

백서의 중대뇌동맥 폐쇄로 유발시킨 뇌경색의 범위 측정과 경시적 변동*

계명대학교 의과대학 신경외과학교실, 병리학교실**

김인수 · 임만빈 · 이장철 · 손은익 · 김동원 · 김인홍 · 권건영**

= Abstract =

The Evaluation and Quantification of Cerebral Infarction Following a Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats*

In Soo Kim, M.D., Man Bin Yim, M.D., Chang Chull Lee, M.D.,
Eun Ik Son, M.D., Dong Won Kim, M.D.,
In Hong Kim, M.D., Kun Young Kwon, M.D.**

*Department of Neurosurgery and Pathology,** School of Medicine, Keimyung University,
Taegu, Korea*

In order to find out the accuracy of the quantification of the infarction area by using triphenyltetrazolium chloride(TTC) staining and to evaluate the change of the infarction size according to the duration after the ischemic insult, in a series of 33 adult rats, a surgical occlusion of the middle cerebral artery(MCA) was carried out through a small subtemporal craniotomy. 11 animals at 6 hour, 12 animals at 24 hour and 10 animals at 48 hour following the surgical occlusion of the MCA, rats were sacrificed and brain slices were obtained and stained with TTC, and hematoxyline and eosin(H & E). The size of the infarction area stained by each method was quantified by a computer image analysis system.

The average percent of the infarction size(\pm standard error) was larger in the 24 and 48 hour groups than that of the 6 hour group(determined by TTC : 9.94 ± 0.97 vs. 9.98 ± 1.08 vs. $6.83 \pm 0.82\%$, respectively : 6 hour vs. 24 & 48 hour groups ; one-way ANOVA test $p < 0.05$ determined by H & E : 10.02 ± 0.94 vs. 10.02 ± 1.06 vs. $7.73 \pm 0.85\%$, respectively). However, there was no significant difference in the size of the infarction between the 24 and 48 hour groups.

The size of the infarction area determined by either method was not significantly different in any group(TTC vs. H & E : paired t-test $p > 0.05$), and linear regression analysis showed a significant correlation existed between the two methods in all groups. However, the degree of correlation was more prominent in the 24 and the 48 hour groups than 6 hour group(6 hour group : $r = 0.76$, slope = 0.78, y intercept = 0.55 ; 24 hour group : $r = 0.97$, slope = 1.03,

* 본 논문의 요지는 1990년 추계 신경외과학술대회에서 발표되었음.

* 본 논문은 1991년 동산의료원 조사연구비 및 을종연구비의 일부보조로 이루어졌음.

y intercept = -0.78 ; 48 hour group : r = 0.98, slope = 0.94, y intercept = 0.42).

From this study it is concluded that : 1) the evolution of the infarction size continues up to 24 hours following the arterial occlusion, and thereafter, the change of the infarction size is minimal in the rat. This data suggests that it is sufficient to evaluate the change of the infarction size up to 24 hours following the ischemic insult in the experimental study of ischemia in the rat. 2) the detection and the quantification of the cerebral infarction by using TTC staining is a reliable method after 24 hours following the ischemic insult. However, in the earlier period than 24 hours following the ischemic insult, staining with TTC coupled with histopathological H & E staining will add to the accuracy in the obtaining the quantity of the cerebral infarction in the rat.

KEY WORDS : Cerebral infarction · Rat · Middle cerebral artery · Quantification · Triphenyltetrazolium chloride · Hematoxyline and eosin.

서 론

뇌혈류의 장애로 발생하는 뇌경색을 실험 동물에서 유발시켜서 뇌경색의 부위와 범위를 정확히 측정하고 뇌동맥 폐쇄의 시간에 따른 차이를 관찰하는 것은 뇌경색의 진행과정을 이해하고 나아가 치료제나 치료방법을 연구하는데 도움이 될 것이다.

실험적 뇌경색을 연구함에 있어 과거에는 뇌경색 부위 및 범위를 확인하고 측정하기 위하여 주로 병리조직학적 방법을 이용하였으나 이는 시간이 많이 걸리는 단점이 있어⁷⁾, 최근에는 정상 뇌세포내 사립체(mitochondria)의 dehydrogenase와 반응하여 착색되는 triphenyltetrazolium chloride (TTC)를 사용하여 뇌경색 부위를 측정하는 방법이 종종 이용되고 있다²⁾³⁾²⁰⁾. 그러나 TTC를 사용한 방법의 그 정확도를 병리조직학적 방법과 비교하였거나 뇌허혈 유발후 시간 경과에 따른 양 방법간의 관계를 비교 조사한 연구는 드물다⁷⁾.

따라서 저자들은 백서를 실험동물로 하여 측두하 접근으로 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌허혈을 유발하고²⁸⁾, 뇌허혈 유발후 6시간, 24시간, 48시간에 TTC 염색과 hematoxylin & eosin(H & E) 염색으로 뇌경색 범위를 측정하였다. 그리고 경시적 변동을 조사함과 함께 양 방법간의 상관 관계 및 시간 경과에 따른 차이를 조사하여, 향후 뇌경색에 대한 실험에서 뇌경색 범위의 정확한 측정 및 실험 시간의 설정에 도움을 얻고자 본 실험을 시행하

였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 재료

체중 270~335g의 건강한 백서 33마리를 암수 구별없이 사용하였고 실험군은 중대뇌동맥 폐쇄후 조직 검사를 시행하기 위하여 경시적으로 6시간, 24시간 및 48시간의 3군으로 나누었으며 6시간군 11마리, 24시간군 12마리, 그리고 48시간군 10마리를 사용하였고, 뇌경색 범위 측정에는 TTC(Sigma, U.S.A.)를 사용하였다.

