

흰쥐 포르말린 검사에서 지주막하강
내 pregabalin의 전처치와 후처치에
따른 진통효과 비교

연세대학교 대학원
의 학 과
조 남 룡

흰쥐 포르말린 검사에서 지주막하강
내 pregabalin의 전처치와 후처치에
따른 진통효과 비교

지도교수 이 윤 우

이 논문을 석사 학위 논문으로 제출함

2006년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

조 남 룡

조남룡의 석사 학위 논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2006 년 12월 일

감사의 글

본 연구를 준비하고 진행하는데 있어 모든 과정을 꼼꼼히 지도해 주셨고, 또 이 논문의 완성을 위해 많은 관심과 지도편달, 조언을 주신 이윤우 교수님, 윤경봉 교수님 그리고 임중우 교수님께 진심으로 감사드립니다.

실험에 익숙하지 않은 저를 위해 많은 관심과 수고를 아끼지 않으시고, 너무나 많은 도움을 주신 한동우 교수님, 권태동 선생님께도 진심으로 감사하는 마음을 전합니다.

마지막으로 이 논문의 진행에 많은 힘을 주신 부모님께 감사드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 대상 및 방법	6
1. 대상	6
2. 방법	7
III. 결과	9
IV. 고찰	14
V. 결론	18
참고문헌	19
영문요약	25

그림 차례

그림. 1. Time effect curve of pregabalin pretreatment in rat formalin test.	10
그림. 2. Dose response curve of pregabalin pretreatment in rat formalin test.	11
그림. 3. Time effect curve of pregabalin posttreatment in rat formalin test.	12
그림. 4. Dose response curve of pregabalin posttreatment in rat formalin test.	13

국문 요약

흰쥐 포르말린 검사에서 지주막하강 내 pregabalin의 전처치와 후처치에 따른 진통효과 비교

통증은 크게 생리적 통증과 병리적 통증으로 분류할 수 있는데 생리적 통증은 조직에 손상을 줄 수 있는 유해 자극에 대하여 생체의 이상을 신속히 알리고 경고하는 중요한 방어 기전으로 작용하는 반면, 병리적 통증은 체성 감각계에서의 말초성 및 중추성 감각의 유도로서 인해서 발생하며, 통증 유발 자극이 없이도 통증을 일으키게 된다. 병리적 통증의 한 가지 증상인 통각과민(통각과민)의 대표적인 임상 예에는 수술 후 통증과 화상 후 통증 등이 있다.

S(+)-3-isobutyl GABA(pregabalin)은 GABA의 새로운 analog이나 GABA 수용체에는 작용하지 않으며 칼슘 통로의 α -2-delta subunit에 결합해서 칼슘 유입을 조절하고, 증강된 신경 전달 물질의 분비를 조절하여 증강된 통증을 치료하는데 탁월한 약물이다. 또한 이미 말초 감각과 중추 감각으로 증강된 통증을 치료하는 효과가 있음이 여러 연구결과에서 입증되었다.

Pregabalin은 NMDA 수용체에서 신경 전달 물질들과 경쟁적 결합을 하는 것이 아니라, 시냅스 전막에서 칼슘 통로 조절을 통해 신경 전달 물질의 분비를 억제한다. 따라서, 통각과민(hyperalgesia) 유발 전에 pregabalin을 투여하는 것이 이미 중추 감각에 의한 통증이 유발된 상태에서 약제를 투여하는 것보다 진통 효과가 우월하여 선행진통(preemptive analgesia) 효과가 있을 것이라고 가설을 세우고 연구를 진행하였다.

흰쥐를 대상으로 포르말린의 피하 주사 전과 후에 실험군은 pregabalin을, 대조군은 생리 식염수를 지주막하강 내로 투여하여 통증에 대한 반응의 정도를 측정하였다. 각 군별로 6마리씩 나누어 농도를 0.003 μ g, 0.01 μ

g, 0.03 µg, 0.1 µg, 0.3 µg으로 각 군에 투여하였다. 통증에 대한 반응의 정도는 포르말린 주사 후 60 분간 쥐의 통증 회피반응의 횟수를 측정하였다.

대조군에서는 포르말린 주입 후 biphasic형태로 회피반응 횟수가 관찰되었으며, pregabalin 투여 군에서는 phase 1 반응의 횟수를 감소시켰으나 천장 효과를 보였으며, phase 2 반응의 횟수 감소는 용량에 비례하여 감소하는 현상을 볼 수 있었다. 전처치군과 후처치군 모두에서 용량에 비례해서 회피반응 횟수가 감소하였는데, 특히 전처치군에서 후처치군에 비해 phase 2 반응이 더욱 감소함을 보였다. 따라서, pregabalin의 지주막하강 내 투여는 유해성 통각 전달의 과잉 상태를 억제하는 효과를 가지며, 특히 중추 감각의 발생을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한, 전처치를 한 경우 후처치의 경우보다 선행 진통 효과가 우수함을 알 수 있었다.

