creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학박사 학위논문

근위축성 측삭경화증 동물 모델에서 장기간의 간헐적 저산소증이 인지 기능 및 질환 진행에 미치는 영향에 관한 연구

The effect of chronic intermittent hypoxia on cognitive function and disease progression in ALS animal model.

2014 년 2 월

서울대학교 대학원

의학과 뇌신경과학전공

김 성 민

근위축성 측삭경화증 동물 모델에서 장기간의 간헐적 저산소증이 인지 기능 및 질환 진행에 미치는 영향에 관한 연구

지도교수 이 광 우

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

2013 년 10 월

서울대학교 대학원

의학과 뇌신경과학 전공

김 성 민

김성민의 의학박사 학위논문을 인준함

2013 년 12 월

위 원 장	김 용 식	(인)
부위원장	이 광 우	(인)
위 원	차 중 익	(인)
위 원	한 설 희	(인)
위 원	이 경 민	(인)

The effect of chronic intermittent hypoxia on cognitive function and disease progression in ALS animal model.

by

Sung Min Kim

A thesis submitted to the Department of Neuroscience in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Neuroscience at Seoul National University College of Medicine

December 2013

Approved by Thesis Committee

Professor _____Chairman

Professor _____Vice chairman

Professor _____

Professor _____

Professor _____

학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인의 학위논문에 대하여 서울대학교가 아래와 같이 학위논문 제공하는 것에 동의합니다.

1. 동의사항

① 본인의 논문을 보존이나 인터넷 등을 통한 온라인 서비스 목적으로 복제할 경우 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용합니다.

② 본인의 논문을 디지털화하여 인터넷 등 정보통신망을 통한 논문의 일부 또는 전부의 복제.배포 및 전송 시 무료로 제공하는 것에 동의합니다.

2. 개인(저작자)의 의무

본 논문의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락하는 등 동의 내용을 변경하고자 할 때는 소속대학(원)에 공개의 유보 또는 해지를 즉시 통보하겠습니다.

3. 서울대학교의 의무

① 서울대학교는 본 논문을 외부에 제공할 경우 저작권 보호장치(DRM)를 사용하여야 합니다.

초 록

서론: 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)는 진행성의 중추신경계 퇴행질환이다. ALS의 주된 증상은 운동신경세포의 사멸로 인한 근신경계의 위약이며 이외에도 인지기능의 장애가 흔하게 동반되는 것으로 알려져 있다. ALS 환자들은 진행성의 호흡근 위약으로 인하여 만성 지속성 저산소증(Chronic continuous hypoxia, CCH) 및 만성 간헐적 저산소증 (Chronic intermittent hypoxia, CIH)과 같은 다양한 양상의 저산소증에 노출 될 수 있다. ALS 환자들에서 이러한 저산소증은 환자들에서 질병의 악화와 연관이 있을 것이라는 가설이 제시되어 왔다. 그러나 ALS 질병 모델을 이용한 기존의 실험연구들은 오직 CCH 만을 이용하여 연구를 수행하였으며 아직까지 ALS 질병 모델에서 CIH의 영향을 평가한 연구는 전무한 상황이다. 본 연구에서는 ALS 질병 모델 마우스에서 CIH가 질병의 악화에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

방법: 16마리의 ALS 마우스(G93A-SOD1 변이 유전자 삽입 마우스, B6SJL주)와 16마리의 대조군 마우스를 동일한 숫자로 나누어 각각 CIH와 normoxia (NOX)에 2주간 사육하였다. 2주간의 CIH 혹은 NOX 후 마우스 모델에서

rotarod, Y-maze, 그리고 wire hanging 의 행동검사를 시행하였다. 행동검사를 실시한 후 실험동물에서 조직학적 변화를 평가하기 위해 척수조직에서 운동신경세포의 사멸, 산화스트레스의 생성, 그리고 염증경로의 활성화 정도를 평가하였다.

결과: CIH 환경에서 사육된 ALS 마우스 (ALS-CIH)는 NOX 환경에서 사육된 ALS 마우스 (ALS-NOX)에 비해 rotarod 검사에서 운동습득력이 저하되었고, Y-maze 검사에서 공간기억력이 저하되었으며 wire hanging 검사에서 근력이 감소되었다. 척수의 조직학적 검사에서 ALS-CIH 마우스는 ALS-NOX 마우스에 비해 척수의 운동신경세포의 숫자가 감소되어 있었고 산화스트레스의 생성이 증가되었으며 염증경로가 활성화되었다.

결론: ALS 마우스에서 CIH는 운동신경세포의 사멸을 촉진하고 인지기능을 악화시키는 것으로 사료된다. 또한 이러한 현상은 산화스트레스의 증가 및 염증경로의 활성화와 연관이 있을 것으로 판단된다. 본 연구의 결과는 ALS의 질병 경과에 영향을 주는 인자에 대한 주요한 단서를 줄 뿐 아니라, ALS 환자들의 저산소증을 보다 조기에 교정해야 할 이론적인 근거가 될 수 있을 것으로 사료된다.

주요어: 근위축성 측삭경화증, 간헐적 저산소증, 산화스트레스

학 번: 2007 - 30543

목 차

초록 i
목차 iv
그림 목록 v
약어 목록 vi
서론 1
실험재료 및 방법 16
결과 24
고찰 35
참고문헌 47
초록 (영문) 53

그림 목록

Figure 1. Diagrams for the principles of hypoxic chamber 19

Figure 2. Performance on the rotarod test 25

Figure 3. Percent alternation in the Y-maze test 27

Figure 4. Wire-hanging test 28

Figure 5. Immunohistochemistry with anti-choline acetyltransferase (ChAT) to assess the numbers of ventral horn motor neurons. 31

Figure 6. Western blot for markers of oxidative stress (4-HNE) and activation of the NF-κB pathway (IκBα) 33

Figure 7. Immunohistochemistry (IHC) for astrocytosis and microgliosis 34

Figure 8. Diagram showing the possible effects of CIH in ALS 46

약어 목록

ALS: Amyotrophic lateral sclerosis

ChAT: Choline acetyltransferase

CIH: Chronic intermittent hypoxia

$ETCO_2$: End tidal CO_2

F_iO_2: Fraction of inspired oxygen

FTLD: Frontotemporal lobe degeneration

FVC: Forced vital capacity

GFAP: Gliofibrillary acidic protein

SOD1: Superoxide dismutase 1

HIF-1α: Hypoxia inducible factor-1 alpha

H_2O_2: Hydrogen peroxide

IkBα: NF-kB inhibitor alpha

NF-kB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NIV: Non-invasive ventilation

NOX: Normoxia

OSA: Obstructive sleep apnea

PA: Percent of alteration

PET: Positron emission tomography

PCR: Polymerase chain reaction

ROS: Reactive oxygen species

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Wt: Wild type

4- HNE: 4-hydroxynonenal

1. 서론

1) 배경

근위축성 측삭경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)은 성인에게 발생하는 신경계의 질환으로 발생빈도가 인구 10만명당 6명에 이르는 비교적 흔한 퇴행성 신경 질환이다 (McGuire et al., 1996). ALS 환자들에서 증상의 발생 및 진행 정도는 개인별로 차이가 있지만 대부분의 환자들은 중년까지는 무증상으로 지내다가 일단 증상이 발생하면 비교적 빠른 악화를 보이며, 대개 발병 5년 이내에 심각한 수준의 기능적 장애를 가지게 되거나 혹은 사망하는 것으로 알려져 있다 (Andersen et al., 2007).

ALS 환자들의 신경퇴행은 비교적 특이하게 운동신경세포 (motor neuron)에서 가장 심하게 나타나는 것으로 알려져 있으며, 이로 인한 진행성의 구음장애, 사지 위약, 호흡근 마비 등의 증상으로 결국에는 호흡근 마비로 인한 호흡부전으로 사망하게 된다 (Andersen, et al., 2007).

대부분의 ALS 질병은 산발적 (sporadic) 으로 발생하는 것으로 알려져 있으나, ALS 환자들의 약 10%는 가족력을 가지는 것으로

알려져 있으며 이러한 환자들의 유전 양상은 대개 우성 유전의 특징을 보인다. ALS 환자들의 유전성 연구에서 가장 중요한 연구는 유전성 ALS 환자들의 약 20%에서 superoxide dismutase 1 (SOD1) 유전자의 돌연변이를 관찰한 연구이다 (Rosen 1993). Rosen 등은 이 연구를 통해 질환의 발병과 연관된 단일 유전자의 단일 복제 (single copy) 이상만으로도 심각한 마비를 초래하는 신경계의 광범위한 퇴행성의 변형을 유발할 가능성을 제시하였다. 또한 Tu 등 (Tu et al., 1996)은 SOD1 유전자의 93번째 염기를 구아닌에서 아데노신으로 치환시킨 동물 모델에서 ALS 환자와 유사한 마비 증상과 운동신경세포의 사멸을 보고하여 SOD1 유전자의 변이가 가족성 ALS를 일으킬 수 있는 원인임을 증명하였다. 이후 SOD1 유전자의 가장 주된 기능이 세포에 독성을 지니는 활성산화물을 제거하여 세포내의 항산화 작용을 하는 것이라는 연구 결과를 근거로 산화스트레스가 ALS의 발병기전에 중요한 작용을 할 가능성이 제시되기도 하였다 (Boillée et al., 2008).

이와 같은 가족성 ALS 실험 모델을 이용한 연구 결과에 근거하여 ALS의 원인으로 다양한 발병 기전들이 제시되고 있으며 현재까지

글루탐산염 등으로 인한 신경세포의 흥분독성 이론 (Pedersen et al., 1998), SOD1 돌연변이에 의한 산소라디칼 생성 이론, 비정상적인 단백질 응축 이론, 미세섬유 응집 이론 등의 다양한 가설이 제시되고 있다. 그러나 아직까지 어떤 하나의 발병기전으로 가족성 및 산발성 ALS의 발병 기전을 모두 설명하고 있지는 못하는 실정이다 (Boillée, et al., 2008). 대표적인 예로 현재 미국 식약청 (FDA)에서 유일하게 승인 받은 ALS의 치료제인 흥분성 아미노산 수용체 차단제 (riluzole) 로 환자를 치료해도 이 환자에서의 질병의 진행은 계속되며 치료효과는 불과 3~5개월 정도의 생존기간의 향상 뿐 이라는 연구 결과를 들 수 있다 (Miller et al., 2000). 즉 ALS는 어느 한가지 기전의 단편적인 작용으로 일어나는 병이 아니라 오히려 위와 같은 여러 가지 발병 기전이 공통의 선행 원인을 가지고 복합적으로 작용하여 일어나는 퇴행성의 신경계 질환으로 추정되고 있다.

ALS 환자들은 질병의 진행과 함께 진행성의 팔, 다리의 위약, 구음 장애, 연하 곤란, 그리고 호흡근의 마비를 경험하게 된다. 이 중 호흡근의 마비로 인한 저환기증 혹은 저환기증으로 인한 2차적인

저산소증은 과거 호흡부전 및 흡입성 폐렴 등의 호흡기계 합병증을 유발하여 환자의 생존에 영향을 미치는 인자로만 중요하게 여겨져 왔다 (Schiffman et al., 1993).

