

강내 섬유를 이용하여 제작된 뇌경색 백서 모델의 만성기 관찰 양상

차의과학대학교 재활의학교실, ¹서울은평병원 재활의학과

이재혁 · 문자영¹ · 박기철 · 김민영

Establishing Chronic Stroke Rat Models by MCA Occlusion Using Intraluminal Filament

Jae-Hyuk Lee, M.D., Ph.D., Ja-Young Moon, M.D., Ph.D.¹, Ki-Chul Park, M.D., Ph.D. and Min-Young Kim, M.D., Ph.D.

Department of Rehabilitation Medicine, CHA University College of Medicine, ¹Rehabilitation Medicine, Seoul Eunpyeong Hospital

Objective: Focal brain ischemia induced in rats by occlusion of middle cerebral artery (MCA) is a widely used paradigm of human brain infarct. The purpose of this study is to establish chronic stroke model by MCA occlusion using intraluminal filament in rats.

Method: A total 44 rats were operated by modified Longa's method. The surgical procedure consisted of introducing an intraluminal filament into the internal carotid artery and advancing it intracranially to block blood flow for 60 minutes into MCA. After this procedure motor and postural change were assessed using a 0~5 point grading scale consisted of forelimb, hindlimb and circling test. Behavioral tests such as rotarod, stepping and cylinder tests were examined in the survived rats after MCA occlusion up to 14 weeks post-ischemia. Autopsy was done to evaluate the cerebral infarct volume.

Results: Thirteen rats were survived up to 14 weeks post-ischemia and for the severely paralyzed subjects by acute neurological severity scoring were examined with behavioral tests once a week for 14 weeks. Although rotarod test have not shown any specific changes during 14 weeks, stepping and cylinder tests have shown stabilizing pattern since 4 weeks after the procedure.

Conclusion: MCA occlusion using intraluminal filament could be reliable method to make stroke model in rats. We concluded that 4 weeks post-ischemia by this method in rats might be regarded as chronic model. (Brain & NeuroRehabilitation 2011; 4: 35-43)

Key Words: behavioral test, chronic stroke, MCA, model, rat

서 론

2007년 통계연보에 따르면 국내에서 뇌혈관질환의 사망률은 인구 10만 명당 59.6명으로 암에 이어 두 번째 사망원인을 차지하고 있다. 사망률의 문제뿐만 아니라 뇌졸중은 생존한 환자의 약 60% 이상에서 신경학적 손상의 결과로 편마비, 실어증, 연하곤란, 우울증 등의 장애를 남기며, 성인에서 발생하는 후천적 장애의 가장 흔한 원인질환이다.¹

접수일: 2010년 5월 20일, 1차 심사일: 2010년 7월 5일
2차 심사일: 2010년 9월 13일, 3차 심사일: 2010년 10월 7일
게재승인일: 2010년 10월 11일
교신저자: 김민영, 경기도 성남시 분당구 야탑동 351번지
☎ 463-828, 차의과학대학교 분당차병원 재활의학과
Tel: 031-780-1872, Fax: 031-780-5600
E-mail: kmin@cha.ac.kr

본 연구는 2006년도 차의과학대학교수 연구비 지원을 받았음.

환이다.¹

Noone 등의 보고에 따르면 급성기 치료가 종료되고 퇴원한 뇌졸중환자의 6개월 이후의 추적조사에서 42%의 환자가 장애로 인하여 의존적인 생활을 한다. 급성기를 지나 아급성기까지는 재활치료의 효과를 경험하는 경우가 많지만, 신경학적 장애가 고정된 만성기 뇌졸중에서는 손상된 뇌신경 기능의 회복이 어려운 것으로 알려져 있다. 하지만, 그 이후에도 적절한 재활 치료를 할 경우 보행 관련 기능이나 상지의 기능 등이 향상되어³ 삶의 질이 높아진 것으로 보고되었으며, 이의 기전으로 신경가소성이 제시되고 있다.⁴ 따라서, 만성기에도 적절한 재활치료를 하는 것이 뇌졸중 환자의 예후에 매우 중요하다고 할 수 있을 것이다. 이뿐 아니라 최근 대두되고 있는 줄기세포치료는 회복이 어려운 뇌기능 손상에서도 그 효과를 나타낼 것으로 기대되고 있다.

만성 뇌손상에 대한 재활 치료의 효과뿐 아니라 줄기세포 치료 등의 효과를 판정함에 있어서 인간을 대상으로 직접 알아보기 어려운 내용들을 파악하기 위해서는 동물실험이 필요하다. 이제까지 만성 뇌손상 모델은 영장류를 중심으로 제한적으로 연구되어 왔으나, 영장류 모델은 현실적으로 시행하기가 어렵다. 설치류는 실험기간이 길어져도 유지비용이 적게 들고, 뇌의 크기가 작기 때문에 해부 및 정량적인 분석이 용이하며, 기존의 많은 연구로 행동학적 분석 방법 등이 잘 개발되어 있어 영장류를 대신하여 가장 흔히 이용되는 실험대상 소동물이다. 특히 뇌손상 이후의 치료와 재생과정을 파악하기에도 비교적 용이하다는 장점이 있다.⁵

설치류를 이용한 뇌경색모델로서는 사람의 뇌경색 형태와 가장 유사성이 높다고 생각되는 중뇌동맥협착(middle cerebral artery occlusion)이 가장 많이 사용되고 있다.⁶ 이를 위한 모델들은 경동맥 결찰, 화학적 약물주입, 연막혈관 제거, 광화학적 허혈 등의 방법을 사용하여 제작되나 사망률과 뇌경색 병변 크기가 일정하지 않고, 소혈관손상이 동반되거나 뇌경색이 재발하는 등의 단점들을 가지고 있다.⁷

