

Docosahexaenoic acid가 전기충격성 뇌장애 마우스의 기억력 및 Acetylcholine량 변화에 미치는 영향

김문정 · 신정희 · 윤재순*

이화여자대학교 약학대학

(Received March 16, 1995)

The Effect of Docosahexaenoic Acid on Brain Function and Acetylcholine Level in Cerebral Cortex of Electroconvulsive Shock Induced Mice

Moon Jung Kim, Jeung Hi Shin and Jae Soon Yun*
College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract—Electroconvulsive shock (ECS) increases the activity of acetylcholinesterase and decreases in brain acetylcholine levels. A large amount of free fatty acids accumulated in the brain tissue affects cerebral blood flow, brain edema and inflammation and results in brain injury. The present study examined the effect of docosahexaenoic acid (DHA) and D,L-pyroglutamic acid (D,L-PCA) on the learning and memory deficit using the passive avoidance failure technique and on the change of acetylcholine and choline level in the cerebral cortex of ECS-induced mice. The application of ECS (25 mA, 0.5 sec) induced a significant decrease in memory function for 30 min. ECS-induced a significant decrease in cortical acetylcholine and choline levels 1 min following the ECS application, which were almost recovered to ECS control level after 30 min. DHA (20 mg/kg, i.p.), administered 24 hr before shock, prevented the ECS-induced passive avoidance failure and the decrease of acetylcholine level 1 min following the ECS application. DHA failed to elicit a change in cortical choline level. DHA did not affect memory function and the cortical Ach and choline level of normal mice. The administration of D,L-PCA (500 mg/kg, i.p.) increased the effect of DHA on memory function and the change of cortical acetylcholine level of ECS induced mice. These results suggest that DHA treatment may be contributed to the prevention against memory deficit and to the activation of cholinergic system in the ECS induced mice.

Keywords □ Docosahexaenoic acid, D,L-pyroglutamic acid, acetylcholine, step down and step through-passive avoidance, electroconvulsive shock.

Docosahexaenoic acid (22:6 ω -3, DHA)는 사람 대뇌피질의 회백질 부분의 phosphatidylserine과 phosphatidylethanolamine에 많이 포함되어 있으며,¹⁾ 흰쥐에서 뇌,²⁾ 특히 synaptosomal plasma membrane (SPM)³⁾ 등 세포막의 phosphatidylethanolamine에 많이 포함되어 있다. 또한 DHA 및 그 전구체인 linolenic acid(18:3 ω -3, LLA)는 정상 뇌와 망막의 발달에 필수적인 지방산이며^{4, 5)} 세포분화, synaptogenesis, photoreceptor membrane 생합성

에 필요하다.⁶⁾ Lamptey 등⁷⁾은 흰쥐에 LLA결핍식을 공급한 후 Y형 미로시험법으로 학습 능력을 측정할 결과 학습 능력이 저하되어 LLA결핍과 학습 능력이 관련있음을 보고하였다. 또한 태아기와 수유기에 LLA결핍식을 공급한 흰쥐에게 brightnessdiscrimination leaning test로 학습 능력을 측정할 Yamamoto⁸⁾ 등의 실험에서도 학습 능력이 현저히 저하되었다고 보고하였다. Electroconvulsive shock (ECS)는 기억, 학습과 연관된 중추 신경계의 기능에 변화를 초래하는데, acetylcholine성 신경계에서 acetylcholinesterase의 활성을 증가시키고 acetylcholine 함량을 감소

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

시킨다.⁹⁾ ECS에 의해서 중추 신경계의 기능에 변화를 초래함으로써 기억력 장애가 유도되며, 반복적으로 ECS를 실시했을 때 뇌의 muscarinic cholinergic receptor (MCR)의 down regulation이 보고되어 있으며,¹⁰⁾ MCR의 down regulation이 choline성 신경 전달 물질의 감소로 나타나며 그 결과 ECS에 의해 기억력 장애가 유도된다고 알려져 있다.¹¹⁾ 또한 ECS후에 흰쥐의 뇌에서는 phospholipase A₂가 활성화 되어 뇌 세포막의 인지질에 결합되어 있던 지방산, 특히 arachidonic acid (20:4 ω -6, AA)를 많이 유리시켜 손상된 뇌 조직에 축적되고¹²⁾ cyclooxygenase의 활성도 증가되어 prostaglandins (PGs)의 조직내 농도를 증가시키며¹³⁾ 뇌의 PGs는 뇌 혈류량, 뇌 부종, 염증 등에 영향을 미친다고 알려져 있다.¹⁴⁾ 불포화 지방산의 과산화물 생성 및 AA로부터 생성된 free radical은 뇌 조직의 세포막에서 세포 기능의 손상, 세포막 투과도 증가를 유발하여 흰쥐 대뇌의 부종을 일으킨다.¹⁵⁾

Pyroglutamic acid는 포유동물 뇌에 유리형으로 존재하며 대뇌피질에서 acetylcholine의 방출을 증가시키며¹⁶⁾ 또한 ECS와 scopolamine으로 유도된 기억장애 및 뇌 acetylcholine 함량 감소를 개선시켰다고 알려져 있다.¹⁷⁾ 따라서 ECS를 실시하여 기억력장애와 뇌 중 acetylcholine량 감소를 일으킨 마우스에 대해서 step down 및 step through수동회피반응의 행동 실험을 통한 기억력 및 acetylcholine 함량 변화에 대하여 뇌 발달에 필수지방산인 DHA투여가 미치는 영향을 규명하고 D.LPCA와의 협조 효과를 검토하고자 본 실험을 시도하였다.

실험방법

실험동물 - 체중 20~30 g (8~12 주)의 ICR계 웅성 마우스를 일주일 이상 동물실 환경에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 고형사료 (삼양 유지) 및 물을 자유롭게 공급하였고, 동물실은 아침 7시부터 저녁 7시까지 불을 켜서 12시간씩 명암을 자동조절장치를 이용하여 조절하였다.

투여약물 및 측정용 시약 - 99% docosahexaenoic acid (DHA, Sigma Chem. Co.)를 tween 80 (Junsei Chem. Co. Ltd.) 10적을 함유한 0.3% carboxy methyl cellulose (CMC, Kanto Chem. Co. Ltd.)생리식염수로 희석하여 DHA 20 mg/kg를 복강내 투여하였다. D.L-py-

roglutamic acid (D.L-PCA, Sigma Chem. Co.)는 생리 식염수로 희석하여 500 mg/kg를 복강내 투여하였다. Acetylcholine 및 choline 정량을 위해 acetylcholine chloride (Ach, Merck Chem. Co.), choline iodide (Ch, Sigma Chem. Co.), butyrylcholine iodide (Bch, Sigma Chem. Co.), propionyl chloride (Aldrich Chem. Co.), amberlite IRA 400 (Rohm & Haos Co.)을 사용하였으며, 이외의 시약들도 특급 또는 일급을 사용하였다.

