대한외과학회지 : 제61권 제6호
Vol. 61, No. 6, December, 2001

□ 원 저 □

Gabexate Mesilate가 토끼 간의 허혈-재관류 손상에 미치는 영향

경희대학교 의과대학 외과학교실

신영도 · 이상목 · 고영관 · 이기형 · 고석환 · 홍성화 · 오수명

The Effects of Gabexate Mesilate on the Ischemia-Reperfusion Injury in the Rabbit Liver

Young Do Shin, M.D., **Sang Mok Lee,** M.D., **Young Gwan Ko,** M.D., **Kee Hyung Lee,** M.D., **Suck Hwan Koh,** M.D., **Sung Wha Hong,** M.D. and **Soo Myung Oh,** M.D.

Purpose: Ischemia-reperfusion is an important pathologic process that leads to impairment of the liver after major surgery. Ischmia-reperfusion injury includes both hypoxia and an inflammatory response associated with reperfusion; the former is caused by the lack of microvascular perfusion and the latter is mediated by cytyokines and oxygen free radicals. In addition to inhibiting thrombin, plasmin, kalikrein, trypsin, and neutrophil elastase, gabexate mesilate also plays an important role in inhibiting cytokines and oxygen free radical production. The purpose of this study was to investigate the effects of gabexate mesilate on ischemia-reperfusion injury in the liver.
Methods: Twenty-four New Zealand white rabbits were divided into three groups. Clamping was not done in group A (n=8), although it was done in group B (n=8) and group C (n=8). Group C received intravenous infusion of gabexate mesilate (10 mg/kg/hr) continuously during the process of clamping. Serum alanine aminotrasferase (ALT) and purine nucleoside phophorylase (PNP) were measured immediately before clamping, following 30-minute ischemia, and after 60-minute reperfusion. Hepatic tissue adenosine triphophate (ATP), xanthine oxidase, and malondialdehyde (MDA) plus 4-hydroxyalcenals (4HA) were measured after reperfusion.
Results: Compared with group A, group B and group C demonstrated a significant increase in ALT and PNP levels following ischemia and reperfusion, as well as in xanthine oxidase and MDA plus 4HA levels following reperfusion. However, ATP levels showed no significant differences among the three groups. ALT levels were significantly lower in group C than in group B following reperfusion ($P < 0.01$), although there was no significant differences in PNP levels between them. Xanthine oxidase and MDA plus 4HA levels were significantly lower in group C than in group B ($P < 0.05$). The results suggest that gabexate mesilate inhibits an increase in ALT, xanthine oxidase, and MDA plus 4HA levels.
Conclusion: Gabexate mesilate inhibits oxygen free radical production of xanthine oxidase, and results in a reduction of hepatic ischemia-reperfusion injury. **(J Korean Surg Soc 2001;61:553-559)**

Key Words: Gabexate mesilate, Ischemia-reperfusion, Liver
중심 단어: Gabexate mesilate, 허혈-재관류, 간

Department of Surgery, KyungHee University College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

간암으로 인한 간 절제술 시 간 실질 출혈을 최소화하기 위해 문맥세가지(portal triad)를 폐쇄(Pringle maneuver)하거나, 말기 간질환의 최후의 치료법인 간이식시 공여장기의 획득, 보존, 이식이라는 일련의 과정상 허혈-재관류 손상이 불가피하게 일어난다. 이러한 허혈-재관류 손상의 기전은 동모양혈관(sinusoid)의 관류 장애와 백혈구의 활성화를 포함한 염증 반응으로 설명하고 있다.(*1*) 동모양혈관의 관류 장애는 동모양혈관 내피세포의 부종과 endothelin (ET)/nitric oxide (NO) 균형의 변조에 의해 초래된다.(*2,3*) 염증 반응은 tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin(IL)-1 등의 사이토카인(cytokines)과 산소유리기(oxygen free radical)의 분비 및 활동,(*4,5*) selectins, β-integrins, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1과 같은 내피세포 및 백혈구 접착분자의 유도,(*6-8*) 그리고 내피세포와 백혈구의 상호 작용이 동반되면서 발생한다. 따라서 간의 허혈-재관류 손상을 최소화하는 방법은 미세순환을 개선하고 염증 반응을 억제하는 것으로, 현재 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 특히 사이토카인 및 산소유리기의 생성을 억제하여 허혈-재관류 손상을 줄이고자 하는 방법

책임저자 : 고석환, 서울시 동대문구 회기동 1번지
㉾ 130-702, 경희대학교 의과대학 외과학교실
Tel: 02-958-8265, Fax: 02-966-9366
접수일 : 2001년 7월 29일, 게재승인일 : 2001년 9월 17일

