

흰쥐뇌의 허혈-저산소성병변에서 신경흥분성 아미노산 수용체의 변동과 뇌세포병변과의 상관성에 관한 연구

이화여자대학교 의과대학 병리학교실

구 혜 수

The Effects of Excitatory Amino Acids and Their Receptors on Neuronal Damage of Rat Brain in Hypoxic-ischemic Encephalopathy

Heasoo Koo, M.D.

Department of Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University

Since the role of excitatory amino acids such as glutamate and aspartate and their receptors mediating cellular injury through various mechanisms were known in hypoxic-ischemic injury and associated diseases of central nervous system, blocking agents for transmitter release or receptors have been tried to reduce the cellular damages and subsequent sequelae experimentally. Several in vitro studies suggested two kinds of glutamate neurotoxicity: ① rapid toxicity due to influx of sodium or chloride with resultant cellular edema and consequent damage, which is associated with N-methyl-D-Aspartate(NMDA) as well as non-NMDA receptors, ② calcium mediated delayed toxicity associated mainly with NMDA receptor.

This study was conducted to investigate the role of rapid toxicity in hypoxic-ischemic injury. Early lesions of 30 minutes to 24 hours after hypoxic-ischemic insult were examined by autoradiography with radiolabelled glutamate and kainic acid(KA) as well as light and electron microscopy. Late changes were evaluated on formaldehyde-acetic acid-methanol(FAM) fixed brain 1 week after the insult.

Cornus ammonis(CA)1 of hippocampus showed the highest density of NMDA receptors, which was decreased constantly from 2 hours to 24 hours. In contrast, CA3 of hippocampus showed the highest density of KA receptors, which was the lowest at 6 hour and increased thereafter. Light microscopic examination showed the worst changes during 30 minutes to 6 hours. After 1 week, most of the cases showed degeneration of neurons and CA1 and CA3 did not show the difference. Electron microscopic examination showed marked degenerative changes of neurons as well as neuropils starting from 30 minutes after the insult.

In conclusion, rapid toxicity mediated by non-NMDA(KA) receptor seen in CA3 lead to permanent damage in 1 week old lesion. (*Korean J Pathol* 1995; 29: 545~562)

Key Words: Hypoxic-ischemic injury, Excitatory amino acid receptor

접 수: 1994년 5월 29일, 게재승인: 1995년 7월 5일

주 소: 서울시 양천구 목동 911-1번지, 우편번호 158-056

이화여자대학교 의과대학 병리학교실, 구혜수

1. 본 논문의 일부는 1993학년도 이화여자대학교 교수 연구기금 연구비에 의하여 이루어졌음.
2. 본 연구에 사용된 Amersham image analysis system densitometry는 서울대학교 의과대학 중앙실험기기를 사용하였음.

서 론

Glutamate(Glu)등의 신경 흥분성 아미노산(excitatory amino acid, EAA)들이 허혈-저산소성 신경세포의 손상에 관여하는 것은 Glu 수용체의 하나인 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체에 의한 현상으로 알려져 있는 spreading depression에서 보이는 것과 비슷한 전기생리적인 변화를 저산소증의 경우에 보이는 것이 관찰됨으로써 제시되었다¹⁻³. 또한 배양된 해마 신경세포를 저산소에 노출시키는 경우에 전달체의 분비를 억제하고 NMDA 수용체를 선택적으로 억제하는 Mg^{++} 의 세포외액(extracellular space)의 농도를 높이거나 수용체에 대한 길항제를 투여하면 신경세포의 손상이 감소되는 것을 관찰하면서 저산소성 병변에서 신경연접과 전달체의 역할을 확인하였다⁴⁻⁸. 생체내에서는 미세투석법(microdialysis)에 의해 저산소성 병변에서 세포외액의 Glu의 농도가 증가되는 것이 보고되었고^{9,10}, 또한 해마로 가는 Glu를 통한 신경흥분전달을 파괴시키면 저산소에 의한 신경세포의 손상이 감소되는 것을 관찰 함으로써 저산소증을 포함한 허혈, 저혈당, 간질 등의 경우에 Glu 등의 EAA가 뇌세포의 병변을 일으키는데 중요한 역할을 하는 것이 확실하게 되었다^{11,12}. 허혈-저산소성 병변에서 세포외액의 Glu의 양이 증가되는 기전은 확실하지는 않지만 손상을 받은 신경세포에서 많이 분비되는 동시에 재흡수에 관여하는 교세포나 신경세포가 손상을 받으므로 재흡수가 저하되기 때문으로 생각되고 있다^{9,13,14}.

Glu의 독성은 크게 Na^+ , Cl^- 와 H_2O 가 관여하는 급성 신경세포손상(rapid excitotoxic death)와 Ca^{++} 이 관여하는 지연성 신경세포손상(delayed neuronal death)의 두 가지로 분류된다¹⁵⁻¹⁸. 전자는 Glu등이 세포외에 증가되면 탈분극(depolarization)후에 Cl^- 와 동시에 Na^+ 과 H_2O 를 수상돌기내로 이동시켜서 세포의 부종을 일으키고 결국은 손상을 초래하는 것으로 대개 수시간이내에 그 변화가 나타난다. 그에 반해 후자는 Glu등에 의해 Ca^{++} 이 세포내로 들어가고 동시에 세포내의 미세구조에 유리되어 있던 Ca^{++} 이 세포외로 분비되어 증가된 Ca^{++} 에 따른 이차적인 여러 기전에 의한 세포의 변성을 말하며 대부분 2~3일 후에 그 병변이 나타난다.

Glu와 Asp 등의 EAA의 수용체는 현재 6개 이상이 알려져 있는데 그중 대표적인 것은 NMDA, kainate(KA), quisqualate(QA or AMPA)등이고 Glu나 Asp는 위 3개의 수용체에 모두 결합하는 혼합 효현제

(mixed agonist)로 작용한다^{19,20}. 수용체는 성장과정중이나 성숙된 뇌에서 특징적인 분포를 보이고 생화학적으로 전기생리학적으로 약리학적으로 서로 구분된다²¹⁻²³.

EAA에 의한 신경세포의 손상과 수용체간의 상관관계는 Glu 효현제를 뇌내로 주사할 경우 신경세포의 괴사나 병변이 생기는 정도가 부위에 따라 다르고 병변의 분포가 수용체의 분포와 밀접한 관계가 있는 것이 관찰됨으로써 강력히 시사되었다. 또한 EAA에 의한 신경세포 손상시 전자현미경상에서 흥분성 아미노산 수용체가 존재하는 신경세포의 수상돌기(dendrites)에 부종이 주로 나타나는 것도 신경세포의 변성에 EAA 수용체의 탈분극과 그에 따른 변화가 일어나는 것을 의미한다. 그리고 실험동물의 연령에 따라 병변의 분포나 정도가 다른 것으로 보아 성장에 따른 수용체의 분포의 변화에 따라 신경세포 병변의 차이가 있는 것으로 생각되고 있다^{24,25}.

이와 같이 신경세포의 변성에서 수용체의 역할이 알려짐에 따라 수용체에 대한 길항제(antagonist)를 사용하여 병변을 감소시키려는 노력이 활발히 진행되었는데 NMDA수용체에 대한 길항제를 사용하는 경우 지연성 신경세포손상은 방지하는 반면 급성 신경세포손상인 신경세포의 부종은 완전히 방지하지 못하는 것으로 보아 EAA에 의한 급성 신경세포손상에는 NMDA와 non-NMDA(KA와 QA) 수용체가 같이 관여하는 반면 지연성 신경세포손상에는 NMDA 수용체만 작용하는 것으로 생각되고 있다²⁶⁻²⁸.

허혈-저산소성 병변에서도 NMDA 수용체와 그와 연관된 지연성 신경세포손상에 대해서는 많은 연구가 되었고 근래에는 NMDA 수용체에 대한 길항제를 사용하여 병변을 감소시키려는 시도도 활발히 진행되고 있다. 반면에 NMDA와 non-NMDA 수용체가 같이 관여하는 급성 신경세포부종 또는 손상이 허혈-저산소성 병변에서 얼마나 기여하는지에 대해서는 충분한 연구가 시행되지 않았다.

따라서 본 실험에서는 흰쥐뇌에 허혈-저산소성 병변을 일으킨 다음 2시간에서 24시간까지의 초기에 NMDA 수용체와 non-NMDA 수용체의 하나인 KA 수용체의 변화를 자가방사법에 의해 관찰함과 동시에 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하였고 1주일 후에 고정된 조직에서 나타나는 광학현미경상의 변화와 비교하여 초기의 급성 신경세포부종 또는 손상이 궁극적으로 나타나는 허혈-저산소성 병변에 기여하는 바를 보기 위하여, 그리고 동시에 병변의 초기에 일어나는 시간에 따른 형태의 변화를 규명하기 위하여 계획되었다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 250~350 gm 의 자성 성숙흰쥐(Sprague-Dawley계)를 사용하였다. 실험기간동안 조단백질 15%와 지방 3%가 포함된 표준 시판사료(삼양사료)를 공급하였으며 실험전 18시간 동안은 물을 제외하고는 금식시켰다.

2. 실험방법

1) 실험군 분류: 실험백서는 다음의 4군으로 분류하여 실험을 시행하였다.

제 I 군: Sham operation 한 대조군

제 II 군: 왼쪽 경동맥을 묶은 허혈군

제 III 군: 8%산소 - 92%질소에 3 시간 노출시킨 저산소군

제 IV 군: 왼쪽 경동맥 결찰후 8%산소 - 92%질소에 노출시킨 허혈-저산소군

2) 허혈-저산소성 병변의 유발 방법: 실험백서는 ether 마취하에 왼쪽 경동맥을 노출시켜 신경, 정맥 등의 주변조직과 조심스럽게 분리한 다음 봉합사로 결찰하였다. 소요된 시간은 모든 예에서 15분 이내였다. 1시간의 회복기후에 37℃의 water bath에 넣은 플라스틱 용기에 넣고 8%산소 - 92%질소 가스(대한의산, 혼합가스)에 3시간 노출시켰다. 실험후 30분, 1시간, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간 후에 동물을 희생시켜 초기의 변화를 보았고 후기의 변화는 병변을 일으킨후 1주일후에 변화를 관찰하였다.

3) 자가방사 검사: 자가방사 검사는 제 I군에서 12마리, 제 II군에서 13마리, 제 III군에서 12마리, 제 IV군에서 82마리를 사용하였다(총 119마리).

