

Tropinone 유도체의 항경련성 효과 평가

김익수 · 서덕준*

동아대학교 의과대학 생리학교실

Evaluation of the anticonvulsant effect of tropinone derivatives

Ick-Soo Kim and Duk-Joon Suh*

Department of Physiology, College of Medicine, Dong-A University, Busan, 602-714, Korea

Abstract

The aim of this study was to evaluate the anticonvulsant activity of four agents derived from tropinone (T-1: 2,4-dipyrrolylmethenylnortropinone, T-2: 2,4-diphenylmethenylnortropinone, T-3: 2,4-difurfurylmethenylnortropinone, T-4: 2,4-dimethoxyphenylmethenylnortropinone) in NIH Swiss mouse. Pentylenetetrazole (PTZ) was injected via intraperitoneum in mouse and Maximal Electroshock (MES) stimulation was through both conjunctivas by electrodes. Tropinone derivatives were treated at 15 minutes before PTZ or MES procedure. PTZ of 25 mg/kg induced generalized seizure in mouse, effects of tropinone derivatives on PTZ-induced seizure were monitored. Compared with control group, T-4 decreased seizure grade most effectively. Also T-4 increased onset time of PTZ-induced seizure. This result showed that T-4 is most effective on PTZ-induced seizure. In MES-induced seizure, T-1 decreased seizure grade and recovery time. nNOS expression in hippocampus and cortex were increased in PTZ- and MES-induced seizure animals compared with control. Pretreatment of tropinone derivatives in PTZ-induced seizure did not affected nNOS expression in brain tissues, but T-1 and T-4 decreased nNOS expression in cortex of MES-induced seizure animals. These findings suggest that tropinone derivatives have specific anticonvulsant activities according to PTZ- and MES-induced seizure. 2,4-dimethoxyphenylmethenylnortropinone is most effective in PTZ-induced seizure and 2,4-dimethoxyphenylmethenylnortropinone is most effective in MES-induced seizure.

Key words – tropinone derivatives, anticonvulsant, PTZ, MES, nNOS

서 론

인류에게는 다양한 질환들이 있으며, 그 가운데 생명에
는 지장이 없으나 사회활동에 막대한 지장을 초래하는 것
들이 있다. 이러한 질환들 중의 하나로 간질(epilepsy)을 들

수 있다. 현재 전세계적으로 인구의 약 1% 정도가 경련성
질환인 간질 환자로 추정되고 있으며, 미국의 경우만 하더라도
약 250만명의 경련성 환자가 있는 것으로 집계되고
있다[13].

간질 치료는 수술적 요법이나 약물요법을 사용한다. 그
중 약물요법을 사용하기 위해 1938년 Parke-Davis사가
diphenylhydantoin을 개발한 이래 현재까지 felbamate, gar-
bapentin 등 많은 항경련제가 개발되었다. 현재까지 소위

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : (051)240-2927, Fax : (051)246-6481
E-mail : djsuh@daunet.donga.ac.kr

간질을 치료하기 위해 임상적으로 사용되고 있는 항경련제는 화합물의 구조에 따라 (1) hydantoin 류, (2) oxazolidine 류, (3) babital 류, (4) succinimide 류, (5) benzodiazepine 류, (6) acylurea 류와 기타 약물로서 carbamazepine, valproic acid 등으로 나누어진다[22]. 이들 항경련성 화합물의 활성은 대개 임상적으로 매우 다양한 양상을 나타내며, 많은 문제점을 노출시키고 있다. 따라서 경련성 질환을 치료하기 위해서는 몇 가지 약물이 복합 투여되는 것이 관례이며, 특성상 장기적인 약물투여로 인한 부작용 및 약물의 내성에 대한 문제가 매우 심각하다[4,14]. 따라서 현재 이들 경련성 질환에 이상적으로 작용하는 새로운 항경련성 화합물의 검색 연구가 매우 활발하게 진행되고 있으며, 특히 과거의 약물과 전혀 다른 작용기전을 갖는 항경련성 물질인 vigavatrine이 1979년 신약으로 소개되었으며, zonisamide, gabapentin, lamotrigone, oxacabazepine, 그리고 1993년 meprobamate의 analog인 felbamato이 미국 식품의약청(FDA)의 승인을 받아 항경련제로 임상에 사용되고 있다. 이 이외에도 약 10여종의 항경련성 화합물이 간질 치료제의 후보물질로 개발되었다[12].

이와 같이 매우 다양한 작용기전과 다양한 형태의 항경련제에 관한 연구가 진행중에 있으며, 세계적으로 약 1%에 달하는 인구가 경련성 환자이므로 경련치료제로서 항경련 화합물의 무한한 시장성과 관련하여 Cieba-Geigy, Eli Lilly 등을 비롯한 몇몇 유수의 기업에서 많은 연구가 추진되었다[10,12].

현재까지 사용되고 있는 항경련성 약물들의 단점을 극복하기 위하여 여러 가지의 항경련성 약물이 신규 항경련제로 개발되어 왔으며, 항경련제의 구조활성과 항경련효과는 밀접한 관계가 있으므로 구조와 작용에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 아직까지 tropinone 유도체들의 항경련 효과에 대한 연구는 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 최근 동아대학교 자연과학대학 화학과에서 합성한 tropinone 유도체로서 표 1에서 제시하는 약물들을 이용하여 항경련제의 구조와 작용의 관계를 밝히고 새로운 항경련제를 개발하기 위하여 합성된 여러 유도체를 이용하여 실험동물에서 항경련효과를 검증하고자 하였다. 경련유발제인 pentylenetetrazol (PTZ)에 의한 경련 및 경련유발전기자극인 Maximal Electroshock (MES)에 의한 경련에서 유도체들의 효과를 비교하여 항경련 효과가 높은

Table 1. Seizure grade

Grade	Seizure state
0	normal activity
+1	static posture
+2	Kangaroo posture
+3	rolling movement
+4	tonic status but not extended lower extrimites
+5	extended lower extrimites

항경련제를 선별하고 신경독성 정도를 검증하고자 하였다.

