

急性一酸化炭素中毒이 白鼠肝臟에 미치는 影響에 關한 病理組織化學的 및 酵素組織化學的 研究

Histopathologic and Enzyme Histochemical Studies on Effects of Acute Carbon Monoxide Poisoning in Rat Liver

서울大學校 醫科大學 病理學教室* 및 豫防醫學教室**

咸 毅 根* · 宋 啓 用* · 尹 德 老**

緒 論

一酸化炭素(CO)는 無色, 無味, 無臭의 氣體이며 無煙炭(煉炭)과 各種 油類等 燃料의 不完全燃燒로 잘 發生되는 가담에 우리나라 生活環境에서 急性 또는 慢性 中毒의 危險성이 恒상 存在하고 있음은 周知의 事實이다(尹, 1959; McBay, 1965; 尹等, 1977).

一酸化炭素는 血色素(Hemoglobin, Hb)와의 親和力이 酸素의 그것보다 200倍以上 強하여서 容易하게 carboxy hemoglobin(CO-Hb) 複合體를 이루어 혈색소의 酸素運搬機能을 저해하고 酸素解離를 억제함으로써 酸素解離曲線을 左側으로 이동시켜 組織의 低酸素症을 招來한다(Roughton, 1945; McBay, 1965; Goldsmith, 1968). 또 一酸化炭素는 cytochrome oxidase와 結合하여 조직호흡을 억제하여 조직 ATP生成을 저해하는 가담에(Ball, 1952; Pitts, 1970; 배, 1980) 단순한 低酸素症이보다 더 強한 影響을 주게되므로 一酸化炭素는 組織酵素缺乏型 有毒性가스라할 수 있으며 曝露된 個體의 여러 臟器組織의 退行性變化를 일으켜 機能減退를 招來함을 본다.

急性 및 慢性一酸化炭素中毒이 各臟器에 미치는 病理組織學的 觀察는 腦, 心, 腎, 肝, 肺와 胎盤等에서 實驗報告되고 있으며 그 共通된 所見은 各臟器의 모세혈관 확장, 鬱血, 浮腫, 退行性變化 및 壞死로 記錄되어 있다(김, 1971; 김 1973; 송等, 1977, 1978; 박等, 1980; Campbell, 1929; Ehrlich, 1944; Cosby等 1963) 또한 組織化學的 觀察에서는 肝 RNA 및 DNA(한等, 1975) 및 肝, 胎盤糖原質의 減少를(배, 1975; 박等, 1980; Bloom, 1938), 酵素組織化學的 觀察로는 心, 腦, 腎肝과 胎盤等의 NADH diaphorase, succinic dehydrogen-

ase(SDH), Lactic dehydrogenase(LDH), Cytochrome Oxidase, ATPase, Alkaline phosphatase (Alk. P.), Acid phosphatase(Acid. P.) 등의 活性度變動을 報告하고 있다(Stowell, 1961; Ziegler, 1967 임, 1970; 권, 1974; 배, 1975; 배等, 1976, 이, 1976; 송等, 1978; 이(두), 1979; 박等, 1980); 1980; 이 이상의 觀察과 함께 各臟器細胞의 微細構造變化로 絲粒體 및 內形質網(endoplasmic reticulum)의 腫脹 및 空胞性變化和 絲粒體稜의 分切 및 消失等이 觀察報告되고 있다(Bryant等, 1958; Bassi等, 1960, 박等, Lehninger 1962; 1964; Brewer, 1965; Oudéa等 1967; 이, 1976; 1980).

白鼠肝은 組織學的 部位에 따라 組織化學 및 細胞內 미세구조 형태를 달리하는 特異性이 있어 組織學的 部位에 따르는 機能變動을 觀察하려는데 많이 이용되고 있어 即 Novikoff(1959)는 白鼠肝細胞의 絲粒體形態가 肝葉間脈帶에서는 細絲型(filament type)으로 그 數가 많으며 肝葉中心帶에서는 圓型(round type)으로 그 數는 적다고 하였고 組織化學的으로 洞壁과 細膽管 및 膽管에 有關하는 間脈帶에서는 ATPase, Alk.P, Acid P, SDH, 및 cytochrome oxidase 治性도가 높고 반면 5-nucleotidase 및 酸化性酵素(oxidative enzyme)인 NADH diaphorase, LDH와 glutamin dehydrogenase等은 中心帶에서 活性도가 높아서 特異性인 組織化學的 所見을 보이며 glucose 6-phosphatase는 肝葉全體에 均等하게 活性는 나타내고 있어 肝葉內 이들의 活性도는 肝組織內絲粒體의 生物學的 性狀 및 保有數量과 직접적인 관련이 있다.(Seligman, 1951; Schmacher, 1957; Shank, 1959; Kinnula, 1976; 이, 1976).

Gallagher等(1956) 및 Dawkin等(1959)은 肝組織自家融解(autolysis) 過程에서 酸化磷酸反應(oxidative phosphorylation)이 가장쉽게 침해되어 初期에 機能減退를 招來함을 報告하였던 바 酸化磷酸反應과 關聯이 깊다고 理解되는 SDH, NADH diaphorase等을 中心으

* 本 研究은 峨山社會福祉事業財團 研究支援費(1979)로 이루어진 것임.

로한 酵素活性變動을 觀察하려는 組織化學의 試圖은 低酸素狀態에서의 初期細胞變化를 觀察하는데 있어 相當한 研究對象이라고 생각되며 特히 肝은 속크(shock), 心筋梗塞性心不全等 低酸素症에 敏感하여 組織反應을 招來하는 器臟임에 急性一酸化炭素中毒時에 肝에 顯著한 病理組織學的 및 組織化學的 變化가 發生되리라 豫測케 된다.