본 연구에서 선택한 방법은 1980년대 후반에 Koizumi 등⁸이 시작하고, Zea Longa 등⁹이 수정한 강내섬유(intraluminal filament)를 이용한 중뇌동맥협착 방법이다. 즉, 단섬유를 내경동맥(internal carotid artery)으로 삽입하여 중뇌동맥의 기시부를 막을 때까지 진입하는데, 전뇌교통동

맥(anterior communicating artery)에서 중뇌동맥으로의 뇌혈류 유입을 막을 수 있다는 장점이 있다.⁷ 또한, 실을 제거하는 간단한 방법으로 재관류가 가능하기 때문에 원하는 시간만큼의 협착을 줄 수 있고, 시술 방법이 덜 위험한 만큼 이후 수일에서 수개월에 걸쳐서까지 실험동물이 생존할 수 있어 신경학적 변화를 측정하기에 적당하므로 널리 사용되고 있는 방법이다(Fig. 1).¹⁰

기존의 연구들은 대부분 급성기 모델을 이용하여 다양한 연구를 진행하였으며, 장기적으로 점차 호전되는 기능의 변화를 관찰한 경우는 드물었다. 또한, 비슷한 정도의 뇌손상을 받은 모델만을 선별하여 연구 결과를 도출해야 하는데 몇몇 그렇지 못한 경우도 있었다. 본 연구에서는 실험동물의 뇌손상을 비슷한 정도로 주기 위해 노력하였다. 그리고, 확인된 결과에 따라 심한 정도의 중뇌동맥경색 모델만을 대상으로 장기적인 기능의 변화를 14주까지 관찰함으로써 만성 뇌경색 모델을 확립하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1) 연구 대상

본 연구는 (주)샘타코바이오와 (주)바이오제노믹스에서 제공받은 250~300 g의 성숙한 수컷 백서 Sprague Dawley 44마리를 대상으로 시행하였다. 모든 대상들은 인위적으로 밤과 낮의 주기를 12시간으로 통일하였으며, 각각의 우리에서 개별적으로 사육하였다. 음식과 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

2) 시술 전 훈련과 행동학적 평가

(1) Rotarod 검사

실험에서 만든 뇌경색 병변이 운동피질과 감각피질 일부를 침범하는 특징이 있으므로 뇌경색에 따른 감각운동 통합능력의 변화를 평가하는 것이 필요하여 Rozas 등¹¹의 방법에 따라 rotarod 검사를 시행하였다. 시술을 하기 1주일 전부터 5 rpm에서 미리 훈련을 함으로써 백서들이 검사에 익숙할 수 있도록 하였다. 뇌경색 후, 실제 검사에서는 rotarod를 8초마다 1 rpm 씩 증가시키면서 백서가 떨어지는 rpm을 체크하였으며(Fig. 2), 세 번을 검사하여 중간값을 선택하였다. 이 과정을 3회 반복하여 평균값을 구하여 결과분석에 이용하였다.

(2) Stepping 검사

1995년에 Olsson 등¹²이 사용한 방법으로 시행하였다. 본격적인 실험을 시행하기 전에 반복적으로 백서의 몸통을 가볍게 움켜쥐어서 백서들이 실험자의 손에 익숙해질 수 있도록 한 뒤, 가로와 세로가 90 cm인 정사각형 테이블

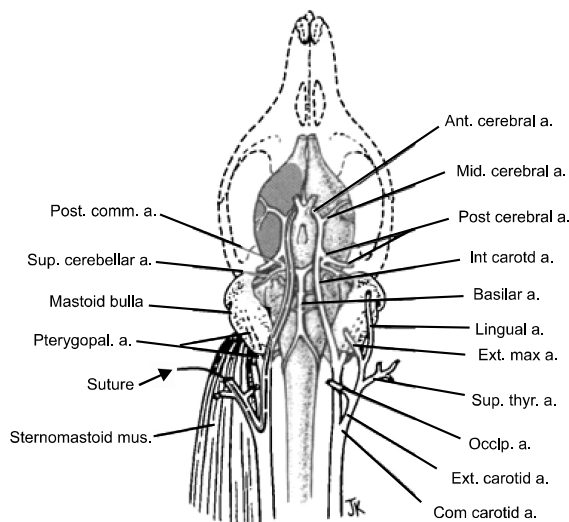


Fig. 1. Middle cerebral artery occlusion procedure using intraluminal filament.⁹ A: artery, Ant: anterior, Com: common, Ext: external, Int: internal, Mid: middle, Mus: muscle, Occip: occipital, Sup: superior, Thyr: thyroid.

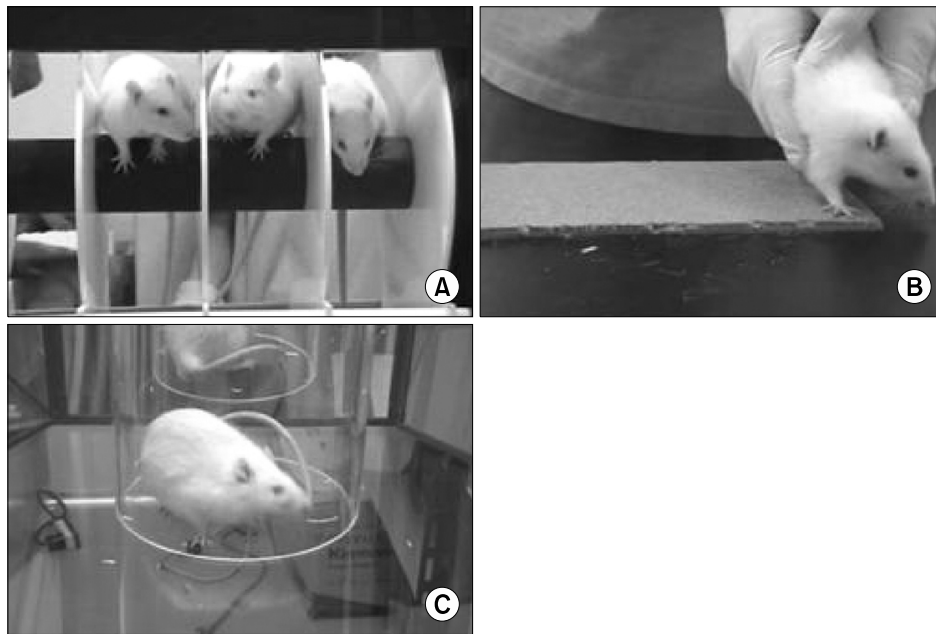


Fig. 2. The behavioral test of middle cerebral artery occlusion rat models. (A) Rotarod test, (B) Stepping test, (C) Cylinder test.