그러나 최근 ALS 환자들의 저환기증 혹은 저환기증으로 인한 2차적인 저산소증이 이 환자들에서 비단 호흡기계 합병증뿐 아니라 척수의 운동신경세포 및 대뇌 등의 중추신경계 이상을 초래 혹은 악화할 수 있다는 증거들이 제시되고 있다. 이외에도 ALS 환자들이 일반인에 비해 호흡부전으로 인한 저산소증에 더욱 취약할 수도 있다는 연구 결과들이 보고되고 있어 관심을 모으고 있다.

저환기증 혹은 저환기증으로 인한 2차적인 저산소증이 ALS에 미칠 수 있는 영향에 관한 최근의 연구 결과는 다음과 같다.

ALS 환자들의 저환기증 혹은 저산소증을 교정함으로써 생존기간을 연장할 수 있다.

Bourke 등 (Bourke, et al., 2006)은 이 호흡부전이 있는 ALS 환자들을 대상으로 비침습성 호흡보조 (non-invasive ventilation, NIV) 의 효과에 대한 무작위대조시험을 시행하였으며 이를 통하여

NIV가 ALS 환자들의 생존기간을 연장 시키는 효과가 있음을 입증하였다. 다만 NIV이 이 환자들에서 어떠한 기전을 통하여 생존기간을 연장시키는 지에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다.

ALS 환자들은 정상인에 비해 저산소증에 취약한 생체 방어기전을 가지고 있을 수 있다.

혈관내피세포 성장인자 (Vascular endothelial growth factor, VEGF)는 저산소증에 반응하여 생체를 보호하는 성장인자의 일종이다. 흥미롭게도 ALS 환자의 뇌척수액 (cerebrospinal fluid, CSF)의 VEGF 농도는 정상인에 비해 현저하게 감소되어 있음이 보고된 바 있다 (Devos et al., 2004). 이 외에도 정상인에서는 체내에 저산소증이 발생하면 이에 대한 방어기전으로 VEGF의 발현이 증가하는 반면, ALS 환자들은 체내에 저산소증이 발생하는 경우 VEGF의 발현이 오히려 역설적 (paradoxical) 으로 감소된다고 보고되었다 (Moreau et al., 2006). 또한 VEGF 유전자의 다형증 (polymorphism)이 있는 인구군에서 ALS 질병의 발생률이 증가함이 보고되어 있어 ALS의 발병기전에 VEGF가 관여하고 있을 가능성이 제기되었다 (Lambrechts et al., 2003).

이러한 VEGF와 ALS와의 관계는 비단 임상연구뿐 아니라 다양한 실험 모델을 이용한 연구에서도 발견된다. 생체내 실험으로는 마우스에서 VEGF 유전자의 일부인 저산소증 반응성 요소 (hypoxic responsive element, HRE)를 knock out시킨 후 이 마우스에서 ALS 환자들과 유사한 사지의 진행성 근위약이 발생함을 관찰한 연구가 있다 (Oosthuyse et al., 2001). 또한 SOD1 유전자의 G93A 변이를 가지는 마우스 (ALS 마우스)와 대조군 마우스를 모두 단시간의 저산소증에 노출시켰을 때 대조군 마우스에 비해 ALS 마우스에서는 VEGF의 발현이 상대적으로 감소해 있음이 보고되기도 하였다 (Murakami et al., 2003). 생체외 실험에서도 ALS 세포주 모델은 대조군 세포주에 비해 저산소증에 더욱 취약하며 VEGF는 저산소증에 의한 ALS 세포주의 손상을 유의하게 방지 한다는 보고가 발표 되었다 (Van Den Bosch et al., 2004).

만성 저산소증은 활성산화물 (reactive oxygen species)의 생성을 통한 신경세포손상을 일으킬 수 있다.

Ryan 등 (Ryan et al., 2005)과 Xu 등 (Xu et al., 2004)은 각각 세포주 실험 모델과 마우스 실험 모델을 이용하여 생체내 및

생체외에서 만성간헐적 저산소증 (Chronic intermittent hypoxia; CIH)에 노출되는 폐쇄성수면무호흡증 (Obstructive sleep apnea, OSA) 실험 모델을 만들었으며, CIH가 이들 실험 모델에서 활성산화물 (reactive oxygen species, ROS)의 생성을 증가 시킴을 보고하였다. 또한 최근에는 Christou 등 (Christou et al., 2009)이 OSA 환자 들에서 지속기도양압 (continuous positive airway pressure, CPAP)을 이용하여 저산소증을 교정해 줌으로써 이 환자들의 혈액에서 ROS를 감소시킨 연구결과를 보고하여 CIH가 ROS의 생성에 관여할 것이라는 주장을 뒷받침 하였다.

저환기증 혹은 저산소증은 인지기능 장애를 유발하거나 악화시킬 수 있다.

과거 ALS는 운동신경세포에 국한된 신경퇴행성 질환으로 알려져 왔다. 그러나 최근의 연구에서 환자들은 척수의 운동신경세포뿐 아니라 대뇌피질의 신경퇴행성 변화 혹은 기능 장애로 인한 인지장애를 호소한다는 것이 밝혀졌으며 이 환자들에서의 인지장애 양상은 주로 전두측두엽 퇴행 (Frontotemporal lobe degeneration, FTLD)의 양상을 띄는 것으로 알려져 있다. ALS 환자들에서 전측두엽

기능장애의 발생율은 연구마다 조금씩 차이가 있으나 많게는 약 50%의 ALS환자에서 전측두엽 기능의 장애가 보고되고 있다 (Lomen-Hoerth et al., 2003).

최근의 연구 결과에서 일부 ALS 환자들의 전측두엽 기능의 장애가 비단 질환의 진행과 관련된 1차적인 신경퇴행의 결과일 뿐만이 아니라 저환기증 혹은 저산소증과 관련된 2차적인 결과일 가능성일 수도 있다는 증거가 발견되고 있다. 이와 관련된 연구결과로는 인지 기능 장애를 호소하는 ALS 환자들에서 NIV를 통해 인지 기능이 호전되었다는 Newsom-Davis 등 (Newsom-Davis et al., 2001) 의 연구, ALS 환자 중 전측두엽 기능의 장애가 있는 환자군에서 상대적으로 강제폐활량 (forced vital capacity, FVC) 이 유의하게 감소되어 있음(66 % vs 95 %)을 보고한 Lomen-Hoerth 등 (Lomen-Hoerth, et al., 2003)의 연구, OSA 환자에서 반복적인 저산소증 혹은 호흡부전이 전두엽의 기능장애를 동반한 인지장애의 원인이 될 수 있음을 보고한 Adams 등 (Adams et al., 2001) 의 연구 등이 있다.

ALS 환자들은 경미한 호흡근의 위약으로도 쉽게 심각한 저환기증 및 저산소증에 노출될 수 있다.

대부분의 ALS 환자들이 질병의 진단을 받을 때 이미 팔과 다리 근육의 위약 뿐 아니라 호흡근의 위약을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 이들은 수면장애호흡 (sleep disordered breathing), 보조 호흡근 (accessory muscle of respiration)의 위약, 횡경막의 위약, 그리고 바로 누운 (supine) 자세 등으로 인하여 경미한 호흡근 위약으로도 쉽게 야간 저환기증 (nocturnal hypoventilation)에 시달리는 것으로 알려져 있다 (Newsom-Davis, et al., 2001).

현재까지의 연구결과를 종합하였을 때 ALS 환자에서의 저환기 혹은 저산소증이 질병의 진행 및 인지 장애를 악화시킬 가능성을 짐작할 수 있다. 또한 이외에도 ALS 환자들이 저산소증에 대한 손상된 방어기전으로 인하여 동일한 정도의 저산소증에도 일반인에 비해 더욱 심각한 신경계 손상을 입을 가능성, 즉 저산소증에 대한 취약성을 가지고 있음을 추정 할 수 있다. 하지만 이러한 ALS의 저산소증에 대한 취약성, 저산소증이 ALS의 운동신경세포에 미치는 직접적인 영향, 그리고 저산소증이 ALS의 질병의 악화에 기여하는 기전 등에 대해서는 아직 생체외 모델에서만 연구가 되었을 뿐, 생체내 모델에서는 증명이 된 바가 없다.

현재까지 ALS에서의 저산소증에 관한 연구들은 다음과 같은 문제점에 대한 보완 혹은 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다. ALS에서 저산소증이 역설적 (paradoxical) 으로 VEGF의 발현을 감소시키는 것이 증명된 바 있으나 이러한 역설적인 VEGF의 발현 감소와 실제적인 신경학적 손상과의 연관성은 규명되지 못하였다. Van Den Bosh 등 (Van Den Bosch, et al., 2004) 은 ALS 마우스 모델을 장기적인 저산소증에 노출 시킨 이후 이 실험 모델에서 VEGF의 발현이 상대적으로 감소되어 있음을 확인한 바 있다. 하지만 이들은 이러한 ALS 마우스 모델에서 실제적으로 VEGF 발현의 감소가 운동신경세포의 사멸 혹은 생존기간과 연관성이 있는 지를 증명하지는 못하였다 (Van Den Bosch, et al., 2004). 또한 이후에도 저산소증과 ALS의 신경학적 손상과의 연관성을 생체내 모델에서 관찰한 연구는 없다.

또한 ALS에서 저산소증에 대한 기존의 연구는 지속적 저산소증 모델 (continuous hypoxia model)을 사용하였다 (Van Den Bosch, et al., 2004). 하지만 일반적인 수면장애호흡 (sleep disordered breathing) 환자들이 호소하는 야간 저환기로 인한 저산소증은 지속적인 저산소증 보다는 오히려 간헐적인 저산소증에 더 가까울

것이다. 기존의 연구들에서 저산소증이 실제 조직에 손상을 주는 주요 기전은 저산소증 자체 보다 오히려 저산소증 이후의 산소의 재공급 이라고 알려진 점 등을 고려 한다면 (Shan, et al., 2007), 지속적인 저산소증과 간헐적인 저산소증이 실제 신경계에 미치는 영향은 서로 매우 상이할 수 있다. 따라서 생체내 ALS 모델을 이용한 저산소증 실험 이전에는 반드시 실제 ALS 환자들이 겪게 되는 저산소증의 양상에 대한 분석이 선행되어야 한다.

2) 선행 연구

ALS 환자들의 저환기증은 환자들의 인지기능 장애와 연관성이 있었다.

ALS 환자들을 그들의 FVC에 따라 2군 (ALS with reduced vital capacity vs. ALS without reduced vital capacity)으로 분류하였으며 이 두 군의 질병 중증도와 인지기능을 서로 비교하는 연구를 실시하였다. FVC가 감소된 ALS 환자들은 FVC의 감소가 없는 질병 대조군과 질병 중증도 (ALS functional rating scale score, ALSFRSr)는 유사하였으나 전두엽과 측두엽의 인지기능이 감소하여 있었다. 즉 ALS 환자들에서 호흡기능의 감소는 전두엽과 측두엽의 기능과

연관된 인지기능의 장애와 연관성이 있음을 확인 하였다 (Kim et al., 2007). 본 연구의 결과는 ALS 환자들에서 저환기증으로 인한 이차적인 저산소증이 환자들의 인지기능 장애와 연관이 있을 가능성을 시사한다.

주관적인 호흡부전 증상을 호소하는 ALS 환자들은 수면 중 유의한 호기말 이산화탄소 분압의 상승과 경피하 맥박 산소포화도의 감소를 보였다.