실험동물을 각 시간에 단두하여 뇌를 적출하여 액화질소에 순간냉동시켰다. 냉동된 뇌는 -20℃의 cryocut을 이용하여 10 μm 두께의 수평 또는 수직 냉동절편하여 젤라틴을 입힌 슬라이드에 붙여서 건조시킨후 -20℃에서 24시간 보관하여 사용하였다. NMDA와 KA 수용체를 측정하기 위하여 각각 3개의 절편(total 2장, nonspecific 1장)을 사용하고 그다음 절편은 광학 현미경상의 변화를 보기 위하여 formalin에 고정된 다음 Hematoxylin-Eosin(H-E)과 Bodian 염색을 시행하였다.

Monaghan 등의 방법을 참고하여 정량적 자가방사법을 시행하였다. 조직표본을 냉동실에서 꺼내서 건조시킨 다음 0℃의 50 mM Tris-acetate-buffer(pH 7.2)(NMDA)와 50 mM Tris-citrate-buffer(pH 7.0)(KA)에

30분-1시간 담근후 내인성 리간드(ligand)와 여러 이온을 제거하기 위해 30℃의 동일한 완충액에 다시 전보온(preincubation)시켰다. 그후 NMDA 수용체를 보기 위해서 non-NMDA 수용체에 결합하는 것을 막기 위하여 5 μM QA를 넣은 동일 완충액에 100 nM L-[³H]-glutamate(57.4 Ci/mmol)를 넣은 용액으로 0~4℃에서 10분간 보온하였으며 KA수용체를 보기 위하여는 50 nM [³H]-kainate(58.0 Ci/mmol)를 사용하였다. 모든 방사배위 리간드(radiolabelled ligand)는 Dupont(Wilmington, DE, U.S.A.)에서 구입하였다. 비특이성 반응을 보기위하여 조직절편을 hot 리간드를 포함한 위의 용액에 100 μM NMDA와 100 μM KA를 각각 첨가한 것을 사용하였으며 이 농도는 90% 이상의 NMDA와 KA 수용체와 결합하기에 충분한 것이었다.

보온후에 결합하지 않은 방사성 물질을 제거하기 위하여 0-4℃에서 동일 완충액으로 4번 행구었고 총 소요시간은 30초 정도였다. 방사선 물질과 결합된 조직표본은 저온의 바람(hair dryer)에 의해 급속으로 건조시켰으며 하루밤을 더 건조시켰다. 건조된 슬라이드를 X-ray cassette안에서 tritium-sensitive 필름(Amersham Inc., Arlington Heights, IL, U.S.A.)과 [³H] methacrylate density reference standards(Microscales, Amersham Inc., Arlington Heights, IL, U.S.A.)와 함께 4℃에서 10~14일간 노출시켰다. 노출후 Kodack D-19으로 인화한 필름을 농도계기(Amersham image analysis system densitometry)를 이용하여 분석하였다. 본 실험에서는 측정하고자 하는 부위에 무작위로 10개 이상의 점을 찍어 밀도를 측정하였으며 평균값을 계산하였다. 각 부위의 밀도는 labeled calibration standard를 이용하여 fmol/mg protein으로 계산되었다. 해부학적 부위의 결정은 H-E염색슬라이드를 이용하였으며 흰쥐뇌부도²⁹를 참고로 하였다.

4) 전자현미경 검사: 자가방사 검사에서와 같이 제 I, II, III군으로 각 2예를 검사하였고 제 IV군에서는 병변을 일으킨후 각각 30분, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간으로 2마리씩 나눴다(총 16마리). 3% paraformaldehyde-3% glutaraldehyde를 좌심방을 통해 관류고정한 다음 뇌를 적출하여 해마와 대뇌 피질에서 표본을 취하여 0.1% OsO₄에 후고정한 후 일반적인 전자현미경 표본제작과정에 따라 epon에 포매하였다. 얇은 절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 염색한 후 Hitachi-500 전자현미경으로 관찰하였다.

5) 광학현미경 검사: 자가방사 검사군과 전자 현미경 검사를 한 동물에서 각각의 뇌에서 한 절편을 취하여 일반적인 조직절편 제작과정을 통하여 H-E 염

색을 하여 초기의 변화를 보았다. 전자현미경 검사를 위하여 cpon에 포매된 조직도 0.25 μ m 두께로 만들어진 조직전편을 toluidine blue 염색을 통해서 광학현미경 소견을 관찰하였다.

후기의 변화를 보기 위하여 33마리의 백서를 제 IV군과 같은 방법으로 병변을 일으킨 후 1주일이 지난 다음 formaldehyde, glacial acetic acid, absolute methanol(FAM) 1:1:8 용액으로 관류고정하여 뇌를 적출한 다음 대표적인 부위에서 여러개의 전편을 만들어 H-E과 Bodian염색을 통하여 뇌세포 병변을 관찰하였다.

대뇌반구와 해마의 각 부위에서 신경세포의 허혈-저산소성 병변의 특징적인 소견으로 알려져 있는 호산성 변성을 관찰하였으며 미상핵-조가비핵(caudate-putamen)과 시상(thalamus)에서는 농축된 진한 호염기성 세포질을 갖는 세포를 관찰하였다. 신경세포 변성 정도의 판정은 Smith등³⁰이 사용한 5-point scale을 변형하여 사용하였는데 변성된 신경세포가 가끔 보이는 경우 grade 1, 10%이하인 경우 grade 2, 10~50%인 경우 grade 3, 50%이상인 경우 grade 4로 분류하여 비교하였다.

6) 통계처리: 자가방사 검사의 결과는 대뇌반구의

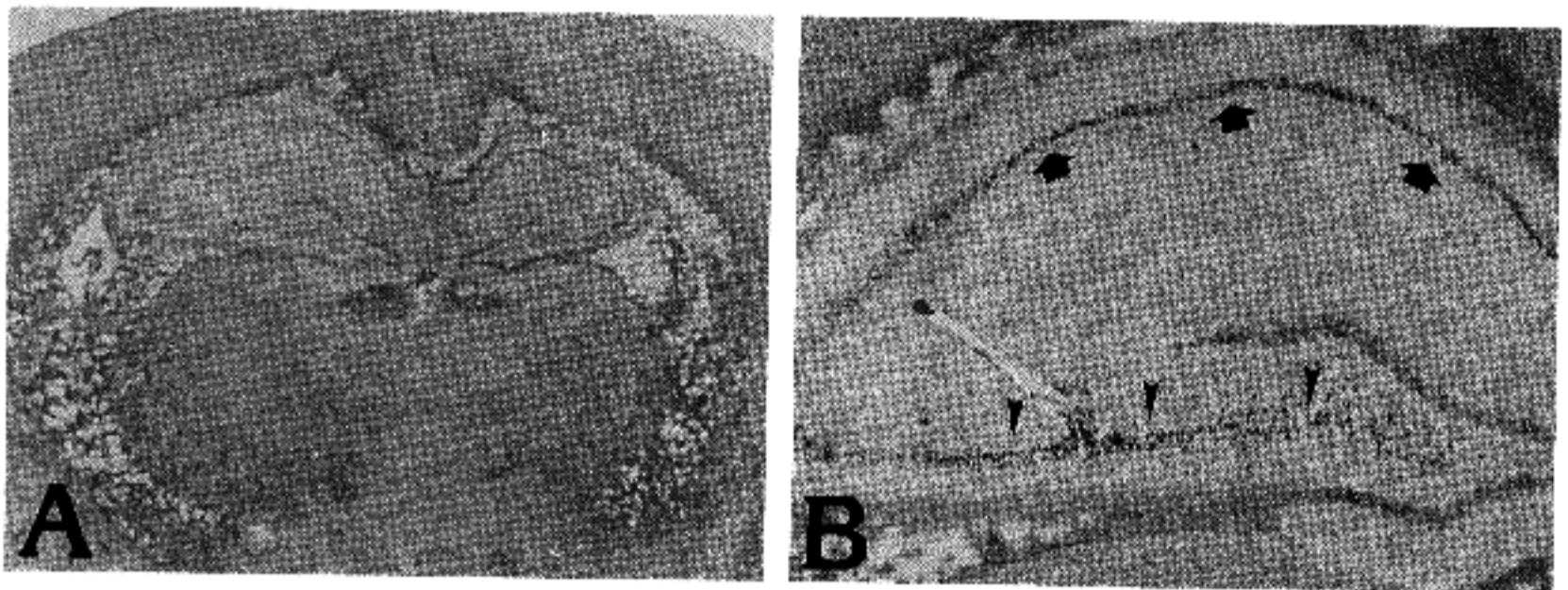


Fig. 1. Light microscopic findings of frozen sectioned rat brains 2 hours after hypoxic-ischemic exposure. Eosinophilic neurons were noted in left hippocampus, frontoparietal cortex, and thalamus in the territory of middle cerebral artery(A). Hippocampus(B) showed many eosinophilic neurons mostly in CA1(arrows) and CA3-4(arrowheads).

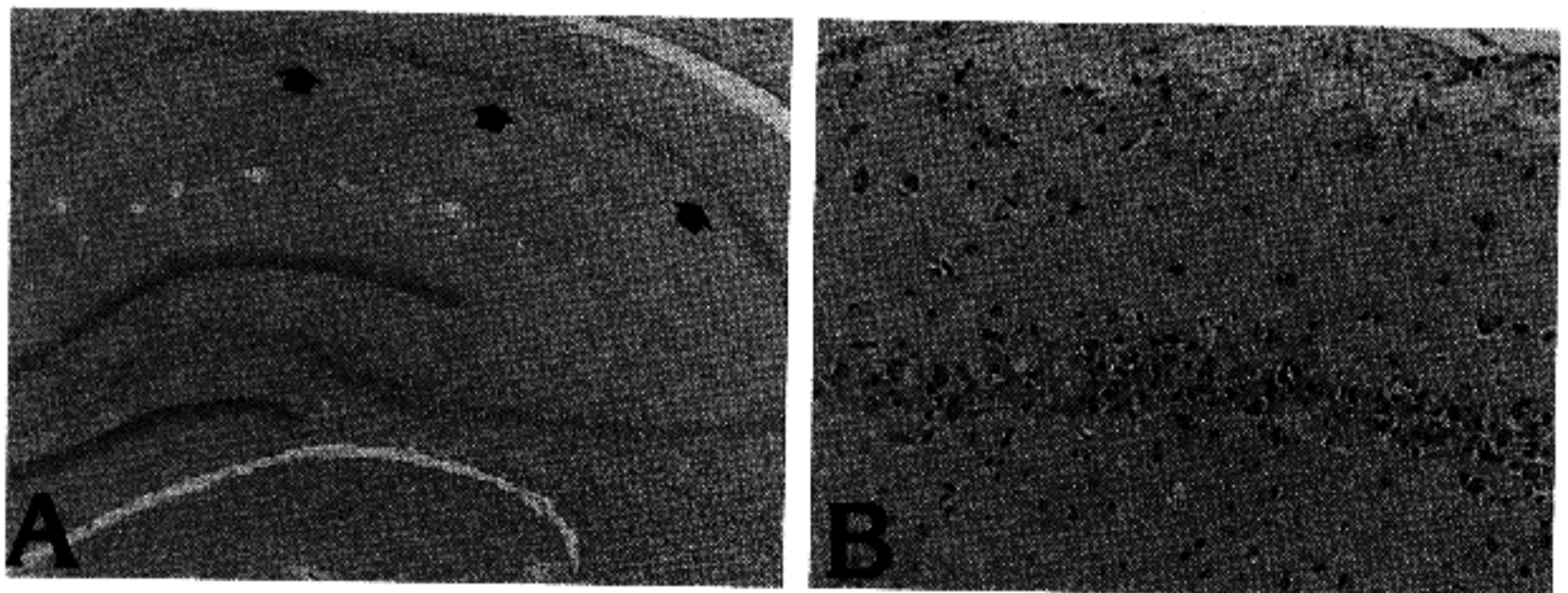


Fig. 2. Light microscopic findings of formaldehyde-acetic acid-methanol(FAM) fixed rat brains 1 week after hypoxic-ischemic exposure. Eosinophilic neurons were mostly noted in left CA1(arrows) and showed pyknotic nuclei and eosinophilic cytoplasm.