현재 합성된 여러 항경련제 역시 항경련 동물시험에서 MES 혹은 PTZ test 중 한가지의 test에만 활성을 보인다고 보고되었다[3]. 따라서 실제 임상적용시 일부 경련에만 억제 효과를 보일 뿐 경련의 재 증상을 일반적으로 억제시키기에는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 기존의 항경련제보다 그 적용범위가 넓고 항경련활성이 우수한 신규 항경련성 화합물을 개발하고자 동아대학교 화학과의 도움으로 합성된 항경련 화합물을 사용하였다. 이들의 작용기전 및 항경련 화합물의 구조활성 상관관계를 근거로 하여 이들 활성물질에 대한 PTZ 및 MES 유발 경련의 1차 항경련 활성검색 및 신경독성 평가로 뇌조직의 neuronal nitric oxide synthase (nNOS) 단백질 발현에 미치는 효과를 조사하였다.

본 연구인 항경련 효과의 생체 평가 결과는 신경독성이 적게 나타나며 항경련 효과가 높은 약물을 선별한 후 새로운 유도체 합성에 대한 자료로 제시되어 향후 새로운 항경련 약물의 합성 진행에 대한 방향을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 male NIH Swiss mouse (25~30 g)을 사용하였다. 독립된 케이지에서 사육하며 12시간씩 주간과 야간을 구분하여 조명을 비추며, 사료와 물은 충분히 공급하였다. 실험동물을 대조군, PTZ 투여군, PTZ 투여 15분전 tropinone 유도체 전처치군과 대조군, MES test군, MES test 15분전 tropinone 유도체 전처치군으로 나누어 경련을 유발시켰다. 각 군의 뇌를 적출하여 해마부와 피질부를 분

리하여 nNOS의 변화를 Western blot을 이용하여 비교하였다. 각 군에서 PTZ에 의한 경련은 최초의 myoclonic jerk가 나타내는 시간을 경련시작시간(latent period)으로 하고 seizure scale (표 1)에 의한 경련의 정도와 형태를 기록하였다. MES에 의한 경련에서는 경련의 정도와 경련지속시간을 측정하여 항경련 효과를 비교하였다.

2. Tropinone 유도체

합성된 tropinone 유도체들의 화학명칭 및 구조는 표 2와 같다. 약물의 명칭을 간략히 사용하기 위하여 T-1: 2,4-dipyrrolylmethenylnortropinone, T-2: 2,4-diphenylmethenylnortropinone, T-3: 2,4-difurfurylmethenylnortropinone, T-4: 2,4-dimethoxyphenylmethenylnortropinone 등으로 약어를 사용하였다. 실험에 사용한 약물들은 동아대학교 화학과에서 합성하였으며 methenylnortropinone에 서로 다른 작용기가 결합되어 있는 형태이다. 항경련효과 실험시 분말 형

Table 2. Tropinone derivatives used in this study
2,4-disubstituted methenylnortropinone

Derivative abbreviation	Chemical nomenclature	Structure
		R
T-1	2,4-dipyrrolylmethenylnortropinone	
T-2	2,4-diphenylmethenylnortropinone	
T-3	2,4-difurfurylmethenylnortropinone	
T-4	2,4-dimethoxyphenylmethenylnortropinone	

태의 시약을 제공받아 증류수에 녹여 2.5 mg/ml 농도로 만들어 생쥐의 복강내로 투여하였다.

3. 항경련 효과 검사

(1) PTZ 경련 검사

항경련제의 PTZ에 의한 유발 경련 억제효과는 Swinyard 등의 방법[19]에 따라 진행하였다. 본 연구에서 PTZ를 투여하여 항경련 효과를 관찰한 과정은 그림 1-A와 같다. 실험동물의 복강내 항경련제 투여하고 15분 후 피하에 PTZ를 80 mg/kg 주사하고 30분간 관찰한다. 5초 이상 지속되는 clonic spasm이 나타나지 않으면 항경련효과가 있는 것으로 판정한다.

(2) MES 경련 검사

MES에 의한 경련유발의 시간대적인 과정은 그림 1-B에 제시되어 있다. 항경련제를 실험동물의 복강내 주사하고 15분 후 corneal electrode로 60 Hz, 50 mA, 0.2 초의 전기자

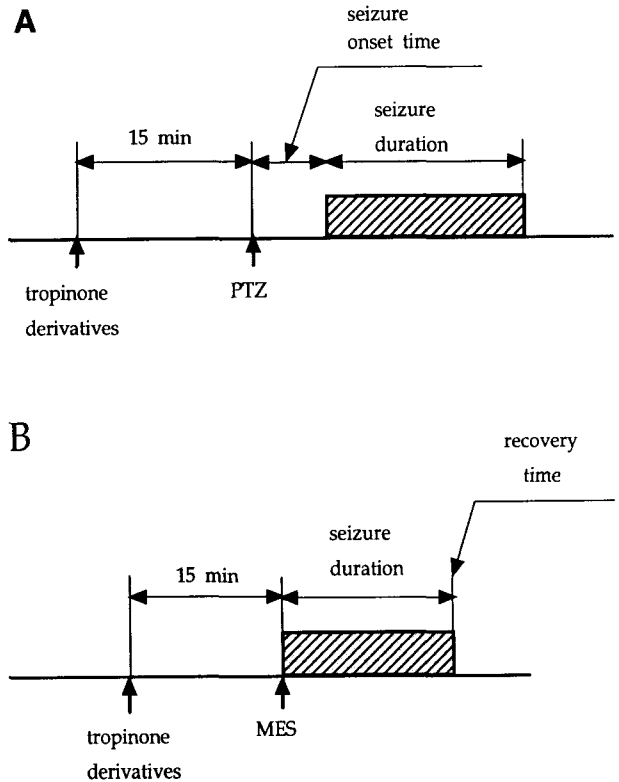


Fig. 1. Time course of seizure induction in mouse. A is for PTZ treatment, and B is for MES treatment. Hatched areas were seizure periods.

