

Ektacytometer를 이용한 *tert*-Butyl Hydroperoxide, Verapamil 및 Ascorbate 처리 적혈구의 혈액유변학적 변형능 측정

김동현¹ · 김유경¹ · 원동일¹ · 신세현² · 서장수¹

경북대학교 의과대학 임상병리학교실¹, 고려대학교 공과대학 기계공학과²

Assessment of Hemorheological Deformability of Human Red Cells Exposed to *tert*-Butyl Hydroperoxide, Verapamil and Ascorbate by Ektacytometer

Dong Hyun Kim, M.S.¹, Yu Kyung Kim, M.D.¹, Dong Il Won, M.D.¹, Sehyun Shin, Ph.D.², and Jang Soo Suh, M.D.¹

Department of Clinical Pathology¹, School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu; Department of Mechanical Engineering², School of Engineering, Korea University, Seoul, Korea

Background : Normal erythrocyte is deformable and this facilitates blood flow in the capillaries. Oxidative stress reduces the deformability of erythrocytes, and influences on blood flow in microcirculation. The objective of this study was to investigate the deformability of erythrocytes exposed to oxidative stress, the protective effects of verapamil and ascorbic acid against oxidative damages in erythrocytes, and the value of the microfluidic ektacytometer, RheoScan-D (RheoMeditech, Korea) in clinical application.

Methods : Effects of oxidative stress on erythrocytes were investigated using *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP). Before exposure to tBHP, the erythrocytes were pretreated with verapamil and ascorbic acid to examine their protective effect against oxidative damages. The deformability of erythrocytes was measured by the microfluidic ektacytometer, RheoScan-D.

Results : When treated with tBHP, the deformability of erythrocytes was decreased ($P<0.01$) and methemoglobin (methHb) formation and mean corpuscular volume (MCV) of erythrocytes were increased ($P<0.01$, $P<0.05$) compared to those of the untreated control cells. Compared to the tBHP treated cells, pretreatment with verapamil increased the deformability of erythrocytes ($P<0.01$) and decreased methHb formation ($P<0.01$) and MCV ($P<0.05$). Likewise, pretreatment with ascorbic acid increased the deformability of erythrocytes ($P<0.01$) and decreased methHb formation ($P<0.01$).

Conclusions : Oxidative stress reduces the deformability of erythrocytes and the deformability could be one of markers for oxidative damage. Verapamil and ascorbic acid have protective role against tBHP induced oxidative stress. The ektacytometer, RheoScan-D used in this study is convenient for clinical measurement and could be used in various fields of clinical medicine. (*Korean J Lab Med* 2008;28:325-31)

Key Words : *tert*-butyl hydroperoxide, Erythrocyte deformability, Ektacytometer

접 수 : 2008년 3월 19일 접수번호 : KJLM2122
수정본접수 : 2008년 6월 13일
게재승인일 : 2008년 7월 21일
교신저자 : 서 장 수
우 700-721 대구광역시 중구 삼덕동 2가 50
경북대학교병원 진단검사의학과
전화 : 053-420-5293, Fax : 053-426-3367
E-mail : suhjs@knu.ac.kr

*본 논문은 2007년도 정부(과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. ROA-2003-000-10306-0).

서 론

인체의 주요 장기와 조직들은 혈관 내 혈액의 흐름을 통하여 필요한 생명력을 유지하고 있다. 이러한 생명 현상에서 적혈구

는 가장 중요한 역할을 담당하고 있는데 장기와 조직에서 필요한 산소를 가져다주고, 여러 대사과정을 거쳐 만들어진 이산화탄소를 배출하는 일을 한다. 한편, 적혈구는 형태학적으로 6-8 μm 의 직경을 가진 중심이 파여 있는 원반모양을 취하고 있고 가변성이 뛰어나 장기와 조직 내에 분포된 3-5 μm 직경의 모세혈관 내부로도 쉽게 이동을 할 수 있다. 이러한 적혈구의 가변정도는 적혈구 변형능으로 표시할 수 있으며 인체의 생명현상을 유지하는 혈액유변학적 특성의 하나가 된다[1].

