

Morphine을 전신투여한 랫드의 뇌에서 분비되는 amino acid성 신경전달물질 측정을 위한 미세투석법의 개선에 관한 연구

이장현 · Alvin J Beitz*

서울대학교 수의과대학 생리학교실
미네소타 수의과대학 생물학교실
(1998년 8월 10일 접수)

Study on the improvement of microdialysis method for measuring brain amino acids in systemic morphine treated rats

Jang-hern Lee, Alvin J Beitz*

Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University
*Department of Veterinary Biology, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota**
(Received Aug 10, 1998)

Abstract : In the present study, we designed and constructed new microdialysis probe in order to improve the efficacy and accuracy of microdialysis method. In addition, extracellular concentrations of GABA, glutamate, aspartate and glycine were monitored with new designed probe in the lateral portion of the ventrocaudal periaqueductal gray using unanesthetized and unrestrained rats. Furthermore, the effect of opiates on release of these amino acids, especially GABA, was analyzed by measuring their concentration in PAG dialysates following veratridine administration in the presence of systemic morphine. The results were summarized as follow :

1. The damaging rates of 1.0mm or 1.5mm window probe were 12.5% or 42.8%, respectively. In the group using 1.5mm window probe, the damaging area was extended into mesencephalic aqueduct because of microdialyzing pressure.
2. Because of the unique design of our probes with an opening facing one side, dialysis occurs in a hemisphere(600 μ m in mediolateral direction and 100 μ m in opposite side of the dialysis probe) around the opening rather than in a spherical shaped configuration which is typical of most commercially available probe designs.
3. Glutamate, taurine and glycine were present in the highest concentration in the dialysate sample obtained before treatment with veratridine, whereas, aspartate and GABA were present in the lowest concentration.
4. The concentration of all 5 amino acids increased significantly following 75 μ m veratridine

이 논문은 1995년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

Address reprint requests to Dr. Jang-hern Lee, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

perfusion into lateral ventrocaudal PAG.

5. There was no significant difference between basal and peak amino acid concentrations according to window sizes.

6. Morphine had no effect on baseline concentrations of amino acids in dialysates obtained from the lateral PAG as compared to saline treated controls. However, following veratridine treatment, morphine selectively affected GABA release in the lateral ventrocaudal PAG as compared to saline treated controls.

These results suggest that GABAergic interneurons in the PAG are inhibited by opioids. Therefore, endogenous enkephalins or endorphins may directly inhibit intrinsic GABAergic interneurons and block their tonic inhibition of PAG-NMR projection neurons. Moreover, new designed probes demonstrate improved efficiency and accuracy in collecting samples as compared to commercial types of microdialysis probes.

Key words : morphine, *In vivo* microdialysis, GABA, central gray, excitatory amino acids.

서 론

외인성 opioid peptides를 전신투여하거나 ventrocaudal periaqueductal gray(PAG)내에 직접 주입하였을 경우 진통 효과(antinociception)가 유발되며^{1,2} 이러한 진통효과는 PAG 내에 존재하는 opioid성 신경세포에 의해 PAG내의 억제성 중간뉴런(inhibitory interneuron)의 활동이 억제됨으로써 나타나는 것으로 밝혀져 있다³. 이들 억제성 중간뉴런의 활성억제에 의해 PAG에 존재하면서 nucleus raphe magnus내의 신경세포들의 활성을 조절하는 신경세포들이 이들 억제성 중간뉴런의 영향에서 벗어나게 되는 'disinhibition 현상'에 의해 결과적으로 척수내에서 강력한 진통효과를 나타내게 된다⁴⁻⁶.

최근에 이러한 진통기전에 직접적으로 관여하는 것으로 알려진 신경세포들에서 분비되는 신경전달물질을 마취를 하지 않은 실험동물의 중추신경계내 세포외액에 존재하는 amino acids나 기타 신경전달물질을 미세투석법에 의해 채취한 후 채취된 시료를 생화학적인 방법을 이용하여 분석함으로써 진통기전에 관여하는 신경전달물질을 밝히고자 하는 노력이 진행되고 있다^{7,8}.