이 가장 활발히 연구되고 있다. 간의 허혈이 시작되면 간 실질 세포에 있는 adenosine triphosphate (ATP)의 일부는 분해되고 대부분은 inosine으로 전환된다. 동모양혈관 내피세포에서는 이러한 inosine이 purine nucleoside phosphorylase (PNP)에 의해 hypoxanthine으로 다시 전환되고, 재관류가 일어나면 hypoxanthine은 xanthine oxidase에 의해 xanthine과 산소유리기를 생성하게 된다.(*9,10*) 산소유리기는 백혈구의 유착이 일어나도록 접착분자의 표현을 유도하고,(*11*) 세포막의 지질을 과산화시킴으로써 세포의 기능을 상실하게 만든다.(*12*)

췌장염과 파종성 혈관내응고증의 치료 약제로 사용되고 있는 gabexate mesilate는 trypsin, thrombin, plasmin, activated factor X, kallikrein, neutrophil elastase 등의 serine 단백분해효소를 억제한다.(*13-15*) 간의 허혈-재관류 손상에서 gabexate mesilate의 효과에 대한 보고에 의하면, TNF-α의 생성을 저하시켜 백혈구 활성화를 억제하거나,(*16*) 산소유리기를 억제 또는 항산화효소를 증가시켜서 허혈-재관류 손상을 줄인다고 하였다.(*17*)

저자들은 토끼의 말초 정맥으로 gabexate mesilate를 계속 주입하면서 간의 허혈-재관류 손상을 유발하여, 혈액에서는 간 실질세포 손상의 지표인 alanine aminotransferase (ALT)와 동모양혈관 손상의 지표인 PNP를 측정하고, 간 조직에서는 ATP, xanthine oxidase, 그리고 세포 지질 과산화 결과 산물인 malondialdehyde (MDA)와 4-hydroxyalcenals (4HA)를 측정하여 gabexate mesilate가 간의 허혈-재관류 손상을 효과적으로 줄일 수 있는지 알아보고자 하였다.

방 법

1) 실험 동물

암수 상관없이 체중 2~5 kg 정도의 New Zealand white rabbit 총 24마리를 사용하였고 시술 전 24시간 동안 물 공급을 제외하고는 굶겼다.

2) 실험 계획

각 군당 8마리씩 세군으로 나누어 실험하였으며, 실험군과 대조군은 30분간 허혈을 유도한 후 60분간 재관류 시켰고, 정상군은 허혈-재관류 손상을 주지 않고 단순 개복만 하였다. 정상군과 대조군은 허혈-재관류시 링거액을 10 ml/kg/hr로 정맥 주입하였고, 실험군은 같은 양의 링거액에다 gabexate mesilate를 10 mg/kg/hr로 혼합하여 투여하였다.

3) 실험 방법

모든 토끼들은 ketamine hydrochloride 25 mg/kg와 xylazine hydrochloride 1 mg/kg의 혼합제를 근내주사하여 마취시켰고, 체온이 일정하게 유지되도록 하기 위해 온열 담요가 깔려있는 수술대 위에서 시술하였다. 토끼를 앙와위로 눕힌 상태에서 한쪽 귀에다 24-gauge 혈관도관침으로 정맥로를 확보하고 반대편 귀에는 동맥의 산소포화도를 감시하기 위해 맥박산소계측기(pulse oximeter)를 부착하였다. 복부의 털을 깍고 절개 부위를 소독한 후 정중절개로 개복하였다. 간십이지장인대를 분리하고 혈관 겸자(Bulldog clamp)를 이용하여 문맥세가지를 완전 차단한 후 복벽을 봉합하였다. 허혈 30분 후 재개복하고 혈관 겸자를 제거하여 재관류를 60분간 시킨 후 thiopentone sodium 25 mg/kg으로 희생시켰다.

4) 검체 채취

간정맥이 유입되는 부위의 하대정맥을 25-gauge 두피정맥 주입침(scalp vein infusion set)으로 천자하여 3 ml 정도 채혈하였으며, 채혈 시기는 실험군과 대조군인 경우 허혈 조작(clamping) 직전, 재관류 직전, 그리고 60분간의 재관류 후였고, 정상군은 개복 후 0분, 30분, 90분에 채혈하였다. 채혈한 혈액은 반씩 나누어 각각 1,000 g에서 3분간 원심분리 후 혈청만을 분리, 하나는 곧바로 ALT를 측정하는데 사용하였고, 다른 하나는 PNP 측정을 위해 $-70^{\circ}C$에서 동결 보관하였다. 마지막 혈액 채취 후 thiopentone sodium으로 토끼를 희생시켜 간을 적출하였으며, 이중 일부는 100~200 mg 정도로 절편하고 신속히 액화질소탱크에 넣어 $-70^{\circ}C$로 급속 냉동 후 보관하였고, 나머지는 10% formalin 용액에 넣어 고정시켰다.

5) 혈청 ALT의 측정

ALT의 활성도는 자동분석기(CX-7, Beckman, CA, USA)를 이용하여 정량 분석하였고, 결과는 international units/L (IU/L)로 표시하였다.

