

## 腦內 Norepinephrine含量變化와 Clonazepam의 抗痙攣效果에 미치는 6-Hydroxydopamine의 影響

尹 再 順·金 玲 珠\*

梨花女子大學校藥學大學·\*서울大學校 病院 藥劑部

(Received December 31, 1987)

### The Effect of 6-Hydroxydopamine on the Anticonvulsant Activity of Clonazepam and Norepinephrine in Brain

Jae Soon Yun and Young Joo Kim\*

College of Pharmacy, Ewha Woman's University, Seoul 120, Korea

\* Department of Pharmacy, Seoul National University Hospital, Seoul 110, Korea.

**Abstract**—There is evidence that brain norepinephrine may play a role in experimentally induced seizures in animals. Thus the present experiments were undertaken in an attempt to explore the role of brain norepinephrine in anticonvulsant activity of clonazepam. 6-Hydroxydopamine was given to newborn rats and PTZ-induced seizures were tested 70~90 days after birth and the rats were killed for determination of brain norepinephrine 8 days after the seizure test. Depletion of norepinephrine in the rat brain significantly potentiated the PTZ-induced convulsions and antagonized the effect of clonazepam on clonic seizures, tonic seizures and the number of seizures, but the latency to the seizure and the mortality has not been altered. However the 6-hydroxydopamine-induced antagonism of anticonvulsant action was surmountable by increasing the dose of clonazepam. These results show that brain norepinephrine may play an important role in seizure susceptibility as well as in the anticonvulsant activity of clonazepam in rats.

Clonazepam은 benzodiazepine계 항경련제로서 소발작 및 영아경축등에 사용되고 있는 FDA 승인 약물이다.<sup>1,2)</sup> Benzodiazepine계 약물의 항경련 효과는 gammaaminobutyric acid (GABA)—수용체 친화력 증가와 관련하여 중추신경 억제작용에 의한다고 전기생리학적 및 생화학적으로 부분적인 증거가 되어있고<sup>3,4)</sup> 기타 중추신경계 작용부위에서 glycin양 작용이 있다고도 보고되어 있으나<sup>5)</sup> clonazepam의 명확한 작용기전은 아직 밝혀져 있지 않다. 한편 뇌중의 monoamine은 경련 및 간질발작에 중요한 역할을 하며 수종 항경련제의 작용기전에 관여하고 있음이 보고되었다.<sup>6-8)</sup>

실험동물에서 5-hydroxytryptamine (5-HT)이나 norepinephrine (NE)을 고갈시키면 경련역치는 저하되고 5-HT이나 NE의 전달이 증가되면

경련역치가 상승한다고 하였으며<sup>6,9)</sup> clonazepam을 투여한 결과 뇌중의 5-HT과 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)의 농도가 투여량에 비례하여 증가하였고<sup>10,11)</sup> clonazepam은 또한 뇌중의 NE과 dopamine농도도 증가시켰다고 보고하였다.<sup>12)</sup> 그러나 최근의 동물실험 보고에 의하면 간질성경련을 조절하는데에는 前腦(forebrain) 영역의 NE이 매우 선택적으로 작용하며 dopamine은 이와같은 억제작용을 나타내지 못한다고 한다.<sup>6,13-15)</sup> 6-hydroxydopamine (6-OHDA)을 실험동물에 투여하면 뇌 각영역의 catecholamine량을 변화시키며 catecholamine의 농도가 저하되면 실험적으로 유발된 경련작용이 더욱 심해진다고 하였다.<sup>16-18)</sup>

이상의 문헌적 고찰을 기초로하여 6-OHDA을 신생쥐에 투여하여 선택적으로 교감신경을 파괴

시킨 후 사육한 성숙한 웅성흰쥐에서 pentylenetetrazole (PTZ)에 의한 경련발작과 이에 대한 clonazepam의 항경련효과를 평가하고 동시에 뇌중 NE량을 측정하여 6-OHDA에 의한 중추신경계의 NE농도 변화가 PTZ에 의해 유발된 경련과 clonazepam의 항경련효과에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

**實驗材料 및 實驗方法**

**實驗動物**—체중 200~220g의 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 2주이상 본실험실에서 사육한 후 교배시키고 여기에서 출산한 웅성흰쥐를 사용하였다.

**投與藥物 및 測定用試藥**—6-Hydroxydopamine·HBr(Sigma Chem. Co.)는 0.1% ascorbic acid를 함유하는 0.9% 생리식염수에 용해하여 용해 즉시 사용하였다. Clonazepam (Roche Korea Co.)은 polyethyleneglycol-400의 30% 수용액에 용해하여 사용하였으며 pentylenetetrazole(Sigma Chem. Co.)은 0.9% 생리식염수에 용해하여 병장보관하여 사용하였다. 측정용 시약으로는 *l*-norepinephrine bitartrate와 HClO<sub>4</sub> (Wako pure Chem. Ind. LTD), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> activated (Merck Chem. Co), EDTA와 *l*-ascorbic acid (Shinyo pure Chem. Co. LTD), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (Hayashi pure Chem. Ind.), NaOH (Tokyo ohka kogyo Co.), Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Shimakyu's pure Chem.)를 사용하였다. 이상의 모든 시약은 특급시약이었으며, 측정하는 전 과정은 2차 증류수를 사용하였다.