실험기기 - ECS 모델을 만들기 위해 electroconvulsive device (Minipa, GR22-28D)를 사용하였고, 수동회피반응 측정장치는 step down 및 step through의 2가지 장치를 사용하였다.

Step down 수동회피반응 측정장치는 Chorover 등¹⁸⁾에 의해 사용된 것을 기본으로 본 교실에서 설계한, 12×12×50 cm의 아크릴 상자로서 바닥에 7 mm 간격으로 격자를 설치하였다. 격자 위에는 높이 및 지름이 각각 4 cm인 원통형의 우레탄으로 된 단을 설치하였고, 마우스가 이 단에서 바닥으로 내려올 경우 바닥의 격자를 통해 30 volt의 전기가 주어지도록 장치하였다.²⁰⁾

Step through 수동회피반응 측정장치는 일본 동경대 약학부 Saito 교수가 고안, 제작케 한 passive avoidance control PA-M5 (OHC O'HARA & Co. Ltd.)를 사용하였다. 2 개의 공간으로 나누고 그 사이 칸막이에 구멍을 내어 이 구멍을 통해 마우스가 쉽게 통과할 수 있도록 하였다. 상자의 한쪽부분 (12×10×10 cm)은 투명한 아크릴판으로 만들어 상자 안을 밝게 하였고 다른 한쪽 (16×10×10 cm)은 검은 아크릴판으로 만들어 상자 안을 어둡게 하였으며, 바닥에는 7 mm 간격으로 격자를 설치하였다. 마우스가 어두운 부분으로 들어갔을 때 바닥의 격자를 통해 30 volt의 전기가 주어지도록 장치하였다.

Acetylcholine 및 choline 정량을 위해서는 microwave irradiator (ER-747JB, out put 700 W, frequency 2450 MHZ, 금성사), pyrojector II (SGE International PTY. Ltd, Australia), gas chromatography (Hewlett-Packard 5890A, U.S.A.)를 사용하였다.

검체 처리용으로는 homogenizer (DAE HAN Science Industrial Co.), Sorvall centrifuge (Dupont Co.), microcentrifuge (Hettich, Germany)를 사용하였다.

실험동물의 구분 및 처리 - 실험군은 0.3% CMC 생

리식염액만을 투여한 정상대조군, 정상동물에 DHA 210 mg/kg ip 투여군, ECS실시대조군, ECS실시동물에 DHA 20 mg/kg ip 투여군, D,L-PCA 투여군 및 DHA와 D,L-PCA 병용투여군의 6군으로 구분하였다. 0.3% CMC 생리식염액, DHA 20 mg/kg를 검사 혹은 ECS 실시 24시간³³⁾ 전에 복강내투여하였고, D,L-PCA 500 mg/kg는 검사 혹은 ECS실시 2시간 전에 복강내투여하였다. 각 군마다 step down 및 step through 수동회피반응을 측정하였고, 이 때 사용한 동물수는 각 군마다 20-30마리로 하였다. 대뇌피질 acetylcholine 및 choline량을 측정하였고, 이 때는 각 군 동물수를 6마리로 하였다.

DHA는 복강내 투여 후 간, 뇌, 망막에서 발견되는데 뇌에서는 투여 2시간 후에 DHA 분포가 나타나기 시작하여 24시간에서 72시간 사이에 높은 함량으로 나타나므로³³⁾ 실험에서는 DHA 복강내 투여 24시간 후에 ECS 실시 및 step down와 step through 수동회피반응을 측정하였다.

ECS에 의한 기억력 장애 모델 작성 - Paalzow¹⁹⁾의 방법을 기초로 하여 수동회피반응 측정시 훈련시행 바로 직후에 마우스의 양쪽 귀에 생리식염수를 적신 전극을 대고 25 mA로 0.5초동안 전기충격을 주어 ECS를 유발시켰다. 정상대조군 및 정상 동물에 DHA 투여군은 자극기에 전류를 통하지 않게 하고 같은 방법으로 처리하였다.

step down 수동회피반응 - 마우스를 실험상자의 원통단 위에 올려 놓으면 마우스는 즉시 바닥으로 내려오게 되는데, 이 때 마우스가 바닥으로 내려오면 바닥의 격자를 통해 전기자극이 가해지도록 하는 조건에서, 마우스가 바닥으로 내려온 시간부터 1분동안 마우스를 실험상자 안에 두고 기억을 획득하게 하였다. 이 때 마우스를 처음에 단 위에 올려 놓은 뒤 30초 이상 바닥으로 내려오지 않는 동물은 실험에서 제외시켰다. 검사시행은 훈련시행 5분, 10분, 30분 후에 각각 다른 마우스를 가지고 실시하였으며, 마우스를 실험상자의 단 위에 올려놓고 바닥으로 내려오기까지의 시간 (latency time)을 실험상자에 설치된 감지기를 통해 자동으로 측정하였다. 검사시행은 5분동안 관찰하였다.

step through 수동회피반응 - 마우스를 실험상자의 밝은 부분에 놓으면 마우스는 구멍을 통해 어두운 부분으로 들어가는 데, 1분동안 전기자극을 주지 않은 상태에서 마우스가 양쪽을 자유로이 왔다갔다 하며 탐색, 적

응토록 하였다. 적응이 끝난 후에 마우스가 어두운 부분으로 들어 갔을 때 구멍을 막은 상태에서 1초 후에 전기자극이 2초동안 가해지도록 했고, 전기자극이 끝나면 구멍을 다시 열고 마우스를 꺼냈다. 훈련시 30초 이상 어두운 부분으로 들어가지 않은 동물은 실험에서 제외시켰다. 검사시행은 훈련시행 5분, 10분, 30분 후에 각각 다른 마우스를 가지고 실시하였으며, 마우스를 밝은 부분에 넣고 어두운 부분으로 들어갈 때까지의 시간 (latency time)을 상자의 어두운 부분내에 설치된 감지기를 통해 자동으로 측정하였으며 5분동안 관찰하였다.²⁰⁾

운동 기능에 대한 영향 - 수동회피반응 측정시 ECS나 기타 사용된 약물의 효과가 기억에 대한 고유한 영향인지 혹은 운동 기능 실조에 의한 현상인지를 구별하는 것은 중요하다. 따라서 훈련 받지 않은 동물을 이용하여 step down 및 step through 수동회피반응 측정장치에서의 지체시간 (latency time)을 측정하였다. 실험군은 정상대조군, ECS실시군, DHA투여군, D,L-PCA 투여군, DHA 및 D,L-PCA 병용투여군의 5군으로 하였으며, 검사시행 24 시간 전에 DHA를, 2시간 전에 D,L-PCA를 복강내투여 하였고, 검사시행 5분, 10분, 30분 전에 ECS를 실시하였다. 각 실험군의 동물은 각각 6마리를 사용하였다.