6) 혈청 PNP의 측정

Guanosine이 PNP에 의해 대사되는 과정을 이용한 Glantz와 Lewis(*18*)의 방법으로 PNP의 활성도를 측정하였다. $40^{\circ}C$에서 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 6.3)에 기질인 0.2 mM guanosine 2.5 ml와 검체 0.1 ml를 첨가하여 잘 섞은 후, 자외선 분광광도계(spectrophotometer)로 파장 252 nm에서 30초 간격으로 3분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소의 활성도는 bovine albumine을 표준 단백질로 사용하여 1분당 1 mg의 단백질이 소멸시킨 guanosine의 양으로 나타내었고, 단위는 nmole/min/ml serum으로 표시하였다.

7) 간 조직내 MDA와 4HA의 측정

간 조직을 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 혼합 후 분쇄하여 10% 균질액(homogenate)으로 만들고, 이 균질액 0.2 ml를 얻어 과산화지질에 대한 colorimetric assay법인 LPO-586^{TM} assay kit (OXIS International, Inc. Portland, U.S.A.)를 사용하여 586 nm에서 자외선 분광광도계로 흡

광도를 측정하였다. 단위는 bovine albumine을 표준 단백질로 사용하여 단백질 1 g 당 포함되어 있는 MDA와 4HA의 양을 nmole로 산정하였다.

8) 간 조직내 xanthine oxidase의 측정

Xanthine oxidase에 의해 hypoxanthine은 xanthine으로, xanthine은 요산으로 산화되는 과정을 이용한 Stirpe와 Della Corte(*19*)의 방법에 따라 xanthine oxidase의 활성도를 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 기질인 0.05 M hypoxanthine과 적당히 희석된 간 조직액을 첨가하여 25°C에서 반응시킨 다음, 12% trichloroacetic acid로 제단백시킨 후 원심분리하여 상층액을 얻어서 자외선 분광광도계로 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성도는 bovine albumine을 표준 단백질로 사용하여 1분당 1 mg의 단백질이 생성시킨 요산의 양으로 나타내었고, 단위는 μmole/min/mg protein로 표시하였다.

9) 간 조직내 ATP의 측정

−70°C로 냉동 보관된 간 조직을 잘게 부수어 만든 가루를 12% trichloroacetic acid에 넣어 얼음 속에서 균질화시키고 이를 0°C에서 10,000 g로 15분간 냉장 원심분리한다. 이 상층액 0.5 ml를 얻어 ATP진단 kit (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)를 사용하여 340 nm에서 자외선 분광광도계로 ATP를 측정하였다. 단위는 bovine albumine을 표준 단백질로 사용하여 단백질 1 g당 ATP의 양을 μmole로 산정하였다.

10) 병리조직 검사

10% formalin으로 고정된 간 조직을 알코올로 탈수하고 파라핀으로 포매하였다. 포매된 표본은 4 μm의 두께로 잘라서 hematoxylin-eosin으로 염색한 후 광학현미경으로 조직학적 변화를 한 명의 병리학자가 관찰하였다.

11) 통계 분석

검사 결과는 평균값(평균±표준오차)으로 표시하였으며, 통계분석은 SPSS for window 8.0 프로그램을 이용하였다. Wilcoxon signed ranks test를 사용하여 각 군에서의 시간대별 ALT와 PNP 평균값의 차이를 검증하였고, 대조군과 실험군간의 평균값의 차이는 비모수적 방법인 Mann-Whitney test로 비교 분석하였으며, 유의검정 수준은 $P<0.05$로 하였다.

결 과

1) 혈청 ALT의 변화

정상군의 허혈 조작 직전, 재관류 직전, 재관류 60분 후의 ALT 평균값은 43.6±9.8, 45.1±11.8, 48.8±8.4 IU/L로 시간의 변화에 따른 차이는 없었다. 대조군과 실험군의 시간대별 ALT 평균값은 각각 43.7±16.5, 155.3±57.1, 816.6±161.5 IU/L와 49.2±12.5, 126.2±47.2, 293.6±99.9 IU/L로 두 군 모두 시간의 변화에 따라 통계적으로 유의한 차이가 있었다. 재관류 직전과 재관류 60분 후에서 대조군과 실험군은 정상군보다 통계적으로 유의하게 높은 ALT 평균값을 보였다. 시간대별로 대조군과 실험군을 비교하면 재관류 직전에서는 두 군간의 유의한 차이가 없었으나 재관류 60분 후에서는 실험군의 ALT 평균값이 현저히 낮았다(P=0.000)(Fig. 1).

