

실험동물의 뇌파 측정에 의한 중추약물의 항경련효과 연구

A Study on the Anticonvulsant Effects of Centrally-Acting Drugs by Measuring Electroencephalography of Experimental Animals Intoxicated with Organophosphate Compounds

조 영*
Young Cho

김 왕 수*
Wang-Soo Kim

허 경 행*
Gyeong-Haeng Hur

ABSTRACT

Organophosphorus compounds are irreversible inhibitors of cholinesterase enzyme. Exposure causes a progression of toxic signs, including hypersecretion, tremor, convulsion, respiratory distress, epileptiform seizure, brain injuries and death. To protect brain injuries, administration of diazepam as a neuroprotectant is now considered essential for severely exposed nerve agent casualties. However, studies have shown diazepam to provide less than total protection against the neuropathological consequences of nerve agent exposure. In this context, extensive studies have been carried out to find out effective alternative drugs to protect brain from epileptiform seizures induced by organophosphate compounds intoxication. It has been reported that a combination of carbamate and anticholinergic or antiglutamatergic can be a very effective medical countermeasure in dealing with the threat of organophosphorous poisoning. In this study, experimental animals including rats and guinea pigs were implanted with microelectrodes on their brain skulls, and treated with various centrally acting drugs such as physostigmine and procyclidine prior to soman challenge, and then its electroencephalography(ECoG) was monitored to see anticonvulsant effects of the drugs. It was found that seizure activities in ECoG were not always in proportion to clinical signs induced by soman intoxication, and that combinative pretreatment with physostigmine plus procyclidine effectively stopped the seizures induced by organophosphorous poisoning.

Keywords : Anticonvulsant(항경련제), Seizure(발작), Electroencephalography(뇌파), Procyclidine(프로사이클리딘), Physostigmine(피소스티그민), Prophylactic(예방), Soman(신경작용제 GD), Poisoning(중독)

1. 서론

† 2013년 2월 8일 접수~2013년 3월 15일 게재승인

* 국방과학연구소(ADD)

책임저자 : 조 영(choyoung@add.re.kr)

신경작용제(organophosphorus compounds)는 신경전달에 관여하는 효소 acetylcholinesterase(AChE)를 비가역적으로 저해시킴으로서, hypersecretion, fasciculation, tremor, convulsion, respiratory distress, epileptiform seizure와 같은 중독 증상을 초래하고 나아가서 뇌손상

및 사망에 이르게 된다^[1~7]. 이러한 신경작용제의 해독을 위하여는 복합적인 예방제 및 치료제가 요구된다^[8,9]. 전처치제로 사용되는 pyridostigmine 정제는 일정부분(약 30%)의 효소 AChE를 비가역적으로 저해함으로써 AChE 전부가 신경작용제에 의해 비활성화되는 것을 막아준다^[6]. 중독 후에는 anticholinergic drug인 atropine이 muscarinic receptor site를 막아주고, 2-PAM(pyridine-2-aldoxime methylchloride)은 저해된 AChE를 재활성화 시켜준다^[6,10]. 그러나 이 약물들로만은 신경작용제에 의해 유발되는 seizure를 막아줄 수 없으므로 생존하더라도 치명적인 뇌손상을 초래하게 된다^[11,12]. 이를 위해 gamma-aminobutyric acid(GABA) receptor의 agonist인 diazepam이 항경련제(anticonvulsant)로 사용된다. 그러나 diazepam의 뇌보호효과가 미흡하다는 연구결과가 발표된 바 있으며, 약효의 발효시간이 느리고 효력이 약하다는 보고가 있었다^[13~15]. 따라서 diazepam을 대체할 수 있는 후보 약물에 대한 광범위한 연구가 진행되어 왔다. 그 후 보고된 바로는 carbamate 계열 약물과 anticholinergic 또는 antiglutamatergic 약물을 복합투여할 경우 효과적으로 경련을 억제할 수 있으며, 뇌보호효과가 우수하다는 연구결과가 있다^[8,9]. 본 연구에서는 실험동물(rat, guinea pig)의 뇌(brain) 표면에 전극을 이식하고, carbamate 계열 약물인 physostigmine과 anticholinergic 및 antiglutamatergic 효과를 겸비한 procyclidine을 복합투여한 후(피하주사 또는 osmotic mini pump 사용), 유기인화합물 중독에 의해 유발되는 경련성 뇌파(EEG : electroencephalography)의 억제효과를 관찰하였다. 특히 EEG를 실시간으로 모니터링하면서, seizure가 발현되는 시간(onset time), seizure가 지속되는 시간(duration time)을 관찰하여, 약물의 투여조건에 따른 항경련효과를 측정하였다.