인체가 생명현상을 유지하는 데 있어 신진대사는 필수불가결하며 어느 정도의 산화화합물은 혈액 내로 배출이 되고 있다. 일반적으로 체내 신진대사의 결과물로 배출되는 산화화합물의 대부분은 적혈구 내부에 존재하는 환원효소들에 의해 무해한 상태로 변환되지만 산화 스트레스로 인하여 과도하게 배출되는 경우나 외부에서의 과도한 주입은 일차적으로 적혈구에 큰 손상을 주게 된다[2]. 적혈구의 대부분을 차지하고 있는 헤모글로빈(hemoglobin, Hb)은 산화화합물을 만나게 되면 메트헤모글로빈(methemoglobin, MetHb)을 형성하고 헤미크롬(hemichromes, HCRs)이라는 색소덩어리로 분해되는데 이들이 적혈구 막에 결합한 것이 하인즈 소체(Heinz body)이다. 하인즈 소체가 결합된 적혈구 막은 세포 내 칼륨의 유출을 촉진시키고 지질의 과산화작용과 막 단백질의 불안정을 초래하면서 적혈구의 변형능을 떨어뜨리게 된다. 변형능이 떨어진 적혈구는 모세혈관으로의 흐름이 힘들어지게 되고 결과적으로 장기와 조직에의 산소공급에 지장을 초래하여 허혈성질환의 원인이 될 수 있다. 최근 허혈성 심혈관질환이나 뇌혈관질환의 원인으로 적혈구 변형능과 같은 혈액유변학적 특성들이 연구되는 것은 위에서 설명한 기전들이 중요한 가설이 되고 있다[3-5].

허혈성질환과 혈관 및 혈구의 상호관련 연구는 그 동안 전혈이나 혈장의 점도에 대한 실험이 대부분이었으나 최근 적혈구 자체의 물리적 특성인 변형능이나 응집능을 직접 측정할 수 있게 되면서 혈액유변학이라는 새로운 학문 영역을 만들게 되었다[6, 7]. 또한 이들 특성을 약간의 혈액을 이용하여 간편하게 측정할 수 있는 장비들이 개발되면서 임상예의 응용이 가능하게 되어 과거에 잘 설명이 되지 않았던 심혈관질환의 기전에 대한 마지막 퍼즐을 맞추는 작업이 이루어지고 있다[8-12].

산화 스트레스와 허혈성질환의 연관 연구에서 가장 많이 연구된 부분은 반응성 산소화합물에 대한 연구들로 주로 적혈구 막에 존재하는 지질의 과산화작용을 유도하는 실험들이었다. 이 실험들에서 인위적으로 지질의 과산화작용을 유도하는 물질로 유기성 유리라디칼인 *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP)가 가장 많이 사용되고 있는데, 지금도 산화 스트레스와 적혈구 막의 생화

학적 변화 연구에 많이 이용되고 있다[13-19].

본 연구의 목적은 tBHP로 유도된 산화 스트레스가 혈액유변학적 특성인 적혈구의 변형능에 미치는 영향을 알아보는 것이다. 그리고 혈액학적인 변화와 형태학적인 변화도 함께 관찰하여, 이것들이 혈액유변학적인 변화와 일치하는지에 대해 알아보고자 하였다. 또한 환원성 물질인 verapamil과 ascorbic acid를 통해 적혈구의 혈액유변학적인 변화를 예방할 수 있는지에 관하여 실험하였다. 마지막으로 실험실에서 자체 개발한 ektacytometer를 이용한 적혈구 변형능 검사의 임상적 응용 가능성에 대하여 검토하여 보았다.

재료 및 방법

1. 적혈구 부유액 준비

연구내용에 동의하는 20-30대의 건강한 남성 13명으로부터 실험동의서를 받고 정맥혈을 채취하였다. 실험대상자의 혈장이 적혈구 변형능에 미치는 영향을 제거하기 위하여 항응고제로 EDTA를 처리한 전혈을 1,300×g에서 10분 동안 원심분리를 한 후, 상층부에 위치한 혈장, 백혈구 그리고 혈소판을 버리고 적혈구를 PBS 완충용액에 부유시켰다. 그리고 1,600×g에서 원심분리를 하면서 세 차례의 세척과정을 거친 다음, 마지막으로 세척한 적혈구를 최종농도 50%가 되도록 phosphate-buffered saline (PBS) 완충용액에 부유시켜 실험에 이용하였다.

