



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](#)

의학박사 학위논문

Reactive oxygen species - mediated
Aquaporin 4 deficiency in astrocyte induced
perihematomal edema in hemorrhagic stroke

뇌출혈 주변 부종의 발생에 있어
정상세포 Aquaporin 4 채널의 역할 고찰

울 산 대 학 교 대 학 원
의 학 과
박 원 형

뇌출혈 주변 부종의 발생에 있어
정상세포 Aquaporin 4 채널의 역할 고찰

지도교수 안재성

이 논문을 의학박사 학위 논문으로 제출함

2019년 08월

울산대학교대학원
의학과
박원형

박원형의 의학박사 학위 논문을 인준함

심사위원	안재성	(인)
심사위원	이승주	(인)
심사위원	이은재	(인)
심사위원	주성필	(인)
심사위원	홍석호	(인)

울산대학교 대학원

2019년 08월

국문 요약

자발성 뇌출혈 (이하 뇌출혈, spontaneous intracerebral hemorrhage, ICH) 이후 발생하는 출혈 주변 부종은 신경학적 악화의 주요 원인으로 작용한다. 뇌출혈 주변 부종의 발생 기전은 혈액으로부터 유리되는 단백질에 의한 염증반응-유도 세포독성 부종과 이차적으로 발생하는 혈관인성 부종의 복합 작용에 의해 발생하는 것으로 알려져 왔다. 출혈 초기에 발생하는 세포독성 부종의 원인으로는 혈액 유래 thrombin, plasminogen, ferritin, ferrous, reactive oxygen species (ROS) 등에 의한 면역세포의 침윤과 이로 인한 이차성 염증반응이 관여하는 것으로 보고되었다. 반면에 혈관인성 부종의 원인에 대해서는 염증 반응에 의해 유도된 vascular endothelial growth factors 이 관여하는 것으로 알려져 있으나 이와 연관된 blood-brain barrier (BBB)의 미세구조 변화에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 또한 출혈 초기에 발생하는 부종과 지연성으로 발생하는 부종 간의 연관성에 대해서는 연구가 부족하다.

본 연구는 자가 혈액 주입 방법으로 뇌출혈 동물모델 (마우스)을 제작하여 실험군과 대조군으로 나누어서 진행하였다. 자기공명영상과 컴퓨터 단층 촬영을 이용하여 출혈 주변 부종의 크기를 측정하였으며, 면역형광염색 후 조직 샘플을 획득하여 뇌출혈 주변의 혈관 구조를 확인하였다. 또한, 혈관 구조를 확인하는 과정에서 혈관 유출 분석을 시행하였으며, 주변의 ROS 분석을 시행하였다. 그리고, 마우스의 행동실험 및 분석 역시 시행하였다. 추가적으로 실제 임상에서의 적용 가능성을 확인해 보기 위해서, 실제 뇌출혈 환자들의 자기공명 영상, 컴퓨터 단층 촬영 및 임상기록을 대조 분석하였다.

본 연구에서는 뇌출혈 동물모델에서 출혈 주위 부종과 높은 ROS 발현부위 그리고, 성상세포의 활성화 부위가 전반적으로 일치하는 경향을 확인하였다. 또한, 출혈 초기 출혈 산출물로부터 유리되는 ROS 에 의한 BBB 미세구조

변화를 관찰하였고, 성상세포의 aquaporin 4 라는 water channel 의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. Aquaporin 4 발현 감소로 인해 성상세포의 end-feet 이 혈관으로부터 분리되어 BBB 의 구조가 불안정해지며 부종이 증가하는 것을 확인하였다. 이것은 BBB 구성 세포 중의 하나인 성상세포의 coverage 가 감소하여 동적 누수 (dynamic leakage)가 증가하여 발생한 결과로 확인되었다. 하지만, ROS scavenger 를 투여한 그룹에서는 대조군에 비하여 aquaporin 4 발현 감소 폭이 적고, aquaporin 4 의 회복도 빨리 나타났다. 그리고, Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020) 투여 시에는 부종의 발생이 심해지고 뇌출혈 마우스의 운동 능력이 감소하였으며 성상세포의 end-feet 의 혈관으로부터 분리가 심해졌다. 이를 통해 출혈 주변 부종의 발생에 있어 aquaporin 4 의 역할을 확인할 수 있었다.

기존의 논문에서는 중추신경계의 BBB 에서 밀착연접 (tight junction)과 혈관주위세포의 역할에 대해서는 많은 연구가 되어 있으나 성상세포의 역할에 대해서는 과소평가된 경향이 있다. 임상적으로 출혈 이후 발생하는 출혈 주변 부종은 환자의 예후에 밀접한 연관이 있으나 새로운 치료 타겟의 발굴의 발굴보다는 비특이적으로 뇌압을 낮추는 hyperosmolar therapy, 수술적 치료에 의존해 왔다. 본 연구를 바탕으로 출혈 주변 부종을 줄이는 target 으로 aquaporin 4 를 적용할 수 있을 것이다.

목차

국문 요약	i
목차	iii
그림 목차	v
약어 목록	vi
Chapter 1. 서론	1
1.1 연구의 배경	1
1.1.1 뇌출혈 관련 부종의 일반적인 개념	1
1.1.2 뇌출혈 관련 부종의 임상적 중요성	1
1.2 최근 연구의 동향	2
1.3 연구의 목적	2
Chapter 2. 연구 재료 및 방법	4
2.1 뇌출혈 마우스 모델 제작	4
2.2 뇌출혈 모델 자기공명영상 촬영 및 부종 영역 분석	4
2.3 면역형광염색	5
2.4 3 차원 혈관 구조 및 뇌출혈 이후 혈관 누출 분석	6
2.5 활성 산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS) 분석	7
2.6 행동 실험 및 분석	7

Chapter 3. 연구결과	8
3.1. 출혈 주변 부종의 발생 패턴과 세포학적 발생 기전	8
3.1.1 마우스 뇌출혈 모델에서의 혈종 주변 부종의 자연사	8
3.1.2. 출혈 주변 부종 발생에 있어 ROS scavenger 효과	12
3.1.3 출혈 주변 부종에서의 동적 누수 (Dynamic leakage) 평가	16
3.1.4 BBB 완결성 분석을 통한 세포학적 기전 확인	18
3.2. Aquaporin 4 억제에 의한 출혈 주위 부종, 생존율, 행동학적 변화 및 BBB 완결성의 변화: Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020) study	23
 Chapter 4. 고찰	 26
 Chapter 5. 결론	 30
 Reference	 31
 영문요약 (Abstract)	 34

그림 목차

Figure 1. 마우스 뇌출혈 모델에서의 혈종의 자연사.....	9
Figure 2. 마우스 뇌출혈 모델에서의 출혈 주변 부종의 변화	10
Figure 3. 뇌출혈 주변 부종 부위의 reactive oxygen species 발현 및 정상세포의 활성화 범위	11
Figure 4. 뇌출혈 마우스 모델에서 N-acetylcystein 에 의한 출혈량, 출혈 주변 부종, 생존율 변화.....	13
Figure 5. 뇌출혈 마우스 모델에서 N-acetylcystein 에 의한 출혈 주변 부종 감소 (자기공명 영상).....	14
Figure 6. 뇌출혈 마우스 모델에서 Trolox 에 의한 출혈량, 출혈 주변 부종, 생존율 변화.....	15
Figure 7. 출혈 주변 부종 부위에서의 동적 누수	17
Figure 8. Blood Brain Barrier 의 세포 구성과 구조	19
Figure 9. N-acetylcystein 투여 이후 BBB 구성 세포, 구조의 변화.....	20
Figure 10. 출혈 이후 출혈 부위 정상세포의 활성화와 N-acetylcystein 에 의한 안정화.....	21
Figure 11. 출혈 주변 부종 부위의 정상세포 활성화와 aquaporin 4 의 발현 감소, N-acetylcystein 에 의한 정상세포의 안정화 및 aquaporin 4 발현 회복	22
Figure 12. Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020)에 의한 출혈 주변 부종 및 생존율의 변화.....	24
Figure 13. Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020)에 의한 정상세포 end-feet 의 BBB coverage 감소	25

약어 목록 (Abbreviations)

4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)

8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHDG)

blood-brain barrier (BBB)

endothelial nitric oxide synthase (eNOS)

glial fibrillary acidic protein (GFAP)

N-acetylcystein (NAC)

neuronal nuclei (NeuN)

phosphate buffered saline (PBS)

platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR- β)

reactive oxygen species (ROS)

relative perihematoma edema (rPHE)

vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)

vascular endothelial growth factor (VEGF)

Chapter 1. 서론

1.1 연구의 배경

1.1.1 뇌출혈 관련 부종의 일반적인 개념

자발성 뇌출혈 (이하 뇌출혈, spontaneous intracerebral hemorrhage, ICH)에 의한 이차적 뇌 손상은 출혈 이후 발생하는 출혈 주변 부종과 연관이 있다. 출혈 주변 부종이 발생하는 기전은 출혈에 의한 출혈 주변 조직의 직접 손상과 간접 손상으로 나눌 수 있다. 직접 손상 관련 부종은 혈종에 의해 주변 미세혈관이 뇌 조직과 동시에 파괴되거나 혈종 확장에 의한 종괴 효과로 유발된 세포독성 부종 (cytotoxic edema)과 혈관인성 부종 (vasogenic edema)으로 나뉜다 [1]. 뇌출혈 간접 관련 부종은 출혈에 대한 염증반응으로 blood-brain barrier (BBB) 가 파괴되거나, 혈종의 응고 과정에서 발생하는 vascular endothelial growth factor (VEGF)로 인한 효과로 혈관의 투과성 증가로 발생한다. 또한 혈종의 용해 과정에서 발생한 철 성분 유래 free radical 들에 의해 BBB 가 손상되어 이차성 혈관인성 부종이 발생하기도 한다 [2].

1.1.2 뇌출혈 관련 부종의 임상적 중요성

뇌출혈 이후 발생하는 뇌손상은 혈종의 종괴 효과로 인한 일차적 요인과 혈종 주변 부종으로 인한 이차적 요인에 의해 복합적으로 발생한다. 뇌출혈 주변 부종은 출혈 24 시간 이내 급격히 발생하여 이후 서서히 진행하여 10-14 일 사이에 최고조에 이른다. 뇌출혈 주변 부종은 뇌압 상승을 유발하기 때문에 환자의 지연성 신경학적 악화의 중요 원인이 되며 뇌출혈 치료의 주요 대상이

된다. 뇌출혈 주변 부종이 조절이 잘되는 경우, 장기적 임상경과가 양호함은 이미 알려져 있으며 이를 감소시키기 위해서 statin 계열 약물 투여 (혈관주위세포 안정화 (pericyte stabilizer), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) enhancer, reactive oxygen species (ROS) scavenger 투여 (oleuropein, selenium, Vitamin C, E, N-acetylcystein (NAC)) [3-5], 면역 조절 치료(immune modulation) (Spingosine-1-phosphate receptor 1, S1PR1) [6], 출혈 연관 염증(NLRP3 inflammasome inhibitor) [7]을 줄이기 위한 치료 등이 임상에서 사용되었으나 기전에 대해서는 제한적으로 연구되어 있다.

