

흰쥐에서 삼투개열법에 의한 ^{99m}Tc -Diethylene Triamine Pentaacetic Acid 및 페니토인의 뇌로의 송달

황만용* · 박경호** · 이민화****

*제일제당 종합연구소, **서울대학교병원 약재부, ***서울대학교 약학대학

(Received February 7, 1998)

Brain Delivery of ^{99m}Tc -Diethylene Triamine Pentaacetic Acid and Phenytoin by Transient Osmotic Opening Method in Rats

Man Yong Hwang*, Kyoung Ho Park** and Min Hwa Lee****

*Department of Pharmacology, CheilJedang R&D center, Ichon-si 467-810, Korea

**Department of Pharmacy, Seoul National University Hospital, Seoul 110-744, Korea

***College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 152-742, Korea

Abstract—The blood-brain barrier (BBB) of rats was modulated opening reversibly by infusing a hyperosmotic solution of arabinose (1.6 molal) into the right external carotid artery. Previous studies demonstrated that permeability was increased maximally in the first 15 min and remained slightly elevated at 1 hr. As control reference, saline was used. In the present study, to evaluate the effects of osmotic BBB opening on the BBB transport according to hydrophilic or hydrophobic characteristics of drugs. And the differences of the uptakes of these compounds to right (treated osmotic opening) and left (untreated) hemispheres in same rats were compared each other following injection of 8 mCi per rat of ^{99m}Tc -diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) as hydrophilic drug or 5 mg/kg of phenytoin as hydrophobic drug into the right external carotid artery of rats between two groups (1.6 molal arabinose vs saline). The uptakes of ^{99m}Tc -DTPA and phenytoin in the right cerebral hemispheres were increased to about thirty three times and twice rather than those in the left cerebral hemispheres, respectively. And PAs (permeability \times capillary surface area) were also increased from a control mean of 2.11×10^{-4} (untreated) to $6.98 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ (treated osmotic opening) for ^{99m}Tc -DTPA and 0.29 to 0.17 sec^{-1} for phenytoin, respectively. From the results of present study, it is noted that osmotic opening of BBB is more effective on the brain delivery of hydrophilic drugs rather than that of hydrophobic drugs.

Keywords □ Blood-brain barrier, Osmotic opening, Permeability, Phenytoin, ^{99m}Tc -DTPA, Arabinose, Hyperosmotic solution.

인간의 수명이 길어질수록 노인성 질환이 사회적 문제로 부각되며, 이 중에서 특히 뇌질환의 일종인 알츠하이머(Alzheimer's disease)병은 미국의 경우 약 4백만명 정도가 고통을 겪고 있으며, 또한 연간 50억불의 치료비용이 소요되고 있는 것으로 나타나고 있다. 그러나 이러한 각종 뇌질환의 치료제로 응용될 가능성이 있

는 단백질이나 펩타이드 물질들을 임상적으로 쉽게 이용할 수 없는 것은 혈액-뇌관문(blood-brain barrier, BBB라 표시함)이라는 뇌모세혈관 내피세포가 뇌를 보호하고 있기 때문이다. 즉, BBB는 내피세포로 구성되어 있으며, 다른 장기와 달리 매우 견고하게 접합되어 있고, fenestra가 없으며, pinocytosis도 매우 적어, 약물의 투과에 있어 장벽역할을 하고 있다. 또한 BBB를 구성하는 내피세포의 세포질에는 모노아민옥시라제(MAO)등의 약물대사 효소가 고농도로 존재하여, 물리

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7870 (팩스) 02-888-0649

적 장벽 기능뿐만 아니라, 효소적 장벽으로써의 기능도 가지고 있다. 그리고 BBB에는 미토콘드리아 수가 많고, 높은 전기적 저항이 관찰되어 이온 물질들은 투과성이 낮다.¹⁻³⁾

일반 약물들의 뇌로의 이행성을 지배하는 인자중 가장 중요한 것은 약물의 친유성이다. 분자량이 작은 약물의 경우는 BBB에 대한 투과성과 친유성 사이에는 일반적으로 양호한 상관관계가 있음이 인정되고 있으나, 약물의 분자량이 어느 정도 큰 경우에는 친유성에 관계없이 투과성이 나빠진다. 예를 들면, 분자량이 400까지는 친유성과 BBB 투과성 간에 상관성이 있지만, 분자량이 700 이상에서는 친유성과 관계없이 뇌로의 이행성이 나빠지는 것으로 보고되어 있다.^{2,4-6)} BBB의 역할은 이로부터 뇌를 보호하는 것이지만, 뇌기능에 있어 필요한 영양물질에 대해서는 모세혈관벽에 특수 수송계가 존재하여 선택적으로 이것들을 취하고 있다. 또, BBB에는 인슐린 등의 펩타이드류에 대한 수송계가 존재하는 것도 확인되어졌다. 한편 맥락층에는 각종 유기 양이온 및 유기 음이온류를 뇌척수액에서 혈액중으로 내보내는 능동적 수송기구가 있고, 신장에 있는 수송계와의 공통성이 확인되었다.⁷⁾