2. 실험 조작 및 심폐 기능 측정

실험 조작전에 sodium penicilline 30,000unit/kg를 백서의 체중에 따라 계산하여 둔부에 주입후, nembutal 0.05mg/g을 복강내에 주입하여 마취를 시행하였으며, 두경부 및 좌측 서혜부를 제모하였다. 이후 동물을 널판지를 이용한 고정대에 앙와위로 고정하고 2% zephanon 용액으로 좌측 서혜부의 피부를 무균 소독한 다음, 수술용 현미경(Topcon OMS-80)하에서 서혜부 상부에서 슬개부까지 약 3cm의 피부절개를 가한후 대퇴동맥, 대퇴정맥 및 신경조직을 미세 수술 기구를 이용하여 조심스럽게 서로 박리한 다음 두개의 Sugita aneurysmal temporary clip으로 대퇴동맥의 근위부와 원위부에 각각 일시적 결찰을 시행하였다. 이후 11번 수술용 칼로 결찰부 사이의 대퇴동맥에 약 1mm 절개를 가하고 25gauge 도관(catheter)을

삽입한 후 clip을 제거하고 4-0 수술용 실로 도관을 주위조직에 고정한 후 피부봉합을 시행하였으며 실험 기간중 이 도관을 이용하여 심폐 기능을 측정하였다.

다음에 백서의 체위를 좌측 와위로 변경시키고 고정시킨 후 두부를 같은 방법으로 무균 소독한 다음 우측 이개 후하방에서 안와하부까지 협골궁을 따라 피부절개를 가하고 치과용 천공기(drill)를 사용하여 협골궁을 제거하였다. 측두근 및 골막은 수술용 칼을 사용하여 두개골에서 박리하고 삼차 신경이 두개밖으로 나오는 난공(foramen ovale) 바로 전측방 부위의 두개골을 치과용 천공기로 갈아 약 3mm 크기의 구멍을 만들고 소형 지혈겸자를 사용하여 그 주위의 두개골을 제거하였다.

이후 조심스럽게 미세 수술용 가위로 뇌경막을 절개하고 중대뇌동맥의 근위부를 노출하고 주위 조직으로부터 완전히 박리한 후 10-0 나이론사를 사용하여 약 1mm 간격으로 두군데 결찰을 시행한 후 중간부위를 미세 수술용 가위로 절단하였다. 이후 소독된 수술용 고무장갑을 0.5×0.5cm 크기로 잘라 실험 부위 위에 덮어 실험 부위와 측두근의 유착을 방지한 후 실험 조작 부위에 출혈이 없음을

확인한 후 연부 조직을 봉합하였다(Fig. 1).

실험 중 혹은 실험 후 기도 분비물은 30ml 주사기에 polyethylene tube를 연결시켜 만든 흡입기로 흡입하여 제거하였으며, 실험이 끝난 후에는 백서의 마취가 완전히 회복된 후 동물 사육실에 각각 분리하여 수용하고 희생(sacrifice)시킬 때까지 신경학적 이상소견의 발현 유무를 관찰하였다.

중대뇌동맥 폐쇄 직전과 직후, 6시간, 24시간과 48시간에 평균혈압(mean arterial blood pressure)은 Physiograph(Pressure Transduce Mark IV, Narco Bio-system, U.S.A.)로, PaO₂, PaCO₂, pH는 Instrumentation Laboratory(U.S.A.)사의 혈액가스분석기(IL813)로, 적혈구용적(hematocrit)은 Clay Adams(U.S.A.)사의 microhematocrit centrifuge로 측정하였다.

3. 병리학적 관찰 및 뇌경색 범위 측정

실험 동물들은 중대뇌동맥 폐쇄 후 6시간, 24시간, 48시간에 nembutal 0.05mg/g을 복강내에 주입하여 다시 마취를 시행하고, 수술용 현미경하에서 두부 정중선에 두피 절개를 가한 후 두피를 골막과 같이 젖히고 실험 부위를 측두근과 조심스럽게 박리한 후 소형 지혈겸자를 이용하여 두

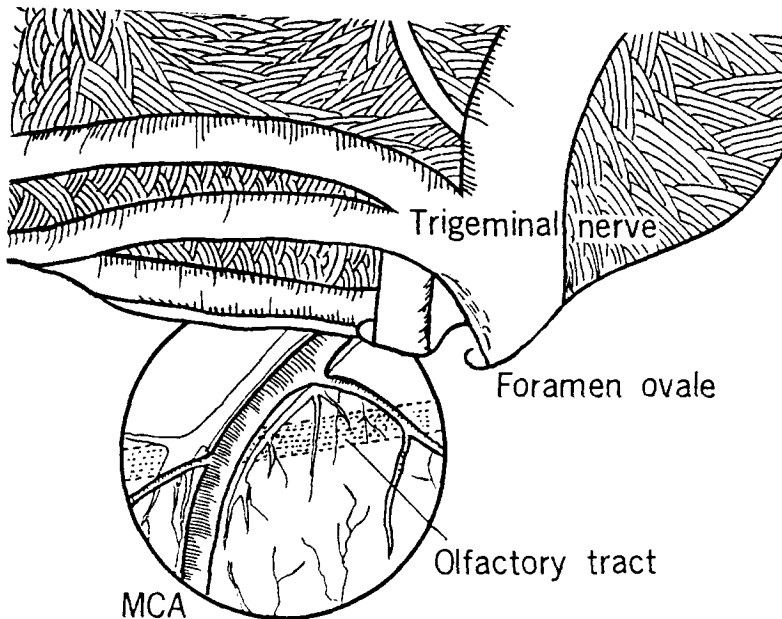


Fig. 1. This is a schematic illustration of a microsurgical view of the operation field. A small craniectomy was performed just anterolateral to the exit of the trigeminal nerve from the foramen ovale. The circled area indicates the craniectomy site and the exposure of the middle cerebral artery.

개골을 제거후 시신경, 후각신경 및 경수부를 횡 절단하여 전뇌를 적출하였다. 적출한 전뇌를 전 두엽 전단에서 부터 약 3mm 간격으로 관상으로 절단하여 8절편으로 만든 후 이들 대뇌조직 절편 들을 빛이 차단된 상태하에서 37°C의 2% TTC 용액에 약 10분마다 뇌조직 절편들을 뒤집는 조 작을 시행하면서 30분간 담구어 염색한 후 수술용 현미경하에서 뇌경색 부위를 관찰 후 증류수로 세척한 뒤 10% 포르말린 용액에 고정하였다.