우측과 좌측을 비교하여 다음의 수식을 이용하였다.

$$\Delta \% = \left[\frac{\text{left hemisphere value (fmol/mg protein)}}{\text{right hemisphere value (fmol/mg protein)}} - 1 \right] \times 100$$

통계는 SPSS/PC+ Package를 이용하여 처리하였고

수량측정치는 평균과 표준편차를 나타냈다. 각 군사이의 유의성의 검증은 경우에 따라 t-test 및 analysis of variance(ANOVA)를 이용하였으며 p 값이 0.05 미만일때 유의하다고 판정하였다.

위의 방법과 비교하기 위하여 좌우측의 차이를 계산하여(NMDAD, KAD) 통계처리를 같은 방법으로 하여 그 결과를 비교하였다.

Table 1. Neuronal damages at 1, 2, 6, 12, 24 hours and 1 week after hypoxic-ischemic exposure (1 to 24 hours: FS, 1 week: FAM-fixed tissue)

Site	Neuronal damage	1 hr (n=10) No(%) ¹	2 hr (n=9) No(%)	6 hr (n=5) No(%)	12 hr (n=7) No(%)	24 hr (n=12) No(%)	1 wk (n=16) No(%)
Outer cortex	Grade ² 3~4	4(40)	5(55.6)	2(40)	1(14.3)	3(25)	12(75)
	1~2	1(10)	1(11.1)		1(14.3)		4(25)
Inner cortex	Grade 3~4	4(40)	4(44.4)	2(40)	1(14.3)	3(25)	13(81.3)
	1~2	1(10)	2(22.2)		1(14.3)		3(18.7)
CA1	Grade 3~4	5(50)	3(33.3)	2(40)	1(14.3)	2(16.7)	7(43.8)
	1~2		1(11.1)		1(14.3)		5(31.3)
CA3	Grade 3~4	5(50)	4(44.4)	2(40)	1(14.3)	1(8.3)	12(75)
	1~2				1(14.3)	1(8.3)	
CA4	Grade 3~4	5(50)	4(44.4)	2(40)	1(14.3)	1(8.3)	9(56.3)
	1~2				1(14.3)	1(8.3)	3(18.7)
Dentate gyrus	Grade 3~4	4(40)	3(33.3)	1(20)	1(14.3)	2(16.7)	7(43.8)
	1~2	1(10)	1(11.1)	1(20)	1(14.3)		4(25)
CP	Grade 3~4	4(40)	5(55.6)	2(40)	2(28.6)	1(8.3)	12(75)
	1~2	1(10)	1(11.1)				1(6.2)
Thalamus	Grade 3~4	5(50)	5(55.6)	2(40)	2(28.6)	1(8.3)	11(68.8)
	1~2						3(18.7)

CA: cornus ammonis FS: frozen section
n: number

CP: caudate-putamen FAM: formaldehyde-acetic acid-methanol

1. Values are number of animals showing changes(%) 2. Grade 1: occasional neurons are degenerated
 2: less than 10% of neurons are degenerated
 3: 10~50% of neurons are degenerated
 4: more than 50% of neurons are degenerated

실험 결과

1. 실험동물의 생존률

실험동물은 총 168마리를 사용하였으며 이중 46마리가 실험중 사망하였고(27.4%) 모두 허혈-저산소군이었다. 자가방사 검사와 전자현미경 검사를 위해 허혈-저산소 병변을 일으킨 92예중 29예가 사망하여 사망률은 31.5%였는데 모든 예가 가스에 노출시키는 도중이나 직후에 사망하였다. 일주일후의 변화를 보기 위하여 허혈-저산소 병변을 일으킨 33예중 17예가 사망하여 사망률은 51.5%였다.

2. 광학현미경 관찰조건

액화질소에 순간냉동하여 얻은 조직은 관류고정한 조직(EM군, FAM군)에 비하여 세포의 변성이 심하여 자세한 소견을 관찰할 수 없었다. 신경세포의 변성은 제 I, II, III군에서 좌측과 우측에 모두 나타나지 않는데 반해 제 IV군에서는 좌측에 주로 중대뇌동맥의 영역에서 변성된 신경세포가 관찰되었다(Fig. 1). 냉동조직의 뇌세포 변성의 판정은 확실한 호산성 세포질을 갖는 세포만을 변성된 세포로 인정하였다(Fig. 1A & B). FAM으로 고정된 조직에서는 세포가 매우 잘 보존되어 있었고 변성된 세포의 판정도 비교적 쉬웠다(Fig. 2). 미상핵-조가비핵과 시상에서 관찰되는 농축된 진한 호염기성 세포질을 갖는 세포는 FAM 군에서만 관찰이 가능하였다. 뇌의 각 부위에서 관찰된 신경세포의 변성을 요약하면(Table 1) 각 시간에 부위에 따른 차이는 관찰되지 않았지만 1시간에서 6시간에는 40~66.7%에서 변성을 보여서 12시간에서 24시간의 8.3~28.6% 보다 심했으며 1주일 후에는 68.8~100%에서 변성을 보였다.

Epon에 포매된 조직의 광학 현미경 검사에서는 30분에서 6시간과 12시간에서 24시간 사이에 별다른 차이가 없었지만 동물의 수가 너무 적었으므로 의미를 부여할 수가 없었다(Table 2). 30분군에서 심한 변화를 보인 대뇌피질에서는 신경망(neuropil)의 부종과 함께 신경세포의 세포질은 염색성이 높아지고 소공포가 많은 특징적인 허혈성 세포변성(ischemic cell change, ICC)를 보였다(Fig. 3A). 2시간에서 12시간 사이에는 해마와 대뇌피질에 모두 ICC의 초기변화로 알려진 응집된 세포질을 갖고 있는 신경세포들이 간혹 흩어져 있었으며 24시간군에서 훨씬 많은 수의 변성된 세포를 보였다(Fig. 3B). 치상회(dentate gyrus)의 내사면(inner blade)은 외사면(outer blade)보다 거의 항상 심한 변화를 보였다.

3. 전자현미경 관찰 소견

제 I, II, III 군에서는 변화가 없었고(Fig. 4) 제 IV 군에서는 30분 후부터 심한 신경세포와 축삭의 변성이 해마와 대뇌 피질에서 관찰되었고 시냅스전 말단(presynaptic terminal)은 시냅스후 수상돌기(postsynaptic dendrites)보다 비교적 잘 유지되어 있었다(Fig. 5).

Table 2. Neuronal damages at 30 minutes to 6 hours and 12 to 24 hours after hypoxic-ischemic exposure (Epon embedded semithin section)

Site	Neuronal damage	30 min to 6 hr (n=6) No(%) ¹	12 to 24 hr (n=4) No(%)
Outer cortex	Grade ² 3~4	3(50)	
	1~2	1(16.7)	4(100)
Inner cortex	Grade 3~4	3(50)	
	1~2	1(16.7)	4(100)
CA1	Grade 3~4	3(50)	3(75)
	1~2	3(50)	
CA3	Grade 3~4	3(50)	3(75)
	1~2	3(50)	1(25)
CA4	Grade 3~4	1(16.7)	3(75)
	1~2	4(66.7)	
Dentate gyrus, Inner blade	Grade 3~4	4(66.7)	4(100)
	1~2	2(33.3)	
Dentate gyrus, outer blade	Grade 3~4	3(50)	1(25)
	1~2		3(75)
Thalamus	Grade 3~4	2(33.3)	1(25)
	1~2	3(50)	3(75)

CA: cornus ammonis n: number

1. Values are number of animals showing changes(%)

2. Grade 1: occasional neurons are degenerated

2: less than 10% of neurons are degenerated

3: 10~50% of neurons are degenerated

4: more than 50% of neurons are degenerated

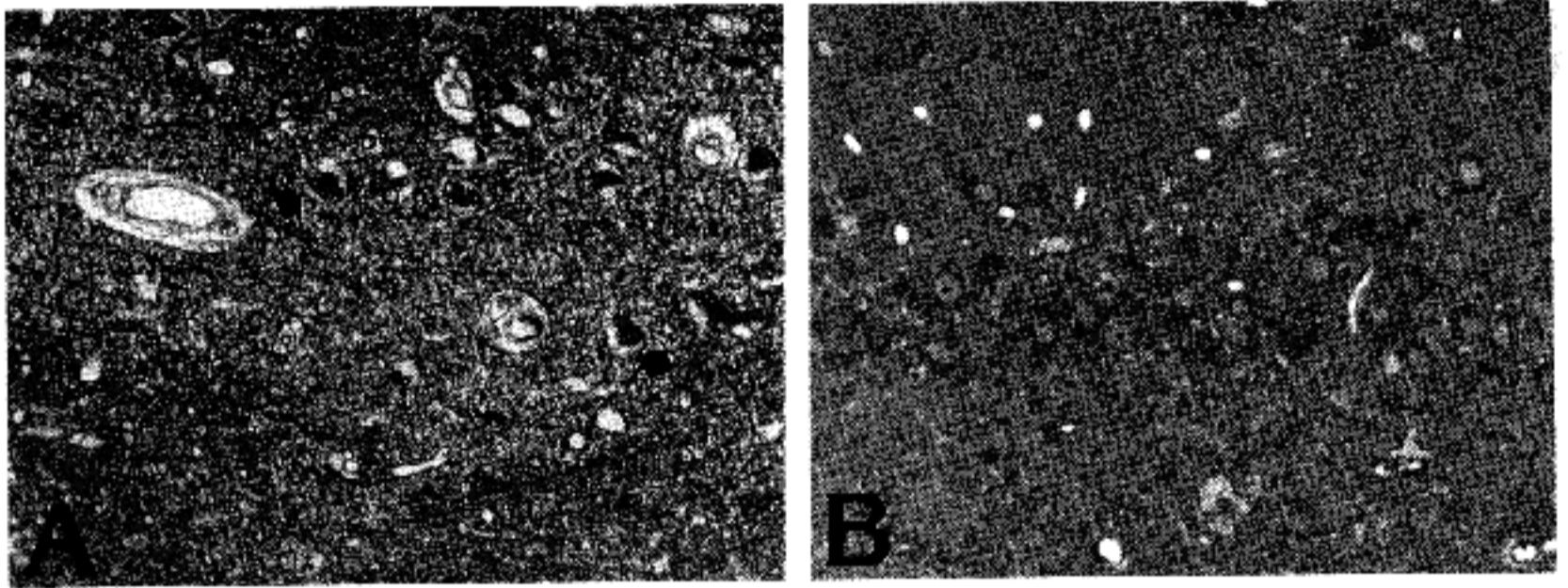


Fig. 3. Light microscopic findings of smthin section of cerebral cortex(A) and left hippocampus(B) of glutaraldehyde fixed rat brains 30 minutes(A) and 24 hours(B) after hypoxic-ischemic exposure. The neurons were markedly degenerated with dark extensively vacuolated cytoplasm(arrows) and the neuropils were edematous at 30 minutes(A). Neurons showed early ischemic changes with darker slightly condensed cytoplasm at 24 hours(B)(Toluidine blue stain).

