

6-하이드록시도파민으로 유도된 흰쥐 뇌내의 도파민 고갈에 대한 *l*-디프레닐의 억제효과

김은미 · 김선춘* · 정희선* · 김화정*

이화여자대학교 약학대학, *국립과학수사연구소

(Received October 8, 1998)

l-Deprenyl (Selegiline) Prevents 6-Hydroxydopamine-induced Depletion of Dopamine and Its Metabolites in Rat Brain

Eun Mi Kim, Sun Choon Kim*, Hee Sun Chung* and Hwa Jung Kim*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, and

*National Institute of Scientific Investigation, Seoul 158-097, Korea

Abstract—Whereas a selective inhibitor of monoamine oxidase type B, *l*-deprenyl (selegiline), is now widely used in the treatment of Parkinson's disease, the precise action mechanism of the drug remains elusive. In this study, to investigate protective effect of *l*-deprenyl against the dopamine depletion induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA), the changes in tissue contents of dopamine, serotonin (5-HT) and their metabolites by *l*-deprenyl were examined in intact and 6-OHDA-lesioned rat brain. In intact rats, a single intraperitoneal (i.p.) administration of *l*-deprenyl showed a no change in striatal dopamine and its metabolites at low concentrations (0.25 and 1 mg/kg), but significantly inhibited dopamine metabolism at a higher concentration (10 mg/kg). The repeated administration of *l*-deprenyl (0.25 and 1 mg/kg, i.p., for 21 consecutive days) reduced the contents of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanilic acid (HVA) in dose-dependent manners without changes in dopamine content. Bilateral intracerebroventricular (i.c.v.) infusion of 6-OHDA (100 µg/10 µl/hemisphere) depleted dopamine in striatum and septum by 81% and 90% respectively. When rats were pretreated with *l*-deprenyl before 6-OHDA administration, the striatal and septal dopamine levels were significantly increased by about 3.0-fold and 3.4-fold, respectively, compared to the untreated 6-OHDA-lesioned rat. Pretreatment of *l*-deprenyl also significantly enhanced the dopamine metabolites, DOPAC, HVA and 3-methoxytyramine, in the striatum, and DOPAC in the septum. These results indicate that a *l*-deprenyl pretreatment prevents 6-OHDA-induced depletion of striatal dopamine and its metabolites.

Keywords □ *l*-deprenyl, 6-hydroxydopamine, dopamine, dopamine metabolites, rat brain.

만성적인 신경퇴행성 질환인 파킨슨씨병(Parkinson's disease)은 운동완서(slowness of movement), 근강직(muscle rigidity) 및 진전(tremor)의 임상적 증상을 나타내며 뇌의 흑질(substantia nigra)내 도파민 신경의 퇴화와 그에 따른 선조체(striatum)내 dopamine양의 현저한 감소가 특징이나 dopamine 신경의 선택적인 퇴화의 원인은 아직 정확히 밝혀져 있지 않다.¹⁾

파킨슨씨 병에서 흑질선조체의 dopamine 결핍이 밝혀진 이후 dopamine의 전구물질인 *l*-dopa를 투여하는 주 치료법 이외에 monoamine oxidase(MAO) B를 선택적으로 억제하는 *l*-deprenyl(selegiline)이 1972년 Knoll 등²⁾에 의해 발견되어 현재 미국, 유럽 및 국내에서도 파킨슨씨병 치료제로 사용되고 있다. MAO는 기질 특이성 및 저해제의 감수성에 따라 norepinephrine 및 5-hydroxytryptamine(serotonin: 5-HT)에 선택적으로 작용하고 clorgyline에 의해 활성이 저해되는 MAO A와 benzylamine을 선택적으로 분해하며 clorgyline에는 비교적 감수성이 적은 MAO B의 두가지 중

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-360-3021 (팩스) 02-360-3051

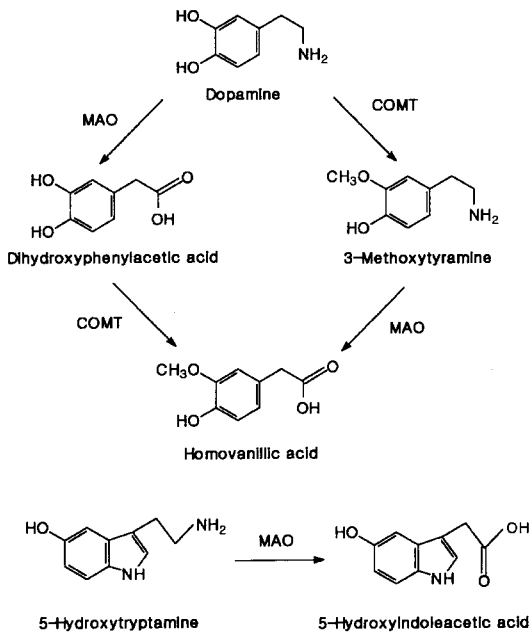


Fig. 1 — Metabolism of dopamine and 5-hydroxytryptamine by monoamine oxidase (MAO) and/or catechol-O-methyltransferase (COMT).

