



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0102601
(43) 공개일자 2024년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/72 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/721 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0184793
(22) 출원일자 2022년12월26일
심사청구일자 2022년12월26일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
전진평
경기도 용인시 수지구 동천로 75(동천동)
윤동혁
충청북도 단양군 어상천면 어상천로 1589-8
한성우
강원도 춘천시 지석로 10, 302동 603호 (퇴계동,
중앙하이츠빌3단지아파트)
(74) 대리인
특허법인본

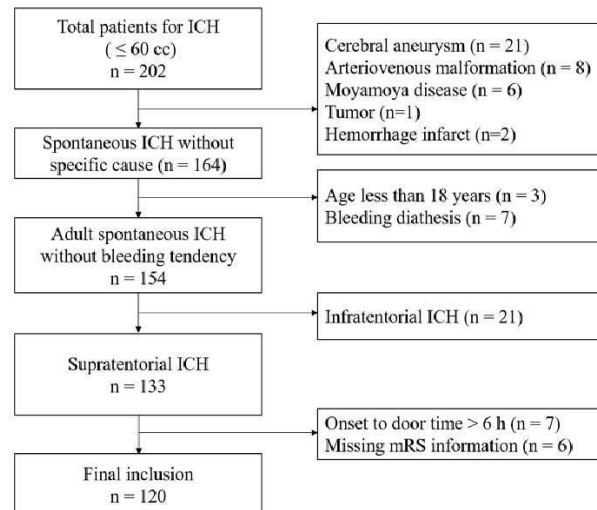
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 합토클로빈 표현형 분석을 이용한 뇌내출혈 후 혈종 주위 부종 증가 여부 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 합토클로빈 표현형 분석을 이용한 뇌내출혈 후 혈종 주위 부종 증가 여부 예측 방법에 관한 것이다. 본 발명은 (a) 뇌내출혈 환자에게서 시료를 얻는 단계; (b) 시료로부터 합토클로빈 표현형을 분석하는 단계; 및 (c) 분석된 합토클로빈 표현형이 Hp 2-2인 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는, 뇌내출혈(Intracerebral hemorrhage) 후 혈종 주위 부종(perihematomal edema) 증가 여부 예측 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2800/2871 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465036270
과제번호	HR21C0198040022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	유전체 · 인공지능 기반 환자맞춤형 신치료 개발 및 관리 기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 뇌내출혈 환자에게서 시료를 얻는 단계;
- (b) 시료로부터 합토글로빈 표현형을 분석하는 단계; 및
- (c) 분석된 합토글로빈 표현형이 Hp 2-2인 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는, 뇌내출혈(Intracerebral hemorrhage) 후 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

혈종 주위 부종 증가의 기준은 혈종 부피를 부종 부피로 나눈 값(rPHE)이 1.2 이상인 경우인, 뇌내출혈(Intracerebral hemorrhage) 후 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

- (d) 분석된 합토글로빈 표현형이 Hp 2-1이고, 상대적 $\alpha 1$ 강도가 높은 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 낮은 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는, 뇌내출혈(Intracerebral hemorrhage) 후 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계는 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 또는 웨스턴 블로팅 법으로 분석하는, 뇌내출혈(Intracerebral hemorrhage) 후 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계의 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 또는 혈액 단백질인, 뇌내출혈(Intracerebral hemorrhage) 후 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 시료는 뇌내출혈 후 3~5일 이내에 수득하는, 뇌내출혈(Intracerebral hemorrhage) 후 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측 방법.

청구항 7

뇌내출혈 환자의 합토글로빈 표현형 및 상대적 $\alpha 1$ 강도를 분석하는 제제를 포함하는, 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

합토글로빈 표현형이 Hp 2-2인 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 높은 것으로 판단하는, 혈종 주위 부종

(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

합도글로빈 표현형이 Hp 2-1이고, 상대적 $\alpha 1$ 강도가 높은 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 낮은 것으로 판단하는, 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

혈종 주위 부종 증가의 기준은 혈종 부피를 부종 부피로 나눈 값(rPHE)이 1.2 이상인 경우인, 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 조성물.

청구항 11

뇌내출혈 환자의 합도글로빈 표현형 및 상대적 $\alpha 1$ 강도를 분석하는 체제를 포함하는, 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 키트.

청구항 12

제11항에 있어서,

합도글로빈 표현형이 Hp 2-2인 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 높은 것으로 판단하는, 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 키트.

청구항 13

제11항에 있어서,

합도글로빈 표현형이 Hp 2-1이고, 상대적 $\alpha 1$ 강도가 높은 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 낮은 것으로 판단하는, 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 키트.

청구항 14

제11항에 있어서,

혈종 주위 부종 증가의 기준은 혈종 부피를 부종 부피로 나눈 값(rPHE)이 1.2 이상인 경우인, 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 합도글로빈 표현형 분석을 이용한 뇌내출혈 후 혈종 주위 부종 증가 여부 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌내출혈(Intracerebral hemorrhage; ICH)은 우리나라 전체 뇌졸중의 약 15~20%를 차지한다. 허혈성 뇌졸중에 비해 ICH는 더 어린 나이에 발생하고 신경학적 예후가 좋지 않다. 다음과 같은 방사선학적 위험 요인은 좋지 않은 예후와 관련이 있다: 입원 시 더 큰 혈종 부피, 출혈 성장, 뇌실내 출혈(Intraventricular hemorrhage; IVH)의 존재, 시간이 지남에 따라 악화되는 혈종 주위 부종(perihematoma edema; PHE). 일련의 방사선학적 위험인자가 1차 뇌손상 정도를 나타내지만 PHE는 초기 출혈 후 2차 뇌손상 정도를 반영한다. 초기 ICH가 적절한 의학적 및 외과적 치료로 성공적으로 치료되더라도 PHE는 여전히 증가된 두개내압(increased intracranial pressure; IICP)을 유발하고 후속 조치 동안 환자의 예후를 악화시킬 수 있다.