acetylcholine 및 choline 추출 - acetylcholine 및 choline의 추출 및 함량 측정은 Maruyama 등²¹⁾의 방법을 기초로 하였다. Ach은 분해 속도가 매우 빠르므로 마우스를 고정틀에 넣고, 머리 정면에 microwave를 4초간 조사하여 처리하였고, ECS실시 후 각각 1분, 5분, 10분, 30분에 실행하였다. 뇌 전체를 적출한 후 즉시 얼음판에서 대뇌피질을 분리하여 무게를 칭량하였다. 15% 1 N formic acid/acetone용액 3 ml과 내부표준물질인 0.3 mM butyrylcholine iodide 100 µl 혼합액에 대뇌피질 전체를 넣고 homogenizer로 20초간 균질화시키고, 얼음 속에서 30분간 방치한 후 0°C에서 17,000×g로 20분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 질소 기류 중에서 용매를 건조시킨 후 잔사에 acetonitrile 100 µl, propionyl chloride 300 µl를 넣고 60°C에서 40분간 방치하여 choline을 propionyl choline으로 ester화 시켰다. 질소 기류 중에서 용매를 건조시키고 증류수 300 µl를 넣어 잔사를 용해시켰다. potassium periodide 20 µl (KI 2 g과 I₂ 1.8 g을 증류수 10 ml에 녹인 용액을 넣고 혼화하여 4급 암모늄을 침전

시키고 10분간 얼음 속에서 방치한 후에 $10.000 \times g$ 에서 3분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전을 얻었다. 이 침전을 acetylcholine 및 choline의 측정용 시료로 사용하였다.

acetylcholine 및 choline의 함량 측정 - 원심분리하여 얻은 침전물을 chromatography용 methanol 50 μ l에 용해시킨 후 amberlite IRA 400 5 mg을 넣어 과잉의 iodide를 제거하였다. 추출액 1 μ l를 microsyringe로 pyrolyzer septum을 통해 주입하여 pyrolyzer온도 400°C에서 acetylcholine를 열분해 시켜서 dealkylation된 것을 gas chromatography (GC)로 분석하였다.

Methylsilicon wide bore capillary column (30 mm length \times 0.53 mm I.D \times film thickness 0.33 μ m, HP-1), thermionic nitrogen and phosphorous detector (NPD), carrier gas로는 nitrogen (5 ml/min)를 사용하였고 GC 분석시 split ratio는 10:1로 하였으며, 주입기 온도는 200°C, 검출기 온도는 250°C로 두었고, column 온도는 120°C 등온에서 20분간 분석하였다. 각 peak 면적을 내부표준물질인 butyrylcholine peak 면적과 비교하여 정량하였고, Ach 및 Ch 함량은 nM/g tissue로 표시하였다.

통계 분석 - 모든 실험값은 평균 \pm 표준오차로 표시하였으며 지체시간에 대한 측정값의 유의성은 Mann-Whitney U-test에 의하였고, 300초 이상 기억하는 동물수에 대한 유의성은 Chi-Square test에 의해 각각 검정하였고, Ach 및 choline 함량 측정 결과는 Student's t-test로 검정하여 $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

운동 기능에 대한 효과 훈련을 받지 않은 실험동물은 정상대조군, DHA투여군, D,L-PCA투여군, DHA 및 D,L-PCA병용투여군 및 ECS실시군의 5군으로 분류하여 수동회피반응 측정장치로 실험하였으며, DHA는 검사시행 24시간 전에, D,L-PCA는 검사시행 2시간 전에 복강내투여하였다. ECS실시군은 ECS 실시 후 5분, 10분, 30분에 각각 실험하였다.

이 결과 step down수동회피반응에서 정상대조군의 평균지체시간은 4.8 초였으며, DHA투여군, D,L-PCA투여군, DHA 및 D,L-PCA병용투여군의 평균지

체시간은 각각 6.1, 6.2, 5.5 초로 모두 정상대조군과 유사한 지체시간을 나타냈다. 또한 ECS실시 후 5분, 10분, 30분에 각각 측정된 평균지체시간은 각각 5.0, 5.0, 5.7초로 나타나 정상대조군과 유의적인 차이가 없었다.

step through수동회피반응에서는 정상대조군의 평균지체시간이 7.7초였으며, DHA투여군, D,L-PCA투여군, DHA 및 D,L-PCA병용투여군의 평균지체시간은 각각 8.5, 8.3, 7.9초로 모두 정상대조군과 유사한 지체시간을 나타냈다. 또한 ECS 실시 후 5분, 10분, 30분에 각각 측정된 평균지체시간은 각각 9.0, 7.3, 8.8초로 나타나 정상대조군과 유의적인 차이가 없었다.

따라서 검사시행 24시간 전에 투여한 DHA 및 2시간 전에 투여한 D,L-PCA, 또 검사시행 5분, 10분, 30분 전에 행해진 ECS실시가 운동 기능에 특별한 영향을 주지 않은 것으로 나타났다 (Table I).

step down 수동회피반응 - 각 실험군에서의 수동회피반응으로 지체시간을 측정하였으며, 300초 이상 지체하는 동물을 완전히 기억한 동물로 간주하고 사용동물수에 대한 완전히 기억한 동물수의 비율을 구하였다. step down 수동회피반응 측정장치로 지체시간을 측정된 결과를 Table II에 나타내었다.

정상대조군의 평균지체시간은 훈련시행 후 5분, 10분, 30분에서 각각 195.4, 173.6, 114.5초였으며, 정상동물에 DHA투여군은 동일 시간대에서 정상대조군에 비해 유의적인 영향을 미치지 않았다. ECS실시대조군은 ECS 실시 후 정상대조군에 비해 10분 ($p < 0.05$)과 30분 ($p < 0.01$)에서 유의적으로 각각 감소하였다. DHA를 전처리한 후 ECS를 실시한 군은 ECS실시대조군에 비해 지체시간이 증가하였으며, 5분 ($p < 0.05$)과 30분 ($p < 0.01$)에서 각각 유의성이 있었다. (Fig. 1). D,L-PCA를 전처리한 후 ECS를 실시한 군은 5분 ($p < 0.05$), 10분, 30분 ($p < 0.01$)에서 ECS실시대조군에 비해 유의적으로 각각 증가하였다 (Table II). DHA 및 D,L-PCA를 병용투여한 후 ECS를 실시한 군은 동일 시간대에서 각각 213.8, 164.9, 208.5초였고 30분에서 ECS실시대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며 ($p < 0.01$), DHA단독투여시보다 증가하였고 ECS 실시 후 30분에서 유의성이 있었다 ($p < 0.01$) (Fig. 1).