**實驗機器**—NE測定用 機器는 Fluorescence Spectrophotometer Model 650~10S (Hitachi Ltd. Japan)을 사용하였다.

**6-Hydroxydopamine 處置**—6-Hydroxydopamine (6-OHDA) 100mg/kg을 出生後 24시간 이내의 웅성흰쥐에 피하주사하고 이후 24시간 간격으로 2회 추가 주사하여 총 3회 주사하였다.

6-OHDA은 0.1% ascorbic acid를 함유한 0.9% 생리식염수에 용해하여 용해 즉시 사용하였고 1회 주사량은 42μl를 repeated dispenser (Ha-

milton PB 600-1)로 피하주사하였다. 대조군은 6-OHDA만 제외시킨 ascorbic acid 함유 생리식염수용액을 같은 조건으로 투여하였다.

동물사육은 같이 출생한 암쥐를 제외시키고 원래의 어미에게 사육시키는 것을 원칙으로 하였고, 出生後25일에 어미를 분리시켰으며 70~90일이 된 성숙한 동물을 사용하여 경련실험을 실시하였다.

**痙攣實驗**—生後 70~90일의 성숙한 웅성흰쥐를 사용하여 clonazepam 50, 300, 1,800μg/kg을 等比數列的用量別로 6-OHDA 處理群과 對照群에 各各 12마리씩을 한 群으로 하였다. Pentylenetetrazole (PTZ) 투여 30분 전에 clonazepam을 복강내주사하고 PTZ 90mg/kg를 피하주사한 후 즉시 48×26×18cm의 투명한 실험용 cage에 넣어 1시간동안 관찰하였다.

各 實驗動物은 初回 및 2회경련의 發現時間, 全身의인 間代性痙攣의 發現有無, 앞다리에서의 強直性痙攣의 發現有無, 앞다리와 뒷다리에서의 強直性痙攣의 發現有無, 痙攣 發現回數 및 1時間以內的 死亡 有無等を 관찰하였다. 痙攣實驗을 實施한 動物은 痙攣實驗이 끝난 8日後에 末梢 抽出하여 뇌중 NE농도를 測定하였다.

Clonazepam은 최대 作用發現時間에서 PTZ이 效果를 나타내도록 PTZ投與 30分前에 前處理하였다.<sup>19)</sup> PTZ은 Lazarova등<sup>20,21)</sup>의 方法에 의해 正常 흰쥐에서 強直性痙攣을 유발시킬 수 있는 用量(90mg/kg)을 투여하였다. Swinyard<sup>22)</sup> 및 Swinyard등<sup>23)</sup>이 확립한대로 5초이상 間代性痙攣이 지속되는 것은 1회의 痙攣으로 간주하였다.

**Norepinephrine 定量法**—Anton등<sup>24)</sup>에 의한 Spectrophotofluorometry에 의하여 NE을 측정하였다. 痙攣實驗이 끝난 8日後 오전시간에 6-OHDA 투여군과 대조군을 각각 단두시킨 直時 腦를 摘출하여 유리어플판 위에서 前腦(forebrain)와 下部腦幹(lower brainstem; mesencephalon, pons medulla)을 분리하여 즉시 무게를 측정한 후 NE량을 精量할 때까지 -50°C로 냉동보관하였다.

腦組織은 0.4N-HClO<sub>4</sub> 10ml을 첨가하여 4°C에서 均질화하고 10°C에서 30,000×G로 10分間

원심분리하여 상등액을 취하였다. 여기에 0.4N-HClO<sub>4</sub>를 가하여 총량을 25ml로 하고 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 400mg, EDTA 200mg, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 10mg을 가하고 혼화하면서 NaOH로 pH 8.6으로 조절하고 다시 5분간 교반 후 靜置시켰다. 침전된 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>에 증류수 10ml을 가하여 2분간 진탕한 후 10°C에서 4688×G로 1분간 원심분리하고 상등액을 吸出除去하는 세척과정을 4회 반복하였다. 殘渣 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>에 0.05N-HClO<sub>4</sub> 3ml을 가하고 15분간 격렬하게 진탕, NE를 抽出한 후 10°C에서 30,000×G로 10분간 원심분리하였다. 溶出液 0.4ml에 0.5 M-phosphate buffer (pH 7.0) 0.2ml, 0.25% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 0.04ml을 가하여 혼화한 후 정확히 1분간 정치하였다. Alkaline ascorbate용액 0.4ml을 가하고 15~30초 이내에 2차증류수 1ml을 가하여 완전히 혼화시키고 alkaline ascorbate 첨가하고 3분 30초가 경과한 후에 excitation λ-396 nm, emission λ-509nm에서 형광도를 측정하였다. 공시험은 검액상등액 0.4ml에 K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>를 가하는 과정만을 제외한 全操作을 동일하게 하여 같은 과정에서 측정하였다. NE의 標準檢量曲線은 檢液 측정시마다 NE표준품을 각각 0.4N-HCl<sub>4</sub>에 용해하여 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 μg/25ml로 하고 本實驗과 같은 방법으로 측정하여 最小自乘法에 의하여 各 檢液의 NE含量을 계산하여 NE ng/g tissue로 標示하였다.