[0003] PHE는 ICH 후 경과된 시간에 따라 다른 메커니즘을 가지고 있다. 출혈 직후 PHE의 첫 번째 단계는 삼투 구배의 차이로 인해 세포 독성 부종을 나타낸다. 악화되는 신경 염증 반응과 BBB(Blood-Brain Barrier) 손상으로 혈관

성 부종이 PHE의 두 번째 단계의 주요 원인이 된다. PHE의 세 번째 단계에서 혈액주위 공간의 적혈구 용해에서 파생된 독성 유리 헤모글로빈(Hb)은 반응성 산소종(reactive oxygen species; ROS) 생산을 자극하고 일반적으로 ICH 후 2~3일에 추가 염증 반응을 일으킨다. 따라서 세포 독성 및 염증 반응을 일으키는 Hb 독성에 대해 선택적으로 보호하는 것이 중요하다.

- [0004] 합토클로빈(Hp)은 Hp-Hb 복합체를 만들고 CD163의 세포 표면 수용체를 통해 제거함으로써 자유 Hb 독성을 제한한다. 인간의 경우 알파(α)와 베타(β) 사슬의 조합에 따라 세 가지 유형의 Hp(Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2)가 있다. Hp-Hb 복합 클리어런스는 Hp 대립 유전자의 특정 조합에 따라 다르다. Hp2-2를 가진 ICH 환자와 비교할 때, Hp1-1을 가진 환자는 이론적으로 PHE가 적고 신경학적 예후가 더 좋을 것으로 예상된다. 기존 연구는 ICH 후 처음 96시간 이내에 Hp1-1이 Hp2-2에 비해 PHE의 위험을 상당히 증가시켰다고 보고했다. 그러나 Hp 2 대립유전자는 ICH 환자의 불량한 기능적 예후와 밀접한 관련이 있다. 이러한 상반된 결과는 이전 연구가 초기 혈종 부피, 혈종 성장, ICH 위치, 급성기 수축 혈압 조절, 증상 발현과 ICH 진단 사이의 시간 간격을 포함하는 결과에 영향을 미칠 수 있는 다양한 변수를 조절하지 않는다고 보고한 것에 기여할 수 있다고 판단된다. 따라서 Hp 표현형에 따른 ICH 환자의 예후를 보다 정확하게 평가하기 위해서는 이전 연구에서 사용된 기준에 비해 포함 기준을 좁힐 필요가 있다. 이러한 사실을 고려하여 다음 두 가지 문제에 답하는 것을 목표로 했다. 첫째, 예후에 영향을 미칠 수 있는 잠재적 요인을 최소화하기 위해 투여시 혈종 용적이 60ml 미만이고 급성기에 항고혈압제를 적극적으로 투여받았던 천막상부(supratentorial) ICH 환자에서 특히 Hp 표현형과 PHE 및 신경학적 예후 사이의 연관성을 조사했다. 둘째, Hp2-1 환자의 예후와 관련된 위험 요소를 평가했다. Hp2-1 환자의 비율은 일반적으로 35-50%로 관찰되지만 ICH 후 예후를 예측하는 기존 연구의 대부분은 Hp 2 대립 유전자보다 Hp1 대립 유전자에 초점을 맞추었다. 기존 연구는 Hp2-1 환자에서 $\alpha 2$ 강도와 비교하여 다양한 $\alpha 1$ 강도를 관찰했다. 특히 $\alpha 1$ 강도가 높을수록 지주막하출혈 후 지연성 뇌허혈 위험이 낮아지는 것으로 확인되었다. 본 발명자들은 Hp 이합체의 우세한 효과가 상대적인 $\alpha 1$ 강도에 의존한다고 가정했다. 따라서 Hp2-1의 $\alpha 1$ 강도가 높을수록 산화 스트레스가 적은 Hp1-1처럼 작용한다. 종합하면 Hp의 상대적인 $\alpha 1$ 강도가 ICH 예후와 밀접한 관련이 있는지 조사했다.

선행기술문헌

- [0005] 한국 공개특허 제10-2022-0009984호
- [0006] Han, S.W.; Kim, B.J.; Kim, T.Y.; Lim, S.H.; Youn, D.H.; Hong, E.P.; Rhim, J.K.; Park, J.J.; Lee, J.J.; Cho, Y.J.; et al. Association of Haptoglobin Phenotype with Neurological and Cognitive Outcomes in Patients with Subarachnoid Hemorrhage. *Front. Aging Neurosci.* 2022, 14, 819628
- [0007] Kim, B.J.; Kim, Y.; Kim, S.-E.; Jeon, J.P. Study of Correlation Between Hp $\alpha 1$ Expression of Haptoglobin 2-1 and Clinical Course in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg.* 2018, 117, e221-e227.
- [0008] Murthy, S.B.; Levy, A.P.; Duckworth, J.; Schneider, E.B.; Shalom, H.; Hanley, D.F.; Tamargo, R.J.; Nyquist, P.A. Presence of Haptoglobin-2 Allele Is Associated with Worse Functional Outcomes after Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *World Neurosurg.* 2015, 83, 583-587.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 합토클로빈 표현형 분석을 이용한 뇌내출혈 후 혈종 주위 부종 증가 여부 예측 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다
- [0010] 또한, 본 발명은 합토클로빈 표현형 분석을 이용한 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 합토클로빈 표현형 분석을 이용한 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타난 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을