따라서 본 연구에서는 미세투석법의 효율성 및 정확성을 향상시키고자 시판되는 기존의 microdialysis probe의 단점을 보완한 새로운 microdialysis probe를 설계, 제

작하여 실험동물의 PAG에서 분비되는 GABA성 신경전달물질 및 glutamate, aspartate, glycine, taurine과 같은 amino acid성 신경전달물질들의 기저농도(basal concentration) 및 veratridine을 투여하여 신경세포가 탈분극됨으로써 분비되는 최고농도(peak concentration)를 HPLC로 측정하였다. 뿐만 아니라 morphine을 전신투여한 실험동물에서 새로이 제작한 microdialysis probe를 이용하여 amino acid성 신경전달물질의 기저농도 및 veratridine의 투여에 의한 최고농도를 측정함으로써 외부에서 투여된 opiate가 PAG내의 이들 amino acid들의 분비에 미치는 영향을 검정하고자 하였다.

재료 및 방법

Dialysis tube의 제작 및 설치 : 본 실험에서는 225~350g Sprague-Dawley종 랫드를 사용하여 Ketamine과 Xylazine을 혼합한 마취제로 심마취한 후 두부의 정중선을 따라 절개한 후 20 gauge stainless guide cannula를 stereotaxic instrument를 이용하여 bregma 후방 A/P axis가 7.9 mm, 두개골의 표면에서 V/D가 6.8mm 및 정중선에서 M/L이 0.073mm 되는 곳에 설치하였다⁹. Guide cannula는 screw와 dental cement를 사용하여 두개골에 단단히 고정시키고 피부를 surgical clip으로 다시 봉합하였다. 수술후 6~10일경이 경과한 후 완전히 정상으로 회복된 실험동

물만을 본 실험에 사용하였다.

Microdialysis tube는 Fig 1에서 보는 바와 같이 직경 25 gauge인 stainless tube를 이용하여 제작하였으며, tube의 끝에서 부터 0.5mm 되는 부분에 길이가 각각 1 또는 1.5 mm 되는 collection window를 만들어 microdialysis membrane이 외부에 노출되도록 하였다. 직경이 200 μ m 되는 dialysis fiber(5,000mol wt cutoff; Spectrum Medical Industries)의 끝을 epoxy로 막고, microdialysis tube의 내로 삽입한 후 고정시켰다. 효과적인 microdialysis를 위해 dialysis fiber의 반대쪽 끝을 약 1.75mm 남겨두고 다시 epoxy로 덮은 후 microdialysis probe의 반대쪽 끝을 microline tubing을 통해 fluid swivel에 연결시켰다. Silica capillary tube(145 μ m o.d., Cole Parmer, Chicago, IL)을 microline tube의 작은 구멍을 통해 dialysis tube내로 주입하였다. 주입된 silica capillary tube를 microdialysis probe의 outflow의 통로로 이용되는 PE-10 tube에 고정하였다. Microdialysis tube의 제작이 끝나면 이 tube를 peristaltic pump(Rainin Rabbit-Plus)에 연결하고 60 μ l 정도의 시료를 Gilson microfraction collector로 채취하여 microdialysis tube의 연결상태를 점검하였다.

투석범위 및 방향에 대한 검정 : 시료채취가 끝난 실험동물은 17.5% chloral hydrate로 심마취시켜 4% paraformaldehyde를 포함한 0.1M Sorenson's buffer로 심장을 통해 관류시켜 뇌조직을 고정하였다. 고정이 끝난 뇌조직을 실험동물에서 즉시 분리하여 microdialysis probe가 이식되었던 PAG를 중심으로 cryostat를 사용하여 연속절편을 제작한 후 microdialysis probe가 설치된 위치를 조사하였으며 microdialysis probe 자체에 의한 조직학적 손상 여부도 광학현미경을 통해 관찰하였다. Microdialysis probe를 통해 fluorogold(0.1%)를 주입하여 dialysis 범위 및 방향을 측정하고자 하였다. Microdialysis probe가 정확히 PAG의 ventrolateral 부위에 이식되었고, 손상의 정도가 생리학적인 범위를 벗어나지 않은 실험동물에서 얻은 시료만을 결과 분석에 사용하였다.

Baseline 농도측정 : Microdialysis tube를 설치하고 18~20시간이 경과한 후 실험동물이 미세투석 장비와 케이지에 익숙해져 안정상태에 들어갔는지의 여부를 실험동물의 행동을 통해 평가하였다. 실험동물이 안정상태에 들어간 것을 확인한 후 microdialysis tube를 통해 Ringer's solution(147mM NaCl, 4.0mM KCl 및 2.2mM CaCl₂; pH 7.4; osmolarity = 300mOsmol)을 3~5 μ l/min의 속

도로 45~60분 가량 관류시켜 확산평형(diffusion equilibrium)에 도달하게 한 후에 실험동물당 최소 8시료 이상을 채취하였다. Microdialysis probe의 window 크기에 따라 각각 5마리의 실험동물을 사용하여 amino acid의 기저농도를 측정하였다. 시료의 채취는 12분의 간격으로 polypropylene tube에 모아서 HPLC로 분석할 때까지 4 $^{\circ}$ C에서 냉장보관하였다.