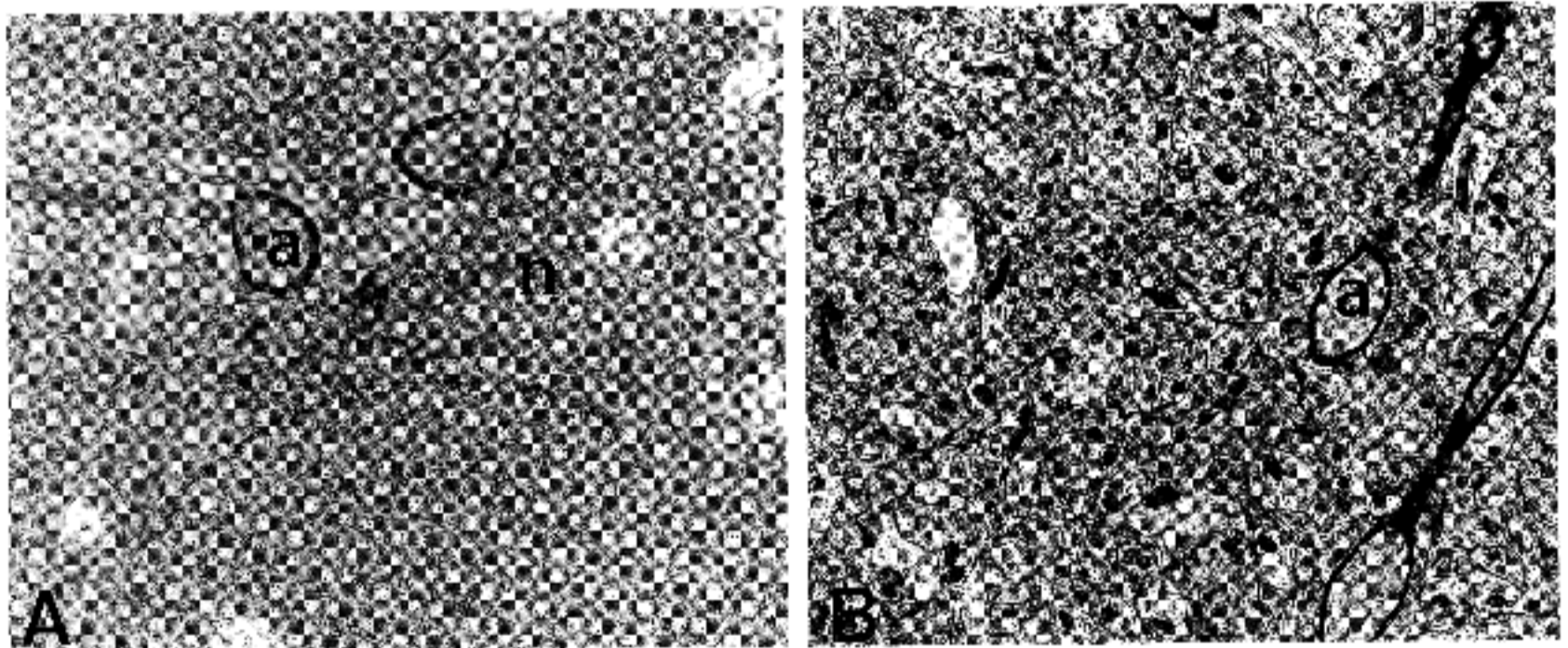


Fig. 4. Electron microscopic findings of hippocampus of control animal. Neuron(n), axon(a), and dendrites were well preserved with well defined presynaptic and postsynaptic junctions(*)(A: $\times 15600$, B: $\times 18000$).

시냅스후 수상돌기는 심한 부종이나 미세구조의 파괴를 보이는 반면 시냅스전 말단의 변성은 소수포(vesicle)가 뭉쳐서 응집(flocculation)되는 형태를 자주 보였다(Fig. 5B). 광학 현미경으로 관찰된 신경세포의 변성이 없는 경우에도 신경 연질의 변성은 대부분에서 관찰되었고 매우 심한 경우도 있었다. 변성된 신경세포는 미세구조가 파괴되어 있었고 변성된 축삭은 신경세사의 경미한 변성부터 완전히 없어지는 심한 변화까지 다양한 소견을 보였다. 이러한 변

화는 30분에서 시작되어 6시간까지 비교적 심했으며 12시간에는 변화가 적게 나타나고 24시간에는 더 많은 수의 변성된 신경세포가 보였지만 검사한 동물의 수가 적기 때문에 그 의의를 부여할 수가 없었다.

4. 자가방사 검사 소견

1) N-methyl-D-Aspartate: Sham 수술한 제1군에서는 NMDA수용체는 헤마의 CA1의 부채살층(stratum radiatum)에 많이 존재하고 상대적으로 CA3에는 소

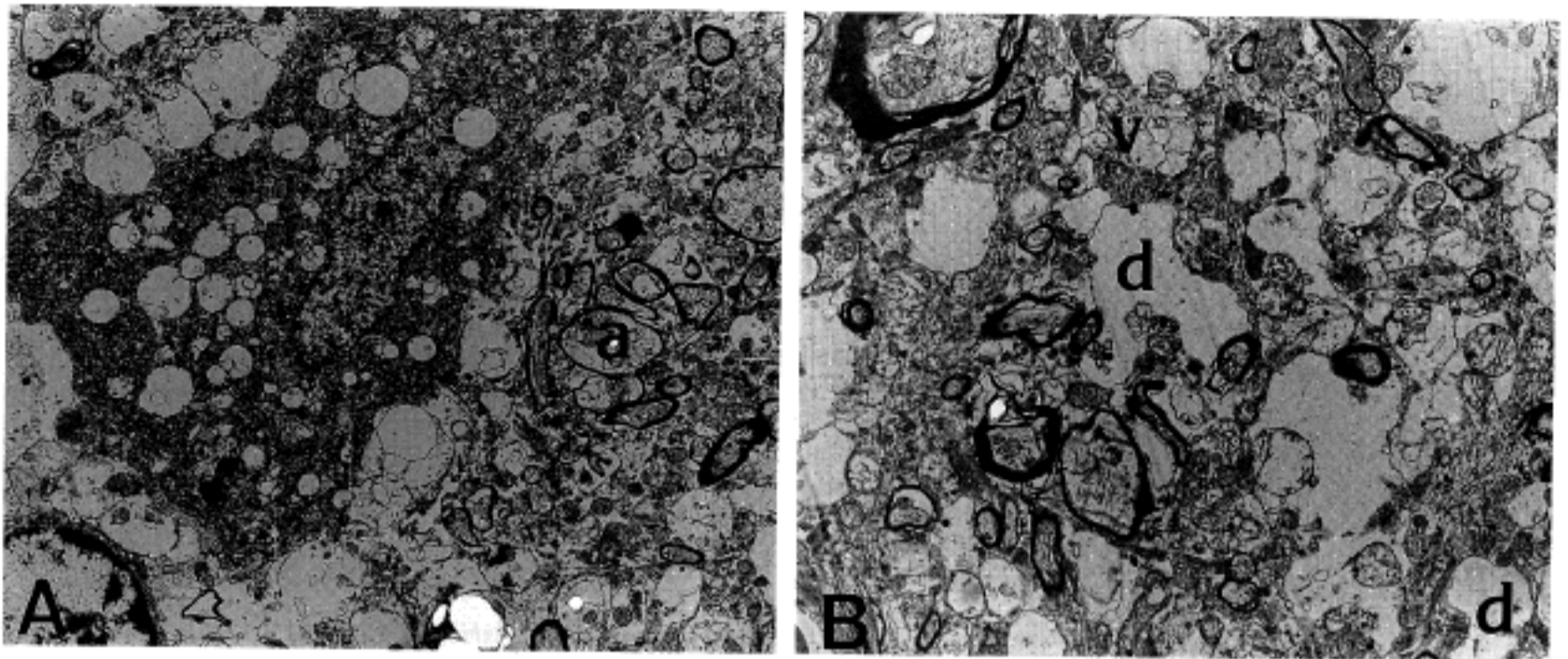


Fig. 5. Electron microscopic findings of left hippocampus(A) and cerebral cortex(B) of rats 30 minutes after hypoxic-ischemic exposure. A markedly degenerated neuron with condensed vacuolated cytoplasm, collapsed nuclei, and degenerated axoplasm(a) was noted with extensive degenerative changes of postsynaptic dendrites(d) and flocculated vesicles(v) accumulating in presynaptic terminals(A: $\times 10400$, B: $\times 18000$).