것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 (a) 뇌내출혈 환자에게서 시료를 얻는 단계; (b) 시료로부터 합토글로빈 표현형을 분석하는 단계; 및 (c) 분석된 합토글로빈 표현형이 Hp 2-2인 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는, 뇌내출혈(Intracerebral hemorrhage) 후 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측 방법을 제공한다.
- [0014] 상기 뇌내출혈은 자발성 뇌내출혈로서, 보다 구체적으로는 혈관 기형이 없는 자발성 뇌내출혈일 수 있다.
- [0015] 상기 혈종 주위 부종 증가의 기준은 혈종 부피를 부종 부피로 나눈 값(rPHE)이 1.2 이상인 경우이다.
- [0016] 상기 예측 방법은 (d) 분석된 합토글로빈 표현형이 Hp 2-1이고, 상대적 $\alpha 1$ 강도가 높은 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 낮은 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0017] 상기 (b) 단계는 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 또는 웨스턴 블로팅 법으로 분석하는 것일 수 있다.
- [0018] 상기 (a) 단계의 시료는 혈액, 소변, 대변, 분변일 수 있고, 상기 혈액은 바람직하게는 전혈, 혈청, 혈장, 또는 혈액 단핵구일 수 있다,
- [0019] 상기 시료는 뇌내출혈 후 3~5일 이내에 수득하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명은 또한, 뇌내출혈 환자의 합토글로빈 표현형 및 상대적 $\alpha 1$ 강도를 분석하는 제제를 포함하는, 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 조성물을 제공한다.
- [0021] 상기 합토글로빈 표현형이 Hp 2-2인 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 높은 것으로 판단한다.
- [0022] 상기 합토글로빈 표현형이 Hp 2-1이고, 상대적 $\alpha 1$ 강도가 높은 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 낮은 것으로 판단한다.
- [0023] 본 발명은 또한, 뇌내출혈 환자의 합토글로빈 표현형 및 상대적 $\alpha 1$ 강도를 분석하는 제제를 포함하는, 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 키트를 제공할 수 있다.
- [0024] 상기 합토글로빈 표현형이 Hp 2-2인 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 높은 것으로 판단한다.
- [0025] 합토글로빈 표현형이 Hp 2-1이고, 상대적 $\alpha 1$ 강도가 높은 경우 혈종 주위 부종 증가 가능성이 낮은 것으로 판단한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명은 합토글로빈 표현형 분석을 이용한 뇌내출혈 후 혈종 주위 부종 증가 여부 예측 방법을 제공할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명은 합토글로빈 표현형 분석을 이용한 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 합토글로빈 표현형 분석을 이용한 혈종 주위 부종(perihematoma edema) 증가 여부 예측용 키트를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은, 본 발명의 실험 흐름도이다.
- 도 2는, 웨스턴 블로팅 분석 결과로서, A는 합토글로빈 표현형, B는 상대적 알파 1 강도만을 측정하기 위한 Hp2-1이다.
- 도 3은, 합토글로빈 표현형(Hp1-1 대 Hp2-2)에 따른 1차 뇌내출혈(ICH) 후 증가된 상대적 혈종 주위 부종(rPHE)의 메커니즘을 나타낸다. 검은색 점선 원은 PHE를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 명세서에서 “합토글로빈(Hp)”은 이황화 결합으로 연결된 2개의 알파 쇠와 2개의 베타 쇠를 포함하는 사량

체 구조를 갖는다. 베타 쇠(245개 아미노산)는 약 40kDa의 질량(이 중 약 30% w/w는 탄수화물이다)을 가지며 모든 표현형에 의해 공유된다. 알파 쇠는 적어도 두 가지 형태로 존재한다: 알파1(83개 아미노산, 9kDa) 및 알파2(142개 아미노산, 17.3kDa). 따라서, Hp는 Hp1-1, Hp2-1 및 Hp2-2라고 하는 세 가지 표현형으로 발생한다. Hp1-1은 2개의 알파1 쇠를 함유하고, Hp2-2는 2개의 알파2 쇠를 함유하며, Hp2-1은 1개의 알파1 및 1개의 알파2 쇠를 함유한다. Hp 1-1은 100kDa, 또는 Hb와 복합체화될 때 165kDa의 분자량을 갖는다. Hp1-1은 단일 이소형으로 존재하며, Hp 이량체라고도 한다. Hp2-1은 220kDa의 평균 분자량을 가지며 선형 중합체를 형성한다. Hp2-2는 400kDa의 평균 분자량을 가지며 고리형 중합체를 형성한다. 각각의 상이한 중합체 형태는 상이한 이소형이다.

[0032] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0033] 환자 및 방법

[0034] 환자

[0035] 연구 코호트는 "제1회 대한뇌졸중유전학회 연구"라는 제목의 뇌졸중 데이터베이스에서 얻었다. 이 뇌졸중 데이터베이스는 5개 대학병원에서 뇌혈관 질환 환자의 임상, 방사선 및 유전 데이터를 포함하여 전향적으로 수집된 다양한 유형의 데이터로 구성되어 있다. 이 데이터베이스에서 2017년 3월부터 2020년 2월 사이에 다음 조건을 가진 ICH 환자를 포함했다: (1) 18세 이상의 성인; (2) 혈관 기형과 관련되지 않은 자발성 ICH; (3) 증상 발현 6시간 이내의 ICH 진단; (4) 천막상부 ICH; (5) 60mL 미만의 초기 혈종 용적; (6) 급성기에 BP < 140 mmHg를 목표로 집중적인 항고혈압 치료를 받은 환자. 한편, 다음 조건을 가진 환자는 제외했다: (1) 외상성 ICH; (2) 두개내 동맥류, 동정맥 기형 및 모야모야병과 같은 혈관 기형과 관련된 ICH; (3) 불충분한 의료 및 방사선 정보; (4) ICH 또는 뇌경색의 이전 병력; 및 (5) Hp 표현형 분석을 거부한 환자(도 1 참조).

