

碩士學位論文

Diisopropylfluorophosphate 투여에 따른 뇌해마  
미세투석액중 신경전달물질의 경시적 변화



濟州大學校 大學院

獸醫學科

金 東 植

2001年 12月

# The Changes of Neurotransmitter Levels in the Hippocampal Microdialysate Following Diisopropylfluorophosphate Treatment

Dongsik Kim

(supervised by professor Youngjae Lee)

Department of Veterinary Medicine  
Graduate School, Cheju National University



## Abstract

This study was designed to investigate the roles of cholinergic and excitatory amino acid systems in the initiation of organophosphate-induced seizures and brain damage in rats through quantitative *in vivo* microdialysis. Microdialysate were collected from the hippocampus of rat brain, treated with diisopropylfluorophosphate (DFP) alone, and/or atropine sulfate, and/or procyclidine. DFP treatments increased the levels of acetylcholine (ACh) within 15 min, and subsequently increased those of aspartate (Asp) and glutamate (Glu) significantly in the hippocampal persuate with the induction of seizures. Treatments of atropine

could not block the increase of ACh release induced by DFP, in the contrary, it increased the release of ACh more profoundly. Treatments of atropine decreased the levels of Asp, Glu significantly compared to those of DFP treated groups. Atropine treatments showed significant anticonvulsive effects against DFP-induced seizures. Treatments of procyclidine could effectively block the increase of Asp, Glu levels, in the contrary it increased the release of ACh more profoundly. Procyclidine treatments showed significant anticonvulsive effects against DFP-induced seizures also. These results may suggest that the increase in extracellular acetylcholine is capable of triggering the release of excessive amounts of Glu from affected glutamatergic neurons and the released Glu damages neighbouring neurones and eventually lead to neuronal death.

---

Keywords: DFP, microdialysis, ACh, Asp, Glu, seizure, convulsion



## 목 차

I. 서	론	· · · · ·	1
II. 재료 및 방법	· · · · ·	· · · · ·	2
III. 결	과	· · · · ·	5
			
IV. 고	찰	· · · · ·	25
V. 결	론	· · · · ·	27
VI. 참 고 문 헌	· · · · ·	· · · · ·	28
국 문 초 록	· · · · ·	· · · · ·	31

## I. 서 론

농업과 산업 전반에 광범위하게 사용되고 있는 유기인제는 중추신경계 및 말초신경계에서 독성을 유발한다고 알려져있다(Tonduli 등, 2001). 대부분의 유기인제는 생체 내에서 acetylcholine(ACh)을 가수분해하는 acetylcholinesterase(AChE)를 비가역적으로 억제함으로써 세포외액 중의 ACh의 과도한 축적을 초래하게 된다고 알려져있다(Tang과 Cassel, 1998). 이에 따라 전형적인 중독증상으로 muscarine양(muscarinic), nicotine양(nicotinic) 증상이 나타나며, 더불어 혼수와 경련과 같은 중추신경계 증상이 나타나게 된다(Moretto, 1998). 경련은 중추신경계에서 유기인제 중독 시 가장 대표적인 증상으로서(Lallement 등, 1998; Lallement 등, 1999), 이는 간질상태로 빠르게 진행되어 뇌 손상을 일으킨다고 보고하였다(Jacobsson 등, 1997; Mcloed 등, 1984; Mcloed, 1985). 유기인제에 의한 뇌 손상에서 ACh은 경련을 유발하는 초기인자로서 작용을 하고, 시냅스 간극내에 축적된 ACh은 흥분성 아미노산계를 활성화하여 NMDA 수용체를 통한 세포내로의 과도한 칼슘 유입으로 인해 결국 신경세포사를 일으킨다고 알려져있다(Solberg와 Belkin, 1997). 그러므로 흥분성 아미노산계는 유기인제 중독 시 뇌 손상을 일으키는 중요한 인자이고(Helden과 Bueters, 1999), 콜린성계도 경련 유발시 중요한 인자로 작용한다고 보고되어 있다(Mcdonough 등, 2000). 따라서, 본 연구에서는 *in vivo* microdialysis법을 사용하여 유기인제 중독 진행에 따른 신경전달물질의 시간별 양상을 알아보고자 뇌 해마 미세투석액 중의 ACh, choline(Ch), aspartate(Asp) 및 glutamate(Glu)의 농도를 측정하였다. 무스카린 수용체 길항제인 atropine을 사용하여 유기인제 중독 시 과도한 콜린성계의 흥분을 막음으로서 경련 및 뇌 손상을 완화할 수 있다고 생각된다. 또한 항콜린성 작용과 NMDA 수용체 길항제로 쓰이는 procyclidine을 사용하여 유기인제 중독 시 흥분성 아미노산계의 과도한 흥분을 막음으로써 Asp와 Glu의 유리를 효과적으로 억제하여 뇌 손상 및 경련을 완화할 수 있음을 밝히고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 외과적 수술 실험

250-300 g의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 실험에 사용하였다((주)대한바이오링크, Korea). Ketamine 30 mg/kg과 xylazine 3 mg/kg으로 근육주사하여 마취를 하였고, 실험시간동안 체온은 37.5 °C로 유지하였다. 뇌정위장치(stereotaxic apparatus)를 사용하여 guide cannula를 마취된 흰쥐의 등쪽 해마에 심었고, 두개골에 두 개의 작은 나사와 dental cement(Bioanalytical system Inc., USA)로 guide cannula를 고정하였다. 2 mm semi-permeable membrane tip dialysis probe(Eicom, Japan)는 등쪽 해마부위 (AP: -5.8mm, L: +4.8mm, H: 4.0mm from dura matter)의 신경전달물질의 농도를 측정하기 위해 guide cannula내로 주입하였다.

### 2. 미세투석 실험

#### (1) ACh과 Ch을 검출하기 위한 미세투석 실험

외과적 수술 후 24시간의 휴식기간을 둔 후 실행하였고, 미세투석액 내 ACh 및 Ch을 검출하기 위해 AChE 길항제인 eserine 200  $\mu$ M을 high K Ringer's 용액(Na 51 mM, Cl 155.6 mM, K 100 mM, Ca 2.3 mM)에 첨가하였다. Probe는 관류펌프(Bioanalytical system Inc., USA)를 사용하여 high K Ringer's 용액을 2  $\mu$ l/min으로 관류하였다. 미세투석액은 15분 간격으로 약물 투여 후 6개를 수집하였고, 기저 농도

(basal concentration)를 측정하기 위해 약물을 투여하기 전 3개의 미세투석액을 미리 수집하였다.