그러므로 著者는 急性一酸化炭素中毒白鼠의 肝臟에서 觀察되는 病理組織學的의 所見과 各種酵素의 組織化學的 活性變動狀態를 把握하여 그 初期病態를 研究하기 위하여 急性一酸化炭素曝露後 白鼠肝의 組織材料에서 H&E, NADH diaphorase, SDH, LDH, Alk. P.와 Acid P. 등의 組織染色을 시행하여 肝의 病理組織學的 變化와 各酵素의 活性變動을 組織化學的으로 觀察하여 一酸化炭素의 曝露量과의 關聯性과 肝部位에 따른 侵害度를 檢索하였으며 急性一酸化炭素中毒에 依한 肝損傷의 病因機轉 및 本態를 說明하는 知見에 도움하고자 本實驗을 實施하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗動物

實驗動物은 同一環境內에서 飼育된 體重의 210~280 gm.의 Sprague-Dawley系 白鼠 97마리며 이들중 32마리는 豫備實驗에, 65마리는 本實驗에 各各 使用되었다

2. 一酸化炭素(CO)의 製造 및 稀釋

三方 cock管內에 濃黃酸을 넣고 水槽 속에서 100°C로 加溫한 後 개미산(formic acid)을 點滴시켜 發生되는 一酸化炭素를 捕集하였으며 이것은 純도가 96~98%가 된다. 이를 wet gas meter와 Douglas bag을 使用하여 稀釋하였으며 實驗에 使用된 一酸化炭素의 濃度は Infrared CO analyzer(英, Grubb Parson社製 Model 200)와 CO檢知管(日本, Kitagawa社製 Cat No. 100)으로 測定하였다.

3. 豫備實驗

一酸化炭素曝露後 致死時間이 30分, 60分, 120分되는 一酸化炭素의 濃度を 알기 위하여 一酸化炭素를 1%, 0.8%, 0.6%, 0.4%되게 稀釋하여 各各의 濃도에 대하여 8마리씩 曝露시켜 致死時間을 測定하였다. 實驗結果耐성에 대한 個體差異가 있어 50%가 死亡하는 時間을 測定하여 30分致死濃도로 1%, 60分致死濃도로 0.7% 그리고 120分 致死濃도로 0.4%를 定하였다.

4. 本實驗

實驗動物들은 正常對照群 15마리, 1% CO曝露群 30마리, 0.7% CO曝露群 12마리와 0.4% CO曝露群 8마

리等 四群으로 나누어 實驗하였으며 病理組織學的 檢索은 모든 動物에서 組織化學的檢索은 各群의 切半에서 시행하였다.

5. 曝露方法

一酸化炭素曝露方法은 白鼠를 gas chamber(190cm×45cm×30cm)에 부착된 吸引裝置로 1%, 0.7%와 0.4%의 CO가 10~15l/min의 量이 흡입되도록 조절한후 群別로 30分, 60分과 120分間曝露하였으며 gas chamber內의 一酸化炭素濃度は 20分, 40分과 60분에 各各 측정하여 一定하게 유지하였으며 同時에 酸素濃도가 18%以上되도록 oxygen analyzer(美, Taylor社 OA 269)를 利用하여 一般大氣를 chamber內로 送入하였다.

6. 病理組織學的 및 組織化學的 方法

對照群 및 曝露群의 白鼠를 에텔마취하에 開腹하여 肝臟을 摘出하고 組織檢索用으로 10%中性포르말린 溶液에 固定한 후 파라핀包埋하여 4~5 μ 으로 薄切後 Hematoxylin-Eosin(H&E)染色을 시행하여 光學顯微鏡으로 檢索하였다. 組織化學的檢索을 위해 -20°C의 frozen medium으로 조직절편을 凍結시킨 후 凍結切片機(cryostat)로 10 μ 두께로 薄切하여 SDH, NADH diaphorase, LDH, Alk. P.와 Acid P. 등의 染色을 실시하였다.

SDH: Naclas等의 方法을 따라 0.2M phosphate buffer(pH 7.6) 5ml에 Nitro BT(nitroblue tetrazolium) 溶液(1mg/ml) 10ml와 0.2M sodium succinate 5ml를 混合한 基質溶液을 使用하여 37°C 恒溫器內에서 同時에 30分間 反應시켰다.

NADH diaphorase: Farber等의 方法을 使用했으며 0.2M phosphate buffer(pH 7.4) 4ml, nitro BT(1mg/ml) 4ml, 증류수 4ml와 NADH 10mg을 混合하여 만든 基質溶液을 使用하여 37°C恒溫器內에서 30分間 反應시켰다.

LDH: Scapelli等의 方法을 使用했고 0.06M phosphate buffer(pH 7.0) 2.5ml, 60% sodium DL lactate 0.2ml, NAD 6.6mg, 0.1M NaCN(pH 7.0) 1ml, 0.005M MgCl₂·H₂O 1ml, Nitro BT 2.5ml, 증류수 2.8ml, polyvinyl pyrolidone 750mg을 混合하여 만든 基質溶液을 使用하여 37°C恒溫器內에서 30分間 反應시켰다.

以上の 3가지 方法은 모두 nitro BT를 使用함으로 酵素活性度는 diformazan生成量에 따라 暗靑色 또는 靑紫色으로 나타나게 되며 酵素의 活性은 暗靑色 또는 靑紫色의 強度에 比例하게 된다.

Alk. P.: Burstone의 方法을 使用하였으며 0.2M tris buffer(pH 9.2) 25ml, Naphthol AS biphosphoric acid 5mg, dimethylformamide 0.2ml, 증류수 25ml,

Red violet LB salt 30mg을 혼합하여 만든 基質溶液을 使用하여 whatman No. 2로 여과한후 37°C恒溫器에서 30分間 反應시켰으며 酵素의 活性은 赤色の 強度에 比例 한다.

Acid P.: Burstone의 方法을 使用했으며 0.2M acetic acid buffer(pH 5.2), naphthol AS biphosphoric acid 5mg. dimethylformamide 0.2ml, 증류수 25ml, Red violet LB salt 30mg을 혼합하여 만든 基質溶液을 使用하여 whatman No. 2로 여과한후 37°C 恒溫器에서 3時間 反應시켰으며 酵素의 活性度는 赤色の 強度에 比例한다.

以上の 組織化學的 反應은 各酵素에 따라 對照群을 同一한 條件下에서 同時에 反應시키고 染色程度를 測定한 후 各酵素의 活性度를 ○:음성, ±:微弱 +:輕度 ++:中等度 卅:強反應 등으로 表示하였다.