한편 사용동물수에 대한 300초 이상 지체하는 동물수의 비율로 비교했을 때, 정상대조군은 훈련시행 후 5분,

Table I—The effect of docosahexaenoic acid (DHA), D,L-pyroglyutamic acid (D,L-PCA) and electroconvulsive shock (ECS) on the motor function in normal mice

Treatments	Dose(mg/kg,i.p.)	Pretreated time +	Latency time (sec)	
			Step down	Step through
		(hr)		
Normal	-	24	4.8±1.0	7.7±0.9
DHA	20	24	6.1±0.7	8.5±0.7
D,L-PCA	500	2	6.2±0.7	8.5±0.7
DHA +	20	24		
D,L-PCA	500	2	5.5±0.9	7.9±0.8
		(min)		
ECS	-	5	5.0±0.4	9.0±1.2
	-	10	5.0±0.6	7.3±0.9
	-	30	5.7±0.8	8.8±0.8

Drug administration was given to normal mice (no foot shock) at 2 or 24 hr and ECS was at 5, 10 or 30 min before testing the latency time, each value is expressed mean±SEM of 6 animals.

Table II—The effect of docosahexaenoic acid (DHA) and D,L-pyroglyutamic acid (D,L-PCA) on latency time of the ECS-induced mice at step down

Agents	ECS treatment	Dose (mg/kg,i.p.)	Latency time (sec. mean±SEM)		
			5	10	30 (min)
normal	-	-	194.5±22.1(21)	173.6±23.1(29)	114.5±19.5(30)
CMC	+	-	148.8±23.1(24)	113.4±21.5(25)*	55.1±16.7(23)**
DHA	-	20	133.2±19.1(23)	174.7±23.7(25)	111.2±20.4(23)
DHA	+	20	223.0±24.1(24)*	153.0±21.0(30)	120.0±22.6(26)**
DHA +	+	20			
D,L-PCA		500	213.8±30.2(20)	164.9±30.5(20)	208.5±26.2(20)**
D,L-PCA	+	500	22.4±23.4(27)*	194.4±24.2(26)**	164.2±30.8(20)**

DHA was administered at 24 hr and D,L-PCA was at 2 hr before ECS application, the figure in each parenthesis represents the number of animals, *p<0.05 and **p<0.01 vs. normal control group, *p<0.05 and **p<0.01 vs. ECS control group. (Mann-Whitney U-test)

10분, 30분에서 각각 42.9, 44.8, 20.0% 였으며, ECS실시대조군은 ECS 실시 후 5분, 10분, 30분에서 각각 25.0, 16.0, 4.3% 로 10분에서 정상대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며(p<0.05), DHA를 전처리한 후 ECS를 실시한 군은 동일 시간대에서 각각 62.5, 26.7, 23.1% 로 5분에서 ECS실시대조군에 비해 유의적으로 증가하였다(p<0.01)(Fig. 2). D,L-PCA를 전처리한 후 ECS를 실시한 군은 동일 시간대에서 각각 70.4, 53.8, 47.4%로 모든 시간대에서 ECS실시대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며(p<0.01), DHA 및 D,L-PCA를 병용투여한 후 ECS를 실시한 군은 동일 시간대에서 각각 70.0, 45.0, 60.0% 로 ECS실시대조군에 비해 5분(p<0.01), 10분(p<0.05), 30분(p<0.01)의 모든 시간대에 각각 유의적으로 증가하였으며 ECS 실시 후 30분에서 유의적인 증가를 나타냈다(p<0.05)(Fig. 2).

step through 수동회피반응 - step through 수동회피반응 측정장치로 지체시간을 측정한 결과를 Table III에 나타내었다.

정상대조군의 평균지체시간은 훈련시행 후 5분, 10분, 30분에서 각각 189.4, 165.5, 115.7초였으며, 정상동물에 DHA투여군은 동일 시간대에서 정상대조군에 비해 유의적인 영향을 미치지 않았다. ECS실시대조군은 ECS 실시 후 정상대조군에 비해 5분과 30분에서 각각 유의적으로 감소하였다(p<0.05). DHA를 전처리 후 ECS 실시군은 동일 시간대에서 각각 151.5, 137.0, 182.7 초로 ECS실시대조군에 비해 증가하였고 30분에서 유의적인 증가를 보였다 (p<0.01)(Fig. 3). D,L-PCA를 전처리 후 ECS 실시군은 ECS실시대조군에 비해 지체 시간이 유의적으로 증가하였으며(p<0.01). DHA 및 D,L-PCA를 병용투여 후 ECS 실시군은 ECS실시대조군에 비해 30분에서 지체 시간이 유의적

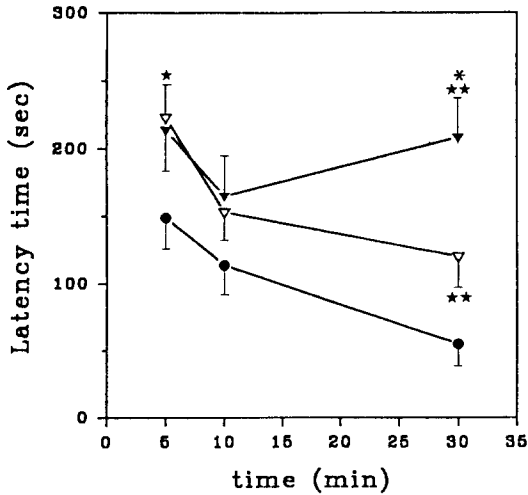


Fig. 1.—The effect of docosahexaenoic acid (DHA) and D,L-pyrogltutamic acid (D,L-PCA) on latency time of the ECS-induced mice at step down. Each value is expressed as mean \pm SEM of 20–30 animals. * p <0.05 vs. DHA treated group. * p <0.05 and ** p <0.01 vs. ECS control group (Mann-Whitney U-test). ●: ECS control group ▽: DHA 20 mg/kg treated group ▼: DHA 20 mg/kg and D,L-PCA 500 mg/kg treated group.

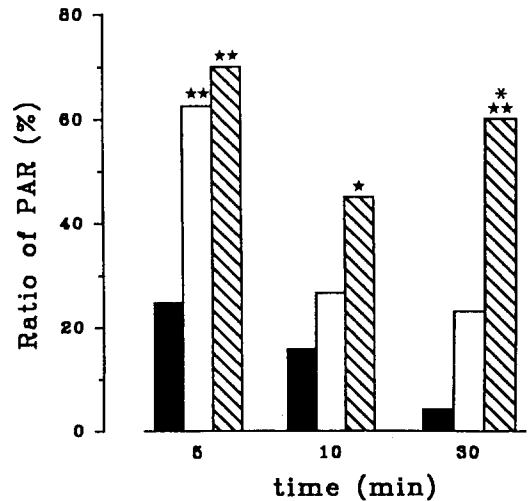


Fig. 2.—The effect of docosahexaenoic acid (DHA) and D,L-pyrogkutamic acid (D,L-PCA) on ratio of PAR of the ECS-induced mice at step down. Each value is expressed as percentage the number of animals staying on the platform more than 300 sec to the number of animals used. * p <0.05 vs. DHA treated group. * p <0.05 and ** p <0.01 vs. ECS control group. (Chi-Square test). ■: ECS control group, □: DHA 20 mg/kg treated group, ▨: DHA 20 mg/kg and D,L-PCA 500 mg/kg treated group.