2. 실험재료 및 방법

가. 실험재료

실험동물로는 male Hartley albino guinea pig(무게 : 300~400g) 및 male albino rat(400~550g)를 사용하였다. 신경작용제인 Soman(pinacolyl methylphosphonofluoridate), 1-[(4-(aminocarbonyl)pyridinio)methoxymethyl]-2-[(hydroxyimino)methyl]pyridinium dichloride(HI-6), pyridine-2-aldoxime methylchloride(2-PAM)은 ADD의 지정된 실험실에서 합성하여 사용하였다. Physostigmine,

procyclidine, Atropine methylnitrate 등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. Soman을 isopropanol에 녹여서 stock solutions을 만들고 시험직전에 saline에 순차적으로 희석하여 사용하였다.

나. 실험방법

실험동물의 마취를 위하여 4% isoflurane을 사용하였고 Kopf stereotaxic frame에 머리를 고정시킨 후, 2개의 stainless-steel recording screw type의 electrodes(screw head에 절연된 silver wire 연결)를 두개골 경막(epidural)에 implantation하였다(정수리 bregma 기준 2~3mm 후방 및 측면). 3번째 reference screw electrode는 소천문(lambda) 기준 2mm 전방에 심었고, electrode는 dental cement로 고정하였으며, wire는 5-pin connector에 연결하였다. 그 후 5일간의 회복기간을 거친 후 실험에 사용하였다.

피하에 미니펌프(alzet mini-osmotic pumps) 이식을 위하여 24시간 전에 체중을 측정하고, 투여약물의 적정 농도를 결정하였다. 펌프 1개당 0.2ml의 약물 용액을 충전시키고 펌프의 약물 delivery 속도는 2.5, 5.0, 10.0 µg/kg/hour로 각각 설정하였다. 기니픽을 2% Rompun solution(0.1ml/Kg, I.v)로 마취시킨 후, 등의 일정부분을 면도하고 소독한 다음 피부를 절개하여 펌프를 넣고, 멸균된 braided silk(Ethicon Ltd, UK)로 봉합하였으며, 펌프이식 직전부터 48시간 후까지 경시별로 혈액을 채취하여 약물농도를 분석하였다. 마지막 혈액샘플 채취 직후 작용제를 투여하였으며(800µg/ml; 50µg/Kg = 2.5×LD₅₀). 각 실험동물은 독립된 케이지에서 관리하고, computerized electroencephalographic system(UNIQUANT[®])에 연결시켜, electrocorticogram(ECoG)을 측정하였다. Soman challenge 30분 및 10분 전에 pyridostigmine bromide(0.1mg/kg)과 atropine methylnitrate(20mg/kg)를 투여하였고, ECoG signal은 amplified/filtered(0.3~40Hz) 되어 computer monitor에 나타남과 동시에 computer hard disk에 저장하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. Seizure 유발 및 관찰

우선 seizure를 유발시켜 ECoG를 관찰하기 위하여 rat에 soman challenge(2×LD₅₀) 30분 전에 HI-6 125mg/kg을 투여하고 ECoG를 측정된 결과는 아래 Fig. 1과 같

다. Soman challenge 후 7분 경과 시에는 정상 ECoG를 보였으며, 시간이 경과됨에 따라서 ECoG의 주파수(frequency)와 진폭(amplitude)이 증가하는 양상을 나타내었다. Soman challenge 41분 경과 후부터 경미한 seizure가 나타나기 시작하여 2시간 이후에는 심한 seizure를 보였다. 본 실험군의 경우 12시간 경과 후 사망함을 확인하였다.