統計分析—痙攣實驗에서 間代性痙攣, 强直性痙攣, 痙攣의 回數 및 死亡率等은 Fisher의 직접확률계산법(Fisher's exact probability)으로 標示하였고, 痙攣發現時間과 NE농도 변화는 student's t-test로 검정하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 腦中 Norepinephrine量에 미치는 6-OHDA의 영향

신생쥐에 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 100 mg/kg씩 3회 피하주사하여 70~90일간 사육한 후 腦 各部位에서 측정된 NE量은 Table I과 같다. 6-OHDA를 투여하였을 때 前腦部位의 NE量은 對照群의 29.5%로 低下되었다. 이것은 6-OHDA를 신생쥐에 투여하면 dopamine效能神經에는 손상을 주지 않은채 前腦部位의 noradrenaline效能神經末端에 선택적으로 作用하여 NE量이 현저하게 減少하였다는 Versteeg<sup>25)</sup>를 비롯한 많은 보고와<sup>26-29)</sup> 一致하였다. 6-OHDA를 투여하면 noradrenaline效能神經이 파괴되어 交感神經支配下의 末梢器管이나<sup>30)</sup> 腦의 特殊領域에서<sup>25,31)</sup> NE량이 고갈되고 Versteeg등<sup>32)</sup> 및 Matthews등<sup>33)</sup>의 보고에서 된것과 같이 6-OHDA는 交感神經을 선택적으로 破壞하여 用量依存性으로 化學的 交感神經切除效果를 일으킨 결과로 NE량의 감소·고갈이 일어난 것으로 생각된다. 반대로 腦幹部位의 NE량은 6-OHDA 처리로 대조군의 190.7%로 증가하였으며 Arvin과 Liew<sup>28)</sup>의 보고와 같았다.

### 2. Clonazepam의 抗痙攣效果에 대한 6-OHDA의 영향

6-OHDA 투여군과 대조군에 clonazepam을 각 농도별로(50, 300, 1800 μg/kg 및 vehicle) 전 처리하고 30분후에 pentylenetetrazole 90mg/kg 투여 후 1시간 동안 관찰한 결과는 Table II와

Table I—Effect of 6-hydroxydopamine on norepinephrine content in the brain region of rats.

	Norepinephrine levels (ng/g tissue)		Ratio of Control (%)
	Control	6-OHDA	
Forebrain	359±17(7)	106±8*(10)	29.5
Lower brainstem	463±27(6)	883±33*(7)	190.7
Cerebral cortex	206±28(6)	106±33(7)	51.4

Each value is the mean±s.e.

Number of animals was given in parenthesis.

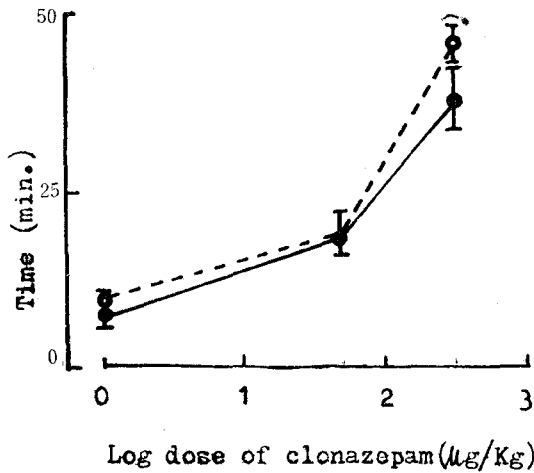
NE determinations were carried out 8-days after the seizure test.

\*Significantly different from control, p<0.001 (student's t-test).

**Table II**—Effect of 6-hydroxydopamine on the anticonvulsive action of clonazepam to latency of seizure induced by pentylenetetrazole in rats.

Clonazepam ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.)	6-OHDA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.)	n	latency (min. $M \pm s.e.$ )	
			to 1st. Conv.	to 2nd Conv.
Vehicle	—	12	$7.9 \pm 0.5$	$16.6 \pm 1.5$
Vehicle	300	12	$9.6 \pm 0.6$	$31.2 \pm 5.2$
50	—	12	$18.1 \pm 2.5$	$19.0 \pm 5.4$
50	300	12	$18.5 \pm 3.9$	$36.0 \pm 8.0$
300	—	12	$38.6 \pm 3.8$	—
300	300	12	$45.4 \pm 3.0$	—
1800	—	12	—	—
1800	300	12	—	—

n is number of rats used for experiments.



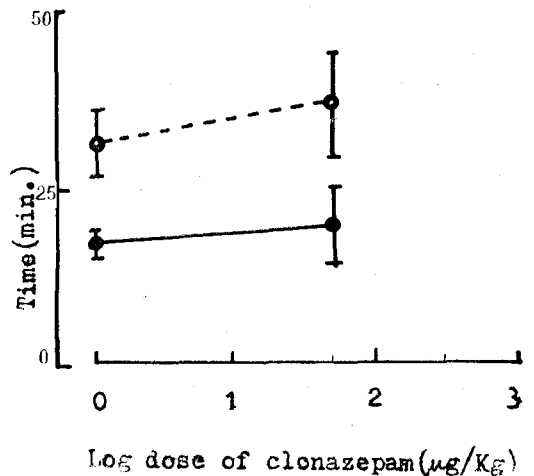
**Fig. 1**—Effect of 6-hydroxydopamine on the anticonvulsive action of clonazepam to the latency of first convulsion induced by PTZ(90mg/kg) in rats.