이러한 BBB의 특성을 고려하여 뇌질환 치료제들을 뇌조직 속으로 이행시키기 위한 많은 노력들이 진행되어 왔으며, 이 중에서 특이적 생체반응을 이용하여 BBB의 투과성을 증가시키는 방법으로 hypertension, freezing 및 trauma 등을 이용하는 방법들이 소개되어 있다. 그러나 이 방법들은 비가역적 뇌손상과 뇌종양을 유발시킬 수 있는 단점을 안고 있다.⁸⁾ 또한 삼투개열(osmotic opening)도 특이적 생체반응을 이용한 방법으로,⁸⁻⁹⁾ 이것은 경동맥으로 우레아, 만니톨, 아라비노스 및 락타마이드 등의 수용성 용질의 고장액을 주입하면 뇌혈관의 내피세포들이 수축하여 tight junctions이 분리되어,⁷⁻¹¹⁾ BBB의 투과성이 상승되는데 이때 펩타이드 및 항암제를 송달시키는 방법이다. 이 방법은 처치 후 일정한 시간이 경과되면 원래의 BBB 모습으로 원상회복 되지만,¹¹⁾ 높은 침투압이 작용하고 있는 동안은 목적으로 하는 약물 이외의 물질에 대한 투과성도 상승하며, 뇌파이상 및 경련 등과 같은 부작용도 많아 실용화에는 아직도 극복해야 할 문제점들이 많기 때문에 앞으로 계속 연구되어야 할 분야로 생각된다.¹²⁻¹³⁾

따라서 본 연구에서는 삼투개열법에 의한 BBB의 투과성 향진이 수용성 약물 및 지용성 약물의 경우에 있어

어떻게 영향을 미치는지 비교 관찰하기 위해, 수용성 약물은 BBB 투과가 매우 낮은 ^{99m}Tc -diethylene triamine pentaacetic acid(DTPA)를, 그리고 지용성 약물은 중추신경계에 작용하는 페니토인을 각각 선정하여 BBB 삼투개열이 이들 약물의 BBB 투과에 미치는 영향을 비교·평가하고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기 - ^{99m}Tc -DTPA는 수용성이며, 무색 투명한 액체로서 반감기가 6시간인 감마 방사선을 내는 방사선 진단시약으로 뇌 및 신장 스캔(scan)에 이용되며, 미국 Sigma사의 것을, ^{99m}Tc -알부민 및 L-(+)-아라비노스도 Sigma사 것을 구입하여 사용하였으며, 소듐 펜토바르비탈은 동아제약에서, 페니토인은 삼진 제약에서 제공받아 사용하였으며, 그외의 시약은 특급 또는 일급을 사용하였다. 기기로는 자가방사기록계(Digital Autoradiographic System, RAS-R1000 Analysis system, Amersham), 등속주입 펌프(Infusion/Withdrawal Pump, Harvard apparatus), 현상필름(Hyperfilm B-max, Amersham), 감마신틸레이션카운터(Multi-Prias, Packard), cryostat microtome(Reichert Histostat, Reichert), 냉장고(Deep Freezer, REVCO), 초원심분리기(Microcentrifuge 1236, National Labnet Co., U.S.A), 조직분쇄기(Ika-Ultra-Turrax T25, Janke&Kunkel, Ika-Labortechnik, W-Germany) 및 HPLC 시스템(Shimadzu, Japan) 등을 사용하였다.

BBB의 삼투개열 방법 - 서울대학교 실험동물 사육장에서 분양받은 웅성 Wistar계 흰쥐를 KGLP 규정에 적합한 환경에서 사육하여 사용하였으며, 실험 수행시 흰쥐의 체중은 300~350 g 이었다. BBB 삼투개열시 먼저 체중(kg)당 50 mg의 소듐 펜토바르비탈을 흰쥐의 복강에 주사하여 마취시킨 후 고정대에 묶고 우측 외경동맥(right external carotid artery)을 박리하여 헤파린이 들어 있는 생리식염수(100 IU/ml)로 채워진 폴리에틸렌관(PE-50, 내경 0.58 mm, 외경 0.97 mm)을 총경동맥(common carotid artery)의 분지점으로부터 1~2 mm 전까지 혈류의 역방향으로 삽입하였다. 이때 삼투개열의 수술방법은 기본적으로 Takasato 등¹⁵⁾의 방법을 이용하였으나 총경동맥은 절찰하지 않았다. 그러나 우측 익돌구개(ptyergopalatine) 동맥은

Takasato 등의 방법과 같이 결찰하였다. 그리고 우측 외경동맥(right external carotid artery)에 연결된 폴리에틸렌관으로 미리 조제해둔 1.6 molal L-(+)-아라비노스 고장액(37°C)을 등속주입 펌프를 사용하여 0.12 ml/sec의 일정한 속도로 30초 동안 등속주입 함으로써, 삼투압에 의한 뇌모세혈관의 위축을 유도하여 BBB를 개열하였다.

뇌조직 중의 혈액부피 측정 - 뇌조직을 절편하여 그 속의 약물농도를 측정하면, 실제로 측정되는 약물량은 뇌실질조직중 약물 뿐아니라, 뇌조직 중의 뇌혈관에 존재하는 약물도 포함되기 때문에, 뇌실질조직중 약물만을 측정하고자 하면, 총 조직중 약물량에서 혈관내에 존재하는 약물량을 빼주는 방법으로 보정해주어야 한다. 따라서 뇌조직 중의 혈관내에 존재하는 약물량을 구하기 위해서는 먼저 ^{99m}Tc -알부민과 같은 혈관투과성이 없는 물질을 대퇴정맥으로 주사하여 뇌조직 중의 혈액부피 및 혈액중 농도를 측정해야 한다. BBB를 삼투개열한 다음 5분 후에 ^{99m}Tc -알부민을 대퇴정맥으로 주사하고, 주사후 2분 후에 동맥혈 50 μl 를 에펜도르프 튜브에 채혈했다. 그 다음 즉시 단두하고 뇌를 제거하여 그린 튜브에 옮기고, 감마신틸레이션카운터를 이용하여 방사활성을 측정했으며, 다음 (1)식으로 뇌조직중 혈관내 혈액부피를 구했다

$$V_b = \frac{C_{\text{brain}}}{C_{\text{blood}}} \quad (1)$$

여기서 V_b 는 뇌조직중 혈액부피(ml/g)이고, C_{brain} 은 뇌조직중 ^{99m}Tc -알부민의 농도(cpm/g)이고, C_{blood} 은 혈액중 ^{99m}Tc -알부민의 농도(cpm/ml)이다.