Veratridine 및 morphine의 투여 : 신경세포의 활성을 증가시키기 위해 75 μ m의 veratridine(Sigma)을 modified Ringer's solution에 희석하여 120분동안 microdialysis probe를 통해 주입하였다. Veratridine에 의한 신경세포의 활성 증가에 morphine의 전신투여가 미치는 영향을 알아보기 위해 veratridine을 microdialysis probe를 통해 주입하기 12분 전에 morphine(10mg/kg, Eli Lilly Co.)을 복강내로 주사하였다. 대조군의 실험동물은 동량의 생리식염수를 복강내로 주사하였다.

HPLC를 이용한 baseline의 분석 : 실험동물당 8개의 시료를 채취하여 sample 중의 amino acids 농도를 precolumn ophthaldialdehyde(OPA) derivatization 법¹⁰으로 측정하였다. 시료에 함유된 amino acid들의 농도는 spectrovision fluorometer가 부착된 Gilson dual pump HPLC를 사용하여 측정하였다. 12 μ l의 OPA를 49 μ l의 시료와 혼합하여, 2분간 반응이 일어나도록 기다린 후 총 41 μ l의 혼합물을 column에 주입하였다. Non linear gradient를 나타내는 5~60% methanol을 함유한 sodium acetate buffer로 C18 reverse phase column(Phenomenex; 250mm \times 4.6mm)을 이용하여 amino acid를 약 12분간 분리하고, 유도체들을 spectrovision fluorometer로 분석하였다. Amino acid의 basal concentration은 picomole로 표시하였으며, 약물처치후 정량한 amino acid의 농도는 평균 peak concentration에서 basal concentration을 뺀 수치로 표시하였다.

결과분석 : 실험결과는 ANOVA *t*-test(Statview 512+ Software, Brainpower Inc., Abacus Concept Inc., 1986)를 이용하여 통계처리 하였으며 probability values를 측정하기 위해 Scheffe F test를 실시하며, 실험동물간의 variance도 고려하였다.

결 과

Microdialysis probe의 위치, dialysis 범위 및 방향에 대한 검정 : 본 실험에 사용했던 microdialysis probe는

Fig 1에 도시된 바와 같이 제작하였으며, 시료를 채취하는 통로로 사용되는 probe window의 크기가 각각 1mm 또는 1.5mm가 되도록 제작하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 실험동물의 PAG에 삽입했던 microdialysis probe의 위치를 시료의 채취가 끝난 직후 실험동물의 뇌를 절편으로 제작하여 조직학적으로 검정하였다. Microdialysis probe의 위치가 정확히 PAG의 ventrolateral 부위에 위치한 실험동물에서 채취한 시료만을 baseline 측정 및 morphine 투여에 의한 baseline 변화에 대한 실험에 사용하였다. Fig 2A에서 보는 바와 같이 microdialysis probe는 실험동물의 PAG의 ventrolateral 부위에 정확히 위치하고 있었으며, 본 실험에 사용했던 1mm 크기의 window를 bar의 형태로 표시하였다. 1mm 및 1.5mm의 microdialysis window를 실험동물의 뇌에 고정할 때의 발생하는 microdialysis membrane의 파손율은 각각 12.5% 및 42.8%로 나타났으며 특히 1.5mm의 window의 경우 microdialysis시 용액을 주입할 때 발생하는 압력에 의해 mesencephalic aqueduct까지 조직파손의 범위가 확장되어 관찰되었다. Microdialysis probe를 통해 fluorogold를 주입하여 측정된 투석의 범위는 1mm 및 1.5mm인 window의