Each point is represents as the mean  $\pm$  s.e. of 12 rats.

—●— Control,    ---○--- 6-OHDA pretreated group.

같다.

**痙攣發現時間에 미치는 영향**—PTZ투여 후 경련을 발작하기까지의 발현시간을 측정 한 결과 정상동물에서는 7.9分인데 비하여 clonazepam 50, 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 투여하였을 때는 각각 18.1, 38.6分이며 1,800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 투여하였을 때에는 경련발작이 일어나지 않았다. 6-OHDA을 전처치



**Fig. 2**—Effect of 6-hydroxydopamine on the anticonvulsive action of clonazepam to the latency of second convulsion induced by PTZ(90mg/kg) in rats.

Each point is represents as the mean  $\pm$  s.e. of 12 rats.

—●— Control,    ---○--- 6-OHDA pretreated group.

한 흰쥐에 PTZ 투여 후 경련발현시간을 측정하였을 때 대조군동물은 9.6分이고 clonazepam 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 투여하였을 때는 18.5分이고 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 투여하였을 때는 45.4分이고 1,800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 투여하였을 때는 경련발작이 일어나지 않았다. 即 clonazepam의 用量을 增加함에 따라 정상동물이나 6-OHDA 전처치군 모두에서 경련발

**Table III**—Effect of 6-hydroxydopamine on the anticonvulsive action clonazepam in the PTZ-induced spasmodic rats.

Clonazepam ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.)	6-OHDA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c.)	n	number of rats.					
			Clonic Conv. (general)	Tonic Conv. (fore limb)	Tonic Conv. (fore-hindlimb)	2nd Conv.	3rd Conv.	Drging i/within/ hr.
Vehicle	—	12	12	6	1	4(2)	2(4)	4
Vehicle	300	12	12	10	6*	10*	2	2
50	—	12	12	2	—	2	—	2
50	300	12	12	6	5**	6*	—	—
300	—	12	4	—	—	—	—	—
300	300	12	9*	—	—	—	—	—
1800	—	12	—	—	—	—	—	—
1800	300	12	—	—	—	—	—	—

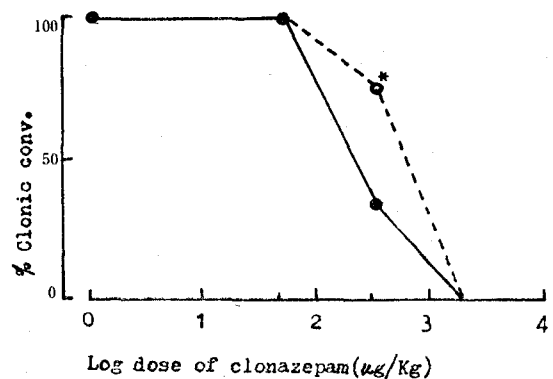
n is the number of rats used for experiments.

Number of dead animals was given in parenthesis.

\*, \*\* Significantly different from 6-OHDA untreated group, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.03$  (Fisher's exact probability).

현시간이 지연되거나 전혀 발작이 일어나지 않았다(Fig. 1, 2). 한편 정상동물이나 clonazepam 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 투여한 동물에서 PTZ에 의한 경련 발작시간은 6-OHDA에 의해서 전혀 영향을 받지 않았으나 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 투여군에서는 경련발작발현이 약간 지연되었으나 통계적 유의성은 없었다. 이것은 Lazarova 등<sup>21)</sup>과 Corcoran 등<sup>40)</sup>이 6-OHDA 투여로 PTZ에 의한 경련발현시간이 단축되었다는 보고와 상반되며 경련발현시간이 6-OHDA에 의해 전혀 영향을 받지 않았다고 보고한 Mason 등<sup>13)</sup>의 실험결과와 일치한다.

PTZ은 흥분성 시냅스(excitatory synapse)를 직접 활성화시키는 "시냅스 작용성 경련제"로서의 효과를 나타낸다고 알려져 있으며<sup>34)</sup> PTZ의 경련유발작용에  $\alpha_2$ -아드레날린수용체가 부분적으로 관여한다는 보고도 있다.<sup>21,35)</sup> 본 실험의 결과는 NE이 만성적으로 고갈되어 있는 상태에서 PTZ이 경련을 유발시키는데 이것은 노르아드레날린성신경계가 완벽히 존재하지 않아도 경련을 유발시킬 수 있다는 사실을 보여주는 것이다. 그러나 PTZ이 단순히 노르아드레날린수용체에 직접 작용한다면 脫神經에 의한 수용체의 초과민성 결과로 PTZ이 더욱 강하게 경련을 유발할 수 있을 것이다. 본 실험에서는 이러한 작용기전에 대하여 충분한 설명을 할 수 없으나



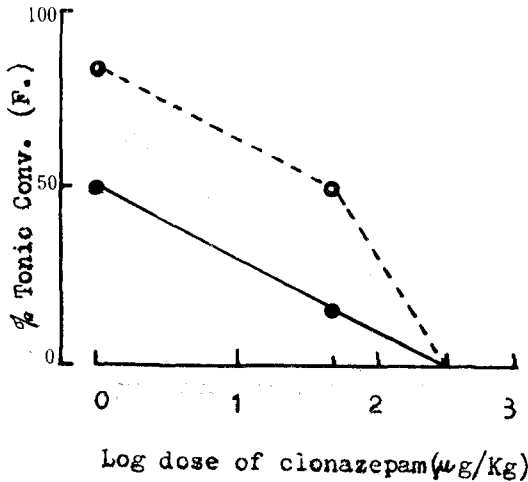
**Fig. 3**—Effect of 6-hydroxydopamine on the anticonvulsive action of clonazepam to the incidence of general clonic convulsions induced by PTZ (90mg/kg) in rats.