류로 분류된다.³⁾ Dopamine은 두종류의 MAO에 의해 모두 분해되나 사람의 뇌에서는 주로 MAO B에 의하여 대사된다고 알려져 있다.^{4,5)} *l*-Deprenyl은 MAO B에 대한 선택적 저해제이나 고용량 투여나 반복투여에 의해 선택성을 소실하여 MAO B 뿐만 아니고 MAO A도 억제하기 때문에³⁾ *l*-deprenyl의 용량 및 투여 기간에 따라 뇌내 아민들의 대사에 대한 영향이 다르게 나타날 수 있다는 것을 예측할 수 있으며, 이는 dopamine 및 5-HT와 MAO에 의해 생성되는 그들의 대사체들(Fig. 1)에 대한 연구들로부터 확인되고 있다. 즉, Yang 등⁶⁾에 의한 연구에서 *l*-deprenyl을 정맥내로 일회 투여시 정상 흰쥐의 뇌조직내의 norepinephrine과 5-HT 대사에 대한 효과 없이 dopamine 대사의 저해효과 (dopamine 함량은 증가하고 DOPAC 함량은 감소)가 관찰되었고, Wiener 등⁷⁾은 *l*-deprenyl 장기간(4주) 연속 투여시 생쥐(mouse)의 선조체내 dopamine 농도변화는 관찰되지 않고 대사체인 DOPAC과 HVA의 함량이 감소된다고 보고하였다. *l*-Deprenyl은 선택적 MAO B 저해작용 이외에도 도파민 흡수 (uptake) 억제,³⁾ 1-methyl-4-phenylpyridinium ion(MPP⁺) 병변 쥐와 노화 쥐 뇌에서의 산화적 손상 (oxidative damage)에 대한 보호작용^{5,8,9)}에 대한 연구결과들이 보고되었다. 또한 MPP⁺

와 6-hydroxydopamine(6-OHDA) 등의 신경독성물질들로 유발된 apoptosis가 *l*-deprenyl에 의해 감소되며^{10,11)} *l*-deprenyl이 N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor의 modulation을 통해 신경보호작용을 나타낼 수 있다¹²⁾는 보고들이 있다. 이러한 *l*-deprenyl에 의한 신경보호작용이 MAO B 억제작용을 나타내는 농도보다 훨씬 낮은 농도 범위($10^{-9} \sim 10^{-11}$ M)에서도 나타난다고 보고되고 있어^{13,14)} *l*-deprenyl은 MAO B 저해작용 이외에도 아직 자세히 밝혀지지 않은 작용기전을 보유할 것으로 추정할 수 있다.

l-Deprenyl이 현재 파킨슨씨병 환자에게 치료제(정확히는 증상개선편제)로 사용되고 있으나 선조체(striatum)내 dopamine양이 이미 현저하게 감소되어 있는 상태에서는 *l*-deprenyl의 dopamine 분해 억제작용이나 신경보호효과에 의한 치료효과를 크게 기대하기 어렵다. 실제 기존의 동물실험 연구에서 6-OHDA으로 도파민 신경의 병변을 유발시킨 후에 *l*-deprenyl을 투여한 경우 뇌선조체내의 dopamine 함량을 거의 변화시키지 않는 것으로 보고되었고,¹⁵⁾ *l*-dopa와 병용투여하는 경우에도 *l*-deprenyl에 의한 뇌내 dopamine의 농도의 변화가 관찰되지 않았으며¹⁶⁾ 임상에서도 대부분 파킨슨씨병 환자에게 *l*-dopa 요법의 보조제로 적용되고 있다. *l*-Deprenyl이 최근의 보고들에 비추어 신경보호효과를 나타낸다고 전제한다면 dopamine 신경 파괴가 일어나기 전에 전처치할 경우 독성물질에 의한 신경파괴에 대한 억제효과로 인해 신경 말단이 존재하는 뇌조직내의 dopamine 함량이 증가될 수 있다는 가설을 생각해 볼 수 있다. 6-OHDA이나 MPP⁺에 의한 파킨슨씨병 동물 모델에서 *l*-deprenyl 전처치에 의한 뇌조직에서의 dopamine 및 대사체들의 함량변화에 대한 연구결과는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 이 가설을 조사하기 위하여 *l*-deprenyl을 전처치한 후 정상쥐 및 6-OHDA으로 선조체 내 dopamine 고갈을 일으킨 파킨슨씨병 모델 병변쥐¹⁷⁾에서 뇌부위별로 dopamine, 5-HT 및 대사체들의 함량변화를 조사하였다.

실험방법

시약 및 기구

l-Deprenyl hydrochloride는 초당약품에서 제공받았으며, 표준품으로 사용한 dopamine, DOPAC, HVA, 3-MT, 5-HT, 5-HIAA 및 내부표준물질인 3,4-dihy-

droxybenzylamine, 파킨슨씨병 동물모델 유도를 위한 6-OHDA과 desipramine은 Sigma사의 제품을 사용하였고, 마취제로 사용한 pentobarbital sodium은 한림 제약에서 구입하였으며, 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

6-OHDA을 뇌실내로 주입하기 위해 흰 쥐를 Vari-ous사의 stereotaxic instrument를 사용하여 고정시켰고, 약물주입은 Hamilton사의 701N syringe 를 사용하였다. 조직내의 dopamine, 5-HT 및 대사체의 분석은 μ Bondapak C₁₈ column(3.9×300 mm, Waters), Varian 9012 HPLC pump를 사용하였고 검출기는 Bioanalytical system사의 electrochemical detector 를 사용하였다.

실험동물

생후 5주령의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 식품의약품안전본부에서 분양받아 일주일이상 실험실에서 적응시킨 후 사용하였다.