야간 카프노그래피 (nocturnal capnography)와 야간 경피하 맥박산소 측정 (nocturnal transcutaneous pulse oximetry)을 이용하여 ALS 환자들에게서 측정한 비침습적인 호기말 이산화탄소 분압 (end-tidal CO_2, $ETCO_2$)의 측정 값이 침습적인 검사인 동맥혈 가스분석을 통해 측정한 실제 환자들의 동맥혈 이산화탄소 분압 (PaO_2)과 유의한 연관성이 있음을 확인하였다. 또한 ALS 환자 중 야간 호흡부전의 주관적인 증상을 호소하는 환자들은 객관적인 검사인 야간 카프노그래피 및 야간 경피하 맥박 산소포화도 검사에서도 고이산화탄소혈증 및 저산소증을 보였다. 따라서 본 연구결과를 통해 주관적인 야간 호흡부전의 증상을 호소하는 ALS

환자들에게서 적극적인 호흡 보조가 필요함을 확인하였다 (Kim et al., 2011).

ALS 환자들에게서 수면 중 간헐적 저산소증 양상을 확인하였다.

ALS 환자에서 야간 경피하 맥박 산소측정 측정을 시행하여 ALS 환자들에게서 간헐적 저산소증의 양상인 군발성 산소포화도 감소 (cluster of desaturation)가 관찰됨을 확인하였다. 군발성 산소포화도 감소는 기존의 연구결과에 따라 수면 중 산소포화도가 급격하게 4%이상 감소하는 현상이 10분 내에 5회 이상 발생하는 것으로 정의하였다. 총 25명의 ALS 환자 중 약 36%인 9명의 ALS환자에서 군발성 산소포화도 감소의 증상이 있음을 확인하여 ALS 환자에서 간헐적 저환기증이 비교적 드물지 않은 증상임을 확인하였다 (Park et al., 2013).

CIH는 ALS 마우스 실험모델의 rotarod 유지 시간을 감소시켰다.

생후 85일 ALS 마우스를 이용하여 CIH (5분간의 저산소증 시기와 10분간의 저산소증 시기가 하루 12시간 동안 반복)가 rotarod 검사결과에 미치는 영향을 확인하였다. CIH 군에서 normoxia (NOX)

군에 비해 rotarod 시행 3일째에 유의하게 짧은 rotarod 유지시간을 보였다. 본 예비연구 결과를 바탕으로 본 실험의 CIH 방법에 대한 계획을 수립할 수 있었다 (unpublished data).

Micro-PET을 이용하여 CIH가 ALS 마우스의 대뇌 산소대사에 미치는 영향 분석하였다.

CIH가 대뇌기능에 미치는 영향을 간접적으로 Micro-PET을 이용하여 확인하였다. 가천의대 뇌과학 연구소에서 ALS-CIH, ALS-NOX, 그리고 wild type (Wt)-NOX 마우스의 micro-PET을 시행하였으며 ALS-CIH 마우스에서 대뇌의 산소대사 감소 양상을 확인할 수 있었다. 이 연구결과를 통하여 CIH 가 ALS 마우스의 대뇌 기능에 영향을 미칠 가능성을 추정할 수 있었다 (unpublished data).

3) 가설 및 목적

본 연구에서는 위와 같은 배경과 선행 연구 결과에 근거하여 CIH가 ALS의 질병의 진행을 악화시킬 것이라는 가설을 세웠으며, ALS 마우스를 이용하여 CIH가 ALS에서 인지기능 및 신경근력의 악화와

척수의 배측 운동신경세포의 사멸에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

1) ALS 생체내 모델

Superoxide dismutase 1 (SOD1) 유전자는 가족성 ALS 환자들의 질병 발생 원인 유전자 중 하나이다. 다양한 종류의 SOD1 유전자 이상이 ALS를 유발할 수 있는 것으로 알려져 있으며 4번째 염기인 알라닌이 발린으로 치환되는 A4V 변이 (Rosen 1993), 46번째 염기인 히스티딘이 아르기닌으로 치환되는 H46R 변이 (Muller et al., 2008), 그리고 93번째 염기인 글리신이 알라닌으로 치환되는 G93A 변이 (Valentine et al., 2003) 등이 인간에서 ALS를 유발할 수 있는 SOD1 유전자의 이상원인으로 알려져 있다.

본 연구에서는 G93A 변이 인간 SOD1 유전자를 가지고 있는 유전자 변이 마우스 (B6SJL-Tg, Jackson LAB, stock NO.-002726)를 ALS 실험군 생체내 모델로 이용하였다. 이 마우스는 생후 30~35일 후에는 세포 수준의 병리적 변화가 관찰되고, 생후 70일 후에는 몸무게가 줄어들며, 90일 후에는 뒷다리의 마비 증상이 생기고, 또한 생후 110일부터는 증상의 진행 속도가 빨라지면서 130~40일 후에는 사망하는 특징을 가지고 있다 (Tu, et al., 1996). 또한 대조군

마우스로는 인간 SOD1 유전자 변이가 없는 것 이외에는 ALS 마우스와 동일한 유전적 형질을 가지는 B6SJL 마우스를 사용하였다. 마우스들은 12시간의 light/dark cycle하에 공급자의 연구설명서 (protocol)에 따라 사육하였다. 꼬리 조직을 채취하여 DNA를 추출하였으며 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 통하여 인간의 G93A 변형유전자 (transgene) 유무를 확인하였다. 총 16마리의 ALS 마우스와 16마리의 대조군 마우스 (각 군당 8 male 마우스, 생후 14주령)을 동일하게 CIH 군과 NOX 군으로 나누었다.

본 연구는 서울대학교 IACUC (Institutional animal care and use committee)의 승인 (승인번호: SNU – 080303-1) 하에 시행하였다.

2) 저산소증 및 정상 산소증의 구현

생체내 모델에서 CIH 환경을 조성하기 위하여 다음과 같이 특수 제작 (customized)된 저산소 체임버 (hypoxic chamber)를 고안하였다. 반 밀폐형의 저산소 체임버 (VS-9108MS2; Vision Science Co., Seoul, Korea; 420 × 410 × 600 mm [가로 × 세로 × 높이])를 변형하여 본 연구의 목적에 맞게 특화 (specification) 하였다. 2개의 특수 제작된 공기주입펌프 (air infusion pump)가 각각

질소 (N2) 와 실내 공기를 주입하기 위해 체임버에 연결되었다. 또한 4개의 상자 (180 × 280 × 150 mm)가 체임버의 내부에 설치되어 질소나 혹은 실내 공기의 빠른 주입 및 확산을 용이하게 하였다. 질소가스의 유입을 통해 저산소증 시기 (90 초, 최종 F_iO_2 7.8%)를 구현하였으며 실험실의 실내 공기 유입을 통해 정상 산소증 시기 (4 분, 최종 F_iO_2 20%)를 구현하였다 (Figure 1). 12시간의 암시기 (dark phase)와 12시간의 명시기 (light phase)를 조성하였으며 40%~50%의 습도와 22~ 24°C의 온도를 유지하였다.

온도, 습도, 그리고 소음 등의 영향을 배재하기 위해 정상 산소증 마우스들을 저산소 체임버에 하루 12시간동안 실내 공기만 공급한 상태로 사육하였다.

3) 행동 검사

ALS 마우스의 운동조화력 (motor coordination) 및 운동습득력 (motor learning)을 검사하기 위해 rotarod 검사를 시행하였다 (Karl et al., 2003; Crawley 2008). Rotarod 검사는 2회의 rotarod 훈련을 거친 후에 가속조건 (range, 4-40rpm) 하에 시행하였다. 검사는 CIH 혹은 NOX 시작 8, 9, 12, 15일 후에 시행하였으며 최대 5분 이내의 rotarod

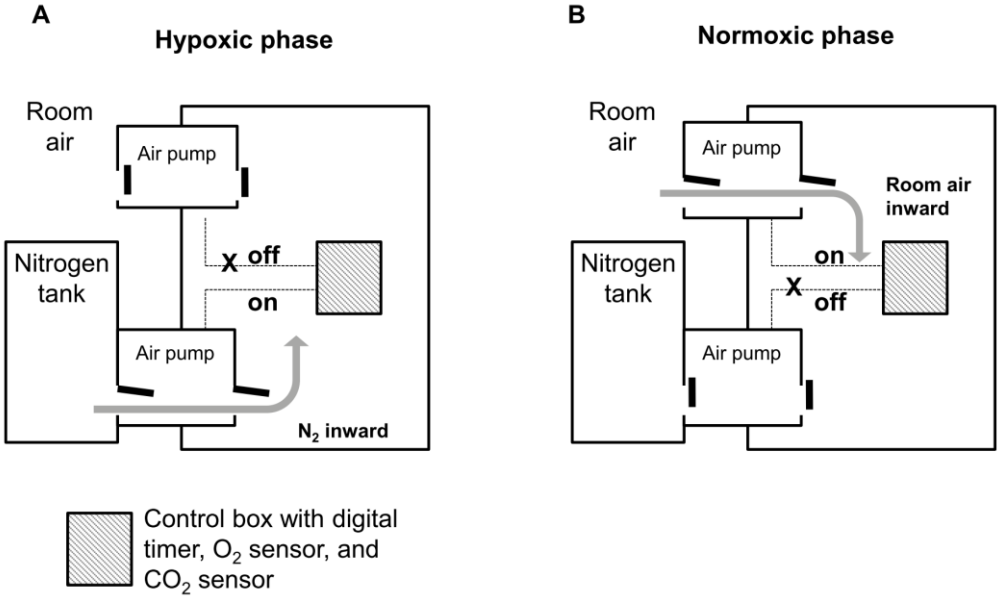


Figure 1. Diagrams illustrating the experimental setup for the hypoxic (A) and normoxic (B) phases

Customized semi-closed hypoxia chamber with solenoid valves was developed to achieve a chronic intermittent hypoxia. The hypoxic phase (90 s) was achieved with rapid infusion of nitrogen gas and the normoxic phase (4 min) was achieved with rapid infusion of room air. The final F_iO_2 levels of the hypoxic and normoxic phases were 7.8% and 20%, respectively. In the CIH group, hypoxic and normoxic phases were repeated consecutively 12 h/day.

검사를 2회씩 하였다. 매 검사간의 간격은 1시간으로 유지하였으며 각 마우스당 rotarod 유지시간을 측정하여 매 검사에서 가장 좋은 결과를 채택하여 기록하였다.

마우스의 신경근력 (neuromuscular strength)를 측정하기 위해 wire hanging 검사를 시행하였다 (Karl, et al., 2003; Crawley 2008). Wire hanging 검사는 마우스를 부드럽게 cage의 wire로 된 뚜껑 위에 올려 놓은 다음 공중에서 부드럽게 흔들어 마우스가 wire를 잡게 유도한 이후 wire를 뒤집어서 마우스가 떨어지는 시간을 측정하는 방법이다. 측정 시간은 최대 60초로 한정하였다.

공간기억력 (spatial memory)를 측정하기 위해 Y-미로 검사를 시행하였으며 이는 해마 (hippocampus)의 기능을 평가하는 방법이다 (Jung et al., 2012). Y-미로는 3개의 검은색 플라스틱 arm으로 구성하였으며 각 arm은 서로 120º 의 각 (angle) 을 가졌다. 마우스는 그 중 하나의 arm 끝에 놓여지게 되며 8분동안 자유롭게 미로를 돌아다닐 수 있게 된다. 서로 다른 세 개의 arm을 순차적으로 들어가는 것을 alteration으로 정의하였으며 percent of alteration (PA)을 다음과 같이 계산하였다 PA = number of alternations/(total number of entrances into each arm – 2) (Jung, et al., 2012).