2) 혈청 PNP의 변화

시간대별 정상군 PNP의 평균값은 3.89±0.58, 3.88±0.48, 4.05±0.43 nmole/min/ml로 시간의 변화에 따른 차이는 없었지만, 대조군과 실험군인 경우는 각각 3.89±0.78, 4.55±0.48, 5.24±0.53 nmole/min/ml와 3.82±0.66, 4.47±0.61, 5.19±0.40 nmole/min/ml로 두 군 모두 시간의 변화에 따른 유의한 차이를 나타내었다. 재관류 직전과 재관류 60분 후에서 대조군과 실험군은 정상군보다 통계적으로 유의하게 높은 PNP 평균값을 보였지만, 대조군과 실험군간의 PNP 평균값은 모든 경우에서 유의한 차이가 없었다(Fig. 2).

3) 간 조직내 MDA와 4HA의 변화

간 조직에서 정상군 MDA와 4HA의 평균값은 129.5±51.4 nmole/g protein이었고, 대조군의 평균값은 340.2±94.0 nmole/g protein으로 정상군에 비해 통계적으로 유의

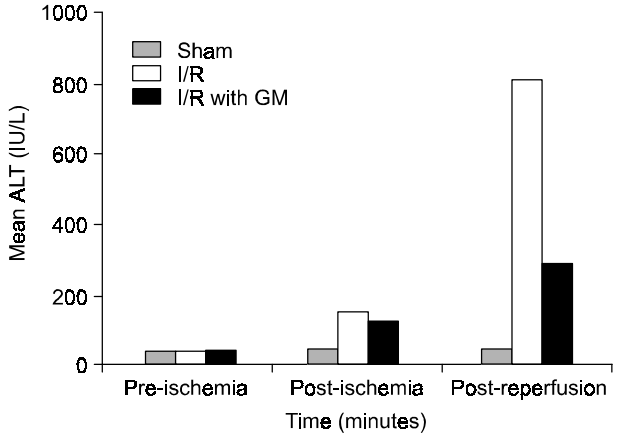

Fig. 1. Mean differences in serum ALT (alanine aminotransferase) levels after 30-minute hepatic ischemia and after 60-minute reperfusion. Sham indicates those animals that underwent laparotomy without hepatic ischemia. At 60 minutes after reperfusion, ALT levels were significantly lower in I/R with GM (ischemia/reperfusion with gabexate mesilate) group than in I/R-only group ($P<0.01$).

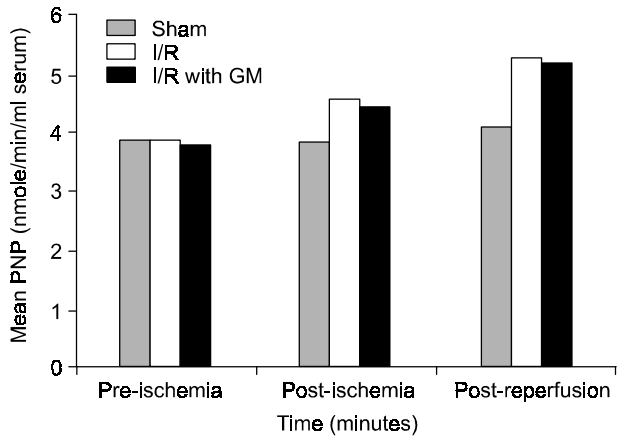

Fig. 2. Mean differences in serum PNP (purine nucleoside phophorylase) levels after 30-minute hepatic ischemia and after 60-minute reperfusion. There were no significant differences between I/R-only group and I/R with GM group ($P>0.05$).

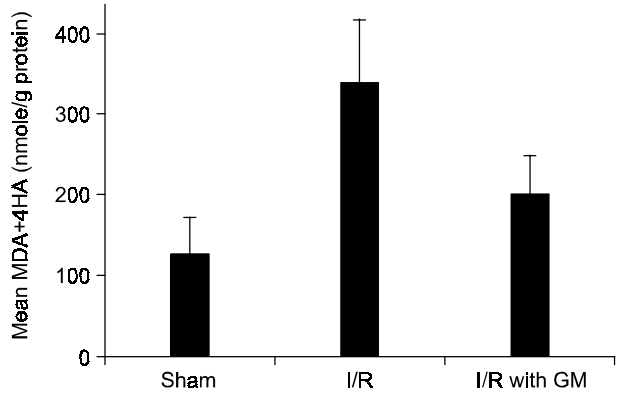

Fig. 3. Hepatic tissue MDA (malondialdehyde)+4HA (4-hydroxyalcenals) levels after 30-minute hepatic ischemia and 60-minute reperfusion. Liver MDA+4HA levels in I/R with GM group were significantly lower than those in I/R-only group ($P<0.05$).

하게 높았다. 실험군 MDA와 4HA의 평균값은 203.7±57.8 nmole/g protein으로 대조군보다 유의하게 낮았다(P=0.03) (Fig. 3).