극을 가한다. 전극은 5 mm 직경의 스테인레스 스틸로 된 볼을 사용하며 생리식염수에 적셔 전기자극한다. 전기자극 후 뒷다리에 긴장성 신전이 나타나지 않으면 전기자극에 의한 경련에 대하여 항경련 효과가 있는 것으로 판단하였다.

4. NOS 측정

(1) 단백질 분리

항경련제 투여 후 경련을 일으킨 생쥐의 뇌에서 해마부와 전뇌피질부를 적출하여 단백질을 분리하였다. 적출된 조직은 차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 2회 세척 후 단백질분해효소 억제제(0.5 mM leupeptin, 1 mM pepstin A, 1 mM aprotinin, 10 mM PMSF)가 첨가된 균질용액(100 mM KCl, 2 mM EDTA, 6 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 20 mM Hepes, pH 7.4)에 넣고 tissue homogenizer로 분쇄하여 균질액을 만들었다. 이 균질액에 2% Tween 20을 첨가하여 4°C에서 1 시간 처리한 뒤 4,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 얻은 상층액을 실험에 사용하였다. 단백질의 농도는 BSA를 표준 단백질로 하여 Bradford 방법[2]으로 정량하였다.

(2) Western Blotting

단백질 발현 정도를 측정하기 위하여 조직에서 분리한 단백질을 전기영동으로 분리하였다. 7.5% polyacrylamide gel (0.38 M Tris-HCl, pH 8.3) 위에 4.5% polyacrylamide (0.13 M Tris HCl, pH 6.8)가 놓이는 불연속 gel을 만들어 추출한 단백질을 gel-loading buffer (50 mM Tris·HCl, pH 6.8; 5% mercaptoethanol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)에 처리하여 95°C에서 5 분간 가열한 후 급냉시켜 각 lane 당 20 µg 씩 gel에 부하하였다. 이것을 Tris-glycine buffer (0.025 M Tris HCl, pH 8.3, 190 mM glycine, 1 % SDS)를 사용하여 100 V에서 3 시간 동안 전기영동을 시행하였다.

SDS-PAGE에 의하여 분획된 단백질을 nitrocellulose membrane (Biorad, USA)으로 전기적인 전이를 시행하였는데, 이 때 electrotransfer buffer (50 mM Tris base, pH 8.3; 384 mM glycine; 20 % methanol)를 사용하여 4°C에서 약 100V의 전압에서 60분 동안 전이하였다. 이렇게 전이된 nitrocellulose membrane을 PBS (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.4)에 5% 탈지분유와

0.1% Tween 20이 함유된 blocking buffer로 4°C에서 1시간 처리한 후 일차 항원-항체결합에 사용하는 항체(n-NOS, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1:1000으로 희석하여 첨가시킨 blocking buffer에 nitrocellulose membrane을 담구어 4°C에서 24시간 반응시켰다. PBS와 PBS에 0.1% Tween 20이 함유된 PBS-T로 15분 간격으로 3회 세척한 후, 발색반응을 보기 위해서는 alkaline phosphatase가 결합된 이차 항체를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Nitrocellulose membrane을 PBS와 PBS-T로 각각 5회 세척한 후, 3% 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphate p-toluidine salt (BCIP)와 0.015% p-nitroblue tetrazolium chloride (NBT)가 포함된 alkaline phosphatase buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂)에 담구어 발색하여 관찰하였다.

결 과

정상적인 활동을 보이는 생쥐에 PTZ 투여로 경련을 유발하였다. 그림 2의 A는 PTZ 투여 전의 생쥐 사진이며, PTZ를 생쥐의 복강에 투여하면 대개 10분 내에 전신성 경련이 관찰되었다. 긴장성 경련의 전형적인 자세를 그림 2의 B에 제시하였다. 이후 점차 경련에서 벗어나며 활동성이 떨어진 상태가 지속되었다.

PTZ를 투여하기 15분전에 tropinone 유도체를 복강내로 투여하고 경련의 정도를 비교하여 그림 3의 A에 제시하였다. 대조군에 비하여 사용한 모든 유도체들이 경련 억제효과를 보였으며, 특히 T-4가 가장 큰 경련 억제효과를 보였다. PTZ를 투여한 후 경련이 나타날 때까지의 시간을 비교한 결과는 그림 3의 B에 제시하였다. 경련의 onset time은 대조군에 비하여 T-1, T-2, 및 T-3는 차이가 없었으나 T-4는 유의하게 증가시켰다. 이러한 결과는 PTZ에 의한 유발 경련에 있어 T-4 유도체가 항경련 효과가 가장 크게 나타남을 보여주었다.