정맥투여법에 의한 BBB의 약물투과 평가 - 삼투개열 물질 투여에 의한 BBB 개열을 평가하기 위해 뇌로 잘 송달되지 않는 수용성 약물인 ^{99m}Tc -DTPA와 지용성 약물인 페니토인을 선정하여 정맥투여법으로 삼투개열법에 의한 뇌로의 약물송달 정도를 검토하였다. 삼투개열한 다음 5분 후에 ^{99m}Tc -DTPA(용량: 8 mCi/흰 쥐) 혹은 페니토인(용량: 5 mg/kg)을 대퇴정맥으로 투여하였으며, 채혈은 대퇴동맥으로부터 약물 투여전 및 투여후 10, 30초, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 7 및 10분 간격으로 해파린이 처리된 에펜도르프 튜브에 취한 다음, 즉시 원심분리하여 일정량의 혈장을 취하고, 10분대에서는 전혈을 따로 취했다. 샘플링이 끝나자마자 바로 단두하여 뇌를 적출하고 약물농도 분석때까지 -70°C 냉동고

에 보관하였다. 혈장, 혈액 및 뇌조직 중의 ^{99m}Tc -DTPA농도는 감마신틸레이션카운터로 측정하였으며, 페니토인의 농도는 HPLC를 이용하여 정량하였다. 그리고 뇌실질조직중 약물농도는 (2)식에 의해 구하였는데, 뇌조직중 총약물 농도에서 뇌조직중의 혈관에 존재하는 약물농도를 제거하여 구하였다.

$$C_b = C_t - C_{\text{IR}} \quad (2)$$

여기서 C_b 는 뇌실질조직중 ^{99m}Tc -DTPA(cpm/g) 혹은 페니토인($\mu\text{g/g}$)의 농도이고, C_t 는 뇌조직중의 ^{99m}Tc -DTPA(cpm/g) 혹은 페니토인($\mu\text{g/g}$)의 총농도이고, C_{IR} 는 뇌조직중에서 혈관내에 존재하는 ^{99m}Tc -DTPA(cpm/g) 혹은 페니토인($\mu\text{g/g}$) 농도로 조직내 혈관중에 존재하는 약물의 총량 (혈액의 부피(ml/g) × 전혈중 농도(cpm/ml or $\mu\text{g/ml}$))을 해당 뇌조직 중량으로 나누워 구한 값이다. 또한 BBB의 투과 정도는 투과도를 계산하여 평가하였으며, 계산방법은 (3)식을 이용하였다.⁸⁾

$$\begin{aligned} \text{PA}(\text{sec}^{-1}) &= P(\text{cm/sec}) \times A(\text{cm}^{-1} \text{ or } 240 \text{ cm}^2/\text{g brain} \\ &\quad \text{in the rat}) \\ &= \frac{C_b}{f_p \times \text{AUC}(T)} \quad (3) \end{aligned}$$

여기서 P는 뇌혈관 투과도(cm/sec)이고, A는 모세혈관의 표면적(cm^{-1} or $240 \text{ cm}^2/\text{g}$ 흰쥐뇌)이며, f_p 는 ^{99m}Tc -DTPA의 단백질결합형 분율(0.96) 또는 페니토인의 단백질결합형 분율(0.15)이고, T는 도살시킨 시간을 의미한다.

혈장, 혈액 및 뇌조직 중의 ^{99m}Tc -DTPA의 농도 측정 - 전혈과 혈장 20 μl 씩을 그린튜브에 담아 감마신틸레이션카운터로 ^{99m}Tc -DTPA의 농도를 측정하였다. 또한 적출한 뇌는 먼저 액체질소에 담근 다음 -70°C 냉장고에 보관하였다가, 필요로 하는 부위를 취해 이미 무게를 알고 있는 그린 튜브에 넣어 감마신틸레이션카운터로 측정 한 다음 뇌조직이 포함된 그린 튜브 무게를 다시 측정하여 조직의 무게를 알아내는 방법으로 뇌조직중 ^{99m}Tc -DTPA의 농도를 측정하였다. 이때 분리한 뇌조직은 후각구신경(olfactory bulb), 미상핵(caudate nucleus), 해마(hippocampus), 전두엽(frontal lobe), 후두엽(occipital lobe), 시상(thalamus), 시상하부(hypothalamus), 소뇌(cerebellum), 신경교(pons) 및 연수

(medulla) 등 이었다.