로 증가하였다(p <0.01).

한편 사용동물수에 대한 300초이상 지체한 동물수의 비율을 비교했을 때 정상대조군은 훈련시행 후 5분, 10분, 30분에서 각각 46.2, 38.1, 17.6% 였으며, 정상동물에 DHA투여군은 정상대조군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았다. ECS실시대조군은 ECS실시 후 정상대조군에 비해 10분에서 유의적인 감소를 보였다(p <0.05). DHA를 전처리 후 ECS 실시군은 동일 시간대에서 각각 31.8, 36.0, 34.8% 로 ECS실시대조군에 비해 증가하였고, 10분과 30분에서 유의적으로 각각 증가하였다 (p <0.05)(Fig. 4). D,L-PCA 전처리 후 ECS실시군은 동일 시간대에서 각각 70.8, 60.0, 69.6%로 모든 시간대에서 ECS실시대조군에 비해 유의적인 증가를 나타냈다 (p <0.05). 또한 DHA 및 D,L-PCA를 병용투여한 후 ECS를 실시한 군은 동일시간대에서 각각 45.0, 40.9, 33.3%로 ECS실시대조군에 비해 10분과 30분에서 유의적으로 증가하였다(p <0.05).

acetylcholine의 함량에 미치는 영향—ECS를 실시하지 않은 정상동물 및 ECS를 실시한 동물의 대뇌피질에서 acetylcholine의 함량을 측정하여 DHA, D,L-

PCA 및 DHA와 D,L-PCA의 병용투여가 acetylcholine의 함량 변화에 미치는 영향을 검토하였고, 그 결과를 Table IV.에 나타내었다. 정상대조군의 acetylcholine의 함량은 21.8 nM/g tissue였고, ECS를 실시하지 않은 정상동물에 DHA를 투여한 군은 21.3 nM/g tissue로 정상대조군과 유사하였으며 DHA로 인한 acetylcholine의 함량 변화를 볼 수 없었다. ECS대조군은 ECS를 실시한 후 1분, 5분, 10분, 30분에서 각각 14.2, 17.4, 18.2, 19.9 nM/g tissue로 ECS 실시 후 1분에서 정상대조군에 비해 34.9% 유의적인 감소를 나타냈으며(p <0.05). 다른 시간대에서는 정상대조군에 비해 각각 20.2, 16.5, 8.7%감소하는 경향을 나타냈으나 통계적으로 유의성은 없었다. DHA를 전처리 후 ECS실시군은 acetylcholine의 함량이 ECS 실시 후 1분에서 ECS실시대조군에 비해 27.5%의 유의적인 증가를 했으며(p <0.05). 다른 시간대에서는 ECS실시대조군에 비해 증가하는 경향을 나타냈으나 ECS 실시에 의해 감소된 acetylcholine의 함량 변동에 유의적인 영향을 미치지 못했다. D,L-PCA 전처

Table III—The effect of docosahexaenoic acid (DHA) and D,L-pyroglutamic acid (D,L-PCA) on latency time of the ECS-induced mice at step through

Agents	ECS treatment	Dose (mg/kg.i.p.)	Latency time(sec. mean±SEM)		
			5	10	30(min)
normal	-	-	189.4±23.7(26)	165.5±28.1(21)	115.7±18.1(30)
CMC	+	-	122.4±22.1(30)*	109.4±19.4(27)	91.9±22.4(24)*
DHA	-	20	140.3±20.5(27)	212.8±26.6(21)	132.2±23.5(22)
DHA	+	20	151.5±24.3(22)	137.0±26.0(25)	182.7±20.8(23)**
DHA + D,L-PCA	+	20	159.2±30.3(20)	158.8±28.3(22)	159.9±27.9(21)**
D,L-PCA	+	500	219.6±25.4(24)**	195.1±26.8(25)**	229.9±24.4(23)**

DHA was administered at 24 hr and D,L-PCA was at 2 hr before ECS application, the figure in each parenthesis represents the number of animals, * p<0.05 vs. normal control group, **p<0.01 vs. ECS control group. (Mann-Whitney U-test)

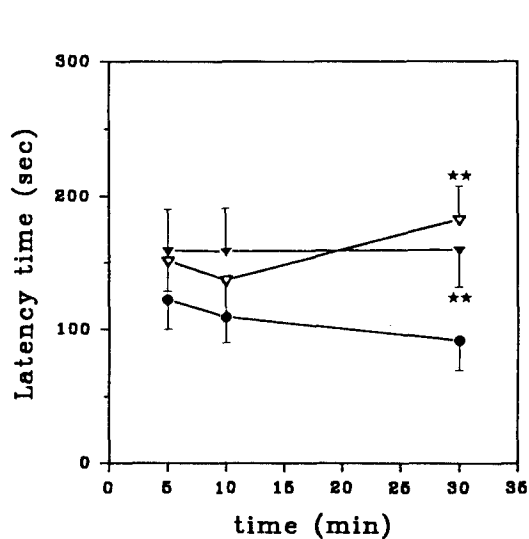


Fig. 3—The effect of docosahexaenoic acid (DHA) and D,L-pyroglutamic acid (D,L-PCA) on latency time of the ECS-induced mice at step through. Each value is expressed as mean±SEM of 20~30 animals. **p<0.01 vs. ECS control group (Mann-Whitney U-test), ●: ECS control group ▼: DHA 20 mg/kg treated group ▽: DHA 20 mg/kg and D,L-PCA 500 mg/kg treated group.

리 후 ECS실시군은 동일 시간대에서 acetylcholine의 함량이 각각 26.6, 26.3, 25.5, 28.0 nM/g tissue로서 1분, 5분, 10분, 30분의 모든 시간대에서 ECS실시로 인한 acetylcholine의 함량 감소에 대해 각각 87.3%, 51.1%(p<0.01), 40.1%(p<0.05), 40.7%(p<0.01)의 유의적인 증가를 나타냈다. DHA 및 D,L-PCA를 병용투여한 후 ECS를 실시한 군은 1분, 5분, 30분에서 ECS실시대조군에 비해 각각 79.6%(p<0.01), 43.1%

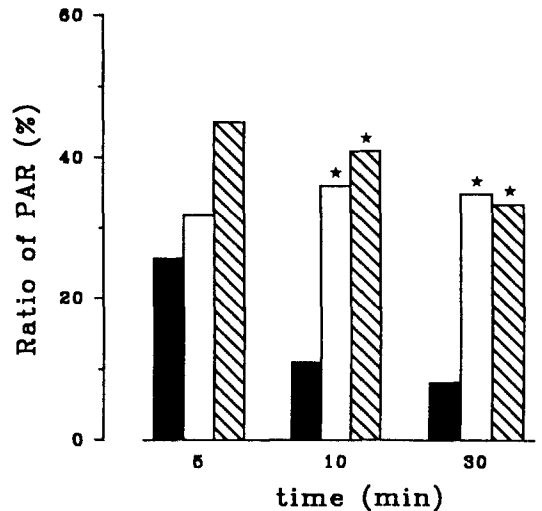


Fig. 4—The effect of docosahexaenoic acid (DHA) and D,L-pyroglutamic acid (D,L-PCA) on ratio of PAR of the ECS-induced mice at step through. Each value is expressed as percentage the number of animals staying on the light compartment more than 300 sec. to the number of animals used, *p<0.05 vs. ECS control group. (Chi-Square test), ■: ECS control group □: DHA 20 mg/kg treated group ▨: DHA 20 mg/kg and D,L-PCA 500 mg/kg treated group.