### (2) Asp와 Glu를 검출하기 위한 미세투석 실험

외과적 수술 후 24시간의 휴식기간을 둔 후 실행하였고, 미세투석액 내 Asp와 Glu를 검출하기 위해 high K Ringer's 용액으로만 관류를 하였다. 미세투석액은 30분 간격으로 약물투여 후 11개를 수집하였고, 기저 농도를 측정하기 위해 약물을 투여하기 전 1개의 미세투석액을 미리 수집하였다.

### (3) 사용된 약물

Atropine sulfate 15 mg/kg와 procyclidine 30 mg/kg은 증류수에 녹여 사용을 하였고, DFP 2.67 mg/kg는 콩기름에 녹여 사용하였다. 또한 atropine sulfate와 procyclidine은 근육주사를 하였고, DFP는 피하주사를 하였다.

## 3. ACh 및 Ch 분석

뇌 해마 미세투석액 중의 ACh 농도는 전기화학검출기(Eicom, Japan)를 이용한 고성능 액체크로마토그래피(Shimadzu Co., Japan)를 사용하여 분석하였다. 25 mM의 phosphate buffer 용액(pH 3.5)과 10 mM의 EDTA가 첨가된 용액에 내준표준액인 1  $\mu$ M ethylhomocholine(EHC)을 혼합하였고, 미세투석액은 EHC와 동량으로 혼합하여 튜브에 수집하였다. 미세투석액은 ACh을 분리하기 위해 C<sub>18</sub> column(Eicom, Japan)에 주입하였고, AChE와 choline oxidase로 고정화되어 있는 enzyme-reaction column(Eicom, Japan)으로 ACh을 hydrogen peroxidase로 변환하여, 450 mV의 platinum electrode로 검출 하였다. 이동상은 100 mM phosphate buffer 용액 1 L에 200 mg의 sodium 1-decanesulfonate 와 65 mg tetramethylammonium chloride을 첨

가하였다.

#### 4. Asp, Glu 분석

뇌 해마 미세투석액 중의 Asp와 Glu는 RE-10A<sub>XL</sub> 형광 검출기(Shimadzu Co., Japan)를 이용한 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 측정하였다. 형광 검출기의 excitation 파장은 330 nm, emission 파장은 418 nm로 설정하였다. 미세투석액 내 Asp와 Glu를 분리하기 위해 C<sub>18</sub> column(Waters, U.S.A)을 사용하였고, LC-10AT pump(Shimadzu Co. Japan)로 binary gradient를 다음과 같은 비율로 혼합하였다: 0-100/0; 2-100/0; 4.2-0/100; 6-100/0 (min-%A/%B). 이동상 A는 0.1 M sodium acetate buffer(pH 6.95), methanol, tetrahydrofuran을 92.5 : 5 : 2.5로 조성하였고, 이동상 B는 methanol, tetrahydrofuran을 97.5 : 2.5로 조성하였다. 유속은 1.2 ml/min으로 유지하였고, 발색시약 OPA 용액은 methanol 1 ml에 OPA 27 mg을 용해하여 10  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanol과 9 ml sodium tetraborate buffer(0.1 M, pH 9.3)를 혼합하였다. OPA 용액 10  $\mu$ l 와 미세투석액 20  $\mu$ l를 혼합하여 4 °C에서 1 분간 반응을 시킨 후 20  $\mu$ l를 주입하였다.

#### 5. 통계 처리

고성능 액체크로마토그래피를 이용하여 얻어진 모든 결과들은 student's t-test로 유의성을 검정하였고, 경련 유발 시간은 ANOVA test와 다중검정으로는 Tukey-Kramer test로 유의성을 검정하였다. 약물을 투여하기 직전 미세투석액의 ACh, Ch, Asp 및 Glu 농도는 100%로 보정하여 이 수치들을 mean  $\pm$  SD로 나타내었다.



### Ⅲ. 결 과

#### 1. 약물 투여 후 경련 유발 시간

흰쥐에서 DFP를 단독 투여하였을 때 투여 후  $31.7 \pm 4.2$ 분에 경련이 유발되었다. 그러나 DFP와 atropine 동시 투여군은  $58.3 \pm 2.9$ 분에 경련이 유발되었고, DFP와 procyclidine 동시 투여군은  $47.3 \pm 2.5$ 분에 경련이 유발되었다( $p < 0.05$ , Table 1).

#### 2. 약물 투여 후 뇌 해마 미세투석액 중의 ACh의 농도 변화

뇌 해마 미세투석액 중의 ACh의 기저농도는  $164 \pm 8$ (mean  $\pm$  SD; n=18) fmol/min이다. 대조군은 쿡기름 투여 후 15, 30분에 각각 76, 48 %로 미세투석액 중의 ACh 농도가 감소하였지만 DFP 단독 투여군은 투여 후 15, 30분에 163, 149 %로 ACh 농도가 유의한 증가를 나타내었다( $p < 0.05$ , Fig. 5A). DFP와 atropine 동시 투여군은 투여 후 30분까지는 DFP 단독 투여군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, 45분부터 90분까지 DFP와 atropine 동시 투여군에서 ACh 농도가 유의하게 증가하였고, 75분에는 기저 농도보다 317 %가 증가하여 최고 농도를 나타내었다( $p < 0.05$ , Fig. 5B). DFP와 procyclidine 동시 투여군은 투여 후 15분까지는 DFP 단독 투여군과 유의한 차이를 보이지 않았으나, 투여 후 30분부터 90분까지 DFP 단독 투여군보다 유의한 증가를 나타내었고, 45분에는 기저 농도보다 556 %가 증가하여 최고 농도를 나타내었다( $p < 0.05$ , Fig. 5C). Atropine 단독 투여군의 뇌 해마부위 ACh의 농도는 15, 30, 45, 60분에 각각 164, 332, 468, 518 %로 증가하는 경향이 나타났다.(Fig. 6A).

Procyclidine 단독 투여군은 투여 후 15, 30, 45, 60분에 각각 278, 553, 493, 514 %로 증가하는 경향이 나타났고(Fig. 6B), 두 투여군간의 유의한 차이는 관찰할 수 없었다(Fig. 6C).