Table 3. Changes of NMDA receptor at 6 hours and 12 to 24 hours in ischemic(II) and hypoxic(III) groups compared with control(I)

Anatomical region	Δ % left versus right hemisphere				
	Group I (n=10)	Group II		Group III	
		6 hr (n=5)	12 to 24 hr (n=6)	6 hr (n=6)	12 to 24 hr (n=6)
FP cortex					
outer	21.0 (13.7)	6.1 (23.7)	-16.5* (29.1)	22.1 (15.7)	35.9 (67.8)
inner	19.1 (17.0)	1.3* (9.0)	-10.1* (26.6)	4.4 (20.8)	20.8 (40.7)
Hippocampus					
CA1	9.7 (18.6)	2.3 (4.3)	7.6 (22.5)	-0.0 (20.8)	12.8 (18.7)
CA3	0.4 (11.3)	-4.2* (9.5)	-6.4 (10.2)	12.5 (20.9)	5.0 (16.6)
DG	6.0 (15.4)	-3.8 (9.2)	-1.5 (15.0)	1.0 (12.0)	12.0 (17.5)
CP	25.6 (25.0)	2.9** (21.0)	-10.9* (15.4)	7.7 (19.5)	16.0 (28.0)

*: Values are mean(SD), significantly different between groups ($p < 0.05$)

** : Values are mean(SD), significantly different between groups ($p < 0.1$)

NMDA: N-methyl-D-aspartate

FP: frontoparietal

CA: cornus ammonis

DG: dentate gyrus

CP: caudate-putamen



Fig. 6. Autoradiographic findings of N-methyl-D-aspartate receptor in control(A) and hypoxic-ischemic group(B) 2 hours after the exposure. Density of receptors were symmetrical in both hemispheres(A). The highest density was noted in stratum radiatum of CA1(yellow) and lower densities were expressed in green, black, dark blue in decreased order. Density was markedly decreased in left CA1 stratum radiatum, cerebral cortex, thalamus, and caudate-putamen at 2 hours after the insult(B).

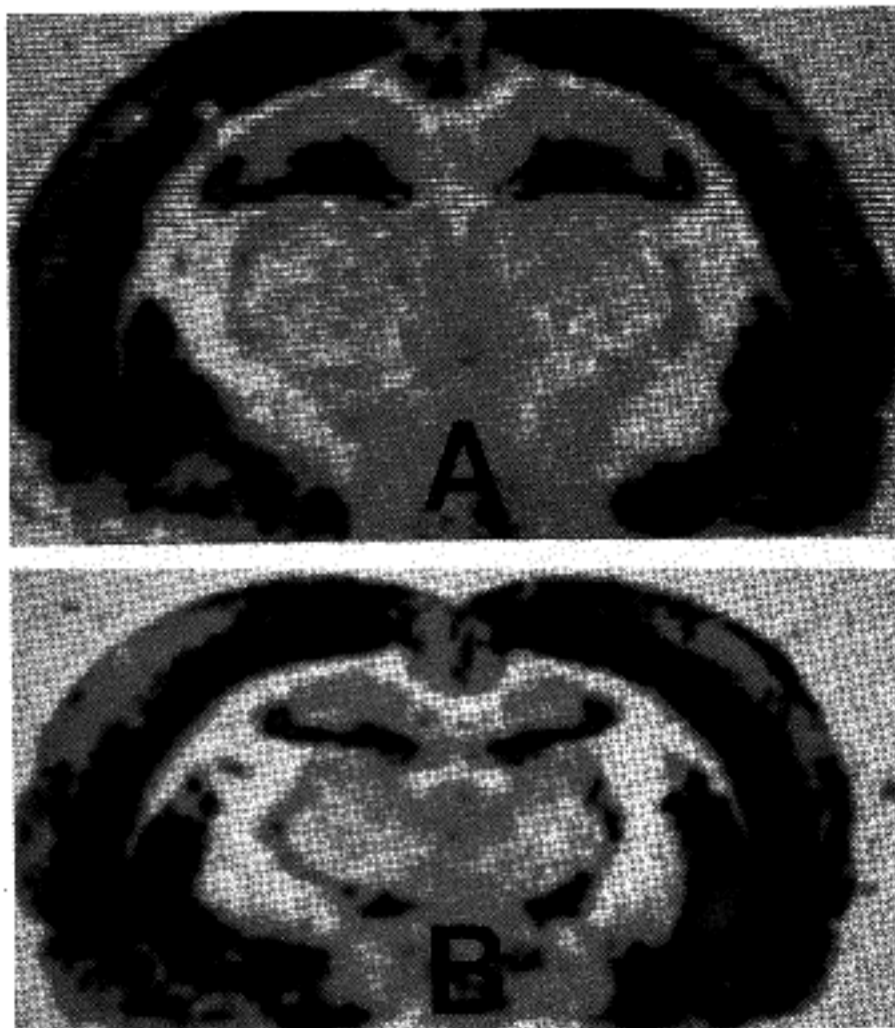


Fig. 7. Autoradiographic finding of kainic acid receptor in control (A) and hypoxic-ischemic group(B) 2 hours after the exposure. Density of receptors were symmetrical in both hemispheres(A). The highest density was noted in stratum lucidum of CA3(green) and lower densities were expressed in black, dark blue, and pink in decreased order. Density was markedly decreased in left hemisphere, especially cerebral cortex, thalamus, and caudate-putamen(B).

Table 4. Changes of NMDA receptor at 2, 6, 12, and 24 hours in hypoxic-ischemic group(IV) compared with control(I)

Anatomical region	△ % left versus right hemisphere				
	Group I (n=10)	Group IV			
		2 hr (n=16)	6 hr (n=5)	12 hr (n=5)	24 hr (n=11)
FP cortex					
outer	21.0 (13.7)	-20.3* (33.5)	-33.1* (18.2)	-20.9* (16.5)	-11.3* (25.8)
inner	19.1 (17.0)	-19.4* (15.8)	-24.9* (10.3)	-16.5* (19.5)	-15.5* (17.1)
Hippocampus					
CA1	9.7 (18.6)	-8.5* (14.4)	-23.1* (9.2)	-19.8* (21.6)	-15.3* (14.5)
CA3	0.4 (11.3)	-8.0 (19.9)	-17.4* (11.3)	-11.2 (13.2)	-13.7* (16.4)
DG	6.0 (15.4)	-6.2* (6.6)	-15.5* (9.7)	-6.5** (8.9)	-4.9** (11.6)
CP	25.6 (25.0)	-13.1* (12.1)	-27.6* (15.6)	-9.1*** (45.3)	-19.5* (19.4)

* : Values are mean(SD), significantly different between groups (p<0.05)

** : Values are mean(SD), significantly different between groups (p<0.1)

*** : p<0.05 by NMDAD method(difference between right and left)

NMDA: N-methyl-D-aspartate

FP: frontoparietal

CA: cornus ammonis

DG: dentate gyrus

CP: caudate-putamen

량이 존재하며 좌우측의 차이가 없었다(Fig. 6A).

제 II 군에서 경동맥을 묶은 왼쪽 대뇌피질의 내층은 6시간부터 계속되는 감소를 보였고, 외층은 12시간에서 24시간에 심한 감소를 보였으며(p<0.05) CA3는 6시간에만 대조군보다 의미있는 감소를 보였다(p<0.05). 미상핵-조가비핵은 6시간에 약간의 변화를 보이고(p<0.1) 12시간에서 24시간에는 심한 변화를 보였고(p<0.05). 모든 부위에서 시간에 따른 차이는 없었다. 제 III 군은 대조군에 비해 의미있는 변화가 없었고 시간에 따른 차이도 없었다(Table 3).

제 IV 군에서 해마의 CA1은 대조군과 비교해서 2시간 후부터 심한 감소를 보였으며(Fig. 6B) 24시간까지 지속되었고(p<0.05) 대뇌 피질의 외층과 내층, 미상핵-조가비핵도 같은 변화를 보였고(p<0.05). CA3는 대조군과 비교해서 6시간과 24시간에만 산발적으

로 의미있게 감소되었고(p<0.05) 치상회는 대조군과 비교해서 2시간과 6시간에 의미있는 감소를 보였고(p<0.05) 12시간과 24시간에서 약간의 감소를 보였다(p<0.1)(Table 4). 각부위의 시간에 따른 변화를 비교했을때 치상회만 6시간과 24시간 사이에 의미있는 차이를 보였다(p<0.05).

2) **Kainic acid:** Sham 수술한 제 I 군에서는 KA 수용체는 해마의 CA3의 투명층(stratum lucidum)에 많이 존재하고 상대적으로 CA1에는 거의 존재하지 않으며 좌우측의 차이가 없었다(Fig. 7A).

제 II 군에서는 대조군과 비교해서 12시간에서 24시간에 피질의 내층과 미상핵-조가비핵에서 약간의 감소를 보였고 (p<0.1) 시간에 따른 차이는 없었다. 제 III 군에서는 6시간군에서 왼쪽 대뇌반구 피질의 내층에 약간의 감소를 보였고 (p<0.1) 6시간과 12시

Table 5. Changes of KA receptor at 6 hours and 12 to 24 hours in ischemic(II) and hypoxic(III) groups compared with control(I)

Anatomical region	△ % left versus right hemisphere				
	Group I (n=10)	Group II		Group III	
		6 hr (n=6)	12 to 24 hr (n=6)	6 hr (n=6)	12 to 24 hr (n=6)
FP cortex					
outer	12.3 (14.2)	15.4 (19.1)	-1.1 (16.0)	-2.3 (19.2)	11.7 (14.4)
inner	13.4 (17.7)	1.9 (8.6)	-2.1** (14.3)	-1.6** (10.8)	2.4 (13.9)
Hippocampus					
CA1	-3.9 (12.9)	-7.1 (11.7)	-0.6 (12.9)	2.3 (11.2)	-0.5 (7.4)
CA3	7.6 (14.8)	1.2 (4.1)	-0.8 (9.5)	8.8 (7.0)	0.1 (15.0)
DG	0.7 (10.6)	-1.6 (13.4)	1.2 (8.4)	0.2 (12.3)	2.1 (12.3)
CP	11.8 (16.3)	5.7 (7.8)	-3.6** (15.5)	12.0 (28.8)	5.0 (28.2)

*: Values are mean(SD), significantly different between groups (p<0.05)

** : Values are mean(SD), significantly different between groups (p<0.1)

KA: kainic acid
 FP: frontoparietal
 CA: cornus ammonis
 DG: dentate gyrus
 CP: caudate-putamen

간에서 24시간 사이에 시간에 따른 차이는 없었다 (Table 5).

제 IV 군에서는 CA1은 변화를 보이지 않았고 CA3는 2시간부터 대조군에 비해 약간 감소되었으며 (p<0.1) 6시간부터 의미있게 감소되었다(p<0.05) (Fig. 7B). 왼쪽 대뇌피질의 외층과 내층과 미상핵-조가비핵은 모두 2시간후부터 대조군과 비해 심한 감소를 보였으며 24시간까지 지속되었다 (p<0.05). 치상회는 2시간과 24시간에서 대조군에 비해 약간의 감소를 보였다(p<0.1)(Table 6).

시간에 따른 각 부위의 비교에서는 대뇌피질의 내층은 2시간과 6시간사이와 6시간과 24시간 사이에 의미있는 차이를 보였고(p<0.05) CA3는 2시간과 6시간사이에서 의미있는 차이를 보였다(p<0.05). 미상핵-

조가비핵은 2시간과 6시간, 2시간과 12시간, 6시간과 24시간, 12시간과 24시간사이에 의미있는 차이를 보였다(p<0.05).