實驗 成績

1. 病理組織學的 所見

對照群과 白鼠의 肝에서 鬱血이나 退行性變化는 觀察되지 아니하였으나 2例에서 輕度の 中心帶性 脂肪變性이 觀察되었다. 1% CO를 30分間 急性曝露한 實驗群에서 肝中心靜脈을 中心으로 中間帶洞腔까지 波及된 中等度 乃至 高度의 鬱血을 보았으며 肝細胞의 好酸性退行變化(acidophilie degeneration), 核濃縮 細胞

萎縮과 出血性壞死等이 觀察되었다. 鬱血程度가 增加됨에 따라 그 變化가 增加되었다. 中心帶에서는 肝細胞의 萎縮으로 因하여 肝細胞實質의 크기가 減少되어 洞腔(sinu-soidal space)과 中心靜脈은 확장되어 있었다. 以上과 같은 退行性 變化는 심한 鬱血의 同伴없이도 中心帶 또는 中間帶에서 觀察되었다.

0.7% CO를 60分間急性曝露한 實驗群과 0.4% CO를 120分間 曝露한 實驗群의 肝에서는 1% CO를 30分間 曝露한 實驗群에 비해 鬱血 및 退行性變化의 程度가 輕減되었다. 出血性 壞死는 두 實驗群에서 各各 1例씩 觀察되었다.

以上の 結果로본래 急性 一酸化炭素曝露後의 白鼠肝에서의 病理組織學的 變化는 中心靜脈과 洞腔에 中等度 以上の 鬱血과 肝細胞의 好酸性 退行變化, 核濃縮, 細胞萎縮과 出血性壞死와 脂肪變性 등이 있으며 最脆弱部는 肝中心帶로써 그 組織變化的 程度는 高濃度短期曝露群에서 더 顯著하였다.

2. 組織化學的 所見

a. NADH diaphorase 活性度: 對照群肝의 NADH diaphorase活性度는 肝小葉의 全帶에서 中等度 乃至 高度로 나타났으나 比較的 中心帶에서 間脈帶보다, 좀 더 強陽性反應을 보였다.

1% CO·30分曝露群 肝에서는 對照群에 비해 個體差를 두고 輕度 乃至 中等度の 活性減少를 全體의으로 나타냈으며 中心帶와 中間帶에서 顯著하였고 肝細胞壞

Table 1. Histopathologic changes resulting from different degree of acute carbon monoxide exposure in rat liver

Histopathology	Groups	Conc. of CO /No. of Rats.	Control				30 min. exp			60 min. exp.			120 min. exp.						
			○	±	+	++	卅	-	±	+	++	卅	○	±	+	++	卅		
Congestion	Control	Z.	15					5	15	7	3	3	6	3			5	2	1
	Middle	Z.	15					5	15	7	3	3	6	3			5	2	1
	Portal	Z.	15					5	18	7		7	4	1			6	2	
Acidophilic degeneration	Control	Z.	15					10	12	8		7	3	2			6	1	1
	Middle	Z.	15					10	12	8		8	2	2			6	1	1
	Portal	Z.	15					17	10	3		10	1	1			7	1	
Necrosis	Control	Z.	15					28	1	1		11	1				7	1	
	Middle	Z.	15					29	1			11	1				7	1	
	Portal	Z.	15					29	1			12					8		
Fatty change	Control	Z.	13	2				17	9	4		9	3				7	1	
	Middle	Z.	13	2				20	8	2		9	3				7	1	
	Portal	Z.	15					25	5			11	1				8		

*Degree: -: Negative ±: Ragre +: mild ++: modiate 卅: marked, Z: Zone, Exp: exposure
Conc.: Concentration

死 또는 萎縮所見이 觀察된 中心帶에서는 活性減少가 더 顯著하였다. 0.7% CO·60分間曝露, 0.4% CO·120分間曝露의 兩群에서도 輕度乃至 中等度の NADH diaphorase活性을 나타내어 同一한 活性度分布를 나타냈다.

b. Succinic dehydrogenase(SDH) 活性度 : 對照群의 肝의 SDH活性度는 肝 中心帶와 中間帶에서는 中等度로 間脈帶에서는 高度로 나타내었다.

1% CO·30分曝露群의 肝에서는 個體差를두고 肝小葉全帶에 全體의로 輕度乃至 中等度の 活性減少를 나타냈으며 특히 肝細胞의 壞死또는 萎縮이 있는 中心帶에서 顯著하였다.

0.7% CO·60分間曝露, 0.4% CO·120分間 曝露의 兩群에서도 1% CO·30 分間 曝露群과 類似한 組織學的 分布의 活性度減少를 나타내었다.

c. Lactic dehydrogenase(LDH) 活性度 : 對照群의 肝細胞에서 LDH의 活性度는 肝小葉 各部位에서 輕度로 나타나서 靑紫色으로 好染되었으며 部位別로 큰 活性의 차이는 지적하기 어려웠다.

1% CO·30分間曝群은 肝小葉 部位에 따라 그 活性出現狀態가 달라서 즉 中心帶와 中間帶에서는 輕度の

減少를, 間脈帶에서는 오히려 輕度の 增加를 나타내었고 壞死部位는 그 活性이 극히 미약하였다.

0.7% CO·60分間曝露와 0.4% CO·120分間曝露의 兩群에서도 1% CO·30分間曝露群의 肝에서의 活性出現이 類似하였다.

d. Alkaline phosphatase(Alk. P.) 活性度 : 白鼠肝의 Alk. P.의 活性活는 間脈帶의 膽管壁과 散在된 kupffer cell에서 中等度로 나타났으나 肝細胞實質에서 그 活性이 극히 미약하여 對照群과 急性一酸化炭素曝露群間에 Alk. P의 活性度の 差異있는 變動을 觀察할 수 없었다.

e. Acid phosphatase(Acid P.) 活性度 : 對照群의 毛細膽管(bile canaliculi)에 연한 肝細胞에서 輕度の Acid P. 活性을 나타냈고 그 活性은 間脈帶가 中心帶에서 보다 좀더 強하였다.