TTC 염색에 의한 뇌경색 범위의 측정은 Com-puter Image Analysis System(IBAS 2000, Kontron, West Germany)을 사용하여 각각의 절편에서 전체 면적에 대한 뇌경색 범위 면적의 percent를 구하

였다. 병리조직학적으로는 H & E 염색을 시행하여 광학 현미경으로 뇌경색 부위를 관찰하고 그 경 계를 표시한 후 역시 Computer Image Analysis System을 사용하여 같은 방법으로 뇌경색 면적의 percent를 측정하였다.

4. 통계처리

각 군간의 차이에 대한 유의성은 심폐 기능의 측정치에서는 Mann Whitney test로, 뇌경색 범위의 측정치는 one-way ANOVA test를 사용하였다. 또 한 TTC 염색과 H & E 염색간의 비교는 paired t-test로 유의성을 검증하였고, p값이 0.05이하는 통계학적 유의성이 있는 것으로 하였다.

Table 1. Mean arterial blood pressure, gas analysis and hematocrit

	Pre MCAO	Post MCAO	6 H PO	24 H PO	48 H PO
MABP (mmHg)					
Group I	94.8 ± 18.6	101.0 ± 10.7	96.0 ± 16.3		
Group II	101.3 ± 12.4	100.5 ± 16.5	91.7 ± 19.6	91.7 ± 14.0	
Group III	92.8 ± 12.5	101.8 ± 13.4	97.3 ± 12.0	98.1 ± 10.0	102.9 ± 12.8
Arterial pH					
Group I	7.373± 0.028	7.360± 0.039	7.361± 0.029		
Group II	7.370± 0.039	7.377± 0.040	7.367± 0.029	7.367± 0.033	
Group III	7.366± 0.023	7.359± 0.021	7.366± 0.034	7.368± 0.037	7.367± 0.030
Arterial pCO ₂ (mmHg)					
Group I	38.0 ± 7.9	37.7 ± 7.2	34.8 ± 6.8		
Group II	40.4 ± 6.4	37.8 ± 8.2	36.0 ± 6.1	33.2 ± 8.0	
Group III	33.4 ± 5.7*	32.9 ± 4.6	34.3 ± 7.2	33.7 ± 6.8	32.3 ± 6.1
Arterial pO ₂ (mmHg)					
Group I	83.5 ± 8.0	83.4 ± 8.9	82.3 ± 12.0		
Group II	80.1 ± 6.4	81.6 ± 7.2	86.9 ± 11.9	82.5 ± 15.8	
Group III	85.1 ± 8.1	79.6 ± 5.9	80.3 ± 4.9	81.5 ± 6.1	79.2 ± 9.1
Hematocrit (%)					
Group I	40.1 ± 4.6	36.2 ± 6.3	35.9 ± 4.2		
Group II	42.8 ± 8.9	37.0 ± 5.4	34.8 ± 6.2	32.9 ± 5.6	
Group III	38.8 ± 3.4	36.6 ± 3.8	38.8 ± 4.3	36.2 ± 4.6	36.3 ± 2.8

Values are mean±SD

MCAO=middle cerebral artery occlusion : H=hours : PO=post-occlusion

MABP=mean arterial blood pressure

Group I =6 hour group(n=11) : Group II=24 hour group(n=12) :

Group III=48 hour group(n=10)

* Mann Whitney test : p<0.05 compared to group II

결 과

1. 심폐 기능 측정치

각 실험군에서 측정된 평균혈압, pH, PaO₂, PaCO₂ 및 적혈구 용적은 정상 범위를 보였으며 각군간의 비교에서 중대뇌동맥폐쇄 직전에 측정된 PaCO₂중 24시간군과 48시간군간의 차이(p<0.05)를 제외하고 나머지에서는 차이가 없었다(Table 1).

2. 육안 및 광학 현미경적 소견

육안적 소견으로 뇌경색 부위는 우측 전두 및 두정엽에 주로 형성되어 있었으며, 6시간군에서는 경색부위가 적고 주위 정상 뇌조직과의 경계가 불분명하였으나, 24시간군 및 48시간군에서는 뇌경색 부위가 더욱 진행되고 경계가 명확한 소견을 보였다.

TTC 염색을 시행한 후 정상 뇌조직 부위는 붉게 염색되었으나 뇌경색 부위는 염색되지 않아 정상 뇌조직 부위와 육안상 쉽게 구별할 수 있었다. 육안적으로도 뇌경색 부위는 6시간군보다 24시간군과 48시간군에서 크게 관찰되었으나, 24시간군

과 48시간군간에는 큰 차이를 관찰 할 수 없었다 (Fig. 2).

병리조직학적으로 H & E 염색을 시행한 후에는 TTC에 의한 정상 뇌조직의 염색부위의 색이 탈색되었다.

광학 현미경적 소견으로, 6시간군에서는 뇌경색 부위는 작고 회백질과 백질에서 모두 관찰되었으나 회백질에서 더 현저하였으며, 신경교세포의 변성이 관찰되기 시작했다. 일부 신경교세포에서 괴사가 관찰되었고 주위조직의 모세 혈관에 울혈도 관찰되었으나 뇌경색 부위와 정상조직간의 경계는 불분명하였다(Fig. 3).

24시간군에서는 6시간군에 비해 뇌경색 부위가 확장된 소견을 보였고 정상 뇌조직과의 경계가 비교적 명확해졌으며 세포내 핵이 희미해져 변성과 괴사가 인정되었다. 그리고 간혹 모세 혈관에 울혈과 혈전이 발견되기도 하였다(Fig. 4).

48시간군에서는 24시간군에 비교하여 뇌경색의 범위가 확장되지는 않았으나 경계가 더욱 명확해졌으며 신경세포는 소실되어 공포로 보였고 신경세포의 변성과 괴사가 뚜렷해졌다. 그리고 국소적인 출혈을 동반한 모세 혈관의 울혈과 혈전이 발견되었다.