NMDA와 KA 수용체 검사결과와 통계처리에서 좌우측의 값의 비율의 비교나 차이(NMDAD, KAD)의 비교사이에 별다른 차이가 없었다.

고 찰

Glu가 뇌와 망막에서 호흡을 증가시키는 것이 1935년에 Krebs에 의해 보고된 이래 Glu와 Aspartic acid(Asp)가 포유동물의 중추신경계에서 신경연접에서 분비되어 신경흥분성 전달물질로 작용하는 것은 잘 알려진 사실이다^{31,32}. 신경흥분성 아미노산을 전

Table 6. Changes of KA receptor at 2, 6, 12, and 24 hours in hypoxic-ischemic group(IV) compared with control(I)

Anatomical region	△ % left versus right hemisphere				
	Group I (n=10)	Group IV			
		2 hr (n=20)	6 hr (n=5)	12 hr (n=8)	24 hr (n=11)
FP cortex					
outer	12.3 (14.3)	-9.4* (18.8)	-16.6* (16.7)	-11.3* (7.8)	-19.3* (18.4)
inner	13.4 (17.7)	-10.6* (12.4)	-25.1* (12.7)	-16.0* (14.6)	-11.1* (10.7)
Hippocampus					
CA1	-3.9 (12.9)	-3.3 (18.7)	-6.5 (11.4)	-6.2 (12.5)	0.1 (7.2)
CA3	7.6 (14.8)	-1.8** (6.8)	-15.3* (19.1)	-5.7* (6.3)	-7.1* (9.6)
DG	0.7 (10.6)	-8.0** (16.4)	-12.3 (17.7)	-6.6 (12.3)	-8.6** (9.5)
CP	11.8 (16.3)	-5.2* (8.7)	-21.4* (14.7)	-14.1* (4.5)	-5.8* (8.2)

* : Values are mean(SD), significantly different between groups (p<0.05)

** : Values are mean(SD), significantly different between groups (p<0.1)

KA: kainic acid

FP: frontoparietal

CA: cornus ammonis

DG: dentate gyrus

CP: caudate-putamen

신투여하는 경우 신생 마우스 망막의 신경세포를 파괴시키는 것이 관찰되었고 Olney는 이런 신경세포의 손상을 신경 흥분성 작용과 동시에 작용하는 독성에 의한 것이므로 "excitotoxicity"라고 하였다^{33,34}.

정상 뇌의 각 부위에서 EAA 수용체의 분포가 태생기나 출생후의 뇌의 발달에 따라 다른 것은 자가 방사법에 의하여 사람과 동물에서 알려졌다^{21,23,35}. 그 분포를 요약하면 해마의 CA1의 추체세포(pyramidal neuron)에는 다량의 NMDA와 AMPA 수용체가 있고 부채살층에는 NMDA가 주로 있는 반면 CA3의 두명층과 치상핵의 분자층(molecular layer)와 문신경세포(hilar neuron)에는 KA의 수용체가 많이 존재한다. 대뇌피질에서는 외층에는 AMPA 수용체가 주로 있고 KA는 5~6층에 많이 존재한다.

EAA의 역할은 다양한데 이중 NMDA수용체는 성

장중이거나 성숙된 중추신경계에서 발육가소성(developmental plasticity)에 관여하며 장기 상승작용(long term potentiation)이나 기억과정에도 관여하는 것으로 알려져 있다³⁶⁻³⁸. 그리고 이러한 EAA와 그들의 수용체의 작용은 신경세포의 중요한 특성의 하나인 선택성 취약성(selective vulnerability)에서 특히 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다^{22,39}. 신경전달체나 그 수용체와 선택성 취약성의 상관관계는 Glu등의 EAA를 전신투여하거나 뇌실질 또는 뇌실내로 주사하는 경우나 혹은 glutaminergic pathway를 자극하는 경우에 병변이 선택적으로 나타나는 것에 의해 뒷받침 되었다^{40,41}. 그러나 동물이나 병변의 종류나 병변의 유발방법에 따라서 신경세포의 손상이 나타나는 부위와 정도가 다르므로 수용체의 역할 뿐만 아니라 각 세포의 물리적 화학적 요소와 함께 다른

여러가지 요소가 작용하여 선택성 취약성을 일으키는 것으로 생각된다^{42,43}. 그 이외에도 Glu 등의 EAA와 수용체는 Huntington병이나 Alzheimer병 등의 중추신경계의 만성 퇴행성 신경질환에도 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다^{44,45}.

Glu의 합성과 그 작용을 보면 신경세포에서 합성되어 신경연접으로 분비되고 분비된 양의 대부분은 시냅스후 수용체에서 흡수되고 나머지는 신경세포나 주변의 교세포에서 흡수되므로 정상상태에서는 극히 소량만이 세포밖에 존재한다⁴⁶. EAA와 연관이 있는 질환들에서는 세포외액(extracellular fluid)에 Glu의 양이 증가되어 있는 것이 보고되었는데, 어떤 원인에 의해서든지 세포외액에 증가된 Glu 등의 EAA는 전압활성통로(voltage-activated channel)에 작용하거나 또는 직접 통로(channel)를 개방하여 Ca^{++} 을 세포내로 이동시킨다¹⁶. Ca^{++} 의 유입과 동시에 세포질내의 미세구조속에 들어 있던 Ca^{++} 도 분비되어 세포질내의 Ca^{++} 의 농도는 더욱 높아지게 된다. 세포질내에서 증가된 Ca^{++} 은 EAA의 시냅스후 수용체의 증가, 또는 시냅스전의 신경세포내에서 Glu 등의 EAA의 분비를 증가, 혹은 EAA의 재흡수의 방해 등의 적어도 3가지의 방법에 의해 세포질밖의 전달체를 증가시키고 그들의 수용체를 증가시키는 것으로 생각된다^{47,48}. 이렇게 증가된 Ca^{++} 이 EAA에 대한 반응을 증가시키는 이외에도 세포질내에서 미토콘드리아의 손상을 일으키고 신경세포의 용해를 초래하며 막의 인지질을 파괴시키고 그에서 분비되는 여러가지 화학물질(chemical mediator 및 free radicals)들을 증가시켜서 세포의 손상을 일으킨다⁴⁹. 이런 각각의 단계에 대한 규명과 그들의 역할의 중요성을 알기 위해서는 생화학적 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 EAA와 연관이 있는 것이 확실한 실험적으로 일으킨 외상성 뇌손상에서 Glu 수용체의 감소와 기능적인 손상은 있지만 신경세포의 괴사는 초래하지 않는 것이 관찰되었는데 Glu가 충분히 상승하지 않았던지 아니면 Glu와 그 수용체 이외에 다른 요소들이 작용해야 신경세포의 손상을 일으키기 때문이라고 해석되었다⁵⁰.

Glu 등의 EAA에 의해서 즉시 나타나는 급성 세포독성은 EAA에 의한 탈분극에 의해 세포내와 세포외의 Cl의 평형이 깨지고 그에 따라 Cl가 세포질내로 이동되어서 시작되므로 세포질외액에서 Na^+ , Cl를 제거하고 투과성이 없는 이온으로 대체하면 방지된다^{13,15}. 그와 반해서 Ca^{++} 과 관련된 지연성 세포독성은 EAA에 잠시동안 노출된 후에 시간이 지난 다음 신경세포의 변성이 서서히 진행되는 것으로 이때는 외인성(exogenous) EAA는 감소된 상태이므로 내인성

(endogenous) EAA가 작용하는 것으로 생각되며 이렇게 변성이 서서히 진행되는 것은 억제 중간신경원(inhibitory interneuron)의 기능저하, 신경세포의 취약성 증가, Ca^{++} -dependent 효소들이 작용하기 때문이라고 추측되고 있다. 이렇게 서서히 진행되는 신경세포의 손상은 NMDA 수용체의 길항제를 후기에 투여해도 감소되었고 또한 세포질밖의 Ca^{++} 을 제거하면 EAA에 의한 신경세포의 손상이 감소되는 것이 대뇌피질 또는 해마세포의 배양에서도 관찰되었다^{16,51,52}.

흰쥐에서 한쪽 경동맥을 묶은 후에 8%산소-92%질소가스에 노출시키는 Levine procedure는 중대뇌동맥의 영역, 특히 해마, 대뇌피질, 선조체(striatum)에서 국소적인 신경세포의 손상을 일으킨다^{53,54}. 본 연구에서도 경동맥을 묶은 왼쪽 중대뇌동맥이 분포하는 부위에서만 세포의 손상이나 수용체의 변화를 보였다. 저산소에만 노출시킨 실험군이나 경동맥을 묶기만 한 동물에서는 광학현미경이나 전자현미경상의 변화가 없었으며 또한 수용체의 변화도 산발적으로만 보였을 뿐이었다.

본 연구에서는 허혈-저산소성 병변에서 EAA와 그들의 수용체와 관련된 급성과 지연성 신경세포손상의 의미를 규명하고자 해마의 각 부위중에서도 NMDA 수용체가 많이 분포하는 CA1과 non-NMDA 수용체의 하나인 KA수용체가 많이 분포한 CA3에서 수용체의 변동과 형태의 변화를 중점적으로 관찰 비교하였다. 해마의 CA1(CA1 subfield of Lorente de Nó 19 또는 h1 of Rose 또는 Sommer's sector)부위는 1880년에 Sommer가 간질병 환자에서 자주 신경세포의 손실이 있는 부위로 관찰한 이래로 허혈-저산소성 병변에서 가장 심한 변화를 보이는 부위로 알려져 있다^{55,56}. 본 실험동물의 모델에서는 2시간에서 24시간까지의 초기의 병변에서는 해마의 CA1에서는 NMDA 수용체의 변화가 2시간부터 심하고 KA의 변화는 없지만 CA3에서는 반대로 NMDA 수용체의 변화가 산발적이며 KA는 2시간에 감소되기 시작하여 6시간에 가장 심한 감소를 보여서 NMDA와 KA수용체의 변화가 현저히 다른 것을 볼 수 있었다. 또한 KA 수용체는 6시간에 가장 심하게 감소되었다가 24시간까지 단계적으로 증가되고 NMDA 수용체는 2시간부터 지속적인 감소를 보이는 것은 병변의 초기에는 KA 수용체가 더 많이 작용하고 NMDA 수용체는 2시간부터 지속적으로 작용한다고 생각된다. 이러한 변화는 해마뿐만 아니라 대뇌피질이나 미상핵-조가비핵에서도 비슷하게 나타났다. 대뇌피질이나 해마의 부위에 따른 수용체의 변화는 농도계기를 이용한 자가방사법으로는 정확하게 측정할 수가 없고

각 부위의 조직에서 생화학적인 검사를 시행하면 더 확실한 차이를 볼 수 있으리라고 생각된다. 이와 같이 EAA 수용체의 변화가 초기의 병변에서 확실히 다른데 반해 1주일 후에 나타나는 광학현미경상의 병변에서는 CA1과 CA3의 병변이 거의 차이가 없으므로 이 실험동물의 허혈-저산소성 병변에서 NMDA 수용체와 Ca^{++} 이 관여하는 지연성 신경세포손상뿐만 아니라 KA 수용체가 관여하는 급성 신경세포손상도 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 동시에 초기의 병변이 비가역성을 알 수 있었다.