위에 왼쪽과 오른쪽 앞발을 각각 앞쪽 방향과 뒤쪽 방향으로 이동시키는 훈련을 시행하였다(Fig. 2). 뇌경색 이후 검사에서는 먼저 백서의 왼발을 제압하여 고정시킨 뒤에 오른쪽 앞발부터 앞쪽과 뒤쪽 방향으로 움직이게 유도하고 관찰자는 stepping 횟수를 세었고, 끝난 뒤에는 반대로 오른쪽 앞발을 고정시켜 stepping 횟수를 세었다. 이러한 과정을 세 번씩 실행하여 평균값을 낸 뒤에 좌우의 비를 결과 분석에 이용하였다.

(3) Cylinder 검사

Martin 등¹³의 방법에 따라 검사를 시행하였다. 우선 백서를 실린더에 넣고 관찰과 촬영을 시작하고, 백서가 몸을 일으켜서 실린더 벽에 앞발을 짚거나(rearing score) 내려올 때 땅을 딛게 되면(landing score) 왼발 단독 짚기, 오른발 단독 짚기 그리고 양 발 같이 짚기가 일어난 횟수를 측정하였다(Fig. 2). 양 발을 모두 짚은 경우는 왼발 단독 짚기와 오른발 단독 짚기에 한번씩 포함시켰다. Rearing과 landing score를 합친 후 좌우의 비를 결과 분석에 이용하였다. 총 10분 동안 비디오촬영을 하였고, 총 앞발 짚기 횟수가 10회 미만이거나 착지 횟수가 5회 미만일 경우에는 결과값으로 책정하지 않았다. 뇌경색이 발생하기 전에 이미 몇 번의 모의 훈련을 통하여 백서들이 충분히 실린더에 익숙해 질 수 있도록 하였으며, 원활한 검사를 위하여 백서들의 반응이 저조할 때는 행동분석실의 불을 켜다 키거나 백서를 사육시설에 옮겼다가 다시 실린더에 넣는 방식을 사용하였다.

3) 시술방법

시술 대상 모두 시술 전 밤부터 금식 조치를 하였다. 시술 동안에 체온을 37°C로 유지하기 위하여 적외선램프와 온열패드를 이용하였다. 마취약으로 80~100 mg/kg 용량의 ketamine hydrochloride와 5 mg/kg 용량의 acepromazine maleate를 복강내 주사하였다. 전신마취가 유도된 후 수술현미경을 사용하여 전방 중앙경부에 절개를 하여 우측 총경동맥(common carotid artery)을 노출시킨 후에 이 복근(digastric muscle)과 흉쇄유돌근(sternomastoid muscle) 사이에 견인기를 유지하였다. 내경동맥은 조심스럽게 주변의 미주신경(vagus nerve)과 분리시켰다. 다음 단계로 외경동맥(external carotid artery)이 흔들리지 않도록 근위부에 6.0 실크를 살짝 묶어 놓고, 혈관을 뚫을 때의 출혈을 감소시키기 위해서 구부러진 형태의 미세혈관용 클립을 외경동맥 기시부에 인접하여 총경동맥과 내경동맥에 설치하였다. 열을 가하여 끝이 둥글게 만들어진 5 cm 길이의 4.0 단섬유(monofilament)를 외경동맥내로 삽입한 후에 천천히 내경동맥내로 진입시켰다(Fig. 1). 지속적으로 내경동맥 안쪽으로 진입시키면 갑작스럽게 저항이 느껴지고 실이 휘는 순간이 발생하는데, 이는 단섬유의 끝이 중뇌동맥 기시부를 지난 후 직경이 상대적으로 작은 전뇌동맥의 근위부로 진입하면서 발생하는 현상이다. 이론적으로 이 시점에서 단섬유가 내경동맥과 전뇌동맥, 후뇌동맥에서 중뇌동맥으로 유입되는 혈류를 모두 막아버리게 된

다. 시술이 성공적으로 이루어졌다고 판단된 후에 나중에 시행할 재관류를 위해서 1 cm 정도의 단섬유를 남겨놓고 절개부위는 봉합하였다. 단섬유는 60분 동안 유지하도록 하였다. 하지만, 마취가 잘 진행되지 않아 60분을 지속하지 못한 몇몇 경우들이 있었다. 단섬유를 뽑아내어 중뇌동맥 재관류를 시행할 때, 따로 마취를 시행하지는 않았으며, 중뇌동맥 기시부를 지날 때 느껴지는 저항에 주의를 기울이면서 뽑아내었다. 시술 동안 모든 대상들의 생체징후는 주의 깊게 관찰하였으며 시술도중 생체징후가 나빠지면서 사망한 경우도 있었으나 후에 실험대상으로 선정된 대상들은 수술도중 특별한 이상이 발견되지 않았다.