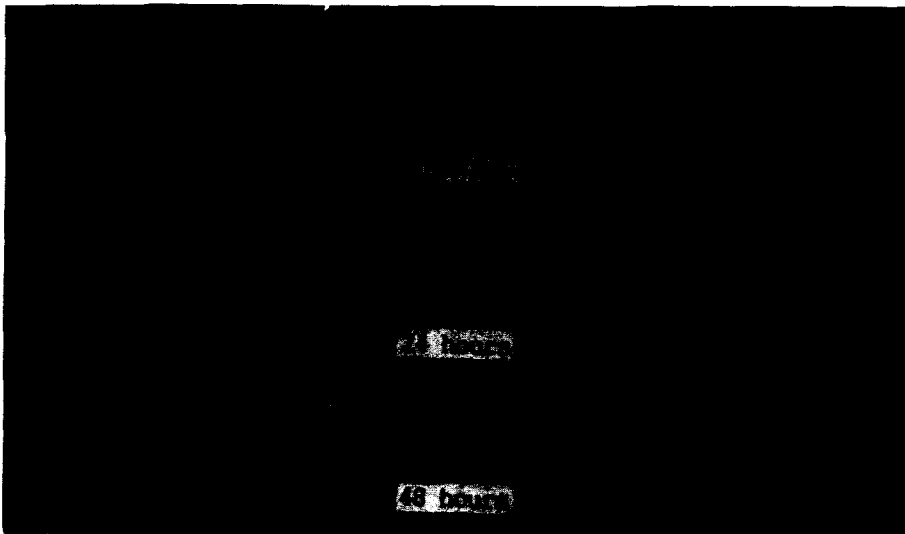


Fig. 2. A gross photograph of the coronal section of a rat's brain with TTC staining. TTC stained normal areas of the brain are deep red but no stain is seen in the infarcted area. The border between the normal and infarcted area was well-defined and could be detected easily by gross inspection in the 24 and 48 hour groups.



Fig. 3. The infarcted area is small in size. The border between the cerebral infarcted area and the normal brain tissue is not clear. 6 hour group - H & E, $\times 100$.



Fig. 4. The infarcted area is more extended and pale due to edematous change and focally liquefactive necrosis. Capillaries are congested and thrombus can be seen occasionally. 24 hour group - H & E, $\times 40$.

3. TTC 염색과 H & E 염색으로 측정된 뇌경색 범위의 경시적 변동과 차이

TTC 염색으로 측정된 뇌경색 범위의 측정치는 6시간군 6.83±0.82, 24시간군 9.94±0.97, 48시간군 9.98±1.08%로써, 뇌경색 부위가 6시간군에 비하여 24시간군 및 48시간군에서 유의성 있게 확장되었으나(p<0.05), 24시간군과 48시간군 간에는 큰 차이가 없었다.

H & E 염색으로 측정된 측정치는 6시간군 7.73±0.85, 24시간군 10.02±0.94, 48시간군 10.02±1.06%로써 역시 6시간군에 비하여 24시간군 및 48시간군에서 뇌경색 범위가 확장되었으나 유의성은 없었고 24시간군 및 48시간군간에는 차이가 거의 없었다.

TTC 염색과 H & E 염색으로 측정된 측정치 간에는 각 군에서 공히 H & E염색으로 측정된 측정치가 높았으나 유의성 있는 차이는 없었다 (Table 2).

4. 뇌조직 절편에 따른 뇌경색 범위의 경시적 변동

TTC 염색과 H & E 염색에서 공히 뇌경색은 대뇌의 중간부위 즉 slice 2, 3, 4, 5에서 가장 심하였고 또한 뇌경색 유발후 시간 경과에 따른 차이도 이부분에서 현저하였다(Fig. 5, 6).

5. TTC 염색과 H & E 염색으로 측정된 경시적 뇌경색 범위의 상관 관계

6시간군 r=0.76, slope=0.78, y intercept=0.55 였고, 24시간군 r=0.97, slope=1.03, y intercept=-0.78였으며, 48시간군 r=0.98, slope=0.94, y intercept=0.42로써 각군에서 공히 높은 상관 관계를 보였으나 이중 6시간군에서 상관 관계가 가장 낮았다(Fig. 7).

고 찰

뇌허혈성 병변을 연구하기 위하여 동물 실험을

Table 2. The average thickness and percentage of infarction size determined by TTC and H & E staining in each group

Group	Method	Mean thickness (mm)	The No. of slice and average percent of infarction size in each slice								Total (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	
I	TTC	2.88 ± 0.08	6.51 ± 2.51	14.51 ± 2.36	16.13 ± 1.73	11.09 ± 1.27	5.25 ± 1.19	1.11 ± 0.42	0.00	0.00	6.83 ± 0.82
	H & E	2.88 ± 0.08	6.44 ± 2.09	15.28 ± 2.28	18.23 ± 1.75	13.20 ± 1.18	6.68 ± 0.94	1.97 ± 0.55	0.00	0.00	7.73 ± 0.85
II	TTC	3.04 ± 0.08	7.98 ± 1.49	18.34 ± 2.16	22.28 ± 2.08	17.64 ± 1.58	10.04 ± 1.60	3.27 ± 1.04	0.00	0.00	9.94 ± 0.97
	H & E	3.04 ± 0.08	8.75 ± 1.18	18.25 ± 2.00	21.78 ± 2.08	17.43 ± 1.59	10.17 ± 1.39	3.82 ± 0.08	0.00	0.00	10.02 ± 0.94
III	TTC	3.06 ± 0.09	6.99 ± 1.19	18.55 ± 1.44	23.90 ± 1.79	18.24 ± 2.33	9.23 ± 1.74	2.92 ± 0.68	0.00	0.00	9.98 ± 1.08
	H & E	3.06 ± 0.09	7.25 ± 1.04	18.55 ± 1.39	23.57 ± 1.71	18.12 ± 2.26	9.45 ± 1.72	3.24 ± 0.70	0.00	0.00	10.02 ± 1.06

Values are mean±SE

Group I = 6 hour group(n=11) : Group II = 24 hour group(n=12) : Group III = 48 hour group(n=10)