MES를 시행하여 경련을 유발시키면 자극 후 즉각적인 경련 반응을 나타내었다. 그림 4의 A는 생쥐의 양측 결막에 전기자극전극을 이용하여 MES test 과정을 제시하였다. 자극 직후 나타나는 전형적인 긴장성 경련 자세를 그림4의 B에 제시하였다. 시간이 지남에 따라 긴장성-간대성 경련을 보이다가 활동성이 감소한 상태가 지속되었다. Tropinone

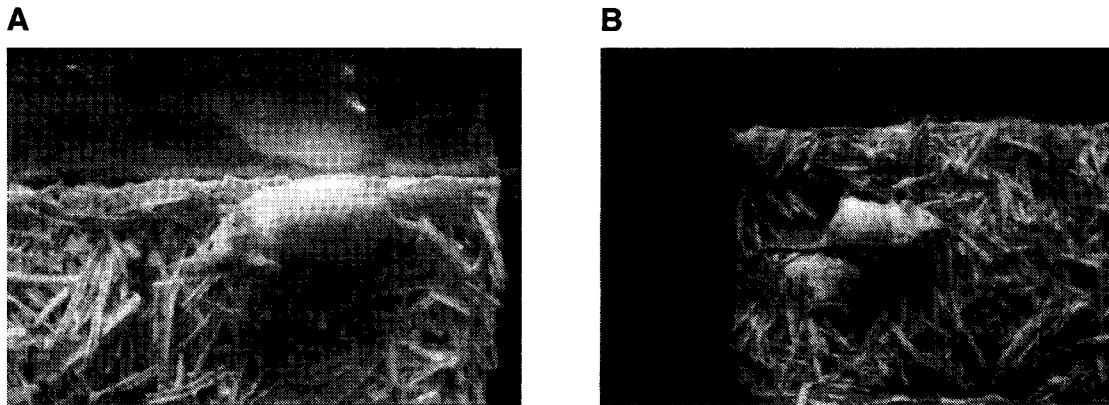


Fig. 2. Photograph of the animal posture.

A: normal activity of mouse. B: typical posture of general seizure induced by PTZ in mouse.

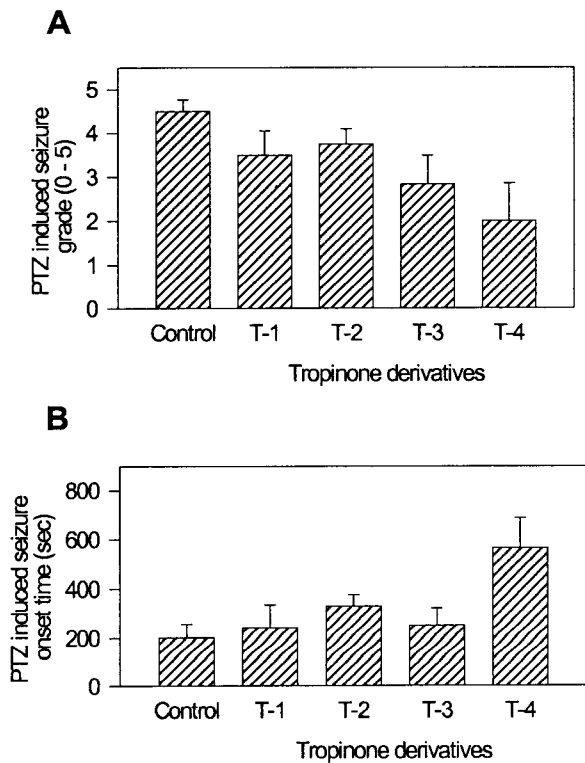


Fig. 3. Effects of tropinone derivatives on PTZ-induced seizures.

A: PTZ-induced seizure grades in mice. B: onset time of PTZ-induced seizure in mice. Each data are mean \pm SEM of 6 animals.

유도체를 MES 자극하기 15분전에 전처치하고 항경련 효과를 비교하였다. Tropinone 유도체에 따른 경련정도의 비교를 그림 5의 A에 제시하였다. T-1에서 경련억제효과가

가장 크게 나타났다. 경련 후 회복되는 시간을 비교한 결과는 그림 5의 B에 제시하였다. T-1에서 회복시간이 가장 빨랐으며 T-2, T-3, T-4의 순서로 회복시간이 길어졌다. 따라서 MES에 의한 경련에서는 T-1의 항경련 효과가 가장 크게 나타났다.

경련이 발생하면 뇌조직의 손상이 동반되므로 tropinone 유도체의 항경련 효과가 뇌조직 보호에도 작용하는가를 알아보기 위하여 nNOS의 발현을 조사하였다. 경련을 유발한 각 실험동물에서 실험 후 6시간 뒤에 실험동물을 희생시키고 뇌를 차가운 생리식염수에서 적출하여 해마부와 피질부를 분리하여 단백질을 전기영동하였다. 경련을 유발하지 않은 생쥐와 PTZ 및 MES에 의한 경련 유발 실험동물을 비교한 것이 그림 6에 제시되어 있다. nNOS의 항체를 사용하여 비교한 결과 대조군에 비하여 경련을 유발한 생쥐는 nNOS의 발현이 증가하였다. 정량적인 비교를 위하여 densitogram을 한 결과를 그림 6의 B에 제시하였다. 대조군에 비하여 PTZ 및 MES로 경련을 유발한 생쥐의 뇌조직에서 해마부 및 피질부 모두에서 nNOS 발현이 증가된 양상을 보였다. 그림 6은 4마리에서 관찰한 결과 중에서 대표적인 결과를 제시하였으며 PTZ와 MES에 의한 경련동물에서 모두 대조군에 비하여 nNOS 발현은 증가하였다.