허혈-저산소성 병변에서 Glu 수용체의 변화에 대해서는 Silverstein 등²⁴이 본 실험과 같은 실험 모델을 신생 흰쥐에서 만든 다음 24시간까지 Glu 수용체를 정량적 자가방사법으로 측정하여 결과 수용체가 병변을 일으킨 쪽의 해마, 대뇌피질, 선조체에서 점차적으로 감소되는 것을 관찰하였다. 그들의 결과에서 특이한 것은 치상핵에서 수용체의 변화가 다른 부위보다 빨리 1시간 후부터 더 심하게 나타난 것인데 이것은 신생 흰쥐나 소아에서 성숙 흰쥐나 어른에서보다 이 부위에 Glu 수용체의 분포가 더 많기 때문으로 설명되었다. 본 실험에서는 성숙 흰쥐에서 이미 알려진 바와 같이 병변은 치상핵보다 CA 부위에 더 심했지만 사람에서와는 달리 CA1과 CA3 사이에 차이는 없었으며 그것은 실험 모델이나 병변의 종류에 따라 나타나는 소견이 다른 것으로 설명이 가능하다고 생각된다.

허혈-저산소성 병변에서 Glu의 분비가 증가되고 EAA 수용체의 수가 증가되어 신경세포의 손상을 일으키는 것으로 알려져 있는데 반해 이런 병변에서 수용체의 수가 감소되는 것은 수용체의 "down regulation"이 관여하는 것을 시사한다. 본 연구의 결과에서도 NMDA와 KA 수용체의 변화가 2시간에서 24시간까지 지속적인데 반해 광학현미경상 12시간에서 24시간의 변화가 6시간까지의 변화보다 적은 것은 수용체감소의 일부는 기능적인 "down regulation"에 의한 것을 의미한다. 그러나 이러한 변화중의 어느 정도가 신경세포의 변성에 의한 것이고 어느 정도가 EAA 수용체의 친화성(affinity)의 변화 등의 기능적인 변화에 의한 것인지는 앞으로 연구가 되어야 할 과제이다.

Johansen 등⁵⁷은 20분간의 일시적인 허혈성 병변을 흰쥐에서 일으킨 다음 4일 후에 CA1에서 전자현미경상의 변화와 Na^+ -dependent glutamate high affinity uptake의 관찰에서 CA3에서 오는 Schaffer collateral로 구성되는 것으로 알려진 CA1의 부채살층에서 거의 모든 시냅스후의 수상돌기에 심한 변화가 있는 반면

대부분의 시냅스전 말단에는 변화가 없는 것을 보고 하였다. 그들의 연구에서 자가방사법에 의한 Glu 흡수 검사 결과는 정상에 비해 감소되지 않았는데 그 이유를 저자들은 대부분의 축삭이 잘 유지되어 있기 때문이라고 설명하였다. 본 실험에서는 수용체의 검사를 24시간까지의 초기에만 국한하였기 때문에 4일 후의 변화와 비교할 수는 없었고, 또한 실험동물이 다르고 병변의 종류도 국소적인 허혈-저산소성 병변으로 그들의 전반적인 허혈성 병변과는 다르기 때문에 그 차이의 의의를 규명하기는 힘들다. 그러나 본 실험의 2시간군의 CA1부위의 전자현미경 검사에서 축삭이 비교적 잘 유지되고 시냅스후 수상돌기에만 심한 변화를 보여서 그들의 결과와 비슷하지만 NMDA 수용체의 변화는 심하게 나타나는 것으로 봐서 그들의 결과와는 완전히 일치하지는 않는 것으로 생각된다. 따라서 이러한 연구결과에 차이가 대해서는 추후 연구가 더 필요하다.

허혈성 또는 저산소성 병변과 Glu 등의 EAA에 의한 신경세포의 형태학적 변성에 대해서 많은 보고가 있다^{30,58-60}. 해마나 소뇌의 절편에서 시행한 검사에서 NMDA는 특징적인 괴사성 병변을 일으켜서 세포질의 심한 부종이나 소공포화, 미토콘드리아의 확장, 핵염색체의 응집(chromatin clumping) 등의 소견을 초래하고 그와 반대로 QA는 점진적인 "dark cell degeneration"을 일으켜서 세포의 핵과 세포질이 점차 응축(condense)되고 진하게 염색되다가 소공포로 가득 차는 변화를 보이며 수상돌기의 말단부는 심한 풍선양 변화(ballooning)를 보이는 것으로 보고되었다⁶¹. 뇌의 허혈성 병변이나 뇌척수의 외상 또는 경련중첩증(status epilepticus)에서는 이러한 두가지 변화가 함께 관찰되며 그중 수상돌기의 풍선양 변화나 미토콘드리아의 부종은 가역성으로 생각되기도 한다^{8,62}. Kirino⁶⁰는 모래쥐(gerbil)의 해마의 각 부위에서 나타나는 형태의 시간에 따른 변화를 관찰하였는데 6시간까지는 CA4에 있는 일부의 세포에서만 염색성이 중등도로 증가되고 세포질내의 소공포화가 생기는 변화가 보이고 다른 부위에서는 변화가 없다가 12시간 후에는 염색성이 증가되는 특징적인 허혈성 세포변성을 보이고 이러한 변화는 24시간에 떠 두렷히 보이는 것을 보고하였다. 한편 CA2에서는 특징적인 염색질용해(chromatolysis)와 비슷한 변화가 관찰되어서 그들은 이러한 변화를 반응성변화(reactive change)라고 명명하였다. 이러한 CA4와 CA2의 변화는 21일 후에는 관찰되지 않아서 손상을 받은 세포들이 완전히 흡수되어 없어지던지 아니면 CA2의 반응성 변화는 상당수가 회복되는 것으로 해석되었

다. CA2나 CA4와는 달리 CA1의 변화는 2일 후에 세포질의 틈새(clefts)의 형태로 나타나기 시작하여 4일 후에는 세포의 구조가 완전히 파괴되는 심한 변화를 보여서 지연성 세포손상의 형태로 나타났으며 불가역성이었다. 비슷한 지연성 변화는 정도가 약한 허혈성 병변에서 "maturation phenomenon"이라고 보고되기도 했다⁵⁹.

본 연구에서 관찰된 광학현미경상의 변화는 동결 절편한 조직에서는 세포의 변화를 정확히 알기가 힘들었기 때문에 세포가 뚜렷한 ICC로 생각되는 변화를 보일때만 변성된 세포로 판정하였다. 전자현미경 검사를 위해서 glutaraldehyde로 관류고정한 조직에서는 세포의 변화를 더 자세히 관찰할 수 있었다. 그때의 변화는 가장 심한 변화를 보였던 30분군에서는 대뇌피질에서 뚜렷히 관찰되는 진하게 염색되며 많은 소공포를 갖는 전형적인 신경세포의 변성을 보였으며 신경망에도 부종이 심하게 나타났으나 그 이후의 시간군에서 단지 흩어져 있는 조기의 허혈성 신경세포 변성만 보인 것은 이전의 실험에서 보고되었던 조기의 병변이 회복되는 것과 연관이 있을 수도 있지만 검사한 동물의 수가 너무 적기 때문에 추후 충분한 수의 동물로 연구하여야 한다고 생각된다. 반면에 7일 후에 FAM으로 관류고정한 조직에서는 통상 ICC의 특징으로 잘 알려져 있는 호산성 세포질과 농축된 핵(pyknotic nuclei)을 갖는 세포가 대뇌피질과 해마에서 관찰되었고 시상에서는 그 형태가 다른 응축된 핵을 갖는 찌그러진 세포의 형태로 보였다. 이와 같이 부위에 따라 변성된 세포의 형태가 다른 것은 잘 알려진 사실이지만 그 원인은 아직도 뚜렷히 밝혀지지 않았다.

본 연구의 전자현미경 검사에서는 여태까지 많은 저자들의 보고와 비슷한 소견을 보였으나 단지 신경세포나 신경망이 30분에서 6시간까지에서 12시간보다 더 심한 변성을 보였고 이것은 광학현미경 검사 소견과도 상응하는 것이었다. 이와 같이 광학현미경이나 전자현미경 검사의 관찰에서 12시간에서 24시간의 변화가 1시간에서 6시간의 변화보다 적고 1주일 후에 대부분의 예에서 병변을 보인 것은 조기의 병변이 일부 회복될 가능성과 24시간 이후에 진행되는 지연손상에 의한 것으로 생각된다.

뇌의 허혈-저산소성 또는 외상성 병변에서의 신경세포의 손상에 관여하는 기전과 조기의 변화를 규명하는 것은 임상에서 높은 유효율을 보이고 있는 뇌혈관 질환이나 외상의 효과적인 치료를 개발하려는 목적하에 열심히 진행되었다. 현재까지 알려진 바와 같이 이러한 병변에서 NMDA의 역할이 인정됨에 따

라 NMDA의 분비를 감소시키거나 그들의 수용체에 대한 길항제를 사용함으로써 신경세포의 변성을 감소시키려는 노력이 시도되어 왔다^{52,63-65}. 그러나 아직까지는 수용체에 대한 여러가지 종류의 길항제중 어떤 것도 이러한 병변을 완전히 방지할 수는 없으므로 새로운 효과있는 약제의 개발에 대한 연구가 진행되고 있다.

본 실험결과에서 얻어진 결론은 신경세포의 변화가 병변의 초기인 30분에서부터 전자현미경상에서 보이므로 임상에서 수용체의 길항제에 의한 허혈-저산소성 병변의 치료에서 초기에 투여할수록 효과가 있을 것으로 생각된다. 또한 허혈-저산소성 병변에서 NMDA 수용체가 주로 관여하는 지연성 세포손상뿐만 아니라 non-NMDA 수용체가 같이 관여하는 급성 신경세포의 손상도 비가역성으로 남아서 병변에 기여하는 것은 이러한 질환의 치료에서 NMDA의 길항제뿐만 아니라 non-NMDA 수용체의 길항제를 함께 쓰면 효과가 더 좋으리라고 생각된다.

그리고 이런 수용체의 길항제나 EAA의 분비를 억제하는 약제는 전신투여하는 경우 혈뇌장벽(blood-brain barrier)를 잘 통과해야 하며 EAA의 역할을 감소시키는데 따른 부작용이 없어야 되므로 이러한 약제의 개발과 효과적인 투여는 매우 중요한 것으로 사료된다.