Statistical significance among groups by one-way ANOVA test

TTC : 6 hour vs. 24 & 48 hour : p<0.05 24 hour vs. 48 hour : p>0.05

H & E : p>0.05

Statistical significance between TTC and H & E stainings by paired t-test

TTC vs. H & E : p>0.05

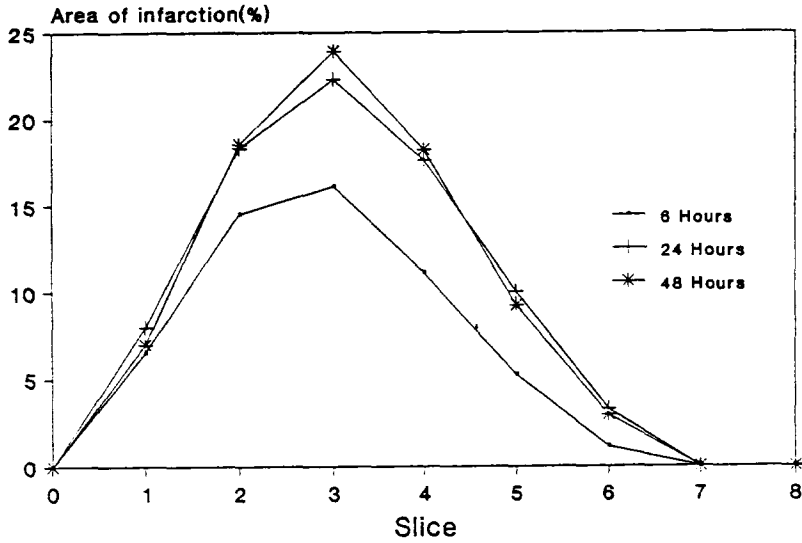


Fig. 5. The average percent of the infarction size was determined by TTC staining according to the duration of MCA occlusion in each slice. In the 24 hour and 48 hour groups, the average size of the infarction area was larger than that of the 6 hour group, especially in the midportion of the brain (slices 2, 3, 4, 5) ($p < 0.05$). However, only minimal difference was noticed in the infarction size between the 24 and 48 hour groups.

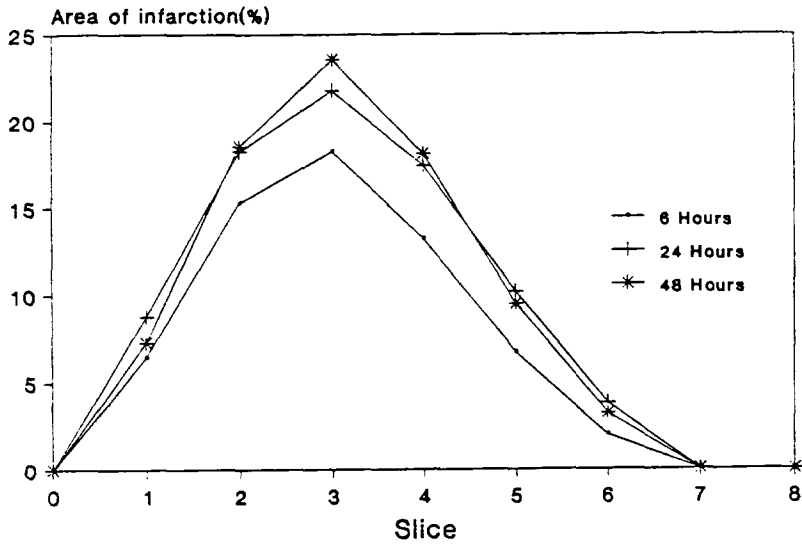


Fig. 6. The average percent of infarction size was determined by H & E staining according to the duration of MCA occlusion in each slice. The result was similar to that which was determined by TTC staining.

시행시 실험 동물은 백서²⁾³⁾⁵⁾⁷⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁸⁾³⁰⁾, gerbil¹⁷⁾¹⁹⁾, 고양이⁴⁾⁶⁾¹²⁾ 및 원숭이¹⁴⁾¹⁸⁾ 등이 주로 사용되어 왔으나 비교적 측부혈행이 적고 뇌혈관 구조의 다양성이 적은 gerbil이나 백서를 사용하는

것이 좋다고 알려져 있다¹³⁾¹⁷⁾¹⁹⁾²⁸⁾.

뇌허혈 병변을 만드는 방법은 gerbil에서는 총경동맥만 폐쇄시키고도 뇌허혈 병변을 얻을 수 있으나¹⁷⁾¹⁹⁾, 백서에서는 총경동맥과 함께 추골동

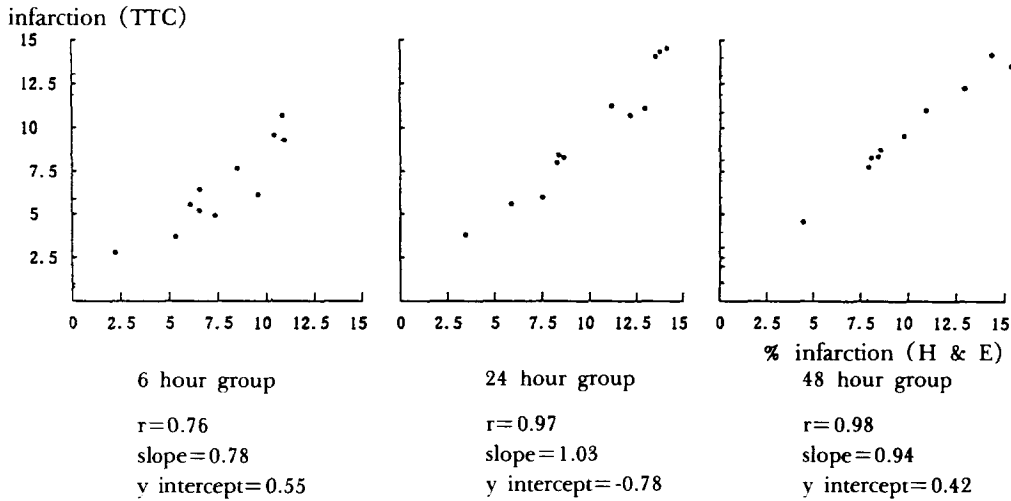


Fig. 7. The relation of the average percent of the infarction area shows a correlation between that determined by TTC and that by H & E staining according to the duration of the MCA occlusion. Linear regression analysis showed that a significant correlation existed between the two methods in all groups. However, the degree of correlation was more prominent in the 24 and the 48 hour groups than the 6 hour group.