(p<0.05), 33.7%(p<0.01)의 유의적인 증가를 보였다.

choline 함량에 미치는 영향—ECS를 실시하지 않은 정상동물 및 ECS를 실시한 동물의 대뇌피질에서 choline의 함량을 측정하여 DHA, D,L-PCA 및 DHA와 D,L-PCA의 병용투여가 choline의 함량 변화에 미치는 영향을 검토하였고, 그 결과를 Table V에 나타내었다.

Table IV—The effect of docosahexaenoic acid (DHA) and D,L-pyroglutamic acid (D,L-PCA) on acetylcholine (Ach) contents in cerebral cortex of the ECS-induced mice

Agents	ECS	Ach contents (nM/g tissue)			
		1	5	10	30(min)
normal	-			21.8±2.3	
CMC	+	14.2±0.7*	17.4±2.2	18.2±2.5	19.9±1.3
DHA	-			21.3±2.0	
DHA	+	18.1±1.2*	21.5±1.1	20.0±1.5	21.2±1.4
DHA + D,L-PCA	+	25.5±2.0**	24.9±1.9*	24.2±1.4	26.6±1.3**
D,L-PCA	+	26.6±1.0**	26.3±1.3**	25.5±1.6*	28.0±0.7**

DHA (20 mg/kg.i.p.) was administered at 24 hr and D,L-PCA (500mg/kg. i.p.) was at 2 hr before ECS application. Each value is expressed as mean±SEM of 6 experiments, *p<0.05 vs. normal control group, *p<0.05 and **p<0.01 vs. ECS control group. (Student's t-test)

Table V—The effect of docosahexaenoic acid (DHA) and D,L-pyroglutamic acid (D,L-PCA) on choline (Ch) contents in cerebral cortex of the ECS-induced mice

Agents	ECS	Ch contents (nM/g tissue)			
		1	5	10	30 (min)
normal	-			503.9±24.5	
CMC	+	129.7±15.4**	258.1±40.3	260.7±36.6	287.3±20.6
DHA	-			265.6±20.8	
DHA	+	153.0±10.5	237.7±30.6	265.0±7.2	310.4±38.0
DHA + D,L-PCA	+	336.5±35.5**	380.1±19.9*	374.7±28.0*	405.1±34.2*
D,L-PCA	+	213.8±18.7**	407.4±26.3*	396.4±30.9*	414.1±28.6**

DHA (20 mg/kg. i.p.) was administered at 24 hr and D,L-PCA(500 mg/kg. i.p.) was at 2 hr before ECS application. Each value is expressed as mean±SEM of 6 experiments, **p<0.01 vs. normal control group, *p<0.05 and **p<0.01 vs. ECS control group.(Student's t-test)

ECS실시대조군의 choline 함량은 ECS실시 후 1분, 5분, 10분, 30분에서 각각 129.7, 258.1, 260.7, 287.3 nM/g tissue로서 302.9 nM/g tissue인 정상대조군에 비해 각각 57.2, 14.8, 13.9, 5.2%로 감소하는 경향을 나타냈으며, ECS실시 후 1분에서 유의적으로 감소하였다(p<0.01). 정상동물에 DHA를 투여한 군의 choline 함량은 265.6 nM/g tissue로 정상대조군에 대해 유의적인 영향을 미치지 않았다. DHA를 전처리한 후 ECS를 실시한 군에서는 동일 시간대에서 ECS에 의해 감소된 choline 함량에 영향을 미치지 못했다. D,L-PCA를 전처리한 후 ECS를 실시한 군은 ECS실시대조군에 비해 모든 시간대에서 유의적으로 증가하였고, DHA 및 D,L-PCA를 병용투여 후 ECS 실시군은 동일 시간대에서 각각 336.5, 380.1, 374.7, 405.1 nM/g tissue로 ECS실시대조군에 비해 각각 159.4%(p<0.01), 47.3%, 43.7%, 41.0%(p<0.05)의 유의적인 증가를 나타냈다.

Choline 효능성 신경계는 학습 및 기억과 많은 관련이 있으며, 기억력 손상에 있어서 choline성 물질이 중요한 역할을 한다는 것이 행동실험을 통해 밝혀진 바 있으며, Deutsch등의 실험에서도 기억의 저장에 cholinergic synapse가 핵심적인 역할을 한다고 보고하였다.²²⁾ 또한 scopolamine과 같은 anticholinergic drug에 의해 기억력 손상을 일으킬 수 있는데, 이는 acetylcholine이 학습 및 기억능력에 직접적으로 관여함을 시사한다. 그 외에 저산소증, electroconvulsive shock (ECS), 허혈 등에 의해 acetylcholine의 함량이 감소되며, 기억력 감퇴를 유발한다.^{9,23)}

ECS에 의해서는 acetylcholine성 신경계의 손상 뿐 아니라, GABA성, adrenaline성, serotonin성 신경계에도 영향을 미치며, 뇌 glucose 대사를 증가시키고, 뇌에서 glycolysis속도가 산소의 소비속도를 초과하여 lactic acid의 축적을 유발한다.²⁴⁾ 혈압과 뇌혈류량을 증가시키고, 흥분성 신경 전달물질에 영향을 미치며 막 투과도를 변화시키고 mitochondria의 산화적 인산화에도 손상을 주게된다고 알려져 있다.²⁵⁾

고 찰

Choline효능성 신경계에 작용하는 지적 능력 향상 약물로는 piracetam, oxiracetam, aniracetam, pyroglutamic acid, tenilsetam, pramiracetam과 같은 pyrrolidone유도체⁹⁾ vinopocetine, naloxon, e-biratide (Hoe 427)과 같은 이중화학구조 약물, phosphatidylserine과 같은 인지질이 알려져 있다.²⁵⁾ 약물들은 뇌 acetylcholine 형성을 자극하거나 acetylcholine의 방출을 용이하게 하며, 특히 phosphatidylserine은 cholinergic neuron을 자극하며 성숙한 흰 쥐에서 광범위한 phosphatidylserine이 대뇌의 acetylcholine의 방출을 향상시킨다는 보고가 있다.²⁶⁾ 또 이 약물들이 muscarinic receptor의 수를 증가시킨다는 주장도 있으나, 이 부분에서는 더 많은 연구가 필요하다고 본다.