혈장, 혈액 및 뇌조직 중의 페니토인의 농도 측정 - 페니토인 표준용액 각각을 혈장 및 전혈 400 μl 에 대하여 phenytoin 농도가 1, 3, 5, 10 및 15 $\mu\text{g/ml}$ 농도가 되도록, 또한 뇌조직을 분쇄하여 얻은 용액 400 μl 에 대해서도 페니토인 농도가 1, 3, 5, 7.5 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도가 되도록 가한 후 2분간 혼합하여 검량선 작성용 검체로 이용하였다. 이렇게 만든 검량선 시료 및 페니토인을 정맥 투여한 후 얻은 혈장, 전혈 및 뇌조직 시료를 다음과 같은 방법으로 전처리하여 HPLC로 정량하였다. 먼저 혈장인 경우는 혈장 100 μl 에 아세트니트릴을 100 μl 가해 30초간 혼합한 후 4000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액 50 μl 를 HPLC로 분석하였으며, 전혈의 경우 전혈 100 μl 에 주사용 증류수 100 μl 를 가해 1분간 혼합하여 용혈시키고, 200 μl 아세트니트릴을 가해 30초간 다시 혼합하고, 4000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액 50 μl 를 HPLC에 주입하여 분석하였다. 또한 뇌조직의 경우는 시료의 무게를 정확히 달아 코니칼 튜브에 넣은 다음 3배량의 1 mM 수산화나트륨 용액을 가하고 조직분쇄기로 교반한 후 2배량의 아세트니트릴을 가해 혼합하고, 4000 rpm에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액 50 μl 를 HPLC로 주입하여 분석하였다. 이때 HPLC의 분석조건으로 칼럼은 역상 C_{18} -칼럼(3.9 \times 300 mm, μ -BondapakTM C_{18} , Waters)이었고, 자외선 검출기의 파장은 214 nm에서 정량하였다. 또한 이동상은 0.05 M KH_2PO_4 용액에 인산을 가해 pH를 3으로 맞춘 다음, 이 용액과 아세트니트릴을 60 : 40(v/v%)으로 혼합하여 사용하였다. 이동상의 유속은 2.0 ml/min로, 용기공급속도는 0.5 cm/min로, attenuation은 6으로 하여 분석하였다.

자가방사기록법을 이용한 ^{99m}Tc -DTPA의 뇌조직 중의 분포 측정 - ^{99m}Tc -DTPA 경우는 자가방사기록법을 이용하여 뇌분포 상황을 파악하였는데, 이때 먼저 동결시킨 뇌조직을 -20°C 의 저온조내에서 1~2시간 동안 서서히 해동시킨 후 미세절편도(microtome)를 이용하여 전두엽극으로부터 300 μm 간격으로 20 μm 두께의 판상 절편을 얻었다. 각각의 뇌절편을 유리 슬라이드 위에 올려놓은 후 건조시킨 다음 암실에서 현상필름에 밀착시켜 하루동안 방치하고, 자가방사기록 분석 시스템을 이용하여 뇌조직중 ^{99m}Tc -DTPA의 분포도를 검토했다.

통계분석 - 약물 투여군간 혹은 같은 흰쥐에 있어서

의 우반구(BBB 개열한 쪽) 및 좌반구의 약물 투과 정도 등의 비교 분석시 Student' t-test를 이용하였으며, 두 군간 차이의 유의성은 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 에서 평가하였다.

결과 및 고찰

뇌조직 중의 혈액부피 측정 - 좌, 우 대뇌반구 전체의 각각에 대해 구한 혈액부피(ml/g) 값을 Table I에 나타내었다. 혈액부피는 뇌조직 중의 농도(cpm/g)를 전혈농도(cpm/g)로 나눈 값인데, 알부민은 혈관내에만 존재하기 때문에 뇌조직중 농도는 뇌조직 중의 혈관내에 존재하는 알부민의 농도를 반영하므로, 이 두 요소를 이용하여 뇌조직 중의 혈액부피를 구하였다. 본 실험에서 구한 대뇌 우반구의 혈액부피는 1.90×10^{-2} ml/g 이었고, 대뇌 좌반구의 혈액부피는 2.30×10^{-2} ml/g 이었으며, 뇌의 각부위별 조직중 약물양을 구하기 위해서는 뇌조직 각 부위별 혈액부피(regional blood volume, RBV)가 필요한데, 이 경우는 문헌에서 많이 인용되는 값을 이용하였다(Table II).²²⁻²³ 그리고 이들 값을 이용하여 뇌실질 세포에만 존재하는 ^{99m}Tc -DTPA 및 페니토인 양을 구할때 총조직중 농도에서 혈관내에 존재하는 농도를 빼주는 방법으로 보정하였다.

Table I - Total blood volume of rat hemisphere

Brain Region	Blood Volume(V) ^a \times 100 (ml/g) ^b
Right hemisphere	1.9 \pm 0.3
Left hemisphere	2.3 \pm 0.4

$$^a V = \frac{(\text{dpm/g hemisphere})}{(\text{dpm/ml whole blood})}$$

^b Mean \pm SD (n=5)

Table II - Regional blood volume (RBV) in rat brain

Brain Region	RBV \times 100 (ml/g) ^a
Olfactory nucleus	2.96 \pm 0.19
Caudate nucleus	1.25 \pm 0.12
Hippocampus	0.95 \pm 0.18
Frontal lobe	1.74 \pm 0.09
Occipital lobe	1.84 \pm 0.03
Thalamus + Hypothalamus	1.62 \pm 0.05
Cerebellum	2.72 \pm 0.23
Pons	1.99 \pm 0.18
Medulla	2.35 \pm 0.22

^a Given as the C^{14} -sucrose space at t=0 after an i.v. bolus injection of C^{14} -sucrose.

^a RBV data were cited from references.²²⁻²³

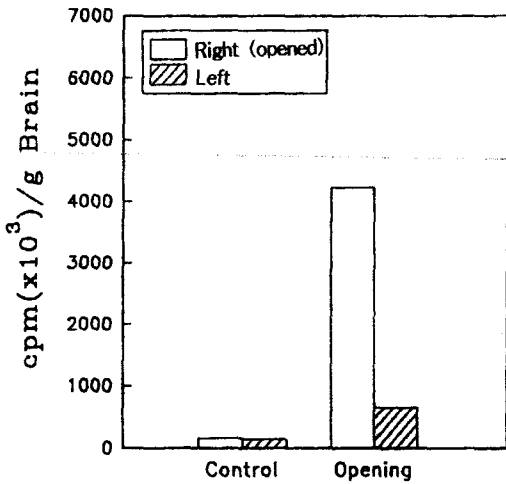


Fig. 1—Cpm of ^{99m}Tc-DTPA (8 mCi) at hemisphere in the parenchymal brain (n=3).