2. 실험장비 및 시약

적혈구의 변형능을 측정하기 위하여 레이저 회절방식으로 변형능을 측정할 수 있는 ektacytometer로 Rheoscan-D (Rheo-Mediatech, 서울, 대한민국) (Fig. 1)를 사용하였다. 이 장비는 넓은 범위의 전단응력(shear stress, 0-30 Pa)에서 적혈구의 변형능을 측정할 수 있는데, 측정값은 연장지수(elongation index, EI)로 표현된다(Fig. 2, 3) [12].

시약으로는 적혈구에 산화 스트레스를 유발시키는 물질로 tBHP를 사용하였고 환원제로 verapamil과 ascorbic acid를 사용하였다. MetHb 측정을 위하여 disodium hydrogen phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), aqueous sodium cyanide, aqueous potassium ferricyanide를 사용하였으며 모든 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다.

3. 혈액유변학적 분석

1) tBHP 산화성 물질 처리

PBS 완충용액에 부유된 적혈구에 tBHP (최종농도 0.4 mM)를 첨가하고, 37°C에서 90분 동안 방치한 후 적혈구 변형능을 측정하였다[17].

2) Verapamil, ascorbic acid 등 환원성 물질 처리

실험 목적에 따라 tBHP가 처리되기 전에 verapamil (최종농도 0.1 μ M) 또는 ascorbic acid (최종농도 1 mM)를 먼저 처리하고 30분 동안 방치하였다가 적혈구 변형능을 측정하였다[17].

3) 적혈구 변형능 측정

Rheoscan-D를 이용하여 전 처리를 하지 않은 대조군과, tBHP 처리군, verapamil+tBHP 처리군, ascorbic acid+tBHP 처리군에서 각각 적혈구 변형능을 측정하였다. 측정시작과 동시에 진공생성기(vacuum generator)에 의해 압력이 가해지고 시간이 지나면서 점차 압력이 줄어드는데 그에 따른 적혈구 모양의 변화를 카메라로 분석하는 원리를 사용하였다(Fig. 1). Rheoscan-D는 전단응력 0-30 Pa 범위에서 EI의 값을 모두 구할

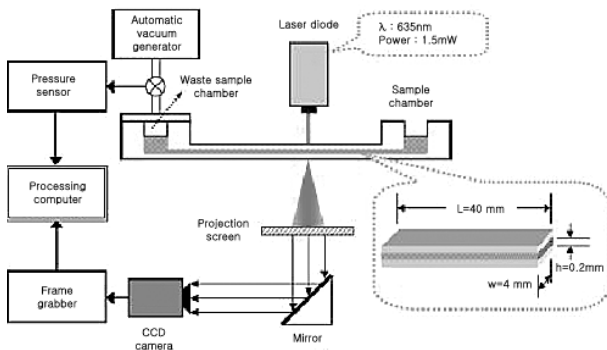


Fig. 1. Schematic diagram of RheoScan-D ektacytometer.

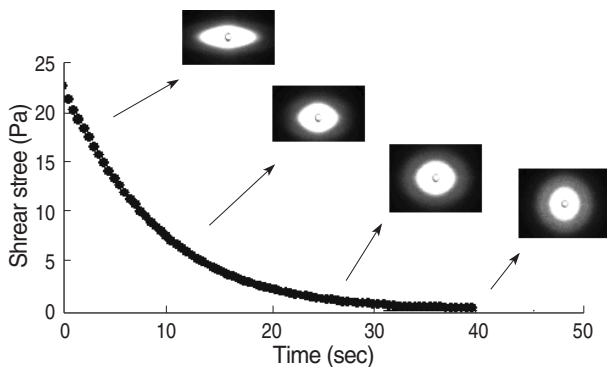


Fig. 2. Changes in red blood cell images as differential pressure.