4) Immunoblot

각 군당 4마리의 마우스에서 염증성 반응 경로인 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-kB) 활성화의 표지자인 NF-kB inhibitor alpha (IkBα, 1:1000, Ab32518; Abcam, Cambridge, UK) (Ryan, et al., 2005), 산화스트레스 (oxidative stress)로 인한 지질 과산화 (lipid peroxidation) 의 표지자인 4-hydroxynonenal (4- HNE, HNE 12-S; Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA) (Smith et al., 1998), 그리고 β-actin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 의 발현을 면역블롯검사로 측정하였다. 행동검사 후 마우스들을 pentobarbital sodium으로 마취하고 차가운 phosphate-buffered saline (PBS) 을 심장을 통해 관류하였다. 각 마우스의 척수를 제거하고 초저온 냉장고 (-80°C)에 냉동 보관하였다 (Ahn et al., 2012). 마우스의 척수는 조직-단백 추출제제인 (T-PER, Pierce/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 를 첨가하여 분쇄하였으며 13,200 rpm, 20 min, 4°C의 조건 하에 원심분리 하였다. 상층액에서 Bradford 법을 이용하여 단백질의 농도를 측정한 후 각 마우스 당 25ug씩의 단백질을 SDS/polyacrylamide gels (Invitrogen SDS-PAGE, Life Technologies,

Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 분리하였다. 이후 나이트로셀룰로스 (nitrocellulose) 멤브레인에 단백질을 이동시켰으며, 5%의 탈지 우유를 이용하여 blocking을 하였다. 1차 항체는 4°C 에서 밤새 반응시켰으며 2차 항체는 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 각 단백질의 발현 농도를 Image J 프로그램 (http://rsb.info.nih.gov/ij/) 을 이용하여 측정 하였으며 IkBα과 4-HNE의 농도는 β-actin의 농도에 대한 상대적인 발현으로 표시하였다.

5) 운동신경세포 숫자의 확인 및 면역조직화학검사

각 군당 4마리의 마우스는 면역조직화학검사(immunohistochemistry)에 사용되었다. 마우스를 pentobarbital sodium을 이용해 마취하고 심장을 통해 차가운 PBS와 paraformaldehyde를 관류하였다. 마우스의 척수를 채취하였으며 차가운 sucrose 용액을 이용하여 냉동 보관하였다 (Park et al., 2007). 척수의 확장 형태를 이용하여 경추를 확인하였으며 20-μm 두께의 횡단 절편을 얻었다. 3%의 과산화수소가 포함된 Tris Buffered Saline (TBS)으로 절편을 세척하였으며 이후 0.3%의 triton-X100를 포함한 TBS (TBST)로 1시간 동안 절편을 blocking 하였다. 1차 항체는 4°C 의 조건하에

밤새 반응시켰으며 2차 항체는 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Anti-choline acetyltransferase (Anti- ChAT) antibody (1:100, Millipore, Bilerica, MA, USA)를 이용하여 척수 배측의 운동신경세포를 확인하였으며 그 숫자를 세었다. 미세아교 세포와 별아교세포의 활성화를 확인하기 위해 각각 anti-ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1) antibody (1:400, Wako, Japan)와 anti-gliofibrillary acidic protein (GFAP) antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 염색을 시행하였다.

6). 통계분석

결과는 평균 ± 표준편차로 표기하였다. 통계 분석은 Student's *t*-test와 one-way ANOVA를 통해 시행하였으며 Fisher's least significant difference를 이용하여 post-hoc 검사를 하였다. 각 군간의 측정치 비교에 있어, 통계 분석 결과 0.05 이하의 p value를 보이는 경우를 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과

1) CIH는 ALS 마우스의 운동습득 능력을 저해하였다.

CIH/NOX 시행 8, 9, 12, 그리고 15일에 마우스들에서 rotarod 검사를 시행하였다. Wt 과 ALS-NOX 마우스는 CIH 혹은 NOX 시행 8일에 비해 9일에 rotarod 유지 시간이 증가하는 경향을 보였으나 ALS-CIH 마우스에서는 CIH 시행 9일에 이러한 rotarod 유지 시간의 증가가 매우 미미하였다. CIH/NOX 시행 9일에 시행한 rotarod 검사에서 ALS-CIH 마우스의 rotarod 유지 시간은 100.00 ± 52.06 초로 ALS-NOX 마우스의 rotarod 유지 시간인 168.25 ± 61.60 초와 Wt-CIH 마우스의 186.13 ± 65.84 초에 비해 유의하게 짧았으며 각각의 *p*-value는 0.017 과 0.041로 통계적으로 유의하였다. 또한 검사기간 동안 Wt-CIH 마우스는 Wt-NOX 마우스에 비해 rotarod 유지 시간이 짧은 경항을 보여 주었으나 통계적인 유의성은 없었다. CIH/NOX 시작 12일 그리고 15일에는 ALS 마우스가 rotarod 유지 시간의 감소를 보이기 시작했으며 이는 ALS의 질병 진행에 따른 진행성 근위약 때문인 것으로 사료된다. CIH 혹은 NOX 시작 12일 그리고 15일의 rotarod 유지 시간은 ALS-CIH군과 ALS-NOX군에서

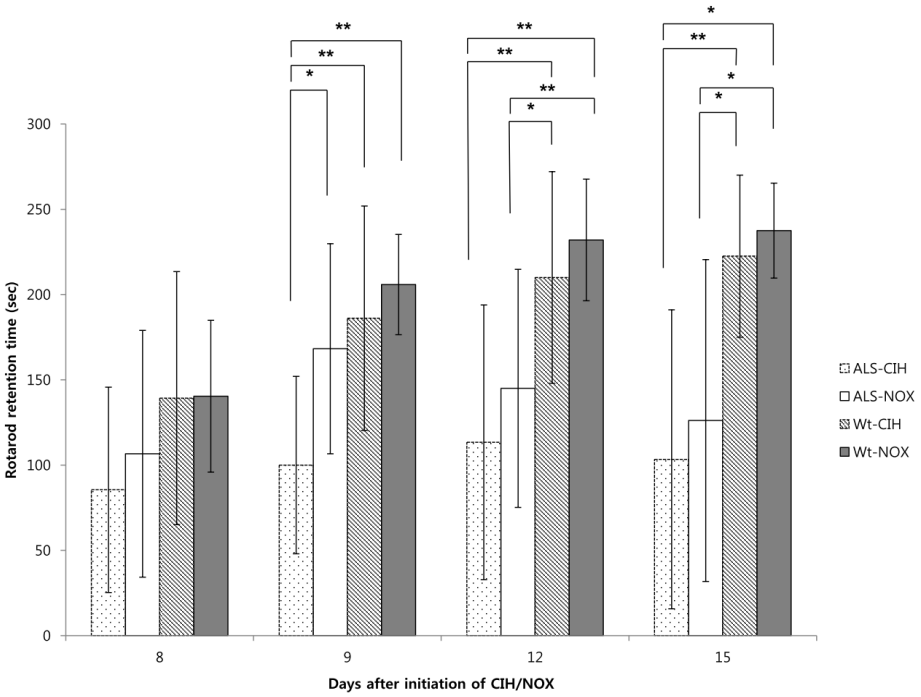


Figure 2. Performance on the rotarod test

Rotarod rod test was performed to evaluate the motor coordination and learning ability on day 8, 9, 12, and 15 days after the initiation of CIH or NOX. On the second day of rotarod testing (Day 9), Wt and ALS-NOX mice showed good improvements in rotarod retention time, compared to the first day of testing (Day 8). However, ALS-CIH mice did not show an improvement in rotarod retention time and had significantly shorter rotarod retention time on Day 9 compared with ALS-NOX mice ($p < 0.05$).

크게 다르지 않았다 (Figure 2).

2) CIH는 ALS 마우스에서 공간기억력을 저해하였다

Y-미로검사에서 공간기억력의 검사를 위해 percent of alteration (PA)를 측정하였다. ALS-CIH 마우스의 PA는 44.8 ± 15.2% 로 ALS-NOX 마우스의 PA인 64.8 ± 12.7% 과 Wt-CIH 마우스의 PA인 66.3 ± 17.9% 에 비해 유의하게 감소되었으며 각각의 *p-value* 는 0.016과 0.010로 통계적인 유의성을 보였다. 그러나 Wt-CIH 마우스의 PA와 Wt-NOX 마우스의 PA인 58.6 ± 15.9% 는 통계적으로 유의하게 다르지 않았다 (Figure 3).

3) CIH는 ALS 마우스의 근력저하를 악화시켰다.

CIH/NOX의 시작 12일 혹은 15일에 wire hanging 검사를 이용하여 근력을 측정하였다. 각 군 (ALS-CIH와 ALS-NOX)당 6마리의 마우스가 wire hanging 검사의 수행에 성공하였으며 이 마우스들의 wire hanging 시간을 비교하였다. CIH/NOX 시작 12일에 ALS-CIH의 wire hanging 시간은 ALS-CIH 마우스에서 42.5 ± 19.94 초로 ALS-

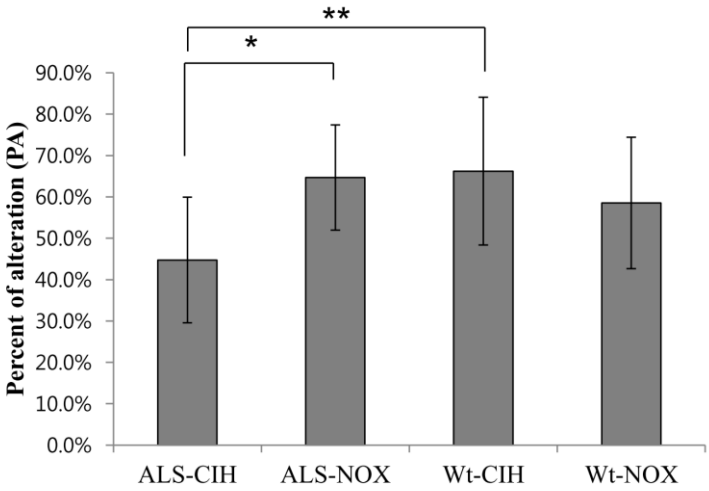


Figure 3. Percent alternation in the Y-maze test

The Y-maze test was performed to evaluate the effect of CIH on spatial memory in mice. After 2 weeks of CIH, ALS mice exhibited significantly lower percent alternation (PA) in the Y-maze test than did the ALS-NOX mice ($p < 0.05$). In addition, the ALS-CIH mice showed poorer spatial memory compared with the Wt-CIH mice, an effect which suggests that ALS mice are more vulnerable to CIH than the Wt mice are. * $p < 0.05$, **, $p < 0.01$

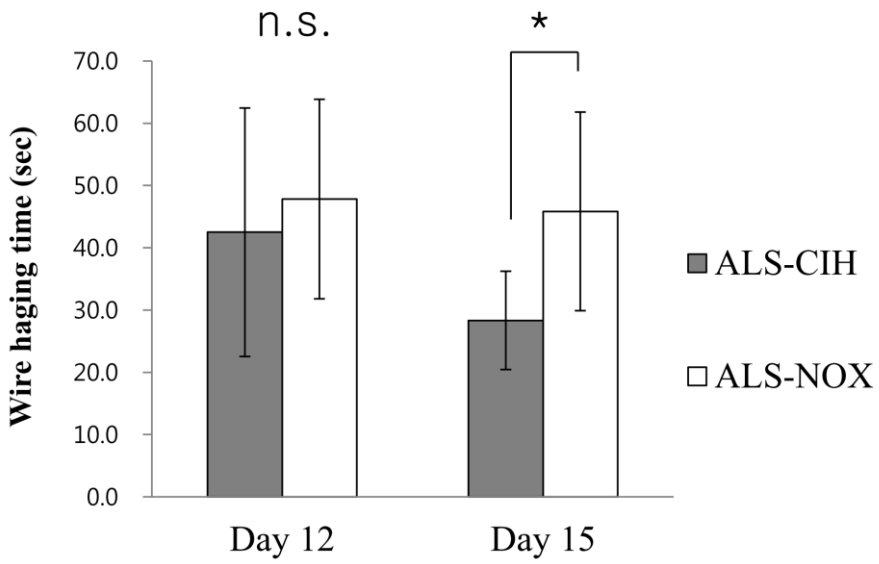


Figure 4. Wire-hanging test

Wire-hanging times were tested to measure the effect of CIH on neuromuscular strength in ALS mice. The ALS-CIH mice exhibited somewhat reduced neuromuscular strength compared to the ALS-NOX mice (p = 0.037). * p < 0.05, n.s. = no statistical significance.