삼투개열에 의한 ^{99m}Tc-DTPA의 BBB 투과 평가 -

우측 외경동맥으로 삼투개열 물질을 30초 동안 0.12 ml/sec의 일정한 속도로 등속주입한 후 대퇴정맥으로 투여한 ^{99m}Tc-DTPA의 대뇌반구 뇌실질조직 농도를 Fig. 1에 나타내었는데, 이것은 단두하여 적출해낸 뇌를 좌, 우측 대뇌반구로 분리한 후 각 반구의 전체농도를 직접 측정하고, 여기에 뇌조직중 혈액에 존재하는 ^{99m}Tc-DTPA의 양을 보정한 값이다. 이 결과 ^{99m}Tc-DTPA의 뇌실질 조직농도에 있어 대조군(saline)의 우

반구는 1.68×10^5 , 좌반구는 1.44×10^5 cpm/g으로 차이가 없었는데, 삼투개열이 행해진 흰쥐의 우반구는 4.22×10^6 , 좌반구는 7.57×10^5 cpm/g로 유의한 차이 ($p < 0.01$)가 있었다(Table III 참조). 그리고 대뇌반구와 뇌실질 조직 중으로의 투과정도를 나타내는 PA값은 뇌실질 조직농도를 단백질결합형분율과 AUC의 곱으로 나누어 구하는데, 대조군(saline)의 우반구는 2.11×10^{-4} , 좌반구는 $1.79 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 로 차이가 없었으나, 삼투개열이 행해진 흰쥐의 우반구는 6.97×10^{-4} , 좌반구는 $1.24 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 로 유의한 차이 ($p < 0.01$)가 있었다(Table IV).

그리고 Fig. 2에는 대뇌반구를 해부학적으로 더욱 세분화하여 각 부위에 대한 뇌실질 조직농도를 그래프로 표시한 것인데, 대조군에 비해 삼투개열이 행해진 흰쥐군(고장용액 투여군)의 좌, 우반구에서 ^{99m}Tc-DTPA의 투과가 모두 증가하였으며, 특히 우반구가 좌반구보다 더 높게 나타났다. 평균값으로 살펴보면 대조군의 우반구는 8.64×10^5 , 좌반구는 6.90×10^5 cpm/g이었으며, 삼투개열이 행해진 흰쥐의 우반구는 4.44×10^6 , 좌반구는 2.01×10^6 cpm/g 이었다. 각 부위별 뇌실질조직중 농도에 차이가 있었는데, 이것은 각 부위로 공급되는 혈관의 분포가 상이하기 때문으로 생각되었으며, 소뇌, 신경교와 연수는 좌, 우반구에서 큰 차이가 없었는데, 이는 이들 조직이 척추동맥으로부터 혈액을 공급을 받고 있기 때문으로 사료되었다.

Table III—Brain parenchymal concentrations for ^{99m}Tc-DTPA following i.v. administration (8 mCi) to rats which were treated by constant infusing saline or a hyperosmotic solution of arabinose (1.6 molal) into right external carotid artery at rate of 0.12 ml/sec for 30 seconds*

Brain region	Brain Parenchymal		Concen. cpm/g × 10 ⁶	
	Control (saline)		Arabinose (1.6 moral)	
	Right Side (saline)	Left Side	Right Side (opened)	Left Side
Hemisphere	0.17 ± 0.04	0.14 ± 0.04	4.22 ± 1.32	0.76 ± 0.65**
Olfactory bulb	1.42 ± 0.14	1.18 ± 0.12	6.31 ± 0.93	3.11 ± 0.24*
Caudate nucleus	1.47 ± 0.39	0.99 ± 0.15	2.75 ± 0.57	0.85 ± 0.21*
Hippocampus	0.79 ± 0.23	0.63 ± 0.07	5.12 ± 1.35	0.79 ± 0.01**
Frontal lobe	1.07 ± 0.33	0.67 ± 0.18	6.17 ± 0.58	2.73 ± 0.75*
Occipital lobe	1.07 ± 0.19	0.92 ± 0.08	4.38 ± 0.92	0.24 ± 0.09**
Thalamus + Hypothalamus	0.61 ± 0.19	0.49 ± 0.08	4.13 ± 1.09	1.01 ± 0.37*
Cerebellum	0.51 ± 0.12	0.39 ± 0.05	6.77 ± 0.84	5.28 ± 1.26
Pons	0.50 ± 0.09	0.51 ± 0.04	2.32 ± 0.81	2.57 ± 0.81
Medulla	0.32 ± 0.05	0.43 ± 0.01	2.04 ± 0.52	1.47 ± 0.31*
Mean	0.86	0.69	4.44	2.01

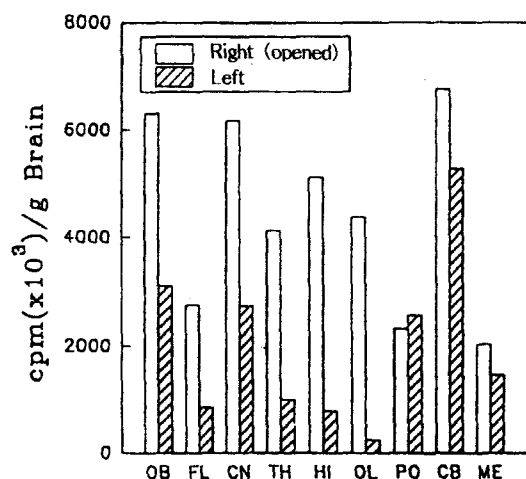
*Mean ± SD (n=3)