[0036] 연구 결과

[0037] 이 작업의 주요 결과는 ICH 후 96시간 이내에 Hp 표현형과 상대적 혈종 주위 부종(rPHE) 사이의 연관성을 평가하는 것이다. 2차 결과는 Hp 표현형에 따라 3개월차에 불량한 신경학적 예후를 평가하는 것이다. 본 발명자들은 또한 Hp의 상대적 $\alpha 1$ 강도를 기반으로 Hp2-1을 가진 ICH 환자의 예후를 분석했다. 불량한 신경학적 예후는 mRS(modified Rankin Scale)에서 3-6점으로 정의되었다. 의료 기록(예: 성별, 연령, 고혈압, 당뇨병, 관상 동맥 심장 질환, 만성 신장 질환, 고지혈증, 항혈소판제 및 항응고제 사용 이력, 흡연)을 검토했다. 혈종 위치, 유형(엽성 및 심부 ICH), 혈종 부피 및 진단 후 첫 96시간 이내에 발생한 rPHE에 대한 방사선학적 기록도 검토되었다. 입원 환자, 특히 60cc 미만의 자발성 ICH 환자에 대한 영상 프로토콜은 아래에 언급되어 있다. 첫째, ICH와 관련된 원인을 규명하기 위해 입원 1-2일 후 선택적으로 MRI를 시행하였다. 둘째, MRI 시간을 고려하여 ICH 발생 후 3-4일 이내에 추적 CT를 한 번 더 확인하였다. 혈종 용적 및 rPHE는 컴퓨터 단층 촬영(CT)(3D-Slicer, Harvard University, Cambridge, MA, USA)으로 생성된 원본 DICOM 형식 파일을 업로드하고 10년 이상의 경력을 가진 두 명의 신경 중재자가 검사한 오픈 소스 3D 슬라이스 소프트웨어를 사용하여 측정했다. rPHE는 부종 부피(edema volume)를 혈종 부피(hematoma volume)로 나눈 값으로 정의되었다. 이전 보고서에서 사용된 방법을 수정하여 96시간 이내에 rPHE가 1.4 이상인 경우 PHE가 증가한 것으로 간주했다. 이 연구는 모든 참여 병원의 기관 검토 위원회(IRB No: 2016-31, 2017-113, 2018-6, 2019-06)의 승인을 받았다. 환자 또는 법적 대리인으로부터 사전 동의를 얻었다.

[0038] 합토글로빈 표현형

[0039] Hp 표현형 분석은 이전에 설명한 프로토콜에 따라 수행되었다. 먼저, Hp 표현형을 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 이용하여 Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2로 분류한 후 $\alpha 1$ 및 $\alpha 2$ 사슬을 검출하기 위한 면역블로팅을 수행하였다(도 2). 다음으로, Hp2-1을 발현하는 환자에서 Hp의 상대 $\alpha 1$ 강도를 계산하기 위해 웨스턴 블로팅을 다시 수행하였다. 방법에 대한 자세한 설명은 다음과 같다. 1 μ L의 혈청을 74 μ L의 인산완충식염수에 첨가하여 혈청을 1:75로 희석했다. 혈청 희석제를 동량의 2x-SDS 샘플 완충액(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)과 혼합하여 샘플을 준비하고 95 ° C에서 8분 동안 끓였다. 끓인 후, 각 샘플 10 μ L를 15% 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하고 100 V(Bio-Rad, CA, USA)에서 150분 동안 전기영동하였다. 이동 후, 막을 0.01% Tween-20을 포함하는 TBST(10mM Tris-HCl pH8.0, 150mM NaCl) 중 5% BSA로 1시간 동안 차단시켰다. 그런 다음 막을 4 ° C에서 차단 완충액에 1 : 10,000으로 희석된 다 클론 토끼 항 인간 합토글로빈 항체(Dako, Glostrup, Denmark)와 함께 밤새 배양했다. TBST로 3회 세척한 후, 막을 HRP(horseradish peroxidase)-접합된 염소 항-토끼 IgG(Abcam, Cambridge, UK)와

함께 1:10,000으로 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 최종 세척 단계 후, HRP 기질(Thermo, Waltham, MA, USA)을 막에 첨가하고, 이 시점에서 X-선 필름(Kodak, Rochester, NY, USA)을 사용하여 화학발광을 검출하였다. 분자 크기를 기반으로 Hp2-1의 고분자 조성을 결정하기 위해 항-Hp 항체로 추가 면역 침전을 수행했다. Hp를 면역 침전시키기 위해 Hp2-1 환자의 0.3mg/mL 혈청을 항-Hp 항체와 함께 4° C에서 밤새 배양했다. 면역 복합체는 protein A/G Sepharose(Santa Cruz, CA, USA)로 침전시키고 웨스턴 블로팅을 통해 분석하였다. 항-알부민 항체(Abcam, Cambridge, UK)를 로딩 대조군으로 사용하였다. α1 사슬과 알부민의 강도는 ImageJ 소프트웨어 (Version 1.49v, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 측정되었다.

통계 분석

불연속 및 연속 데이터는 각각 비율 및 중앙값(25-75 백분위수)이 있는 평균으로 설명된다. 특정 예후와 관련된 관련 요인을 찾기 위해 단변량 분석을 수행했다. p-값이 0.20 미만인 변수를 포함하여 특정 예후에 대한 위험 요인을 식별하기 위해 다변량 분석을 수행했다. 예후와 상대적인 α1 강도 상관 관계는 Hp2-1 환자에 대해서만 추가로 분석되었다. 상대적 α1 강도는 α1의 강도를 알부민의 강도로 나눈 값으로 계산되었다. p 값 < 0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 통계 분석은 SPSS V.19(SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행하였다.

결과

1차 결과

총 120명의 환자가 제외 후 분석에 최종적으로 포함되었다(도 1). Hp1-1은 15명(12.5%), Hp2-1은 51명(42.5%), Hp2-2는 54명(45.0%)에서 나타났다. 증가된 PHE(96시간에서 rPHE ≥ 1.4로 정의됨)는 Hp2-1(n = 15, 29.4%) 또는 Hp1-1 환자(n = 2, 13.3%)보다 Hp2-2(n = 26, 48.1%) 환자에서 훨씬 더 자주 관찰되었다(p = 0.020) (표 1 및 2). 다변량 분석 결과, Hp1-1을 기준 값으로 사용했을 때 Hp2-2가 rPHE 증가 가능성(OR = 6.294, 95% CI: 1.283-30.881)을 유의하게 증가시킨 것으로 나타났다(표 3 참조). 고혈압, 관상 동맥 질환, 항혈소판제 또는 항응고제를 사용한 약물 치료, 입원 시 혈중 용적과 같은 다른 변수는 rPHE에서 유의미한 증가를 나타내지 않았다(표 3). Nagelkerke R-Square 값은 0.131이다.