6-OHDA에 의한 dopamine 고갈

체중 250~300 g의 웅성 흰쥐를 pentobarbital sodium(50 mg/kg, i.p.)으로 마취시켜 stereotaxic 기구에 고정한 후, 두피를 제거하고 두개골 접합부중 bregma점을 기준으로 posterior 0.6 mm, lateral±1.2 mm, ventral -3.5 mm 위치에 Hamilton syringe를 고정하고 20 μ L의 6-OHDA(200 μ g) 또는 정상 대조군은 vehicle(0.1% ascorbic acid in saline)을 1.5 μ L/min의 속도로 양측 ventricle 부위에 주입하였다. 모든 동물은 수술 30분전에 6-OHDA이 noradrenergic 신경 말단으로 uptake되는것을 막기위하여 desipramine (25 mg/kg)을 복강내 주사하였다.¹⁸⁾

약물투여 및 조직내 아민류의 추출

정상쥐에서 *l*-deprenyl 1회 및 반복투여에 따른 영향

l-Deprenyl 1회 투여에 의한 효과를 조사하기 위하여 약물을 생리식염수에 용해하여 흰쥐 체중 kg당 0.25 mg, 1 mg 및 10 mg을 1회 복강주사하고 30분 및 2시간 후에 단두하였으며, 반복투여에 따른 영향을 조사하기 위해서는 *l*-deprenyl을 kg당 0.25 mg 및 1 mg을 1일 1회 3주간 복강내로 연속투여한 후 최종 투여 2시간 후에 단두하여 뇌를 적출하였다. 선조체를 얼음상에서 신속하게 분리하여 내부표준물질인 3,4-dihydroxyben-

zylamine(71.4 ng/mL in 0.4 M HClO₄) 600 μ L를 가하여 균질화시켰다. 균질화된 조직을 4°C, 15,000×g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 dopamine, 5-HT 및 대사체들의 분석시료로 하고, pellet은 1N NaOH 1 mL을 가한 후 단백질 정량을 위한 시료로 하였다.

6-OHDA에 의한 병변 유도과 *l*-deprenyl의 전처치에

다른 영향 - *l*-Deprenyl 체중 kg당 0.25 mg, 1 mg 및 10 mg을 수술 30분전에 1회 복강내 주사한 후 stereotaxic 기구를 이용하여 본 방법에 따라 6-OHDA (100 μ g/10 μ L)을 양측 뇌실(ventricle)내로 주입하였다. 수술한지 5일째되는 날에 단두하여 선조체(striatum), 해마(hippocampus), 중격(septum), 시상하부(hypothalamus) 및 뇌간(stem)을 분리한 후 내부표준물질인 3,4-dihydroxybenzylamine(71.4 ng/mL in 0.4 M HClO₄)을 선조체에는 600 μ L, 기타 뇌 조직에는 300 μ L를 가하여 균질화시킨 후 위와 같은 방법으로 추출하였다. 모든 시료는 분석 전까지 -70°C에서 보관하였다.

HPLC에 의한 조직내 dopamine, 5-HT 및 대사체들의 정량

표준품 dopamine, DOPAC, HVA, 3-MT, 5-HT 및 5-HIAA는 각각 500 ng/mL가 되도록 0.4 M HClO₄에 용해시켜 표준원액으로 하였다. 여기에 3,4-dihydroxybenzylamine(71.4 ng/mL in 0.4 M HClO₄)을 함유하도록 한후 0.4 M HClO₄으로 희석하여 1.8 ng/mL~214 ng/mL의 표준용액을 만들고, 이를 HPLC에 20 μ L씩 주입하였을때 검출되는 표준물질의 피크를 내부표준물질에 대한 면적비로서 검량선을 작성하였다. Mobile phase는 1.2 mL/min의 속도로 89% 0.17 M monochloroacetic acid buffer(90 mM NaOH, 150 mM NaCl, 2.7 mM Na₂EDTA, 3.2 mM sodium octyl sulphate, pH 3.0) : 5% methanol : 6% acetonitrile을 사용하여 850 mV vs. Ag/AgCl에서 측정하였다. 시료는 분석 직전 해동시켜 0.45 μ m로 여과하여 주입하였다. 시료내에 함유되어 있는 아민류의 함량은 검량선으로부터 계산한 후 pmol로 환산하였다.

단백질 정량 및 통계

뇌조직내 아민류의 함량은 각각 시료중의 단백질 함량을 측정하여 보정하였다. 단백질 함량은 표준물질로

서 bovine serum albumine을 사용한 Lowry 법¹⁹⁾에 의하여 측정하였다. 실험결과는 mean±S.E.M.로 표시하였으며 유의성 검정은 student's t-test에 의하여 계산하였다.

실험결과 및 고찰

뇌내 아민들 및 대사체들의 동시분석조건외의 확립 - 본 연구의 HPLC 분석조건에서 내부표준물질로 사용된 3,4-dihydroxybenzylamine과 표준검체 중에 포함되어 있는 dopamine, DOPAC, 5-HIAA, HVA, 3-MT 및 5-HT이 각각 5.0분, 5.4분, 6.2분, 8.0분, 9.7분, 11.0분 및 12.4분에서 동시에 뚜렷하게 분리되었으며, 각 표준품들의 농도범위인 1.8~214 ng/mL에서, dopamine은 $Y=0.0228X-0.0009(r=0.9999)$, DOPAC은 $Y=0.0156X+0.0095(r=0.9999)$, 5-HIAA는 $Y=0.0229X-0.0717(r=0.9996)$, HVA는 $Y=0.0169X-0.0233(r=0.9999)$, 3-MT은 $Y=0.0212X-0.0153(r=0.9999)$, 5-HT은 $Y=0.0285X-0.0239(r=0.9999)$ 로 양호한 직선성의 검량선을 얻었다. HPLC로 분석한 쥐의 선조체내 아민류의 전형적인 크로마토그램을 나타낸 Fig. 2에서 보는 바와 같이 생체시료에서도 상기 아민들 및 대사체들의 peak들이 뚜렷하게 분리되어 동시에 정량할 수 있었다.