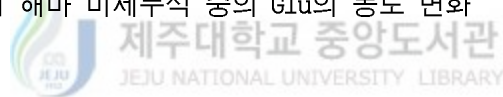
### 3. 약물 투여 후 뇌 해마 미세투석액 중의 Ch의 농도 변화

뇌 해마 미세투석액 중의 Ch의 기저농도는  $3.8247 \pm 2.1651$  (mean  $\pm$  SD; n=14) pmol/min이었다. 대조군은 콩기름을 투여 후 15, 30 분에 각각 60, 49 %로 Ch 농도가 감소하였지만 DFP 단독 투여군은 투여 후 15, 30 분에 각각 120, 94 %로 15분에 Ch의 최고 농도를 나타내었다. 두 투여군간의 유의한 차이는 보이지 않았으나, DFP 단독 투여군은 대조군보다 뇌 해마부위의 Ch 농도가 상대적으로 높은 경향이 나타났다(Fig. 7A). DFP 투여군과 DFP와 atropine 동시 투여군도 두 투여군간의 유의한 차이는 보이지 않았으나, DFP 단독 투여군이 DFP와 atropine 동시 투여군에 비해 뇌 해마부위의 Ch 농도가 상대적으로 높은 경향이 나타났다(Fig. 7B). DFP 투여군과 DFP와 procyclidine 동시 투여군도 두 투여군간의 유의한 차이는 보이지 않았으나, DFP 단독투여군이 DFP와 procyclidine 동시 투여군에 비해 뇌 해마부위의 Ch 농도가 상대적으로 높은 경향이 나타났다(Fig. 7C). 대조군과 atropine 단독 투여군의 뇌 해마부위의 Ch 농도는 대조군과 유의한 차이는 보이지 않았으나, 상대적으로 Ch의 농도가 높은 경향이 나타났다(Fig. 8A). Procyclidine 단독 투여군도 대조군과의 유의한 차이는 보이지 않았으나, 뇌 해마부위의 Ch의 농도가 높은 경향이 나타내었다(Fig. 8B). Atropin 단독 투여군과 procyclidine 단독 투여군도 두 투여군간의 유의한 차이는 보이지 않았으나, procyclidine 단독 투여군이 atropine 단독 투여군보다는 투여후 뇌 해마부위의 Ch의 농도를 좀더 높게 나타나는 경향이 나타났다(Fig. 8C).

#### 4. 약물 투여 후 뇌 해마 미세투석 중의 Asp의 농도 변화

뇌 해마 미세투석액 중의 Asp의 기저농도는  $1.296 \pm 0.766$ (mean  $\pm$  SD; n=12) pmol/min이다. DFP 단독 투여에 의한 뇌 해마부위 Asp의 농도는 투여 후 90, 120, 150분에 각각 380, 490, 365 %로 대조군보다 유의한 증가를 나타내었다(p<0.05, Fig. 10A). DFP와 atropine 동시 투여군은 투여 후 30분부터 300분까지 DFP 단독 투여에 의한 Asp의 농도를 유의하게 감소시켰고(Fig. 10B), DFP와 procyclidine 동시 투여군도 투여 후 30분부터 300분까지 DFP 단독 투여에 의한 Asp의 증가를 효과적으로 감소하였다.(p<0.05, Fig. 10C).

#### 5. 약물 투여 후 뇌 해마 미세투석 중의 Glu의 농도 변화



뇌 해마 미세투석액 중의 Glu의 기저농도는  $9.734 \pm 5.175$ (mean  $\pm$  SD; n=12) pmol/min이다. DFP 단독 투여군은 대조군보다 투여 후 30분부터 150분까지 유의한 증가를 나타냈고, 투여 후 120분에 기저 농도보다 최고 440 %의 Glu 농도가 상승하였다(p<0.05, Fig. 9A). DFP와 atropine 동시 투여군은 투여 후 30분부터 180분까지 DFP 단독 투여에 의한 Glu의 농도 상승 유의하게 감소시켰다(p<0.05, Fig. 9B). DFP와 procyclidine 동시 투여군도 투여 후 30분부터 180분까지 DFP 단독 투여에 의한 Glu의 농도 상승을 유의하게 감소시켰다(p<0.05, Fig. 9C).

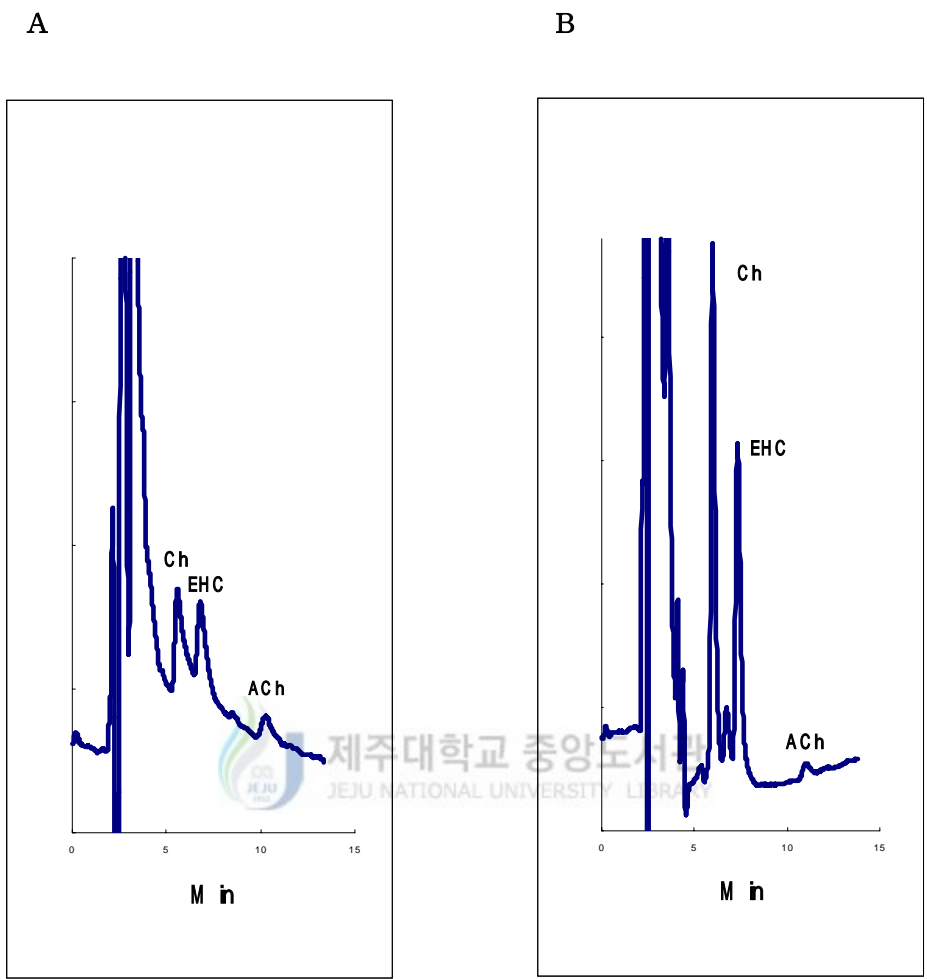


Fig. 1. Representative HPLC chromatogram of ACh standard (A) and hippocampal microdialysate (B).