Tropinone 유도체 전처치가 경련후 nNOS 발현에 미치는 효과를 비교한 결과는 그림 7 및 그림 8에 제시하였다. PTZ 유발 경련에서 nNOS 발현에 미치는 tropinone 유도체들의 전처치 효과를 그림 7에 제시하였다. 대조군에 비하여 tropinone 유도체를 전처치한 모든 실험군에서 해마

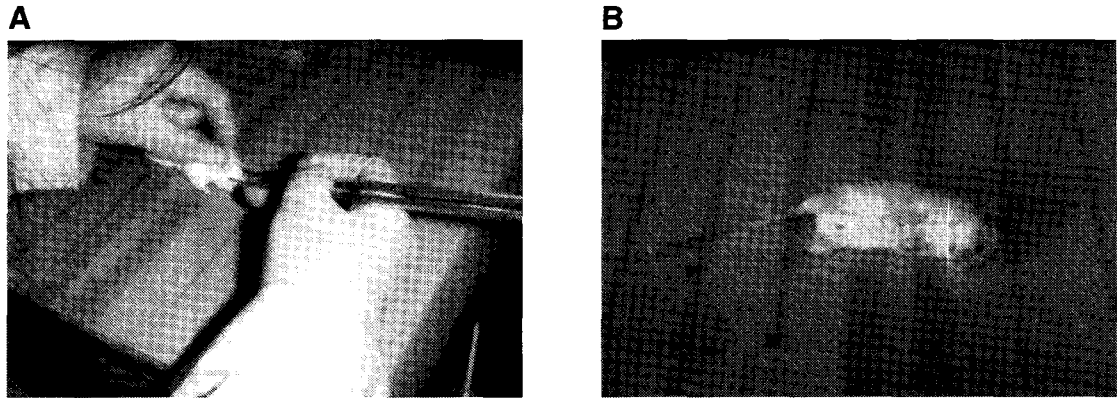


Fig. 4. MES test procedure and typical seizure posture in mouse.
 A: photograph of procedure that stimulates MES to both conjunctivas by electrodes. B: photograph of the animal posture that presents typical tonic seizure induced by MES.

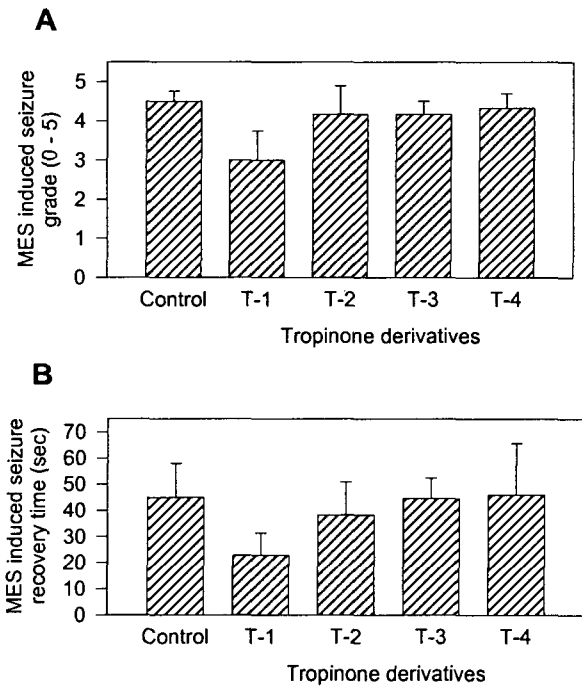


Fig. 5. Effects of tropinone derivatives on MES-induced seizures.
 A: MES-induced seizure grades in mice. B: onset time of MES-induced seizure in mice. Each data are mean \pm SEM of 6 animals.

부 및 피질부 nNOS 발현이 증가되었다. 그림 8은 MES 유발 경련에서 tropinone 유도체의 효과를 관찰한 것으로 대조군에 비하여 해마부는 모두 nNOS 발현이 증가되어 있으나 피질부는 T-1 및 T-4에서 감소되어 있는 양상을 보였다.

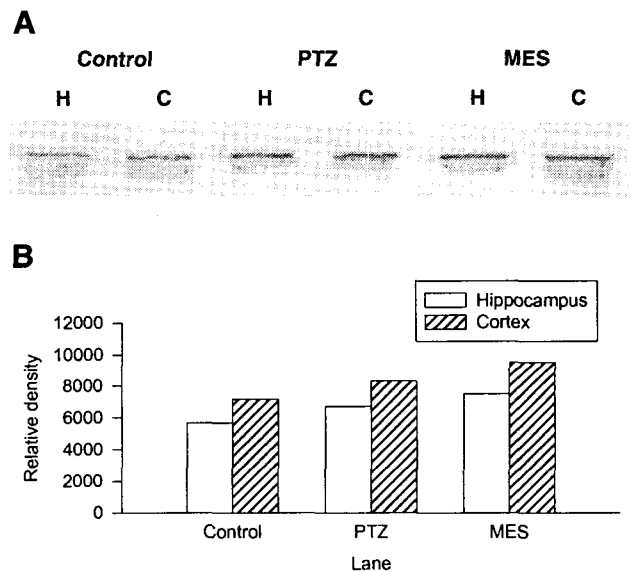


Fig. 6. Comparison of nNOS expression in hippocampus and cortex of mouse brain among control, PTZ-induced seizure and MES-induced seizure.
 A: photograph of electrophoresis image. B: density values from upper image by each lane. H, Hippocampus; C, Cortex.

고 찰

간질은 심각한 신경학적 질환 중에서 가장 유병율이 높은 것으로 역학 조사가 되어 있다[16,17]. 그러나 비교적 적절한 치료에도 불구하고 partial 또는 generalized seizures 환자의 20~30%는 현재 널리 이용되는 carbamazepine,

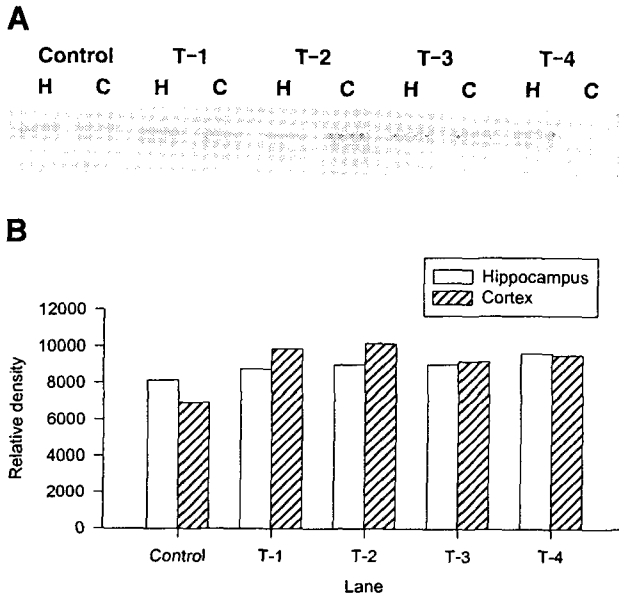


Fig. 7. Effect of tropinone derivatives on nNOS expression in PTZ-induced seizure animals. Control is the animal that was not treated by PTZ.
A: photograph of electrophoresis image. B: density values from upper image by each lane. H, Hippocampus; C, Cortex.