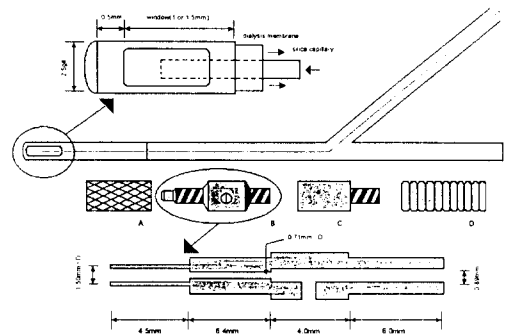


Fig 1. Schematic diagram of the microdialysis probes developed in these studies. Probes are cut to length using a laser milling machine. The collect body attaches to the outer guide cannula, which is inserted up to the machined stop. Probes insert into the stainless collect body and are fixed with a set screw. The 1mm or 1.5mm window in the probe tip is also laser-cut for reproducible area. The 0.5mm probe tip protects the dialysis membrane in the probe window during insertion. Tubing from the probe was threaded through a stainless steel support spring that attached to the butt of the collect body. The entire assembly was suspended from a counter-balanced fluid swivel and did not influence the animal's posture or motion.

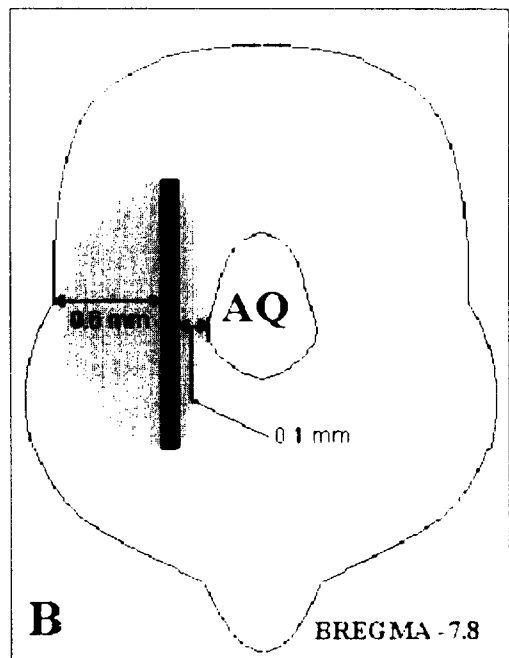


Fig 2. A: Photomicrograph of a representative transverse section of the midbrain depicting the placement of a microdialysis probe in the lateral PAG. The solid bar represents the location of the actual length (1mm) of dialysis window. B: Schematic drawing depicting the approximate dialysis area that illustrated the extent of fluorogold labeling following 0.1% fluorogold infusion into the PAG.

전방으로 각각 600 μ m 및 700 μ m로 측정되었다. Window의 후방으로는 probe로부터 100 μ m 이하로 fluorogold 입자가 분산되었음이 관찰되었다. Fig 2B는 1mm 크기의 window를 사용하였을 때 fluorogold 입자가 분산되어 나간 범위를 표시하였다.

Veratridine 투여에 의한 amino acid의 분비효과 : Lateral ventrocaudal PAG로부터 투석한 시료중에 존재하는 amino acid(GABA, glutamate, aspartate, glycine, taurine)의 평균 basal concentration 및 veratridine의 투여로 인한 평균 peak concentration을 HPLC를 이용하여 측정하였다(Table 1). Veratridine을 투여하기 전과 후에 채취한 시료 내에서 glutamate, taurine 및 glycine은 고농도로 존재하는 반면 GABA와 aspartate의 경우 극히 낮은 농도로 측정되었다. Veratridine(75 μ m)을 microdialysis tube를 통해 주입하여 신경세포를 탈분극시켰을 경우 amino acid의 최고 농도가 기저농도에 비해 급격히 증가하는 양상을 나타내었다. GABA, aspartate 및 glutamate의 경우 veratridine을 주입한 후 baseline에 비해 각각 약 10,000%, 2,400% 및 1,100%의 증가를 나타내었다. 반면 taurine과 glycine의 경우 veratridine의 투여후 baseline에 비해 각각 약 500% 및 200%의 증가를 나타내었다. Microdialysis probe의 window 크기에 따라 PAG에서 분비되는 amino acid의 basal concentration 및 peak concentration은 통계학적으로 차이를 나타내지 않았다($p < 0.05$).

Amino acid 분비량에 대한 morphine 전신투여의 효

과 : Morphine을 전신투여한 실험동물의 lateral ventrocaudal PAG에서 분비되는 amino acid의 기저농도와 veratridine의 투여에 의해 신경세포의 활성이 증가함으로써 나타나는 최고농도를 측정하였다(Fig 3). Morphine 전처치에 의해 lateral ventrocaudal PAG 내에서 분비되는 amino acid들의 basal concentration은 영향을 받지 않았다(data not shown). 하지만 veratridine을 전처치하여 신경세포의 활성을 증가시킨 처치군의 경우 morphine의 전처치에 의해 lateral ventrocaudal PAG에서 GABA의 분비가 선택적으로 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다($p < 0.05$).

