한 손상, 리보솜의 증창이 나타난다. 세포사망 이후에 세포성분은 점차 변질되고 세포내 효소가 밖으로 광범위하게 새어나오는 반면, 세포사이에 있는 고분자물질들이 죽은 세포 내로 유입되어, 수초도(*myelin figures*) 모습의 인지질 덩어리로 변하게 된다. 이들은 다른 세포에 의해 탐식되거나 아니면 지

방산에 의해 붕괴되기도 하며, 이런 지방산의 찌꺼기는 석회화되고 석회 비누화도 일어난다. 이 시점에 도달하면 비정상적인 투과성을 가진 세포막을 통해 세포내의 효소가 세포 밖으로 새어나와 혈청내로 들어가게 된다.

신용호 등¹¹은 6시간 허혈 후 골격근에서 근섬유의 크기가 현저히 작아졌으며, 근섬유 사이의 간격이 넓어지고, 핵의 부종, 핵소체가 관찰되었다고 하였다. 부분적인 괴사 소견은 12시간, 24시간 허혈군에서, 세포질내 공포화 현상은 24시간 허혈군에서 가장 심하게 관찰되었다고 하였다. 저자들의 실험에서 4시간 허혈 후 24시간 재관류시킨 군에서는 급성염증세포의 침윤이 특징적으로 관찰되었고, 대부분의 근원섬유가 용해되거나 변성되었고, 세포질내의 공포화도 심하게 관찰되었다. 즉, 단순한 허혈보다는 재관류 시 조직손상이 더 심하게 일어났음을 짐작할 수 있다.

몇몇 연구에서 반응성 산소종의 유리를 자극하여 세포 손상을 초래하는 초기 현상으로서의 중성구의 활성화와 침윤을 지적하였다.¹² CD11이나 CD18과 같은 백혈구 표면 인테그린(*integrin*)과 ICAM(*endothelial intercellular adhesion molecule*)이 재관류된 조직내의 염증세포 축적을 야기하며 따라서 화학유인물질과 반응성 산소종의 생성을 더욱 촉진하여 유해 과정의 진행을 증가시킨다. 이러한 과정의 결과가 미세혈관의 투과성과 조직 부종의 증가로 나타나게 된다. 실험결과 멜라토닌을 투여한 군에서는 염증세포의 침윤과 근육 간질조직의 부종이 경미한 소견을 보여, 이상적인 허혈-재관류 손상 완화 약물을 찾는 데 있어서 반응성 산소종 매개 손상의 결과뿐 아니라 중성구의 활성화와 침윤도 고려해야 한다는 관점에서 멜라토닌은 우수한 약물이라 할 수 있을 것이다.

저자들의 골격근의 허혈-재관류 손상에 대한 멜라토닌의 효과에 관한 이전의 연구에서 DMSO보다 멜라토닌이 골격근의 허혈-재관류 손상을 효과적으로 방지하는 것을 부종을, 지질과산화의 최종산물인 혈중 *malondialdehyde*와 골격근 용해(*rhabdomyolysis*)의 표지로서 *creatine kinase*와 같은 생화학적 지표의 측정을 통해 증명한 바 있는데,⁶ 본 실험에서도 병리학적 소견으로 Teravainen 등¹³이 보고한 핵 주변에 염색질의 응집, 근세포 사이의 해리, 근섬유의 원형변화, 섬유형태의 구조적 손상과 같은 가역적인 변화가 허혈-재관류군, DMSO 투여군보다 멜라토닌 투여군에서 경미했으며, 사립체의 부종, 속사립체막능선의 형태적 변화, 세포질내 공포 형성, 용해소체의 확장 등과 같은 비가역적인 변화를 허혈-재관류군, DMSO 투여군에서는 어느 정도 관찰할 수 있었으나, 멜라토닌 투여군에서는 경미한 사립체의 부종 정도만을 볼 수 있었다. 결론적으로 조직학적으로도 멜라토닌 투여군은 근육세포의 손상이나 염증반응이 DMSO 투여군과 비교했을 때 확연한 차

이를 보이며 거의 정상 골격근에 가까운 소견을 보일 정도로 효과가 훨씬 뛰어났다.