*Significantly different between left and right hemispheres ($p < 0.05$)

**Significantly different between left and right hemispheres ($p < 0.01$)

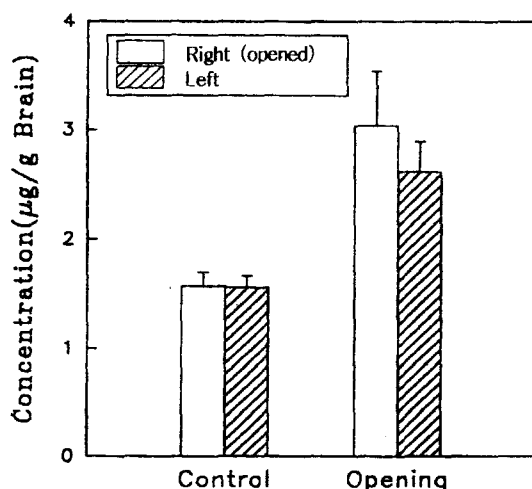
Table IV—Regional permeability \times area products (PA) for ^{99m}Tc -DTPA following i.v. administration (8 mCi) to rats which were treated by constant infusing saline or hyperosmotic solution of arabinose (1.6 molal) into right external carotid artery at rate of 0.12 ml/sec for 30 seconds^a

Brain region	PA Value			
	Control (saline)		Arabinose (1.6 molal)	
	Right Side (saline)	Left Side	Right Side (opened)	Left Side
Hemisphere	2.11 \pm 0.81	1.79 \pm 0.65	6.98 \pm 3.01 ^a	1.24 \pm 1.12 [*]
Olfactory bulb	17.70 \pm 0.69	14.67 \pm 1.58	11.95 \pm 4.44	5.86 \pm 1.77
Caudate nucleus	18.27 \pm 3.89	12.30 \pm 1.02	4.96 \pm 2.00	1.55 \pm 0.66 [*]
Hippocampus	9.83 \pm 2.47	7.96 \pm 1.19	7.21 \pm 0.96	1.14 \pm 0.19 ^{**}
Frontal lobe	13.41 \pm 4.14	8.46 \pm 2.48	8.98 \pm 2.38	3.84 \pm 0.64 [*]
Occipital lobe	13.27 \pm 1.64	11.53 \pm 0.78	12.09 \pm 0.65	0.83 \pm 0.01 ^{**}
Thalamus + Hypothalamus	7.80 \pm 2.59	6.09 \pm 0.64	6.41 \pm 0.73	1.56 \pm 0.41 ^{**}
Cerebellum	6.36 \pm 1.53	4.95 \pm 0.89	11.32 \pm 1.68	8.73 \pm 1.48
Pons	6.28 \pm 0.84	6.37 \pm 0.78	3.59 \pm 1.87	3.88 \pm 1.60
Medulla	4.03 \pm 0.46	5.42 \pm 0.20	3.15 \pm 0.44	2.26 \pm 0.07 [*]
Mean	10.73	8.64	7.74	3.29

^a Mean \pm SD (n=3)^{*} Significantly different between left and right hemispheres (p<0.05)^{**} Significantly different between left and right hemispheres (p<0.01)**Fig. 2**—Cpm of ^{99m}Tc -DTPA (8 mCi) at regional tissues in the parenchymal brain (n=3).

Key: OB: olfactory bulb, FL: frontal lobe, CN: caudate nucleus, TH: thalamus-hypothalamus, HI: hippocampus, OL: occipital lobe, PO: pons, CB: cerebellum, ME: medulla

또한 대뇌반구 중에서 세분화된 각 부위에서의 PA값을 평균값으로 살펴보면 대조군의 우반구는 1.08×10^{-3} , 좌반구는 $0.86 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 로 차이가 없었으나, 삼투개열이 행해진 흰쥐의 우반구는 7.70×10^{-3} , 좌반구는 $3.29 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 로 유의한 차이가 있었다 ($p < 0.01$). 이와 같이 각 부위별로 세분화해서 구한 뇌실질 조직중 농도 및 PA의 평균값은 대조군에 비해서는 좌, 우반구가

**Fig. 3**—Concentration of phenytoin (5 mg/kg) at hemisphere in the parenchymal brain (n=3).

모두 증가했지만, 삼투개열시 흰쥐 뇌의 좌반구가 우반구에 비해 2배 정도밖에 높지 않은 것은 세분화했을 경우의 모든 부위에 대한 PA의 평균값을 구하지 않고, 주요 부위의 평균값만 고려했을 뿐만 아니라, 척추동맥의 영향을 받는 소뇌, 연수 및 신경교 등은 다른 부위에 비해 좌, 우반구에 큰 차이가 없기 때문으로 생각된다.

삼투개열에 의한 페니토인의 BBB 투과 평가—페니토인의 대뇌반구 뇌실질조직중 농도는 우반구가 3.04 ± 0.50 , 좌반구는 $2.62 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$ 이었고, 대조군의 우반구는 1.57 ± 0.17 , 좌반구는 $1.56 \pm 0.11 \mu\text{g/g}$ 이었으

Table V—Brain parenchymal concentrations and permeability \times area (PA) for phenytoin in rat brain^a

	Brain parenchymal conc. ($\mu\text{g/g}$)		PA (sec^{-1})	
	Right side ^c	Left side ^d	Right side	Left side
Opening ^a	3.04 ± 0.50	2.62 ± 0.28	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.02
Control ^b	1.57 ± 0.13	1.56 ± 0.11	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.01

^a Mean \pm SD (n=3)

^a Osmotic opening was conducted by constant infusing hyperosmotic solution of arabinose (1.6 molal) into right external carotid artery at rate of 0.12 ml/sec for 30 seconds.