Each point is represents as percentage of positive response.

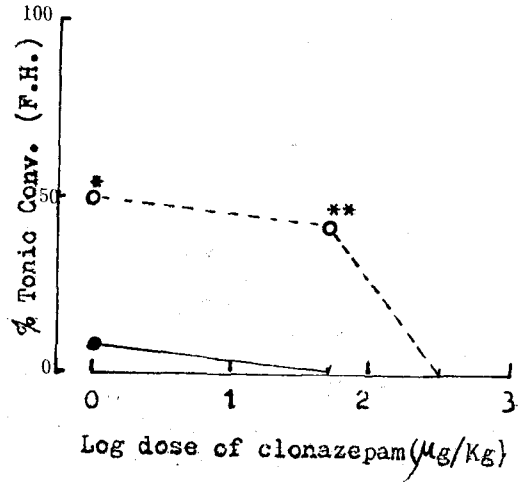
\*Significantly different from controls at  $p < 0.05$  (Fisher's exact probability)

—●— Control, ...○... 6-OHDA pretreated group.

지금까지의 다른 실험보고에 의해 PTZ 이외의 경련유발방식에 의해서도 腦中 NE량이 감소하면 경련유발이 매우 민감하게 일어나 여러 항경련약의 효과가 감소된다고 보고되었다.<sup>16,18)</sup> 先天的으로 간질성향이 높은 흰쥐(genetically epilepsy-prone rat)나 acidogenic seizure에서도 NE량



**Fig. 4**—Effect of 6-hydroxydopamine on the anticonvulsive action of clonazepam to the incidence of tonic extension of the forelimb in the rat induced by PTZ (90mg/kg).  
 —●— Control,    ---○--- 6-OHDA pretreated group.  
 Each point is represents as percentage of positive response.



**Fig. 5**—Effect of 6-hydroxydopamine on the anticonvulsive action of clonazepam to the incidence of tonic extension of the forelimb and hindlimb in the rat induced by PTZ(90mg/kg). Each point is represents as percentage of positive response.  
 \*, \*\*, Significantly different from control  $p^* < 0.05$ ,  $p^{**} < 0.03$  (Fisher's exact probability)  
 —●— Control,    ---○--- 6-OHDA pretreated group

이 감소되는 현상을 볼 수 있다는 점으로<sup>36-38)</sup> 미루어 보아 NE이 경련발작에 대한 뇌의 민감도를 저하시킨다는 사실을 입증할 수 있다.

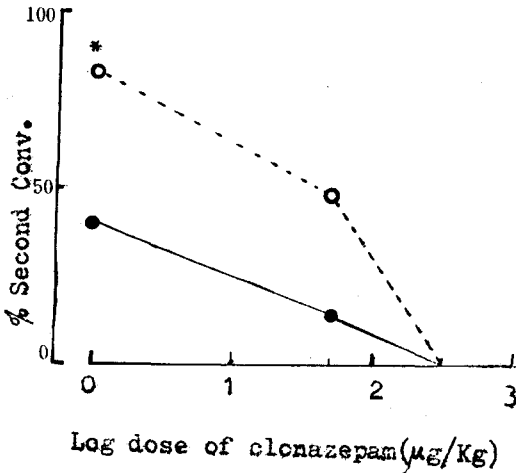
**間代性痙攣發現에 미치는 영향**—PTZ를 투여하기 30분전에 clonazepam의 각 용량에 따른 전신적인 간대성경련의 발현율은 Fig. 3과 같다. Clonazepam 300µg/kg를 투여했을 때 정상동물은 경련발현율이 33%인데 비해 6-OHDA 전처치군은 75%로 유의적인 차를 나타냈으나 clonazepam의 용량을 더 증가시켰을 때는 6-OHDA의 처치에 상관없이 간대성경련의 발현은 완전히 차단되었다. 즉 PTZ으로 일어나는 경련발작에 대한 clonazepam의 抗痙攣作用은 6-OHDA으로 減少됨을 알 수 있다.

Browning등<sup>16)</sup>은 6-OHDA투여에 의해 前腦部位的 catecholamine이 고갈된 흰쥐에서 몇가지 항경련약은 그 효과가 감소한다고 하였고, Mason등<sup>17)</sup>은 이러한 항경련작용에 대한 拮抗効果는 NE에 대하여 선택적이며 전기적으로 유발된 (electroconvulsive shock) 경련에서도 같은 현상이 일어남을 지적하였다.