아래 표 1은 합토클로빈(Hp) 표현형에 따른 뇌내출혈 등록 환자의 기본 특성을 나타낸다.

표 1

Variables	Hp1-1 (n = 15)	Hp2-1 (n = 51)	Hp2-2 (n = 54)	p-Value
Clinical variables				
Male	6 (40.0%)	29 (56.9%)	30 (55.6%)	0.496
Age (years)	64.3 ± 10.7	62.9 ± 16.1	65.6 ± 13.8	0.674
Hypertension	11 (73.3%)	34 (66.7%)	27 (50.0%)	0.116
Diabetes mellitus	3 (20.0%)	10 (19.6%)	8 (14.8%)	0.782
Coronary artery disease	1 (6.7%)	5 (9.8%)	4 (7.4%)	0.878
Hyperlipidemia	2 (13.3%)	7 (13.7%)	8 (14.8%)	0.982
Chronic kidney disease	2 (13.3%)	3 (5.9%)	2 (3.7%)	0.371
Smoking	2 (13.3%)	10 (19.6%)	10 (18.5%)	0.858
Antiplatelet or anticoagulation	4 (26.7%)	11 (21.6%)	10 (18.5%)	0.778
Laboratory variables				
Albumin (g/L)	4.2 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.1 ± 0.4	0.159
Hemoglobin (g/dL)	12.9 ± 1.9	13.6 ± 2.2	13.9 ± 1.6	0.247
Platelet (×10 ⁹ /L)	249.7 ± 89.3	235.3 ± 67.8	236.8 ± 82.2	0.949
Radiologic variables				
Deep ICH	12 (80.0%)	47 (92.1%)	44 (81.5%)	0.230
Hematoma volume at admission (cc)	14.2 ± 9.7	17.7 ± 11.9	20.3 ± 13.5	0.135
rPHE ≥ 1.4 at 96 h	2 (13.3%)	15 (29.4%)	26 (48.1%)	0.020
Treatment				
Burr-hole trephination or craniotomy	3 (20.0%)	8 (15.7%)	13 (24.1%)	0.562
Outcome				
Poor neurological outcomes at 3 months	2 (13.3%)	22 (43.1%)	26 (48.1%)	0.051

rPHE indicates relative perihematomal edema.

아래 표 2는 뇌내출혈 후 96시간 이내에 rPHE ≥ 1.4로 정의되는 상대적 혈중 주위 부종(rPHE) 증가와 관련된 관련 요인의 단변량 분석을 나타낸다.

표 2

Variables	rPHE < 1.4 (n = 77)	rPHE ≥ 1.4 (n = 43)	p-Value
Clinical variables			
Male	34 (44.2%)	21 (48.8%)	0.622
Age, years	67.0 (50.0–74.3)	68.0 (53.3–75.8)	0.760
Hypertension	50 (64.9%)	22 (51.2%)	0.140
Diabetes mellitus	14 (18.2%)	7 (16.3%)	0.793
Coronary artery disease	9 (11.7%)	1 (2.3%)	0.075
Hyperlipidemia	12 (15.6%)	5 (11.6%)	0.551
Chronic kidney disease	4 (5.2%)	3 (7.0%)	0.690
Smoking	15 (19.5%)	7 (16.3%)	0.664
Antiplatelet or anticoagulation	19 (24.7%)	6 (14.0%)	0.166
Laboratory variables			
Albumin (g/L)	4.3 (3.9–4.5)	4.3 (4.0–4.5)	0.462
Hemoglobin (g/dL)	13.6 (12.7–14.6)	13.6 (12.6–15.1)	0.763
Platelet ($\times 10^9$ /L)	239 (191–287)	234 (186–305)	0.852
Radiologic variables			
Deep ICH	65 (84.4%)	38 (88.4%)	0.551
Hematoma volume at admission (cc)	13.6 (8.8–22.7)	15.0 (11.3–26.0)	0.109
Burr-hole trephination or craniotomy	15 (19.5%)	9 (20.9%)	0.849
Haptoglobin phenotypes			0.020
Hp1-1	13 (16.9%)	2 (4.6%)	
Hp2-1	36 (46.8%)	15 (34.9%)	
Hp2-2	28 (36.3%)	26 (60.5%)	

[0050]

[0051]

아래 표 3은 뇌내출혈 후 96시간에 rPHE ≥ 1.4로 정의되는 상대적 혈중 주위 부종(rPHE) 증가의 위험 인자를 식별하기 위한 다변량 로지스틱 회귀 분석을 나타낸다.

표 3

	Odds Ratio	95% Confidence Interval	p-Value
Hypertension	0.866	0.368–2.036	0.742
Coronary artery disease	0.172	0.020–1.440	0.104
Antiplatelet or anticoagulation	0.592	0.192–1.825	0.362
Hematoma volume at admission (cc)	1.013	0.982–1.045	0.417
Haptoglobin phenotypes			0.028
Hp1-1		1	
Hp2-1	2.843	0.566–14.284	0.204
Hp2-2	6.294	1.283–30.881	0.023

[0052]

[0053]

ICH 환자 50명(41.7%)에서 열악한 예후가 관찰되었다: Hp1-1, n = 2(13.3%); Hp2-1, n = 22(43.1%); 및 Hp2-2, n = 26(48.1%)(표 4). 9명의 환자(7.5%)가 입원 중 사망하였다. 3명의 환자는 신경학적 손상으로 사망했고, 6명의 환자는 폐렴 및 혈전색전증 합병증으로 사망했다. 다변량 분석 결과 Hb 수치가 높은 경우(OR = 1.447, 95% CI: 1.115–1.877), 입원 시 혈중 부피(OR = 1.057, 95% CI: 1.015–1.101)가 높은 경우, 천공 두개술 또는 개두술로 이루어진 외과적 치료를 받은 경우(OR = 5.340, 95% CI: 1.665–17.122)는 ICH 후 불량한 예후의 위험을 증가시켰다. Hp1-1을 기준값으로 사용했을 때 Hp2-2(OR = 4.286, 95% CI: 0.733–25.048) 및 Hp2-1(OR = 5.265, 95% CI: 0.881–31.457)은 열악한 예후를 크게 증가시키지 않았다(표 5). Nagelkerke R-Square 값은 0.338이다.