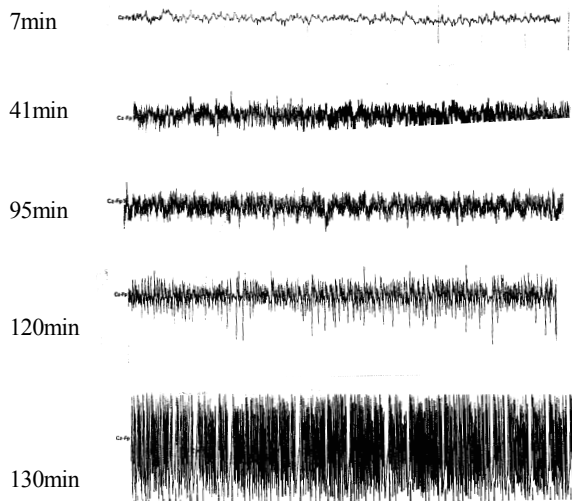


Fig. 1. Electrocardiogram(ECoG) of a rat pretreated with HI-6(125mg/kg) 30 min prior to soman challenge ($2 \times LD_{50}$).

나. 항경련효과 관찰

현재 외국에서 운용 중인 전처치제 피리도스티그민 정제와 MARK-1의 항경련효과를 관찰하기 위하여, 전극이 이식된 rat를 대상으로, soman challenge 30분 전에 pyridostigmine 0.026mg/kg을 근육주사하고, $2 \times LD_{50}$ 의 soman을 근육 주사하여 1분 경과 후 atropine (2mg/kg)과 2-PAM(25mg/kg)을 근육주사하고 ECoG를 관찰한 결과는 다음 Fig. 2와 같다.

Fig. 2는 ECoG 상에서 나타난 진폭과 주파수의 증가를 경시별로 나타낸 것이며, 측정시작 5분 후 심한 seizure가 유발되어 1시간 정도 지속되었고, 그후에도 완전한 정상상태로 돌아오지는 않았다. 48시간 이후에도 생존은 가능하였으나, brain을 적출하여 조직병리학적 방법(histopathological method)에 의해 뇌조직을 검사해본결과 보고된 바와 같은 심한 뇌손상이 관찰되었다¹⁶⁾.

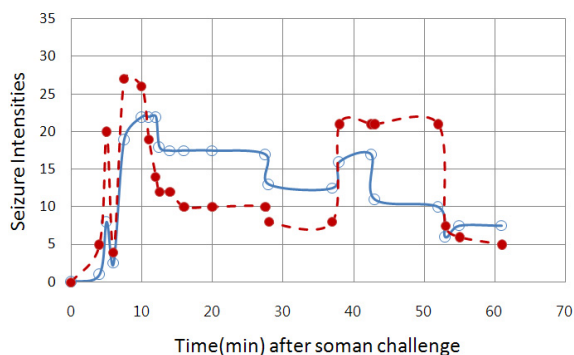


Fig. 2. Time courses of the changes of amplitude and frequency exhibited in electrocardiogram(ECoG) from a rat pretreated with pyridostigmine (0.026mg/kg) prior to soman challenge($2 \times LD_{50}$), followed by post-treatment with atropine(2mg/kg) plus 2-PAM(25mg/kg). o-o : Amplitudes in ECoG, o--o : Frequencies in ECoG

다음 실험으로서 soman challenge 30분 전에 중추약물로서 뇌보호효과가 우수한 것으로 판명된 procyclidine (3mg/kg)과 physostigmine(0.1mg/kg)을 피하주사로 투여하고 $2 \times LD_{50}$ 의 soman을 투여하여 ECoG를 관찰하였다.



Fig. 3. Electrocardiogram(ECoG) of a rat pretreated with procyclidine(3mg/kg) plus physostigmine (0.1mg/kg) 30 min prior to soman challenge ($2 \times LD_{50}$). A : Before soman challenge, B : After soman challenge

Fig. 3과 같이 $2 \times LD_{50}$ 의 soman challenge에 대하여 ECoG 상에서 나타나는 seizure의 징후는 관찰되지 않았으며, 외관상으로 나타나는 약간의 중독 증상(tremor 등)과 seizure는 비례하지 않는다는 것을 알 수 있다. 실제로 procyclidine(3mg/kg)과 physostigmine(0.1mg/kg)은 soman 중독에 대해 실험동물 종류별로 차이가 있으나 최소 2배 이상의 protection ratio를 나타내는 약물농도로서¹⁶⁾ seizure를 관찰하기 위하여는 더 낮은 농도의 중추약물 용량을 설정할 필요성이 있는 것으로 판단되었다.