4) 급성기 신경학적 검사와 뇌경색 크기 측정

대뇌동맥협착시술 다음날부터 여러 신경학적 검사를 통해 모델의 형성 정도를 확인하였다. 급성신경학적 검사로 사용된 방법은 David 등¹⁴이 사용한 방법을 약간 변형한 것으로 회전검사(circling test), 앞다리검사(forelimb test) 그리고 뒷다리검사(hindlimb test) 등 세 가지였다. 정상적으로 백서는 보행 중에 회전을 하지 않지만, 뇌경색이 발생한 경우 마비가 발생한 쪽으로 도는 경향이 있다. 오른쪽 중뇌동맥경색이라고 가정하였을 때, 회전검사에서 직선 또는 오른쪽으로 조금만 걸어도 1점을 주었고, 왼쪽으로만 돌면 0점을 주었다. 앞다리검사에서는 앞발을 당겼을 때 2초 이내로 원상 복귀되면 2점을 주었고, 원상 복귀되는 데에 2초 이상이 걸리거나 100% 완전복귀가 되지 않았을 때는 1점을 주었으며, 전혀 반응이 없으면 0점을 주었다. 마지막으로 시행한 뒷다리검사는 뒷발을 잡아 당겼으며 점수 기준은 앞다리검사와 동일하였다. 모든 검

사를 마치고 만점인 5점을 정상으로, 4점을 경한 마비로, 3점 이하를 심한 마비로 분류하였다. 그리고, 장기적인 기능의 변화를 판단하기 이전에 뇌경색의 크기가 급성기 신경학적 평가 결과와 일치하는지를 알아보기 위하여 신경학적 검사 총점 3점과 4점짜리 백서를 해부하여서 뇌경색의 양을 측정된 뒤에 행동학적 손상 정도와 비교하였다.

5) 시술 후 행동학적 변화 재평가

만성모델의 제작여부 확인을 위하여 rotarod 검사, stepping 검사, cylinder 검사의 세 가지 행동학적 검사를 매주 실시하여 그 결과가 좋아지는지, 계속 나빠지는지 혹은 안정화되는지 여부를 조사하였다. 행동학적 검사결과가 변하지 않거나 경미하게 나빠지는 시기를 만성기의 시작점으로 간주하기로 하였으며, 이런 양상이 지속되는지 여부를 시술 후 14주까지 확인하였다.

6) 통계

통계 프로그램은 SPSS 12K를 사용하였다. Rotarod, stepping, cylinder 검사법들에 대하여 제 2주째부터 1주 간격으로 측정한 점수를 비모수 통계의 Kruskal-Wallis H 방법을 사용하여 95% 유의수준으로 검정하였다. 먼저 2주째부터 14주째까지의 행동학적 검사 결과를 비교하고, 2주째의 점수를 제외한 후에 3주째부터 14주까지 비교하는 방식으로 1주씩 전 주의 점수 결과를 제외하면서 반복적으로 검정하였다. 모든 주에서 검사결과와 평균치가 동일하게 나타나면 검정을 중지하였다. 뇌경색 양은 급성기 신경학적 평가 점수에서 3점과 4점을 받은 두 그룹의 평균치를 비교하였으며, 비모수 통계의 Mann-Whitney U 방

Table 1. Acute Neurologic Score and Infarct Volume of Survived Middle Cerebral Occlusion Rat Models

| Animal No. | Occlusion time | Acute test | | | Total score | Infarct Vol. (uml3) |
|------------|----------------|------------|----------|----------|-------------|---------------------|
| | | Circling | Forelimb | Hindlimb | | |
| St131 | 60 min | 1 | 1 | 2 | 4 | 92.51 |
| St133 | 30 min | 1 | 0 | 1 | 2 | 53.56 |
| St135* | 60 min | 1 | 1 | 1 | 3 | 109.64 |
| St137 | 60 min | 1 | 1 | 1 | 3 | 245.39 |
| St138 | 30 min | 1 | 1 | 1 | 3 | 107.39 |
| St140* | 60 min | 1 | 1 | 1 | 3 | 212.19 |
| St142 | 30 min | 1 | 0 | 0 | 1 | 298.62 |
| St159* | 60 min | 1 | 1 | 1 | 3 | 114.91 |
| St160 | 60 min | 1 | 1 | 2 | 4 | 93.23 |
| St165 | 60 min | 1 | 1 | 2 | 4 | 29.46 |
| St167* | 60 min | 1 | 1 | 1 | 3 | 194.08 |
| St168* | 60 min | 1 | 1 | 1 | 3 | 192.13 |
| St169* | 60 min | 1 | 1 | 1 | 3 | 171.22 |

*Survived 3 points rats after MCA occlusion up to 14 weeks post-ischemia.

법을 사용하여 95% 유의수준으로 검정하였다.

결 과

1) 급성기 결과

14주까지 장기적 생존이 가능하였던 백서들은 (주)샘타코바이오의 백서 총 30마리 중 7마리(1점-0마리, 2점-1마리, 3점-5마리, 4점-1마리, 5점-0마리)와, (주)바이오제노믹스의 백서 총 14마리 중 6마리(1점-1마리, 2점-0마리, 3점-3마리, 4점-2마리, 5점-0마리)였다(Table 1). 이들 중 급성 신경학적 검사에서 3점을 받은 경우는 8마리였으며, 이 중 2마리(St138, 139)는 안구파열과 탈수가 발생하여서 도중에 행동학적 분석검사에서 제외되었다. 최종적으로 심한 중뇌동맥 경색이 발생되고 14주간 행동학적 분석검사가 가능하였던 6마리만 연구에 사용되었으며, 이들은

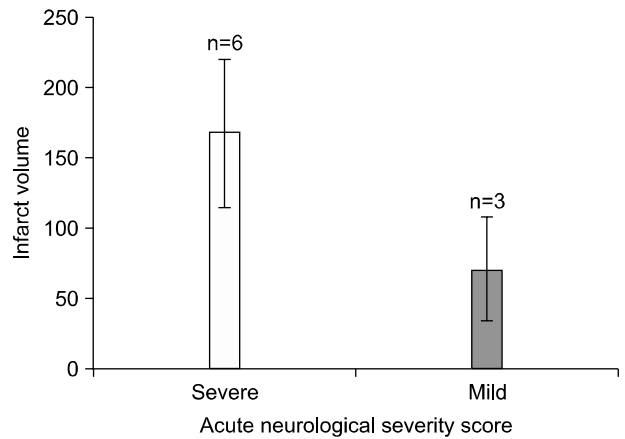


Fig. 3. The relation of acute neurological severity score with infarct volume ($p < 0.05$). Note severe means 3 points middle cerebral artery occlusion rat models and mild means 4 points rat models.