1.2 최근 연구의 동향

뇌출혈 주변 부종과 연관된 세포학적, 분자생물학적 기전은 활발히 연구되고 있으나 여전히 불확실하다. 뇌출혈 주변 부종이 발생하는 주요 기전은 염증에 의한 세포독성 부종과 BBB 손상에 의한 혈관인성 부종이다. 뇌출혈 이후에 발생하는 염증 반응은 모집된 면역세포가 분비한 tumor necrosis factor-alpha 와 같은 면역 유도 cytokine 들과 [8] matrix metalloproteinase (MMP) [9], ROS [10] 등과 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 면역 반응과 더불어 출혈과 연관된 thrombin, heme, ferrous 는 미세아교세포를 활성화시키고 이차적으로 정상세포 (astrocyte)를 활성화하여 부종을 가속화하는 것으로 알려져 있다 [11].

1.3 연구의 목적

뇌출혈 주변 부종의 발생은 세포독성 부종과 BBB 손상에 의해서 복합적으로 발생하는 것으로 여겨진다. 하지만 이를 설명할 수 있는 분자생물학적 기전은 모호하다. 뇌출혈 주변 부종을 심도 있게 이해하기 위해서는 BBB 를 구성하는

세포들의 상호작용 (cellular interaction)과 완결성(integrity)을 유지하는 기전에 대해서 연구가 필요하다. BBB 는 endothelial cell 을 접합하는 밀착연접 (tight junction), 성상세포의 end-foot, endothelial cell 과의 완결성을 유지하며 edema clearance 역할을 하는 aquaporin 4, 혈관주위세포, 기저막 (basement membrane)로 구성된다 [12]. 이 중에서 aquaporin 4 는 뇌부종의 발생과 제거에 있어서 중요한 channel 로서 작용한다 [13]. 하지만, 출혈 주변 부종 발생에 있어서 aquaporin 4 의 역할은 아직 많이 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 출혈 주변 부종 발생에 있어서 성상세포에서 aquaporin4 의 역할을 확인하였다. 뇌출혈 이후에 발생하는 aquaporin 4 의 기능 변화를 확인하였고 이를 유발하는 원인을 규명하고자 한다. 또한, Aquaporin 4 변화로 인한 BBB 변화를 확인하고, 이와 연관된 세포학적, 분자생물학적 기전을 확인하고자 한다.

Chapter 2. 연구 재료 및 방법

2.1 뇌출혈 마우스 모델 제작

수컷 C57BL/6 마우스 (8-10 주령) 를 케타민(100mg/kg)과 xylazine hydrochloride (10mg/kg)을 사용하여 마취를 유도 하였다. 뇌 심부 고정 장치를 사용하여 정수리점 (bregma)부터 오른쪽으로 2.0mm 앞쪽으로 0.2mm 위치에 1mm hole 을 만든 이후 50ul 의 안와 채혈을 통하여 얻은 자가 혈액을 해밀턴 주사기를 사용하여 3.7mm 깊이에 주입하였다. 주입 속도는 1.25ul/min 으로 26 gauge 시린지 펌프를 통하여 주입하였다. 주입이 끝난 이후, 약물 투여군은 NAC 를 생리 식염수에 희석한 후 200mg/kg 의 용량으로 복강을 통해 투여하였다. 이후 NAC 는 48 시간에 한 번씩 뇌출혈 발생 후 8 일간 투여하였다. 또한 모델 제작 이후 생존율을 확인하기 위하여 뇌출혈 마우스를 대조군, 실험군 (NAC 처리군) 각각 10-15 마리를 모델 제작 이후 2 주 동안 관찰하여 뇌출혈 이후 생존율을 측정하였다. 실험 동물은 아산생명과학연구원 실험동물 연구실 동물실험 윤리 위원회 Institutional Animal Care and Use Committee 규정에 따라 관리 및 사육하였다.

2.2 뇌출혈 모델 자기공명영상 촬영 및 부종 영역 분석

자기공명영상은 뇌출혈 이후 뇌부종의 크기의 변화를 확인하기 위하여 1 일, 3 일, 7 일 이후 각각 촬영하였으며, T2 강조 영상은 소동물 자기공명영상 촬영 장비인 Bruker Pharmascan 7.0T/160mm (Ettlingen, Germany) 를 통하여 획득 하였다. 자기공명영상 촬영 조건은 repetition time=4500.00ms, echo time=50.00 ms, averages=2, echo spacing=16.667 ms, matrix size=256x256, slice thickness=0.5mm 로 촬영하여 영상을 획득 하였다. 촬영 이후 뇌부종 및 출혈 부위는 ImageJ (National Institutes

of Health, USA)를 사용하여 측정 하였으며, 뇌출혈 연관 부종 영역의 부피 (relative perihematoma edema, rPHE) 는 다음의 방법으로 계산하였다

$$rPHE = \sqrt[3]{\frac{Edema\ volume + Hemorrhage\ volume}{4/3 \times \pi}} - \sqrt[3]{\frac{Hemorrhage\ volume}{4/3 \times \pi}}$$

2.3 면역형광염색

뇌출혈 모델 제작 이후, 1 일, 3 일, 7 일 이후 시간에 맞추어 뇌 조직을 적출하였다. 뇌 조직 적출 전, 혈관의 구조를 분석하기 위하여 Dylight 649 labeled lectin (Vector Laboratories) 100ul 을 심장에 관류시켜 5 분정도 지난 이후, 4% paraformaldehyde 를 좌심실에 주입하여 조직을 고정하였다. 적출한 조직을 24 시간동안 4% paraformaldehyde 에 고정한 이후, sucrose 저농도에서 고농도로 20% sucrose, 30% sucrose 각각 24 시간 이상 농도에 따라 담가두어 뇌 조직의 수분을 제거하고 O.C.T (optimal cutting temperature) compound 에 넣어 동결 조직을 제작 하였다. Cryomicrotome 을 사용하여 60um 두께로 뇌출혈이 있는 뇌 조직을 잘라내었다. 조직 샘플은 phosphate buffered saline (PBS) 을 사용하여 세척한 이후, 1% bovine serum albumin 이 포함된 PBS-T (0.3% Triton x-100 in PBS)를 통하여 blocking 하였다. 1 차 항체는 24 시간이상 4°C에서 배양하였으며 24 시간이 지난 이후 PBS-T (0.1% Triton x-100 in PBS)를 사용하여 세척 하였다. 사용한 1 차 항체는 다음과 같다; CD31 (BD 1:100), CD31 (Merck 1:100), CD13 (R&D 1:200), platelet derived growth factor receptor-beta (PDGFR-β) (eBioscience 1:100), glial fibrillary acidic protein (GFAP) (NOVUS 1:1000) , Aquaporin 4 (Santa cruz 1:100), vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) (BD 1:100), Claudin-5 (Thermo 1:100), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHDG) (Santa cruz 1:100), neuronal nuclei (NeuN) (Merck 1:100), Ter119 (eBioscience 1:100). 2 차 항체는 2 시간동안 상온에서 incubation 하였으며

사용한 2 차 항체는 다음과 같다; Donkey anti-goat IgG, Donkey anti-mouse IgG, Donkey anti-rabbit IgG, Donkey anti-rat IgG, Goat anti-hamster IgG FITC 및 Cy3 (Bethyl 1:500). 2 시간이 지난 이후 0.1% PBS-T 를 사용하여 30 분 동안 non-specific binding 을 제거하기 위하여 세척하여 주었다. 이후 핵 염색을 위하여 DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) 1ug/ml 을 상온에서 5 분 동안 배양한 이후 Prolong gold anti-fade solution (Thermo) 을 통하여 마운팅 하였다. 형광 염색이 된 뇌조직은 LSM 780 공초점 현미경 (Zeiss)을 통하여 이미지를 획득 하였고 혈관의 구조를 나타내기 위하여 Z-stack 을 하여 결과를 획득하고 ZEN image software (Zeiss) 를 통하여 분석하였다.

2.4 3 차원 혈관 구조 및 뇌출혈 이후 혈관 누출 분석

뇌출혈 이후 혈관구조를 3 차원적으로 분석하기 위하여 488-lectin 과 Tetramethylrhodamine-Dextran 10,000 MW (Thermo) 을 심장과 꼬리정맥에 다른 경로로 주입한 이후 5 분정도 지난 이후 뇌 조직을 적출하여 4% paraformaldehyde 에 넣어 24 시간 고정 하였다. 이후 출혈 부분을 포함하여 대략 3mm 정도의 두께로 자른 이후 고정액에 24 시간 담가두어 조직이 가라앉을 때까지 두었다. 24 시간이 지난 이후 clearing buffer 에 24 시간이상 37°C water bath 에 담가두어 조직이 투명해질 때까지 clearing buffer 를 교체해 주며 실험을 진행 하였다. 조직이 투명해진 이후 가변 평면 레이저 형광 현미경 촬영을 위한 굴절률을 맞추기 위하여 굴절률이 1.45 로 맞추어진 mounting solution 에 24 시간 이상 담가 두었다. 24 시간이 지난 이후 1% agarose 에 투명해진 뇌 조직을 고정하여 가변 평면 레이저 형광 현미경 (Light sheet microscopy Z.1, Zeiss)을 통하여 촬영 하였다. 이미징 획득 조건은 488nm, 561nm 두가지 레이저를 통하여 이미지를 획득 하였고 사용한 렌즈는 5x/0.16, 노출 시간은 99.9ms, zoom factor 0.7

조건으로 이미지를 획득 하였다. 이미지 획득 이후 ZEN software (Zeiss)를 통하여 분석하였다.

2.5 활성 산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS) 분석

뇌출혈 모델 제작 이후 출혈 주변의 부종 부위에서의 ROS 의 변화를 확인하기 위하여 1 일, 3 일, 7 일 이후 얻어진 뇌 조직을 CellROX green (Thermo)과 Dihydroethidium (Thermo), 을 통하여 분석하였다. PBS 로 조직을 세척한 이후 최종 농도 1uM 이 되도록 CellROX green 과 Dihydroethidium 시약을 PBS 에 희석한 이후, 37°C에서 15 분간 배양하였다. 이후 DAPI 를 사용하여 핵 염색을 한 이후, Prolong gold anti-fade solution (Thermo)를 통하여 마운팅 한 이후, 공초점 현미경을 통하여 결과를 획득 하였다.