따라서 혈액 중의 약물농도를 적은 오차범위내로 일정하게 유지시킨 상태에서 soman 중독에 의해 유발되는 seizure를 관찰하기 위하여 rat의 피하조직에 다양한 약물농도의 procyclidine과 physostigmine을 충전시킨 mini-osmotic pump를 이식하고, 약물농도를 일정하게 유지시킨 상태에서 soman 중독에 대한 항경련효과를 측정하였다. 본 실험에 적용된 약물농도는 다음 Table 1과 같다.

Table 1. Experimental conditions of osmotic mini-pump containing various amounts of physostigmine (PHY) and procyclidine(PC)

Tested Animal	weight (g)	Drug amounts(μ g) in mini-pump (for 300g of weight)		Fold of LD ₅₀ of soman
		PHY	PC	
1	550	36	576	5
2	500	36	576	10
3	440	18	288	2
4	470	18	288	3
5	470	9	144	2
6	410	9	144	2

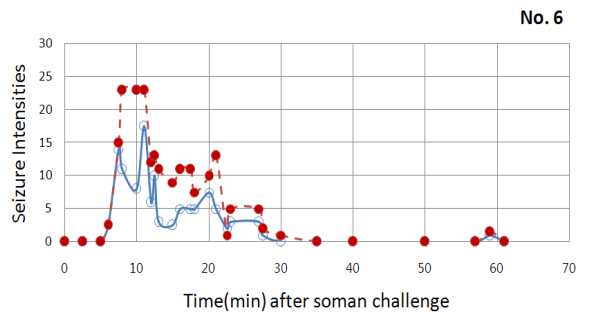
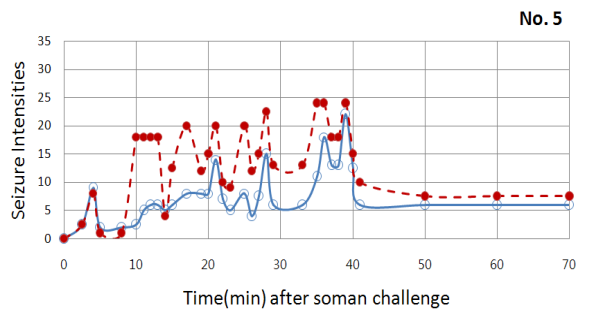
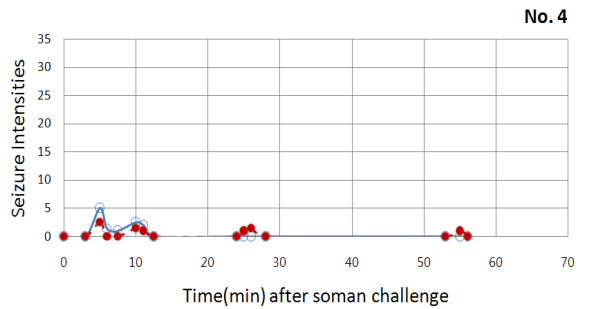
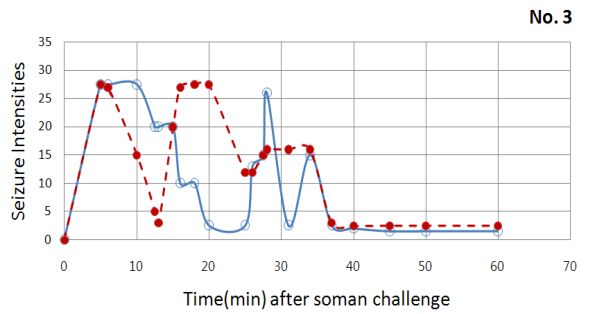
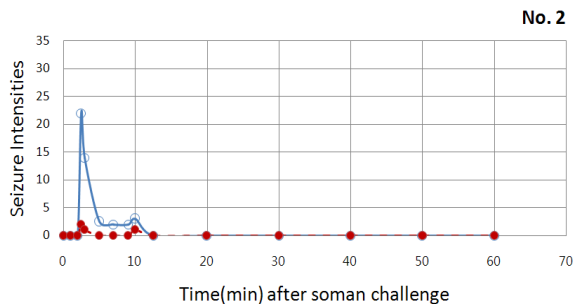
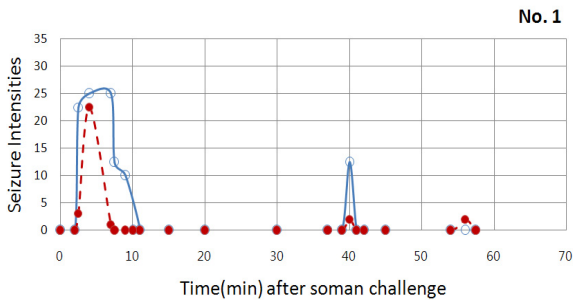