정상쥐에서 l-deprenyl 1회 및 반복투여에 따른 영향 - l-Deprenyl을 흰 쥐에 kg당 0.25, 1 또는 10 mg을 1회 복강주사하고 30분 및 2시간 후에 적절한 선조체로부터 아민들 및 대사체들의 함량을 분석하였다(Table

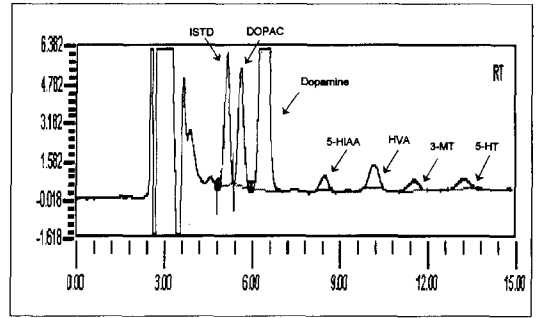


Fig. 2 - High performance liquid chromatogram of dopamine, 5-HT and their metabolites containing in rat striatum. Peaks for internal standard (ISTD, 3,4-dihydroxybenzylamine), DOPAC, dopamine, 5-HIAA, HVA, 3-MT and 5-HT, separated simultaneously, are shown in order.

I). l-Deprenyl 0.25 mg/kg와 1 mg/kg 투여군에서는 투여 30분 및 2시간 후에 모두 아민들 및 대사체들의 함량에 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았으나, l-deprenyl 10 mg/kg 투여군에서는 30분 후에 dopamine과 3-MT이 각각 14%와 28%의 증가를 보인 반면 DOPAC은 유의적으로(33%) 감소하였으며, 2시간 후에 역시 dopamine의 양은 30분 후에 비슷한 정도로 증가하고 DOPAC 및 HVA가 각각 42%와 23%의 유의적인 감소를 나타냈다. 5-HT와 대사체인 5-HIAA의 함량변화는 관찰되지 않았다. Dopamine 및 5-HT의 대사변화를 좀더 정확히 해석하기 위하여 각 대사체들의 함량을 dopamine 및 5-HT에 대한 %비율로 환산했을 때 (Table II) 역시 l-deprenyl 10 mg/kg 투여군에서 시간에 따른 차이는 보이지 않았으나 DOPAC/dopa-

Table I - Effect of single administration of l-deprenyl (DPN) on contents of dopamine, 5-HT and their metabolites in rat striatum

| Drug (mg/kg) | Dopamine | DOPAC | HVA | 3-MT | 5-HT | 5-HIAA |
|--------------|-------------|------------|-----------|-----------|----------|----------|
| Saline | 834.2±30.1 | 163.6±16.6 | 46.1±2.0 | 17.3±1.9 | 15.9±2.3 | 23.5±1.3 |
| DPN (0.25) | | | | | | |
| 30 min | 836.2±47.0 | 169.5±4.0 | 51.0±3.3 | 16.7±1.2 | 15.3±1.0 | 24.6±1.6 |
| 2 hr | 809.4±13.3 | 173.7±9.3 | 40.6±2.9 | 14.9±1.3 | 187.±1.9 | 25.6±1.4 |
| DPN (1) | | | | | | |
| 30 min | 861.0±76.7 | 173.1±5.2 | 50.5±1.6 | 20.3±1.3 | 15.3±1.2 | 24.1±1.4 |
| 2 hr | 806.8±34.6 | 144.0±6.8 | 39.0±3.2 | 12.6±0.8 | 17.6±1.3 | 26.7±1.5 |
| DPN (10) | | | | | | |
| 30 min | 953.0±25.7* | 109.5±6.2* | 43.4±1.2 | 22.1±0.9* | 17.0±2.4 | 22.5±1.8 |
| 2 hr | 963.4±54.6 | 94.6±5.4** | 35.7±2.7* | 17.9±2.8 | 17.6±2.4 | 22.5±2.1 |

Rats were treated with l-deprenyl for 30 min or for 2 hr before sacrificed. Data are the means±S.E.M from 5~6 rats in units of pmol/mg protein.

*p<0.05, **p<0.01 relative to control (saline) group.

Table II—Effect of single administration of *l*-deprenyl (DPN) on metabolic ratio of dopamine and 5-HT in rat striatum

| Drug (mg/kg) | DOPAC/dopamine | HVA/dopamine | 3-MT/dopamine | 5-HIAA/5-HT |
|--------------|----------------|--------------|---------------|-------------|
| Saline | 21.7±5.4 | 6.6±0.9 | 2.3±0.6 | 168.8±39.2 |
| DPN (0.25) | | | | |
| 30 min | 22.6±2.9 | 7.3±0.9 | 2.2±0.6 | 173.5±34.6 |
| 2 hr | 23.6±3.1 | 6.0±1.0 | 2.0±0.4 | 158.7±48.9 |
| DPN (1) | | | | |
| 30 min | 22.8±5.0 | 7.2±1.5 | 2.7±1.0 | 171.8±39.8 |
| 2 hr | 19.7±2.7 | 5.7±0.8 | 1.7±0.2 | 167.4±25.1 |
| DPN (10) | | | | |
| 30 min | 12.6±1.6** | 5.4±0.3* | 2.5±0.1 | 150.3±27.7 |
| 2 hr | 10.9±1.3** | 4.4±0.8** | 2.0±0.9 | 141.9±26.0 |