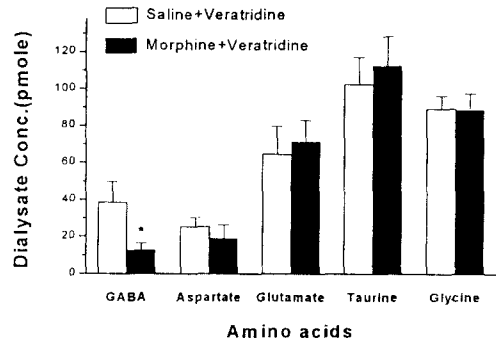


Fig 3. Effects of morphine(10mg/kg b.wt.) or saline treatment on veratridine(75 μ M)-induced release of amino acids in the lateral ventrocaudal PAG *in vivo*. An asterisk indicated $p < 0.05$ by ANOVA and Sheffe post hoc tests between morphine and saline-treated levels.

Table 1. Mean basal concentrations and mean veratridine-induced peak concentrations of amino acids in PAG dialysate using 1mm or 1.5mm dialysis window.

Amino acid baseline concentration(pmol) and peak values(pmol) following veratridine-induced release in the dialysate of the lateral ventrocaudal PAG. Baseline amino acid concentrations and peak concentrations represent mean \pm S.E.M. values. All amino acids shown in the table were significantly($p < 0.05$) increased from baseline after veratridine stimulation. There was no significant difference between groups that used either 1mm or 1.5mm dialysis window.

| Amino acids | Baseline(pmol) | | Veratridine induced peak release(pmol) | |
|-------------|-------------------|-------------------|--|--------------------|
| | 1mm | 1.5mm | 1mm | 1.5mm |
| GABA | 0.35 \pm 0.12 | 0.42 \pm 0.98 | 30.12 \pm 6.72 | 32.07 \pm 8.31 |
| Aspartate | 0.92 \pm 0.20 | 1.12 \pm 0.74 | 24.16 \pm 11.20 | 27.43 \pm 15.03 |
| Glutamate | 7.12 \pm 1.21 | 7.96 \pm 2.45 | 73.05 \pm 27.88 | 75.89 \pm 31.71 |
| Taurine | 15.13 \pm 3.25 | 18.13 \pm 4.36 | 73.18 \pm 16.75 | 76.03 \pm 20.15 |
| Glycine | 61.21 \pm 11.89 | 65.34 \pm 15.07 | 130.44 \pm 39.01 | 140.15 \pm 50.75 |

고 찰

현재 가장 보편적으로 사용되고 있는 *in vivo* 미세투석법은 Tossman과 Ungerstedt¹¹에 의해 종래의 방법이 가지는 문제점을 보완수정하여 개발된 방법으로서 마취를 하지 않은 상태의 실험동물에 inner tube와 outer tube로 구성된 microdialysis probe를 외과적인 방법으로 설치한 후 실험동물이 케이지 내에서 자유롭게 움직이는 동안 특정 자극이나 약물의 투여에 의해 신경세포들이 세포외액으로 분비하는 신경전달물질들을 microdialysis membrane을 통해 채취하여 정량 및 정성분석을 할 수 있는 방법이다.^{12,13} 뿐만 아니라 dialysis membrane의 pore 크기를 조절함으로써 특정 신경전달물질을 선택적으로 채취할 수 있을 뿐만 아니라 실험에 필요한 약물을 투여하는데도 이용되고 있다.^{6,14}