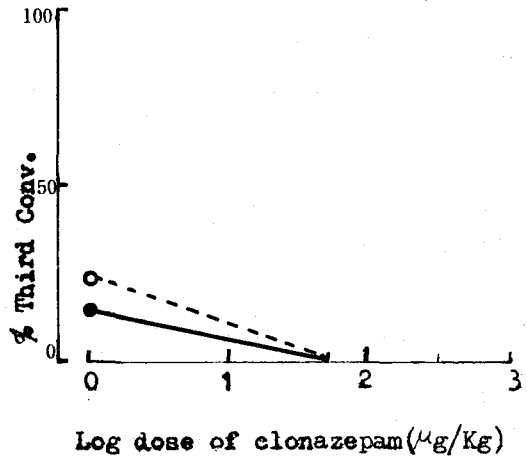
본 실험에서도 6-OHDA 전처치군은 clonazepam에 의한 항경련효과가 감소되었고 8일 후에 前腦에서 NE량을 측정하였을 때 NE량도 감소되었다. 이것으로 미루어 6-OHDA을 전처치하였을 때 clonazepam의 항경련효과가 감소된 것은 6-OHDA의 선택적인 NE고갈작용에 의한 것이라 사료된다.

**強直性痙攣에 미치는 영향**—Clonazepam 50, 300, 1800µg/kg을 각 용량별로 복강내주사한 30분후에 PTZ를 투여하였을 때 강직성경련의 발현율은 Fig. 4, Fig. 5와 같다.

강직성경련은 간대성경련이 발현된 후 연속적으로 일어났으며, 강직성경련이 흰쥐의 앞다리에서만 일어난 경우는 6-OHDA투여군에서 발현율이 높았으나 통계적으로 유의성있는 차이는 없었다. 흰쥐의 앞다리와 뒷다리 모두에서의 발현율은 vehicle과 50µg/kg의 clonazepam을 투여하였을 때 6-OHDA 전처치군은 그 발현율이 유의적으로 높았다. 이러한 강직성경련은 clonazepam 300µg/kg이상의 용량을 투여하였을 때는



**Fig. 6**—Effect of 6-hydroxydopamine on the anticonvulsive action of clonazepam to the incidence of second convulsion within 1hr. in PTZ treated rats. Each point is represents as percentage of positive response. \*Significantly different from control at  $p < 0.05$  (Fisher's exact probability). —●— Control, ..... 6-OHDA pretreated group.

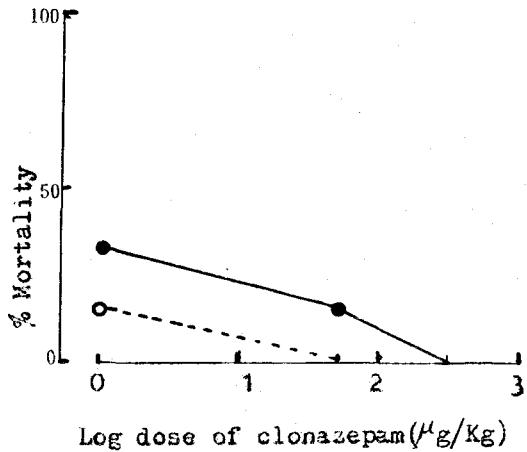


**Fig. 7**—Effect of 6-hydroxydopamine on the anticonvulsive action of clonazepam to the incidence of third convulsion induced by PTZ(90mg/kg) within 1 hr. Each point is represents as percentage of positive response. —●— Control, ..... 6-OHDA treated group.

6-OHDA 전처치와는 관계없이 모두 완전히 차단되었다.

**痙攣 回數에 미치는 영향**—Clonazepam을 용량별로 투여하고 30分후에 PTZ 90mg/kg 투여 후 1시간 동안 관찰하는 중 2회이상 경련을 일으킨 경련발현율은 Fig. 6, Fig. 7과 같다. 6-OHDA 처치군에서 1시간 이내에 2회 경련을 유발시킨 동물수는 6-OHDA를 처치하지 않은 정상동물군에 비하여 유의성 있게 발현률이 높았다. Clonazepam을 전처치하였을 경우에는 발현률의 차이는 있으나 통계적 유의성은 없었다. 3회 경련을 일으킨 경우 6-OHDA 투여군과 정상군의 차이는 없었다. 이때 1회의 경련 도중 사망한 동물은 2회, 3회의 경련발현률에서 제외시켰다.

**사망률에 미치는 영향**—PTZ 투여 후 1시간 이내에 사망하는 비율에 대한 6-OHDA의 효과는 Fig. 8과 같다. Vehicle및 clonazepam 50µg/kg투여하였을 때 정상군에서 사망률이 높았으나 유의적인 차이는 없었다.



**Fig. 8**—Effect of 6-hydroxydopamine on the mortality of clonazepam treated rats induced by PTZ (90mg/kg) within 1 hr. —●— Control, ..... 6-OHDA treated group.

본 실험에서 6-OHDA은 PTZ 투여로 야기되는 간대성, 강직성경련에 대한 clonazepam의 항경련효과는 감소하고 경련 횟수에 대한 억제작용도 저하시켰다. 그러나 clonazepam은 용량을 증가시킴으로서 6-OHDA에 의한 길항효과가 완

전히 소실되었다.