2.6 행동 실험 및 분석

뇌출혈 모델 제작 이후, 대조군과 실험군을 통하여 각각 행동실험을 하여 약물의 효과를 분석 하였다. 모델 제작 이후 시간에 맞추어 마우스를 30 도 각도, 5mm 간격으로 만들어진 아크릴판 사이에 위치시킨 후, 아크릴판 사이에서 몸을 완전히 돌아 나오는 방향을 측정하여 분석 하였다. 총 측정 횟수는 마리당 10 회로 통일 하였으며 출혈 방향과 출혈 반대방향으로 몸을 돌려 코너에서 탈출하여 나오는 횟수를 확인하였다. 측정 방법은 다음과 같이 계산 하여 수치화 하였다 [14].

$$\frac{\text{오른쪽 회전 횟수}}{\text{오른쪽 회전 횟수} + \text{왼쪽 회전 횟수}} \times 100$$

Chapter 3. 연구결과

3.1. 출혈 주변 부종의 발생 패턴과 세포학적 발생 기전

3.1.1 마우스 뇌출혈 모델에서의 혈종 주변 부종의 자연사

사람에서 뇌출혈 주변 부종은 출혈 발생 후 24 시간 이내 시작하여 10~14 일 이내에 최대에 이르며 이후 서서히 감소하는 패턴을 보인다. 본 연구의 마우스 뇌출혈 모델에서는 뇌출혈 발생 수 시간 뒤부터 진행하여 2~4 일째 뇌출혈 주변 부종이 최대에 이르고 8~10 일 사이에 완화되는 양상을 보였다 (Figure 1,2). 흥미롭게도 뇌출혈 주변 부종 부위에서 ROS 발현이 높게 관찰되었고 정상세포의 활성화 범위와 일치되는 양상을 보였다 (Figure 3).

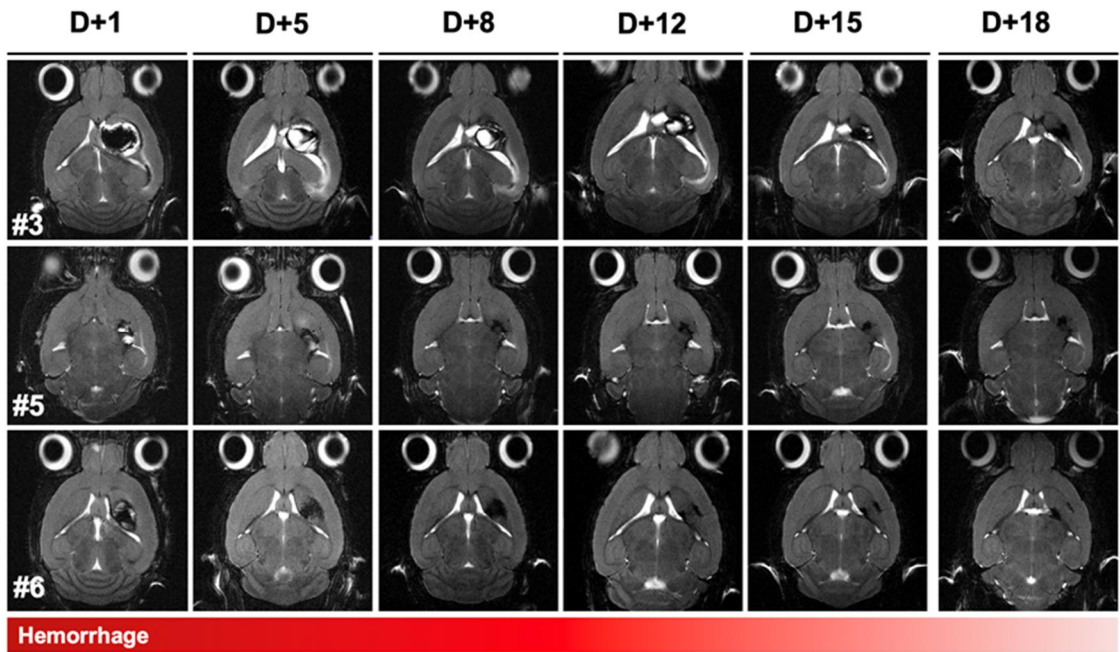


Figure 1. 마우스 뇌출혈 모델에서의 혈종의 자연사 (자기공명영상)

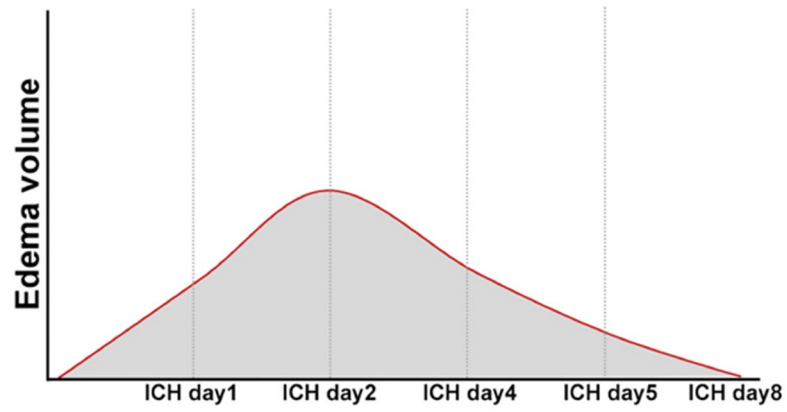
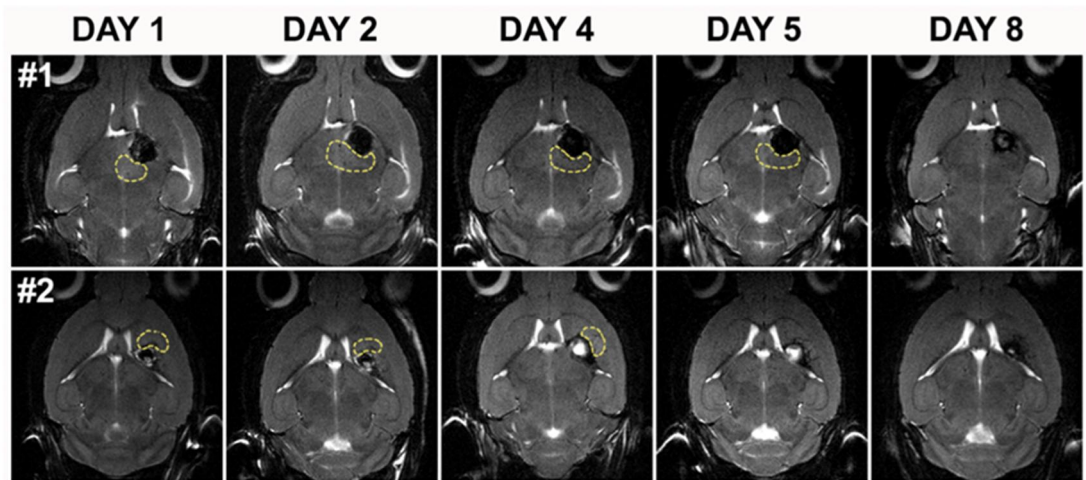


Figure 2. 마우스 뇌출혈 모델에서의 출혈 주변 부종의 변화 (자기공명영상)

ICH, intracerebral hemorrhage

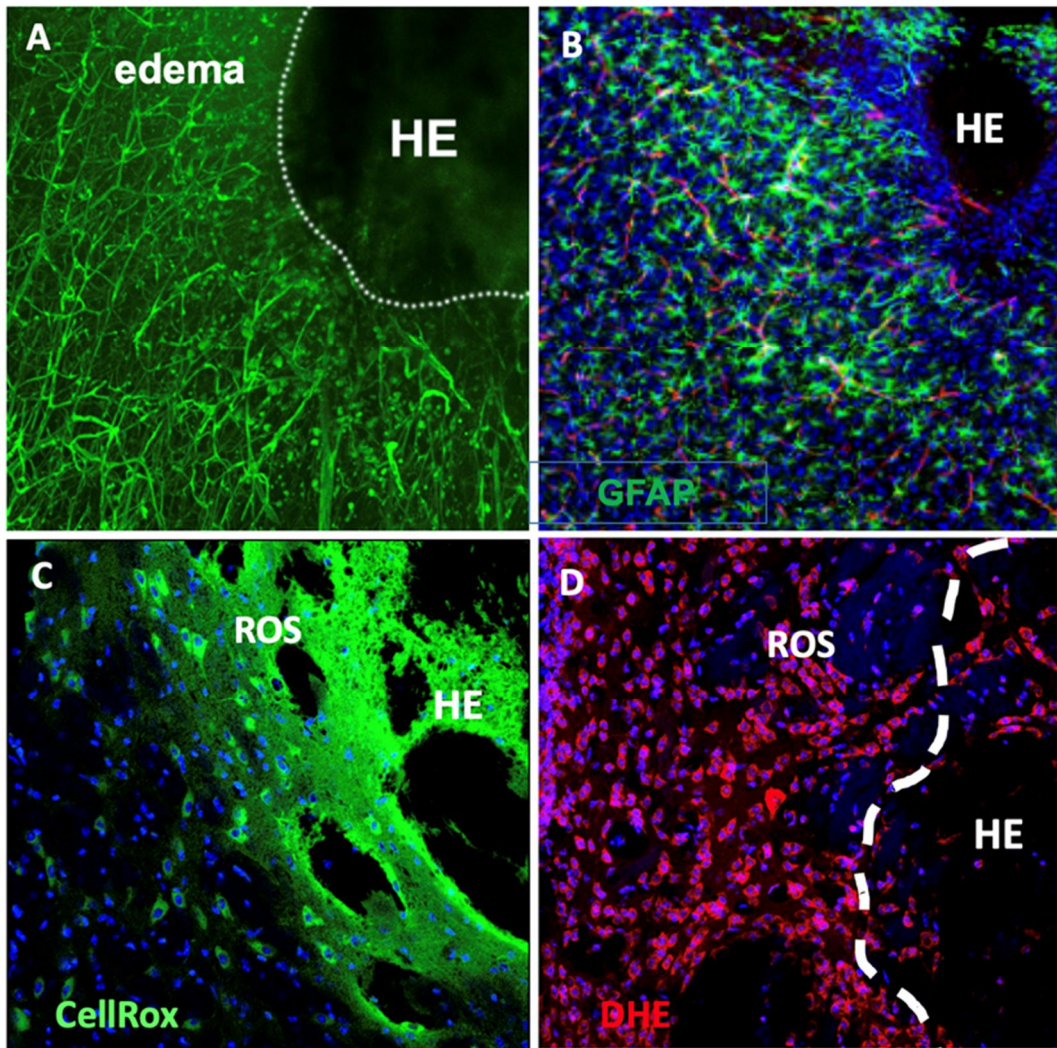


Figure 3. 뇌출혈 (혈종) 부위와 주변 부종 (A), 출혈 주변의 활성화된 정상세포 (B), 출혈 주변의 증가된 reactive oxygen species (ROS) (CellRox) (C), 출혈 주변의 증가된 ROS (DHE) (D)

HE, hematoma; GFAP, glial fibrillary acid protein; ROS, reactive oxygen species; DHE, dihydroethidium

3.1.2. 출혈 주변 부종 발생에 있어 ROS scavenger 효과

본 연구에서 어떤 약제도 투약하지 않은 뇌출혈 마우스 그룹의 치사율 (overall mortality)은 60% (n=20) 였으며 대부분 뇌출혈 부종이 최대화하는 2-4 일 이내에 발생하였다. 반면에 ROS scavenger 를 사용한 그룹에서의 치사율은 20% (n=20)으로 40%가량 감소하였다 (p=0.0240). ROS scavenger 처리에 따른 출혈 자체의 크기(hematoma size)에 미치는 영향은 없었고 출혈 주변의 edema 는 출혈 1 일째, 4 일째, 7 일째 관찰하였을 때 ROS scavenger 를 투약한 그룹에서 1 일째 60%, 4 일째 70%, 7 일째 60% 작게 관찰되었다. ROS scavenger 에 의해서 출혈 주변 부종은 감소하였고 mortality 도 감소하였다 (Figure 4,5). ROS scavenger 인 NAC 에 의한 출혈 주변 감소, mortality 향상 효과는 다른 기전의 ROS scavenger 인 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, water-soluble analog of vitamin E)에서도 관찰함으로써 ROS scavenger 에 의해서 나타나는 특이적 효과임을 확인할 수 있었다 (Figure 6).