Fig. 4. Time courses of the changes of amplitude(and frequency exhibited in electrocorticogram(ECoG) of rats implanted with osmotic mini-pumps containing various amounts of physostigmine (PHY) and procyclidine(PC) prior to soman challenge. : Amplitudes(o-o) and Frequencies (o-o) in ECoG

상기의 조건으로 pump를 이식하고 1일 경과 후에 다양한 농도의 soman을 투여하고 ECoG를 측정하였다. 기니피그 brain에서 seizure가 증가할 경우 ECoG 상에서 파장의 진폭(amplitude)과 주파수(frequency)가 증가되는 현상을 관찰 하였으며, soman challenge 시각을 기점으로 하여 시간이 경과함에 따라 변하는 진폭과 주파수를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다.

Table 2. Summarized results of ECoG, clinical signs, and cholinesterase inhibition exhibited in guinea pig models

No	Drug amount loaded in pump		Folds of soman LD ₅₀	ChE inhibition (%)	ECoG results		
	PHS (µg/kg)	PC (µg/kg)			Onset time (min)	Duration Time (min)	clinical signs
1	18	576	1.3	76	15	2	normal after seizure
2	18	576	1.5	56	17	80	"
3	18	288	1.5	56	15	160	"
4	18	288	1.7	31	10	143	died in 155min
5	18	144	1.7	43	14	220	normal
6	18	144	1.5	36	21	20	recovered to normal
7	18	72	1.5	40	8	180	recovered to normal
8	18	72	1.7	47	10	180	died in 190min
9	18	36	1.7	44	17	180	died in 24hrs
10	18	36	1.7	38	18	180	died in 24hrs
11	9	576	1.7	41	no seizure		tremor, normal afterward
12	9	288	1.7	41	18	6	hypersensitive, dead in 160min
13	9	144	1.7	32	15	145	tremor, normal in 170min
14	9	72	1.7	28	23	15	normal afterward, hypersensitive
15	9	36	1.5	35	9	1.5	normal afterward

실험군 2번의 경우 고용량의 soman(10×LD₅₀) 투여로 10분 후 사망하였으며, ECoG 상에서 약 2~3분 정도의 seizure에 따른 진폭증가가 관찰되었으나, 유의적인 주파수 증가는 미미하였다. 실험군 1번의 경우 역시 고용량의 soman(5×LD₅₀) 투여로 60분 후 사망하였으며, 간헐적인 seizure가 관찰되었다. 실험군 3번과 4번의 경우에 동일수준의 항경련 약물농도에서 soman의 중독농도를 LD₅₀의 2배 및 3배로 실시되었는데, 2배의 LD₅₀로 중독된 경우 극심한 seizure를 보였으나, 생존한 반면, 같은 조건에서 3배의 LD₅₀로 중독시킨 경우에, 미미하고 간헐적인 seizure를 나타내다가 60분 후에 사망하였다. 실험군 5번과 6번의 경우, 비교적 낮은 농도의 procyclidine과 physostigmine을 충전시킨 mini-osmotic pump를 이식하였는데, 6번의 경우 seizure onset 5분 후에 나타나서 약 30분 경과된 시점에서 seizure가 가라앉았고, 이 실험동물은 생존하였다. 그러나 5번의 경우 seizure onset 2~3분 후에 나타나서 40분동안 격렬하게 지속되었고, 그 후에도 1시간 20분동안 일정수준의 seizure가 지속되다가 사망하였다. 다음 실험으로서, 다양한 농도의 procyclidine과 physostigmine으로 충전된 mini-pump를 guinea pig에 이식하고, 1.3~1.7배 LD₅₀의 soman으로 중독시켜 항경련효과를 측정 한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서 seizure onset time 및 duration time과 약물농도, GD 중독 농도는 일률적으로 비례하지 않았으며, 유의성있는 상관관계를 찾기 어려웠다. 사망한 동물들의 경우 모두 GD 중독 농도 1.7×LD₅₀의 조건에서 발생되었으며, 그 이하에서는 모든 실험군이 생존하는 결과를 나타내었다.