1% CO·30分間曝露群에서 肝小葉 全體에서 個體差를 인정하나 一般의 對照群에 비해 微弱한 活性增加를 觀察할 수 있었으며 0.7% CO·60分間曝露와 0.4% CO·120分間 曝露의 兩群에서는 對照群에 비해 輕度の 活性增強을 나타내었으며 間脈帶에서 좀더 顯著하였다. 以上の 酵素組織化學의 所見을 總括하여 보면 急性一

Table 2. Enzyme histochemical changes resulting from different degree of acute CO exposure in rat liver

Enzyme	Groups Conc. of CO /No. of Rats	Control	30 min Exp.	60 min exp.	120 min CO
		8	15	5	5
	Site.		1% CO	0.7% CO	0.4% CO
NADH diaphorase	Central Z.	卅	+	+	+
	Middle Z.	卅	+	+	+
	Portal Z.	卅	卅	卅	卅
SDH	Central Z.	卅	±	±	±
	Middle Z.	卅	+	+	+
	Portal Z.	卅	卅	卅	卅
LDH	Central Z.	+	±	±	±
	Middle Z.	+	±	±	±
	Portal Z.	+	卅	卅	卅
Alk. Phosphatase	Central Z.	-	-	-	-
	Middle Z.	-	-	-	-
	Portal Z.	+	+	+	+
Acid Phosphatase	Central Z.	+	+	卅	卅
	Middle Z.	+	+	卅	卅
	Portal Z.	+	+	卅	卅

* Degree; - : Negative, ± : meagre, + : mild, 卅 : modete, 卅 : marked, exp: exposure, Z: Zone, Conc.: Concentration

酸化炭素中毒白鼠에서 NADH diaphorase와 SDH는 肝小葉中心帶와 中間帶에서 輕度乃至中等度の 活性減少를, LDH活性도는 中心帶와 中間帶에서 輕度の 活性減少를 보이거나 中間帶에서 輕度の LDH活性增強을 나타내었으며, Alk. P.는 그 活性이 肝小葉에서 극히 미약하게 觀察되어 實驗群에서 그 差異를 觀察할 수 없었으며 Acid. P.는 對照群에 비해 輕度の 活性增強을 나타냈다. 各 酵素의 活性도는 壞死 또는 退行性變化 및 萎縮所見을 나타낸 部位에서는 增減되었고 中心帶에서 특히 그것이 顯著하였다.

總括 및 考按

1%CO를 急性曝露後 白鼠肝에서 觀察된 病理組織學的 變化는 中心靜脈 및 中間帶洞壁에 中等度の 鬱血과 焦點性 및 多發性出血性壞死와 肝細胞의 好發性退行性變化核濃縮 및 脂肪變性等이었으며 最脆弱는 肝中心帶로서 以上の 退行性變化는 中心靜脈鬱血의 同伴없이도 觀察되었다. 肝小葉에서의 組織變化的 程度는 高濃度短期曝露群에서 더 顯著하였다.

急性一酸化炭素中毒時 各臟器에는 심한 鬱血, 浮腫 또는 壞死等이 發生한다고 報告되고있다. 即, 金(1977)은 肝과 腎에서 심한 鬱血 및 壞死를 肺에서는 鬱血 및 肺浮腫等을 報告하고 있다. 本實驗에서도 肝에서 中等度の 鬱血과 肝細胞의 萎縮 및 好酸性退行變化的 壞死가 招來된 것과 一致되는 病理組織學的 所見이라 할 수 있다. 또 本實驗에서 肝小葉中心帶 中心靜脈의 鬱血없이도 好酸性變化的 肝細胞萎縮 및 壞死等이 發生되는 것은 急性一酸化炭素曝露에 의한 直接的인 組織內 및 血中 低酸素症에 의한 것이며 中心靜脈의 鬱血에 의한 二次的變化的 아니라고 思料된다.

이(1979)는 急性一酸化炭素曝露後 中間帶에서 初期에 SDH, cytochrome oxidase 등의 酵素性이 減少된다고 報告하여 中心帶보다 中間帶의 損傷을 強調하였으나 肝의 切斷面에 따라 中心帶의 中心靜脈이 露出되지 않는 경우가 많다는 組織學的觀察을 감안할 때 分명한 中間帶分別이 이루어진 것인지 疑心되어지며 아마도 中間帶로 잘 못 判定된 可能性을 排除키 어렵다.

實際로 속크時 또는 心不全으로 發生되는 肝에서의 主要所見은 中心靜脈의 심한 鬱血과 中心小葉性出血壞死가 發生하며 好酸性肝細胞變化的 肝細胞萎縮等을 特徵으로 하고 있어 中心帶는 低酸素症에 弱하다고 알려져 있다.

이 境遇 電子顯微鏡으로 觀察된 低酸素症의 所見은 肝細胞의 內形質網의 확장, 絲粒體의 腫脹 및 分切 및

細胞內 lysosome의 增加와 空胞性變化라고 報告하고 있다.

鬱血性心不全의 肝壞死는 속크상태가 24시간이 상경과 후 觀察되는 所見이어서 10時間前에는 드물다. 그 機轉은 血壓減少가 酸素供給의 減少를 招來하여 肝細胞는 低酸素症狀態가 되며 특히 肝小葉의 中心帶가 주변 中間帶보다 酸素分庄이 더욱 減少되므로 中心帶에 低酸素性鬱血性壞死가 招來된다. 本實驗에서 觀察된 肝小葉의 損傷部位는 主로 中心帶이어서 鬱血性순환장애 時에 察되는 肝損傷과 形態學的으로 一致하였으며 경우에 따라서 中心靜脈의 鬱血病變없이 肝細胞의 好酸性變性, 萎縮 및 壞死의 出現은 急性一酸化炭素中毒으로 惹起된 低酸素症狀態와 깊이 有關했을 것이라 思料될 수 있는 所見이라 하겠다.

本實驗에서 觀察된 各酵素의 活性出現狀況을 總括하면 急性一酸化炭素中毒白鼠 肝에서 NADH diaphorase와 SDH는 肝小葉中心帶 및 中間帶 輕度乃至中等度の 活性減少를, LDH는 CO曝露初期에 中心帶 및 中間帶에서 輕度の 活性減少의 傾向을 나타내다가 時間經過에 따라 中心帶에서는 活性減少는 현저하여지고 오히려 中間帶에서 輕度の 活性增強을 보였고 Alk. P.는 그 活性이 肝小葉에서 극히 미약하며 中間帶의 膽管및 散在된 kupffer細胞에서 中等度活性을 나타낼 뿐이어서 實驗群에 따른 活性差異를 찾기 어려웠다. Acid P.는 CO曝露後初期에는 큰 活性의 變動이 없었으나 時間經過에 따라 中間帶에서 顯著히 增強하였고 中心帶에서는 輕度の 增強을 나타냈다 모든 酵素의 活性도는 壞死 또는 退行性變化 및 萎縮病變部位에서는 增減乃至 活性消失되었고 中心帶에서 그것이 더 顯著하였다.