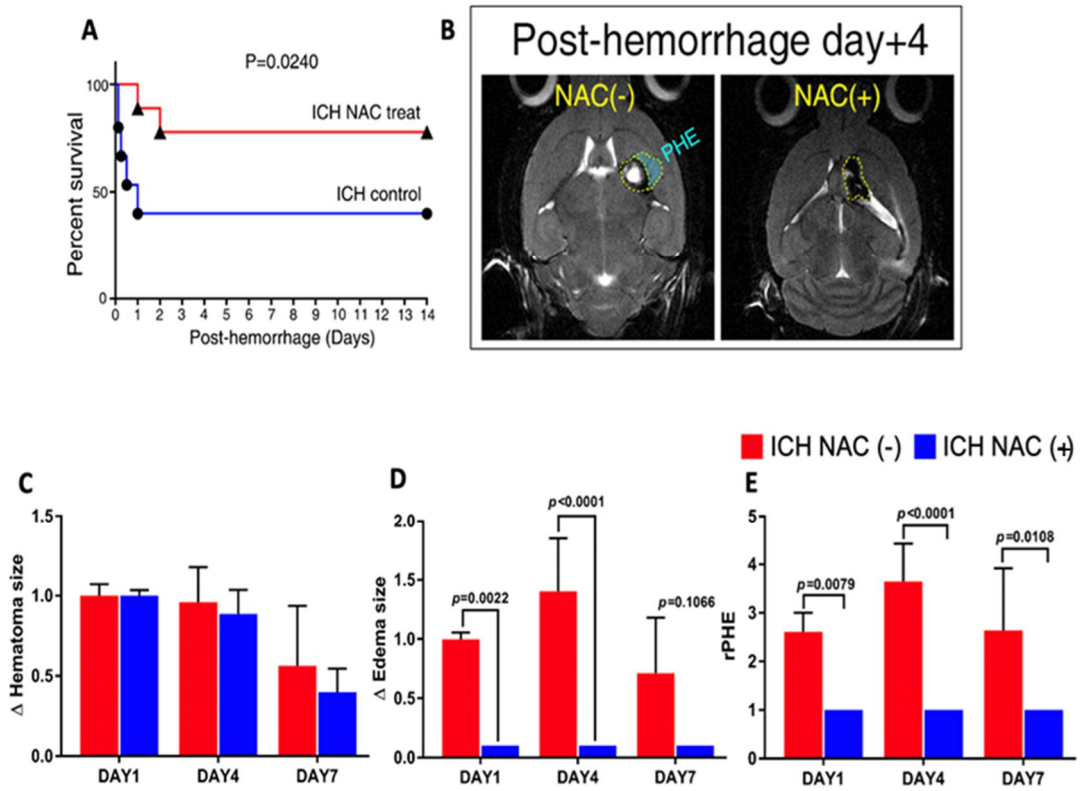


Figure 4. 뇌출혈 마우스 모델 ROS scavenger (NAC, N-acetylcystein)에 의한 생존율 향상(A), 출혈 주변 부종의 감소 (자기공명영상) (B). 출혈 자체에 미치는 효과는 없었으며 (C), 출혈 주변 부종의 크기를 감소 시킴 (D, E).

ICH, intracerebral hemorrhage; NAC, N-acetylcystein

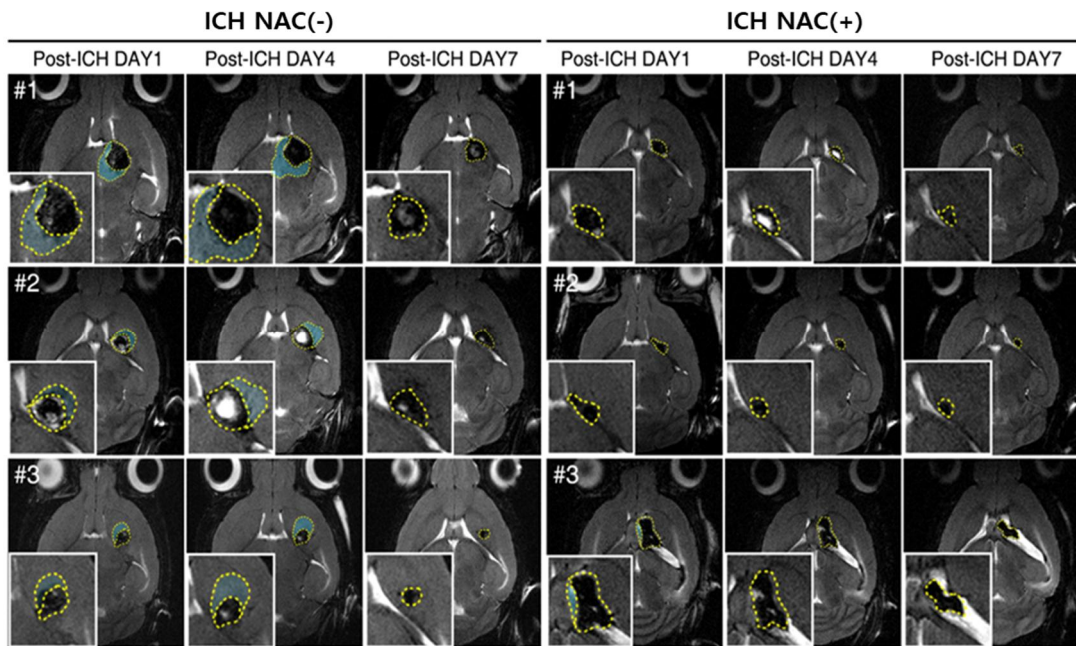


Figure 5. ROS scavenger (N-acetylcystein, NAC)에 의한 출혈 주변 부종 감소 자기공명영상

ICH, intracerebral hemorrhage; NAC, N-acetylcystein

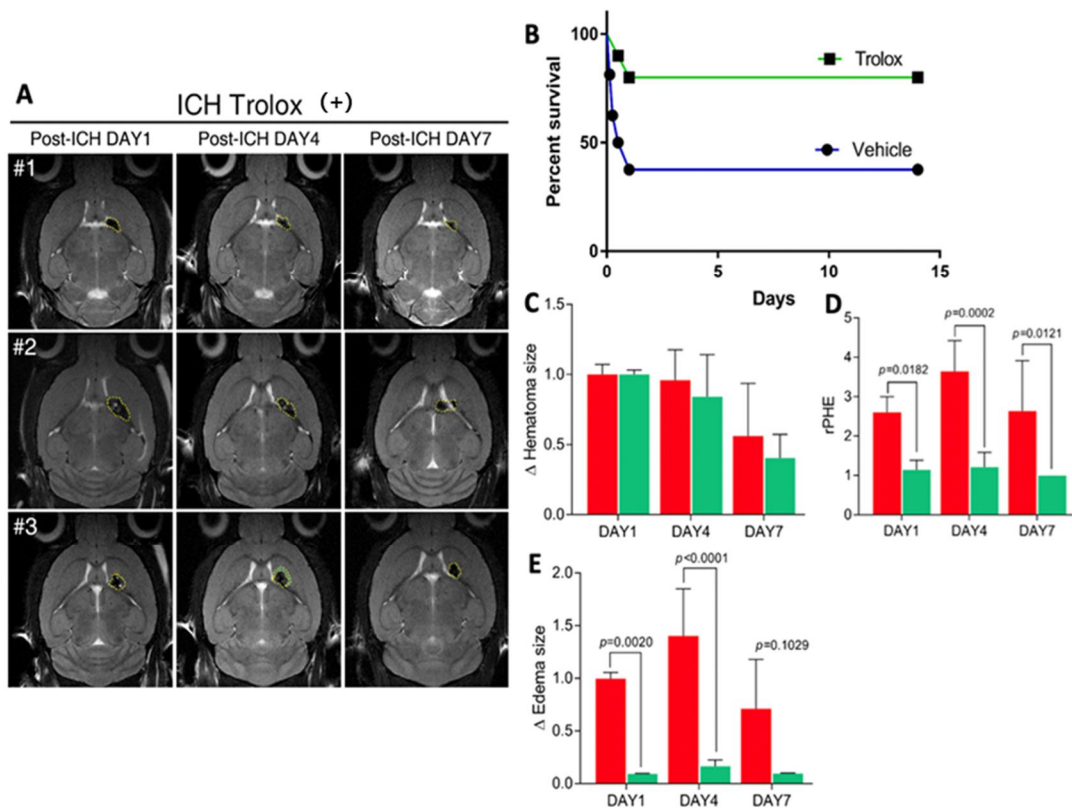


Figure 6. ROS scavenger (Trolox, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) 에 의한 생존을 향상(A), 출혈 주변 부종의 감소 (B). 출혈 자체에 미치는 효과는 없었으며 (C), 출혈 주변 부종의 크기를 감소 시킴 (D, E).

Blue line: control group, Green line: ICH treated with Trolox

Red bar: control group, Green bar: ICH treated with Trolox

ICH, intracerebral hemorrhage

3.1.3 출혈 주변 부종에서의 동적 누수 (Dynamic leakage) 평가

뇌출혈 주변 부종을 유발하는 BBB 의 구조적 변화를 확인하기 위해서 부종 부위의 혈관 구조적 완결성(vascular integrity)을 평가하였다. 우선 lectin 을 관류하였을 때 부종 부위 혈관에서 누출된 lectin 이 관찰되었으며 10 KD dextran 을 관류하였을 때에도 부종 부위에서 혈관에서 누출이 관찰되었다 (Figure 7). Lectin, 10KD dextran leakage 를 확인하여 기능저하, 즉 동적 누수 (dynamic leakage)가 있음을 확인하였고, ROS scavenger (NAC) 투여한 그룹에서 출혈 주변 부종뿐 만 아니라 lectin, dextran 10 KD leakage 도 감소하였다. ROS scavenger 투여에 따른 출혈 주변 부종 감소의 세포학적 기전을 확인하기 위해 BBB(Blood Brain Barrier)의 구성 요소들을 체계적으로 조사하였다. 또한 ROS scavenger 에 의한 BBB 구조 변화를 확인하였다.