수 있지만(Fig. 2, 3) 선행 연구 결과 3 Pa의 전단응력에서 정상 적혈구와 비정상적혈구 간의 적혈구 변형능 차이를 확실하게 나타내어 본 연구에서도 연장지수는 3 Pa의 전단응력에서 측정하였다[12].

4. 혈액학적 분석

1) 평균적혈구용적 측정

자동혈액분석기(ADVIA 2120 Hematology System, Bayer-HealthCare, Tarrytown, NY, USA)를 이용하여 대조군, tBHP 처리군, verapamil+BHP 처리군 및 ascorbic acid+tBHP 처리군의 평균적혈구용적을 측정하였다.

2) MethHb 측정

MetHb의 측정은 분광광도계를 사용하여 대조군, tBHP 처리군, verapamil+tBHP 처리군 및 ascorbic acid+tBHP 처리군에서 시행하였으며 모든 실험은 실온에서 실시하였다. 혈액을 인산완충용액으로 희석시키고 Triton X-100으로 완전 용해시킨 후, 630 nm에서 1차 흡광도(OD NO.1)를 측정하였다. 그리고 potassium cyanide 첨가한 후 630 nm에서 2차 흡광도(OD NO.2)를 측정하였다. 마지막으로 potassium ferricyanide와 potassium cyanide를 첨가한 후 530 nm에서 3차 흡광도(OD NO.3)를 측정하여 다음의 공식으로 산출하였다[20].

$$\frac{\text{OD NO.1} - \text{OD NO.2}}{\text{OD NO.3}} \times 100 = \text{Met Hb (\%)}$$

3) 말초혈액도말을 이용한 적혈구의 형태학적 변화 관찰

대조군, tBHP 처리군, verapamil+tBHP 처리군 및 ascorbic acid+tBHP 처리군 등 4가지 군에서 말초혈액도말을 만들어 Wright 염색을 실시한 후 광학현미경을 이용하여 적혈구의 형태학적 변화를 관찰하였다.

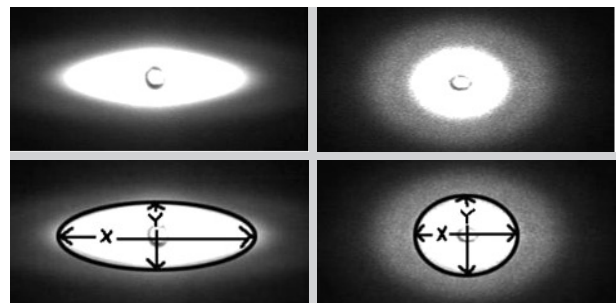


Fig. 3. Changes in red blood cell images as 20 Pa (left), 0.3 Pa (right) and EI (=X-Y/X+Y). Abbreviation: EI, elongation index.

5. 통계학적 분석

Wilcoxon signed rank test를 이용하여 각 군 간의 평균값을 비교하였으며 P 값이 0.05 미만인 경우를 통계학적 유의 수준으로 판정하였다.

결 과

1. 적혈구의 혈액유변학적 변형능 변화

적혈구의 변형능의 평균값은 대조군 0.3077에 비하여 tBHP 처리군은 0.1915로 유의하게 감소하였으며 tBHP 처리에 앞서 verapamil과 ascorbic acid를 전 처리한 경우에는 각각 0.3027과 0.3110으로 정상화되었다(Table 1).

2. 적혈구의 혈액학적 변화

1) 평균적혈구용적

평균적혈구용적의 평균값은 대조군 86.25에 비하여 tBHP 처리군은 88.55로 유의하게 증가하였으며 tBHP 처리에 앞서 verapamil과 ascorbic acid를 전 처리한 경우에는 각각 85.55와 88.54로 verapamil은 회복되었으나 ascorbic acid에서는 변화가 없었다(Table 2).

2) MetHb

MetHb의 평균값은 대조군 4.16에 비하여 tBHP 처리군은 43.45로 유의하게 증가하였으며 tBHP 처리에 앞서 verapamil과 ascorbic acid를 전 처리한 경우에는 각각 3.64와 3.57로 회복되었다(Table 2).