Rats were treated with *l*-deprenyl for 30 min or for 2 hr before sacrificed. Data are the means±S.E.M from 5~6 rats in units of % ratio.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$ relative to the control (saline) group.

mine 및 HVA/dopamine의 비율이 유의적으로 감소한 것으로 보아 dopamine의 대사가 억제되었음을 알 수 있었다. 한편 *l*-deprenyl은 고용량 투여시 선택성을 잃고 MAO A까지 저해하는 것으로 보고되어 있어¹⁶⁾ 이를 조사해 본 결과, MAO A의 기질인 5-HT와 그 대사체인 5-HIAA의 함량과 5-HIAA/5-HT 비율에 10 mg 투여군에서도 아무 변화가 관찰되지 않았으므로 (Table I & II), 본 실험 조건에서는 10 mg/kg의 *l*-deprenyl 1회 투여로 MAO A까지 저해되지 않았다고 볼 수 있다.

l-Deprenyl을 3주간 반복투여 한 후 선조체내 아민류의 함량을 측정하였을 때 0.25 mg과 1 mg 반복투여군에서 모두 dopamine 함량에는 변화는 없었으나 DOPAC과 HVA는 유의적으로 감소하였으며, Fig. 3에서 보는 바와 같이 용량 의존적으로 dopamine의 대사가 억제되었다는 것을 알 수 있었다. 5-HT 및 5-HIAA의 함량은 *l*-deprenyl 1회 투여시와 마찬가지로 반복투여에 의해서도 변화를 나타내지 않았다(data not shown). *l*-Deprenyl의 3주간 반복투여시에 1회 투여시와는 다르게 dopamine의 함량증가를 나타내지 않는 이유는 장기간 분해가 억제됨으로서 증가되는 dopamine이 자신의 합성효소인 tyrosine hydroxylase를 저해(feedback inhibition)함으로써 dopamine 합성이 감소하기 때문일 것으로 추정된다.⁷⁾ Mouse나 rat에서 뇌내 dopamine, 5-HT 및 NE 등의 아민류의 함량이 증가하기 위해서는 MAO A의 활성이 85% 이상 저해되어야 한다는 기존의 보고²⁰⁾를 근거로 본 실험에서 시행한 *l*-deprenyl의 용량 및 투여기간은

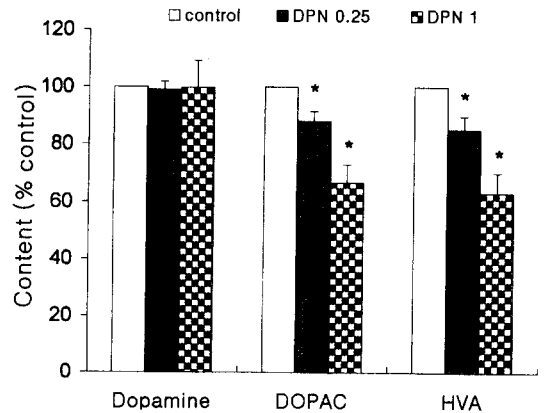


Fig. 3—Effect of repeated administration of *l*-deprenyl on striatal dopamine and its metabolites in normal rats. Rats were intraperitoneally (i.p.) administered with 0.25 mg/kg (DPN 0.25) or 1 mg/kg (DPN 1) of *l*-deprenyl once daily for 21 days. Rats were sacrificed by decapitation one day after the last injection and the striatal content of dopamine, DOPAC and HVA were analysed by HPLC. Data represent mean±S.E.M. from 7~9 rats per group. * $p<0.05$ relative to the vehicle treated control group.

로는 dopamine의 함량이 증가할 정도의 MAO A 활성이 저해되지 않았을 것으로 추측된다.

6-OHDA에 의한 dopamine 고갈에 대한 *l*-deprenyl 전저치의 영향—대표적인 신경독(neurotoxin)인 6-OHDA는 카테콜아민 신경세포를 파괴시키므로 파킨슨씨병의 동물모델을 만들곤자 할 때 이용된다. 6-OHDA는 구조가 카테콜아민류와 유사하여 high-af-

Table III— Effect of intraventricular injection of 6-OHDA on tissue content of dopamine, 5-HT and their metabolites in the striatum, hippocampus and septum

| Treatment | | Dopamine | DOPAC | HVA | 3-MT | 5-HT | 5-HIAA |
|-------------|----------------------|--------------|------------|------------|----------|-----------|-----------|
| Striatum | vehicle ^a | 792.7±78.2 | 198.1±23.7 | 57.1±5.6 | 18.2±2.1 | 18.5±3.0 | 36.1±4.8 |
| | 6-OHDA | 152.5±28.8** | 39.1±5.8** | 20.3±1.9** | 9.4±1.5* | 10.7±1.0 | 35.6±5.8 |
| Hippocampus | vehicle ^a | 4.6±1.0 | ND | ND | ND | 17.0±2.4 | 25.6±3.4 |
| | 6-OHDA | 2.6±0.9 | ND | ND | ND | 5.1±0.4** | 18.3±2.1* |
| Septum | vehicle ^a | 140.3±17.0 | 19.0±2.4 | 13.7±5.5 | ND | 23.3±4.1 | 30.3±7.3 |
| | 6-OHDA | 14.4±3.5** | ND | ND | ND | 23.8±3.0 | 58.6±12.9 |

Date expressed in pmol/mg protein for the means±S.E.M. of 5~7 rats.