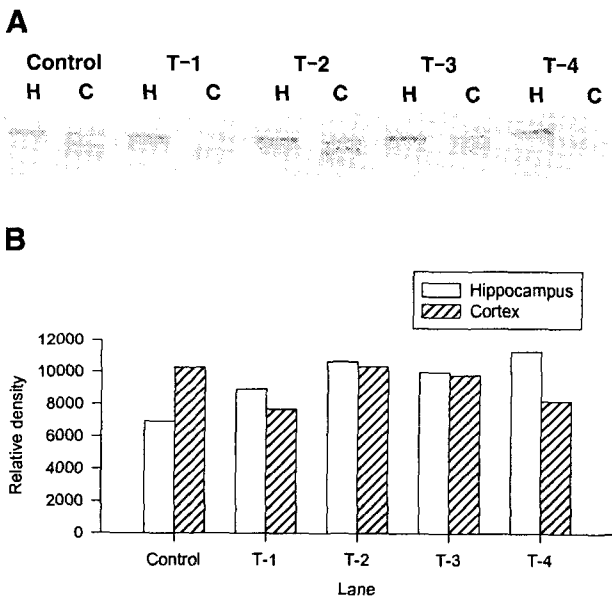


Fig. 8. Effect of tropinone derivatives on nNOS expression in MES-induced seizure animals. Control is the animal that was not treated by MES.
A: photograph of electrophoresis image. B: density values from upper image by each lane. H, Hippocampus; C, Cortex.

phenytoin 및 valproate 등에 의한 약물치료에 효과가 낮다[8]. 또한 용량 증가에 따른 부작용도 빈번하다[3,9]. 최근 들어 새로운 항경련제로 lamotrigine, vigabatrin 및 gabapentin 등이 등장하여 기존 약물에 비하여 효력 (efficacy)이 높으며 부작용이 적은 것으로 알려지고 있으나 간질에 대한 이상적인 약물이라고는 인정할 수 없다[21]. 따라서 치료에 불응하는 간질 환자에게 보다 효과적이고 안전한 약물의 개발이 절실한 실정이다.

항경련성 약물의 역사는 오래되었으나 현재까지 부작용이 적고 치료효과를 높이기 위하여 많은 유도체들이 합성되고 있다. 현재 사용 중인 항경련제는 질환의 50~80% 정도에서만 효과를 보이며 여러 가지 부작용의 문제가 있어 좀 더 개선된 치료제를 개발하고자 활발한 연구가 진행되고 있다. 최근의 항경련제 연구의 방향은 대개 Na channel 에 억제제로서 작용하는 약물의 개발, GABA 관련 약물로서 inhibitory transmission을 증가시키는 화합물의 개발 또는 glutamate receptor 작용 약물에 대한 연구가 주된 연구로 되고 있다.

여러 식물로부터 분리되는 tropane alkaloid 화합물들은 색다른 고리계의 존재로 아주 오래 전부터 약리학적으로 매우 흥미로운 연구 과제로 지목되어 입체적 구조분석이 밝혀졌다[7,20]. 동아대학교 화학과에서는 nortropinone의 합성법을 응용하여 발표되지 않은 새로운 nortropinone 유도체를 합성하고, 또한 이 nortropinone 유도체들을 사용하여 지금까지 알려지지 않은 새로운 nortropane spirohydantoin 유도체들을 합성하였다.

현재 항경련제의 개발 경향은 기존의 항경련제, NMDA receptor 및 GABA receptor 관련 화합물에 대하여 각 활성물질의 구조적 유사성 및 structure-activity relationship (SAR)을 근거로 신규 화합물의 design 및 합성을 통해 이루어지고 있다. 본 연구에서는 동아대학교 화학과에서 합성된 4가지 종류의 tropinone 유도체를 대상으로 항경련 효과를 비교하였다.

합성된 항경련 약물에 대한 생체내 활성도 측정은 살아 있는 생쥐를 대상으로 한 개체마다 직접 전체적인 관점에서 항경련 효과를 알아내어야 하므로, 분리된 동물 조직 또는 세포를 재료로 하는 실험과는 달리 본 연구에서는 PTZ 및 MES seizure test에서 검정하였다.

본 연구에서 PTZ를 복강내 투여한 생쥐는 일정시간이

경과한 후에 전신성 경련을 보였다. Tropinone 유도체들을 전처치하고 PTZ에 의한 경련의 변화를 관찰한 그림 3에서 항경련 효과는 사용한 모든 tropinone 유도체들에서 나타났으나 T-4의 효과가 가장 크게 나타났으며, PTZ 투여 후 경련이 시작되는 시간도 지연되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 사용한 4가지 tropinone 유도체 중에서 T-4가 PTZ 유발 경련에 가장 효과가 크다는 것을 나타낸다. 반면 MES로 유발시킨 경련은 PTZ와 다른 양상을 보였으며, MES 유발 경련의 정도는 T-1이 가장 효과적이었으며 경련 후 회복시간도 T-1에서 가장 짧았다. 이러한 결과는 tropinone 유도체들이 경련유발조건에 따라 그 효과가 다르게 나타남을 제시한다. 다른 항경련제 연구에서도 PTZ와 MES test 상에서 효과가 선택적으로 나타난다는 보고가 있다[11].