이상과 같이 신경작용제 중독에 의해 유발되는 seizure를 정량적으로 분석하고, 각 시험조건 하에서 실험동물로부터 관찰되는 중독증상(clinical signs, survivability)을 종합적으로 관찰함으로써 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

4. 결론

유기인화합물로서 soman 중독에 의해 유발되는 ECoG의 변화를 관찰하였으며, seizure에 의해 나타나는 양상은 진폭과 주파수의 증가로 확인되었다. 이 방법에 의해 seizure의 발현시간, 강도, 지속시간 등을 판별 가능하였으며, 항경련효과에 대한 약효를 스크리

닝할 수 있는 효과적인 수단이 될 수 있음을 보여주었다.

신경작용제 전처지제로 사용되고 있는 pyridostigmine과 치료제인 atropine+2-PAM의 복합투여로는 2×LD₅₀의 soman 중독시 유발되는 seizure를 억제할 수 없다는 것이 확인되었으며, 반면 pyridostigmine과 같은 carbamate 계열의 anti-cholinesterase인 physostigmine과 N-methyldiaspartate(NMDA) 및 muscarinic antagonist인 procyclidine의 복합투여로서 일정 약물농도 이상에서는 효과적으로 seizure를 억제할 수 있음이 확인되었다.

본 연구에서는 신경작용제 중독에 의해 유발되는 seizure와 clinical sign들을 실시간으로 모니터링하면서, 약효를 관찰하였는데, 흥미롭게도 육안으로 관찰되는 tremor와 convulsion이 brain에서 나타나는 seizure와 항상 일치되지는 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 과량의 신경작용제로 중독되어 단시간에 사망하게 되는 실험군의 경우는 오히려 미미하고 간헐적인 seizure의 양상을 나타낸 반면, 약효가 효과적으로 나타나서 정상상태로 회복되고 생존하게 된 실험군의 경우 중간과정에서 심한 정도의 seizure가 관찰되었다. 이 경우에 뇌조직 검사를 실시하여 뇌세포의 손상여부를 관찰한 결과, 심한 뇌손상이 관찰되었기 때문에^[16~18], 생존하게 될 경우에 뇌보호제로서의 항경련제 역할이 더욱 중요한 것으로 입증되었다고 할 수 있다.