4) 간 조직내 xanthine oxidase의 변화

간 조직에서 정상군 xanthine oxidase의 평균값은 0.029 ±0.004 μmole/min/mg protein이었으며, 대조군의 평균값은 0.063±0.008 μmole/min/mg protein으로 정상군에 비해 통계적으로 유의하게 높았다. 실험군 xanthine oxidase의 평균값은 0.048±0.004 μmole/min/mg protein으로 대조군보다 유의하게 낮았다(P=0.01)(Fig. 4).

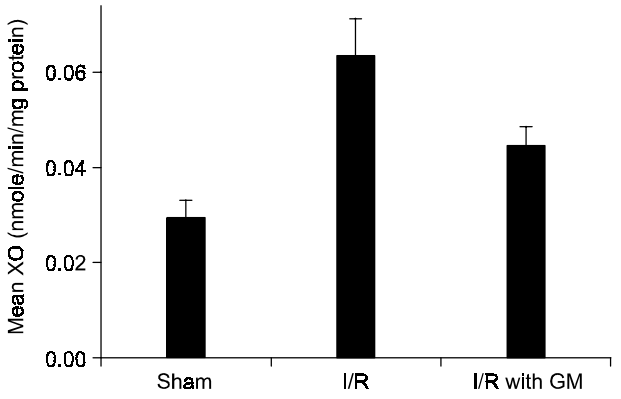

Fig. 4. Hepatic tissue XO (xanthine oxidase) levels after 30-minute hepatic ischemia and 60-minute reperfusion. Liver XO levels in I/R with GM group were significantly lower than those I/R-only group ($P<0.05$).

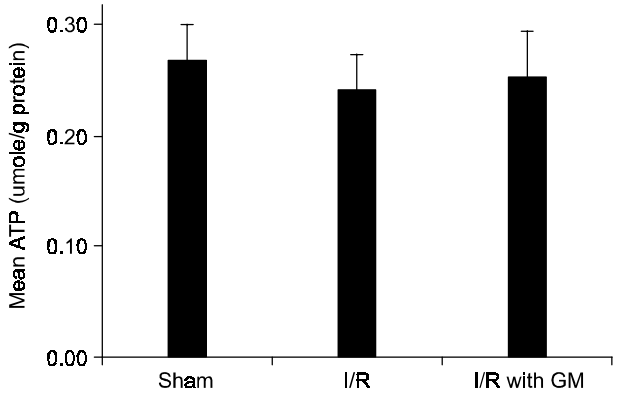

Fig. 5. Hepatic tissue ATP (adenosine triphosphate) levels after 30-minute hepatic ischemia and 60-minute reperfusion. ATP levels showed a higher tendency in I/R with GM group than those in I/R-only group, but they showed no significant differences between the two groups ($P>0.05$).

5) 간 조직내 ATP의 변화

간 조직에서 정상군 ATP의 평균값은 0.267±0.038 μ mole/g protein이었고, 대조군과 실험군의 평균값은 각각 0.241 ±0.038, 0.256±0.047 μmole/g protein으로 정상군과 통계적으로 유의한 차이는 없었다(Fig. 5).

6) 조직 병리학적 소견의 변화

정상군, 대조군, 그리고 실험군의 간 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과 서로간의 조직학적 변화의 차이가 발견되지 않아 비가역적인 허혈-재관류 손상은 일어나지 않았다고 해석하였다.

고 찰

간의 허혈-재관류 손상에 대한 보고들을 보면 동물실험 대상으로 보통 백서를 사용하였지만 본 실험에서는 토끼를 사용하였는데, 그 이유는 토끼가 간 문맥을 완전 차단하여도 잘 견디고, 간정맥이 유입되는 하대정맥을 통하여 혈액을 반복 채취해도 될 만큼 하대정맥의 직경이 크기 때문이다. 또한 2 kg 이하 토끼는 마취 합병증의 빈도가 높고, 5 kg 이상 토끼는 간 문맥 차단에 따른 장울혈의 위험도가 높다는 타 실험자의 경험을 바탕으로 체중 2~5 kg의 토끼를 선택하였다.(*20*) 대부분의 문헌에서는 간 문맥 차단을 통한 허혈 기간을 60분으로 하였는데, 저자들의 예비 실험에서는 60분의 허혈을 유도한 결과 장울혈로 인해 토끼의 희생이 많았고, 허혈 기간을 30분으로 하였을 때 혈청 ALT가 크게 상승되는 것으로 보아 30분의 허혈 기간으로도 허혈-재관류 손상이 유도됨이 확인되어 허혈 기간을 30분으로 선택하였다.