3) 적혈구의 형태학적 변화

적혈구의 모양은 대조군에서 정구성 정색소성 적혈구를 나타내었으나 tBHP를 처리한 군은 돌기세포, 물집세포 등 변형적

혈구들이 일부 관찰되었으나 임상적인 의미를 부여할 수준은 아니었다. 한편 tBHP 처리에 앞서 verapamil과 ascorbic acid를 전 처리한 경우에는 대조군에서와 같이 정구성 정색소성 적혈구를 보여주었다.

고 찰

산소 유리라디칼을 발생시키는 몇 가지의 산화제 중에서 tBHP는 가장 안정하고, 널리 사용되는 대표적인 산화화합물이다[13-16]. tBHP의 적혈구 막에 대한 생화학적 작용은 세포막 지질의 과산화작용과 막 단백질의 상호연결로 인한 불안정화, 인지질 유사물질의 작용 증대 등에 의하여 세포막의 정상적인 기능을 떨어뜨려 세포 내 이온의 유출과 함께 적혈구의 변형을 초래하고 심한 경우 적혈구 용혈로 이어지게 된다[13-16]. tBHP의 작용 기전은 적혈구가 심각한 산화 스트레스를 받았을 때 나타나는 이상 소견들과 흡사하여 적혈구의 산화 스트레스에 의한 변화 연구에 많이 이용되고 있다[13-16]. 본 연구 결과에서도 tBHP를 처리한 적혈구에서 헤모글로빈의 산화로 인한 metHb이 과도하게 나타나 다른 연구 결과들과 유사하였다.

정상적인 적혈구는 장기와 조직에 산소를 운반하고 이산화탄소를 배출하는 자신의 역할을 원활하게 수행하기 위하여 끊임없이 자신의 모양을 변환시키고 있는데 이러한 적혈구의 가변성을 혈액유변학적 특성으로 보면 적혈구의 변형능으로 생각할 수 있다. 적혈구의 변형능이 높으면 장기와 조직에서의 혈류 흐름이 원활하여 건강한 상태를 유지하게 되고 변형능이 떨어지면 혈류 흐름이 원활하지 못하여 주요 장기의 허혈성질환과 같은 병적인 상태에 빠지게 된다. 적혈구의 변형능에 영향을 미치는 인자는 크게 두 가지로 막 지질의 과산화작용과 막 단백질의 변성이다[14, 15]. 즉 인체가 심한 산화 스트레스를 받게 되면 세포막 지질과 단백질에 변화를 초래하여 적혈구의 변형능을 떨어뜨리게 된다. 본 연구의 선행 연구에서 정상인의 적혈구 변형능은 3 Pa

Table 1. Red cell deformability among non-treated control group, tBHP treated group, verapamil+tBHP treated group, and ascorbic acid+tBHP treated group (N=13 in each group)

Group	RBC Deformability (EI)
Control	0.31±0.01
tBHP treated	0.19±0.02*
Verapamil+tBHP	0.30±0.02
Ascorbic acid+tBHP	0.31±0.02

* $P<0.01$ as compared with the control.

Abbreviation: tBHP, *tert*-butyl hydroperoxide.

Table 2. Hematologic changes among non-treated control group, tBHP treated group, verapamil+tBHP treated group, and ascorbic acid+tBHP treated group (N=13 in each group)

Group	MCV (fL)	MetHb (%)
Control	86.25±1.34	4.16±0.97
tBHP treated	88.55±2.31*	43.45±4.52 [†]
Verapamil+tBHP	85.55±1.78	3.64±0.66
Ascorbic acid+tBHP	88.54±2.44*	3.57±0.71

* $P<0.05$; [†] $P<0.01$ as compared with the control.

Abbreviations: tBHP, *tert*-butyl hydroperoxide; MCV, mean corpuscular volume; metHb, methemoglobin.

의 전단응력에서의 연장지수값으로 0.2850에서 0.3600의 범위로 나타났는데 본 연구에서 대조군의 평균 연장지수값인 0.3077은 정상범위에 포함되지만 tBHP를 처리한 군에서는 0.1915로 나타나 정상범위에서 30% 이상 감소한 수치를 보인 것이 이를 잘 설명하는 결과이다[12].