References

- [1] McDonough, J. H., Jr., Shih, T. M., "Pharmacological Modulation of Soman-Induced Seizures", *Neurosci. Biobehav. Rev.*, Vol. 17, pp. 203~215, 1993.
- [2] Shih, T. M., Koviak, T. A., Capricio, B. R., "Anti-Convulsants for Poisoning by the Organophosphorus Compound Soman : Pharmacological Mechanisms", *Neurosci. Biobehav. Rev.*, Vol. 15, pp. 349~362, 1991.
- [3] Kim, Y.-B., Hur, G.-H., Shin, S., Sok, D.-E., Kang, J.-K., Lee Y.-S., "Organophosphate-Induced Brain Injuries : Delayed Apoptosis Mediated by Nitric Oxide", *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, Vol. 7, pp. 147~152, 1999.
- [4] McDonough, J. H., Jr., Jaax, N. K., Crowley, R. A., Mays, M. Z., Modrow, H. E., "Atropine and Diazepam Therapy Protects Against Soman-Induced Neural and Cardiac Pathology", *Fund. Appl. Toxicol.*, Vol. 13, pp. 256~276, 1989.
- [5] Tryphonas, L., Clement, J. G., "Histomorphogenesis of Soman-Induced Encephalocardiomyopathy in Sprague-Dawley Rats", *Toxicol. Pathol.*, Vol. 23, pp. 393~409, 1995.
- [6] Shih, T. M., Duniho, S. M., McDonough, J. H., "Control of Nerve Agent-Induced Seizures is Critical for Neuroprotection and Survival", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 188, pp. 69~80, 2003.
- [7] Spradling, K. D., Dillman, J. F., "Toxicology of Chemical Warfare Nerve Agents", *Advances in Molecular Toxicology*, Vol. 5, pp. 111~144, 2011.
- [8] Myhrer, T., "Prophylactic and Therapeutic Measures in Nerve Agent Poisoning", *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, pp. 965~975, 2009.
- [9] Joosen, M. J. A., Schans, M. J., Helden, H. P. M., "Efficacy of Combined Atropine, Obidoxime and Diazepam Treatment", *Chem. Bio. Int.*, Vol. 188 (Issue 1, No. 6), pp. 255~263, 2010.
- [10] Vrdoljak, A. L., Calic, M., Radic, B., Berend, S., Jun, D., Kuca, K., Kovarik, Z., "Pretreatment with Pyridium Oximes Improves Antidotal Therapy Against Tabun Poisoning", *Toxicol. Vol.* 228, pp. 41~50, 2006.
- [11] Kadar, T., Shapira, S., Cohen, G., Sahar, R., Alkalay, D., Raveh, L., "Sarin-Induced Neurophathology in Rats", *Human Exp. Toxicol.*, Vol. 14, pp. 252~259, 1995.
- [12] Philippens, I. H. C. H. M., Melchers, B. P. C., DeGroot, D. M. G., Wolthuis, O. I., "Behavioral Performance, Brain Histology and EEG Sequela After Immediate Combined Atropine/Diazepam Treatment of Soman-Intoxicated Rats", *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Vol. 42, pp. 711~719, 1992.
- [13] McDonough, J. H., Jr., Dochterman, L. W., Smith, C. D., Shih, T. M., "Protection Against Nerve Agent-Induced Neurophathology, but Not Cardiac Pathology, is Associated with the Anticonvulsant Action of Drug Treatment", *Neurotoxicology Vol.* 15, pp. 123~132, 1995.
- [14] Capacio, B. R., Whalley, C. E., Byers, C. E.,

- McDonough, J. H., "Intramuscular Diazepam Pharmacokinetics in Soman-Exposed Guinea Pigs", *J. Appl. Toxicol.*, Vol. 21, pp. S67~S74, 2001.
- [15] LTS Lohmann Therapie-System AG(Germany), Prophylactic Transdermal Device Against Nerve Agents, White Paper, April, 2002.
- [16] Kim, Y.-B., Cheon, K.-C., Hur, G.-H., Phi, T.-S., Choi, S.-J., Hong, D.-S., Kang, J.-K., "Effect of Combinational Prophylactics Composed of Physostigmine and Procyclidine on Soman-Induced Lethality, Seizures and Brain Injuries", *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, Vol. 11, pp. 15~21, 2002.
- [17] Kim, W.-S., Cho, Y., Kim, J.-C., Hang, Z.-Z., Park, S.-H., Choi, E.-K., Shin, S.-H., Nam, S.-Y., Kang, J.-K., Hwang, S.-Y., Kim, Y.-B., "Protection by a Transdermal Patch Containing Physostigmine and Procyclidine of Soman Poisoning In Dogs", *Euro. J. Pharmacol.*, Vol. 21, pp. 135~142, 2005.
- [18] Cho Y, Kim W-S, Hur G-H, Ha Y-C, "Minimum Effective Drug Concentrations of a Transdermal Patch System Containing Procyclidine and Physostigmine for Prophylaxis Against Soman Poisoning in Rhesus Monkeys", *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, Vol. 33, pp. 1~8, 2012.