한편 microdialysis tube를 뇌조직에 설치할 경우 조직의 대사에 심각한 불균형을 초래하는 것으로 밝혀져 있으며^{15,16} 미세투석법에 의해 채취된 신경전달물질들이 실제로 자극에 의해 신경세포에서만 분비된 것인지 아니면 미세투석시 발생할 수 있는 물리적인 자극에 의해 신경세포가 파괴되어 세포내의 성분이 유출되었는지의 여부를 정확히 검정해야 하는 것으로 알려져 있다. 또한 시료를 채취하고자 목적했던 뇌의 특정 nucleus 내에서 시료가 채취된 실제 범위를 반드시 고려해야 한다. 이러한 방법상의 문제점중 시판되는 microdialysis probe의 dialysis membrane이 probe의 끝에 위치하고 있어 투석되는 방향 및 부위를 조절하는 것이 불가능했던 것이 사실이다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위해 probe의 측면에 크기가 각각 1mm 및 1.5mm인 window를 제작하고, fluorogold를 투여하여 실제로 투석되는 방향 및 범위를 검정하고자 하였다. 1mm 및 1.5mm의 microdialysis window를 실험동물의 뇌에 고정할 때의 발생하는 microdialysis membrane의 파손율은 각각 12.5% 및 42.8%로 나타나 1.5mm의 window가 1mm 크기의 window에 비해 membrane의 파손율이 급격히 증가하였다. 특히 1.5mm의 window의 경우 microdialysis시 용액을 주입할 때 발생하는 압력에 의해 mesencephalic aqueduct까지 조직파손의 범위가 확장되는 것으로 관찰되어 채취한 시료에 다량의 뇌척수액이 함유될 것으로 추측된다. 뿐만 아니라 microdialysis probe를 통해 fluorogold를 주입하여 측정한

dialysis 범위는 1mm 및 1.5mm인 window의 전방으로 각각 600 μ m 및 700 μ m로 측정되었으며 window의 후방으로는 probe로부터 100 μ m 이하로 fluorogold 입자가 분산되었음이 관찰되었다. 이는 기존의 probe에 비해 시료 채취 부위를 특정한 부위로 국한시키는데 일조를 할 것으로 사료된다. Table 1에서 보는 바와 같이 window의 크기에 따라 amino acid의 기저농도는 통계적으로 유의성을 관찰할 수 없었으나 1.5mm의 window가 1mm 크기의 window에 비해 측정치간의 variation이 증가하는 양상을 보였다. 이러한 현상은 1.5mm 크기의 window가 1mm window에 비해 membrane의 파손율이 높았으며, mesencephalic aqueduct까지 조직파손의 범위가 확장되어 시료에 다량의 뇌척수액이 함유되었기 때문으로 생각된다. 따라서 1.5mm 크기의 window 보다는 1mm 크기의 window를 사용하는 것이 실험의 정확도 및 재현성을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

Morphine이나 opioid peptides를 전신투여하거나 뇌의 ventrocaudal periaqueductal gray(PAG)에 직접 주입하였을 경우 진통효과를 유발하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 진통효과는 PAG 내에 존재하는 억제성 중간뉴론들의 활동이 외부에서 투여된 opioid agonist에 의해 억제됨으로서 일어난다고 추측하고 있다.^{2,4-6} 세부적으로 밝혀진 antinociception의 기전은 뇌의 다른 부분에서 PAG 내의 opioid 분비 신경세포의 말단에서 분비되는 opioid에 의해 PAG 내의 중간뉴론의 활동이 억제됨으로서 일어난다. 따라서 interneuron의 활성억제는 PAG에서 nucleus raphe magnus로 투사(projection)하는 신경들의 활성이 중간뉴론의 억제에서 벗어나게 되어 결과적으로 척수내에서 진통효과를 나타내게 된다.³ 이들 중간뉴론들은 GABA를 분비하여 억제효과를 나타내는 것으로 보고되어 있으며,^{5,18} quantitative electron microscope를 이용하여 PAG-NMR neuron이 직접적으로 GABAergic neuron의 지배를 받는다는 것이 재확인 되었다.^{19,20}

본 연구에서는 새로이 제작된 microdialysis probe를 사용하여 PAG 내에서 분비되는 신경전달물질들의 기저농도 및 veratridine을 투여함으로써 나타나는 최고농도를 조사하고, morphine을 전신투여한 실험동물을 이용하여 PAG에 존재하는 신경전달물질의 분비에 morphine의 전신투여가 어떠한 영향을 미치는지를 검정해 보았다. Veratridine을 투여하기 전과 후에 채취한 시료내에서 glutamate, taurine 및 glycine은 고농도로 존재하는 반면