핵심되는 말 : pregabalin, 지주막하강, 전처치, 후처치, 포르말린검사

흰쥐 포르말린 검사에서 지주막하강 내 pregabalin의 전 처치와 후 처치에 따른 진통효과 비교

<지도교수 이 윤 우>

연세대학교 대학원 의학과

조 남 룡

I. 서 론

통증은 크게 생리적 통증과 병리적 통증으로 분류할 수 있다. 생리적 통증은 조직에 손상을 줄 수 있는 유해 자극에 대하여 기능적으로 특이화되고 역치 침해 수용체(high threshold nociceptor)의 활성화로 나타나게 되며, 이는 생체의 이상을 신속히 알리고 경고하는 중요한 방어 기전으로 작용하고 유해 자극의 소실과 함께 자연 소멸된다. 이와는 달리 병리적 통증은 체성 감각계(somatosensory system)에서의 말초성 및 중추성 감각 및 병리학적인 현상의 유도로 인해서 약한 자극에도 증강된 통증이 유발되며, 유발 자극이 없이도 통증(자발통)을 일으키게 된다. 병리적 통증의 한 가지 증상인 통각과민(hyperalgesia)의 대표적인 임상 예에는 수술 후 통증과 화상 후 통증 등이 있다.¹

통각과민을 연구하는 동물실험의 하나로 포르말린 테스트가 있다. 포르말린의 피하 주사로 인한 침해 수용성 자극은 두 가지 형태의 침해 수용성 반응(biphasic nociceptor response)을 보이게 되는데, 먼저 짧게 지속되는 phase 1반응과 이후에 천천히 시작되고 오래 지속되는 phase 2반응이 나타난다.¹ Phase 1은 포르말린 주사로 인해 발생된 유해 자극에 대한 생리적 통증이다. Phase 2는 phase 1시기에 촉진되고 지속적으로 유지되는 자

극에 의해 형성되는 말초 조직에서의 말초감작(peripheral sensitization)과 척수 후각에서의 중추감작(central sensitization)으로 발생된 병리적 통증이다. 말초감작은 말초에서 유해자극으로 생성된 여러 가지 발통물질들이 서로 상승작용을 나타내어 구심성 A δ -, C-fiber 말단의 통각 수용기의 역치를 낮추고 작은 자극에도 강력히 활성화됨으로써 통증이 증강(facilitation)되는 현상이다. 중추감작은 구심성 C-fiber가 반복적으로 자극받아 척수 후각 광역역신경원(wide dynamic range neuron)의 NMDA 수용체가 활성화되어 wind-up 현상과 통증의 악순환에 의해 발생된다.^{1,2} 즉, 중추감작은 유해 자극 후 일차적으로 신경전달물질이 AMPA 수용기를 활성화 시켜 나타나며, 반복된 AMPA 수용기 활성화와 신경전달물질의 NMDA 수용기의 glycine subunit와의 작용으로 이차적인 NMDA 수용기 활성화로 발생한다. 안정적인 NMDA 수용기를 유지하는 Mg⁺⁺ 마개가 열리고 NMDA 수용기 통로를 통해 이차신경 세포질 안으로 Ca⁺⁺ 유입이 되면 NO, PGE₂ 등이 생성되며, 이들은 feedback하여 시냅스 전막에서의 신경전달물질 분비를 증가시키고, AMPA 수용체를 더욱 발현시킬 뿐 아니라, immediate early gene을 복제하여 중추신경 내에서 통증의 악순환과 장기간 지속되는 증강된 통증(long term potentiated pain)을 일으킨다.

포르말린 테스트에서 척수 후각 신경 세포 흥분에 의한 말초 감작과 중추 감작으로 인한 phase 1 & 2 반응은 사람에서 수술 후에 나타나는 통증과 유사하므로 술 후 통증에 부합되는 좋은 모델로서 약리학 연구에 널리 이용되고 있다.³ Dickenson등은 evoked C-fiber response를 억제시키는 opioid mu receptor agonist를 쥐의 척수 강 내로 투여할 경우 포르말린 자극 전에 투여한 경우가 자극 후 통증이 유발된 후에 투여한 경우보다 진통 효과가 현저히 높음을 보고하였다.⁴ NMDA receptor antagonist를 포르말린 자극 전에 투여한 경우와 자극 후에 투여했을 때를 비교한 연구에서 양군 모두 phase 1차단 효과에는 차이가 없이 미약하였으며, 자극전 투여군에서 phase 2 차단 효과가 월등함을 보여주었다.^{5,6} 이들 연구는 중추 감작이 유발된 뒤에는 신경 전달 물질 분비 억제제나 NMDA receptor

antagonist를 투여해도 큰 효과가 없다는 사실을 보여주었다.

S(+)-3-isobutyl GABA(pregabalin)은 GABA의 새로운 analog이나 GABA receptor에는 작용하지 않으며 기존의 GABA약물에 비해 칼슘 통로의 alpha-2-delta subunit에 특이적으로 결합해서 칼슘 유입을 조절하고, 증강된 신경전달물질의 분비를 조절하여 증강된 통증을 치료하는데 탁월한 약물이다. 또한 이미 말초 감각과 중추 감각으로 증강된 통증을 치료하는 효과가 있음을 여러 연구결과에서 입증되었다.^{2,3,7-10}

Pregabalin은 NMDA receptor에서 신경 전달 물질들과 경쟁적 결합을 하는 것이 아니라, 시냅스 전막에서 칼슘 통로 조절을 통해 과잉 분비되는 신경전달물질의 분비를 억제한다.^{2,3,6} 따라서 통각 과민 유발 전에 pregabalin을 투여하는 것이 이미 중추 감각에 의한 통증이 유발된 상태에서 약제를 투여하는 것보다 진통 효과가 우월하여 preemptive analgesia 효과가 있다고 생각할 수 있다. 쥐를 대상으로 한 실험에서 pregabalin이 술 후 통증(abdominal surgery)이나¹¹ incisional pain model등에서³ 대조군이나 다른 약제에 비해 통증 조절에 효과가 있다는 연구들은 있었지만; pregabalin을 통증유발 전에 처치할 때와 통증 유발 후 처치할 때 그 효과의 차이를 증명한 연구는 아직까지 없다.

II. 대상 및 방법

1. 대상

수컷 Spraque-Dawley 200-220 g 쥐를 실험 대상으로 하였으며 사육실에서 물과 먹이를 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 3일 이상 사육실에서 주위 환경에 적응시킨 후 실험을 진행하였다.