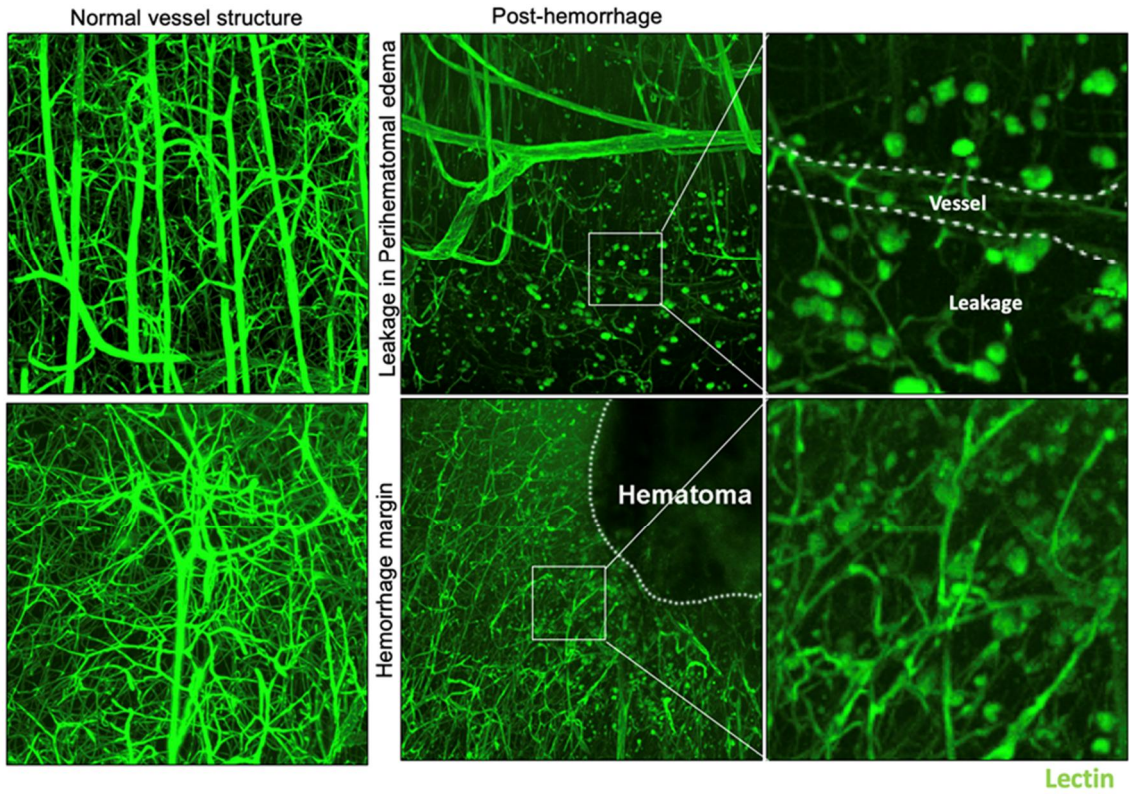


Figure 7. 출혈 주변 부종 부위에서의 동적 누수: lectin leakage 가 관찰됨.

3.1.4 BBB 완결성 (Integrity) 분석을 통한 세포학적 기전 확인

출혈 주변 부종 부위 BBB 의 cellular component 의 구조 변화를 확인하기 위해서 endothelial cell adherence junction (VEcad), 밀착연접 (claudin5), 혈관주위세포 (NG2 proteoglycan, PDGFR- β , CD31), 기저막, 성상세포 coverage 를 분석하였다 (Figure 8). 출혈 주변 부종 부위에서 혈관주위세포 coverage 는 출혈 이후 감소하였다가 7 일 쯤부터 회복되는 경향을 보였으며 ROS scavenger 투여 그룹에서는 혈관주위세포 coverage 소실이 적었으며 이후에도 지속적으로 coverage 가 높게 유지되었다. Endothelial cell adherence junction 과 밀착연접은 출혈 이후에 감소하였다가 7 일 이후에 회복하기 시작하고 ROS scavenger 투여에 의해서 영향을 받지 않았다 (Figure 9).

출혈 이후 부종 부위의 성상세포는 3 일 이후에 현저하게 발현이 증가하였다. 3 일 이후에는 성상세포의 수상돌기 (dendrite) 가 증가하고 형태가 변하여 반응성 성상세포 (reactive astrocyte)로 전환(conversion)되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 10). 흥미롭게도 출혈 주변 부종 부위와 성상세포의 활성화 부위가 일치하였다 (Figure 3). 반응성 성상세포에서 발현하는 S100-beta (S100- β) 발현은 출혈 이후 증가하였는데 ROS scavenger 를 투여한 그룹에서 감소하였다. 출혈 주변 부종 부위에서 성상세포의 반응성 성상세포로의 전환을 확인할 수 있었으나 ROS scavenger 그룹에서는 적게 관찰되었다 (Figure 10). 또한 성상세포의 end-feet 에 발현하는 aquaporin 4 의 발현이 출혈 1 일째부터 감소하였다가 7 일 이후에 서서히 회복하는 패턴을 보이나 ROS scavenger 투여 그룹에서는 aquaporin 4 발현 감소가 적었고, 회복도 빠르게 나타났다 (Figure 11).