GABA와 aspartate의 경우 극히 낮은 농도로 측정되었다. 본 실험에서 관찰할 수 있었던 이들 amino acid의 기저농도는 앞서 보고된 바 있는 중추신경계내의 다른 부위와 일치한다^{8,20}. Veratridine(75 μ m)을 microdialysis tube를 통해 주입하여 신경세포를 탈분극시켰을 경우 amino acid의 최고농도가 기저농도에 비해 급격히 증가하는 양상을 나타내었다. 특히 GABA의 경우 veratridine을 투여하기 전의 기저농도에 비해 약 100배에 가까운 증가를 나타내었다. 이러한 PAG 내에서의 veratridine에 의한 GABA의 분비증가는 Beitz¹⁷에 의해 보고된 바 있는 nucleus raphe magus에서 나타나는 veratridine에 의한 GABA의 분비양상(약 50배 증가)과 일치한다. PAG 내에서 veratridine에 의한 GABA의 분비증가가 nucleus raphe magnus에 비해 높게 관찰되는 이유는 PAG 내에 존재하는 GABA를 생산, 분비하는 신경세포의 수가 nucleus raphe magnus에 비해 많기 때문으로 추측된다^{19,21}. Morphine을 전신투여한 실험동물의 lateral ventrocaudal PAG에서 분비되는 amino acid의 기저농도와 veratridine의 투여에 의해 신경세포의 활성이 증가함으로써 나타나는 최고농도를 측정 한 결과 morphine 전처치에 의해 lateral ventrocaudal PAG 내에서 분비되는 amino acid들의 기저농도는 영향을 받지 않았다. 하지만 veratridine을 전처치하여 신경세포의 활성을 증가시킨 처치군의 경우 morphine의 전처치에 의해 lateral ventrocaudal PAG에서 GABA의 분비만이 선택적으로 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 이러한 양상으로 미루어 볼 때 전신투여한 morphine이 PAG 내의 GABA를 분비하는 신경세포에 작용하여 ventromedial medulla에 영향을 미치는 신경세포들을 GABA의 억압에서 벗어나게 함을 의미하고 있다.

결 론

본 연구에서는 microdialysis 법의 효율성 및 정확성을 향상시키고자 시판되는 기존의 microdialysis probe의 단점을 보완한 새로운 microdialysis probe를 설계, 제작하여 실험동물의 PAG에서 분비되는 GABA성 신경전달물질 및 glutamate, aspartate, glycine, taurine과 같은 amino acid성 신경전달물질의 basal level 및 veratridine을 투여하여 신경세포가 탈분극됨으로써 분비되는 최고농도를 HPLC로 측정하였다. 뿐만 아니라 morphine을 전신투여한 실험동물에서 새로이 제작한 microdialysis probe를 이용하여 amino

acid성 신경전달물질의 기저농도 및 veratridine의 투여에 의한 최고농도를 측정함으로써 외부에서 투여된 opiate가 PAG 내의 이들 amino acid들의 분비에 미치는 영향을 검증하고자 하였다. 실험결과는 다음과 같다.

1. 1mm 및 1.5mm의 microdialysis window를 이용하여 실험동물의 뇌에 고정할 때의 발생하는 microdialysis membrane의 파손율은 각각 12.5% 및 42.8%로 나타났으며 특히 1.5mm의 window의 경우 microdialysis시 용액을 주입할 때 발생하는 압력에 의해 mesencephalic aqueduct까지 조직파손의 범위가 확장되어 관찰되었다.

2. Microdialysis probe를 통해 fluorogold를 주입하여 측정 한 dialysis 범위는 1mm 및 1.5mm인 window의 전방으로 각각 600 μ m 및 700 μ m로 측정되었다. Window의 후방으로는 probe로부터 100 μ m 이하로 fluorogold 입자가 분산되었음이 관찰되어 시료의 채취범위를 특정부위로 국한시킬 수 있을 것으로 사료된다.

3. Veratridine을 투여하기 전과 후에 채취한 시료내의 glutamate, taurine 및 glycine의 기저농도는 고농도로 존재하는 반면 GABA와 aspartate의 경우 극히 낮은 농도로 측정되었다.

4. Veratridine(75 μ m)을 microdialysis tube를 통해 주입하여 신경세포를 탈분극시켰을 경우 amino acid의 기저농도가 최고농도에 비해 급격히 증가하는 양상을 나타내었다.

5. Microdialysis probe의 window 크기에 따라 PAG에서 분비되는 amino acid의 기저농도 및 최고농도는 통계학적으로 차이를 나타내지 않았다.

6. Morphine 전처치에 의해 lateral ventrocaudal PAG 내에서 분비되는 amino acid들의 기저농도는 영향을 받지 않은 반면 veratridine을 전처치하여 신경세포의 활성을 증가시킨 처치군의 경우 morphine의 전처치에 의해 lateral ventrocaudal PAG에서 GABA의 분비가 선택적으로 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다.