적혈구막에서 band 3 단백질은 생리학적으로 중요한 음이온인 염소이온과 중탄산염이온의 세포 내 이동에 중심 역할을 수행하면서 세포 용적을 조절하는 작용을 하고 있다[16]. 적혈구에 tBHP를 처리하면 band 3 단백질의 이상을 초래하여 세포팽창이 나타나게 되는데 본 연구에서 tBHP 처리군에서 평균 적혈구 용적이 유의하게 증가한 것과 일치하는 현상이다[16]. 환원제로 사용하는 verapamil 전 처리가 평균 적혈구 용적을 원래 상태로 감소시킨 것에 반하여 ascorbic acid 전 처리에서는 평균 적혈구 용적이 원래 상태로 오지 않은 것은 verapamil의 작용이 band 3 단백질, protein 4.2 및 spectrin 등 막 단백질의 기능을 어느 정도 보존시키는 반면 ascorbic acid는 막 단백질의 기능 보존보다는 인지질 유사물질의 작용증대를 억제하는 효과가 크기 때문으로 추정할 수 있다[17].

적혈구 막의 band 3 단백질의 작용 이상에 의한 세포팽창 또한 적혈구 변형능 감소에 원인이 될 수 있지만 다른 연구에서는 적혈구의 tBHP 처리에 의해 나타난 적혈구 변형능의 감소가 band 3 단백질의 작용 이상에 의해서라기보다는 오히려 tBHP에 의해 적혈구가 metHb으로 산화되는 과정에 있을 것으로 생각하고 있다[19]. 즉 적혈구의 metHb은 O_2^- 와 H_2O_2 같은 활성산소를 지속적으로 생성하기 때문에 세포 손상에 직접적인 위해를 초래하고 적혈구의 변형능 감소에 주 역할을 담당하는 것으로 판단하는 것이다[19]. 본 연구에서도 대조군에 비하여 tBHP 처리군에서 적혈구 변형능의 감소 정도와 metHb의 생성 정도는 비례하지만 평균 적혈구 용적의 증가 정도는 크지 않은 것으로 나타나 이를 반영한 결과로 생각할 수 있다.

적혈구에 tBHP와 같은 산화제가 주입되면 세포막에 하인즈 소체가 형성되고 세포팽창과 함께 돌기를 가진 유극적혈구나 물집적혈구와 같은 변형적혈구들이 나타나게 된다[21-24]. 적절한 환원제를 투여하는 것과 같은 조치를 취하지 않으면 적혈구 용혈이 일어나고 용혈성빈혈을 초래하기도 한다. 그러나 metHb이나 적혈구 변형능의 변화에 비하여 실제적인 적혈구의 형태학적 변화는 크지 않은 것으로 알려져 있다[25, 26]. 본 연구에서도 tBHP 처리군의 말초혈액 도말을 이용한 적혈구의 형태학적 변화로 돌기세포와 물집세포 등 변형적혈구들이 일부 나타났으나 임상적인 의미를 부여할 수준은 아니었다.

tBHP 처리에 의한 적혈구 기능 변화 중 칼슘이온 조절효소

의 활성을 억제하는 것이 칼슘이온의 항정상태에 영향을 미쳐 적혈구의 변형능을 감소시킬 수 있다[17]. 환원제인 verapamil은 칼슘이온의 길항제로 작용하는 약물로 tBHP 처리에 의한 적혈구 변형능 감소를 복원하는데 매우 효과적이다. 실제 관상동맥의 막힘에 의한 급성심근경색환자에게 관상동맥 내부로 verapamil을 주입하는 치료법이 효과적인 것은 적혈구 변형능을 복원시켜 미세순환계의 혈류 흐름을 증대시킬 수 있기 때문이다[17]. 본 연구에서 각각 작용기전이 다른 두 가지 종류의 환원제를 이용하여 tBHP로 인한 적혈구의 산화 스트레스를 해소할 수 있음을 알 수 있었다. 특히 적혈구 변형능의 회복은 의미 있는 결과로 생각되며, 산화 스트레스에 의한 심근경색, 뇌졸중 등 주요 장기의 허혈성 질환을 예방하고 치료할 수 있는 근거가 될 수 있을 것으로 판단된다.