胞水素酵素(dehydrogenase)인 SDH와 酸化性酵素(oxidative enzyme)인 NADH diaphorase는 絲粒體內에 存在하고 있으므로 이들 酵素의 活性度變動과 絲粒體의 形態學的 變化間에는 깊은 關聯性이 있으리라 생각된다. 李(1976)는 0.5%CO를 10分間 曝露後 絲粒體積의 分切 및 消失等과 酵素活性의 低下를 報告하였다. Vogt等(1968)은 20~25分間の 低酸素症의 初期變化로 絲粒體의 形態學的變化的 觀察함과 同時에 乳酸의 蓄積, 絲粒體의 酸化磷酸反應의 減少 그리고 SDH의 活性減少를 報告하였다. 또 Bassi等(1960)은 低酸素症肝에서 電子顯微鏡으로 肝細胞의 脂肪 및 空胞性變性和 絲粒體의 腫脹 및 空胞性變化的 觀察하였고 同時에 SDH의 活性度도 減少되는 것을 관찰하였다. 本實驗에서도 NADH diaphorase와 SDH의 活性이 急性一酸化炭素曝露後 輕度乃至中等度の 減少가 肝小葉의 中心帶에서 觀察되어 위의 事實과 一致되는 所見이라

생각된다.

本實驗에서 急性一酸化炭素中毒時 LDH가 初期에 뚜렷하지 않으나 점차 時間經過에 따라 中心帶에서는 活性減少의 傾向을 間脈帶에서 輕度の 活性增強을 나타내어 中心帶의 脆弱性を 提示하였다. 즉 急性一酸化炭素中毒時 一酸化炭素에 대한 組織耐性 乃至感受性은 해당 組織內 含有된 LDH를 使用하여 嫌氣性解糖作用은 통한 熱量供給을 얼마나 할 수 있는가에 有關된다고 思料되었으며 特히 壞死와 萎縮을 보였던 中心帶의 脆弱性과 酵素活性度變動과의 關聯性を 暗示하고있다. Kim等(1969)는 急性低酸素症을 6分間 일으켜 肝, 腎, 心, 等の SDH와 LDH의 活性減少를 觀察했고, 林等(1970)은 0.7%CO를 8시간 凝露後 肝, 心, 腦, 등에서 LDH의 活性이 減少되었다고 報告하였으나 이들의 實驗은 組織를 homogenate 使用했으므로 本實驗에서 觀察된 바 있는 部位別 觀察를 할 수 없었다는 點을 指摘할 수 있겠다.

Alk. P.는 腎의 近位曲細尿管袞자연에 풍부하게 존재하고 있으며 葡萄糖의 再吸收에 關여하는 酵素인데 송等(1978)은 CO中毒時 ALK. P의 急激한 活性減少를 觀察하여 低酸素狀態에 敏感한 酵素이라 하였으나 本實驗에서는 白鼠·肝의 그 活性이 극히 微弱하여 CO中毒實驗群에서의 活性度變動을 觀察하기 어려웠다.

Acid P.는 주로 肝細胞의 lysosome에 分布하고 있는 酵素이며 모세 膽管을 연하여 肝細胞質內에 散在하고 있었으며 1%CO, 0.7%와 0.4%CO曝露로 急一酸化炭素中毒을 일으킬時 時間이 經過됨에 따라 점차 增加되었고 그 程度는 間脈帶에서 좀더 顯著하였다. 이같은 結果는 Confer等(1964)이 肝에서 低酸素症을 일으킨 후 細胞質內에서 lysosome의 增加를 관찰한 所見과 一致되는 所見이라고 할 수 있으며 이(1979)도 急性一酸化炭素中毒後 時間經過함에 따라 肝에서 Acid P.의 活性度增加를 報告한 바 있다 電子顯微鏡으로 低酸素症時 肝細胞內에 空胞가 많이 생기는데 이것들이 처음엔 Acid P.의 活性을 갖고 있지않으나, 時間經過에 따라 lysosome으로 變化하면서 lysosome도 증가되고 酵素의 活性을 나타내었다고(Brewer, 1965)한 報告는 本實驗의 結果를 뒷받침해준다고 할 수 있겠다.

急性一酸化炭素中毒 또는 急性低酸素症時 組織內含有된 糖原質(glycogen)의 소모가 顯著하여 Bloom(1956)은 低酸素症 5分內에 糖原質의 減少를, 배(1975)는 急性一酸化炭素中毒時 糖原質의 顯著한 減少를 觀察報告하였다. 糖原質의 重要性은 Gallaher等(1956)의 研究에서 肝細胞의 自家融解過程에서 가장 큰 影響을 주는 要素는 糖原質量이라고 하였으며 그다음은 酸化磷酸反

應에 關여하는 酵素의 活性도가 低下되므로 細胞의 生存과 糖原質과 酵素의 活性度變化에는 密接한 關聯性이 있음을 시사했는데 本實驗에서 脆弱部인 中心帶의 鬱血과 退行性變化가 顯著했을 뿐만 아니라 酵素活性이 減少된 것과 一致되는 所見이라 하겠다. 即 急性一酸化炭素曝露後 肝臟에서 惹起되는 病理組織學的인 變化는 急性低酸素症으로 肝細胞內의 급격한 糖原質 및 各酵素의 活質減少를 이루어 低酸素症에 특히 민감한 中心帶에 退行性變化 및 壞死가 招來된다고 思料되었다

以上の 急性一酸化炭素曝露에 의한 病理組織學的的變화와 酵素組織化學的的所見을 볼때 一酸化炭素曝露에 의한 이들의 變化는 CO-Hb에 의한 低酸素症의 單獨 影響이 기보다 低酸素症과 生物學的 酸化反應系酵素의 活性低下等 여러 要因의 複合된 結果라고 생각되었다. 또 急性一酸化炭素曝露에 의하여 肝小葉의 中心帶가 가장 脆弱部이며 속크時와 같은 低酸素症에서 觀察된 所見과 一致하는 所見으로서 基本的인 病理學的的機轉의 同一性을 暗示해 주고있으며 또한 下心帶의 顯著한 NADH diaphorase, SDH, LDH等의 活性減少가 그 事實을 뒷받침해 주고 있다고 생각되어 病理組織學的 變化와 酵素活性變動間에 밀접한 關聯性을 考察할 수 있다.