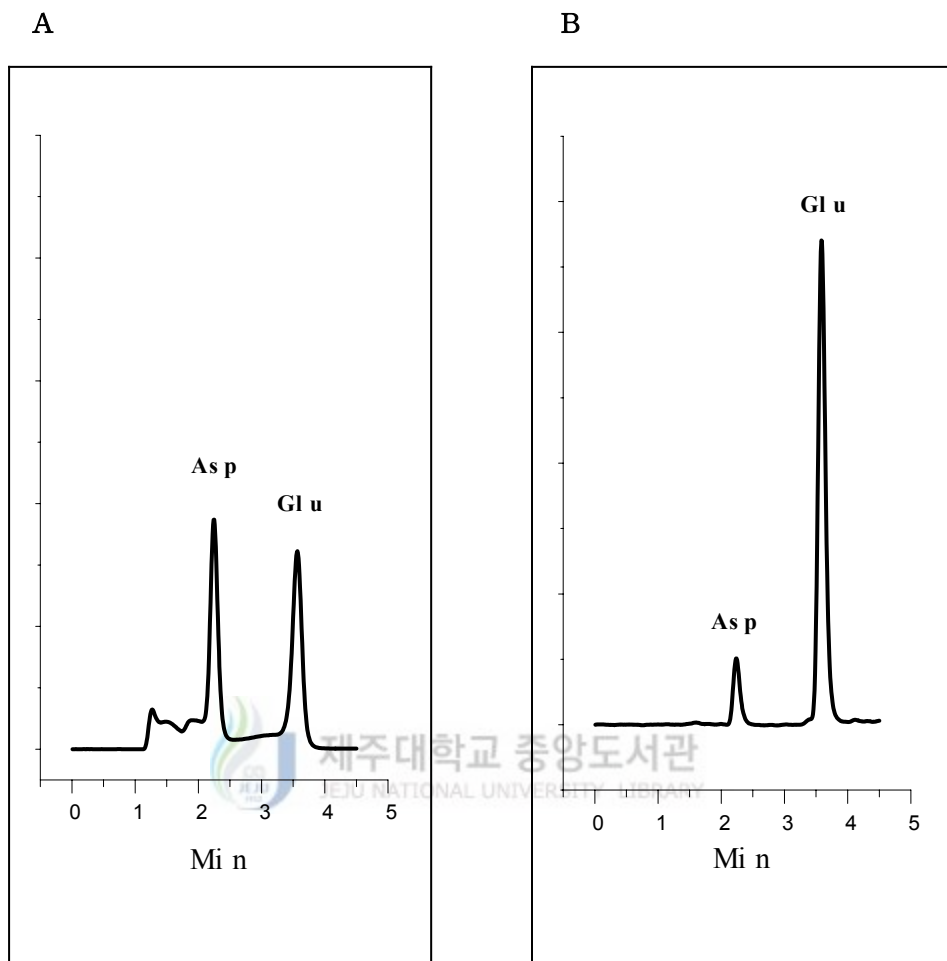


Fig. 2. Representative HPLC chromatogram of Asp, Glu standard (A) and hippocampal microdialysate (B)

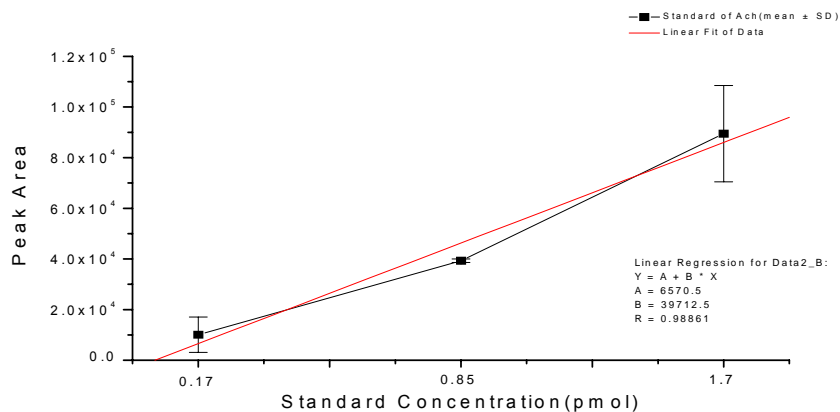


Fig. 3. Linear relationship between peak area and concentration for standard solution of ACh. standard solutions (3 concentration, 3 points per concentration) were prepared by diluting the stock solution with a microdialysis buffer. Data are corrected with the appropriate external standards and are expressed by mean  $\pm$  SD.

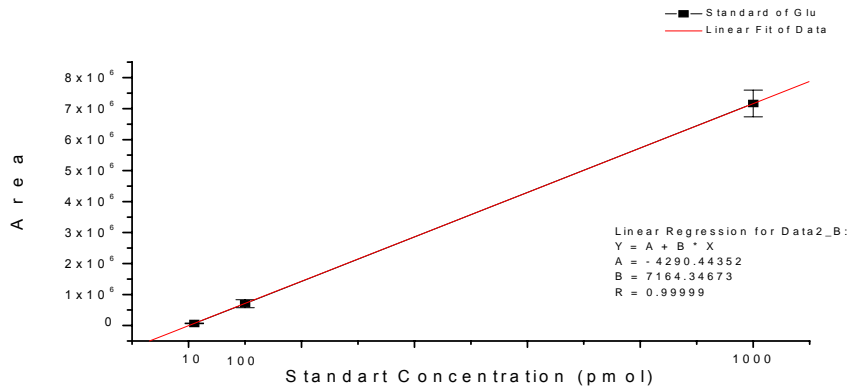


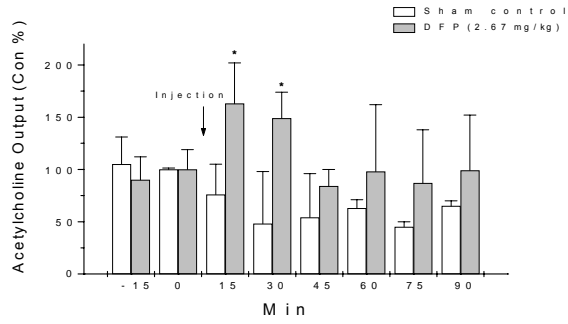
Fig. 4. Linear relationship between peak area and concentration for standard solution of Glu. standard solutions (3 concentration, 3 points per concentration) were prepared by diluting the stock solution with a microdialysis buffer. Data are corrected with the appropriate external standards and are expressed by mean  $\pm$  SD.