결 론

성숙 흰쥐의 대뇌반구에서 왼쪽 경동맥을 묶은 후 8%산소-92%질소 가스에 3시간 노출시킨 허혈-저산소성 병변에서 자가방사법, 광학현미경과 전자현미경으로 관찰한 24시간까지의 조기의 병변과 광학 현미경으로 관찰한 1주일후의 병변을 관찰 비교하여 다음의 결과를 얻었다.

- 1) 정상에서 높은 NMDA 수용체의 밀도를 갖는 해마의 CA1은 허혈-저산소성 병변에서 NMDA 수용체가 2시간부터 24시간까지 지속적으로 감소되었다.
- 2) KA 수용체가 많이 있는 해마의 CA3는 허혈-저산소성 병변에서 KA수용체가 6시간 후에 가장 심하게 감소되었고 그후 점차 증가되었다.
- 3) 대뇌 피질과 미상핵-조가비핵은 NMDA와 KA 수용체가 2시간부터 24시간까지 지속적으로 감소하였다. NMDA 수용체는 시간에 따른 차이를 보이지 않았고 KA 수용체는 6시간에 가장 변화가 심했다.
- 4) 광학현미경 관찰에서 각 시간에 부위에 따른 차이는 없었지만 1시간에서 6시간에는 12시간에서 24시간보다 심했으며 1주일 후에는 대부분의 예에

서 변성을 보였다.

5) 전자현미경상의 변화는 신경세포의 변성보다는 신경연접의 변화가 더 심했으며 시냅스전 말단보다 시냅스후 수상돌기의 변화가 훨씬 더 심했다. 변화는 30분에 매우 심하게 나타났고 12시간에 비교적 적었으며 24시간에는 정도가 더 심했다.

이상과 같은 결과를 요약하면 KA 수용체가 관여하는 급성 신경세포손상도 허혈-저산소성 병변에서 중요한 역할을 하는 것과 초기의 병변이 비가역성임을 알 수 있었다. 또한 신경세포의 변화가 병변의 초기인 30분에서부터 전자현미경상에서 보이므로 임상에서 수용체의 길항제에 의한 허혈-저산소성 병변의 치료에서 초기에 투여할수록 효과가 있으며 NMDA 수용체의 길항제뿐만 아니라 non-NMDA 수용체의 길항제를 함께 쓰면 효과가 더 좋으리라고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Van Harreveld A. Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J Neurochem* 1959; 3: 300-15.
2. Hansen AJ. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 1985; 65: 101-48.
3. Mody I, Lambert JDC, Heinemann U. Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 1987; 57: 869-88.
4. Kass IS, Lipton P. Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice. *J Physiol* 1982; 332: 459-72.
5. Rothman SM. Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science* 1983; 220: 536-7.
6. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature* 1984; 309: 261-3.
7. Rothman SM, Somaie M. The physiology of excitatory synaptic transmission in cultures of dissociated rat hippocampus. *J Neurophysiol* 1985; 54: 701-13.
8. Ikonomidou C, Price MT, Mosinger JL, Friedrich G, Labruyere J, Salles KS, Olney JW. Hypobaric-ischemic conditions produce glutamate-like cytopathology in infant rat brain. *J Neurosci* 1989; 9: 1693-700.
9. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 43: 1369-74.
10. Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1988; 51: 1455-64.
11. Johansen FF, Jorgensen MB, Diemer NH. Ischemic CA-1 pyramidal cell loss is prevented by preischemic colchicine destruction of dentate gyrus granule cells. *Brain Res* 1986; 377: 344-7.
12. Onodera H, Sato G, Kogure K. Lesions to Schaffer collaterals prevent ischemic death of CA1 pyramidal cells. *Neurosci Lett* 1986; 68: 169-74.
13. Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 1986; 19: 105-11.
14. Kauppinen RA, McMahon HT, Nicholls DG. Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca^{2+} concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: Possible relevance to hypoglycaemia and anoxia. *Neuroscience* 1988; 27: 175-82.
15. Olney JW, Price MT, Samson L, Labruyere J. The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett* 1986; 65: 65-71.
16. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987; 7: 369-79.
17. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987; 7: 357-68.
18. Rothman SM, Thurston JH, Hauhart RE. Delayed neurotoxicity of excitatory amino acids in vitro. *Neuroscience* 1987; 22: 471-80.
19. Mayer ML, Westbrook GL. Mixed-agonist action of excitatory amino acids on mouse spinal cord neurons under voltage clamp. *J Physiol* 1984; 354: 29-53.
20. Watkins JC, Olverman HJ. Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci* 1987; 10: 265-72.
21. Monaghan DT, Holets VR, Toy DW, Cotman CW. Anatomical distributions of four pharmacologically distinct 3H -L-glutamate binding sites. *Nature* 1983; 306: 176-9.
22. Cotman CW, Monaghan DT, Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways. *Trends Neurosci* 1987; 10: 273-80.

23. Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989; 29:365-402.
24. Silverstein FS, Torke L, Barks J, Johnston MV. Hypoxia-ischemia produces focal disruption of glutamate receptors in developing brain. *Dev Brain Res* 1987; 34: 33-9.
25. Young RS, Petroff OA, Novotny EJ Jr, Wong M. Neonatal excitotoxic brain injury. Physiologic, metabolic, and pathologic findings. *Dev Neurosci* 1990; 12: 210-20.
26. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 1988; 11: 465-9.
27. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of nervous system. *Neuron* 1988; 1: 623-34.
28. Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 171-82.
29. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. Australia, Academic press, 1986.
30. Smith ML, Kalimo H, Warner DS, Siesjö BK. Morphological lesions in the brain preceding the development of postischemic seizures. *Acta Neuropathol* 1988; 76: 253-64.
31. Krebs HA. Metabolism of amino-acids. III. Deamination of amino acids. *Biochem J* 1935; 29: 1620-44.
32. Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 1984; 42: 1-11.
33. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol* 1957; 58: 193-201.
34. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 164: 719-21.
35. Lee H, Choi BH. Density and distribution of excitatory amino acid receptors in the developing human fetal brain: A quantitative autoradiographic study. *Exp Neurol* 1992; 118: 284-90.
36. Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *Nature* 1986; 319: 774-6.
37. McCabe BJ, Horn G. Learning and memory: regional changes in N-methyl-D-aspartate receptors in the chick brain after imprinting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2849-53.
38. Muller D, Joly M, Lynch G. Contributions of quisqualate and NMDA receptors to the induction and expression of LTP. *Science* 1988; 242: 1694-7.
39. Spielmeyer W. Zur Pathogenese örtlich elektiver Gehirnveränderungen. *Z Ges Neurol Psychiatr* 1925; 99: 756-76.
40. Coyle JT, Bird SJ, Evans RH, Gulley RL, Nadler JV, Nicklas WJ, Olney JW. Excitatory amino acid neurotoxins: selectivity, specificity, and mechanism of action. *Neurosci Res Prog Bull* 1981; 19: 329-427.
41. Steiner HX, McBean GJ, Kohler C, Roberts PJ, Schwarcz R. Ibotenate-induced neuronal degeneration in immature rat brain. *Brain Res* 1984; 307: 117-24.
42. Koh J, Choi DW. Cultured striatal neurons containing NADPH-diaphorase or acetylcholinesterase are selectively resistant to injury by NMDA receptor agonists. *Brain Res* 1988; 446: 374-8.
43. Tecoma ES, Choi DW. GABA-nergic neocortical neurons are resistant to NMDA receptor-mediated injury. *Neurology* 1989; 39: 676-82.
44. Greenamyre JT, Penney JB, Young AB, D'Amato CJD, Hicks SP, Shoulson I. Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's disease. *Science* 1985; 227: 1496-8.
45. Geddes JW, Chang-Chui H, Cooper SM, Lott IT, Cotman CW. Density and distribution of NMDA receptors in the human hippocampus in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1986; 399: 156-61.
46. Naito S, Ueda T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem* 1985; 44: 99-109.
47. Baudry M, Bundman MC, Smith EK, Lynch GS. Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in rat brain synaptic membranes. *Science* 1981; 212: 937-8.
48. Dubinski JM, Rothman SM. Intracellular calcium concentrations during "chemical hypoxia" and excitotoxic neuronal injury. *J Neurosci* 1991; 11: 2545-51.
49. Meldrum BS, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 379-87.
50. Miller LP, Johnson AE, Gelhard RE, Insel TR. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain. II. Kainic acid receptors. *Neuroscience* 1990; 35: 45-51.
51. Foster A, Gill R, Woodruff GN. Neuroprotective effects of MK-801 in vivo: Selectivity and evidence for delayed degeneration mediated by NMDA receptor activation. *J Neurosci* 1988; 8: 4745-54.
52. Choi DW. Cerebral hypoxia: Some new approaches

- and unanswered questions. *J Neurosci* 1990; 10: 2493-501.
53. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 1960; 36: 1-17.
54. Rice JE, Vaucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981; 9: 131-41.
55. Sommer W. Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie. *Arch Psychiat* 1880; 10: 631-75.
56. Falconer MA. The significance of mesial temporal sclerosis (Ammon's horn sclerosis) in epilepsy. *Guy's Hosp Rep* 1968; 117: 1-12.
57. Johansen FF, Jorgensen MB, Elström von Lubitz DKJ, Diemer NH. Selective dendrite damage in hippocampal CA1 stratum radiatum with unchanged axon ultrastructure and glutamate uptake after transient cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res* 1984; 291: 373-7.
58. McGee-Russell SM, Brown AW, Brierley JB. A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischaemic cell change in rat brain. *Brain Res* 1970; 20: 193-200.
59. Ito U, Spatz M, Walker JT, Klatzo I. Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropathol* 1975; 32: 209-23.
60. Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982; 239: 57-69.
61. Garthwaite G, Garthwaite J. Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in young rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods* 1989; 29: 33-42.
62. Simon RP, Griffiths T, Evans MC, Swan JH, Meldrum BS. Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1984; 4: 350-61.
63. Weiss JH, Goldberg MP, Choi DW. Ketamine protects cultured neocortical neurons from hypoxic injury. *Brain Res* 1986; 380: 186-90.
64. Boast CA, Gerhardt SC, Pastor G, Lehmann J, Etienne PE, Liebman JM. The N-methyl-D-aspartate antagonists CGS 19755 and CPP reduce ischemic brain damage in gerbils. *Brain Res* 1988; 442: 345-8.
65. Steinberg GK, Saleh J, Kunis D. Delayed treatment with dextromethorphan and dextrorphan reduces cerebral damage after transient focal ischemia. *Neurosci Lett* 1988; 89: 193-7.
-