^a 0.1% ascorbic acid in saline. *p<0.05, **p<0.01 relative to the vehicle-treated group. ND, not detected.

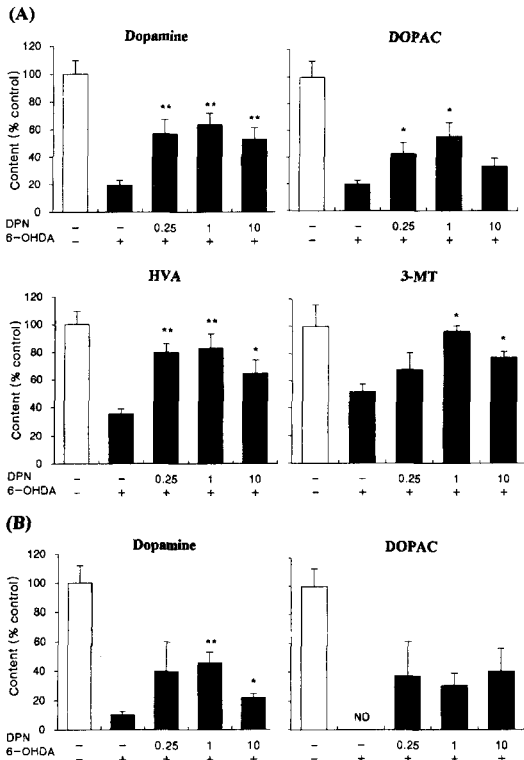


Fig. 4— Effect of *l*-deprenyl pretreatment on striatal (A) and septal (B) dopamine and its metabolites in 6-OHDA-lesioned rats. Rats were administered (i.p.) with saline or three concentrations (0.25, 1 and 10 mg/kg) of *l*-deprenyl (DPN) 30 min before the bilateral intracerebroventricular injection of vehicle or 6-OHDA (100 µg/10 µL/hemisphere). Rats were sacrificed five days after the surgery and tissue content of dopamine, DOPAC, HVA and 3-MT was measured. Data represent mean±S.E.M. from 5-7 rats per group.

*p<0.05, **p<0.01 relative to the 6-OHDA treated group.

finity transport system에 의해 카테콜아민 신경에 축적된다. 6-OHDA은 매우 빠르게 산화되어 세포독성 물질인 과산화수소(H₂O₂)를 생성시켜 신경을 파괴하는 것으로 알려져 있다.²¹⁾

6-OHDA를 양측뇌실에 각각 100 µg씩 주입함으로써 선조체내에서 81%의 dopamine 고갈이 유도되었으며 대사체들인 DOPAC, HVA 및 3-MT도 각각 80%, 64% 및 48%의 유의적인 감소를 나타냈으나, 5-HT와 그 대사체(5-HIAA)의 유의적인 감소는 관찰되지 않았다(Table III, Fig. 4). 선조체와 함께 구조상 뇌실에 직접적으로 노출되어 있는 부위인 해마, 중격, 시상하부 및 뇌간 조직에서도 6-OHDA 투여에 의한 아민류 함량을 측정하였다. 중격에서는 선조체에서와 마찬가지로 6-OHDA 투여로 dopamine 함량이 현저하게 (90%) 감소하였고 5-HT 함량은 변화되지 않았으며, 해마에서는 dopamine의 유의적인 변화는 관찰되지 않았으나 5-HT와 5-HIAA이 각각 70%와 29%가 감소된 것으로 나타나 선조체와는 다른 양상을 나타냈다(Table III). 시상하부와 뇌간에서는 특별한 변화가 관찰되지 않았다(data not shown).

Commins 등²²⁾은 150 µg 및 200 µg의 6-OHDA 투여시 선조체내에서 유의적으로 dopamine 함량은 감소하고 5-HT은 증가하나, 반대로 해마에서는 5-HT의 양이 감소되어 상이한 결과를 나타냈다고 보고하였다. 본 실험에서도 200 µg의 6-OHDA 투여시 뇌 부위별로 아민류들의 변화가 다르게 관찰되었으며 이러한 부위별 차이는 Commins 등²²⁾이 지적한 바와 같이 뇌부위별로 6-OHDA의 독성효과에 대한 감수성(susceptibility)이 다르기 때문일 것으로 사료된다. 또한 고용량의 6-OHDA은 카테콜아민류뿐만 아니라 5-HT에도 영향을 미칠수 있으므로¹⁴⁾ 본 실험에서 사용한 6-OHDA의 용량도 이러한 변화의 요인으로서 작용하였을 가능성이

있다.