적혈구 변형능 검사는 그 동안 특수검사실이나 기초의학 실험실에서 할 수 있을 정도로 어렵고 시간과 노력이 많이 필요한 검사였다[10, 11]. 그러나 본 연구에서 이용한 레이저 회절원리를 이용한 ektacytometer인 Rheoscan-D는 적혈구 변형능 검사에 소요되는 시간이 60초 이내이고 넓은 영역의 shear stress (0-30 Pa)에서 결과 값을 도출할 수 있으며, 일회용 키트를 사용하고 검사에 필요한 혈액의 양이 10 μ L 이내로 임상검사실에서 환자검사에 응용할 수 있게 되었다[12]. 실제 본 연구를 수행하면서 적혈구 변형능 검사의 일상검사가 가능함을 확인할 수 있었으며 검사의 표준화와 상용화가 필요한 것으로 사료되었다.

요 약

배경 : 정상적혈구는 변형능을 가지고 있어서 모세혈관에서의 혈액의 흐름을 가능하게 한다. 산화 스트레스는 적혈구의 변형능을 저하시키는데 이로 인해 미세순환에서의 혈류에 영향을 주게 된다. 본 연구는 산화 스트레스에 노출된 적혈구 변형능의 변화를 살펴보고, verapamil과 ascorbic acid를 이용하여 적혈구의 산화손상 예방효과에 대해 조사하였다. 또한 micro-fluidic ektacytometer, RheoScan-D (RheoMeditech, 대한민국)의 임상적 유용성에 관해서도 살펴보았다.

방법 : 적혈구에 대한 산화 스트레스의 영향을 알아보기 위해 tert-butyl hydroperoxide (tBHP)를 처리하였고, tBHP 처리 전에 verapamil과 ascorbic acid를 전처리하여 산화 손상에 대한 예방효과를 살펴보았다. 적혈구 변형능은 RheoScan-D를 사용하여 측정하였다.

결과 : tBHP를 처리한 적혈구를 대조군과 비교했을 때 변형능은 감소하였고($P < 0.01$) 메트헤모글로빈(methemoglobin,

metHb)과 평균적혈구용적은 각각 증가하였다($P < 0.01$, $P < 0.05$). tBHP를 처리한 적혈구와 비교 시, tBHP 처리 전에 verapamil을 전 처리한 경우 유의하게 적혈구 변형능이 증가하였고($P < 0.01$), metHb과 평균적혈구용적은 감소하였다($P < 0.01$, $P < 0.05$). 마찬가지로 ascorbic acid를 전처리한 경우 적혈구 변형능이 증가하였고($P < 0.01$), metHb 값은 감소하였다($P < 0.01$).

결론 : 산화 스트레스는 적혈구의 변형능을 감소시켰고, 적혈구 변형능이 산화손상을 반영하는 지표의 하나로 쓰일 수 있으리라 생각되었다. Verapamil과 ascorbic acid는 tBHP로 인한 산화 스트레스를 예방할 수 있었다. 본 연구에 사용한 ektacytometer, RheoScan-D는 임상적인 측정도구로서 편리하였고 앞으로 임상의학의 다양한 분야에서 사용되리라 기대된다.