2. 방법

3일 이상 사육실에서 주위 환경에 적응시킨 쥐를 투명한 마취 유도 상자에 넣은 후 100% 산소 1리터/분 및 4 vol% enflurane으로 2분간 마취유도 후 움직임이 없어지면 마스크로 2-3 vol% 의 enflurane으로 마취를 유지하였다. 전신마취 상태를 유지하면서 쥐를 뇌 정위 장치에 고정하고 후두부와 경추부위 털을 제거하고 베타딘 용액으로 소독하였다. 피부를 중으로 절개한 다음 후두골과 제1경추 사이 환추 후두막이 노출되도록 근육을 박리하였다. 23 G 바늘 끝으로 경막을 절개 후 polyethylene 카테터 (PE-10, Becton Dickinson, USA)를 지주막하 강에 거치시켰다. 카테터는 지주막하강을 따라 8 cm 밀어 넣어 카테터 끝이 허리팽대부에 위치하도록 하였다. 카테터 다른 끝 4 cm은 피하를 통하여 두개골 상부에 고정하였다. 지혈 후 피부 절개 부위를 봉합하고 마취에서 각성시켰다. 마취로부터 회복 후 자유롭게 물과 먹이를 먹도록 하며 5일 - 7일간 백서의 걸음걸이, 상처부위, 전신 상태 등을 관찰하여 신경학적 손상과 감염증이 없다고 판단되는 백서를 대상으로 본 실험에 사용하였다.

모든 쥐는 임의로 전처치군과 후처치군으로 나누고, 전처치군은 포르말린 주사 10분 전에, 후처치군은 포르말린 주사 10분 후에 지주막하강에 거치된 PE-10 카테터를 통해 Hamilton 주사기를 이용하여 약물을 주입하였다. 대조군은 생리식염수 10 μ l를 실험군은 pregabalindmf 0.9% 생리 식염수로 녹여 10 μ l의 양으로 만들어 주입하였다. 전처치 실험군은 임의로 네 군으로 나누어 0.003 μ g, 0.01 μ g, 0.03 μ g, 0.1 μ g을, 후처치 실험군은 임의로 네 군으로 나누어 0.01 μ g, 0.03 μ g, 0.1 μ g, 0.3 μ g을 투여하였다. 카테터의 사강 용적을 고려하여 모든 군에서 약물 주입 후 생리 식염수 10 μ l를 추가로 주입하였다. 각각의 군은 6마리씩 실험하였다.

포르말린은 원액을 5% 용액으로 희석 후 30 G 바늘을 이용하여 쥐의 왼쪽 뒷 발등에 50 μ l를 피하 주사하였다.

포르말린과 약물 주입이 끝나면 사방이 투명한 케이지에 자유롭게 놓아

두고, 60분간 행동 반응을 관찰하였다. 포르말린을 주입받은 쥐의 주사한 측의 발을 움짚거림, 핥기, 물기, 들고 있기 등의 행동을 모두 통증 회피 반응으로 기록하였다. 포르말린 주사 후 60분간 매 1분마다 회피반응 횟수를 측정하고 결과는 첫 1분 기록이후 매 5분 동안의 측정치를 5로 나누어 1분간의 평균치로 5분마다 12회 기록하였다. 실험이 끝난 모든 쥐는 과량의 thiopental sodium을 복강 내로 주사하여 안락사 시켰다.

대조군, 전처치군, 후처치군에서 얻어진 결과는 통증 반응 phase 1(1-10분)와 phase 2(20-60분)로 분류하고 각 군의 측정치의 비교는 평균 ± 표준오차로 표시하였다.

선형 회귀 분석을 이용하여 용량 반응 관계를 알아보고 용량 반응 곡선을 이용하여 약물의 ED₅₀를 구하였다. 용량 반응 곡선에서 각 용량에 따른 반응의 정도는 ANOVA test를 이용하고, 두 군 간의 ED₅₀은 Student's t-test를 이용하여 비교하여 P값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의하다고 판단하였다. 용량 반응 곡선에서의 반응은 회피반응 횟수의 총 합계로 하고, 약물의 ED₅₀를 구하기 위해 최대가능 백분율(% maximal passible effect, %MPE)을 다음 공식을 이용하여 구하였다.

% MPE

=(대조군 회피반응 횟수 - 실험군 회피반응 횟수)/대조군 회피반응 횟수 x 100

III. 결 과

대조군에서는 포르말린 주입 직후 회피반응이 활발히 나타나다가 10분에 현저히 감소하였으며 이 후 다시 점차 증가하여 50-60 분까지 지속되는 biphasic graph를 보였다. (그림 1 & 3)

Pregabalin 전처치 실험군에서 phase 1 반응은 0.003 μg 을 투여한 군은 대조군과 의미 있는 차이를 보이지 않았으며, 0.01 μg 이상을 투여한 군에서 통계적으로 의미 있는 회피반응의 감소를 보였다. 그러나 투여 용량에 비례하지 않았으며(그림 1) 용량반응 곡선에서 천장 효과를 보였다. (그림 2)

Pregabalin 전처치 실험군에서 phase 2 반응은 0.003 μg 을 투여한 군은 대조군과 의미 있는 차이를 보이지 않았으며, 0.01 μg 이상을 투여한 세 군 모두 대조군에 비해 용량 의존적으로 회피반응이 의미 있게 감소하였다. (그림 1 & 2)

Pregabalin 후처치 군에서 phase 1반응은 pregabalin투여 전에 이미 나타났다가 사라지므로 회피반응의 횟수 변화에 의미가 없었고, phase 2반응은 용량 의존적으로 회피반응의 의미 있는 감소를 보였다. (그림 3 & 4)

용량 반응 곡선으로 전처치군과 후처치군을 비교할 때 전처치군의 $ED_{50} = 0.014(0.004-0.04) \mu\text{g}$, 후처치군의 $ED_{50} = 0.087(0.015-1.00) \mu\text{g}$ 로 두 군간의 유의한 차이가 있었다. (그림 2 & 4)