l-Deprenyl을 6-OHDA 주입 30분전에 전처치하였을 때 본 실험에서 투여된 *l*-deprenyl의 농도범위(0.25, 1 및 10 mg/kg)에서 용량 의존적은 아니었으나 세 농도에서 모두 *l*-deprenyl을 처치하지 않은 6-OHDA 병변쥐에 비해 선조체내의 dopamine 함량이 유의적으로 증가되었으며, DOPAC, HVA 및 3-MT 등의 대사체들 함량도 증가되었다(Fig. 4A). 세 농도의 *l*-deprenyl 전처치에 의해 모두 6-OHDA 병변쥐의 선조체내 dopamine 함량의 3배 정도 증가되었으며, vehicle 투여군인 정상 대조군 dopamine의 53~64%까지 회복되었다. 대사체인 DOPAC, 3-MT 및 HVA의 양도 증가하여 각각 정상 대조군의 33~56%, 77~97% 및 64~83%로 회복되었다. 따라서 6-OHDA에 대한 뇌내 아민과 그 대사체들의 고갈이 비교적 저농도의 *l*-deprenyl의 투여로 저해되었음을 알 수 있었다. 중격에서도 6-OHDA 주입 전에 1 mg/kg 및 10 mg/kg의 *l*-deprenyl 투여시 dopamine의 함량이 *l*-deprenyl을 처치하지 않은 6-OHDA 병변 흰쥐에 비해 각각 4.5배와 2.2배의 유의적인 증가를 나타냈다(Fig. 4B). 해마에서는 *l*-deprenyl 투여로 5-HT 함량이 6-OHDA 병변쥐보다 다소 증가하였으나 유의성은 없었으며, 뇌간 및 시상하부에서 dopamine, 5-HT 및 대사체의 함량변화는 관찰되지 않았다(data not shown).

본 실험에서 *l*-deprenyl은 1회 전처치만으로도 6-OHDA에 의한 뇌내 dopamine의 고갈을 유의적으로 억제하였다. Scarr 등¹⁵⁾은 6-OHDA으로 선조체내 dopamine 고갈(25%~97%)을 일으킨 후 *l*-deprenyl(2 mg/kg, i.p.)을 투여하였을 때 dopamine과 대사체들의 함량이 변화하지 않는 것으로 보아 *l*-deprenyl이 dopamine의 대사에 아무 영향을 미치지 않았다고 보고하였다. Finberg 등¹⁶⁾도 6-OHDA로 95%이상 dopamine 고갈을 일으킨 쥐의 미세투석법을 이용한 실험에서 *l*-deprenyl(1 mg/kg, s.c.) 후처치에 의한 dopamine 함량의 변화를 볼 수 없었으며 *l*-dopa 투여에 따른 선조체의 세포외액 중의 dopamine 함량변화에도 영향을 주지 못하였으므로 선조체내의 dopamine 대사에 MAO B가 크게 관여하지 않는다고 추론하였다. 이들 연구들이 모두 6-OHDA 주입 후에 *l*-deprenyl을 투여한 반면, 본 연구에서는 6-OHDA 주입 30분전에 *l*-deprenyl을 전처치하여 병변 쥐에서의 dopamine 증가효과를 관찰하였다. 따라서 6-OHDA에 의해 신경퇴

행이 일어난 후에는 *l*-deprenyl에 의한 dopamine 함량증가 효과를 크게 기대하기 어려우나 *l*-deprenyl을 전처치할 경우 6-OHDA에 의한 dopamine 신경독성 효과에 대해 보호효과를 나타낸다고 추측할 수 있다. 그 이외에 6-OHDA에 의한 선조체내 dopamine의 고갈 정도의 차이와 *l*-dopa와 같은 dopamine 전구물질의 투여에 따라 dopamine의 함량도 달라질 것이므로 이들 약물의 투여여부 등도 *l*-deprenyl의 6-OHDA에 대한 효과에 영향을 미칠 수 있다. 6-OHDA에 의한 신경독성에 대해 *l*-deprenyl이 보호효과를 나타내는 이유는 *l*-deprenyl에 의해 6-OHDA이 presynaptic neuron으로 흡수(uptake)되는 것이 저해되기 때문⁵⁾이거나 또는 6-OHDA에 의해 생성되는 산화 유리기들에 대한 scavenger 활성이 증가되기 때문²³⁾이라고 제기되고 있다. 본 실험에서 *l*-deprenyl의 전처치에 의해 6-OHDA에 의한 dopamine 고갈이 억제되어 6-OHDA 병변쥐보다 dopamine 및 대사체들의 함량이 증가되는 것으로 나타난 결과는 독성물질에 의한 신경과괴에 대한 억제효과로 인해 신경 말단이 존재하는 뇌조직내의 dopamine 함량이 증가되었다고 생각해 볼 수 있다. 6-OHDA의 신경독성은 MAO-catalyzed process와는 무관한 기전에 의한 것이라는 의견이 제시되고 있고, 본 실험에서 dopamine뿐만 아니라 그 대사체들의 농도가 증가한 것으로 미루어 6-OHDA에 대한 *l*-deprenyl의 보호작용은 단순한 MAO-B 저해 때문만은 아닌 것으로 사료된다.

결론

l-Deprenyl 1회 및 반복투여한 정상 쥐와 *l*-deprenyl을 전처치한 후 6-OHDA으로 선조체내 dopamine 고갈을 일으킨 파킨슨씨병 모델 병변쥐에서 뇌부위별로 dopamine, 5-HT 및 대사체들의 함량변화를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 정상쥐에서 *l*-deprenyl 1회 투여시 0.25 및 1 mg/kg의 용량에서는 선조체내 dopamine 및 5-HT 대사에 영향을 미치지 않으나 10 mg/kg에서 dopamine의 대사가 저해되었고, 0.25 및 1 mg/kg 용량을 3주간 반복투여시에도 선조체내 dopamine 대사가 용량의존적으로 저해되었으며, 본 실험조건에서 관찰된 *l*-deprenyl에 의한 dopamine 대사 저해 효과는 MAO B에 대한 억제작용에 의한 결과로 보여진다.