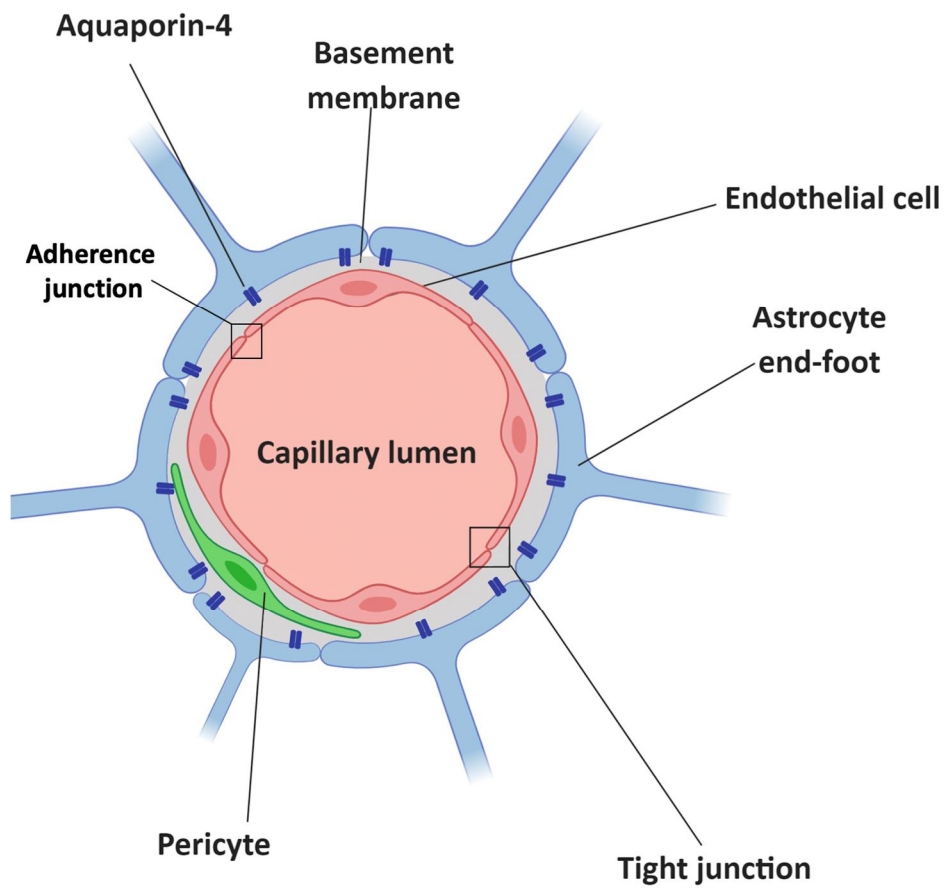


Figure 8. Blood Brain Barrier 의 세포 구성과 구조

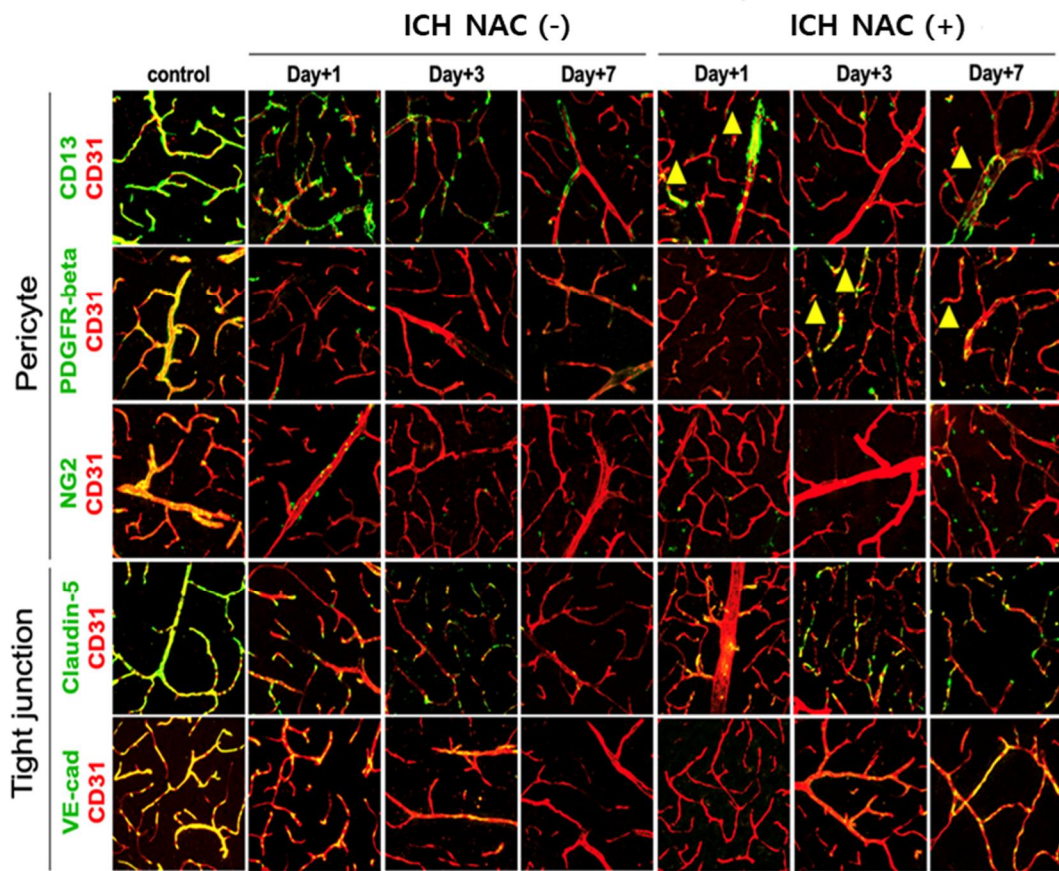


Figure 9. ROS scavenger (NAC, N-acetylcystein) 투여 이후 BBB 구성 세포, 구조의 변화

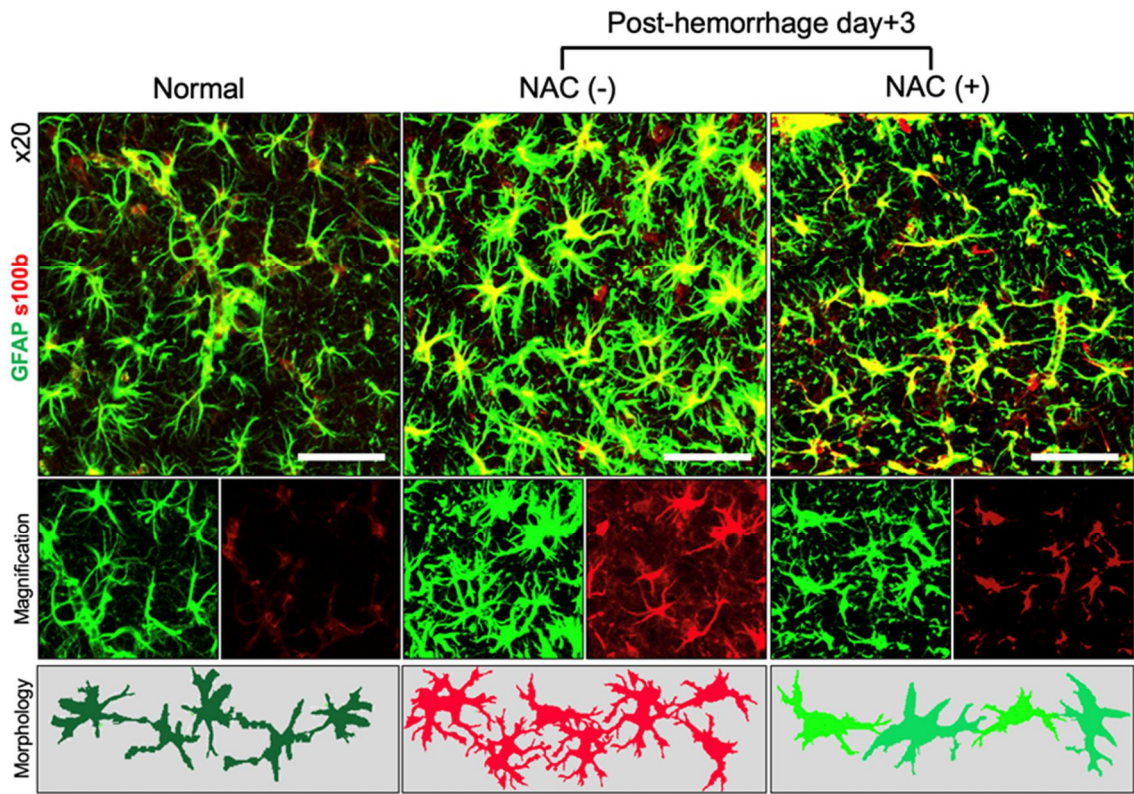


Figure 10. 출혈 이후 출혈 부위 성상세포의 활성화 (형태학적 변화, S100- β 발현 증가)와 ROS scavenger (NAC, N-acetylcystein)에 의한 안정화

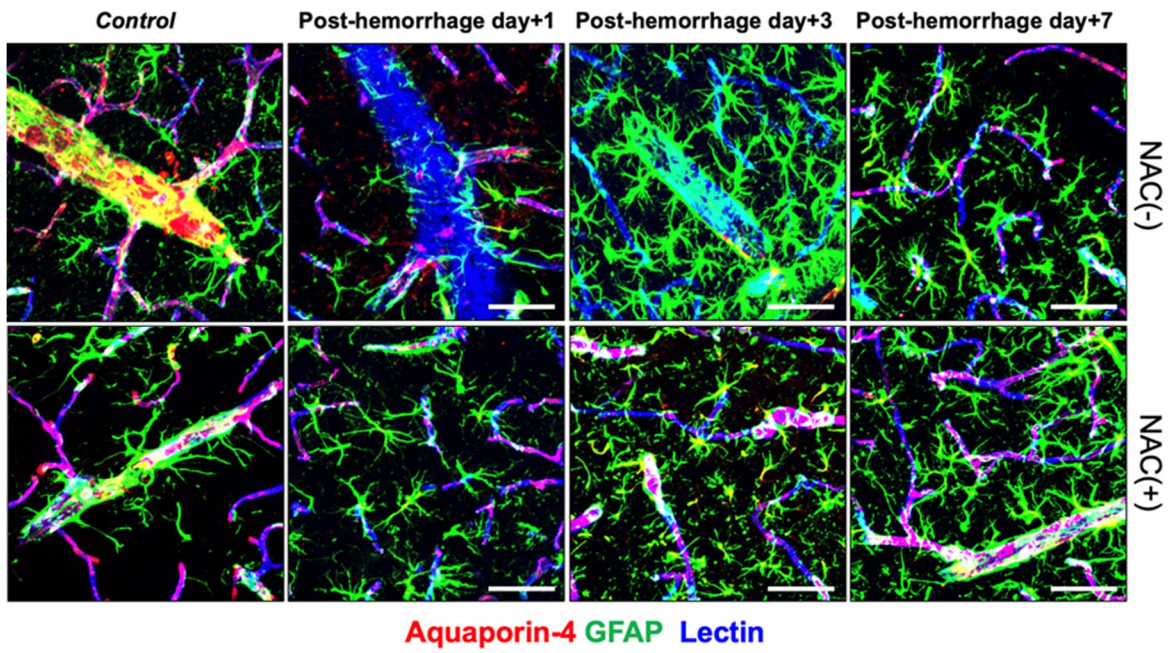


Figure 11. 출혈 주변 부종 부위의 성상세포 활성화와 aquaporin 4 의 발현 감소, NAC (N-acetylcystein)에 의한 성상세포의 안정화 및 aquaporin 4 발현 회복

3.2. Aquaporin 4 억제에 의한 출혈 주위 부종, 생존율, 행동학적 변화 및 BBB 완결성의 변화: Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020) study

앞서, 뇌출혈 마우스 모델에서 부종 부위에서 성상세포의 활성화를 확인하였고 in vitro experiment 에서 ROS 에 의해서 유도되는 것을 확인하였다. 또한 부종 부위-ROS 발현 부위-성상세포 활성화 범위의 연관성이 확인되었는데, 이는 상호 관련이 있음을 의미한다. 그리고, ROS scavenger 에 의해서 부종이 감소하였다. ROS scavenger 에 의한 출혈 주변 부종 감소의 세포학적 기전 규명을 위해서 BBB 구조 분석을 하였다. ROS scavenger 에 의해서 성상세포의 end-feet 에 발현하는 aquaporin 4 의 발현이 상당히 복원되는 것을 확인하였다. 따라서 출혈 주변 부종 발생에 있어서 aquaporin4 의 역할을 조사하였다.

먼저 aquaporin 4 inhibitor(TGN-020)을 뇌출혈 마우스 모델에 투약 후 전반적인 생존율, 행동 실험 분석, 출혈 주변 부종의 변화, BBB 구조를 분석하였다. Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020) 투약 후에 혈종 자체 크기의 차이는 없었으나 edema 는 출혈 1 일째부터 지속적으로 증가하였고 이후에도 지속적으로 유지되어 감소되지 않음을 확인하였다 (Figure 12). 또한, aquaporin 4 inhibitor 를 투여한 그룹에서는 성상세포 end-feet 의 BBB coverage 가 대조군에 비하여 감소 (60%) 하였다 (Figure 13). 흥미로운 점은, 성상세포의 활성화가 되지 않음에도 aquaporin 4 inhibitor 에 의해서 성상세포가 혈관에서 분리가 증가되었고 (Figure 13), 출혈 주변 부종이 증가하였다. 하지만, 전반적인 생존율과 운동능력은 두 그룹 간의 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

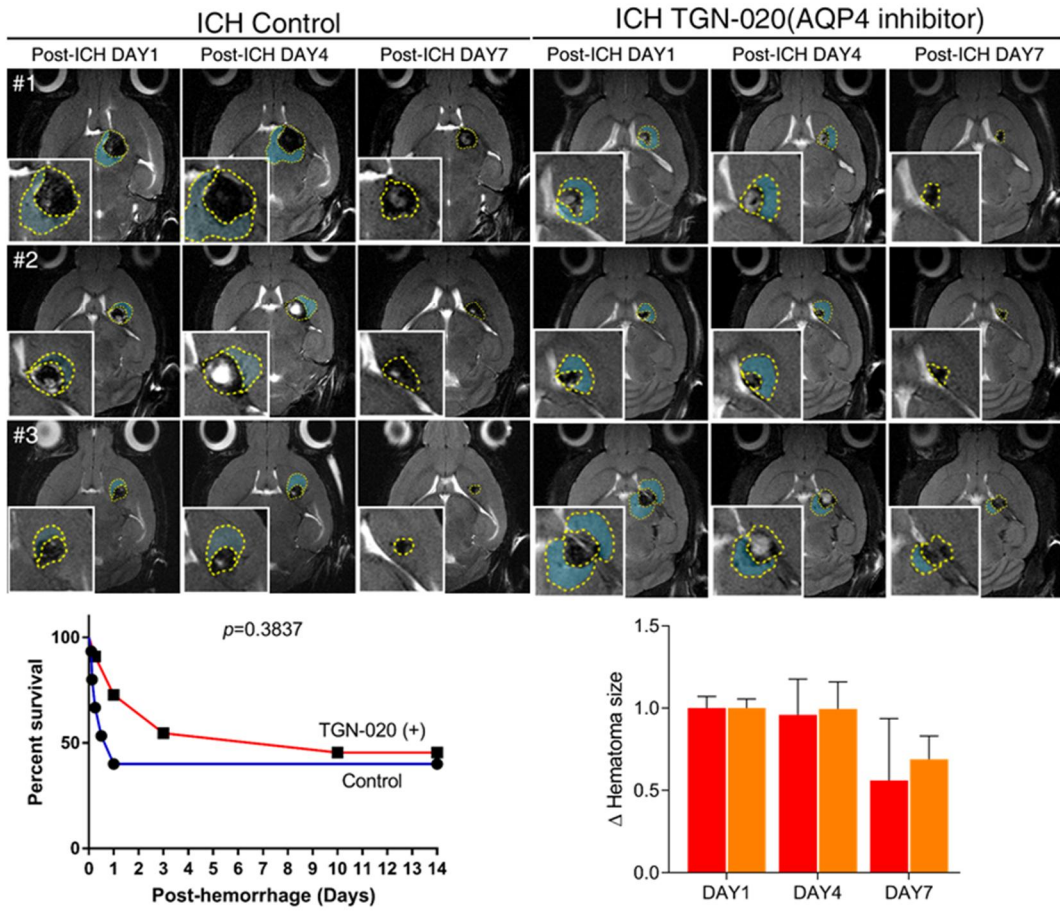


Figure 12. Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020)에 의한 출혈 주변 부종 및 생존율의 변화