Gabexate mesilate는 현재 임상적으로 췌장염과 파종성 혈관내 응고증의 치료에 사용되고 있는 일종의 단백분해효소 억제제로서,(*13,14*) 비록 동물 실험 단계이지만 간의 허혈-재관류 손상도 방지한다고 알려져 있다. 그 기전에 대해서 지금까지 확실하게 정립된 것은 없지만 gabexate mesilate가 사이토카인, 특히 TNF-α의 생성을 저하시킴으로써 백혈구의 활성화를 억제한다는 주장과 산소유리기의 생성을 억제함으로써 세포 손상을 줄인다는 가설이 가장 인정받고 있다.(*16,17*)

조직은 허혈 상태가 되면 저산소증이 발생하여 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 과정이 저하되기 때문에 ATP 결핍으로 세포 손상이 초래하게 된다. 재관류가 되면 허혈시 세포 손상의 정도에 따라 ATP 재합성이 일어날 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 많은 연구 보고에 의하면 허혈 유도 후 재관류시 ATP의 회복 속도는 조직의 생명력과 실험 동물의 생존을 결정하는 지표로 사용될 수 있다고 하였다.(*21,22*) 저자들의 실험에서는 재관류 60분 후에 ATP를 측정하였는데 30분의 허혈을 유도한 대조군 및 실험군 모두 정상군과 유의한 차이가 관찰되지 않은 것으로 보아, 대조군과 실험군의 간 조직은 재관류 후 ATP 재합성이 정상적으로 회복되었음을 의미한다. 몇몇 보고에 의하면 허혈 기간이 45분 이상이 되어야 ATP의 재합성이 일어나지 않는 비가역적인 손상이 초래한다고 한다.(*10,23*) 본 실험에서는 45분 이하인 30분을 허혈 기간으로 선택하였기 때문에 손상이 가역적이라 재관류 후에 ATP 수치가 정상적으로 회복되었으며, 광학현미경으로 관찰한 병리조직 검사에서도 정상군과 차이가 없었다고 본다. 아마도 허혈 기간이 45분 이하인 경우에는 허혈 기간 동안에 ATP를 측정해야 될 것이며, 허혈 기간이 45분 이상이면 허혈 기간 동안이나 재관류 후 어느 때에 측정하여도 무방할 것으로 사료된다.

PNP는 inosine을 hypoxanthine으로 분해시키는 효소로서 주로 내피세포와 Kupffer 세포의 세포질에 존재한다.(*10,24*) Rao 등(*10*)에 의하면 PNP는 미세혈관 내피세포의 허혈 손상에 대한 유용한 지표일 뿐만 아니라, 재관류 후 간의 기능적 상태를 예견할 수 있는 정보를 제공한다고 하였다. 저자의 실험에서는 30분의 허혈을 유도한 대조군이 정상군에 비해 허혈 및 재관류 후 모두에서 PNP 수치가 유의하게 높았고, gabexate mesilate를 투여한 실험군과 단순히 허혈-재관류만을 유도한 대조군간의 유의한 차이가 관찰되지 않은 것으로 보아 gabexate mesilate가 동모양혈관의 손상을 방지하지 못한다고 추정할 수 있었다. 재관류 60분 후에서 실험군의 ALT가 대조군에 비해 현저하게 저하된 것으로 보아 gabexate mesilate가 간 실질세포의 손상은 억제한다고 볼 수 있다.

지질 과산화는 세포 손상에 대한 잘 알려진 기전으로서, 세포막의 다중불포화 지방산이 과산화되면 MDA와 4HA를 생성하기 때문에 MDA와 4HA를 측정하여 지질 과산화의 지표로 사용해 왔다.(*25*) 산소유리기는 매우 반응성이고 짧은 반감기를 가지고 있기 때문에 산소유리기를 직접 측정한다는 것은 어렵다. 그래서 유리기 제거제(radical scavenger)를 투여하거나,(*26*) gluthathione(*27*) 또는 MDA(*28*)의 측정과 같은 간접적인 방법으로 산소유리기의 존재를 증명해 왔다. 본 실험에서는 MDA와 4HA를 측정함으로써 세포 손상의 정도뿐만 아니라 산소유리기와 허혈-재관류 손상과의 관계를 알아보고자 하였다.

허혈-재관류 손상에서 산소유리기의 생성을 매개하는 효소로는 내피세포의 xanthine oxidase와 백혈구 NADPH oxidase가 있다. Xanthine oxidase는 정상적으로는 간, 폐, 위장관에 xanthine dehydrogenase의 형태로 존재하지만 허혈과 같은 어떤 요인에 의해 xanthine oxidase로 변환된다. allopurinol에 의한 xanthine oxidase의 억제와 N-acetylcysteine에 의한 항산화 치료가 백혈구 축적 및 간세포 손상을 억제하므로, 허혈-재관류 손상의 방아쇠 역할을 하는 산화제는 백혈구가 아닌 내피세포의 xanthine oxidase에 의해 생성된다고 볼 수 있다.(*29*) 또한 조직학적으로도 허혈-재관류 손상이 발생하는 장소가 xanthine oxidase가 존재하는 중심간정맥(central hepatic vein)과 동모양혈관 주위라는 사실은 이를 증명해 준다.(*30*) 백혈구에 의해 초래되는 미세혈관 손상의 중요한 인자는 백혈구 NADPH oxidase 보다도 elastase이다.(*31*)