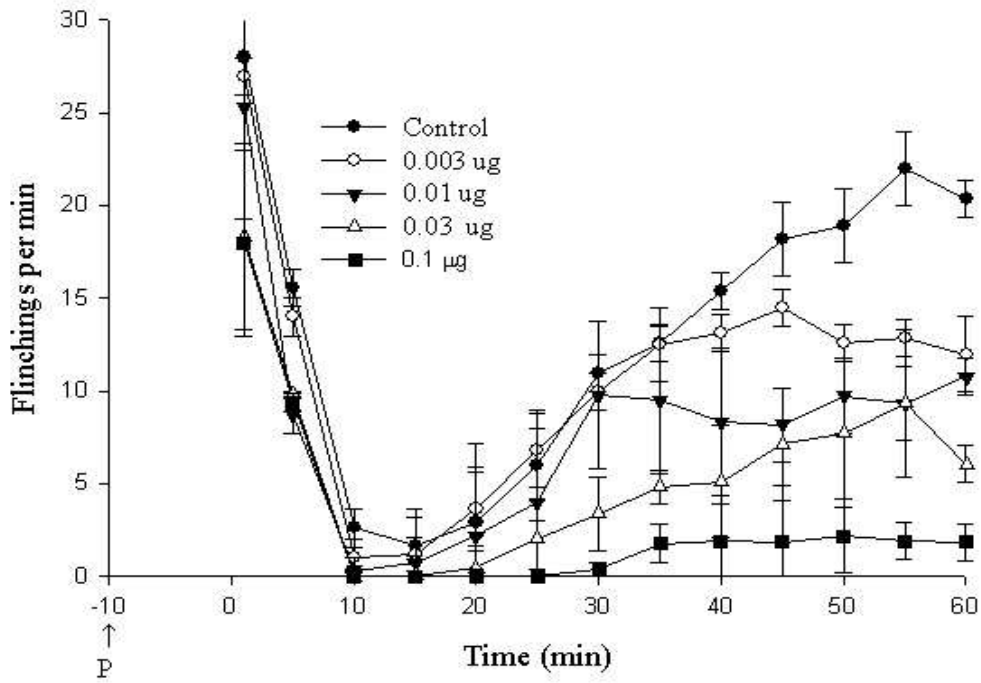


그림 1. Time-effect curve of intrathecal pregabalin given before injections of formalin for number of flinches per minute observed after formalin. Drug(P) was administered 10 min before formalin injection. Pregabalin produced a significant suppression of flinches in a dose-dependent manner. Each line represents the mean and SEM in six rats. Saline group is presented for comparison.

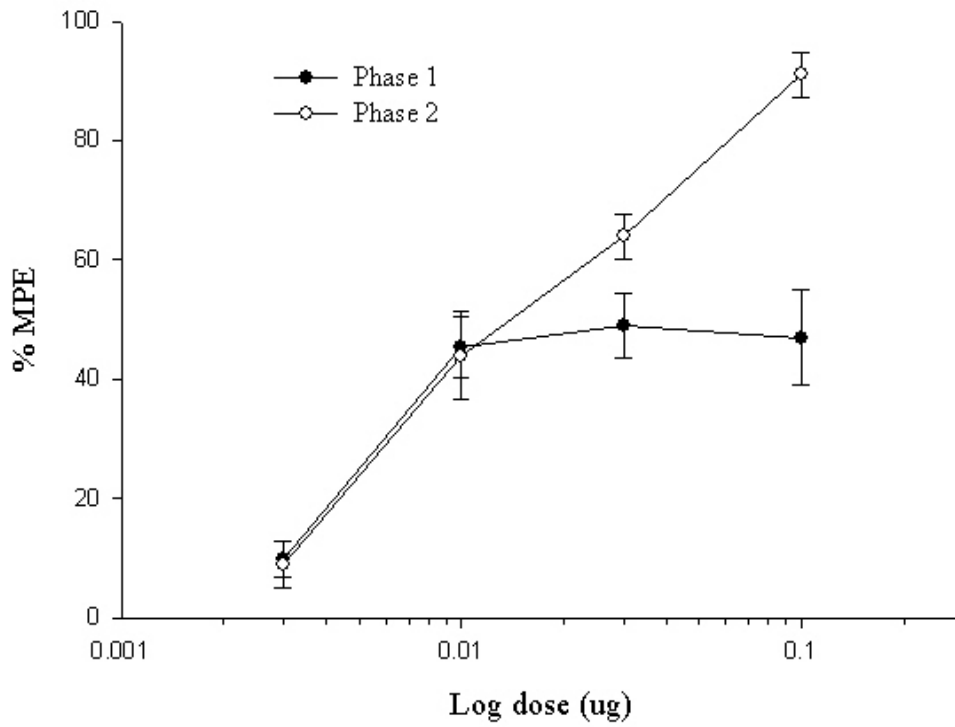


그림 2. Log-dose response curves for reduction in flinches(express as % MPE) produced by intrathecal injection of pregabalin in phase 2 but not in phase 1 in pretreatment group. Each line represents the mean % MPE with SEM bars.