경련과 같은 자극 후에는 스트레스에 반응하는 유전인자들의 발현이 증가하며 뇌허혈 과 동반되어 특정 유전자의 발현이 또한 증가된다[23]. 본 연구에서 PTZ 및 MES 등은 모두 처치를 하지 않은 대조군에 비하여 nNOS 발현이 증가되어 있었다. 따라서 경련이 nNOS의 발현을 증가시킨다는 것을 알 수 있다. Elmer 등은 반복적인 전기자극에 의한 경련을 쥐에 가했을 때 해마부의 CA1 및 CA3에서 nNOS의 mRNA가 증가한다는 보고를 하였다[6]. Tropinone 유도체 전처치가 경련을 억제한 것과 nNOS 발현에 있어 관계를 알아보기 위하여 실험한 결과가 그림 7과 8이다. PTZ 유발 경련에서 T-4는 매우 효과적으로 경련을 억제하였지만 nNOS의 발현에는 효과가 없었다. 이러한 결과는 PTZ 자체가 신경세포 독성을 가지고 있음을 나타내며 T-4는 경련발생에만 관계하고 신경세포독성에는 무관함을 알 수 있다. 최근 NO가 경련과 관련이 있으며 NOS 억제제들의 항경련 효과에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다[5,15].

Benzodiazepines계는 일차적으로 진정, 항불안 및 간질 치료에 쓰이는 약물이다. 전기자극에 의한 경련 보다는 PTZ에 의한 야기 발작에 방지효과가 더 큰 것으로 알려져 있다[18]. Benzodiazepine류의 항간질 효과와 구조활성에는 긴밀한 관계가 있으며 많은 유도체가 알려져 있다. 작용기전으로는 대뇌피질, 시상 및 변연구조 등의 간질 생성부위로부터의 발작확산을 억제하는데, 그 부위의 이상 방전을 억제하지는 못한다[1]. 여러 benzodiazepine류는 GABA 수용체의 작용을 증가시켜 시냅스 후 억제 통로를 증강시킨다.

MES 유발경련에서는 해마부 nNOS 발현은 대조군에 비하여 모든 tropinone 유도체 전처치에서 증가하였지만 피질부 nNOS 발현에 있어서는 T-1 및 T-4가 nNOS 발현을 유의하게 억제하는 양상을 보였다(그림 8). MES 유발 경련에 대하여 T-1이 항경련 효과를 보였으며 nNOS 발현도 억제하는 결과는 T-1이 MES 유발경련에 경련억제 및 신경세포 보호기전에 효과가 있음을 나타낸다.

본 연구의 결과는 tropinone 유도체들이 PTZ 및 MES에 의해 유발된 경련에 미치는 효과와 nNOS 발현에 미치는 효과가 일치하지는 않았으며 이러한 결과는 tropinone 유도체들이 화학적 구조에 따라 작용하는 부위가 다르기 때문에 나타나는 결과로 추측된다. 유도체의 구조에 따라 항경련 활성이 결정될 수 있으므로 유도체 합성과 항경련성 평가가 병립되어 연구가 진행되어야 할 필요성이 있다.

이상적인 항경련 화합물이 화학적인 수정에 의하여 합성된다면 신약 개발 과정의 합성법에 대한 기술 축적이 이루어질 뿐 아니라, 이에 대한 항경련 약물의 활성도를 함께 측정함으로써 합성된 약물의 항경련 효과와 더불어 안정성에 대한 검사 방법이 확립되어 항경련 의약품의 제품 개발에 있어서도 보다 안전하고 효과가 있는 약물의 개발에 적극 이용될 수 있을 것이다.

요 약

생쥐에서 최근 합성된 4가지 종류의 tropinone 유도체들의 항경련 효과를 조사하기 위하여 pentylenetetrazole (PTZ) 및 Maximal Electroshock (MES)로 유발된 경련에 tropinone 유도체들이 경련상태에 미치는 효과를 관찰하였다. Tropinone 유도체로는 화학구조가 다른 4가지 종류를 사용하였다(T-1:2,4-dipyrrolylmethylnortropinone, T-2:2,4-diphenylmethylnortropinone, T-3: 2,4-difurfurylmethylnortropinone, T-4: 2,4-dimethoxyphenylmethylnortropinone). PTZ 25 mg/kg을 복강 내로 투여 후 전신성 경련을 유발하였으며 tropinone 유도체를 전처치한 후 PTZ에 의한 경련의 변화를 관찰하였다. 대조군에 비하여 T-1과 T-2는 경련정도에 변화가 없었으나 T-3과 T-4는 유의하게 경련정도를 약화시켰다. PTZ에 의한 경련의 시작 시간은 T-4에서 유의하게 지연되어 T-4가 PTZ에 의한 경련에 항경련 효과가 있음을 나타내었다. MES로 경련을 유발한 경

우에 있어서는 T-1이 경련정도를 유의하게 약화시켰으며 경련 후 회복시간도 T-1에서 가장 빨리 회복되는 특성을 보였다. 따라서 T-1이 MES에 의한 경련유발에 항경련 효과가 있음을 나타내었다. Troponine 유도체에 의한 경련 억제 효과와 경련과 동반되어 증가한다고 알려진 neuronal nitric oxide synthase (nNOS) 발현과의 관계를 알아보기 위하여 조직 단백질에서 Western blot을 하였다. 대조군에 비하여 PTZ 및 MES에 의해 경련을 유발한 생쥐에서 모두 해마부 및 전뇌피질부에서 nNOS가 증가하였다. Tropinone 유도체를 투여하지 않고 경련을 유발시킨 대조군에 비하여 tropinone 유도체를 투여한 군에서도 모두 nNOS의 발현이 해마부 및 전뇌피질부에서 증가되었다. MES로 경련을 유발한 생쥐에서 대조군에 비하여 T-1 및 T-4는 피질부에서 nNOS가 감소했으나 나머지군에서는 감소가 없었다. 이상의 결과를 토대로 tropinone 유도체들은 경련유발의 자극 조건에 따라 항경련 효과가 다르게 나타났으며, PTZ 유발 경련에서 2,4-dimethoxyphenylmethenylnortropinone의 항경련 효과가 가장 크고, MES 유발경련에서는 2,4-dipyrrolylmethenylnortropinone의 항경련 효과가 가장 크게 나타났다.