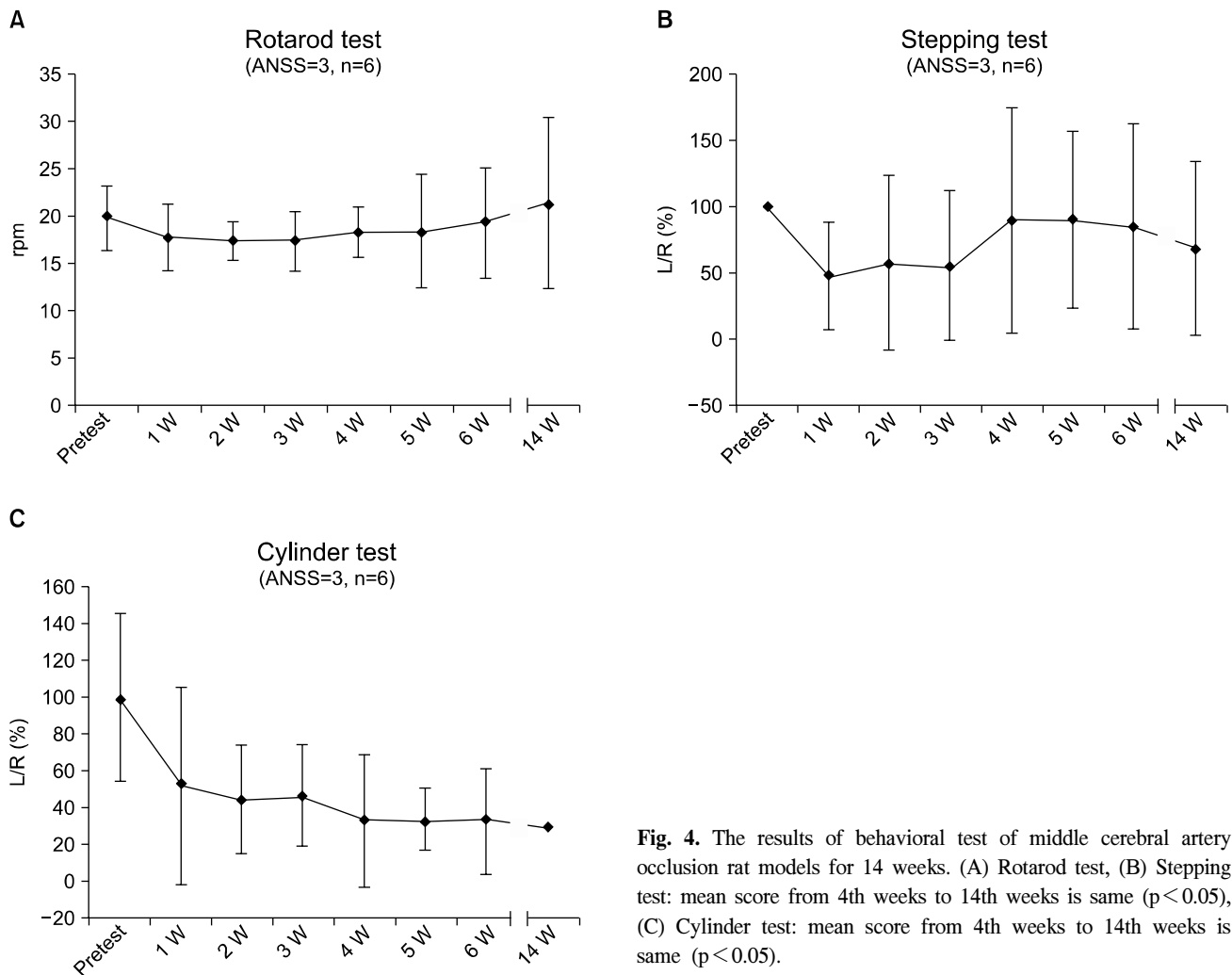


Fig. 4. The results of behavioral test of middle cerebral artery occlusion rat models for 14 weeks. (A) Rotarod test, (B) Stepping test: mean score from 4th weeks to 14th weeks is same ($p < 0.05$), (C) Cylinder test: mean score from 4th weeks to 14th weeks is same ($p < 0.05$).

모두 60분간 중뇌동맥협착이 이루어진 백서였다.

급성기에 신경학적평가 점수와 뇌경색의 크기의 관계를 확인하기 위하여 심한 마비의 3점짜리 백서 6마리와 경한 마비 4점짜리 백서 3마리를 해부하여 뇌경색 양을 측정하였으며, 3점짜리 백서에서 통계적으로 유의하게 뇌경색 양이 증가한 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 3)($p < 0.05$).

2) 장기적 관찰

(1) Rotarod 검사

행동학적 분석검사에서 첫 번째로 시행하였던 rotarod test에서는 14주 동안 큰 변동은 없었다(Fig. 4). 개체별로 체중에 따라서 약간의 차이를 보였는데, 과체중일 경우 더 빨리 떨어지려는 경향을 보이기도 하였다.

(2) Stepping 검사

각 측정간의 편차가 비교적 크게 나타나서 최소 3회 반복하여 평균치를 사용하였다. 측정 결과 기능이 뇌경색 직후에는 저하되었다가 점차 상승하여 4주 이후부터는 큰 변화 없이 고정되는 경향을 나타내었으며, 검사가 끝나는 14주에는 약간의 점수저하가 있었으나 급성기 보다는 향상된 상태로 유지되는 모습을 보였다(Fig. 4). 검정 결과 3주째의 점수를 포함한 경우는 모든 주수의 평균 점수 값이 동일하지 않은 것으로 나타났지만, 4주째부터는 모든 주수의 평균 점수 값이 동일한 것으로 나타났다($p < 0.05$).