Red bar: control group, Orange bar: ICH treated with TGN-200

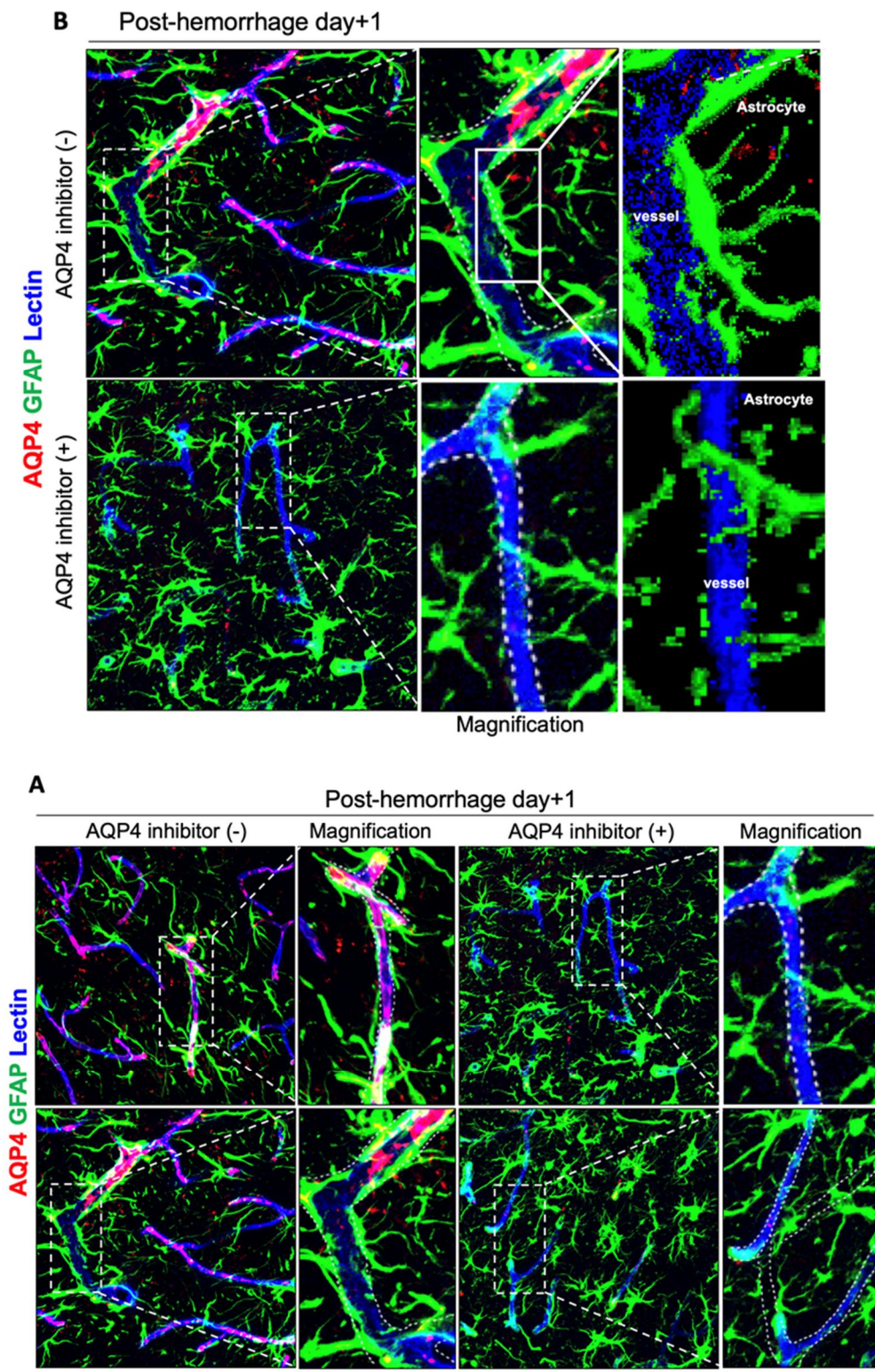


Figure 13. Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020)에 의한 성상세포 end-feet의 BBB coverage 감

Chapter 4. 고찰

뇌출혈 이후에 발생하는 출혈 주위의 부종은 크게 세포독성 부종과 혈관인성 부종으로 나눌 수 있다. 세포독성 부종은 세포 내로의 빠른 수분의 이동으로 세포 부종으로 발생한다. 반면에 혈관인성 부종은 BBB 손상으로 인해서 혈관으로부터 세포 바깥 공간으로의 water leakage 에 의해서 발생한다. 특정 질환에서 특정 부종이 우세할 수 있지만 대부분의 경우에는 두 기전은 공존한다. 최근 aquaporin 4 의 발견으로 출혈 주변 부종 발생, 수분 이동에 대한 새로운 인식이 증가하고 있다[13, 15].

뇌출혈에 의한 초기 부종은 혈종의 정수압 (hydrostatic effect)에 의한 물리적 손상과 누출된 혈액(clot) 유래 단백질과 vasoactive substance 에 의해서 BBB 의 완결성 손상이 발생한다[16, 17]. 동물 모델에서 혈액에서 유래된 thrombin, plasminogen activator, urokinase 에 의해서 면역세포의 침윤이 유도되고, 이어서 염증 반응이 일어난다[18]. 염증 반응으로 인해 BBB 의 균열이 발생하고 proteinaceous ultrafiltration 이 발생하여 출혈 주변 지연성 부종이 발생하는 것으로 알려져 있다. 출혈 주변 지연성 부종은 BBB 손상에 의해서 발생하며, 빠르게 회복되지 않으면 뇌압 상승 상태를 유지하여 합병증의 원인이 된다 [19].

본 연구에서 출혈 주변 부종 부위는 높은 ROS 발현 부위와 일치하였다. 부종 부위의 성상세포는 형태학적으로 수상돌기가 증가하고 두꺼워져 있었으며 S100- β 발현이 특이적으로 높아 반응성 성상세포로 전환되어 있음을 확인할 수 있었다. 성상세포를 in vitro condition 에서 일차 배양하여 ROS stress 를 주었을 때 성상세포의 수상돌기가 증가하고 두께가 증가하였으며 S100- β 발현이 증가하는 동일한 형태적 변화를 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 출혈에 의한 ROS 증가로 성상세포가 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 출혈 이후 ferritin 이 $Fe^{2+} + ROS$ 로 전환되는 것은 Gao 등에 의해 보고되었고 [20], ROS 에 의해서

성상세포가 기능적 결함이 생기는 것으로 보고되었다. 그러나, 본 연구진은 성상세포가 활성화되는 것을 확인하였다 [21].

뇌출혈 주변 부종 부위에서 성상세포는 3 일 후에 활성화되었는데 ROS scavenger 를 사용한 그룹에서는 S100- β 발현이 낮고, 형태학적으로 활성화가 통계적으로 유의하게 감소하였다. 또한 성상세포의 end-feet 에서 발현하는 aquaporin 4 는 유사하게 출혈 1 일째에는 발현이 감소하지 않고 3 일 이후에 발현이 감소하기 시작하였다. 그러나, ROS scavenger 를 사용한 그룹에서는 aquaporin 4 의 발현이 감소하지 않고 높게 유지되었다. 이러한 결과를 바탕으로 ROS scavenger 는 endothelial cell junction, 혈관주위세포에 미치는 영향보다는 성상세포의 활성화를 억제하여 aquaporin 4 의 발현을 유지하는데 기여하는 것으로 보인다. Aquaporin 4 는 부종 발생에 양면적인 (Janus) 역할을 한다[22]. 높게 발현되는 경우에는 세포 내로의 수분 유입을 유도하여 세포독성 부종을 유도하지만, 한편으로는 세포 바깥 공간의 수분을 제거하는 역할을 한다. 따라서 이미 형성된 부종의 제거 (edema clearance)에 있어서 중요한 역할을 하는데 성상세포의 활성화에 의해서 발현이 감소하는 경우에는 부종의 제거가 적절히 되지 않아 지연성 부종 발생과 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다[23].

타 연구에서 산화스트레스 (oxidative stress)에 의해서 caveolin-1 의 tyrosine phosphorylation 에 의해서 성상세포의 aquaporin4 발현이 증가하고 [24] 부종을 악화시키는 것으로 보고하였으나 이는 초기 부종의 발생과 연관이 있는 것으로 보인다. 본 연구에서는 출혈 직후에는 aquaporin 4 발현이 유지되나 3 일 이후에는 감소하였으며 ROS scavenger 를 사용하였을 때 aquaporin 4 회복이 더 빨랐다. ROS scavenger 를 사용한 그룹에서 출혈의 크기는 대조군과 차이가 없으나 출혈 주변 부종의 크기는 더 작았고 생존율, 행동학적으로 개선되는 효과를 확인하였다.

출혈 주변 부종 발생에 있어 aquaporin 4 의 직접적 효과를 확인하기 위해서 뇌출혈 마우스 모델에서 aquaporin 4 inhibitor (TGN-020)을 투여하고 출혈 주변

부종의 정도, 마우스 생존율, 행동학적 변화, 혈관 구조의 변화를 확인하였다. 흥미롭게도 aquaporin 4 inhibitor 를 투약한 그룹은 출혈 자체의 크기 변화는 없으나 출혈 주변 부종이 대조군에 비해서 증가하였고 운동 능력도 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 변화는 출혈 주변 부종 형성에 있어서 aquaporin 4 의 중요성을 유추할 수 있게 하였다.

허혈성 뇌졸중에서는 TGN-020 이 뇌부종을 감소시키는 것으로 보고되었으나[25] 이는 허혈성 뇌졸중 발생의 15-20min 이내 결과로 지연성 부종의 상황과는 다르고 뇌출혈과의 기전적 차이점을 배제하기 어렵다. 반면에 Cheng-Di et al.은 뇌출혈에서는 aquaporin 4 의 발현 감소로 혈관인성 부종이 증가하는 것으로 보고하였는데 이것은 자기공명영상 기반으로 분석한 결과로 미세구조에 관한 분석 (microstructure analysis)은 이루어지지 않았으나 본 연구 결과와 유사하다[26]. Aquaporin 4 inhibitor 투여 그룹에서는 성상세포의 end-feet 이 혈관에서부터 분리되는 것을 확인하였는데 aquaporin 4 가 water channel 로써의 역할 외에도 BBB 완결성 유지에도 중요한 역할을 함을 의미한다. 본 연구에서는 ROS 에 의해서 aquaporin 4 의 발현이 감소하였고 이것은 출혈 주변 부종의 발생에 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다. 하지만, ROS scavenger 투여군 에 의해서 aquaporin 4 의 발현 감소가 최소화 되었으며, aquaporin 4 의 발현 회복 속도를 빠르게 해 주었다. 그리고, ROS scavenger 투여군에서 출혈 주변 부종이 감소하였고 운동 능력이 향상되었다. 또한 성상세포의 end-feet 부착이 증가하여 BBB 완결성을 향상시키는 결과를 확인하였다.