감사의 글

이 논문은 1998학년도 동아대학교 학술연구비 (특정목적과제) 지원에 의하여 연구되었음

참고 문헌

- Albright, P. S. and W. M. Burnhan. 1980. Development of a new pharmacological seizure model: effects of anticonvulsants on cortical- and amygdala-kindled seizures in the rat. *Epilepsia* **21**, 681-689.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brodie, M. J. 1990. Established anticonvulsants and the treatment of refractory epilepsy. *Lancet* **336**, 350-354.
- Costsworth, J. J. 1981. *NINCD Monography*, No.12, Government Printinf Office, Washington D.C
- Dzoljic, E., De Vries R. and M. R. Dzoljic. 1997. Anticonvulsant activity of new and potent inhibitors of nitric oxide synthase. *Brain Res Bull* **43**, 191-195.
- Elmer E., P. Alm M. Kokaia B. Larsson M. Keep K. E, Andersson and O. Lindvall. 1996. Regulation of neuronal nitric oxide synthase mRNA levels in rat brain by seizure activity. *Neuroreport* **7**, 1335-1339.
- Galvez E., M., Martinez J., Gonzalez G. G., Trigo P, Smith-Verdier F. Florencio and S. Garcia-Blanco 1983. Synthesis and structural study of N-substituted nortropane spirohydantoin. *J Pharm Sci* **72**, 881-886.
- Juul-Jenson, P. 1986. Epidemiology of intractable epilepsy. In *Intractable Epileps*, pp.5-11, In Schmidt, D. and P. L. Morselli (eds.), *Experimental and Clinical Aspects*, Raven Press, New York.
- Kalviainen, R., T. Keranen and P. J. Riekkinen 1993. Place of newer anticonvulsant drugs in the treatment of epilepsy. *Drugs* **46**, 1009-1024.
- Kohn, H., K. N., Sawhley P., Bardel D. W. Robertson and J. D. Leander 1993. Synthesis and Anticonvulsant activity of α -acetamido-N-bezoyl acetamide derivatives. *J Med Chem.* **36**, 3350-3360.
- Kokate, T. G., M. K., Banks T., Magee S. Yamaguchi and M. A. Rogawski 1999. Finasteride, a 5α -reductase inhibitor, blocks the anticonvulsant activity of progesterone in mice. *J Pharm Exp Ther* **288**, 679-684.
- Krall, R. L., J. K., Penry B. G., White H. J. Kupfererg and E. A. Swinyyard 1978. Antiepileptic Drug Development II. Anticonvulsant Drug Screening. *Epilepsia* **19**, 393-408.
- Liebman, J. M. 1985. Anxiety anxiolytics and brain stimulation reinforcement. *Neurosci Biobehav Rev* **9**, 75-86.
- Penry, J. K. 1986. *Epilepsy, Diagnosis Management Quality of Life*. pp.17, Raven Press, New York.
- Rundfeldt, C., R., Koch A., Richter M., Mevissen U. Gerecke and W. Loscher 1995. Dose-dependent anticonvulsant and proconvulsant effects of nitric oxide synthase inhibitors on seizure threshold in a cortical stimulation model in rats. *Eur J Pharmacol* **274**, 73-81.
- Senanayake, N. and G. C. Roman. 1993. Epidemiology of epilepsy in developing countries. *Bull. World Health Organization* **71**, 247-258.
- Shorvon, S. D. 1990. Epidemiology, classification, natural history, and genetics of epilepsy. *Lancet* **336**,

- 93-96.
18. Swinyard, E. A. and A. W. Castellion. 1966. Anticonvulsant properties of some benzodiazepines. *J Pharmacol Exp Ther* **51**, 369-375.
 19. Swinyard E. A., J. H, Woodhead H. S. White and M. R. Franklin 1989. General principles, experimental selection, quantification, and evaluation of anticonvulsants, PP. 85-102, *In* Levy, R., R., Mattso B., Meldrum J. K. Perry and R. E. Dreifuss. (eds.) *Antiepileptic Drugs*, 3rd. Raven Press, New York.
 20. Trigo, G. G., M. Martinez and E. Galvez. 1981. PMR and ¹³C-NMR spectroscopy of tropane and N-substituted nortropane spirohydantoin. *J Pharm Sci* **70**, 87-89.
 21. Upton, N. 1994. Mechanisms of action of new anti-epileptic drugs: rational design and serendipitous findings. *Trends Pharmacol Sci* **15**, 456-463.
 22. Vida, J. A., W. O., Foye T. L. Lemke and D. A. Williams. 1995. *Anticonvulsant in principle of Medicinal Chemistry*. pp.182-198, 4th eds., Lea and Febiger, Philadelphia.
 23. Zhang, Z. G., M., Chopp S., Gautam C., Zaloga R. L., Zhang H. H., Schmidt J. S. Pollock and Forstermann. U. 1994. Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* **654**, 85-95.

(Received July 4, 2002; Accepted August 20, 2002)