Table 1. Onset time of convulsion induced by DFP, DFP + atropine, DFP + procyclidine treatment

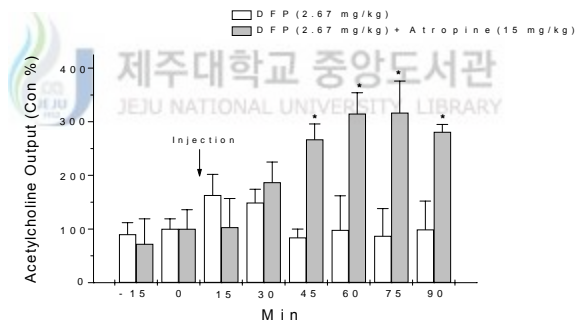
	DFP	DFP + Atropine	DFP + Procyclidine
Min	31.7 ± 4.2	58.3 ± 2.9	47.3 ± 2.5



**A**



**B**



**C**

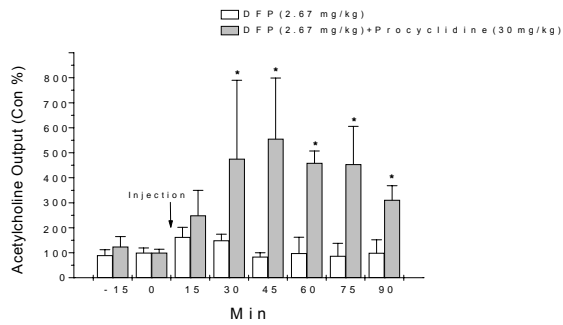
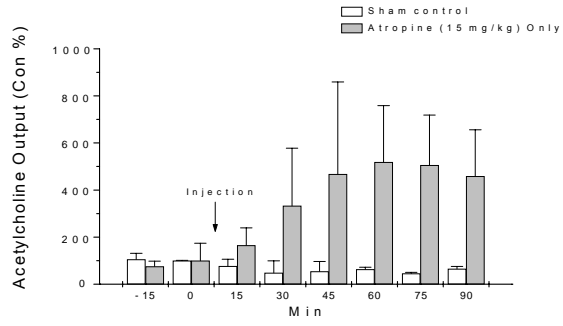


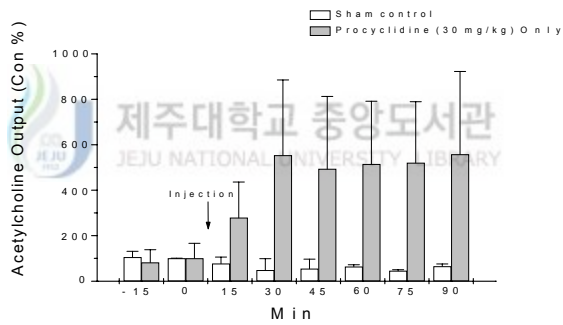
Fig. 5. The effects of drug on hippocampal extracellular ACh levels: (A) Vehicle (Sham control), DFP (2.67 mg/kg), (B) DFP (2.67 mg/kg), DFP plus Atropine (15 mg/kg), (C) DFP (2.67 mg/kg), DFP (2.67 mg/kg) plus Procyclidine (30 mg/kg). The values at 15 min before drug injection were used as the control value (100 %) for each animal. Hippocampal dialysate collected for 90 min after drug injection. The amount of ACh measured in the six samples taken after injection were expressed as a proportion of this. Error bars represent the standard deviation of 3-4 animal per drug ( $p < 0.05$ ).



**A**



**B**



**C**

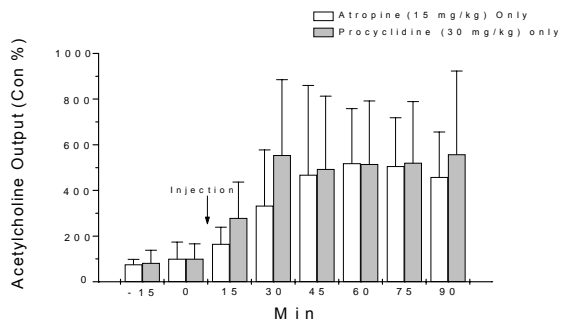
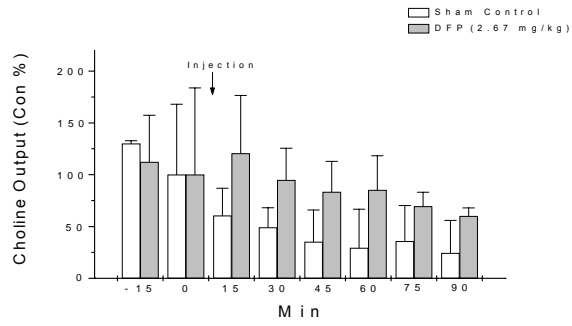


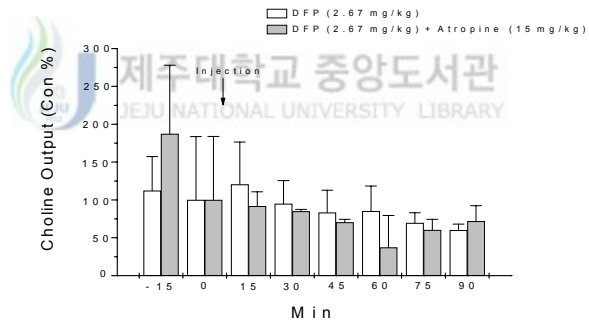
Fig. 6. The effects of drug on hippocampal extracellular ACh levels: (A) Vehicle (Sham control), Atropine (15 mg/kg), (B) Vehicle (Sham control), Procyclidine (15 mg/kg), (C) Atropine (15 mg/kg), Procyclidine (30 mg/kg). The values at 15 min before drug injection were used as the control value (100 %) for each animal. Hippocampal dialysate collected for 90 min after drug injection. The amount of ACh measured in the six samples taken after injection were expressed as a proportion of this. Error bars represent the standard deviation of 3-4 animal per drug.