2. 6-OHDA(200 μ g)의 양측뇌실내 투여로 선조체와 중격에서 각각 81%와 90%의 dopamine 고갈이 유도되었다. L-Deprenyl을 전치치하였을 때 선조체와 중격에서 모두 L-deprenyl을 처치하지 않은 6-OHDA 병변위에서의 dopamine 함량에 비해 3배 정도 증가하였고, dopamine 대사체들도 선조체와 중격에서 모두 함량이 증가되었다. 이러한 결과로부터 dopamine 신경과괴가 일어나기 전에 L-deprenyl을 전치치할 경우 6-OHDA에 의한 신경과괴에 대한 억제효과로 인해 뇌조직내 dopamine 및 대사체들의 고갈이 억제되어 특히 dopamine 신경 말단이 존재하는 뇌조직내의 dopamine 함량이 증가될 수 있다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 과학재단의 여자대학 기반 확충사업 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Katzung, B. G. : Basic & Clinical pharmacology 6th ed., 419 (1995).
- 2) Knoll, J. and Magyar, K. : Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors, *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, **5**, 393 (1972).
- 3) Gerlach, M., Riederer, P. and Youdim, M. B. H. : The molecular pharmacology of L-deprenyl. *Eur. J. Pharmacol.*, **226**, 97 (1992).
- 4) Glover, V., Sandler, M., Owen, F. and Riley, G. J. : Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man, *Nature*, **265**, 80 (1977).
- 5) Heinonen, E. H. and Lammintausta, R. : A review of the pharmacology of selegiline, *Acta Neurol Scand*, **84**, suppl 136, 44 (1991).
- 6) Yang, H. Y. T. and Neff, N. H. : The monoamine oxidase of brain: selective inhibition with drugs and the consequences for the metabolism of the biogenic amines, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **189**, 733 (1974).
- 7) Wiener, H. L., Hashim, A., Lajtha, A and Sershen, H. : Chronic L-deprenyl-induced up-regulation of dopamine uptake carrier, *European Journal of Pharmacology*, **163**, 191 (1989).
- 8) Carrillo, M. C., Kanai, S., Nokubo, M. and Kitani, K. : Deprenyl induced activities of both superoxide dismutase & catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rat, *Life Sciences*, **48**, 517 (1990).
- 9) Cruz, C. P., Revilla, E., Steffen, V., Rodriguez-Gomez, J. A., Cano, J. and Machado, A. : Protection of aged substantia nigra of the rat against oxidative damage by (-)-deprenyl, *British journal of pharmacology*, **117**, 1756 (1996).
- 10) Le, W., Jankovic, J., Xie, W., Kong, R. and Appel, S. H. : (-)-Deprenyl protection of 1-methyl-4-phenylpyridium ion (MPP+)-induced apoptosis independent of MAO-B inhibition, *Neurosci. Lett.*, **224**, 197 (1997).
- 11) Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R. M. E., Ju, W. Y. H., Wadia, J. and Tatton, N. A. : Apoptosis in neurodegenerative disorders: potential for therapy by modifying gene transcription, *J. Neural. Transm., suppl* **49**, 245 (1997).
- 12) Gerlach, M., Youdim, M. B. H. and Riederer, P. : Is selegiline neuroprotective in Parkinson's disease?, *J. Neural. Transm. suppl*, **41**, 177 (1994).
- 13) Tatton, W. G., Ju, W. Y. L., Holland, D. P., Tai, C. and Kwan, M. : (-)-Deprenyl reduces PC12 cell apoptosis by inducing new protein synthesis, *J. Neurochem.*, **63**, 1572 (1994).
- 14) Tatton, W. G., Wadia, J. S., AChalmer-Redman, R. M. E. and Tatton, N. A. : (-)-Deprenyl reduces neuronal apoptosis and facilitates neuronal outgrowth by altering protein synthesis without inhibiting monoamine oxidase, *J. Neural. Transm. suppl* **48**, 45 (1996).
- 15) Scarr, E., Wingerchuck, D. M., Juorio, A. V. and Paterson, I. A. : The effects of monoamine oxidase B inhibition on dopamine metabolism in rats with nigro-striatal lesions, *Neurochem. Res.*, **19**, 153 (1994).
- 16) Finberg, J. P. M., Wang, J., Goldstein, D. S., Kopin, I. J. and Bankiewicz, K. S. : Influence of selective inhibition of monoamine oxidase A or B on striatal metabolism of L-DOPA in hemiparkinsonian rats, *J. Neurochem.*, **65**, 1213 (1995).
- 17) Zigmond, M. J. and Stricker, E. : Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: clin-

- ical and basic implications, *Int. Rev. Neurol.*, **31**, 1 (1989).
- 18) Breese, G. and Traylor, T. D. : Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine: Evidence for selective degeneration of catecholamine neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **174**, 413 (1970).
- 19) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 20) Green, A. R., Mitchell, B and Tordorff, A. : Evidence that dopamine deamination by both type A and type B monoamine oxidase in rat brain in vivo and for the degree of enzyme inhibition necessary to increase functional activity of dopamine and 5-hydroxytryptamine, *Br. J. Pharmacol.*, **34**, 181 (1977).
- 21) Sachs, C. and Jonsson G. : Mechanism of action of 6-hydroxydopamine, *Biochem Pharmacol.*, **24**, 1 (1975).
- 22) Commins, D. L., Shaughnessy, R. A., Axt, K. J., Vosmer, G and Seiden, L. S. : Variability among brain regions in the specificity of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced lesions, *J. Neural. Transm.*, **77**, 197 (1989).
- 23) Knoll, J. : The pharmacology of (-)-deprenyl, *J. Neural Transm.*, **22**(suppl), 75 (1986).