(3) Cylinder 검사

마지막으로 시행한 cylinder test는 검사가 진행될수록 동작의 수행 횟수가 점점 줄어드는 양상을 보였으며, 4주가 지나면서부터는 거의 변화가 없는 모습이 관찰되었다(Fig. 4). 마찬가지로 3주째를 제외하고 4주째부터 모든 주수의 평균 점수 값이 동일한 것으로 나타났다($p < 0.05$).

고 찰

사람의 경우 영구적인 중대뇌동맥협착은 잘 발생하지 않기 때문에 백서에서도 일시적인 중대뇌동맥협착 모델을 사용하는 것이 연구에 적합한 방법인 것은 당연하다. 그러나 똑같은 일시적인 중대뇌동맥협착이라도 그 기간에 따라서 신경학적 손상의 정도는 분명히 차이가 있고, 이것은 본 연구에서 알아보려는 뇌경색이 만성화가 되는 시기에도 큰 영향을 주는 인자가 될 수 있다.¹⁵ 한 연구에서는 30분과 120분의 중대뇌동맥협착을 준 두 그룹을 비교한 결과 운동감각 신경의 회복이 일어나는 양상과 시기가 달랐다는 보고를 하기도 하였다.¹⁶ 30분 그룹에서는 이미 1~2주가 경과하는 시점에서 행동학적 분석 검사가 고정화되는 모습을 보였고, 3주째에는 거의 정상으로 돌아

오는 모습을 보여서 본 연구에 사용되기에 적합하지 않다고 생각되었다. 또한, 120분 그룹의 경우에는 확실하게 뇌경색을 유발할 수 있는 장점이 있지만, 사망률이 높고, 3주째에도 운동기능이 변화하는 양상을 보였기 때문에 만성화되기에 너무 오랜 기간이 걸릴 것으로 예상되어 본 연구에서는 둘의 중간 정도로 생각되는 60분을 선택하였다. 결과적으로 비록 사망률은 높기는 하였지만, 중등도 이상의 뇌경색을 85% 정도에서 얻었으며, 4주정도에 안정화되는 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

뇌경색 이후에 백서의 기능적 장애를 평가하기 위한 방법들로 본 연구에서는 rotarod, stepping, cylinder test 세 가지를 선택하였다. Rotarod test는 여러 연구에서 감각운동의 변화를 관찰하는 데에 유용성이 검증되어 있는 방법이다.^{7,12,17} 그러나, 본 연구에서는 다른 두 가지의 기능평가 방법들이 뇌경색 이후에 큰 감소를 보이다가 4주정도부터 안정화되는 양상을 보이는 것과는 달리 rotarod test는 14주 내내 큰 변화가 없는 모습을 보여주어서 큰 의미가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과가 나타난 것은 rotarod test 자체가 뇌경색 후의 변화를 반영하지 못한다고 생각하기보다는 본 연구에서 시행한 방법상의 문제였을 것으로 생각된다. 그 첫 번째 이유로 시술이전에 일주일간 시행한 적응훈련이 완전하게 이루어지지 않았을 것으로 추측된다. 실험에 사용했던 총 6마리의 백서들의 결과를 보면 시술 전에 측정한 값보다 실험이 끝난 14주 후에 측정한 값이 더 좋게 나온 경우가 절반이 넘는 4마리에서 관찰되었다. 실제로 사전에 훈련이 제대로 이루어져서 백서들이 완전하게 적응이 되었다면 훈련이 끝날 때 측정한 것이 거의 최고값을 가지고 뇌경색 직후에 갑자기 떨어졌다가 다시 상승하여 14주째에는 개체의 차이에 따라서 조금씩 다르기는 하겠지만, 대부분 훈련 때의 값보다 작거나 비슷한 양상을 보였을 것이다. Rozas 등¹¹에 의하면 뇌경색 이전에 하는 rotarod 훈련은 크게 두 가지 단계로 나눌 수 있는데, 첫 번째 단계는 test 방법을 백서가 터득할 수 있게 하는 것이고, 두 번째 단계는 습관이 될 정도로 익숙하게 만드는 것이다. 백서가 스스로 연구자의 손에서 검사기구의 막대 위로 올라갈 수 있고, 회전이 끝난 이후에도 자발적으로 머무르게 되었을 때 비로소 익숙해진 것으로 생각할 수 있으며, 이렇게 검사에 익숙해져 있어야 스트레스를 받지 않고, 백서들이 스스로 할 수 있는 정상적인 능력을 보여 줄 수 있다. 본 연구에서는 이러한 익숙해지는 단계가 다소 미흡했던 것으로 생각된다. 두 번째 이유로 본 연구에서 뇌경색 후 rotarod 검사에서 rpm을 1씩 증가시켰었는데, 다른 연구에서는 증가량이 5 rpm 보다 낮은 경우에는 결과의 정확도가 떨어질 수 있다고 보고

하였다.¹² 그러나 이것은 확립된 사실은 아니기 때문에 하나의 가능성 정도로 생각해 볼 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 방법상의 문제가 있다고 생각되는 rotarod test를 제외하고 나머지 stepping test와 cylinder test의 결과들을 가지고 결론을 도출하는 것이 적합하다고 생각된다.