結 論

急性一酸化炭素中毒이 白鼠肝臟에 미치는 影響에 關하여 病理組織學的的 및 酵素組織化學的으로 究明하고자 65마리의 白鼠를 使用하여 四實驗群(對照群 15마리, 1%CO 30分曝露群 30마리, 0.7% CO 60分 曝露群 12마리와 0.4%CO 120分曝露群 8마리)으로 나누어 一酸化炭素曝露後 肝을 摘出 하고 파라핀 包埋法으로 組織標本을 製作하여 病理組織學的으로 檢索함과 同時에 NADH diaphorase, succinic dehydrogenase, lactic dehydrogenase, alkaline phosphatase 및 acid phosphatase 등 各酵素의 肝組織內 活性變動을 組織化學的으로 檢索하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 急性一酸化炭素曝露時 白鼠肝의 病理組織學的的變化는 中心靜脈 및 中間帶의 洞腔에 輕度乃至 中等度の 鬱血, 肝細胞의 好酸性退行變化, 核濃縮, 細胞萎縮과 焦點性 出血性壞死와 脂肪變性이였으며 中心帶를 中心으로 그 所見이 顯著하였고 高濃度短期曝露群에서 더 顯著하였다.

2. 急性一酸化炭素曝露時 NADH diaphorase와 SDH의 活性도는 對照群에 比하여 輕度乃至 中等度の 減少를 주로 肝小葉의 中心帶와 中間帶에 나타냈다.

3. 急性一酸化炭素曝露時 LDH活性도는 對照群에 比

하여 輕度の 減少를 肝小葉의 中心帶와 中間帶에서 나타냈으나 間脈帶에서는 輕度の 活性增加像을 보여 주었다.

4. 急性一酸化炭素曝露時 Alk. P. 活性 度는 實驗群에 따르는 그 變化的 差異를 觀察할 수 없었으나 Acid P. 活性度는 時間經過에 따라 增加됨을 觀察하였다.

5. 以上の 急性一醫化炭素中毒이 白鼠肝에서 病理組織學的 所見과 NADH diaphorase SDH, LDH, Alk, P. 와 Acid P.의 酵素活性度變動은 一酸化炭素의 直接的인 結果로 思料되며 組織學的 脆弱部位는 肝小葉中心帶로서 酵素組織化學的 活性의 部位別 時布 및 活性變動은 바로 肝組織의 脆弱部의 損傷과 有關하였다.

—ABSTRACT—

Histopathologic and Enzyme Histochemical Studies on Effects of Acute Carbon Monoxide Poisoning in Rat Liver

Eui Keun Ham, Kye Yong Song and Dork Ro Yun

*Departments of Pathology and Preventive Medicine
College of Medicine, Seoul National University*

An experimental study was performed to observe the acute carbon monoxide poisoning in the liver of rats by means of histopathologic and enzyme histochemical methods, attempting to explore the mechanism behind the process of the acute anoxic necrosis of liver.

Experimental animals(65 Sprague-Dawley rats, 210 ~280gm.) were divided into four groups by the duration of exposure and the concentration of carbon monoxide: Control (15 rats, unexposures), 1% CO exp.(30 rats, 30 min.), 0.7% CO exp.(12 rats, 60 min.) and 0.4% CO exp. (8 rats, 120 mip.). Histopathological investigation and the enzyme activities of succinic dehydrogenase (SDH), NADH diaphorase, lactic dehydrogenase(LDH), alkaline phosphatase (alk. P.) and acid phosphatase(acid P.) in liver were observed by hematoxylin and cosin staining and appropriate enzyme histochemical stainings.

The results obtained were as follows:

1. Histologic sections of rat liver in groups of acute poisoning with carbon monoxide revealed mild

to moderate congestion of central vein and sinusoidal spaces, accompanied by acidophilic degeneration of hepatocytes, pyknosis, fatty changes and focal necrosis. Central zone was more severely affected than portal zone and the reactions were more marked in higherconcentration and shott duration groups.

2. SDH and NADH diaphorase activities in all experimental group were significantly decreased in mild to moderate degrees, especially in central and midzonal area.

3. LDH activities in all experimental rousps generally decreased in mild degree in the central and midzone in contrast to the increase in mild to moderate degree of portal zone.

4. Changes of alk. P. activities were not noticed. Acid phosphatase activities in all experimental groups were significantly incre-ased in 60 to 120 min. exposures.

5. Above histopathologic and histochemical findings seemed to support that acute anoxic necrosis of liver could be included by acute carbon monoxide poisoning preceded by hepatic enzymeatic changes and the most vulnerable portion of hepatic parenchyme was to be central zone of hepatic lobule.

REFERENCES

권영선 : CO가 흰쥐 심근 APTase 활성에 미치는 영향. 대한해부학회지, 7:33, 1974.

김영균 : 급성 및 만성일산화탄소 중독이 백서신 및 타장기에 미치는 영향에 관한 병리조직학적 연구. 대한비뇨기과학회지, 14:129, 1973.

김종건 : 급성일산화탄소 중독시에 백서장기의 병리조직학적 변화에 대한 실험적 연구. 공중보건잡지, 8:53, 1971.

박진배, 함의근 : 급성일산화탄소중독이 수태백서태반에 미치는 영향에 관한 병리조직학적 및 조직화학적 연구. 서울의대학술지, 21:233, 1980.

배기원 : 급성일산화탄소중독이 흰쥐 간장의 glycogen 함량에 미치는 영향. 최신의학 18:333, 1975.

배기원, 김영선 : 급성일산화탄소 중독이 흰쥐 심장의 Cytochrome Oxidase활성에 미치는 영향, 최신의학, 23:132, 1980.