[0054]

아래 표 4는 뇌내 출혈 후 불량한 예후와 관련된 관련 요인의 단변량 분석을 나타낸다.

표 4

Variables	Good Outcomes (n = 70)	Poor Outcomes (n = 50)	p-Value
Clinical variables			
Male	35 (50%)	30 (60.0%)	0.278
Age, years	69.5 (53.0–76.0)	63.0 (50.0–74.0)	0.138
Hypertension	47 (67.1%)	25 (50.0%)	0.059
Diabetes mellitus	14 (20.0%)	7 (14.0%)	0.394
Coronary artery disease	7 (10.0%)	3 (6.0%)	0.434
Hyperlipidemia	10 (14.3%)	7 (14.0%)	0.965
Chronic kidney disease	5 (7.1%)	2 (4.0%)	0.469
Smoking	11 (15.7%)	11 (22.0%)	0.380
Antiplatelet or anticoagulation	17 (24.3%)	8 (16.0%)	0.271
Laboratory variables			
Albumin (g/L)	4.3 (4.0–4.5)	4.3 (4.0–4.6)	0.659
Hemoglobin (g/dL)	13.3 (12.3–14.6)	14.1 (13.3–15.4)	0.005
Platelet ($\times 10^9/L$)	245 (196–297)	229 (189–300)	0.497
Radiologic variables			
Deep ICH	59 (84.3%)	44 (88.0%)	0.565
Hematoma volume at admission (cc)	12.0 (8.8–18.0)	19.0 (12.0–30.0)	0.001
rPHE ≥ 1.4 at 96 h	22 (31.4%)	21 (42.0%)	0.234
Burr-hole trephination or craniotomy	6 (8.6%)	18 (36.0%)	<0.001
Haptoglobin phenotypes			0.051
Hp1-1	13 (18.6%)	2 (4.0%)	
Hp2-1	29 (41.4%)	22 (44.0%)	
Hp2-2	28 (40.0%)	26 (52.0%)	

rPHE indicates relative perihematomal edema.

[0055]

[0056] 아래 표 5는 뇌내 출혈 후 불량한 예후와 관련된 위험 요인의 다변량 로지스틱 회귀 분석을 나타낸다.

표 5

	Odds Ratio	95% Confidence Interval	p-Value
Hypertension	0.433	0.181–1.309	0.061
Age, years	0.994	0.962–1.027	0.717
Hemoglobin	1.447	1.115–1.877	0.005
Hematoma volume at admission (cc)	1.057	1.015–1.101	0.007
Burr-hole trephination or craniotomy	5.340	1.665–17.122	0.005
Haptoglobin phenotypes			0.190
Hp1-1		1	
Hp2-1	5.265	0.881–31.457	0.069
Hp2-2	6.294	1.283–30.881	0.106

[0057]

[0058] 합토글로빈 2-1 환자에서의 예후

[0059] Hp2-1 ICH 환자의 예후를 분석하였다. 증가된 rPHE가 Hp2-1 환자 중 15명(29.4%)에서 관찰되었다(표 6). 다변량 분석 결과 상대적 $\alpha 1/\alpha 2$ 부민 강도가 높을수록 rPHE 증가 위험이 유의하게 감소한 것으로 나타났다(OR = 0.020, 95% CI: 0.001–0.358)(표 7). Nagelkerke R-Square 값은 0.209이다. Hp2-1을 가진 ICH 환자 중 22명(43.1%)에서 열악한 예후가 관찰되었다. 상대적 $\alpha 1/\alpha 2$ 부민 강도는 Hp2-1이 있는 ICH 환자의 예후와 관련이 없었다($p = 0.856$)(표 8). 다양한 가능한 위험 요인 중 외과적 치료의 존재만이 3개월차에 열악한 신경학적 예후의 위험을 유의하게 증가시켰다(OR = 6.239, 95% CI: 1.054–36.928)(표 9). Nagelkerke R-Square 값은 0.179이다.

[0060] 아래 표 6은 합토글로빈 2-1 환자에서 뇌내출혈 후 96시간에 rPHE ≥ 1.4 로 정의되는 rPHE(relative perihematomal edema) 증가와 관련된 관련 요인에 대한 단변량 분석을 나타낸다.

표 6

Variables	rPHE < 1.4 (n = 36)	rPHE ≥ 1.4 (n = 15)	p-value
Clinical variables			
Male	22 (61.1%)	7 (46.7%)	0.343
Age, years	67.0 (49.0-75.5)	62.0 (50.5-74.5)	0.804
Hypertension	25 (69.4%)	9 (60.0%)	0.514
Diabetes mellitus	5 (13.9%)	5 (33.3%)	0.111
Coronary artery disease	3 (8.3%)	2 (13.3%)	0.584
Hyperlipidemia	2 (5.6%)	2 (13.3%)	0.958
Chronic kidney disease	2 (5.6%)	2 (13.3%)	0.347
Smoking	7 (19.4%)	5 (33.3%)	0.964
Antiplatelet or anticoagulation	6 (16.7%)	5 (33.3%)	0.776
Laboratory variables			
Albumin (g/L)	4.3 (4.1-4.7)	4.3 (4.2-4.6)	0.640
Hemoglobin (g/dl)	13.9 (12.5-14.9)	12.6 (10.6-14.1)	0.061
Platelet ($\times 10^9/L$)	242 (198-267)	234 (200-296)	0.649
Radiologic variables			
Deep ICH	33 (91.7%)	14 (93.3%)	0.840
Hematoma volume at admission (cc)	13.0 (8.4-22.2)	20.0 (11.3-25.5)	0.085
Burr-hole trephination or craniotomy	5 (13.9%)	5 (33.3%)	0.585
Haptoglobin			0.025
Relative $\alpha 1$ /albumin intensity	0.325 (0.225-0.435)	0.210 (0.130-0.255)	

[0061]

[0062]

아래 표 7은 합토글로빈 2-1 환자에서 뇌내출혈 후 96시간에 rPHE ≥ 1.4 로 정의되는 증가된 상대혈액주위 부종 (rPHE)의 다변량 로지스틱 회귀 분석을 나타낸다.