본 실험에서 간 문맥을 차단한 대조군이 정상군에 비해 MDA+4HA와 xanthine oxidase의 수치가 유의하게 증가한 것으로 보아 대조군에서 허혈-재관류 손상이 유발되었으며 이것은 산소유리기와 밀접한 관계가 있음을 의미한다고 볼 수 있다. Gabexate mesilate를 투여한 실험군이 대조

군에 비해 MDA+4HA와 xanthine oxidase의 수치가 유의하게 감소하였으므로, gabexate mesilate는 산소유리기 생성을 억제하여 허혈-재관류 손상을 줄였다고 볼 수 있다. 그러나 백혈구 NADPH oxidase에 의한 산소유리기 생성 억제를 완전히 배제하고 단지 xanthine oxidase 억제에 의해서만 산소유리기 생성을 억제한다고 볼 수는 없다.

Hisama 등(*32*)은 in vitro에서 gabexate mesilate의 농도가 2.0×10^{-8} M이면 TNF-α의 생성을 억제하고, $10^{-4}\sim10^{-3}$ M이면 백혈구 elastase와 백혈구 산소유리기의 분비를 억제한다고 보고하였다. gabexate mesilate의 반감기가 7초라고 가정했을 때, 본 실험에서 사용된 gabexate mesilate의 농도는 1.7×10^{-6} M이다. 이 농도에서는 백혈구 elastase나 백혈구 산소유리기의 분비를 억제하지는 못했을 것이고, 아마도 TNF-α의 생성을 저하시켰을 것으로 생각되나 TNF-α를 측정하지 않아 증명할 수는 없었다. 그러나 저자들의 실험과 같은 농도로 gabexate mesilate를 사용한 Jung 등(*17*)의 보고에 의하면 gabexate mesilate와 TNF-α와의 관계는 명확하지 않았고 주로 산소유리기를 억제하거나 항산화 효소를 증가시키는 등 산소유리기와 관계가 있다고 하였다. 저자들의 실험에서 사용된 gabexate mesilate의 농도로는 백혈구 산소유리기 생성을 저하시키지 못한다고 했을 때, gabexate mesilate는 xanthine oxidase를 억제함으로써 산소유리기 생성을 저하시켜 간의 허혈-재관류 손상을 줄인다고 볼 수 있다. 그러나 차후 실험에서 TNF-α를 측정하여 TNF-α와 gabexate mesilate와의 관계는 명확하게 규명해야 될 것으로 사료된다.

결 론

지질 과산화의 지표인 MDA와 4HA는 산소유리기의 존재를 간접적으로 알려주는 것으로, gabexate mesilate 투여군에서 MDA와 4HA가 유의하게 감소되어 있는데, 이는 gabexate mesilate가 산소유리기와 밀접한 관계를 가지고 있음을 시사한다. 또한 gabexate mesilate 투여군에서 xanthine oxidase도 유의하게 감소되어 있으므로 gabexate mesilate가 xanthine oxidase에 의한 산소유리기 생성을 억제하여 허혈-재관류 손상을 줄인다고 볼 수 있다.

내피세포 손상의 지표인 PNP와 간 실질세포 손상의 지표인 ALT를 측정했을 때 gabexate mesilate 투여군과 대조군간의 PNP에 있어서 유의한 차이는 없었으나 gabexate mesilate 투여군에서 ALT가 유의하게 감소된 것으로 보아 gabexate mesilate가 동모양혈관의 손상을 방지하지는 못하지만 간 실질세포에 대한 재관류 손상은 예방한다고 판단된다.

재관류 60분 후에 채취한 간 조직으로부터 얻은 ATP와 병리조직 검사에서 실험군 및 대조군 모두 정상군과 차이가 없었는데, 허혈 기간이 45분 이상이 되어야 비가역적인 손상이 발생한다는 타 실험자의 보고와 연관지어 볼 때, 허혈 기간을 30분으로 선택한 저자들의 실험에서는 손상이 가역적으로 발생했기 때문이라고 생각된다.

차후 실험에서는 비가역적인 손상을 유도하기 위해 허혈 기간을 45분 이상으로 하면서, 허혈 기간 증대에 따른 장울혈로 인한 실험 동물의 희생을 줄이기 위해 간 문맥혈관계와 체 혈관계 사이에 우회로를 만들어 주는 모델을 설정해야 할 것이다. 또한 허혈-재관류 손상의 기전으로 주목받고 있는 TNF-α와 IL-1과 같은 사이토카인에 대한 gabexate mesilate의 역할도 밝혀내야 될 것으로 사료된다.