이상에서 6-OHDA은 실험동물에서 腦中 NE의 농도를 저하시켜 clonazepam의 항경련효과를 감소시켰으며 이것은 경련역치의 저하로, 경련에 대한 민감도상승에 기인된 비특이적인 효과인 것으로 사료된다. Clonazepam의 항경련효과에는 GABA, glycine, 5-HT등 NE이외의 다른 요소도 관계하므로, 이러한 복합적기전이 clonazepam, 항경련효과에 상승적으로 작용하여 clonazepam을 고용량 투여하면 이러한 NE의 영향이 완전히 소실되는 것으로 생각된다.

중추신경계의 NE량이 clonazepam의 항경련작용에 관련이 있어 앞에서 언급한대로 clonazepam투여로 뇌중 NE량이 상승한다는 실험이 진행되고 있다.

본 실험에서는 腦中 NE농도 저하가 PTZ에 의한 경련유발을 현저히 증가시키며 이에 대한 clonazepam의 항경련효과도 前腦中 NE농도 저하로 감소함을 보여주었다.

### 結 論

6-Hydroxydopamine으로 化學的脫交感神經시킴으로서 中樞神經系의 norepinephrine量變化가 clonazepam의 抗痙攣効果에 미치는 영향을 알아보고자 응성취쥐에 대하여 pentylenetetrazole에 의한 경련실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

신생쥐에게 6-hydroxydopamine 100mg/kg 3회 투여로 norepinephrine량이 前腦部位는 70.5%, 대뇌피질은 48.6%가 低下하였고 下部腦幹部位는 90.7%가 상승하였다.

6-Hydroxydopamine은 pentylenetetrazole에 의한 또는 clonazepam전처리 후 pentylenetetrazole에 의한 痙攣發現時間에 영향을 미치지 못하였으나 clonazepam의 間代性 및 強直性痙攣 차단 효과는 減少하였다. 痙攣發現 빈도도 有意的인 增加를 보여 6-hydroxydopamine은 clonazepam의 抗痙攣效果를 明白히 減少시킴을 보여주었다. 그러나 clonazepam을 高用量投與時는 위의 모든 효과는 완전히 차단되었다.

이상의 結果로 中樞神經系 norepinephrine은 pentylenetetrazole에 의해 유발되는 경련의 敏感度를 變化시켜 clonazepam의 抗痙攣效果에 영향을 주나 clonazepam을 高用量 投與하면 이러한 低下效果가 소멸되는데 이것은 clonazepam의 作用機轉에 norepinephrine과 其他의 要素가 복합적으로 作用하기 때문인 것으로 사료된다.

### 문 헌

- 1) Browne, T.R., Clonazepam. *N. Engl. J. Med.* 299, 812 (1978).
- 2) Editorials, Clonazepam; A new anticonvulsant. *JAMA* 235, 1480 (1976).
- 3) Goodman and Gilman's, *The pharmacological basis of therapeutics*. 6th ed. Macmillan. 466 (1980).
- 4) Meldrum, B.S., New GABA-related anticonvulsant drugs; Animal test and clinical efficacy. *Advances in epileptology* (ed. M. Dam, L. Gram and J.K. Penry) Raven press, New York, 25 (1981).
- 5) Pinder, R.M., Brogden, R.N., Speight T.M., and Avny, G.S., Clonazepam; A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in epilepsy. *Drugs* 12, 321 (1976).
- 6) Morselli, P.L. and Baruzzi, A., New trends in antiepileptic drugs. *Advances in epileptology* (ed. Canger, R., (Angeletti, F. and Penry, J.K.) Raven Press, New York, 377 (1980).
- 7) Gray, W.D., Rauh, C.E. and Shanahan, R.W., The mechanism of the antagonistic action of reserpine on the anticonvulsant effect of inhibitors of carbonic anhydrase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 139, 350 (1963).
- 8) Anderson, E.G., Markowitz, S.D. and Bonnycastle, D.D., Brain 5-HT and anticonvulsant activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 136, 179 (1962).
- 9) Azzaro, A.J., Wenger, G.R., Craig, C.R. and Stitzel, R.E., Reserpine-induced alterations in brain amines and their relationship to changes in the incidence of minimal electroshock seizures in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 180, 558