**A**



**B**



**C**

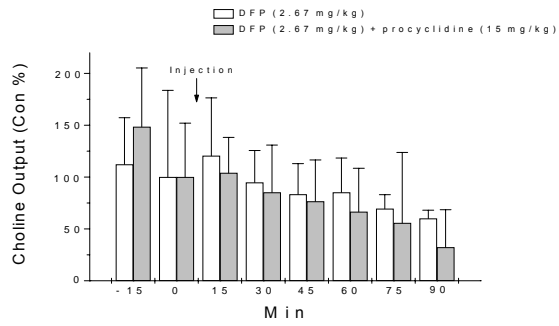
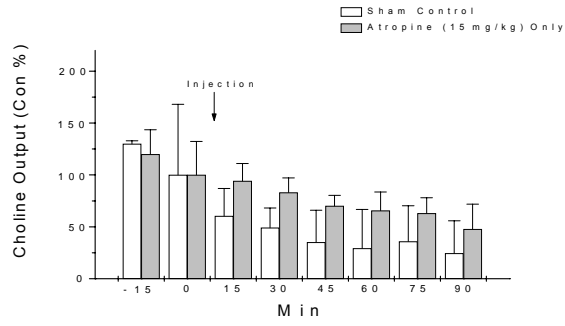


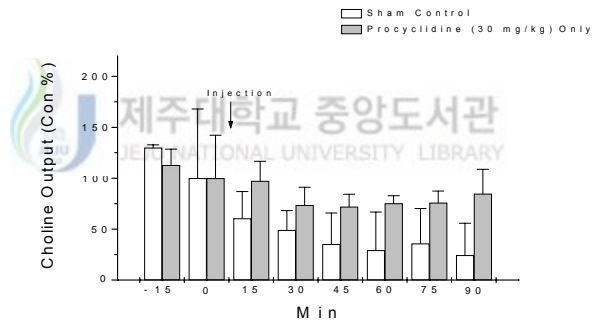
Fig. 7. The effects of drug on hippocampal extracellular Ch levels: (A) Vehicle (Sham control), DFP (2.67 mg/kg), (B) DFP (2.67 mg/kg), DFP plus Atropine (15 mg/kg), (C) DFP (2.67 mg/kg), DFP (2.67 mg/kg) plus Procyclidine (30 mg/kg). The values at 15 min before drug injection were used as the control value (100 %) for each animal. Hippocampal dialysate collected for 90 min after drug injection. The amount of Ch measured in the six samples taken after injection were expressed as a proportion of this. Error bars represent the standard deviation of 3-4 animal per drug.



A



B



C

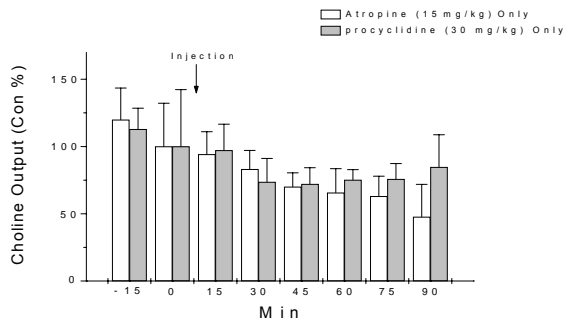
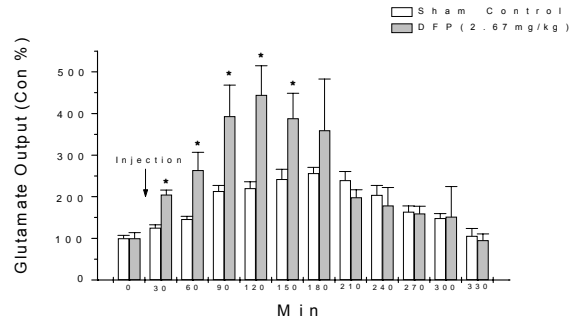


Fig. 8. The effects of drug on hippocampal extracellular Ch levels: (A) Vehicle (Sham control), Atropine (15 mg/kg), (B) Vehicle (Sham control), Procyclidine (15 mg/kg), (C) Atropine (15 mg/kg), Procyclidine (30 mg/kg). The values at 15 min before drug injection were used as the control value (100 %) for each animal. Hippocampal dialysate collected for 90 min after drug injection. The amount of Ch measured in the six samples taken after injection were expressed as a proportion of this. Error bars represent the standard deviation of 3-4 animal per drug.

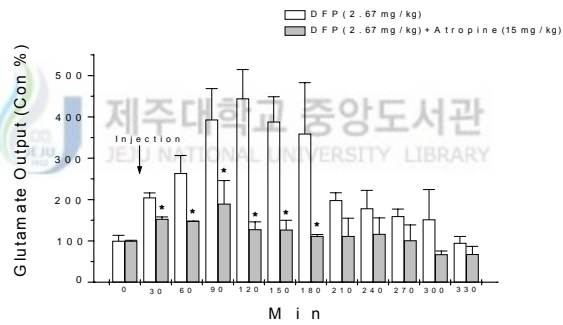




A



B



C

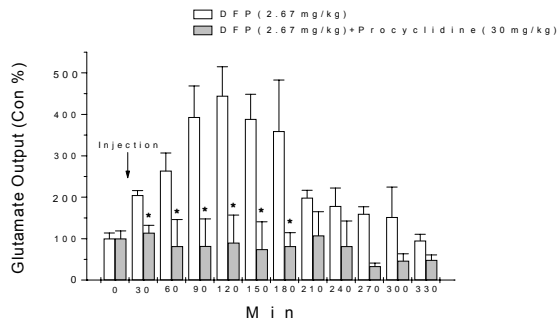
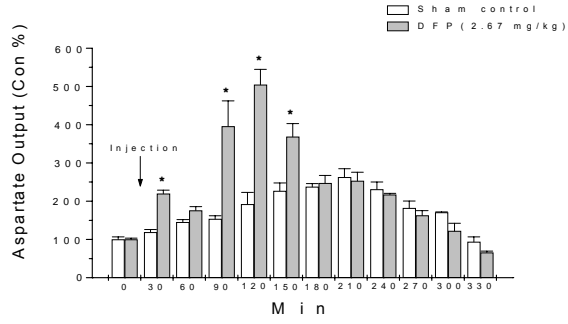


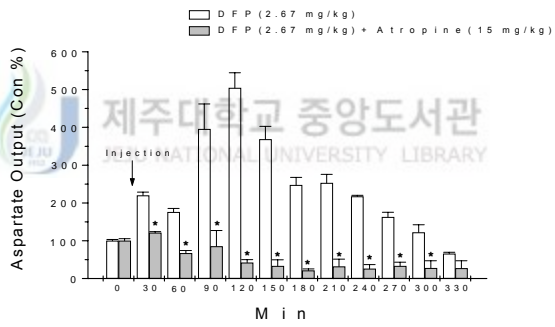
Fig. 9. The effects of drug on hippocampal extracellular Glu levels : (A) Vehicle (Sham control), DFP (2.67 mg/kg), (B) DFP (2.67 mg/kg), DFP (2.67 mg/kg) plus Atropine (15 mg/kg), (C) DFP (2.67 mg/kg), DFP (2.67mg/kg) plus Procyclidine (30 mg/kg). The values at hippocampal dialysate before drug injection were used as the control value (100 %) for each animal. Hippocampal dialysate collected for 330 min after drug injection. The amount of Glu measured in the eleven samples taken after injection were expressed as a proportion of this. Error bars represent the standard deviation of 3-4 animal per drug ( $p < 0.05$ ).