REFERENCES

1) Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. Hepato-Gastroenterology 1999;46:1452-7.
2) Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinanat for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. Am J Pathol 1994; 145:1421-31.
3) Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. Shock 1997;8:80-5.
4) Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. J Clin Invest 1990;85:1936-43
5) Parks DA, Granger DN. Ischemia-reperfusion injury: a radical view. Hepatology 1988;227:832-40.
6) Palma-Vargas JM, Toledo-Pereyra L, Dean RE, Harkema JM, Dixon RA, Kogan TP. Small molecule selectin inhibitor protects against liver inflammatory response after ischemia and reperfusion. J Am Coll Surg 1997;185:365-72.
7) Marubayashi S, Oshiro Y, Maeda T, Fukuma K, Okada K, Hinoi T, et al. Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. Surgery 1997;122:45-52.
8) Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. Surgery 1995;117:195-200.
9) Rubio R, Berne RM. Localization of purine and pyrimidine nucleoside phophorylase in heart, kidney, and liver. Am J Physiol 1980;239:H721-30.
10) Rao PN, Walsh TR, Makowka L, Rubin R, Weber T, Snyder JT, et al. Purine nucleoside phosphorylase: a new marker for free oxygen radical injury to the endothelial cell. Hepatology 1990;11:193-8.
11) Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM. Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. J Cell Biol 1991;

112:749-59.
12) Cross CE. Oxygen radicals and human disease. Ann Int Med 1987;107:526.
13) Messori A, Rampazzo R, Scroccaro G, Olivato R, Bassi C, Falconi M, et al. Effectiveness of gabexate mesilate in acute pancreatitis. Dig Dis Sci 1995;40:734-8.
14) Taenaka N, Shimada Y, Hirata Y, Nishijima MK, Takezawa J, Yoshiya I, et al. Gabexate mesilate (FOY) therapy of disseminated intravascular coagulation due to sepsis. Crit Care Med 1983;11:735-8.
15) Paques E-P, Romisch J. Comparative study on the in vitro effectiveness of antithrombotic agents. Thromb Res 1991; 64:11-21.
16) Harada N, Okajima K, Kushimoto S. Gabexate mesilate, a synthetic protease inhibitor, reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by inhibiting leukocyte activation. Crit Care Med 1999;27:1958-64.
17) Jung SE, Yun IJ, Youn YK, Lee JE, Ha JW, et al. Effect of protease inhibitor on the ischemia-reperfusion injury to the rat liver. J Korean Surg Soc 1998;54:613-20
18) Glantz MD, Lewis AS. Purine nucleoside phosphorylase from rabbit liver. Methods in enzymology. Vol 51. New York: Academic Press; 1978. p.524-30.
19) Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. J Biol Chem 1969;244:3855-63.
20) Eidelman Y, Glat PM, Pachter HL, Cabrera R, Rosenberg C. The effects of topical hypothermia and steroids on ATP levels in an in vivo liver ischemia model. J Trauma 1994;37:677-81.
21) Pontegnie-Istace S, Lambotte L. Liver adenin nucleotide metabolism during hypothermic anoxia and a recovery period of perfusion. J Surg Res 1977;23:339-47.
22) Palombo JN, Pomposelli JJ, Fechner KD, Blackburn GL, Bistrian BR. Enhanced restoration of adenin nucleotides in rat liver following extended preservation of adenosine during reperfusion. Transplantation 1991;51:867-73.
23) LeMasters JJ, Ji S, Thurman RG. Centrilobular injury following hypoxia in isolated perfused rat liver. Science 1981; 213:661-3.
24) Kizaki M, Morris HP, Weber G. Behavior of inosine phophorylase (EC 2-4-2-1) activity in normal, differentiating, and regenerating liver. Cancer Res 1980;40:3339-44.
25) Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Rad Bio Med 1991;11:81-128.
26) Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. Oxygen derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. Surg Gynecol Obstet 1990; 171:120-5.
27) Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. Am J Physiol 1991;260:G355-62.
28) Lambotte L, d'Udekem Y, Amrani M, Taper H. Free radicals and liver ischemia-reperfusion injury. Transplant Proc 1998; 20:977.
29) Ratych RE, Chuknyiska RS, Bulkley GB. The primary localization of free radical generation after anoxia/reoxygeneationin isolated endothelial cells. Surgery 1987;102:122-31.
30) Vickers S, Schiller HJ, Hildreth JEK, Bulkley GB. Immunoaffinity localization of the enzyme xanthine oxidase on the outside surface of the endothelial cell plasma membrane. Surgery 1998;124:551-60.
31) Inauen W, Granger DN, Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ, Kvietys PR. An in vitro model of ischemia/reperfusion-induced microvascular injury. Am J Physiol 1990;259:G134-9.
32) Hisama N, Yamaguchi Y, Okajima K, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, et al. Anticoagulant pretreatment attenuates production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion of rat liver. Dig Dis Sci 1996; 41:1481-6.
33) Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Okabe H, Takatsuki K. Gabexate mesilate, a synthetic protease inhibitor, attenuateds endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting tumor necrosis factor production by monocytes. 1996;24: 1047-53.