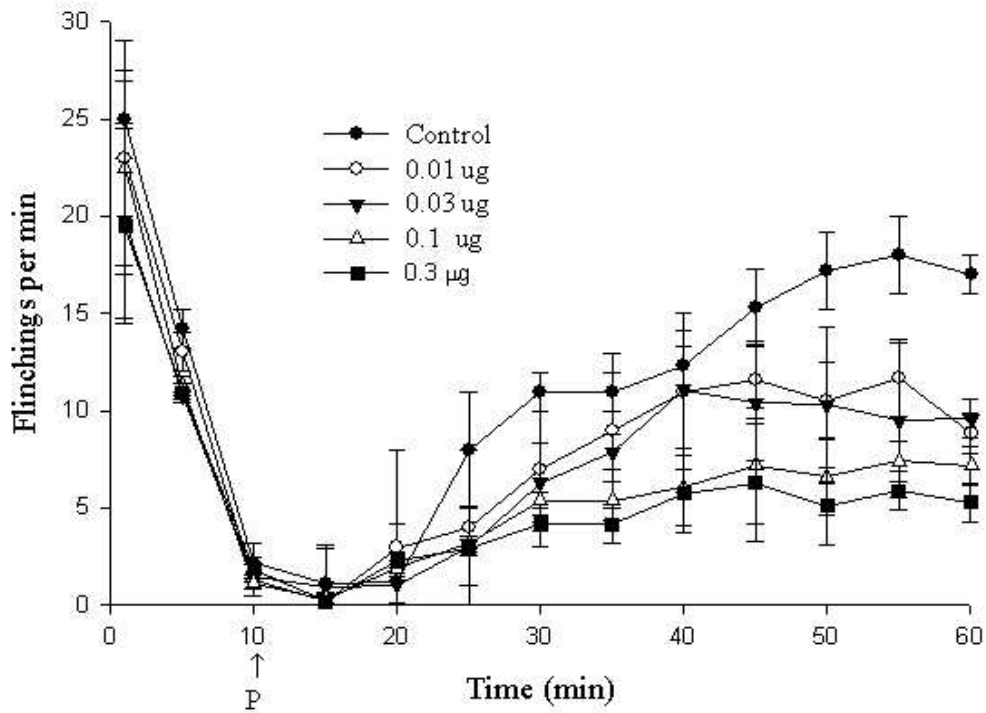


그림 3. Time-effect curve of intrathecal pregabalin for number of flinches per minute in formalin test. Drug(P) was administered 10 min after formalin injection. Pregabalin produced a significant suppression of flinches in a dose-dependent manner. Each line represents the mean and SEM in six rats. Saline group is presented for comparison.

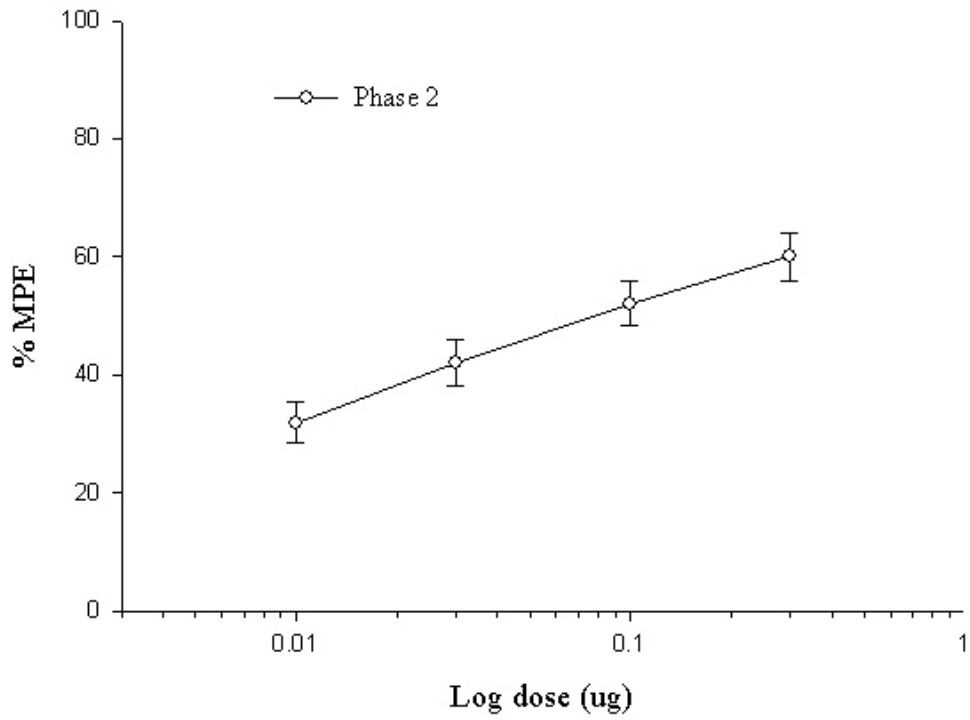


그림 4. Log-dose response curves for reduction in flinches(express as % MPE) produced by intrathecal injection of pregabalin in posttreatment group. Each line represents the mean % MPE with SEM bars.

IV. 고 찰

포르말린의 피하주사는 일차적으로 즉각적인 활동성 증가를 유발시키고, 이차적으로 척수 후각 광영역신경원의 NMDA 수용체를 통해 장기간 지속되는 통증을 일으킨다.^{3,12,13} 흰 쥐에서 포르말린의 발등 피하 주사 후 두 가지 양상의 행동 반응을 볼 수 있는데, 다리를 움찔하는 행동이 biphasic 양상으로 나타나는 것이 대표적이다.^{3,14,15} 본 연구에서도 전형적으로 포르말린 주사 직후 움찔함이 나타났다가 10분 후에 거의 사라지는 phase 1과 20분 후부터 움찔함의 수가 서서히 증가해서 50-60분까지 계속 증가하는 phase 2의 biphasic 양상을 보였다. 이것은 화학물질에 의한 통각수용기의 자극이 역치를 넘어 일차 구심성 섬유를 통해 척수후각으로 전달되어 반사적으로 통각에 대한 회피반응이 나타나는 phase 1과 이후 지속적인 말초 통각이 척수로 전달되면서 말초 감각과 중추 감각에 의한 증강된 통증이 나타나는 phase 2가 나타난 것으로 보인다. (그림 1 & 3)