멜라토닌은 수산화, 단관체 산소(singlet oxygen), 초산기, 과산화 음이온의 독성을 중화하는 자유기 제거 기능을 통해, 자유기로부터 산화 손상을 받는 탄수화물, 지방, 단백질, DNA와 같은 고분자를 보호하며, 사립체의 산화적 인산화의 효율을 증가시켜 사립체 전자 전달 사슬로부터 전자의 누출을 감소시켜 자유기 생성을 감소시키고, 중성구의 침윤 방지, 항산화 효소계의 활성화 등의 작용을 통하여 효과적으로 허혈-재관류 손상을 방지하는 것으로 생각된다. 멜라토닌은 지용성 물질이지만 세포의 수성 환경에도 잘 들어가는 양호성(amphiphilic nature)을 가지고 있어 어떠한 경로로 투여해도 잘 흡수되고 모든 형태생리학 적 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, 비타민 E, glutathione 과 상승작용을 한다는 특성도 가지고 있다.

이와 같은 멜라토닌의 효과, 특성과 실험 결과에 근거하여 임상적으로 골격근의 허혈-재관류 손상이 예상되는 경우에 멜라토닌을 적절히 투여한다면 이상적인 약물로서 허혈-재관류 손상을 효과적으로 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결 론

본 연구의 목적은 4시간 허혈 후 24시간 재관류 시 나타나는 근조직의 손상과 변화를 관찰하고, 근육에서 허혈-재관류 손상을 야기시키는 것으로 알려진 반응성 수산화기를 제거하는 DMSO와 항산화효과를 가진 멜라토닌을 전처치한 경우를 서로 비교하여 멜라토닌이 허혈 및 재관류시킨 근육에 미치는 영향과 효과를 규명하고자 본 실험을 시행하였다.

실험결과 멜라토닌은 조직학적 측면에서 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

1. Blebea J, Kerr JC, Shumko JZ, Feinberg RN, Hobson RW 2nd: Quantitative histochemical evaluation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 43: 311, 1987
2. Becker M, Menger MD, Lehr HA: Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Am J Physiol* 267: H925, 1994
3. Walker PM: Symposium on acute arterial insufficiency. 1.Pathophysiology of acute arterial occlusion. *Can J Surg* 29: 340, 1986
4. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G, Miller S, Nolan D, Peoples J: The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 178: 147, 1999
5. Sener G, Sehri 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
6. Park HJ, Burm JS: The effect of melatonin on biochemical changes after ischemia- reperfusion injury of rat skeletal muscle. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 32: 683, 2005
7. Ratych RE, Chuknyiska RS, Bulkley GB: The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygenation in isolated endothelial cells. *Surgery* 102: 122, 1987
8. Anderson RJ, Cambria R, Kerr J, Hobson RW 2nd: Sustained benefit of temporary limited reperfusion in skeletal muscle following ischemia. *J Surg Res* 49: 271, 1990
9. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM: The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg* 12: 8, 1990
10. Eriksson E, Replogle RL, Glagov S: Reperfusion of skeletal muscle after warm ischemia. *Ann Plast Surg* 18: 224, 1987
11. Shin YH, Lee JI, Chung CH, Oh SJ: Morphological changes of the gastocnemius muscle induced by clamping and recirculation of the common femoral artery of the rat. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 22: 213, 1995
12. Yokota J, Minei JP, Fantini GA, Shires GT: Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia. *Am J Physiol* 257: H1068, 1989
13. Teravainen H, Makitie J: Striated muscle ultrastructure in intermittent claudication. *Arch Pathol Lab Med* 101: 230, 1977