- (1972).
- 10) Jenner, P., Chadwick, D., Reynolds E.H. and Marsden, C.D., Altered 5-HT metabolism with clonazepam, diazepam and diphenylhydantoin. *J. Pharm. Pharmacol.* **27**, 707 (1975).
  - 11) Jenner, P., Chadwick, D., Reynolds E.H. and Marsden, C.D., Clonazepam-induced changes in 5-HT metabolism in animals and man. *J. Pharm. Pharmacol.* **27** (suppl.), 38 (1975).
  - 12) Fenessy, M.R. and Lee, J.R., The effect of Benzodiazepines on brain amines of the mouse. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **197**, 37 (1972).
  - 13) Mason, S.T. and Corcoran, M.E., Catecholamines and Convulsions. *Brain Res.* **170**, 497 (1979).
  - 14) Mason, S.T. and Corcoran, M.E., Depletion of brain noradrenaline, but not dopamine by intracerebral 6-OHDA potentiates convulsions induced by electroshock. *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 209 (1979).
  - 15) Gray, W.D. and Rauch, C.E., The relation between monoamines in brain and the anticonvulsant action of inhibitors of carbonic anhydrase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **177**, 206 (1971).
  - 16) Browning, R.A. and Simonton, R.L.: Antagonism of anticonvulsant action of phenytoin, Phenobarbital and acetazolamide by 6-OHDA. *Life Sci.* **22**, 1921 (1978).
  - 17) Mason, S.T. and Corcoran, M.E., Noradrenaline and seizures. *Science* **203**, 1265 (1979).
  - 18) Quattrone and Samanin, R., Decreased anticonvulsant activity of carbamazepine in 6-OHDA treated rats. *Eur. J. Pharmacol.* **41**, 333 (1977).
  - 19) Swinyard, E.A. and Castellion, A.W., Anticonvulsant properties of some benzodiazepines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **151**, 369 (1966).
  - 20) Lazarova, M., Bendotti, C. and Samanin, R., Studies on the role of serotonin in different regions of the rat central nervous system on pentylenetetrazol-induced seizures and the effect of di-n-propylacetate. *N.S. Arch. Pharmacol.* **322**, 147 (1983).
  - 21) Lazarova, M., Bendotti, C. and Samanin, R., The role of different types of adrenergic receptors in PTZ-induced seizures and the effect of di-n-propylacetate in the rat. *Psychopharmacology* **81**, 177 (1983).
  - 22) Swinyard, E.A., Laboratory assay of clinically effective antiepileptic drugs. *J. Am. Pharm. A.* (Scient. Ed) **38**, 201 (1949).
  - 23) Swinyard, E.A., Brown, C.E. and Goodman, L.S., Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **106**, 319 (1952).
  - 24) Anton, A.H. and Sayre, D.F., A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxy indole procedure for the analysis of catecholamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **138**, 360 (1962).
  - 25) Versteeg, D.H.G., Wijnen, H.J.L.M., Kloet, E.R. and Jong, W., Differential effect of neonatal 6-OHDA treatment on the catecholamine content of hypothalamic nuclei and brainstem regions. *Neuroscience Letters* **7**, 341 (1977).
  - 26) Taylor, K.M., Clark, D.W., Laverty, R. and Phelan, E.L., Specific noradrenergic neurons destroyed by 6-OHDA injection into newborn rats. *Nature New Biol.* **239**, 247 (1972).
  - 27) Sachs, C. and Jonsson, G., Mechanisms of action of 6-OHDA. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1 (1975).
  - 28) Liew, M.C. and Laverty, R., Mechanisms of selective depletion of brain regional norepinephrine by systemic 6-OHDA in newborn rats. *Eur. J. Pharmacol.* **33**, 167 (1975).
  - 29) Sachs, C., Depletion of the blood-brain-barrier for 6-OHDA. *J. Neurochem.* **20**, 1753 (1973).
  - 30) Etcheverry, J.G. and Zicher, M., Permanent depletion of peripheral norepinephrine in rats treated at birth with 6-OHDA. *Eur. J. Pharmacol.* **13**, 272 (1971).
  - 31) Min Chu Liew and Richard Laverty, Mechanism of Selective depletion of brain regional noradrenaline by systemic 6-OHDA in newborn rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **33**, 165 (1975).
  - 32) Versteeg, D.H.G., Wijnen, H.J.L.M., Kloet, E.R. and Jong, W., Differential effect of neonatal 6-OHDA treatment on the catecholamine content of hypothalamic nuclei and brainstem regions. *Neuroscience Letters* **7**, 341 (1977).

- 33) Matthews, W.D. and Gerald, P.C., Gerald., Effects of chemical sympathectomy by 6-hydroxydopamine on  $\alpha$ -adrenoceptor-mediated pressor responses in pithed rat. *J. Cardiovascular Pharmacol.*, **6**, 233 (1984).
- 34) Provoost, A.P., Bohus, B. and Wybren, J., Neonatal chemical sympathectomy: Functional control of denervation of the vascular system and tissue noradrenaline level in the rat after 6-hydroxydopamine. *N.S. Arch. Pharmacol.*, **284**, 353 (1974).
- 35) Stone, W.E., Systemic chemical convulsants and metabolic derangement. *Experimental models of epilepsy-A manual for the laboratory workers* (ed. D.P. Purpura) Raven Press, New York, 407 (1972).
- 36) Oishi, R., Suenaga, N., Hidaka T. and Fukuda, T., The role of adrenoreceptors in the regulation of pentylentetrazole convulsions in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **31**, 707 (1979).
- 37) Jobe, P.C., Picchioni, A.L. and Chin, L., Role of brain norepinephrine in audiogenic seizure in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **184**, 1 (1973).
- 38) Bourn, W.M., Chin, L. and Picchioni, A.L., Enhancement of audiogenic seizure by 6-OHDA. *J. Pharm. Pharmacol.* **24**, 913 (1972).
- 39) Jobe, D.C., Laird, H.E., Ko, K.H., Ray T. and Pailey, J.W., Abnormalities in monoamine levels in the central nervous system of the Genetically epilepsy-prone rat. *Epilepsia*, **23**, 359 (1982).
- 40) Corcoran, M.E., Fibiger, H.C., McGeer, E.G. and Wada, J.A., Potentiation of leptazol seizures by 6-OHDA. *J. Pharm. Pharmacol.* **25**, 497 (1973).