송계용, 함의근 : 급성일산화탄소 중독이 백서 신장에 미치는 영향에 관한 병리조직학적 및 효소조직화학

- 적 연구. 서울의대학술지, 19:150, 1978.
- 송계용, 함의근, 조수현, 윤덕노 : 만성일산화탄소 중독이 백서의 태반에 미치는 영향에 관한 병리조직학적 연구. 대한병리학회지, 11:199, 1977.
- 윤덕노 : 연탄가스중독, 발생기능 및 발생추계에 관한 고찰. 일산화탄소중독, 광문인쇄사, 서울, pp.114, 1969.
- 윤덕노, 조수현 : 연탄가스 중독의 발생 및 진요기능에 관한 조사연구. 대한의학협회지, 20:705, 1977.
- 이두형 : 일산화탄소가 흰쥐 간장의 효소활성에 미치는 영향에 관한 조직화학적 연구. 경희의 대논문집, 4:45, 1979.
- 이영, 이영균, 윤덕노 : 급성일산화탄소 중독시 흰쥐 심근에 있어서 조직화학적 변화연구. 서울의대학술지, 18:205, 1977.
- 이홍식 : 일산화탄소가 흰쥐 선조체에 미치는 영향에 관한 조직화학적 및 전자현미경적 연구. 서울대수의대 논문집, 1:1, 1976.
- 이홍식 : 일산화탄소중독이 근위곡세포 lysosome에 미치는 영향에 관한 전자현미경적 연구. 경희의대 논문집, 4:1, 1979.
- 임취범 : 일산화탄소 중독시 가토조직내 lactic dehydrogenase 활성변화에 관한 연구. 연세의대 논문집, 3:160, 1970.
- 한갑수, 이홍식, 배기원 : 일산화탄소 중독이 흰쥐 간 조직에 미치는 영향에 관한 조직화학적 연구. 최신의학, 18:675, 1975.
- Ball, E.G., Strittmatter, C.F. and Cooper, O.: *The reaction of cytochrome oxidase with carbon monoxide. J. Biol. Chem.*, 193:635, 1952.
- Bassi, M. and Bernelli-Zazzera, A.: *Ultrastructural cytoplasmic changes of liver cells after reversible and irreversible ischemia. Exp. Molec. Path.*, 3:332, 1964.
- Bassi, M., Bernelli-Zazzera, A. and Cassi, E.: *Electron microscopy of rat liver cells in hypoxia. J. Path. Bact.*, 79:179, 1960.
- Bloom, W.L.: *Glycogenolysis in the anoxic heart. Am. J. Physiol.*, 186:518, 1938.
- Bryant, R.E., Thomas, W.A. O'Neal, R.M.: *An electron microscopic study of myocardial ischemis in the rat. Cir. Res.*, 6:699, 1958.
- Burstone, M.S.: *Histochemical demonstration of phosphatase in frozen sections with naphthol AS phosphates. J. Histo. Cyto.*, 8:146, 1960.
- Campbell, J.A.: *Tissue oxygen tension and carbon monoxide poisoning. J. Physiol.* 68:81, 1929.
- Confer, D.B. and Stenger, R.J.: *The evolution of lysosomes in hypoxic liver parenchyma as seen with the electron microscope. Am. J. Path.*, 45:533, 1964.
- Cosby, R.S. and Bergeron, M.: *Electrocardiographic changes in carbon monoxide poisoning. Am. J. Cardiol.*, 11:93, 1963.
- Dawking, M.J.R., Judah, J.D. and Rees, K.R.: *Factors influencing the survival of liver cells during autolysis. J. Path. Bact.* 77:257, 1959.
- Ehlich, W.E., Bellet S. and Lewey, F.H.: *Cardiac changes from CO poisoning. Am. J. Med. Sci.*, 208:511, 1944.
- Farber, E., Sternberg, W.H. and Dunlop, C.E.: *Histochemical localization of specific oxidative enzymes. III. Evaluation studies of tetrazolium staining methods for diphosphopyridine nucleotide diaphorase, triphosphopyridine nucleotide diaphorase and the succinicdehydrogenase system. J. Histo. Cyto.* 4:284, 1956.
- Gallagher, C.H., Judah, J.D. and Rees, K.R.: *Enzyme changes during liver autolysis. J. Path. Bact.* 72:247, 1956.
- Goldblatt, P.J., Trump, B.F. and Stowell, R.E.: *Studies on necrosis of mouse liver in vitro. Am. J. Path.*, 47:183, 1965.
- Goldsmith, J.R. and Landaw, S.H.: *Carbon monoxide and human health. Science*, 162:1352, 1968.
- Hess, R., Scarpelli, D.G., Pearse, A. C.E.: *Cytochemical localization of oxidative enzymes. J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:753, 1958.
- Kim, M.S. and Han, S.S.: *Studies on hypoxia. IV. Differential response of respiratory enzyme in various organs of adult rats. Pro. Soc. Exp. Biol.*, 130:1042, 1969.
- Kinnula, V.L. and Juuvarvi, K.: *Liver and heart mitochondrial succinic dehydrogenase activity of new born rats in anoxic hypoxia and starvation. Acta. Physiol. Scand.* 97:357, 1976.
- Lehninger, A.L.: *Water uptake and extrusion by mitochondrions in relation to oxidative phosphorylation. Physiol. Rev.*, 42:467, 1962.
- McBay, A.T.: *Carbon monoxide poisoning. New Eng.*