참고문헌

- Aleksander SP and Paul CJ. Microcirculation and hemorheology. *Fluid Mech* 2005;37:43-69.
- Carrell RW, Winterbourn CC, Rachmilewitz EA. Activated oxygen and haemolysis. *Br J Haematol* 1975;30:259-64.
- Lynch RE and Fridovich I. Effects of superoxide on the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 1978;253:1838-45.
- Kong S and Davison AJ. The relative effectiveness of OH, H₂O₂, O₂⁻, and reducing free radicals in causing damage to biomembranes. A study of radiation damage to erythrocyte ghosts using selective free radical scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1981;640:313-25.
- Davies KJ and Goldberg AL. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. *J Biol Chem* 1987;262:8220-6.
- Morgan DL, Furlow TL, Menzel DB. Ozone-initiated changes in erythrocyte membrane and loss of deformability. *Environ Res* 1988; 45:108-17.
- Morgan DL, Dorsey AF, Menzel DB. Erythrocytes from ozone-exposed mice exhibit decreased deformability. *Fundam Appl Toxicol* 1985;5:137-43.
- Dobbe JG, Streekstra GJ, Hardeman MR, Ince C, Grimbergen CA. Measurement of the distribution of the red blood cell deformability using an automated rheoscope. *Cytometry* 2002;50:313-25.
- Dobbe JG, Hardeman MR, Streekstra GJ, Grimbergen CA. Validation and application of an automated rheoscope for measuring red blood cell deformability distributions in different species. *Biorheology* 2004;41:65-77.
- Hardeman MR, Goedhart PT, Dobbe JGG, Lettinga KP. Laser-assisted optical rotational cell analyser (LOCRA): 1. a new instrument for measurement of various structural hemorheological parameters. *Clin Hemorheol* 1994;14:605-18.
- Kim YK, Ku Y, Shin S, Suh JS, Song KE. Association between oxidative stress and RBC deformability. *Korean J Lab Med* 2005;25(S2): S659. (김유경, 구윤희, 신세현, 서장수, 송경은. 산화 스트레스와 적혈구 가변형성의 관련성. *대한진단검사의학회지* 2005;25(S2):S659.)
- Shin S, Ku Y, Park MS, Jang JH, Suh JS. Rapid cell-deformability sensing system based on slit-flow laser diffractometry with decreasing pressure differential. *Biosens Bioelectron* 2005;20:1291-7.
- Corry WD, Meiselman HJ, Hochstein P. t-Butyl hydroperoxide induced changes in the physicochemical properties of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1980;597:224-34.
- Trotta RJ, Sullivan SG, Stern A. Lipid peroxidation and haemoglobin degradation in red blood cells exposed to t-butyl hydroperoxide. The relative roles of haem- and glutathione-dependent decomposition of t-butyl hydroperoxide and membrane lipid hydroperoxides in lipid peroxidation and haemolysis. *Biochem J* 1983;212:759-72.
- Dise CA and Goodman DB. t-Butyl hydroperoxide alters fatty acid incorporation into erythrocyte membrane phospholipid. *Biochim Biophys Acta* 1986;859:69-78.
- Deuticke B, Heller KB, Haest CW. Progressive oxidative membrane damage in erythrocytes after pulse treatment with t-butyl hydroperoxide. *Biochim Biophys Acta* 1987;899:113-24.
- Moore RB, Bamberg AD, Wilson LC, Jenkins LD, Mankad VN. Ascorbate protects against tert-butyl hydroperoxide inhibition of erythrocyte membrane Ca²⁺ + Mg²⁺(+)-ATPase. *Arch Biochem Biophys* 1990;278:416-24.
- Rohb TT, Hinds TR, Vincenzi FF. Inhibition of the Ca²⁺ pump of intact red blood cells by t-butyl hydroperoxide: importance of glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1993;1153:67-76.
- Van der Zee J, Van Steveninck J, Koster JF, Dubbelman TM. Inhibition of enzymes and oxidative damage of red blood cells induced by t-butyl hydroperoxide derived radicals. *Biochim Biophys Acta* 1989;980:175-80.
- Simmons A, ed. *Technical Hematology*. 3rd ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1983:13-8.
- Hanss M. Erythrocyte filtrability measurement by the initial flow rate method. *Biorheology* 1983;20:199-211.
- Koutsouris D, Guillet R, Lelievre JC, Guillemin MT, Bertholom P,

- Beuzard Y, et al. Determination of erythrocyte transit times through micropores. I--Basic operational principles. *Biorheology* 1988;25:763-72.
23. Baskurt OK. Deformability of red blood cells from different species studied by resistive pulse shape analysis technique. *Biorheology* 1996;33:169-79.
24. Schmid-Schoenbein H, Wells R, Schildkraut R. Microscopy and viscometry of blood flowing under uniform shear rate (rheoscopy). *J Appl Physiol* 1969;26:674-8.
25. Nakamura T, Hasegawa S, Shio H, Uyesaka N. Rheologic and patho-physiologic significance of red cell passage through narrow pores. *Blood Cells* 1994;20:151-65.
26. Jarolim P, Lahav M, Liu SC, Palek J. Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin. *Blood* 1990;76:2125-31.