본 실험에서는 ECS를 실시하지 않은 실험군과 ECS 실시군에 있어서 수동회피반응을 통한 학습 및 기억 능력, 대뇌피질의 acetylcholine 및 choline함량의 변화에 docosahexaenoic acid(DHA)투여가 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다.

수동회피반응에서는 ECS실시가 정상대조군에 비해 학습 및 기억 능력 저하를 유도하였으며, 대뇌피질 acetylcholine 및 choline함량을 측정했을 때, ECS실시 후 1분에서 유의적으로 감소했으며, ECS실시 후 5분에서 다시 증가하기 시작하여 30분까지 정상대조군의 함량 수준으로 유지되었다. 이 결과는 Longoni and Pepeu²⁷⁾ 및 Spignoli and Pepeu⁹⁾의 실험 결과와 일치하였다. ECS가 Adams, Hoblit and Sutker²⁸⁾이 주장한 뇌 acetylcholinesterase의 활성 증가와 Essman²⁹⁾에 의해 밝혀진 choline acetyltransferase활성을 감소하였다는 보고로 미루어 ECS실시가 choline효능성 신경계에 영향을 미쳤다고 생각된다. 그러나 ECS실시 후 5분에 대뇌피질 acetylcholine 및 choline함량이 거의 정상대조군의 함량 수준으로 증가한 것에 반해 학습 및 기억 능력 저하가 유도된 것을 볼 때, 대뇌피질 외의 다른조직에서의 acetylcholine함량이 영향을 미쳤으리라 생각되며, Spignoli and Pepeu⁹⁾의 실험에서 대뇌피질 외에 해마의 acetylcholine함량이 ECS실시 후 1분뿐 아니라 30분에서도 정상대조군에 비해 유의적으로 감소했다는 보고가 있다. 이 결과를 볼 때, 대뇌피질 acetylcholine함량은 정상 수준으로 증가했으나 해마의 acetylcholine함량 감소가 학습 및 기억 능력 저하에 기여했을 것이라고 사료된다.

24시간 전에 복강내투여한 DHA는 정상동물에 대해서는 학습 및 기억 능력에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, ECS에 의한 학습 및 기억 능력 저하에 대해서는 유의적으로 개선시켰으며, step down 및 step through 수동회피반응 모두에서 ECS 실시 후 5분, 10분에서보다 30분에서 현저한 효과를 나타냈다. DHA 및 D,L-PCA의 병용투여군은 ECS실시대조군에 비해 유의적인 기억력 증가를 보였으며, ECS로 인한 학습 및 기억 능력 저하에 대한 DHA의 방어작용을 증가시켰음을 알 수 있다. DHA는 acetylcholine 및 choline함량에 있어서 정상동물에 대해서는 유의적인 영향을 미치지 않았으나, ECS실시 후 1분에서의 acetylcholine함량 감소를 유의적으로 개선했으며, 동일 시간대의 choline의 함량 감소에 대해서는 개선 효과를 나타내지 못했다. DHA 및 D,L-PCA의 병용투여가 ECS에 의한 1분 후의 acetylcholine 및 choline함량 감소에 대한 DHA의 방어작용을 더욱 증가시켰으며, 정상 대조군보다 더 높은 Ach 및 choline함량을 나타냈다.

이러한 결과에 의해 DHA투여가 ECS의 학습 및 기억 능력 저하와 대뇌피질 acetylcholine 및 choline함량 저하에 대해 방어작용을 했음을 알 수 있다. Corey등²⁸⁾은 ω -3 지방산이 arachidonic acid (AA ω -6)의 cyclooxygenase대사를 감소시킨다고 하였고, 따라서, DHA는 leukotriene(LT)생합성에 대해서는 영향이 없으나 AA가 prostaglandins(PGs)로 변환되는 과정에서 강한 상경적 억제제로 작용한다고 보고하였다. 또한 ω -3 지방산 투여시 뇌 조직의 인지질이 AA는 ω -3 지방산으로 치환되어 AA대사를 감소시킨다고 알려져 있고, 어유 장기투여하면 뇌 중의 eicosapentaenoic acid(EPA)양이 AA대신 현저히 증가한다고 보고되어 있다.²⁹⁾ 3일령의 마우스에 동위원소로 표식된 C¹⁴-DHA를 복강내 투여했을 때 C¹⁴-DHA가 투여 후 24시간에서 72시간 동안에 뇌와 망막의 인지질에서 거의 90%발견되었다는 보고도 있다.³⁰⁾

AA는 cyclooxygenase에 의해 여러가지 생리활성을 나타내는 PG로 대사되는데, 이 PG가 발열, 신경전달 및 뇌혈류량 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 뇌혈류량 측면에서 볼 때, PGI₂, PGE₂, PGD₂는 혈관 이완 작용이 있고 반면에 PGF₂, thromboxane A₂ (TXA₂)는 혈관 수축 작용을 유발하며, 뇌 순환 장애를 일으킨다.³¹⁾

또한 흰쥐 뇌 synaptosomal membrane에서 음식

물로 섭취한 lipid가 acetylcholinesterase활성과 같은 lipid의존성 기능의 생리동력학적 성질에 영향을 미친다고 하였다.³²⁾

따라서 DHA는 뇌 조직 및 혈관에서 AA와 일부 전환하여 ECS로 인해 과잉으로 유입되는 AA, 그의 cyclooxygenase생성물인 PGs 및 그 대사물인 thromboxane A₂등에 의하여 악화된 뇌 미세순환 장애를 방어하며, 뇌 세포막 인지질로의 유입으로 세포막을 안정화시키고 choline효능성 신경계를 활성화함으로써 ECS로 인한 학습 및 기억 능력 저하와 acetylcholine 함량 감소를 방어하리라 생각한다.

결 론

Electroconvulsive shock (ECS)로 인한 학습 및 기억 능력 손상과 대뇌피질에서의 acetylcholine 및 choline의 함량 변화를 측정하고 이에 대한 DHA의 효과를 검토하여 다음과같은 결론을 얻었다.

수동 회피 반응을 통해 측정한 마우스의 학습 및 기억 능력은 ECS실시로 유의성있게 저하하였고 대뇌 피질 acetylcholine 및 choline함량도 감소하였다. ECS 실시 24시간 전에 투여된 DHA는 학습 및 기억능력 저하 및 뇌 acetylcholine함량 감소를 방어하였다.

DHA와 D,L-PCA 병용 투여시는 ECS로 인한 뇌 기능 장애와 acetylcholine 함량 감소에 대한 DHA의 효과를 더욱 증대시키는 협조 작용을 나타냈다.

그러나, DHA는 ECS를 실시하지 않은 정상 동물의 학습 및 기억 능력과 뇌 acetylcholine 및 choline함량에는 영향을 미치지 못하였다.

이상의 결과로 DHA는 ECS로 나타난 뇌기능 장애 마우스의 학습 및 기억 등 지적능력 장애를 방어하며 뇌 choline효능성 신경계에 영향을 미친다고 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 이화 여자 대학교 교내 이화 연구비 지원에 의해 이루어 졌으며, 이에 진심으로 감사드립니다.