**A**



**B**



**C**

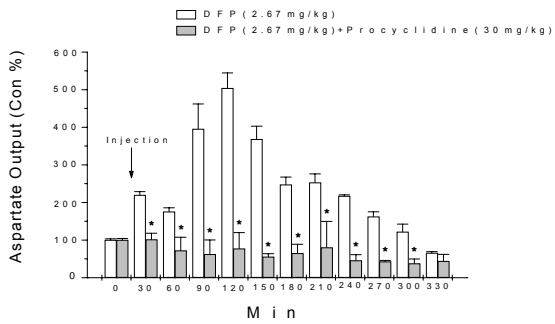


Fig. 10. The effect of drug on hippocampal extracellular Asp levels : (A) Vehicle (Sham control), DFP (2.67 mg/kg), (B) DFP (2.67 mg/kg), DFP (2.67 mg/kg) plus Atropine (15 mg/kg), (C) DFP (2.67 mg/kg), DFP (2.67mg/kg) plus Procyclidine (30 mg/kg). The values at hippocampal dialysate before drug injection were used as the control value (100 %) for each animal. Hippocampal dialysate collected for 330 min after drug injection. The amount of Asp measured in the eleven samples taken after injection were expressed as a proportion of this. Error bars represent the standard deviation of 3-4 animal per drug ( $p < 0.05$ ).



## IV. 고 찰

유기인제가 일으키는 뇌 손상에 있어서 콜린성계와 흥분성 아미노산계와의 경시적 변화를 관찰하고자 *in vivo* microdialysis법을 사용하였고, 흰쥐의 뇌 해마 미세투석액 중의 ACh, Ch, Asp 및 Glu의 분석은 고성능 액체크로마토그래피를 이용한 전기화학 검출기 및 형광 검출기로 이들 물질을 분석하였다. 일반적으로 경련 및 뇌 손상 기전은 흥분성 신경전달계, 특히 NMDA 수용체 활성화에 의한 세포내 칼슘의 유입과 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다(Testylier와 Dykes, 1996; Mody와 Macdonald, 1995). 그러나 유기인제 중독에 의한 뇌 손상에서 콜린성 신경흥분에 따른 흥분성 아미노산계의 동반 흥분이 제시되고 있으나 자세한 작용기전 및 시간별 양상은 알려져 있지 않다. 본 연구에 의하면 흰쥐에서 DFP 단독 투여를 하였을 때 투여 후  $31.7 \pm 4.2$ 분에 경련이 유발되었지만, DFP와 atropine 동시 투여군은  $58.3 \pm 2.9$ 분에 경련이 유발되었고, DFP와 procyclidine 동시 투여군은  $47.3 \pm 2.5$ 분에 경련이 유발되었다. 이는 DFP 단독 투여에 의해 유발되는 경련을 atropine과 procyclidine을 투여함으로써 효과적으로 지연시킴을 알 수 있었다. 또한 DFP 단독 투여군은 30분내에 뇌 해마부위의 ACh이 대조군보다 유의하게 증가를 하였고, 투여 후 180분에 Glu와 Asp의 최고 농도를 나타내었다. 위의 결과는 유기인제에 의한 뇌 손상기전에서 뇌 해마부위의 ACh이 상승함으로 경련유발의 초기인자로서 ACh이 중요한 역할을 하고, 이에 따른 흥분성 아미노산의 유리 증가에 의해 뇌 손상이 유발된다는 것을 Mcdonough와 Shih(1997)도 이와 같은 양상의 결과를 보고한바 있다. DFP와 atropine 동시 투여군은 뇌 해마부위의 ACh이 투여 후 60분에 최고 농도를 나타내고 이 시기에 경련이 유발됨으로서 경련 유발시 ACh이 초기인자로 중요한 역할을 하고, DFP 단독 투여에 의한 경련을 지연함을 알 수 있다. 또한 DFP와 atropine 동시 투여에 의한 Glu와 Asp의 변화도 투여 후 각각 30분부터 유의하게 감소하기 시작하여 Glu는 180분까지 지속적인 감소를 나타내고 Asp는 300분까지 지속적인 감소가 나타났다. 이

는 콜린성신경의 절전섬유 말단에 존재하는 autoreceptor를 atropine이 효과적으로 차단함으로써 ACh의 분비는 증가되었지만(Moor 등, 1995; Stillman 등, 1996) DFP투여에 의해 증가된 Asp 및 Glu의 유리를 atropine이 효과적으로 억제하여 유기인제에 의해 유발되는 뇌 손상을 억제할 수 있음을 시사한다. DFP와 procyclidine 동시 투여군도 투여 후 45분에 뇌 해마부위에서 ACh이 최고 농도를 나타내었고 이 시각에 경련이 유발됨으로써 경련 유발시 ACh이 초기인자로서 중요한 역할을 하고, DFP 단독투여에 의한 경련을 지연함을 알 수 있다. 또한 DFP와 procyclidine 동시 투여에 의한 Asp와 Glu의 변화도 투여 후 30분부터 유의하게 감소하기 시작하여 Glu는 180분째까지 지속적인 감소를 나타내고 Asp는 300분까지 지속적인 감소가 나타났다. 이 결과들 역시 procyclidine이 콜린성 절전섬유 말단에 존재하는 autoreceptor를 차단함으로써 뇌 해마부위의 ACh의 유리를 증가시켰지만 DFP에 의해 상승된 Asp와 Glu의 유리를 억제함으로써 뇌 손상을 완화할 수 있음을 나타낸다. 이상의 결과로 볼 때 유기인제에 의한 뇌 손상 기전에서 콜린성계의 흥분은 흥분성 아미노산계를 흥분시키는 초기인자로 작용을 하고, 흥분성 아미노산계의 활성화는 경련유발 및 뇌 손상을 유발하지만, 흥분성 아미노산의 유리를 억제함으로써 경련 및 뇌 손상을 완화할 수 있다고 생각된다.