^b Saline was treated instead of arabinose (1.6 molal) solution as control.

^c Right hemisphere

^d Left hemisphere

며, Fig. 3에 그래프로 나타내었다. 삼투개열이 행해진 흰쥐의 PA값은 우반구가 0.29 ± 0.03 , 좌반구는 $0.25 \pm 0.02 \text{ sec}^{-1}$ 이었고, 대조군의 PA값은 우, 좌반구가 0.17 ± 0.03 및 $0.17 \pm 0.01 \text{ sec}^{-1}$ 로 큰 차이가 없었다(Table V). 여기에서 알 수 있는 것은 페니토인은 지용성이기 때문에 대조군에서도 뇌로의 이행성이 좋으며, 삼투개열을 행하였을 경우 대조군에 비해 우반구는 1.7배, 좌반구는 1.5배의 증가율을 보였지만 좌, 우 반구의 차이는 없었다.

자가방사기록법을 이용한 $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ 의 BBB 투과 평가 - Fig. 4는 자가방사기록법을 이용하여 찍은 사진인데, 삼투개열하에서 $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ 의 뇌 분포상황을 명확하게 볼 수 있었다. 삼투개열을 행한 우반구에 약물이 더 많이 들어 갔음을 시각적으로 알 수 있었다. Fig. 4의 사진 색깔 구분은 약물의 농도를 나타내는데 붉은 색에서 푸른색으로 갈수록 농도가 낮아짐을 의미한다. 사진에서 보는 것처럼 왼쪽 대뇌반구에서는 약물투과를 거의 볼 수 없는 반면, 오른쪽 대뇌반구에는 $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ 의 투과가 증가했음을 알 수 있었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 마취된 흰쥐에서 우측 외경동맥속으로 30초 동안 1.6 molal L-(+)-아라비노즈 고장액을 등속주입하여 BBB를 개열 하였을 때,⁷⁻¹¹⁾ $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ 의 PA값은 대뇌반구에서는 대조군에 비해 우반구가 33배, 좌반구는 6.9배 증가했으며, 각 부위 별로 세분화한 실험에서 PA의 평균값은 대조군에 비해 우반구는 7.2배, 좌반구는 3.8배 가량 유의성 있게 증가했음을 알 수 있었다. 우측 내경동맥으로의 고장액 주입에 의해 우반구는 영향을 많이 받지만, 좌반구도 우반구

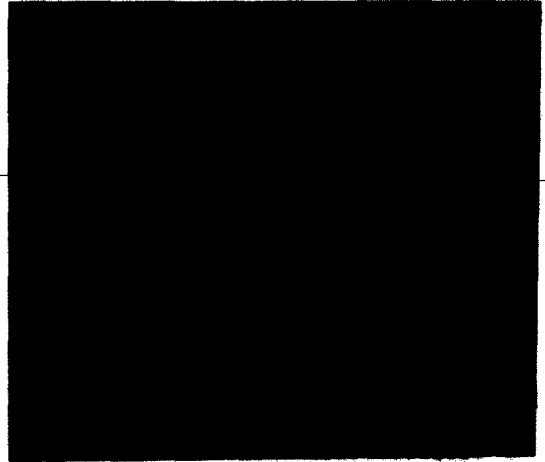


Fig. 4—Autoradiograph of section of rat brain 10 min after i.v. administration of $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ to rat (8 mCi). Also $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ was administered 5 min after osmotic opening of right hemisphere by constant infusing a hyperosmotic solution of arabinose (1.6 molal) into right external carotid artery at rate of 0.12 ml/sec for 30 seconds.

에 비해 상대적으로 적었지만 약간의 영향을 받을 수 있었다. 따라서 좌반구에서의 PA값도 약간 상승함을 알 수 있는데, 이것은 혈액순환에 의한 교차 영향 때문으로 사료되었다. 그리고 척추동맥으로부터 혈액을 공급받는 소뇌, 연수 및 신경교등과 같은 부위에서는 삼투개열의 영향을 크게 받지 않는 것으로 나타났다. 또한, 본 연구 결과는 이미 보고된 바와 같이 투과성이 낮고 수용성인 $^3\text{H-MTX}$ 의 PA값은 7배, $^{14}\text{C-sucrose}$ 의 PA값은 20배 정도 증가한다는 사실과 비교해볼 때 수용성의 $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ 도 비슷한 양상을 나타내고 있음을 알 수 있었다.^{8, 10, 13-21)}

결 론

본 연구에서는 1.6 molal L-(+)-아라비노즈 고장액을 흰쥐의 우측 외경동맥으로 30초 동안 0.12 ml/sec의 일정한 속도로 등속주입하여 우측 대뇌반구의 BBB를 삼투개열시키고, 수용성 약물인 $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ 와 지용성 약물인 항전간제 페니토인을 정맥투여한 후 이들 약물의 BBB 투과성의 변화를 평가하여, BBB 삼투개열이 수용성 약물과 지용성 약물의 BBB 투과에 미치는 영향을 검토하고자 하였으며, 본 연구의 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다. 이때 대조군에는 L-(+)-아라비노

즈 고장액 대신 생리식염수를 이용하였다.

1. ^{99m}Tc-DTPA의 뇌실질 조직농도에 있어 대조군의 대뇌 우반구는 1.68×10^5 , 좌반구는 1.44×10^5 cpm/g으로 차이가 없었는데, 삼투개열이 행해진 흰쥐의 우반구는 4.22×10^6 , 좌반구는 7.57×10^5 cpm/g로 유의한 차이가 있었고(p<0.01), 또한 PA값도 삼투개열이 행해진 흰쥐의 우반구에서 좌반구에 비해 유의성 있게 높게 나타난 것으로 부터(p<0.01), 1.6 molal L-(+)-아라비노즈 고장액 투여에 의한 삼투개열이 ^{99m}Tc-DTPA의 BBB 투과를 증가시키는 것을 알 수 있었다.