NOX 마우스의 47.8 ± 16.01 초에 비해 상대적으로 짧은 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 그러나 CIH/NOX 시작 15일에는 ALS-CIH의 wire hanging 시간은 28.3 ± 7.90 초로 더욱 감소되어 ALS-NOX 마우스의 45.8 ± 15.94 초에 비해 통계적으로 유의하게 짧았다 (p = 0.037) (Figure 4).

4) CIH는 ALS 마우스에서 척수 운동신경세포의 사멸을 촉진하였다

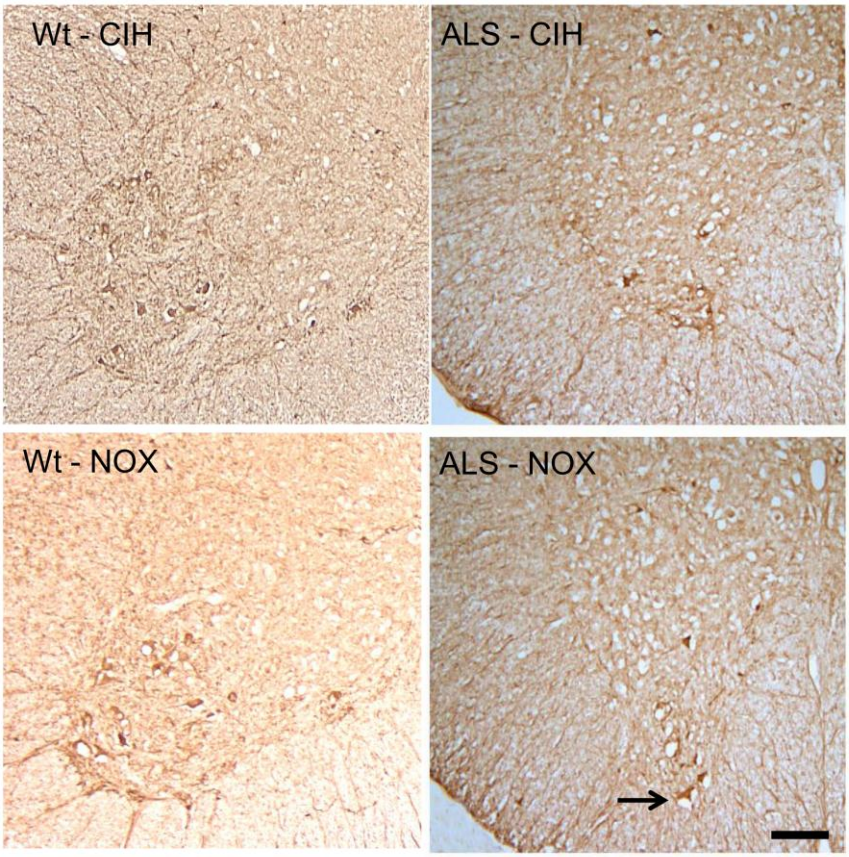
마우스의 척수 배측에서 운동신경세포의 개수를 측정하였으며 ALS-CIH 마우스의 운동신경세포의 개수는 척수의 각 배측뿔 (ventral horn) 당 2.57 ± 1.08 개로 ALS-NOX 마우스의 4.10 ± 0.88 개에 비해 통계적으로 유의하게 감소되어 있었다 (p < 0.001). 하지만 Wt-CIH 마우스와 Wt-NOX 마우스의 운동 신경세포 개수는 각각 9.77 ± 2.81 개와 10.56 ± 3.10 개로 의미 있는 차이를 나타내지 않았다 (p = 0.453) (Figure 5).

5) CIH는 ALS에서 산화 스트레스를 유발하고 염증성 경로를 활성화 시켰다.

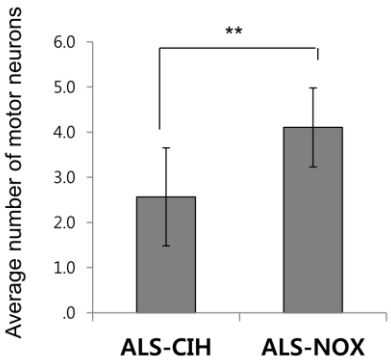
ALS-CIH 마우스는 ALS-NOX 마우스에 비해 산화 스트레스로 인한

지질과산화의 표지자인 4-HNE의 발현이 유의하게 높았다 (p = 0.004). 또한 비록 통계적인 유의성은 보이지 않았으나 ALS-NOX 마우스에서 4-HNE의 발현은 Wt-NOX에 비해 약간 높은 경향을 보였다 (p > 0.05). 이 외에 ALS-CIH 마우스는 Wt-CIH 마우스와 Wt-NOX 마우스에 비해 유의하게 높은 수준의 4-HNE 발현을 보였다 (p < 0.001) (Figure 6 A and B). ALS-CIH 마우스는 ALS-NOX 마우스에 비해 유의하게 낮은 IkBα의 발현을 보였으며 (p = 0.004) 이는 NF-KB pathway의 활성화를 시사할 가능성이 높을 것으로 추정되었다. 비록 ALS-NOX 마우스와 Wt-NOX 마우스의 IkBα 발현 정도는 서로 크게 다르지 않았으나 ALS-CIH 마우스는 Wt-CIH 마우스에 비해 유의하게 낮은 IkBα 발현을 보였다 (p = 0.007) (Figure 6 A and C). ALS-CIH 마우스는 ALS-NOX 마우스 또는 Wt 마우스에 비해 astrocyte와 microglia의 숫자도 증가되는 경향을 보였다 (Figure 7 A and B, respectively).

A


Wt - CIH
ALS - CIH
Wt - NOX
ALS - NOX

B


Average number of motor neurons
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
.0
**
ALS-CIH
ALS-NOX

C

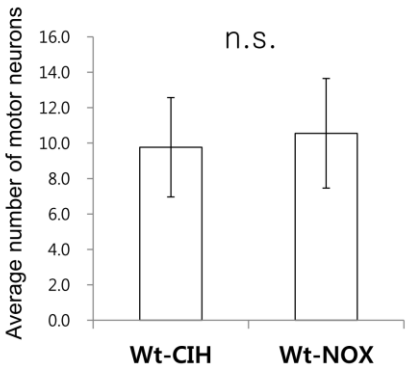

Average number of motor neurons
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
n.s.
Wt-CIH
Wt-NOX

Figure 5. Immunohistochemistry with anti-choline acetyltransferase (ChAT) to assess the numbers of ventral horn motor neurons

Motor neurons in the ventral spinal cord were labeled with anti-ChAT staining (A), and the numbers of motor neurons were counted in ALS mice. Significantly fewer motor neurons were counted in the ALS-CIH mice than in the ALS-NOX mice (B). The numbers of motor neurons did not differ significantly between the Wt-CIH mice and the Wt-NOX mice (C). $^{**}p < 0.01$, n.s. = no statistical significance. Bar size = 100 μm (A).

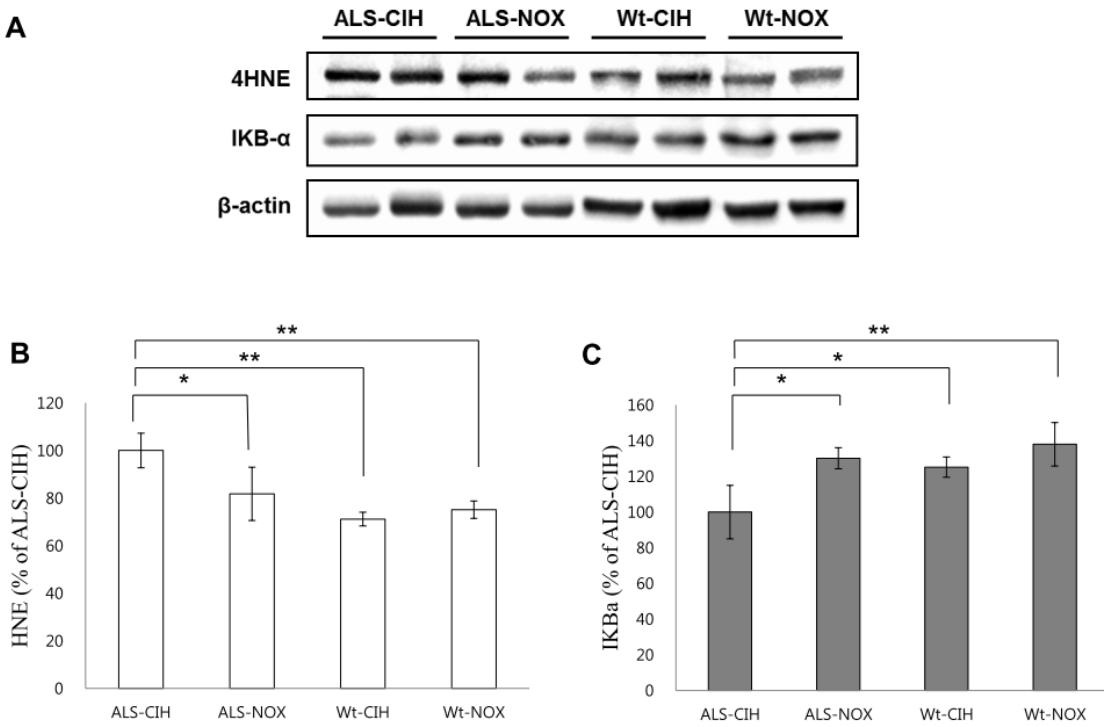


Figure 6. Western blot for markers of oxidative stress (4-HNE) and activation of the NF-κB pathway (IκBα)

Generation of reactive oxygen species and/or activation of inflammatory pathways might be involved in the increased loss of motor neurons in ALS mice due to CIH. Although the mild CIH (minimum F_iO_2 of 7.8%) used in this study did not induce oxidative stress or activation of the NF-κB pathway in the Wt mice, significant oxidative stress (A and B) and activation of the NF-κB (A and C) pathway were demonstrated in ALS mice. *p < 0.05, **p < 0.01, Bar size = 100 μm (A and B).