표 7

	Odds ratio	95% Confidence interval	p-value
Diabetes mellitus	3.136	0.589-16.705	0.181
Hemoglobin	0.768	0.544-1.085	0.134
Hematoma volume at admission (cc)	1.050	0.993-1.110	0.088
Relative $\alpha 1$ /albumin intensity	0.002	0.001-0.358	0.020

[0063]

[0064]

아래 표 8은 합토글로빈 2-1 환자의 뇌내출혈 후 불량한 예후 관련 요인에 대한 단변량 분석을 나타낸다.

표 8

Variables	Good outcome (n = 29)	Poor outcome (n = 22)	p-value
Clinical variables			
Male	15 (51.7%)	14 (63.6%)	0.395
Age, years	71.0 (51.3-76.7)	54.0 (49.0-70.0)	0.142
Hypertension	22 (75.9%)	12 (54.5%)	0.110
Diabetes mellitus	8 (27.6%)	2 (9.1%)	0.099
Coronary artery disease	4 (13.8%)	1 (4.5%)	0.271
Hyperlipidemia	5 (17.2%)	2 (9.1%)	0.402
Chronic kidney disease	2 (6.9%)	2 (9.1%)	0.773
Smoking	6 (20.7%)	4 (18.2%)	0.823
Antiplatelet or anticoagulation	5 (17.2%)	4 (18.2%)	0.930
Laboratory variables			
Albumin (g/L)	4.3 (4.1-4.6)	4.3 (4.2-4.6)	0.468
Hemoglobin (g/dl)	13.0 (12.1-14.9)	13.9 (12.9-14.6)	0.499
Platelet ($\times 10^9/L$)	239 (196-274)	252 (200-300)	0.549
Radiologic variables			
Deep ICH	26 (89.7%)	21 (95.4%)	0.445
Hematoma volume at admission (cc)	13.0 (10.0-21.0)	16.0 (10.0-24.0)	0.401
rPHE ≥ 1.4 at 96 hours	8 (27.6%)	7 (31.8%)	0.743
Burr-hole trephination or craniotomy	2 (6.9%)	6 (27.3%)	0.048
Haptoglobin			0.856
Relative $\alpha 1$ /albumin intensity	0.310 (0.193-0.403)	0.285 (0.210-0.440)	

rPHE indicates relative perihematoma edema

아래 표 9는 합토글로빈 2-1 환자의 뇌내출혈 후 예후 불량 관련 요인에 대한 다변량 분석을 나타낸다.

표 9

	Odds ratio	95% Confidence interval	p-value
Hypertension	0.316	0.089-1.115	0.073
Age, years	0.983	0.944-1.023	0.397
Diabetes mellitus	0.394	0.063-2.454	0.318
Burr-hole trephination or craniotomy	6.239	1.054-36.928	0.044

논의

ICH 환자의 예후에 대한 Hp 표현형의 영향은 잘 알려져 있지 않다. 지주막 하 출혈 (SAH) 환자에서 동일한 영향과 비교하여 조사되었다. 기존 연구는 Hp1 대립 유전자가 Hp2 대립 유전자보다 SAH 후 뇌혈관 경련에 대해 더

강한 보호 효과를 보였다고 보고했다. 한편, Hp2 대립유전자는 고용량 SAH 환자에서 유리한 장기 예후와 관련이 있는 것으로 보고되었다. ICH는 뇌 실질 내에서 발생하는 출혈을 의미한다. 따라서 ICH 주변의 인접한 뇌 세포에 대한 유리 Hb 독성을 제거하는 것이 더 중요하다. 단백질 및 지질 산화 측면에서 Hp1-1은 Hp2-2보다 우수한 항산화 활성을 나타냈다. CD163에 결합하는 Hp1-1-Hb 복합체도 상응하는 Hp2-2-Hb 복합체보다 더 나은 항염증 반응을 보였다. 따라서 우리는 Hp1-1이 Hp2-2보다 더 낮은 PHE 및 더 나은 예후와 연관될 수 있다는 가설을 세웠다. 그러나 선행연구에서는 상반된 결과를 보였다. 기존 연구는 Hp1-1이 발병 후 96시간 이내에 측정된 Hp2-2보다 PHE의 더 높은 가능성과 관련이 있다고 보고한 반면 다른 연구는 Hp2-2 및 Hp2-1을 가진 ICH 환자가 Hp1-1을 가진 환자보다 더 자주 나쁜 예후를 경험했음을 보여주었다. 실제 임상에서 환자의 예후는 초기 혈종의 용적, 혈종의 성장 및 위치에 크게 좌우된다. 60mL를 초과하는 ICH 부피는 심부 ICH에서 약 90%, 엽상 ICH에서 70%의 더 높은 사망률을 나타냈다. 큰 혈종 부피는 그 자체로 증가된 PHE와 밀접한 관련이 있다. 또한 ICH 환자의 최대 2/3에서 처음 3시간 이내에 ICH 양이 증가하는 경향이 있다. ICH 위치와 관련하여 뇌간 ICH 및 소뇌 ICH 환자는 천막상 ICH 환자와 다른 예후를 보였다. 따라서 ICH 예후에 대한 Hp 표현형의 임상적 의의는 예후에 영향을 미칠 수 있는 요인들을 통제하면서 평가되어야 한다. 이 발명에서 본 발명자들은 60mL 미만의 천막상부 ICH만 등록했으며 상대적 rPHE 값을 기반으로 한 결과와 Hp 표현형의 연관성을 평가했다. 본 발명자들의 연구에 따르면 Hp2-2는 Hp1-1보다 PHE를 크게 증가시켰지만 Hp 표현형은 환자의 예후와 관련이 없었다. 처음으로 우리는 Hp2-1을 가진 ICH 환자의 PHE 및 예후에 대한 위험 요소를 확인했다. 간단히 말해서 Hp2-1은 하나의 Hp1 대립 유전자와 하나의 Hp2 대립 유전자로 구성된다. 따라서 Hp2-1의 경우 Hp1-1 대 Hp2-1 및 Hp2-2 또는 Hp1-1 및 Hp2-1 대 Hp2-2의 비교 분석에 주로 사용되었다. 메타 분석 결과 Hp2-2 환자는 SAH 후 Hp1-1 환자보다 좋지 않은 예후의 가능성이 유의하게 높았다(OR = 2.37, 95% CI: 1.12-5.04). Hp2-1 구조는 α 및 β 사슬 조합에 따라 유사성에서 이량체, 중합체까지 다양할 수 있다. 기존 연구는 상대적으로 높은 $\alpha 1$ 강도가 Hp1-1 이량체와 유사한 방식으로 작용하고 이것이 SAH 후 6개월 예후와 관련이 있다고 제안했다. 이 가설을 바탕으로 Hp2-1을 발현하는 51명의 ICH 환자의 예후를 추가로 분석했다. 본 발명자들의 결과는 상대적인 $\alpha 1$ /알부민 강도가 높을수록 Hp2-1 환자에서 rPHE의 가능성이 크게 감소한다는 것을 보여주었다. 상대적 $\alpha 1$ 강도가 높은 형태로 나타나는 Hp2-1-Hb 복합체의 분자량이 낮을수록 혈종 주위 병변에서 상대적 $\alpha 1$ 강도가 낮은 Hp2-1-Hb 복합체보다 더 나은 클리어런스 및 ROS 생성 감소와 관련이 있을 수 있다고 추정했다(도 3).