맥을 폐쇄시켜²³⁾, 혹은 이와 더불어 산소 결핍을 시키는 조작을 첨가하여²¹⁾²²⁾, 또는 중대뇌동맥을 폐쇄시켜 뇌허혈 병변을 만드는 방법이 이용되어 왔다. 실험 목적에 따라 차이는 있겠으나 많은 저자들은 중대뇌동맥을 폐쇄시켜 뇌허혈 병변을 만드는 방법을 이용하고 있다²⁾³⁾⁵⁾⁷⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁸⁾³⁰⁾.

중대뇌동맥을 폐쇄하기 위하여 접근하는 방법은 안와 접근(transorbital 혹은 retro-orbital approach)⁴⁾¹⁴⁾¹⁸⁾²⁰⁾²⁶⁾²⁷⁾과 측두하 접근²⁾³⁾⁵⁾⁷⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁸⁾³⁰⁾으로 대별된다. 고양이, 개 및 원숭이를 실험 동물로 사용시는 중대뇌동맥이 안와공(optic foramen)쪽에서 나오므로 안와 접근이 타당하나 백서에서는 중대뇌동맥의 해부학적 위치가 상기한 동물들과 차이가 있어 측두하접근이 타당하다고 알려져 있다²⁸⁾.

중대뇌동맥을 폐쇄시키는 방법은 많은 저자들이 양극 전기 응혈기로 중대뇌동맥을 응고시키고 절단하는 방법을 사용하였으나²⁾³⁾⁵⁾⁷⁾²⁵⁾³⁰⁾, 이 방법은 중대뇌동맥을 응고시키는 실험 과정에서 대뇌에 손상이 가해져 실험결과에 영향을 줄 위험이 있다²⁶⁾²⁸⁾³⁰⁾.

따라서 저자들은 실험 동물로 백서를 선택하였고, 중대뇌동맥의 폐쇄를 위한 접근은 Tamura등²⁸⁾이 시행한 측두하 접근을 이용하였으나 보다 나은

수술시야를 확보하기 위하여 혈관공을 제거하였다. 또한 실험 조작중 대뇌손상을 최소화하기 위하여 10-0 나이론사로 중대뇌동맥을 결찰후 절단하여 폐쇄시켰다.

뇌허혈성 병변에 기인한 뇌손상 정도의 측정은 광학 현미경이나 전자 현미경적 소견을 기초하여 뇌세포 미세 구조물의 변화 혹은 뇌조직의 파괴 정도와 같은 병리학적 소견으로 손상 정도를 가늠하거나²⁾⁹⁾¹⁰⁾¹²⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁸⁾²¹⁾³¹⁾, 또는 뇌경색 혹은 뇌허혈성 병변 범위의 광범성을 기준하여 그 손상 정도를 측정하는 방법으로 대별할 수 있다²⁾³⁾.

뇌경색 범위의 광범성을 측정하는 방법은 병리 조직학적으로 H & E 염색후 광학현미경하에서 뇌세포 조직의 손상부위를 확인하여, 또는 뇌조직을 염색하여 뇌경색 부위를 정상조직과 구별하여 그 광범성을 측정하는 방법으로 대별된다.

뇌조직의 경색부위를 구별하기 위하여 이용되는 염색 약은 neutral red 생리식염수⁵⁾, carbon black²⁸⁾, triphan blue¹⁹⁾ 및 TTC²⁾³⁾⁷⁾²⁰⁾ 등이 있으나 TTC를 이용한 저자들이 많다²⁾³⁾⁷⁾²⁰⁾.

TTC는 수용성 염(water soluble salt)으로서 사립체의 호흡 효소 즉 전자 수송 고리(electron transport chain)를 구성하는 dehydrogenase와 반응하여 착색되므로써 정상 조직은 착색이 되나 비가

역적 손상을 입은 조직은 착색이 되지 않으므로^{7) 20)}, 심근경색⁸⁾ 및 뇌경색 부위의 측정에 이용되고 있다^{7) 20)}. 이 방법은 시행하기가 용이하고 경비가 적게들며 시간이 절약되나 사립체의 dehydrogenase 존재 여부에 의존되므로 정확한 뇌조직 구조물의 파괴정도를 측정하는데는 한계가 있다^{7) 20)}.

뇌조직에 허혈성 병변이 초래되면 30초내에 sodium-potassium pump의 장애가 오고 sodium의 세포내 유입에 수분이 수동적으로 따라들어가 3분내에 세포내 부종이 유발되며 5~10분후에는 세포내 lactate의 증가 및 glucose의 소멸이 오게 된다. 이때까지는 가역성 병변이나, 이후에도 허혈이 계속되면 사립체의 손상이 와서 비가역성 병변으로 진행된다고 알려져 있다²⁹⁾. 사립체의 병변은 초기에는 사립체가 팽윤되고 능(cristae)들이 해체(disorganization)되다가^{1) 13)} 더욱 진행되면 사립체 자체가 분절되어 비가역성 병변으로 진행된다¹²⁾. 이러한 비가역성 손상시 가장 민감하게 반응하는 생화학적 지표가 dehydrogenase로서 dehydrogenase들이 소실되면 TTC에 염색되지 않으므로 뇌경색 부위를 나타내게 된다. 이 방법은 뇌허혈 병변후 병리조직학적 방법보다 일찍 뇌경색 부위를 나타낼 수 있으나 병리 조직학적으로 병변이 일어난 후에도 사립체의 비가역성 병변이 오랫동안 일어나지 않을 수도 있어 뇌허혈 병변후 초기에 TTC 방법만으로 뇌경색 부위를 측정하는 데는 오류가 있을 수 있다^{7) 20)}. 실제로 Ginsberg등¹⁶⁾은 사립체들의 뇌허혈에 견디는 능력을 실험한 바 뇌허혈 병변후 60분까지 비가역성 병변없이 견딜 수 있고 90~120분 후에도 46~58%의 사립체만 비가역성 병변을 보인다는 실험 결과를 발표한 바가 있다.