시냅스 전막의 칼슘 통로는 통로를 구성하는 alpha-1 subunit과 보조적 역할을 하는 alpha-2-delta, beta subunit, 그리고 일부 조직에 gamma subunit으로 구성되어있다. 보조적 subunit은 alpha-1 subunit의 막과 통로를 통한 이동을 도와준다. 특히, alpha-2-delta subunit은 alpha-1 subunit의 생-물리학적, 약리학적 성상들을 제한, 조절하며, 간질이나 신경병성 통증의 치료를 위해 사용되는 약물들끼리의 상호 작용을 도와주기도 한다.^{16,17} 칼슘 통로의 alpha-2-delta subunit이 중추신경계에서 pregabalin에 대한 주 결합 단백질이라는 사실은 자가방사기록 분석으로 증명된 바 있다.¹⁸ 예를 들어 척수 후각의 칼슘 통로에서 alpha-2-delta subunit이 상향조절 (upregulation) 되면 말초 신경 손상에 따른 병리적 통증이 발생한다.^{19,20}

Pregabalin은 중추신경계에 시냅스 전막 칼슘 통로의 alpha-2-delta subunit에 비경쟁적으로 결합해서 칼슘의 시냅스 전막으로의 이동을 억제한다. Alpha-2-delta subunit에 결합된 pregabalin에 의해 흥분성 신경전달 물질의 분비가 차단되면, NMDA, AMPA 수용체의 흥분도가 감소된다. 다

시 말해, glutamate, noradrenalin, substance P 및 CGRP 등의 흥분성 신경 전달 물질의 분비를 억제시켜,²¹⁻²³ 신경 손상이나 염증, 절개에 의한 손상 등에서 오는 통증의 정도를 줄인다.^{2,7-10,23} Shimoyama 등은 pregabalin이 NMDA, non-NMDA 수용기를 통해 흥분성 반응을 감소시켜 중추감작을 억제시키는 효과가 있음을 증명하였고,²⁴ Wu 등은 pregabalin이 신경병성 통증 모델에서 통증에 대한 반응을 완화한다고 발표하였다.²⁵ 이들은 모두 칼슘 통로의 alpha-2-delta subunit이 여러 자극에 의해 유발된 증강된 신경병성 통증에 대한 차단 작용에 관련이 있으며 이를 차단하는 것이 효과적임을 보여주었다. 그러나, alpha-2-delta subunit에 대한 gabapentin 또는 pregabalin의 진통 작용이 spinal, supraspinal, peripheral 중에서 어느 차단 경로에 가장 효과적으로 작용하는지에 대해서는 아직 정확히 알려지지 않았다.²⁶⁻²⁹

본 연구는 척수 후각에 존재하는 alpha-2-delta subunit에 대한 pregabalin의 항통각과민 효과를 연구하고자 포르말린 테스트 쥐를 이용하여 지주막하강에 pregabalin을 투약하였다. 그 결과를 그림에서 볼 수 있듯이 pregabalin을 투여한 군에서 대조군에 비해 회피반응의 수가 의미 있게 감소함을 볼 수 있었다. Phase 1인 포르말린 주사 후 10분까지보다는 phase 2(20-60분)의 회피반응의 수가 의미 있게 감소하였는데, 이것은 유해 자극에 의한 시냅스 전막으로의 칼슘 유입, 신경 전달 물질의 과다 분비, NO, PGE₂ 생성, 이차적 신경 전달 물질의 분비로 이어지는 일련의 과정 중 시냅스 전막으로의 칼슘 유입을 pregabalin이 억제함으로써 나타난 결과로 보인다.^{1,2} 더욱이 pregabalin의 농도에 따라 회피반응의 차단 정도가 더 커짐을 보였고 이것은 시냅스 전막의 칼슘 통로의 alpha-2-delta subunit에 결합하는 pregabalin의 양이 많을수록 시냅스 전막으로의 칼슘 유입이 비례적으로 억제되어 나타난 결과라 하겠다.

본 실험에서 보고자했던 통각과민 발생 전과 후의 pregabalin 투여에 따른 차이는 전처치군의 ED₅₀ = 0.014(0.004-0.04) µg, 후처치군의 ED₅₀ = 0.087(0.015-1.00) µg로 두 군 간의 유의한 차이가 있어 전처치 군이 후처

치군보다 의미 있게 효과적임을 알 수 있었다. (그림 2 & 4) 이것은 중추 감각 기전인 NMDA 수용체 활성화로 칼슘이 유입되고 이로 인해 생성된 NO, PG 등이 다시 시냅스 전막의 칼슘 통로를 통한 칼슘 유입을 일으키고, 유입된 칼슘이 glutamate, substance P, norepinephrine 등의 신경 전달 물질을 분비시키는 일련의 악순환이 반복되는 과정 중 pregabalin은 시냅스 전막의 칼슘 통로에서 칼슘의 유입을 억제시키는 작용으로 feedback을 억제시키고 악순환의 고리를 절단시켜 중추 감각을 예방하는 것이 이미 중추감각이 발생된 후에 치료하는 효과보다 효과적임을 확실하게 증명하였다. 즉 일단 신경 전달 물질 분비에 의한 NMDA, AMPA수용기의 활성화 일어나 중추감각이 유도된 이후에는 pregabalin에 의한 신경접합부에서의 신경 전달 물질의 분비 감소 효과가 작용을 보여주는 것이다.

NMDA receptor antagonist는 phase 1에서 작용하지 않으며 NMDA 수용기를 통한 중추 감각이 일어나는 phase 2에만 작용하며, 이미 중추 감각이 유발된 후에는 큰 효과가 없는^{5,6,30} 것과는 달리 본 연구에서 pregabalin은 phase 1 및 phase 2 모두에 효과가 있는 것으로 나타났다. 본 연구에서 pregabalin 전처치 시 phase 1에서 대조군에 비해 의미 있게 통증 반응 횟수가 감소됨은 결국 pregabalin이 유해 자극이 전달되는 phase 1 시기에서도 신경 전달 물질의 과도한 분비를 조절할 능력이 있음을 시사하는 결과라 하겠다. 이로써 pregabalin이 유해 수용기를 통한 통증 유발시 통증 전달과정을 억제하는 작용을 가지며 말초감각 및 중추감각을 예방하는 효과를 보이며, 이와 같은 점에서 NMDA receptor antagonist와의 차이가 있음을 알 수 있었다.