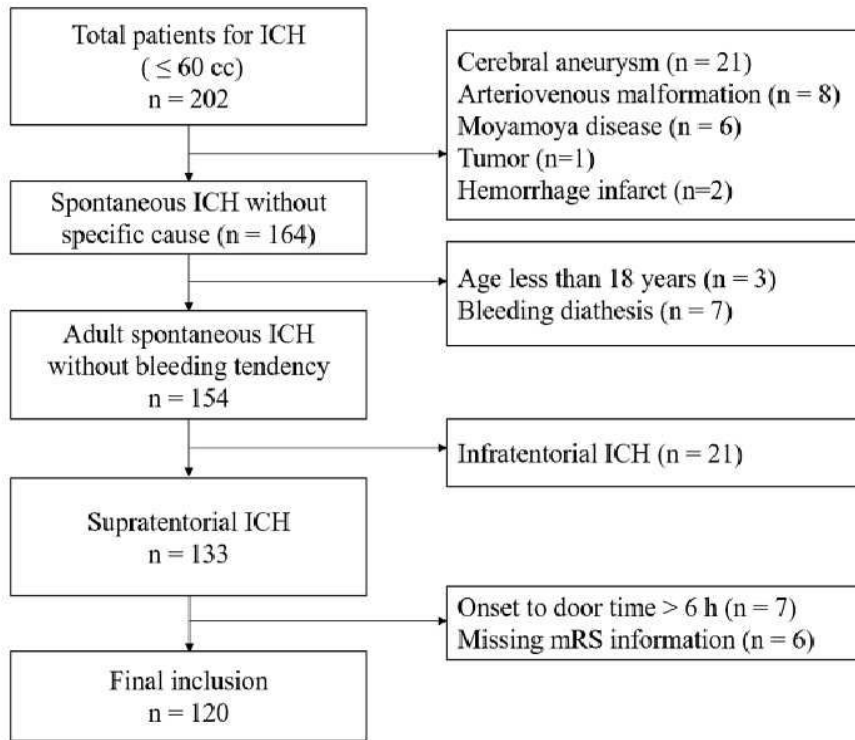
[0070] 지금까지 수행된 Hp 연구와 더불어, 향후 혈액질환 환자에서 뇌졸중 발생 및 치료에 있어 Hp의 역할에 대한 연구가 필요하다. 뇌졸중의 원인이 되는 혈액질환의 빈도는 약 1.3%이다. 기존 연구는 젊고 이전에 정맥혈전증과 원인불명의 재발성 뇌졸중 병력이 있는 환자에서 뇌졸중에 대한 혈액학적 질환이 의심된다고 보고하였다. 또한 겸상 적혈구 질환에서 Hp 2 대립 유전자는 Hp1 대립 유전자보다 더 불리하다. Hp가 겸상 적혈구 질환에서 혈액 독성, 산화 스트레스 및 염증을 감소시키는 데 필수적이라는 점을 고려할 때 향후 다양한 혈액 질환에서 ICH를 비롯한 뇌졸중에 대한 실마리와 치료법을 찾기 위해 Hp에 대한 연구가 필요하다는 가설을 세웠다.

[0072] **결론**

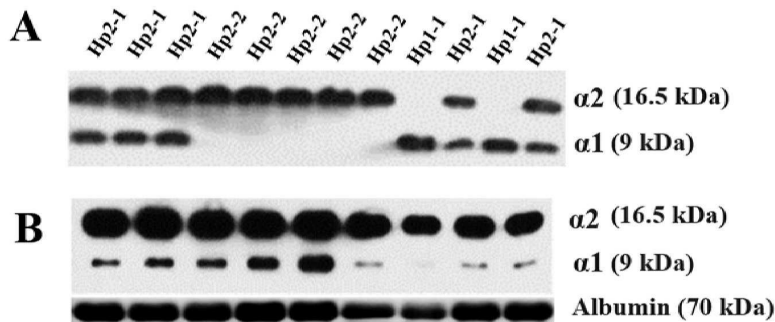
[0073] Hp2-2를 가진 ICH 환자는 Hp1-1을 가진 환자보다 rPHE가 증가할 가능성이 더 높았다. 또한 상대적 $\alpha 1$ 강도가 높을수록 Hp2-1 환자에서 rPHE ≥ 1.4 의 위험이 낮아지는 것과 밀접한 관련이 있는 것으로 확인되었다.

도면

도면1



도면2



도면3