문 헌

1) Holbrook P.G. and Wurtman R.J. : Calcium-dependent incorporation of choline into phosphatidylcholine (PC) by baseexchange in rat brain membranes occurs preferentially

with phospholipid substrates containing docosahexaenoic acid (22:6 (n-6)). *Biochimica et Biophysica Acta.* **1046**, 185-188, (1990).

- 2) Sinclair A.J. and Crawford M.A. : The accumulation of arachidonate and docosahexaenoate in the developing rat brain. *J. Neurochem.* **19**, 1753-1758, (1972).
- 3) Breckenridge W.C., Gombos G., and Morgan I. G. : The lipid composition of adult rat brain synaptosomal membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.* **266**, 695-707, (1972).
- 4) Neuringer M., Connor W.E., Lin D.S., Barstad L. and Luck S. : Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal ω -3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 4021-4025 (1986).
- 5) Neuringer M. and Connor W.E. : n-3 Fatty acids in the brain and retina : Evidence for their essentiality. *Nutrition Review* **44**, 285-294, (1986).
- 6) Scott B.L. and Bazan N.G. : Membrane docosahexaenate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 2903-2907, (1989).
- 7) Lamptey M.S. and Walker B.L. : A possible essential role for dietary linolenic acid in the development of the young rat. *J. Nutr.* **106**, 86-93, (1976).
- 8) Yamamoto N., Saitoh M., Moriuchi A. and Nomura M. : Effect of dietary α -linolenate/linoleate balance on brain lipid compositions and learning ability of rats. *J. Lipid Res.* **28**, 144-151, (1987).
- 9) Spignoli G. and Pepeu G. : Oxiracetam prevents electroshock-induced decrease in brain acetylcholine and amnesia. *Eur. J. Pharmacol.* **126**, 253-257, (1986).
- 10) Lerer B. : Stanley M., Demetriou S. and Gershon S. Effect of electroconvulsive shock on muscarinic cholinergic receptors in rat cerebral cortex and hippocampus. *J. Neurochem.* **41**, 1680-1683, (1983).
- 11) Lerer B., Stanley M., McIntyre I. and Altman H. : Electroconvulsive shock and brain mus-

- carinic receptors : Relationship to anterograde amnesia. *Life Sciences*. **35**, 2659-2664. (1984).
- 12) Bazan N.G. : Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta*. **218**, 1-10. (1970).
 - 13) Lysz T.W., Centra M., Markey K. and Keeting P.E. : Evidence for increased activity of mouse brain fatty acid cyclooxygenase following drug-induced convulsions. *Brain Research* **408**, 6-12. (1987).
 - 14) Kontos H.A., Wei E.P., Ellis E.F., Dietrich D. and Povlishock J.T. : Prostaglandins in physiological and in certain pathological responses of the cerebral circulation. *Federation Proc.* **40**, 2326-2330. (1981).
 - 15) Chan P.H., Yurko M. and Fishman R.A. : Phospholipid degradation and cellular edema induced by free radicals in brain cortical slices. *J. Neurochem.* **38**, 525-531. (1982).
 - 16) Antonelli T., Carla V., Lambertini L., Moroni F. and Bianchi C. : Pyroglutamic acid administration modifies the electrocorticogram and increases the release of acetylcholine and GABA from the guinea pig cerebral cortex. *Pharmacological Research Communications* **16**, 189-197. (1984).
 - 17) Spignoli G., Magnani M., Giovannini M.G. and Pepeu G. : Effect of pyroglutamic acid stereoisomers on ECS and scopolamine-induced memory disruption and brain acetylcholine levels in the rat. *Pharmacological Research Communications* **19**, 901-912. (1987).
 - 18) Chorover S.L. and Schiller P.H. : Short term retrograde amnesia in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **59**, 73-78. (1965).
 - 19) Paalzow L. : An electrical method for estimation of anticonvulsant acting in mice. Part 1. Methodological investigations. *Acta Pharmac. Suecica*. **6**, 163-176. (1969).
 - 20) Yun H.J., Shin J.H., Choi H.J. and Yun J.S. : Effect of ginseng saponins on neurotransmitter system damage in carbon monoxide and aging rats. *Yakhak Hoeji* **36**, 56-65. (1992).
 - 21) Maruyama Y., Kusaka M., Mori J., Horikawa A. and Hasegawa Y. : Simple method for the determination of choline and acetylcholine by pyrolysis gas chromatography. *J. Chromatography* **164**, 121-127. (1979).
 - 22) Drachman D.A., Leavitt J., Chicago M.A. Human memory and the cholinergic system. *Arch. Neurol.* **30**, 113-121. (1974).
 - 23) Gibson G.E. and Duffy T.E. : Impaired Synthesis of acetylcholine by mild hypoxic hypoxia or nitrous oxide. *J. Neurochem.* **36**, 28-33. (1981).
 - 24) Chapman A.G., Meldrun B.S. and Siesio B.K. : Cerebral metabolic changes during prolonged epileptic seizures in rats. *J. Neurochem.* **28**, 1025-1035. (1977).
 - 25) Zanotti A., Balzelli L. and Toffano G. : Reversal of scopolamine-induced amnesia by phosphatidylserine in rats. *Psychopharmacology* **90**, 274-275. (1986).
 - 26) Casamenti F., Mantovani P., Amaducci L. and Pepeu G. : Effect of phosphatidylserine on acetylcholine output from the cerebral cortex of the rat. *J. Neurochem.* **32**, 529-533. (1979).
 - 27) Longoni R., Mulas A., Novak B.O., Pepeu I. M. and Pepeu G. : Effect of single repeated electroshock applications on brain acetylcholine levels and choline acetyltransferase activity in the rat. *Neuropharmacology* **15**, 283-286. (1976).
 - 28) Corey E.J., Shin C. and Cashman J.R. : Docosahexaenoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotriene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 3581-3584. (1983).
 - 29) Galli C., Trzeciak H.I. and Paoletti R. : Effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of brain ethanolamine phosphoglyceride : Reciprocal replacement of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*. **248**, 449-454. (1971).
 - 30) Bazan N.G. and Scott B.L. : Dietary ω -3 fatty acids and accumulation of docosahexaenoic acid in rod photoreceptor cells of the

- retina and at synapses. *Upsala J. Med. Sci, Suppl.* **48**, 97-107, (1990).
- 31) Ellis E.F., Nies A.C. and Oates J.A. : Cerebral arterial smooth muscle constraction by TXA_2 . *Stroke* **8**, 480-483, (1977).
- 32) Foot M., Cruz F.T. and Clandinin M.T. : Influence of dietary fat on the lipid composition of rat brain synaptosomal and microsomal membrane. *Boichem. J.* **208**, 631-640, (1982).
- 33) Burton L. S. and Nicolas G. B. : Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 2903-2907, (1989).