2. 반면에, 페니토인의 경우는 뇌실질 조직농도에 있어 삼투개열이 행해진 흰쥐의 대뇌 우반구는 3.04 ± 0.50 , 좌반구는 2.62 ± 0.28 $\mu\text{g/ml}$ 으로, 대조군의 우반구는 1.57 ± 0.17 , 좌반구는 1.56 ± 0.11 $\mu\text{g/g}$ 인 것과 같이 유의성 있는 차이가 없었다(p<0.05). 또한 PA 값에 있어서도 삼투개열이 행해진 흰쥐와 대조군에 있어 좌반구 및 우반구 사이에 유의성 있는 차이가 없었다.

이들 결과로부터 1.6 molal L-(+)-아라비노즈 고장액 투여에 의한 삼투개열은 지용성약물 보다는 수용성 약물의 BBB 투과에 영향을 더 크게 미치는 것을 알 수 있었다.

문 헌

- 1) Brightman, M. W. and Reese, T. S. : Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* **40**, 648 (1969).
- 2) Cornford, E. M. : The blood-brain barrier, A dynamic regulatory interface. *Molecular Physiol.* **7**, 219 (1985).
- 3) Nabeshima, S., Reese, T. S., Landis, D. M. D. and Brightman, M. W. : Junctions in the meninges and marginal glia. *J. Comp. Neurol.* **164**, 127 (1975).
- 4) Levin, V. A. : Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J. Med. Chem.* **23**, 682 (1980).
- 5) Greig, N. H., Fredericks, W. R., Holloway, H. W., Soncrant, T. T. and Rapoport, S. I. : Delivery of human interferon-alpha to brain by transient osmotic blood-brain barrier modification in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **245**, 581 (1988).
- 6) Robinson, P. J. and Rapoport, S. I. : Size selectivity of blood-brain barrier permeability at various after osmotic opening. *Am. J. Physiol.* **253**, R459 (1987).
- 7) Rapoport, S. I. and Thompson, H. K. : Osmotic opening of the blood-brain barrier in the monkey associated neurological deficits (Abstract). *Science* **180**, 971 (1973).
- 8) Rapoport, S. I., Fredericks, W. R., Ohno, K. and Pettigrew, K. D. : Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.* **238**, R421 (1980).
- 9) Rapoport, S. I., Barranger, J. A., Fredericks, W. R., Pentchev, P. G., Macdermot, K. D., Steusing, J. K. and Brady, R. O. : Modification of the blood-brain barrier-Increased concentration and fate of enzymes entering the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76(1)**, 481 (1979).
- 10) Rapoport, S. I., Brightman, M. W., Hori, M., Reese, T. S. and Westergaard, E. : Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. *J. Comp. Neurol.* **152**, 317 (1973).
- 11) Rapoport, S. I., Hori, M. and Klatzo, I. : Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.* **223**, 323 (1972).
- 12) Neuwelt, E. A., Specht, H. D., Howieson, J., Haines, J. E., Bennett, M. J., Hill, S. A. and Frenkel, E. P. : Osmotic blood-brain barrier modification-Clinical documentation by enhanced CT scanning and/or radionuclide brain scanning. *Am. J. Radiol.* **4**, 907 (1983).
- 13) Ohata, M., Fredericks, W. R., Neuwelt, E. A., Sundaram, U. and Rapoport, S. I. : [³H] Methotrexate loss from the rat brain following enhanced uptake by osmotic opening of the blood-brain barrier. *Cancer Research* **45**, 1092 (1985).
- 14) Reese, T. S. and Kamovsky, M. J. : Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* **34**, 207 (1967).
- 15) Takasato, Y., Rapoport, S. I. and Smith, Q. R. : An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am. J. Physiol.* **247**, H484 (1984).

- 16) Boxenbaum, H. : Interspecies variation in liver weight, hepatic blood flow, and antipyrine intrinsic clearance-Extrapolation of data to benzodiazepines and phenytoin. *J. Pharm. Sci.* **8**, 165 (1980).
- 17) Chou, R. C. and Levy, G. : Effect of heparin or salicylate infusion on serum protein binding and on concentrations of phenytoin in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **219**, 42 (1981).
- 18) Fraser, D. G., Ludden, T. M., Evens, R. P. and Sutherland, E. W. : Displacement of phenytoin from plasma binding site by salicylate. *Clin. Pharmacol. Ther.* **27**, 165 (1980).
- 19) Kurata, D. and Wilkinson, G. R. : Erythrocyte uptake and plasma binding of diphenylhydantoin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **16**, 355 (1974).
- 20) Lunde, P. K. M., Rane, A., Yaffe, S. J., Lund, L. and Sjoqvist, F. : Plasma protein binding of diphenylhydantoin in man. Interaction with other drugs and effect of temperature and plasma dilution. *Clin. Pharmacol. Ther.* **11**, 846 (1970).
- 21) Odar-Dederloef, I. and Borga, O. : Impaired protein binding of phenytoin in uremia and displacement effect of salicylic acid. *Clin. Pharmacol. Ther.* **20**, 36 (1977).
- 22) Ohno, K., Fredericks, W. R. and Rapoport, S. I. : Osmotic opening of the blood-brain barrier to methotrexate in the rat. *Surg. Neurol.* **12**, 323 (1979).
- 23) Ohno, K., Pettigrew, K. D. and Rapoport, S. I. : Low limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat. *Am. J. Physiol.* **235**, H299 (1978).