기존의 논문에서는 중추신경계의 BBB 에서 밀착연접, 혈관주위세포의 역할에 대해서는 많은 연구가 되어 있으나 [27] 성상세포의 역할에 대해서는 과소평가된 경향이 있다. 파킨슨 병 (Parkinson's disease) [28] 혹은 알츠하이머 병 (Alzheimer's disease) [29] 에서 성상세포의 보호역할에 대해서 연구가 활발히 이루어지고 있으며 림프관의 주요 channel 로써 aquaporin 4 의 역할 또한 주목받고

있다 [30]. 임상적으로 출혈 이후 발생하는 뇌부종은 중요한 의미가 있으나 뇌부종을 낮출 수 있는 새로운 치료 타겟의 발굴보다는, 비특이적으로 뇌압을 낮추는 고 삼투압 약물의 투여와 수술적 치료에 의존해 왔다. 본 연구를 바탕으로 출혈 주변 부종을 줄이는 타겟으로 aquaporin 4 이 적용될 수 있을 것이다.

Chapter 5. 결론

본 연구에서는 뇌출혈 동물모델에서 출혈 주위 부종과 높은 ROS 발현부위 그리고, 성상세포의 활성화 부위가 전반적으로 일치하는 경향을 확인하였다. 또한, 출혈 초기 출혈 산출물로부터 유리되는 ROS 에 의한 BBB 미세구조 변화를 관찰하였고, 성상세포의 aquaporin 4 라는 water channel 의 발현이 감소되는 것을 확인하였다. Aquaporin 4 발현 감소로 인해 성상세포의 end-feet 이 혈관으로부터 분리되어 BBB 의 구조가 불안정해지며 부종이 증가하는 것을 확인하였다. 이것은 BBB 구성 세포 중의 하나인 성상세포의 coverage 가 감소하여 동적 누수 (dynamic leakage)가 증가하여 발생한 결과로 확인되었다. 그리고, Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020) 투여 시에는 부종의 발생이 심해지고 뇌출혈 마우스의 운동 능력이 감소하였으며 성상세포의 end-feet 의 혈관으로부터 분리가 심해졌다. 이를 통해 뇌출혈 주변 부종에서 aquaporin 4 의 역할을 확인할 수 있었다.

실제 뇌출혈 환자들 중, BBB 에서의 성상세포를 안정화시키고, aquaporin 4 의 발현을 증가시키는 ROS scavenger 를 투여한 환자군에서 대조군에 비하여, 출혈과 연관된 부종의 크기가 줄어들었고, 의식회복 기간 및 중환자실 재실 기간이 줄어들었다.

임상적으로 출혈 이후 발생하는 출혈 주변 부종은 환자의 예후에 밀접한 연관이 있으나 새로운 치료 타겟의 발굴의 발굴보다는 비특이적으로 뇌압을 낮추는 hyperosmolar therapy, 수술적 치료에 의존해 왔다. 본 연구를 바탕으로 출혈 주변 부종을 줄이는 target 으로 aquaporin 4 를 적용할 수 있을 것이다.

Reference

1. Ironside, N., et al., Perihematomal Edema After Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*, 2019: p. Strokeaha119024965.
2. Zheng, H., et al., Mechanism and Therapy of Brain Edema after Intracerebral Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*, 2016. 42(3-4): p. 155-69.
3. Karuppagounder, S.S., et al., N-acetylcysteine targets 5 lipoxygenase-derived, toxic lipids and can synergize with prostaglandin E2 to inhibit ferroptosis and improve outcomes following hemorrhagic stroke in mice. *Ann Neurol*, 2018. 84(6): p. 854-872.
4. Shi, J., et al., Oleuropein protects intracerebral hemorrhage-induced disruption of blood-brain barrier through alleviation of oxidative stress. *Pharmacol Rep*, 2017. 69(6): p. 1206-1212.
5. Kocaogullar, Y., et al., Preventive effects of intraperitoneal selenium on cerebral vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol*, 2010. 22(1): p. 53-8.
6. Sun, N., et al., Selective Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Modulation Attenuates Experimental Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*, 2016. 47(7): p. 1899-906.
7. Ma, Q., et al., NLRP3 inflammasome contributes to inflammation after intracerebral hemorrhage. *Ann Neurol*, 2014. 75(2): p. 209-19.
8. Pan, W. and A.J. Kastin, Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. *Progress in neurobiology*, 2007. 83(6): p. 363-374.
9. Florczak-Rzepka, M., et al., Matrix metalloproteinases in human spontaneous intracerebral hemorrhage: an update. *Cerebrovasc Dis*, 2012. 34(4): p. 249-62.
10. Duan, X., et al., Intracerebral Hemorrhage, Oxidative Stress, and Antioxidant Therapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2016. 2016: p. 1203285.

11. Wang, J. and S. Dore, Heme oxygenase-1 exacerbates early brain injury after intracerebral haemorrhage. *Brain*, 2007. 130(Pt 6): p. 1643-52.
12. Abbott, N.J., L. Rönnbäck, and E. Hansson, Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 2006. 7(1): p. 41-53.
13. Papadopoulos, M.C. and A.S. Verkman, Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol*, 2007. 22(6): p. 778-84.
14. Jellinger, K.A., *Animal Models of Acute Neurological Injuries II: Injury and Mechanistic Assessments, Volumes 1 and 2.* Jun Chen, Xiao-Ming Xu, Zao C. Xu, John H. Zhang (eds). Totowa, NJ: Humana Press & Springer: New York, Dordrecht, Heidelberg, New York, 2012, Hardcover, 724 and 718 pp., ISBN 978-1-6179-6 and 978-1-61779-781-1. Price: Euro 139.95 and 123.95; US\$ 179.00 and 159.00. *European Journal of Neurology*, 2012. 19(10): p. e120-e120.
15. Papadopoulos, M.C., et al., Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *Faseb j*, 2004. 18(11): p. 1291-3.
16. Stokum, J.A., V. Gerzanich, and J.M. Simard, Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016. 36(3): p. 513-38.
17. Guo, T., et al., Neural Injuries Induced by Hydrostatic Pressure Associated With Mass Effect after Intracerebral Hemorrhage. *Scientific Reports*, 2018. 8(1): p. 9195.
18. Mracsko, E. and R. Veltkamp, Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage. *Front Cell Neurosci*, 2014. 8: p. 388.
19. Zador, Z., et al., Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol*, 2009(190): p. 159-70.
20. Gao, G. and Y.-Z. Chang, Mitochondrial ferritin in the regulation of brain iron homeostasis and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 2014. 5(19).

21. Ishii, T., et al., Endogenous reactive oxygen species cause astrocyte defects and neuronal dysfunctions in the hippocampus: a new model for aging brain. *Aging Cell*, 2017. 16(1): p. 39-51.
22. Chu, H., et al., Aquaporin-4 and Cerebrovascular Diseases. *Int J Mol Sci*, 2016. 17(8).
23. Tang, Y., et al., Effects of Aquaporin-4 on edema formation following intracerebral hemorrhage. *Exp Neurol*, 2010. 223(2): p. 485-95.
24. Bi, C., et al., The Oxidative Stress-Induced Increase in the Membrane Expression of the Water-Permeable Channel Aquaporin-4 in Astrocytes Is Regulated by Caveolin-1 Phosphorylation. *Front Cell Neurosci*, 2017. 11: p. 412.
25. Pirici, I., et al., Inhibition of Aquaporin-4 Improves the Outcome of Ischaemic Stroke and Modulates Brain Paravascular Drainage Pathways. *Int J Mol Sci*, 2017. 19(1).
26. Chiu, C.D., et al., Hyperglycemia exacerbates intracerebral hemorrhage via the downregulation of aquaporin-4: temporal assessment with magnetic resonance imaging. *Stroke*, 2013. 44(6): p. 1682-9.
27. Zhao, Z., et al., Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*, 2015. 163(5): p. 1064-1078.
28. Booth, H.D.E., W.D. Hirst, and R. Wade-Martins, The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci*, 2017. 40(6): p. 358-370.
29. Chun, H. and C.J. Lee, Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: A double-edged sword. *Neuroscience Research*, 2018. 126: p. 44-52.
30. Louveau, A., et al., Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J Clin Invest*, 2017. 127(9): p. 3210-3219.

Abstract

Perihematomal edema (PHE) around spontaneous intracerebral hemorrhage (ICH) is one of major causes of neurological deterioration. PHE usually occurs due to the combined action of cytotoxic edema and vasogenic edema. It has been reported that the infiltration of immune cells and the secondary inflammatory response due to thrombin, plasminogen, ferritin, ferrous and reactive oxygen species (ROS) derived from the blood components may be involved in the cytotoxic edema that occurs early in the bleeding. On the other hand, vascular endothelial growth factors induced by inflammation are known to play an important role in vasogenic edema. However, the microstructure changes of the blood-brain barrier (BBB) are not well known. In addition, there is a lack of research on the relationship between early edema and delayed edema after ICH.

A mouse model of ICH is made by autologous blood infusion using stereotactic method in this study. Amount of PHE around was measured using magnetic resonance imaging and computed tomography. Tissue samples were obtained after immunofluorescence staining to confirm the change of vascular structures around the edema. In addition, vascular leakage and generation of ROS were also identified using tissue samples with various kinds of immunofluorescence staining. Behavioral test and analysis of mice of ICH were also performed. In addition, clinical and radiological characteristics of patients with ICH were also analyzed in order to confirm the applicability of the results of animal experiments in clinical medicine.

In this study, it was confirmed that the area of PHE, high ROS expression site, and astrocyte activation site in the mouse model of ICH were generally consistent. The changes of microstructure of BBB due to ROS derived from blood components were confirmed in the early stage of ICH. It was also identified that the expression of aquaporin 4 water channel in

astrocytes was decreased in resulting detachment of end-feet of astrocytes from blood vessels. As the results, the structure of BBB became unstable and the PHE in the mice with ICH increased. This phenomenon was resulted by the dynamic leakage due to a decrease in the coverage of astrocytes, one of BBB constituent cells. However, in the group treated with ROS scavenger, the decrease in aquaporin 4 expression was less and the recovery of aquaporin 4 was faster than in the control group. When Aquaporin 4 inhibitor (TGN-020) was administered, the PHE became more severe and the detachment of the end-feet of the astrocyte from blood vessels was increased in mice with ICH. In addition, the ability of exercise of mice also decreased.

In the previous studies, the role of tight junctions and pericytes in the BBB of the central nervous system has been studied, but the role of astrocytes tends to be underestimated. PHE is closely related to the prognosis of the patient with ICH. However, the treatment strategies have relied on high osmotic drugs and surgery to lower the intracranial pressure nonspecifically. Based on this study, aquaporin 4 could be applied as a novel specified treatment target to reduce the PHE.