본 실험에서 TTC 염색후 뇌경색 부위가 24시간군 및 48시간군에서 6시간군과 비교하여 유의성있게 확장되었다. 또한 TTC 염색과 H & E 염색후 측정된 측정치간의 비교에서도 24시간군 및 48시간군과 비교하여 TTC 염색으로 측정된 뇌경색 부위의 크기가 6시간군에서 상대적으로 큰 차이를 보이며 작았다. 이는 아마도 뇌허혈 유발 후 6시간이 경과하여도 모든 사립체가 비가역성 변성을 보이지 않는다는 것을 의미한다고 생각된다. 또한 이와 같은 초기에는 TTC 염색방법과 함께

병리조직학적인 측정방법도 병행하여야 더욱 정확성을 기할수 있다는 것을 의미한다 하겠다. 아울러 TTC 염색으로 측정된 뇌경색 부위의 크기와 H & E 염색후 병리조직학적으로 측정된 뇌경색 부위의 크기와 상관 관계에서도 모든 군들에서 상관 관계가 관찰되나 이중 6시간군에서 그 상관 관계가 가장 낮으므로 이 또한 상기한 견해를 뒷받침 하는 것으로 본다.

본 연구에서 뇌경색의 크기가 24시간군 및 48시간군에서 6시간군과 비교하여 큰 차이를 보이며 확장되었으나 24시간군과 48시간군간에는 차이가 없었다는 결과는 박등³⁾이 발표한 연구결과와 차이가 있다. 박등³⁾은 뇌경색 부위의 크기를 전체 면적에 대한 뇌경색 부위의 percent로 계산하지 않고, 뇌경색 부위의 넓이로 계산하므로써 비록 미세하나마 실험동물간의 뇌의 크기에 따른 뇌경색 면적에 차이가 있을 수 있다²⁶⁾. 또한 그들의 논문에서 지적한 대로 6시간군에서 완전한 뇌경색 부위인 백색 부위만 측정된 측정치와 완전한 뇌경색 부위와 부분적 뇌경색 부위인 분홍색으로 착색된 부위를 합한 수치간에는 상당한 차이가 있어 TTC 염색만으로 측정된 6시간군의 측정치에 오차가 많아서 그러하지 않은가 추측된다. 본 실험에서는 6시간군에서 TTC 염색과 병리조직학적으로 측정된 측정치간에는 큰 차이가 없어서, TTC 염색으로 측정된 측정치에 큰 오차가 없지 않나 생각된다.

또한 Bederson등⁷⁾의 연구 결과와 비교하여 볼 때 뇌허혈 유발후 시간 경과에 따른 뇌경색 부위의 크기 변동, TTC 염색과 H & E 염색후 측정된 뇌경색 크기의 상관 관계에 대한 결과에서는 큰 차이가 없었으나, 뇌경색 부위의 크기가 본 실험 결과보다 상대적으로 모든 군들에서 광범위하였다. 이는 아마도 Benderson등⁷⁾의 실험에서는 중대뇌동맥을 양극 전기로 감작후 절단하므로써 이 과정에서 대뇌손상이 가해져서, 또한 그들의 실험에서는 사망시킨후 뇌를 적출하므로써 사망후 조직채취시까지의 기간에 뇌경색이 진행되어 그 범위가 커진 것으로 추측한다.

따라서 본 실험의 결과를 토대로 한다면 백서를 실험 동물로 하여 뇌경색에 대한 연구를 시행시 뇌경색의 크기를 기준하여 실험 결과를 판정하는

실험을 시행한다면 실험기간은 뇌허혈 유발 후 24시간 까지만 하여도 무방할 것으로 사료된다.

중대뇌동맥 폐쇄 후 뇌경색이 가장 현저하게 발생하는 부위는 미상핵을 중심으로 기저핵 부위와 전두엽 및 감각 운동 영역에 현저하다고 알려져 있다³⁾⁷⁾¹¹⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²²⁾²⁵⁾²⁸⁾. 본 실험 결과도 기저핵 부위, 전두엽 후반부 및 감각 운동 영역인 대뇌의 중간부 즉 절편 2, 3, 4, 5에서 가장 현저하여 상기한 저자들의 결과와 차이가 없다.

뇌허혈 유발후 광학 현미경적 소견은 많은 저자들에 의하여 기술되어 있다⁷⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁸⁾²²⁾. 뇌허혈과 동시에 원형질성 성상세포들의 수와 크기가 증가하고 사립체의 수도 증가하며 이후 신경섬유망(neuropil)에 공포형성이 일어나고¹⁵⁾ 각 신경세포는 축소되고 세포질은 불규칙적으로 검푸르게 착색된다. 뇌허혈 유발후 12시간 후에는 3개의 부분으로 구별되는데 중심구역(central zone)은 세포들이 ghost 형태를 보이고 공포들이 신경세포 주위와 신경섬유망등에 보이게 되고 활성화 구역(reactive zone)은 공포화된 신경섬유망, 다형핵성 염색세포들의 침윤, 축색의 부종, 대식세포와 함께 모세혈관들의 증식이 보이고 변연 구역(marginal zone)은 창백하고 팽창된 신경교세포들과 함께 공포들이 보이고 창백한 성상세포 핵들이 관찰된다고 한다¹⁴⁾.

본 실험에서는 뇌허혈 후 6시간군에서 신경교세포의 변성이 관찰되기 시작하였고 일부 신경교세포에서 괴사를 보였으며 조직의 모세혈관에 응혈이 관찰되었다. 24시간군에서는 세포내 핵이 희미해져 괴사와 변성이 인정되었고 48시간군에서는 신경세포는 소실되어 공포로 보였고 신경세포의 변성과 괴사가 뚜렷하였다.

요 약

본교실에서는 33마리의 백서를 실험동물로 하여 측두하 접근으로 중대뇌동맥을 폐쇄하여 뇌경색을 유발하고, 뇌경색의 범위측정을 뇌허혈 유발후 6시간, 24시간 및 48시간에 TTC 염색과 병리조직학적인 H & E 염색으로 하였다.

뇌허혈 유발후 뇌경색 범위는 6시간군에 비하여 24시간 및 48시간군에서 보다 현저히 증가하였으

나 24시간 군 및 48시간 군간에는 별 차이가 없었다. 따라서 본 실험을 통해서 백서를 실험동물로 하여 뇌경색에 대한 실험을 시행시 뇌경색의 크기를 기준하여 실험 결과를 판정할 경우 뇌허혈 유발후 24시간까지만 실험 기간으로 하여도 무방할 것이라는 점을 알았다. TTC 염색과 H & E 염색의 상관 관계에서는 모든 실험 기간에서 높은 상관 관계를 보이나 6시간군에서는 상대적으로 낮으므로, 뇌허혈 유발후 초기, 즉 24시간 이내에는 병리조직학적 방법을 병행하여 시행하는 것이 더욱 정확성을 기할 것으로 생각되었다.