이상의 결과로 기존의 microdialysis에 비해 본 연구에서 제작한 probe가 시료의 채취범위를 특정부위에 국한시킬 수 있는 장점이 있으며, 측면에 제작된 window는 probe의 설치시 일어나는 membrane의 손상을 최소화 할 것으로 사료된다. 새로이 제작된 probe를 이용하여 PAG 내의 amino acid들의 기저농도 및 최고농도를 측정하고, 전신투여한 morphine에 의해 나타나는 이들 amino acid의 분비량의 변화를 측정 한 결과, 전신투여한 morphine

이 PAG 내의 GABA를 분비하는 신경세포에 작용하여 ventromedial medulla에 영향을 미치는 신경세포들을 GABA의 억압에서 벗어나게 함으로써 진통효과를 발휘할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Yaksh TL, Yeung JC, Rudy TA. Systemic examination in the rat brain sites sensitive to the direct application of morphine: observation of differential effects within the periaqueductal gray. *Brain Res*, 114:83-101, 1976.
2. Williams FG, Mullet MA, Beitz AJ. Basal release of Met-enkephalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat: a microdialysis study of antinociceptive circuits. *Brain Res*, 690:207-216, 1995.
3. Beitz AJ. Anatomic and chemical organization of descending pain modulation systems. In CE Short and AV Poznak, ed *Animal Pain*, Livingstone Press, New York:31-62, 1991.
4. Yaksh TL. Central nervous system sites mediating opiate analgesia. In JJ Bonica, ed *Advances in pain research and therapy*, Raven, New York:229-259. 3, 1979.
5. Depaulis A, Morgan MM, Liebeskind JC. GABAergic modulation of the analgesic effect of morphine microinjected in the ventral periaqueductal gray matter of the rat. *Brain Res*, 436:223-228, 1987.
6. Renno WM, Mullett MA, Beitz AJ. Systemic morphine reduces GABA release in the lateral but not the medial portion of the midbrain periaqueductal gray of the rat. *Brain Res*, 594:221-232, 1992.
7. Benveniste H. Brain microdialysis. *J Neurochem*, 52: 1667-1674, 1989.
8. Di Chiara G. *In vivo* brain dialysis of neurotransmitters. *Trends Pharmacol Sci*, 11:116-121, 1990.
9. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed, Academic Press, Australia, 1986.
10. Lindroth O, Mopper K. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Anal. Chem*, 51:1667-1674, 1974.
11. Tossman U, Ungerstedt U. Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta physiol Scand*, 128:9-14, 1986.
12. Hagberg H, Andersson P, Lazarewicz J, et al. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem*, 49:227-231, 1987.
13. Damsma G, Westerink BHC, De Vries JB, et al. Measurement of acetylcholine release in freely moving rats by means of automated intracerebral dialysis. *J Neurochem*, 48:1523-1528, 1987.
14. Benveniste H, Diemer MH. Early postischemic Ca accumulation in rat dentate hilus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8:713-719, 1988.
15. Young AMJ, Bradford HF. EXcitatory amino acid neurotransmitters in the corticostriate pathway: studies using intracerebral microdialysis *in vivo*. *J Neurochem*, 47:1399-1404, 1986.
16. Church WH, Justice JB, Neill DB. Detecting behaviorally relevant changes in extracellular dopamine with microdialysis. *Brain Res*, 412:397-399, 1987.
17. Beitz AJ, Relationship of glutamate and aspartate to the periaqueductal gray-raphé magnus projection: analysis using immunocytochemistry and microdialysis. *J Histochem Cytochem*, 38:1755-1765, 1990.
18. Osborne RH, Bradford HF. Patterns of amino acid release from nerve-endings isolated from spinal cord and medulla. *J Neurochem*, 21:407-419, 1973.
19. Reichling DB, Basbaum AI. Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. *J Comp Neurol*, 302:370-377, 1990.
20. Beitz AJ, Williams FG. Localization of putative amino acid transmitters in the PAG and their relationship to the PAG-raphé magnus pathway. *The Midbrain Periaqueductal Gray Matter*, In A Depaulis and R Bandler, Plenum, New York:305-327, 1991.
21. Blessing WW. Distribution of Glutamate decarboxy-

lase containing neurons in rabbit medulla oblongata
with attention of intramedullary and spinal projection.

Neuroscience, 37:171-185, 1990.