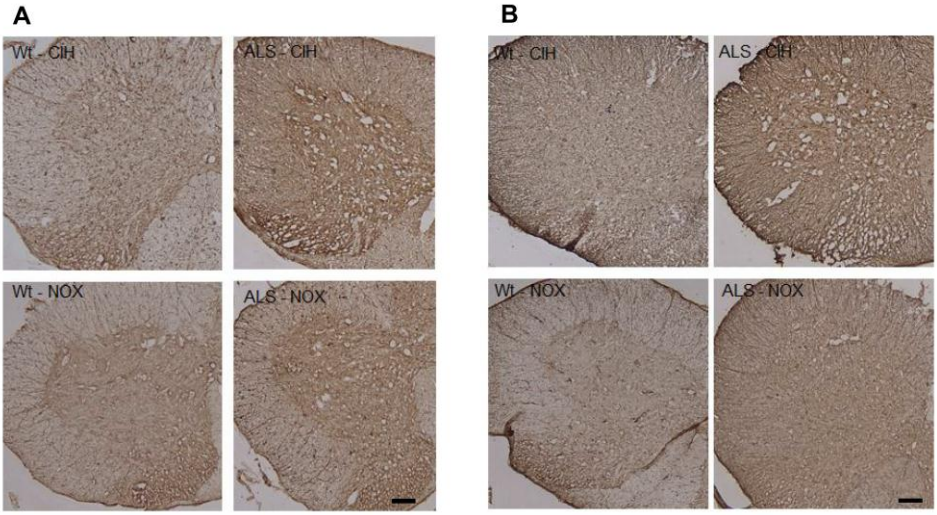


Figure 7. Immunohistochemistry (IHC) for astrocytosis and microgliosis in the ventral horn of the cross-sectioned spinal cord.

Astrocytosis (A) and microgliosis (B) were assessed using IHC assays for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1), respectively. Compared to the ALS-NOX and Wt mice, the ALS-CIH mice showed higher expression of both GFAP (A) and IBA1 (B).

4. 고찰

본 연구에서는 ALS 생체내 모델에서 저산소증이 운동신경세포의 소실과 인지기능의 악화를 유발할 수 있음을 확인하였다. 현재까지 다음과 같은 여러 연구들이 ALS에서 저산소증과 질병의 악화의 관계를 주장한 바 있다. Bourke 등 (Bourke, et al., 2006) 은 호흡부전이 있는 ALS 환자들을 대상으로 NIV를 시행하여 저산소증을 교정한 후 이 환자들에서 생존기간의 연장을 보고한 바 있다. 또한 Vanacore 등 (Vanacore et al., 2010) 은 간헐적 저환기에 노출되기 쉬운 직업군에서 ALS의 발병율이 증가함을 보인 바 있다. 이 외에도 Murakami 등 (Murakami, et al., 2003) 은 ALS 마우스에서 저산소증에 대한 비정상적인 분자생물학적 반응을 확인하기도 하였으며, Van Den Bosch 등 (Van Den Bosch, et al., 2004) 은 ALS 생체외 모델인 세포주를 이용한 연구에서 저산소증과 저혈당증을 같이 ALS 세포주에 주었을 때 운동신경세포가 사멸되는 것을 관찰한 바 있다.

하지만 아직까지 어떤 연구도 저산소증 (간헐적 저산소증 혹은 지속적 저산소증)이 ALS 생체내 모델에서 실제로 운동신경세포의

사멸을 유도한다던지 혹은 증상을 악화시키는 지는 확인하지 못하였다. 심지어 ALS 생체내 모델에서 지속적 저산소증의 영향을 평가하고자 했던 Van den Bosh 등의 연구에서는 ALS 생체내 모델에서 지속적인 저산소증 환경을 조성한 후 실험모델의 증상이 악화되는 지를 관찰하고자 하였으나 유의한 결과를 얻지 못한 바 있다 (Van Den Bosch, et al., 2004).

따라서 기존의 ALS 생체내 혹은 생체외 모델 그리고 ALS 환자들을 대상으로 시행한 연구들은 ALS 에서 저산소증의 영향에 대해 일부 서로 상이한 결과를 보이는 것으로 판단된다. 이렇게 서로 상이한 연구결과의 원인은 아마도 각 연구에 각각 서로 다른 종류의 저산소증을 적용한 것이 가장 큰 원인이라고 사료된다. 예를 들면 기존의 실험 연구에서는 본 연구에서 사용된 CIH 보다는 만성 지속성 저환기 (Chronic continuous hypoxia, CCH)를 사용하거나, 혹은 일부의 생체외 모델을 이용한 실험의 경우 뇌졸중 실험 모델인 저산소증/저혈당증 (hypoxia with hypoglycemia) 모델을 사용하기도 하였다. (Murakami, et al., 2003; Van Den Bosch, et al., 2004). 하지만 기존의 연구에서 hypoxia이후의 분자생물학적 반응은

hypoxia의 종류에 따라 크게 상이한 것으로 알려져 있다 (Ryan, et al., 2005; Arnardottir et al., 2009). 예를 들면 CCH 이후의 주된 분자생물학적 반응은 hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1α) 의 안정화와 이에 따른 적혈구생성인자(erythropoietin, EPO) 와 혈관내피성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 의 전사 증가 (increased transcription)으로 알려져 있으나 이와는 반대로 CIH 이후의 주된 분자생물학적 반응은 본 연구에서 보인 것과 같이 NF-kB pathway의 활성화와 ROS의 생성 증가인 것으로 알려져 있다 (Ryan, et al., 2005).

본 연구의 결과는 또한 ALS 마우스가 Wt 마우스에 비해 CIH에 더욱 취약할 가능성을 시사한다. 기존의 CIH를 이용한 연구에서는 공기 중 최소 산소분획 (minimum FiO2)이 약 5% 정도인 비교적 심한 CIH model을 사용한 반면 (Almendros et al., 2012), 본 연구에서는 공기 중 최소 산소 분획이 7.8%로 비교적 경미한 (mild) CIH model을 사용하였다. 본 연구의 비교적 경미한 CIH 환경 하에서 Wt-CIH 마우스는 Wt-NOX 마우스에 비해 심각한 행동 장애 혹은 분자생물학적 이상을 보이지 않았으나 ALS-CIH 마우스는 ALS-NOX 마우스에 비해 심각한 인지기능장애, 운동신경세포의 사멸,

ROS의 생성증가, 그리고 염증성 경로의 활성화를 보였다.

본 연구에서 사용된 CIH는 실제 ALS 환자들에게서 비교적 흔하게 관찰되는 현상일 것으로 추정된다. 기존 연구 결과에 따르면 약 17–64% 의 ALS 환자들은 수면 중 주기적 (periodic) 혹은 간헐적 (intermittent)인 산소포화도의 감소 (desaturation)를 경험하는 것으로 알려져 있다 (Atalaia et al., 2007; De Carvalho et al., 2009). 또한 기타의 연구에서도 ALS 환자들은 대조군에 비해 약 10배 정도 더 많은 수면 중 무호흡 혹은 저호흡 현상을 경험하는 것으로 보고하고 있으며 이러한 수면중 무호흡 혹은 저호흡 현상은 간헐적 저산소증의 양상으로 나타나는 것으로 알려져 있다 (Ferguson et al., 1996). ALS 환자에서 이러한 간헐적 저환기증의 원인은 아직 명확하지 않다. 하지만 ALS 환자들에서 수면다원검사 (polysomnography) 등을 시행한 최근의 연구에서 Ferguson 등 (Ferguson, et al., 1996) 은 중추신경계의 호흡 관장중추 기능 장애, 호흡근육의 위약 및 피로가 이러한 ALS 환자들의 간헐적 저환기증의 원인이라는 주장을 제시한 바 있다. 또한 이러한 호흡근육의 위약 등으로 인한 간헐적 저환기증은 본 연구에서 보였듯이 ROS의 생성 및 염증성 반응 경로의 항진을 통해 2차적인

신경 손상 및 근 위약을 유발하는 악순환 (vicious cycle)을 통해 ALS 질병의 악화를 더욱 촉진할 것으로 추정된다 (Figure 8).

실험 모델을 이용한 만성간헐적 저산소증의 영향에 대한 실험은 주로 OSA 실험 모델에서 실행되어 왔다. Xu 등 (Xu, et al., 2004) 은 마우스에게 90초 간격으로 반복되는 정상 산소증 (21% O2) 과 저산소증 (5.7% O2) 자극을 통해 CIH를 조성하여 OSA 실험모델을 만들었으며 이를 통해 OSA에서 활성 산화물의 생성이 신경세포의 사멸에 관여함을 밝힌 바 있다. 또한 Chou 등 (Chou et al., 2013) 은 마우스에 5분 간격으로 반복되는 CIH (5% of minimal O2)를 가하여 OSA가 세포사멸에 관여하는 주요 기전을 밝힌 바 있다. 이와 같이 기존의 실험의 경우 CIH의 최소 산소 농도를 약 5%로 비교적 낮게 유지하였으나 본 실험에서는 저산소 단계의 최소 산소 농도가 약 7.8%로 기존의 실험보다는 비교적 경미한 저산소 환경이 조성되었다. 이는 전문 저산소 체임버가 없는 상황에서 자체 제작한 저산소 체임버의 기술적 한계 때문이었으나 보다 더 강한 저산소 환경을 조성하였다면 보다 더 뚜렷한 실험 결과를 보일 수 있었을 수도 있었겠다. 향후 보다 강한 저산소 환경 (예를 들면 최소 산소 농도 5%)을 이용한 ALS에서 CIH의 효과에 대한 실험 또한 필요할

것이다.

본 연구에서는 Wt-CIH 마우스는 Wt-NOX 마우스에 비해 rotarod 유지 시간이 비교적 짧은 경향을 보였으나 통계적인 유의성을 보이지 못하였으며 이외의 행동 검사결과 및 조직검사결과에서도 Wt-CIH 마우스와 Wt-NOX 마우스간의 유의한 차이는 없었다. 그 원인으로는 아마도 위에서 기술한 것과 같은 비교적 경미한 CIH (minimal FiO_2 = 7.8%)를 본 연구에서 사용한 점 (Chou, et al., 2013), 각 군당 마우스 숫자가 8마리로 비교적 적었던 점, 기존 연구에서는 4주 이상의 CIH을 사용하기도 하였으나 (Torres et al., 2013) 본 연구에서는 CIH의 기간이 2주로 비교적 짧았던 점, 또한 한 종류의 성별을 가진 마우스만 사용하여 비교적 균일한 결과를 얻어낸 기존의 일부 연구들과 달리 (Torres, et al., 2013) 본 연구에서는 최대한 실제 임상 환경과 비슷한 조건을 만들기 위해 동일한 숫자의 암수 마우스를 사용하여 상대적으로 마우스간의 편차가 있을 수 있는 점 등이 가능할 것으로 추정된다.

본 연구에서는 마우스들의 기억력의 저하를 검사하기 위해 Y-미로 검사를 시행하였으며 alteration의 비율인 PA를 계산하여 마우스들의 공간기억력을 평가하였다. 이 PA 의 계산은 공간기억력의 유지

표지자인 alteration의 횟수를 마우스들의 이동의 표지자인 각 arm으로의 진입 (entrance) 의 횟수로 보정해주는 지수이다. 본 연구에서는 이러한 PA의 계산법을 통해 ALS 마우스의 근력 악화가 인지기능검사인 Y-미로 검사에 주는 영향을 최소화 할 수 있었을 것으로 사료된다 (Jung, et al., 2012).