References

- 1) 박관선·김정학·신규만 : 실험적 급성 허혈성 뇌부종이 뇌 사립체에 미치는 영향과 이에 대한 nimodipine의 효과. 대한신경외과학회지 17 : 497-508, 1988
- 2) 박세혁·이규호·이규창 : 실험적 뇌경색 후 신경학적 및 병리학적 소견에 대한 nimodipine의 효과. 대한신경외과학회지 19 : 5-13, 1990
- 3) 박춘근·정철구·김달수 등 : 실험적 중대뇌동맥 폐쇄에 의한 지연성 허혈성 뇌경색. 제1부 : 뇌경색의 시간 경과에 따른 변화. 대한신경외과학회지 18 : 505-514, 1989
- 4) 이선호·김영규·정희원 등 : 급성 뇌경색 발생 시 뇌기능 해리 현상에 관한 실험적 연구. 대한신경외과학회지 19 : 445-454, 1990
- 5) 정홍섭·박윤관·이훈갑 등 : 실험적 뇌경색에 미치는 insulin, 2-deoxyglucose 및 dichloroacetate의 효과에 대한 연구. 대한신경외과학회지 20 : 336-344, 1991
- 6) Arsenio-Nunes ML, Hossmann KA, Farkas-Bargeton E : Ultrastructural and histochemical investigation of the cerebral cortex of cat during and after complete ischaemia. Acta Neuropathol(Berl) 26 : 329-344, 1973
- 7) Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, et al : Evaluation of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. Stroke 17 : 1304-1308, 1986
- 8) Boor PJ, Reynolds ES : A simple planimetric method for determination of left ventricular mass and necrotic myocardial mass in postmortem hearts. Am

J Clin Pathol 68 : 387-392, 1977

- 9) Brierley JB, Meldrum BS, Brown AW : *The threshold and neuropathology of cerebral "anoxic-ischaemic" cell change.* *Arch Neurol* 29 : 367-374, 1973
- 10) Dodson RF, Chu LWF, Welch KMA, et al : *Acute tissue response to cerebral ischemia in the gerbil. An ultrastructural study.* *J Neurol Sci* 33 : 161-170, 1977
- 11) Edhardt G, Mies G, Auer LM, et al : *Neuronal injury following permanent middle cerebral artery occlusion in cats.* *Acta Neuropathol(Berl)* 60 : 70-74, 1983
- 12) Fernando DA, Lau JKH : *An electron microscope study of the effects of acute ischaemia in the brain.* *Acta Anat* 100 : 241-249, 1978
- 13) Flynn CJ, Farooqui AA, Horrocks LA : *Ischemia and hypoxia : Basic Neurochemistry.* Edited by Siegel G, Agranoff BW, Molinoff PB. New York, Raven Press, pp783-795, 1989
- 14) Garcia JH, Kamijyo Y : *Cerebral infarction. Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates.* *J Neuropathol Exp Neurol* 33 : 408-421, 1974
- 15) Garcia JH : *Ischemic injuries of the brain. Morphologic evolution.* *Arch Pathol Lab Med* 107 : 157-161, 1983
- 16) Ginsberg MD, Mela L, Wrobel-Kuhl K, et al : *Mitochondrial metabolism following bilateral cerebral ischemia in the gerbil.* *Ann Neurol* 1 : 519-527, 1977
- 17) Ito U, Spatz M, Walker JT, et al : *Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations.* *Acta Neuropathol(Berl)* 32 : 209-223, 1975
- 18) Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, et al : *Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys.* *J Neurosurg* 54 : 773-782, 1981
- 19) Kahn K : *The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil.* *Neurology* 22 : 510-515, 1972
- 20) Liszczak TM, Hedley-Whyte ET, Adams JF, et al : *Limitations of tetrazolium salts in delineating infarcted brain.* *Acta Neuropathol(Berl)* 65 : 150-157, 1984
- 21) McGee-Russel SM, Brown AW, Brierley JB : *A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischaemic cell change in rat brain.* *Brain Res* 20 : 193-200, 1970
- 22) Petito CK : *Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experimental cerebral infarction.* *J Neuropathol Exp Neurol* 38 : 222-234, 1979
- 23) Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE : *Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia.* *Ann Neurol* 11 : 499-509, 1982
- 24) Shigeno T, Teasdale GM, McCulloch J, et al : *Recirculation model following MCA occlusion in rats. Cerebral blood flow, cerebrovascular permeability, and brain edema.* *J Neurosurg* 63 : 272-277, 1985
- 25) Shigeno T, McCulloch J, Graham DI, et al : *Pure cortical ischemia versus striatal ischemia. Circulatory, metabolic, and neuropathologic consequences.* *Surg Neurol* 24 : 47-51, 1985
- 26) Sundt TM, Waltz AG : *Experimental cerebral infarction : Retroorbital, extradural approach for occluding the middle cerebral artery.* *Mayo Clin Proc* 41 : 159-168, 1966
- 27) Sundt TM, Grant WC, Garcia JH : *Restoration of middle cerebral artery flow in experimental infarction.* *J Neurosurg* 31 : 311-322, 1969
- 28) Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al : *Focal cerebral ischaemia in the rat : 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion.* *J Cerebr Blood Flow Metabol* 1 : 53-60, 1981
- 29) Toole JF, Burrow DD : *Pathophysiology and clinical evaluation of ischemic vascular disease. Neurological surgery. vol. 3.* Edited by Youmans JR, Philadelphia, W.B.Saunders. pp1463-1515, 1990
- 30) Tyson GW, Teasdale GM, Graham DI, et al : *Cerebrovascular permeability following MCA occlusion in the rat. The effect of halothane induced hypotension.* *J Neurosurg* 57 : 186-196, 1982
- 31) Webster HF, Ames A : *Reversible and irreversible changes in the fine structure of nervous tissue during oxygen and glucose deprivation.* *J Cell Biol* 26 : 885-909, 1965