한편, Bouley 등¹⁸은 일관성 있는 결과들을 얻기 위해서는 동물의 종, 나이, 수술시의 혈압, 체온, 혈당, 봉합방법, 실의 삽입부위 등을 잘 조절해야 한다고 보고하였다. 하지만, 이러한 인자들을 일정하게 잘 조절했다고 하더라도 뇌경색의 크기나 뇌혈류량의 감소 정도를 항상 일정하게 만들 수 있는 것은 아니다. 그 원인으로 생각되는 것은 바로 백서의 중뇌동맥의 기시부에 해부학적 변이가 많은 경우에서 발견되는 것과 관련된다. 백서의 경우 사람에서처럼 내측경동맥에서 단순히 중대뇌동맥과 전대뇌동맥으로 분리되는 경우가 대부분을 차지하고 있지 않으며, 내측경동맥에서 두 개의 혈관이 분지되었다가 하나로 합쳐지면서 중대뇌동맥을 만드는 경우나 내측경동맥에서 결가지동맥이 중대뇌동맥에 연결되는 경우 등과 같은 해부학적 변이가 오히려 더 많은 것으로 보고되기도 한다.¹⁹ 해부학적 변이가 있는 경우 Longa 등의 방법에서처럼 실의 동근 끝으로 중대뇌동맥 기시부를 확실하게 막는다 하더라도 실과 혈관의 틈새로 결가지 동맥 등을 통하여 중대뇌동맥에 혈류가 공급되어 협착이 원하는 만큼 발생하지 않을 수 있다. 실제로 중대뇌동맥협착의 성공률은 대부분의 연구에서 약 60% 정도로 보고하고 있다.¹⁸ 이러한 단점을 막기 위해 최근에는 섬유에 실리콘을 입히는 방법이 개발되었고, 이 방법을 사용했을 때 중대뇌동맥의 성공률은 90% 정도이며, 뇌경색의 병변 크기도 훨씬 더 일관성 있게 유지되었다는 것이 보고되고 있기도 하다.^{18,20} 이번 실험에서는 실리콘을 입힌 섬유를 사용하지 못하였기 때문에 아쉬움이 있으나 향후 이 방법을 사용한다면 중대뇌동맥협착의 성공률과 일관성을 더 높일 수 있을 것으로 기대된다.

뇌경색 병변을 만드는 방법에 따라 다르기는 하지만, 수술 이후에 백서의 생존율은 높게 보고한 것은 100%까지 있었고, 대부분 80% 이상을 보고하였다.^{7,9,19} 그러나, 기존의 연구들은 협착시간을 30분에서 60분으로 설정하였고, 4주 이내에 실험을 종료한 경우가 대부분을 차지하고 있다. 본 연구의 경우 해부에 사용된 백서를 제외하고 실험에 사용된 총 35마리의 백서 중에서 14주까지 생존한 것은 14마리로 40%의 생존율을 보였다. 다른 연구들에 비해서 본 연구에서 생존율이 더 떨어진 것에 대한 첫 번째 원인으로 뇌경색을 만들 때 Longa 등이 사용한 방법으로

강내섬유를 이용하여 중대뇌동맥협착을 유발한 것이 그 이유가 될 수 있다. Longa의 방법은 중대뇌동맥협착 성공률이 60% 정도로 보고되었기 때문에 본 저자들은 확실한 뇌경색 병변을 만들기 위해서 시술의 강도와 시간을 늘렸던 것이 백서의 낮은 생존율에 영향을 미친 것으로 생각된다. 실제로 대부분 수술 후 발생한 지주막하출혈이 사망의 원인이었고, 저체온증, 마취제 부작용, 전신상태의 저하 등의 수술 후유증도 사망의 원인으로 작용하였다. 비록 생존율은 낮았지만 살아남은 14마리의 백서를 대상으로 급성기에 신경학적 검사에서 12마리가 중증에 해당하는 결과를 보여서 85%의 확률로 비교적 확실한 뇌경색 모델을 얻을 수 있었다. 뇌경색을 증명하기 위해 MRI 같은 방사선학적 검사를 시행하지는 않았지만, 해부를 시행하였을 때 허혈성 뇌경색 병변을 관찰할 수 있었다. 저조한 생존율에 대한 두 번째 원인으로 생각할 수 있는 것이 본 연구는 뇌경색 이후 14주까지 백서를 생존시키면서 진행하였다는 점이다. 기존의 연구들은 대부분 뇌경색 이후 급성기의 백서를 대상으로 하였거나 길게 관찰을 하였어도 4주를 넘는 경우가 거의 없었다.^{15,16} 하지만, 본 연구에서 경험하기로 4주 이후에도 전반적인 전신상태의 저하, 연하곤란, 폐기능 저하 등에 의해 백서의 사망이 지속적으로 발생하였고 결과적으로 전체적인 백서의 생존율을 떨어뜨리게 되었다. 이는 본 연구에서 의도한대로 만성 뇌경색 모델이 만들어지는 시점을 알기 위해서는 반드시 장기간 관찰을 해야 하는 상황에서 발생한 어쩔 수 없는 부작용이라 할 수 있다. 그러나, 85%의 높은 비율로 중증 뇌경색 모델을 만들었고, 14주 동안 장기적으로 추적관찰을 할 수 있었던 것은 기존의 연구들이 갖지 못한 장점으로 생각할 수 있을 것이다.

본 연구에서 아쉬운 부분들이 몇 가지 이미 언급되었으나 다른 무엇보다도 분석에 사용된 기능평가 방법의 종류가 너무 적었던 것이 가장 미흡한 점이라고 할 수 있다. 여기에서 사용한 방법 이외에도 single pellet reaching task나 tray reaching task, rotation test, staircase test, sticky label test처럼 간단한 검사 기구를 사용하여 객관화된 점수를 측정하여 평가할 수 있는 장점을 가진 검사들이 여러 연구에서 보고되었다.^{7,19,20-22} 따라서, 추후 좀 더 신뢰도 높은 연구를 위해서는 행동학적 분석방법을 보다 다원화시켜 객관적인 신뢰도를 향상시키는 것이 필요할 것으로 생각된다.