본 연구에서는 산화스트레스에 대한 표지자로 4-HNE를 사용하였다. 여러 산화스트레스에 대한 표지자 중 4-HNE를 사용한 이유는 ALS 환자들을 대상으로 시행한 기존 연구에서 실제 환자들의 뇌척수액의 4-HNE가 증가되어 있다는 보고 (Smith et al., 1998) 에 기초한 것으로 실제 본 실험에서도 ALS-CIH 군과 ALS-NOX 군 간에 4-HNE의 유의한 차이가 관찰되었다. 그러나 기존의 OSA 환자를 대상으로 시행한 연구들 (Lavie 2009) 에서 ROS 이외에도 활성질소 (reactive nitrogen species) 또한 모종의 역할을 할 가능성이 제시된 바 있어, 향후 ALS에서 ROS뿐 아니라 활성질소를 통한 CIH의 영향에 대한 연구 또한 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 ALS 환자들의 CIH와 질병 악화와의 연관성을 혈중 산소의 변화에 의한 직접적인 신경 손상의 관점에서 규명하였다.

하지만 CIH는 이 외에도 다양한 기전을 통해 ALS 환자들의 예후에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다. 예를 들어 CIH는 반복되는 저산소증과 고산소증 뿐 아니라 반복되는 고이산화탄소증과 저이산화탄소증 또한 유발할 수 있다. 기존의 연구들에서 Jordan 등 (Jordan et al., 2000) 은 저이산화탄소증이 뇌관류 저하 (cerebral hypoperfusion) 를 유발할 수 있음을 밝힌바 있으며, Curley 등 (Curley et al., 2010) 은 이러한 저이산화탄소증에 의한 뇌관류 저하가 일부 환자들에서 대뇌의 허혈을 일으켜 뇌의 손상을 유발할 가능성을 제시한 바 있다. 이 외에도 저이산화탄소증 이후 발생하는 고이산화탄소증은 뇌관류 저하 이후 재관류 (reperfusion)를 일으키는 것으로 알려져 있으며 (Curley, et al., 2010) 이러한 재관류 현상은 ROS의 생성을 증가시켜 생체 조직의 손상을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다 (Park et al., 2007). 마지막으로 CIH는 OSA 환자들에서 전신적인 대사 증후군 및 다양한 심혈관계 합병증을 유발하여 이 환자들의 예후에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Lavie 2009). 위와 같이 CIH는 ALS 환자들에서 혈중 이산화탄소의 변화에 의한 뇌관류 저하 또는 재관류 손상을 통해 신경계에 손상을 일으킬 수도 있을 것이며, 또는 전신적인 합병증을 통해 이

환자들의 예후에 영향을 미칠 수도 있을 것이다. 이러한 CIH에 의한 다양한 병태생리학적 기전이 ALS 환자 혹은 실험 모델에서 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서도 향후의 연구를 통해 규명이 필요해 보인다.

본 연구의 결과는 위와 같은 중요성이 있겠으나 다음과 같은 단점 또한 있을 것으로 사료된다. 각 군의 동물 숫자가 8마리로 비교적 적어 일부 행동시험에서 경향성을 확인하였음에도 통계적을 유의성을 관찰하지 못한 경우가 있었다. 또한 본 연구에서 CIH or NOX은 생후 14주 마우스에서 시작하였다. 이는 ALS 환자들 또한 실제로 ALS의 증상 발현 이후에 CIH에 노출되기 때문에 생후 74일 경에 증상이 발현되는 ALS 마우스에서 실제 임상 환경과 가장 유사한 실험 환경을 조성하기 위해 설정되었었다 (Tu, et al., 1996; Boillée, et al., 2008). 비록 이러한 실험 디자인은 임상 환경과 유사하다는 장점이 있는 반면 실험의 결과의 판단을 증상이 진행된 상태(advanced disease stage)에서 실시해야 하므로 상대적으로 ALS-CIH군과 ALS-NOX군 간의 차이가 무뎌지는 (blunt) 단점이 있을 수 있을 것으로 추정된다. 본 연구에서 rotarod 시행 12일에 ALS-CIH군의 상대적으로 불량한 rotarod 유지 시간에도 불구하고 양

군간에 통계적 유의성이 없는 것 또한 이러한 영향의 가능성을 고려해야 하겠다. 그 외 본 연구에서 비록 CIH가 마우스의 척수에서 ROS를 생성하고 NF-kB pathway를 활성화 시킴을 확인한 바 있으나 뇌조직에서는 검사를 하지 않았던 점을 들 수 있다. 마지막으로 본 연구에서 Wire 유지 시간에 대한 측정을 Wt 마우스에서도 시행했었으면 추가적으로 흥미로운 결과를 도출했을 수도 있었으나 본 연구의 주요 목적은 CIH의 ALS에 대한 영향을 평가하는 것이었으므로 Wt 마우스의 wire hanging 시간을 측정하지 않은 점을 들 수 있다.

위와 같은 연구방법상의 일부 제한점에도 불구하고 본 연구는 처음으로 ALS 생체내 모델에서 저산소증이 운동신경세포 손상, 인지기능 장애, 그리고 활성 산화물의 생성과 염증성 반응의 활성화를 유발할 수 있음을 보여준 연구이다. 또한 본 연구는 ALS에서 처음으로 CCH가 아닌 CIH의 영향을 평가한 연구이기도 하다.

본 연구를 통해 ALS 환자들이 흔히 겪게 되는 저산소증의 영향을 인지기능 및 질병의 진행이라는 다양한 측면에서 검증함으로써

환자들의 초기 저산소증을 NIV 등을 통하여 적극적으로 교정 해주어야 할 근거를 마련할 수 있었다. 또한 ALS가 대조군에 비해 경미한 정도의 저산소증에도 더욱 취약함을 확인하였고 ALS에서 CIH로 인한 분자생물학적 반응을 확인함으로써 ALS의 병태생리의 규명에 대한 추가적인 단서를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

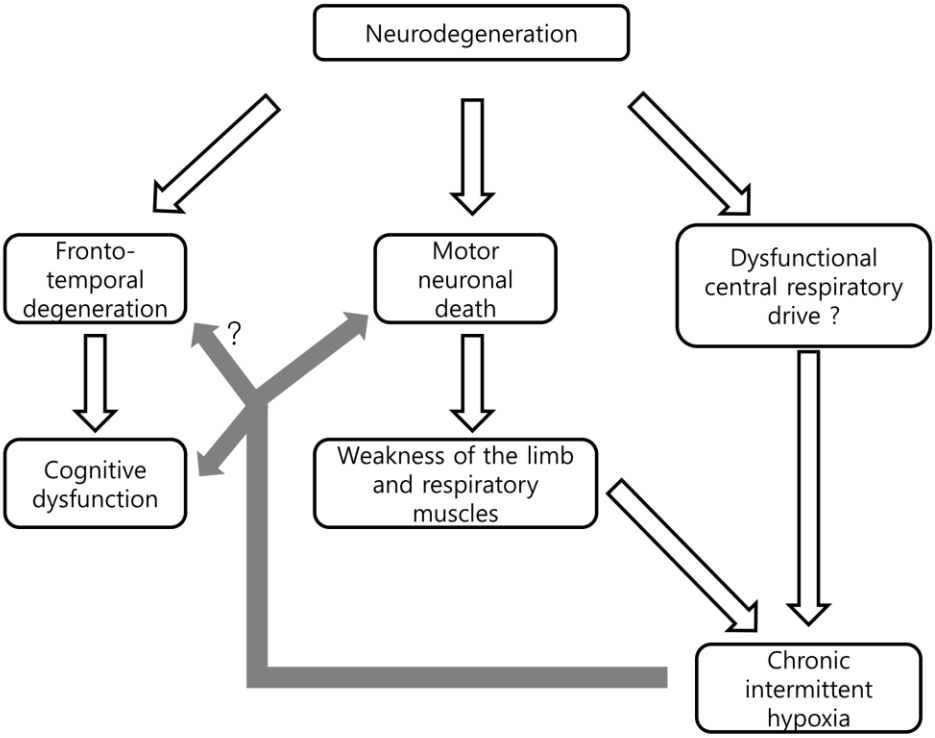


Figure 8. Diagram showing the possible effects of CIH in ALS

Two main features of ALS, cognitive dysfunction and motor weakness, are due to the degeneration of the central nervous system. The symptom of motor weakness, most likely accompanied by dysfunctional central respiratory drive, can cause CIH in patients with ALS. CIH, in turn, might aggravate motor neuronal loss and cognitive dysfunction in ALS via the generation of reactive oxygen species and/or activation of inflammatory pathways.

참고문헌

Adams, N, Strauss M, Schluchter M et al., (2001). "Relation of measures of sleep-disordered breathing to neuropsychological functioning." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(7): 1626-1631.

Ahn, SW, Kim JE, Park KS et al., (2012). "The neuroprotective effect of the GSK-3beta inhibitor and influence on the extrinsic apoptosis in the ALS transgenic mice." *J Neurol Sci* **320**(1-2): 1-5.

Almendros, I, Montserrat JM, Torres M et al., (2012). "Obesity and intermittent hypoxia increase tumor growth in a mouse model of sleep apnea." *Sleep Med* **13**(10): 1254-1260.

Andersen, PM, Borasio GD, Dengler R et al., (2007). "Good practice in the management of amyotrophic lateral sclerosis: clinical guidelines. An evidence-based review with good practice points. EALSC Working Group." *Amyotroph Lateral Scler* **8**(4): 195-213.

Arnardottir, ES, Mackiewicz M, Gislason T et al., (2009). "Molecular signatures of obstructive sleep apnea in adults: a review and perspective." *Sleep* **32**(4): 447.

Atalaia, A, Carvalho MD, Evangelista T et al., (2007). "Sleep characteristics of amyotrophic lateral sclerosis in patients with preserved diaphragmatic function." *Amyotrophic Lateral Sclerosis* **8**(2): 101-105.

Bach, J (1995). "Amyotrophic lateral sclerosis: predictors for prolongation of life by noninvasive respiratory aids." *Archives of physical medicine and rehabilitation* **76**(9): 828.

Boillée, S and Cleveland DW (2008). "Revisiting oxidative damage in ALS: microglia, Nox, and mutant SOD1." *J Clin Invest* **118**(2): 474.

Bourke, SC, Tomlinson M, Williams TL et al., (2006). "Effects of non-invasive ventilation on survival and quality of life in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a randomised controlled trial." *Lancet Neurol* **5**(2): 140-147.

Chou, Y, Zhan G, Zhu Y et al., (2013). "C/EBP Homologous Binding Protein (CHOP) Underlies Neural Injury in Sleep Apnea Model." *Sleep* **36**(4): 481.

Christou, K, Kostikas K, Pastaka C et al., (2009). "Nasal continuous positive airway pressure treatment reduces systemic oxidative stress in patients with severe obstructive sleep apnea syndrome." *Sleep medicine* **10**(1): 87.

Crawley, JN (2008). "Behavioral phenotyping strategies for mutant mice." *Neuron* **57**(6): 809-818.

Curley, G, Kavanagh B and Laffey J (2010). "Hypocapnia and the injured brain: more harm than benefit." *Critical care medicine* **38**(5): 1348.