또한 gabapentin의 전처치는 phase 1의 차단 효과가 없었다는 다른 연구 결과들을^{5,31,32} 참고할 때 pregabalin과 gabapentin이 칼슘 통로의 alpha-2-delta subunit에 동일한 기전으로 작용하지만,³⁰ pregabalin이 gabapentin에 비해 alpha-2-delta subunit에 좀 더 특이적으로 작용하는 약리적 특성 때문으로 생각된다.¹⁸⁻²⁰ 한편 용량에 따른 %MPE의 증가는 고농도의 pregabalin가 보다 많은 칼슘 통로의 차단이 이루어진다고 생각할

수 있다.

그림 2에서 알 수 있듯이 pregabalin 전처치 시 phase 1에 있어서는 약물의 투여 농도에 천장 효과를 보였다. 이것은 pregabalin이 유해자극에 대한 신경전달 물질의 분비를 완전히 억제하지는 못하지만 그것의 과잉 분비는 조절할 수 있음을 시사한다. 신경전달물질의 과잉분비 조절 효과는 적은 양의 pregabalin만으로도 가능하나 이것에 대한 적정 농도는 본 연구에서는 알 수 없었다.

Field등은 incisional pain model에서 pregabalin의 피하투여가 수술 후 통증 억제 작용이 있었으나 통증 유발 전과 후 투여에 있어 차이가 없음을 언급하였다.³ 하지만 본 연구와는 달리 약물을 피하로 투여한 것과, 약물의 작용 시간에 대한 차이를 주로 본 연구라는 점 및 다양한 농도에서의 연구가 이루어지지 않았다는 점 등에서 본 연구 결과와의 차이가 있는 것으로 보인다.

이상의 결과에서 pregabalin은 gabapentin이나 NMDA receptor antagonist와는 달리 phase 1과 phase 2 모두에서 차단 효과를 보이며, 특히 phase 2에 대한 차단효과가 우수함을 보여주었다. 즉, pregabalin은 말초감각에 의한 유해성 통각 전달의 과잉 상태를 억제하는 효과를 가지며, 특히 중추감각의 발생을 억제하는 효과가 많음을 알 수 있었다. 또한 포르말린 자극 전 처치를 한 경우 후 처치의 경우보다 선행진통 효과가 우수함을 알 수 있었다. 이는 통증 유발 전에 약물을 투여하는 것이 중추감각이 유발 되어 NMDA 및 AMPA 수용체의 활성화가 일어난 뒤에 투여하는 것보다 통증 차단 효과가 월등하다는 의미이다. 그러나 포르말린 자극 후 처치에서도 용량 비례적으로 통증 회피반응이 감소하는 것으로 보아 좀 더 많은 연구를 통해 수술 후 통증치료나 조직 손상에 의한 만성 통증증후군의 치료에 응용될 수 있을 것으로 생각한다.

V. 결 론

포르말린 자극 전 pregabalin의 지주막하강 내 투여는 포르말린 자극 후에 투여한 것보다 선행진통 효과가 더 크다.

포르말린 자극 후에도 pregabalin 용량 비례하여 진통효과가 증가하므로 이미 형성된 조직 손상에 의한 통증의 치료 효과가 있다.

Pregabalin은 유해자극에 의한 신경전달물질의 과잉분비를 조절하는 효과가 있어 조직손상에 의한 병리적 통증 예방 효과가 있다.

참고문헌

1. Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation: Implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain* 1991; 44: 293-299.
2. Gajraj NM. Pregabalin for pain management. *Pain practice* 2005; 5: 95-102.
3. Field MJ, Holloman EF, Mcclery S, Hughes J, Singh L. Evaluation of gabapentin and S-(+)-isobutylgaba in a rat model of postoperative pain. *J Phamacol Exp Ther* 1997; 282: 1242-1246.
4. Dickenson AH, Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurons in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. *Pain* 1987; 30: 349-360.
5. Yoon MH, Bae HB, Choi JI. Antinoceptive interactions between intrathecal gabapentin and MK801 or NBQX in rat formalin test. *J Korean Med Sei* 2005; 20: 307-312.
6. 권재영, 김철홍, 김해규, 백승환, 김인세, 정규섭. 백서에서 척수 강 내 투여한 Morphine, Clonidine 및 MK-801이 Formalin 자극반응에 미치는 영향. *대한 마취과 학회지* 1997; 32: 354-359.
7. Framton JE, Foater RH. Pregabalin in treatment of postherpetic

- neuralgia. *Drugs* 2005; 65: 111-118.
8. Wallin J, Cui JG, Yakhnitsa V, Schechtmann G, Meyerson BA, Linderoth B. Gabapentin and pregabalin suppress tactile allodynia and potentiate spinal cord stimulation in a model of neuropathy. *Eur J Pain* 2002; 6: 261-272.
 9. Jun JH, Yaksh TL. The effect of intrathecal gabapentin and 3-isobutyl r-aminobutyric acid on the hyperalgesia observed after thermal injury in the rat. *Anesth Analg* 1998; 86: 348-354.
 10. Field MJ, McCleary S, Hughes J, Singh L. Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozocin in the rat. *Pain* 1999; 80: 391-398.
 11. Diop L, Raymond F, Fargeau H, Petoux F, Chovet M, Doherty AM. Pregabalin (CI-1008) inhibits the trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colonic allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 1013-1022.
 12. Heapy CG, Jamieson A, Russell NJ. Afferent C-fiber and A-delta activity in models of inflammation. *Br J Pharmacol* 1987; 90Supp: 164.
 13. Bonica JJ. Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. In: Bonica JJ, editor: *The management of pain*, 2nd ed. Malvern, Lea and Febiger. 1990. P. 28-94.

14. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-174.
15. Wheeler-Aceto H, Porreca F, Cowan A. The rat paw formalin test: comparison of noxious agents. *Pain* 1990; 40: 229-238.
16. Klugbauer N, Marais E, Hofmann F. Calcium channel alpha-2-delta subunits. differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr* 2003; 35: 639-647.
17. Stahl SM. Mechanism of action of alpha2delta ligands: voltage sensitive calcium channel (VSCC) modulators. *J Clin Psychiatry* 2004; 65: 1033-1034.
18. Bian F, Li Z, Offord J, Davis MD, McCormick J, Taylor CP, et al. Calcium channel alpha2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in alpha2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain Res* 2006; 1075: 68-80.
19. Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME, et al. Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 2001; 21: 1868-1875.

20. Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD. Spinal dorsal horn calcium channel $\alpha_2\delta_1$ subunit upregulation contributes to peripheral nerve injury-induced tactile allodynia. *J Neurosci* 2004; 24: 8494-8499.
21. Fink K, Dooley DJ, Meder WP, Suman-Chauhan N, Duffy S, Clusmann H, et al. Inhibition of neuronal Ca^{2+} influx by gabapentin and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology* 2002; 42: 229-236.
22. Dooley DJ, Mieske CA, Borosky SA. Inhibition of K^{+} -evoked glutamate release from rat neocortical and hippocampal slices by gabapentin. *Neurosci Lett* 2000; 280: 107-110.
23. Field MJ, Oles RJ, Lewis AS, McCleary S, Hughes J, Singh L. Gabapentin (neurontin) and S-(+)-3-isobutylgaba represent a novel class of selective antihyperalgesic agents. *Br J Pharmacol* 1997; 121: 1513-1522.
24. Shimoyama M, Shimoyama N, Hori Y. Gabapentin affects glutamatergic excitatory neurotransmission in the rat dorsal horn. *Pain* 2000; 85: 405-414.
25. Wu WP, Hao JX, Ongini E, Impagnatiello F, Presotto C, Wiesenfeld-Hallin Z, et al. A nitric oxide (NO)-releasing derivative of gabapentin, NCX 8001, alleviates neuropathic pain-like behavior after spinal cord and peripheral nerve injury. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 65-74.

26. Hwang JH, Yaksh TL. Effect of subarachnoid gabapentin on tactile-evoked allodynia in a surgically induced neuropathic pain model in the rat. *Reg Anesth* 1997; 22: 249-256.
27. Kayser V, Christensen D. Antinociceptive effect of systemic gabapentin in mononeuropathic rats, depends on stimulus characteristics and level of test integration. *Pain* 2000; 88: 53-60.
28. Taylor CP, Vartanian MG, Yuen PW, Bigge C, Suman-Chauhan N, Hill DR. Potent and stereospecific anticonvulsant activity of 3-isobutyl GABA relates to in vitro binding at a novel site labeled by tritiated gabapentin. *Epilepsy Res* 1993; 14: 11-15.
29. Chen SR, Xu Z, Pan HL. Stereospecific effect of pregabalin on ectopic afferent discharges and neuropathic pain induced by sciatic nerve ligation in rats. *Anesthesiology* 2001; 95: 1473-1479.
30. Yamamoto T, Yaksh TL. Comparison of the antinociceptive effects of pre- and posttreatment with intrathecal morphine and MK801, an NMDA antagonist, on the formalin test in the rat. *Anesthesiology* 1992; 77: 757-763.
31. Kaneko M, Mestre C, Sanchez EH, Hammond DL. Intrathecally administered gabapentin inhibits formalin-evoked nociception and the expression of Fos-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292: 743-751.
32. Yoon MH, Choi JI, Jeong SW. Spinal gabapentin and antinociception:

mechanism of action. J Korean Med Sci. 2003; 18: 255-261.

Abstract

The Analgesic Effects of Intrathecal Pregabalin in Rat Formalin test ;
Comparison between Pre- and Post-treatment

Nam Ryong Cho

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Youn-Woo Lee)

Pregabalin is a new analog of the neurotransmitter gamma aminobutyric acid(GABA), but does not act on GABA receptor. It is an anti convulsant and analgesic agent that has a selectivity which interacts with the alpha-2-delta subunit of the voltage dependent calcium channels.

There are two distinct biphasic excitatory responses in all convergent neurons tested with formalin: an immediate or acute phasic peak of neuronal firing in 10 min after injection, and a second more prolonged tonic excitatory response over 10-55 min after first firing.

All experimental animals were divided randomly into pre-& posttreatment group. In pretreatment group, pregabalin(0.003 μ g, 0.01 μ g, 0.03 μ g, 0.1 μ g) was administrated through the intrathecal catheter 10 min prior to formalin injection. In posttreatment group, pregabalin(0.01 μ g, 0.03 μ g, 0.1 μ g, 0.3 μ g) was administrated through the catheter 10 min after formalin injection. formalin(50ug, 5%) was injected in the hind paw. We counted the number of spontaneous flinching for 60 min to quantify the formalin response.

The responses which were represented by flinching count, were showed decreased in the phase 2, in all groups(pretreatment & posttreatment group), while little effect in phase 1.

Compare to control group there were significant decreasing of the number of flinchings especially in the pretreatment group.

Correspondingly, intrathecal administration of pregabalin prior to formalin test may be useful in manage injury-induced hyperalgesia.

Key Words : pregabalin, formalin, intrathecal, pretreatment, posttreatment.