결론

본 저자들은 만성 뇌경색 백서 모델을 제작하기 위해

이 연구를 진행하였고, 몇 가지 결과를 얻었다. 첫번째로 내강섬유를 이용한 중대뇌동맥협착 시술 시 협착 시간을 60분간만 적용해도 대부분에서 중증의 중대뇌동맥 경색을 유발할 수 있었다. 두 번째로 본 연구에서 시행한 조건 하에서 뇌경색이 만성기에 접어드는 시기는 뇌경색 유발 후 4주 정도임을 알 수 있었다. 세 번째로 본 연구에서 시행한 급성 신경학적 검사와 행동분석 검사 등이 만성 뇌경색 백서 모델에서 사용하기에 적합하지만, 정확한 결과를 위해서는 충분한 모의훈련과 좀 더 다양한 검사를 추가하여 신뢰도를 높이는 것이 필요하다는 것을 알 수 있었다.

줄기세포와 성장인자 등을 이용한 치료가 뇌경색에 대한 재활치료에서 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되고 있는 가운데, 최근에는 동물에서 성장인자나 줄기세포 치료 등을 사용하였을 때 효과가 있음을 많은 경우에서 보고하고 있고, 특히 뇌경색 만성기에 접어든 동물에서도 효과가 있다는 것 또한 보고되고 있다.^{23,24} 그러나 아직은 이러한 연구들의 결과가 사람에게 일률적으로 적용되기에는 부족한 점들이 많이 있기 때문에, 충분한 동물실험이 선행되어야 하고, 이를 위해서는 적합한 만성 뇌경색 모델의 제작이 필수적이라 할 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 차의과학대학교수 연구비 지원으로 시행되었으며, 특히 백서 실험에 많은 도움을 주신 차의과학대학교 의생명과학과 송지환 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Werner RA, Kessler S. Effectiveness of an intensive outpatient rehabilitation program for postacute stroke patients. *Am J Phys Med Rehabil.* 1996;75:114-120
- 2) Noone I, Fan CW, Tarrant H, O'Keeffe S, McDonnell R, Crowe M. What happens to stroke patients after hospital discharge. *Ir Med J.* 2001;94:151-152
- 3) Ivey FM, Hafer-Macko CE, Macko RF. Task-oriented treadmill exercise training in chronic hemiparetic stroke. *J Rehabil Res Dev.* 2008;45:249-260
- 4) Cauraugh JH, Summers JJ. Neural plasticity and bilateral movements: A rehabilitation approach for chronic stroke. *Prog Neurobiol.* 2005;75:309-320
- 5) Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J.* 2003;44:85-95
- 6) Garcia JH. Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke.* 1984;15:5-14
- 7) Kim HS, Shin YI, Kim HI, Moon SK, Lee S, Moon BS, Lee M. Relevance of behavioral test in the photothrombotic stroke rat model. *J Korean Acad Rehab Med.* 2006;30:135-141
- 8) Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke.* 1986;8:1-8
- 9) Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 1989;20:84-91
- 10) Devries AC, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci Biobehav Rev.* 2001;25:325-342
- 11) Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL. An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res.* 1997;2:75-84
- 12) Olsson M, Nikkhah G, Bentlage C, Bjorklund A. Forelimb akinesia in the rat parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci.* 1995;15:3863-3875
- 13) Woodlee MT, Asseo-Garcia AM, Zhao X, Liu SJ, Jones TA, Schallert T. Testing forelimb placing "across the midline" reveals distinct, lesion-dependent patterns of recovery in rats. *Exp Neurol.* 2005;191:310-317
- 14) Petullo D, Masonic K, Lincoln C, Wibberley L, Teliska M, Yao DL. Model development and behavioral assessment of focal cerebral ischemia in rats. *Life Sci.* 1999;64:1099-1108
- 15) Ding Y, Zhou Y, Lai Q, Li J, Park H, Diaz FG. Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion. *Behav Brain Res.* 2002;132:29-36
- 16) Zhang L, Chen J, Li Y, Zhang ZG, Chopp M. Quantitative measurement of motor and somatosensory impairments after mild (30 min) and severe (2 h) transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurol Sci.* 2000;174:141-146
- 17) Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, Parsons AA. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology.* 2000;39:806-816
- 18) Bouley J, Fisher M, Henniger N. Comparison between coated vs. uncoated suture middle cerebral artery occlusion in the rat as assessed by perfusion/diffusion weighted imaging. *Neurosci Lett.* 2007;412:186-190
- 19) Ardehali MR, Rondouin G. Microsurgical intraluminal middle cerebral artery occlusion model in rodents. *Acta Neurol Scand.* 2003;107:267-275
- 20) Zhao H, Mayhan WG, Sun H. A modified suture technique produces consistent cerebral infarction in rats. *Brain Res.* 2008;1246:158-166
- 21) Ballermann M, Metz GAS, McKenna JE, Klassen F, Whishaw IQ. The pasta matrix reaching task. a simple test for measuring skilled reaching distance, direction, and dexterity in rats. *J Neurosci Methods.* 2001;106:39-45
- 22) Gharbawie OA, Gonzalez CLR, Whishaw IQ. Skilled reaching impairment from the lateral frontal cortex component of

- middle cerebral artery stroke: a qualitative and quantitative comparison to focal motor cortex lesions in rat. *Behav Brain Res.* 2005;156:125-137
- 23) Zhao LR, Berra HH, Duan WM, Singhal S, Mehta J, Apkarian AV, Kessler JA. Beneficial effects of hematopoietic growth factor therapy in chronic ischemic stroke in rats. *Stroke.* 2007;38:2804-2811
- 24) Guerra-Crespo M, Gleason D, Sistos A, Toosky T, Solaroqlu I, Zhang JH, Brvant PJ, Fallon JH. Transforming growth factor-alpha induces neurogenesis and behavioral improvement in a chronic stroke model. *Neurosci.* 2009;160:470-483