De Carvalho, M, Costa J, Pinto S et al., (2009). "Percutaneous nocturnal oximetry in amyotrophic lateral sclerosis: periodic desaturation." *Amyotrophic Lateral Sclerosis* **10**(3): 154-161.

Devos, D, Moreau C, Lassalle P et al., (2004). "Low levels of the vascular endothelial growth factor in CSF from early ALS patients." *Neurology* **62**(11): 2127.

Ferguson, KA, Ahmad D, George CF et al., (1996). "Sleep-disordered breathing in amyotrophic lateral sclerosis." *Chest* **110**(3): 664-669.

Jordan, J, Shannon J, Diedrich A et al., (2000). "Interaction of carbon dioxide and sympathetic nervous system activity in the regulation of cerebral perfusion in humans." *Hypertension* **36**(3): 383.

Jung, BK, Pyo KH, Shin KY et al., (2012). "Toxoplasma gondii Infection in the

Brain Inhibits Neuronal Degeneration and Learning and Memory Impairments in a Murine Model of Alzheimer's Disease." *PLoS One* **7**(3): e33312.

Karl, T, Pabst R and von Horsten S (2003). "Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research." *Exp Toxicol Pathol* **55**(1): 69-83.

Kim, SM, Lee KM, Hong YH et al., (2007). "Relation between cognitive dysfunction and reduced vital capacity in amyotrophic lateral sclerosis." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **78**(12): 1387-1389.

Kim, SM, Park KS, Nam H et al., (2011). "Capnography for assessing nocturnal hypoventilation and predicting compliance with subsequent noninvasive ventilation in patients with ALS." *PLoS One* **6**(3): e17893.

Lambrechts, D, Storkebaum E, Morimoto M et al., (2003). "VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death." *Nature genetics* **34**(4): 383.

Lavie, L (2009). "Oxidative stress--a unifying paradigm in obstructive sleep apnea and comorbidities." *Progress in cardiovascular diseases* **51**(4): 303.

Lomen-Hoerth, C, Murphy J, Langmore S et al., (2003). "Are amyotrophic lateral sclerosis patients cognitively normal?" *Neurology* **60**(7): 1094-1097.

McGuire, V, Longstreth Jr W, Koepsell T et al., (1996). "Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in three counties in western Washington state." *Neurology* **47**(2): 571.

Miller, R, Mitchell J and Moore D (2000). "Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND)." *Cochrane database of systematic reviews (Online)*(2): CD001447.

Moreau, C, Devos D, Brunaud-Danel V et al., (2006). "Paradoxical response of VEGF expression to hypoxia in CSF of patients with ALS." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**(2): 255.

Muller, F, Liu Y, Jernigan A et al., (2008). "MnSOD deficiency has a differential effect on disease progression in two different ALS mutant mouse models." *Muscle & nerve* **38**(3): 1173.

Murakami, T, Ilieva H, Shiote M et al., (2003). "Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor is selectively impaired in mice carrying the mutant SOD1 gene." *Brain Res* **989**(2): 231-237.

Newsom-Davis, IC, Lyall RA, Leigh PN et al., (2001). "The effect of non-invasive positive pressure ventilation (NIPPV) on cognitive function in amyotrophic lateral sclerosis (ALS): a prospective study." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **71**(4): 482-487.

Oosthuyse, B, Moons L, Storkebaum E et al., (2001). "Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration." *Nat Genet* **28**(2): 131-138.

Park, A, Nagase H, Kumar S et al., (2007). "Effects of intermittent hypoxia on the heart." *Antioxidants & redox signaling* **9**(6): 723.

Park, JH, Hong YH, Kim HJ et al., (2007). "Pyruvate slows disease progression in a G93A SOD1 mutant transgenic mouse model." *Neurosci Lett* **413**(3): 265-269.

Park, SY, Kim SM, Sung JJ et al., (2013). "Nocturnal Hypoxia in ALS Is Related to Cognitive Dysfunction and Can Occur as Clusters of Desaturations." *PLoS One* **8**(9): e75324.

Pedersen, WA, Fu W, Keller JN et al., (1998). "Protein modification by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis patients." *Ann Neurol* **44**(5): 819-824.

Rosen, D (1993). "Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis." *Nature* **364**(6435): 362.

Ryan, S, Taylor CT and McNicholas WT (2005). "Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome." *Circulation* **112**(17): 2660-2667.

Schiffman, PL and Belsh JM (1993). "Pulmonary function at diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Rate of deterioration." *Chest* **103**(2): 508-513.

Shan, X, Chi L, Ke Y et al., (2007). "Manganese Superoxide Dismutase Protects Mouse Cortical Neurons From Chronic Intermittent Hypoxia-Mediated Oxidative Damage." *Neurobiol Dis* **28**(2): 206.

Smith, R, Henry Y, Mattson M et al., (1998). "Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* **44**(4): 696.

Smith, RG, Henry YK, Mattson MP et al., (1998). "Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis." *Ann Neurol* **44**(4): 696-699.

Torres, M, Montserrat JM, Pavia J et al., (2013). "Chronic intermittent hypoxia preserves bone density in a mouse model of sleep apnea." *Respir Physiol Neurobiol* **189**(3): 646-648.

Tu, P-H, Raju P, Robinson KA et al., (1996). "Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal

cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(7): 3155-3160.

Valentine, J and Hart P (2003). "Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(7): 3617.

Van Den Bosch, L, Storkebaum E, Vleminckx V et al., (2004). "Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on motor neuron degeneration." *Neurobiol Dis* **17**(1): 21-28.

Vanacore, N, Cocco P, Fadda D et al., (2010). "Job strain, hypoxia and risk of amyotrophic lateral sclerosis: Results from a death certificate study." *Amyotrophic Lateral Sclerosis* **11**(5): 430-434.

Xu, W, Chi L, Row B et al., (2004). "Increased oxidative stress is associated with chronic intermittent hypoxia-mediated brain cortical neuronal cell apoptosis in a mouse model of sleep apnea." *Neuroscience* **126**(2): 313.

영문 초록

Background: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive degenerative disease of the central nervous system that manifests as motor weakness due to motor neuronal death and results in cognitive dysfunction. Patients with ALS may be exposed to variable degrees of chronic intermittent hypoxia. However, all previous experimental studies on the effects of hypoxia in ALS have only used a sustained hypoxia model and it is possible that chronic intermittent hypoxia exerts effects via a different molecular mechanism from that of sustained hypoxia. No study has yet shown that hypoxia (either chronic intermittent or sustained) can affect the loss of motor neurons or cognitive function in an in vivo model of ALS.

Objective: To evaluate the effects of chronic intermittent hypoxia on the loss of motor neurons and cognitive function in ALS mice.

Methods: Sixteen ALS mice and 16 wild-type mice were divided into 2 groups and subjected to either chronic intermittent hypoxia or normoxia for 2 weeks. The effects of chronic intermittent hypoxia on ALS mice were evaluated using the rotarod, Y-maze, and wire-hanging tests. In addition, numbers of motor neurons in the ventral horn of the spinal cord were counted and western blot analyses were performed for markers of oxidative stress and inflammatory pathway activation.

Results: Compared to ALS mice kept in normoxic conditions, ALS mice that experienced chronic intermittent hypoxia had poorer motor learning on the rotarod test, poorer spatial memory on the Y-maze test, and fewer motor

neurons in the ventral spinal cord. Compared to ALS-normoxic and wild-type mice, ALS mice that experienced chronic intermittent hypoxia had higher levels of oxidative stress and inflammation.

Conclusions: Chronic intermittent hypoxia can aggravate motor neuronal loss and cognitive dysfunction in ALS mice, and the generation of oxidative stress with activation of inflammatory pathways may be associated with this mechanism. Our study will provide insight into the association of hypoxia with disease progression, and in turn, the possibility of an early non-invasive ventilation treatment in patients with ALS.

Keywords: Amyotrophic lateral sclerosis, intermittent hypoxia, oxidative stress

Student Number: 2007-30543

감사의 글

멀게만 느껴졌던 박사 논문을 은사님과 많은 선생님들의 도움을 받아 마무리하게 되었습니다. 근위축성 측삭경화증에서의 저환기/저산소증이라는 주제는 신경과 전공의사 과정을 시작한 지 얼마 되지 않은 시기에 처음 막연하게 관심을 가지게 되었습니다. 당시 저는 뇌신경과학을 전공한 지 얼마 되지 않은 시기라 연구를 계획하고 추진할 역량이 턱없이 부족한 상태였으나, 당시에도 선생님들의 지도와 도움 하에 근위축성 측삭경화증 환자들의 저환기증과 인지기능과의 연관성에 대한 주제로 제 생애 첫 논문을 작성할 수 있었고 석사 학위도 무사히 마칠 수 있었습니다. 이후에도 많은 선생님들의 지도와 도움으로 이 저산소증의 근위축성 측삭 경화증 동물 모델에서의 영향과 기전이라는 주제로 박사 학위를 마치게 되었습니다.

뇌신경과학뿐 아니라 임상의사의 자세, 그리고 삶에 대해서 항상 아낌없는 가르침을 베풀어 주신 지도교수님이신 이광우 교수님께 진심으로 감사의 말씀을 올립니다. 선생님께서는 마치 가족처럼 저의 좋은 일에는 같이 기뻐해 주시고 행여 그렇지 않은 일에는 진심 어린 걱정과 조언을 해주셨습니다. 많이 부족한 제자이지만 은사님께서 지나신 길에 누가 되지 않도록 항상 학업뿐 아니라 삶에 바른 자세로 정진하고자 합니다. 또한 바쁘신 와중에도 많이 부족한 이 논문을 개선할 수 있도록 많은 가르침을 베풀어 주신

약리학 교실의 김용식 교수님, 해부학 교실의 차중익 교수님, 그리고 건국대학교 의과대학 신경과학 교실의 한설희 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 석사 논문의 시작부터 박사 논문의 마무리까지 환자들의 인지기능 검사뿐 아니라 동물 실험 전반에 대한 아낌없는 도움과 가르침을 주신 이경민 교수님과 동물 행동 평가를 무사히 마칠 수 있도록 도움을 주신 약리학 교실의 서유헌 교수님께 감사를 드립니다. 이번 실험이 마무리 될 수 있도록 중요한 도움을 주시고 이 외에도 많은 연구를 지도해 주신 성정준 교수님, 어려운 시기에 제게 과분한 도움을 주신 박경석 교수님, 그리고 항상 후학들에게 모범이 되어 주시는 홍윤호 교수님께도 감사 드립니다. 실험 연구에 어려움이 있었을 때 도움의 손길을 주신 한양대학교 의과대학 신경과학 교실의 김승현 교수님과 김희정 박사님께도 감사를 드립니다. 조직 검사에 중요한 도움을 준 전계선 박사님, 이정선 연구원, 그리고 손지흔 연구원에게도 고마운 마음을 전합니다.

저를 이 세상에 있게 해주시고 사랑으로 키워주신 부모님께는 어떠한 감사의 글도 부족할 것 같습니다. 항상 저를 친아들처럼 아껴주시는 아버님과 어머님께도 진심으로 감사 드립니다. 힘들 때 세상 그 무엇보다도 제게 힘이 되는 존재인 예나, 이담, 해담에게 사랑과 고마움을 전합니다.

다시 한번 이 논문이 완성되기까지 많은 도움을 주신 분들께 머리 숙여 깊은 감사를 올립니다.