## V. 결 론

본 연구에서는 유기인제에 의해 유발되는 뇌 손상 과정에서 콜린성계와 흥분성 아미노산계와의 상관관계를 시간적인 변화에 따른 역할을 규명하고자 *in vivo* microdialysis를 사용하여 연구하였다. 유기인제에 의한 뇌 손상 기전에서 콜린성계의 흥분은 흥분성 아미노산계를 흥분시키는 초기인자로 작용함을 나타내고, 흥분성 아미노산계의 활성화는 경련유발 및 뇌 손상을 가져오고, 흥분성 아미노산의 유리를 억제함으로써 경련의 지연 및 뇌 손상을 막을 수 있다고 생각된다.



## VI. 참고 문헌

Helden H. P. M van and Bueters T. J. H. 1999. Protective activity of adenosine receptor agonists in the treatment of organophosphate poisoning. *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 438-440.

Jacobsson S. O. P., Cassel G. E., Karlsson B. M., Sellstrom A. and Persson S. A. 1997. Release of dopamine, GABA and EAA in rats during intrastriatal perfusion with kainic acid, NMDA and soman: a comparative microdialysis study. *Arch Toxicol.* 71: 756-765.

Lallement G., Clarençon D., Galonnier M., Baubichon D., Burckhart M-F. and Peoc'h M. 1999. Acute soman poisoning in primates neither pretreated nor receiving immediate therapy: value of gacyclidine (GK-11) in delayed medical support. *Arch Toxicol.* 73: 115-122.

Lallement G., Dorandeu F., Filliat P., Carpentier P., Baille V. and Blanchet G. 1998. Medical management of organophosphate-induced seizures. *J. physiol. (paris).* 92: 369-373.

McDonough J. H. and Shih T-M., 1997. Neuropharmacological mechanism of nerve agent-induced seizure and neuropathology., *Neurosci. biobehav. rev.* 21: 559-579.

McDonough J. H. Jr., Zoefel L. D., McMonagle J., Copeland T. L., Smith D. and Shih T-M. 2000. Anticonvulsant treatment of nerve agent seizures: anticholinergics



versus diazepam in soman-intoxicated guinea pigs. *Epilepsy res.* 38: 1-14

Mcleod C. G Jr., Singer A. W. and Harrington D. G. 1984. Acute neuropathology in soman poisoned rats. *Neurotoxicol.* 5: 53-58.

Mcleod C. G Jr. 1985. Pathology of nerve agents: perspectives on medical management. *Fundamen. and applies toxicol.* 5: S10-S16.

Mody I. and Macdonald J. F. 1995. NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular  $Ca^{2+}$  release. *Trends Phamacol. Sci.* 16: 356-359.

Moor E., DeBore P., Auth F. and Westerink B. H. C. 1995. Characterisation of muscarinic autoreceptors in the septo-hippocampal system of the rat: a microdialysis study. *Eur. J. Phamacol.* 294: 155-161.

Moretto A. 1998. Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agent. *Toxicol. lett.* 102-103: 509-513.

Solberg Y. and Belkin M., 1997. The role of excitotoxicity in organophosphorus nerve agents central poisoning. *Trends Phamacol. Sci.* 18: 183-185.

Stillman M. J., Shukitt-hale B., Galli R. L. levy A. and Lieberman H. R. 1996. Effect of  $M_2$  Antagonists on *in vivo* Hippocampal Acetylcholine Levels. *Brain Res. Bull.* 41: 221-216.

Tang H-W. and Cassel G. 1998. Effect of soman on N-methyl-D-aspartate-stimulated [ $^3$ H]norepinephrine release from cortical slices. *Toxicol. lett.* 99: 169-173.

Testylier G. and Dykes R. W. 1996. Acetylcholine release from frontal cortex in the waking rat measured by microdialysis without acetylcholinesterase inhibitor: effect of diisopropylfluorophosphate. *Brain Res.* 740: 307-315

Tonduli L. S., Testylier G., Masqueliez C., Lallement G. and Monmaur P. 2001. Effect of huperzine used as pre-treatment against soman-induced seizures. *Neurotoxicol.* 22: 29-37.



## 초 록

# Diisopropylfluorophosphate 투여에 따른 뇌해마 미세투석액중 신경전달물질의 경시적 변화

(지도교수 : 이 영 재)

김 동 식



제주대학교 대학원

수의학과

유기인제 투여에 의한 뇌 손상시 해마부위의 콜린성계와 흥분성 아미노산계의 경시적 변화를 알아보고자 *in vivo* microdialysis technique을 사용하여 연구를 시행하였다. 또한 atropine, procyclidine을 사용하여 DFP에 의해 유발되는 뇌 손상 방어효과를 관찰하였다. DFP 단독 투여에 의한 경련은 투여 후 30분, DFP와 atropine 동시 투여에 의한 경련은 투여 후 60분, DFP와 procyclidine 동시 투여에 의한 경련은 투여 후 45 분에 각각 유발되었다. 또한 DFP 단독 투여군은 투여 후 15, 30분에 대조군보다 유의하게 ACh의 농도가 증가하였고, DFP와 atropine 동시 투여군은 DFP 단독 투여군과 30분까지는 유의한 차이를 관찰할 수 없었지만, 투여 후 60분 이후부터 DFP와

atropine 동시 투여군에서 ACh의 농도가 유의하게 증가하였고, DFP와 procyclidine 동시 투여군도 투여 후 45분 이후부터 DFP 단독 투여군보다 뇌 해마부위의 ACh의 농도가 유의하게 증가하였다. DFP 투여 후 흥분성 아미노산계의 변화는 뇌 해마부위에서 투여 후 2시간째 최고 농도의 aspartate(Asp)와 glutamate(Glu)가 현저하게 증가하였고, DFP와 atropine의 동시 투여군 및 DFP와 procyclidine 동시 투여군은 DFP 단독 투여에 의한 Asp와 Glu의 상승을 효과적으로 억제하였다. 이상의 결과로 미루어 볼 때 경련 유발에 앞서 일차적으로 뇌 해마부위의 ACh이 경련유발의 초기인자로서 중요하게 작용을 하고, 이차적으로 흥분성 아미노산 신경전달계를 활성화하여 뇌 해마부위에서 흥분성 아미노산의 유리를 촉진시키므로 뇌 손상을 가져온다고 사료된다.

---

중요어: DFP, microdialysis, ACh, Ch, Glu, Asp, seizure, convulsion