- J. Med.*, 272:252, 1965.
- MacDonald, M. and Specter, R.G.: *The influence of anoxia on respiratory enzyme in rat brain. Brit. J. Exp. Path.*, 44:11, 1963.
- Moore, K.E. and Brody, T.M.: *Functional changes in liver mitochondria following in situ anoxia. Am. J. Physiol.*, 198:677, 1960.
- Novikoff, A.B., and Essener, E.: *Cytolysomes and mitochondrial degeneration. J. Cell Biol.*, 15:140, 1962.
- Oudea, P.R.: *Anoxic changes of liver cells, Lab. Invest.*, 12:386, 1963.
- Oudea, P. and Oudea, M.C.: *Anoxic lesions of liver cells. Meth. Achiev. Exp. Path.* 3:40, 1967.
- Pitts, R.F.: *Physiology of kidney and body fluid 2nd, ed. pp. 71, Year Book Medical Pub. Inc. Chicago, 1970.*
- Roughton, F.J.W. and Darling, R.C.: *The effect of carbon monoxide on the oxyhemoglobin dissociation curve. Am. J. Physiol.*, 141:17, 1944.
- Scarpelli, D.G., Hess, R., Pearse, A.C.E.: *Cytochemical localization of oxidative enzymes. J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4:747, 1958.
- Seligman, A.M. and Tutenberg, A.M.: *The histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. Science*, 118:317, 1951.
- Shaferm, N., Smilary, M.C. and MacMillan, E.P.: *Primary myocardial disease in man resulting from acute carbon monoxide poisoning, Am. J. Med.*, 38:316, 1965.
- Shank, R.E., Morrison, G., Cheng, C.H., Karl, I., and Schwartz, R.: *Cell heterogeneity within the hepatic lobulae, J. Histochem. Cytochem.*, 7:237, 1959.
- Stowell, R.E., Chang, J.P. and Berenbom, M.: *Histochemical study of necrosis of mouse liver tissue in the peritoneal cavity. Lab. Invest.*, 10:111, 1961.
- Trump, B.F., Berezsky, I.K., Collan, Y. Kahang, M.W., and Mergner, W.J.: *Recent studies on the pathophysiology of ischemic cell injury. Beitr. Path. Bd.*, 158:363, 1976.
- Trump, B.F. and Ginn, F.L.: *The pathogenesis of subcellular reaction to lethal injury. Meth. Achiev. Exp. Path. New York* 4:1, 1966.
- Trump, B.F., Leihö, K.A., Mergner, W.J. and Arstila, A.U.: *Studies of the subcellular pathophysiology of acute lethal cell injury. Beitr. Path. Bd.*, 152:243, 1974.
- Tzagoloff, A. and Wharton, D.C.: *Studies on the electron transfer system. XII. The reaction of cytochrome oxidase with carbon monoxide. J. Biol. Chem.*, 240:2628, 1965.
- Vogt, M.T. and Farber, E.: *The molecular pathology of ischemic renal cell death. Am. J. Path.*, 93:1, 1968.
- Ziegler, F.D.: *Respiratory and phosphorylation responses to hypoxia and food restriction. Am. J. Physiol.*, 212:197, 1967.

LEGENDS FOR FIGURES

- Fig. 1.** Fatty change and mild congestion in liver of rat after acute CO exposures (1% CO, 30 min.), H&E, $\times 400$.
- Fig. 2.** Acidophilic degeneration and pyknosis nuclei in liver of rat after acute CO exposures (1% CO, 30 min.), H&E, $\times 400$.
- Fig. 3.** Focal hemorrhagic necrosis and congestion in liver of rat after acute CO exposure (1% CO, 30 min.), H&E, $\times 100$.
- Fig. 4.** SDH activity in liver of control rat (unexposure), SDH, $\times 100$.
- Fig. 5.** Marked decrease of SDH activity in liver of rat after acute CO exposures (0.7% CO, 60 min.), SDH, $\times 100$.
- Fig. 6.** NADH diaphorase activity in liver of control rat (Unexposure) NADH diaphorase, $\times 100$.
- Fig. 7.** Moderate decrease of NADH diaphorase activity in liver of rat after acute CO exposures (0.4% CO, 120 min.), NADH diaphorase, $\times 100$.
- Fig. 8.** LDH activity in liver of control rat (Unexposure) LDH, $\times 100$.

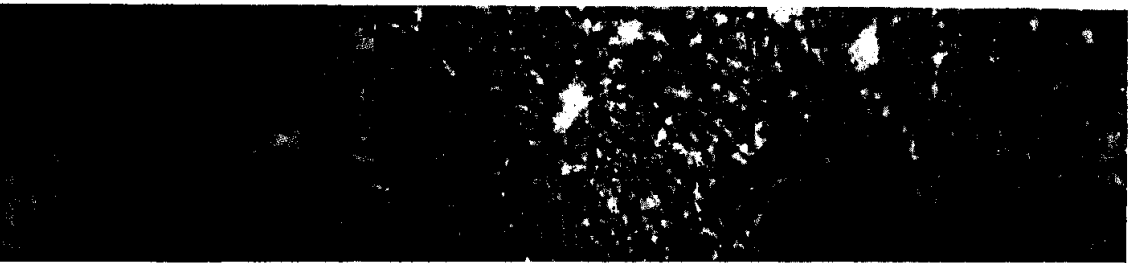
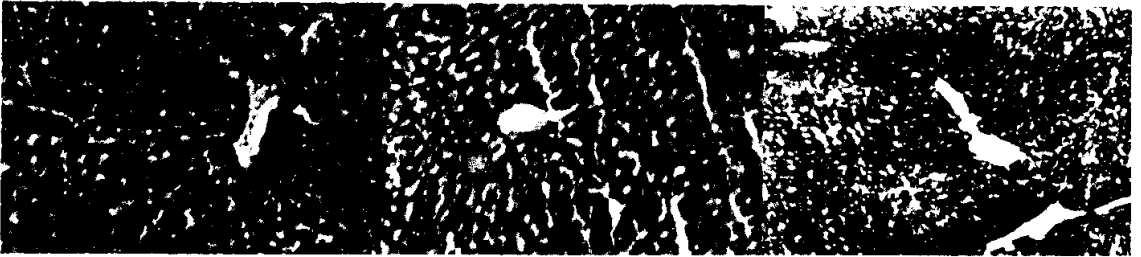


Fig. 9. Moderate increase of LDH activity in portal zone and decrease in the central zone in liver of rat after acute CO exposure (0.7% CO%, 60min) LDH, $\times 100$.

Fig. 10. Alkaline phosphatase activity in liver of control rat (Unexposure) Alk. P., $\times 100$.

Fig. 11. Acid phosphatase activity in liver of control rat (Unexposure) Acid. P., $\times 100$.

Fig. 12. Mild increase of acid P. activity in liver of rat after acute CO exposure (0.7% CO. 60min.) Acid P. $\times 100$.