

뇌하혈 재관류로 인한 뇌조직 아민 변동과 nitric oxide 및 산소유리기와의 관련성

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 악리학교실*, 한림대학교 의과대학 신경과학교실**

문준식·정희선*·김동구*·김경환*·이병철**

—Abstract—

Relationship of the Changes in Biogenic Amines to Nitric Oxide and Oxygen Free Radicals During Cerebral Ischemia/Reperfusion

Joon-Shik Moon, M.D., Hee-Sun Jung, M.S.*,
Dong-Goo Kim, M.D., Ph.D.*; Kyung-Hwan Kim, M.D., Ph.D.*
and Byung-Chul Lee, M.D.**

Department of Neurology, Pharmacology*, Yonsei University College of Medicine,

Department of Neurology, Hallym University College of Medicine**

Recently oxygen free radicals and nitric oxide(NO) are known to play an important role in neuronal reperfusion injury. This study was aimed to investigate the role of oxygen free radicals and NO during cerebral ischemia/reperfusion, using dimethylthiourea(DMTU) and NG-monomethyl-L-arginine(NMMA), an oxygen free radical scavenger and a competitive NOS inhibitor respectively.

In the *in vivo* experiment, the ischemia/reperfusion-induced changes of cerebral biogenic amines were examined in Mongolian gerbil(*Meriones unguiculatus*) pre-treated with NMMA and/or DMTU. To induce cerebral ischemia/reperfusion, bilateral common carotid arteries were clamped for 10 minutes and then released for 15 minutes. The biogenic amines were measured by using HPLC-ECD(High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical detection). To confirm the results from the *in vivo* experiments, the effect of NMMA and/or DMTU on [³H]dopamine release from striatal slices exposed to hypoxia was investigated.

The results are as follows;

- 1) Ischemia/reperfusion increased the ratio of DOPAC/dopamine and HVA/dopamine as well as the concentrations of DOPAC and HVA, which were evident only in corpus striatum.
- 2) NMMA attenuated the ischemia/reperfusion-induced increase in the ratio of DOPAC/dopamine in corpus striatum. However, the change of DOPAC or HVA was minimal.
- 3) DMTU attenuated the ischemia/reperfusion-induced increase of DOPAC and HVA, and the ratio of DOPAC/dopamine and HVA/dopamine in corpus striatum.
- 4) Simultaneous pre-treatment with NMMA and DMTU attenuated the ischemia/reperfusion-induced increase of DOPAC and HVA, and the ratio of DOPAC/dopamine and HVA/dopamine in corpus striatum. The extent of attenuation was greater than the single treatment group with NMMA or DMTU.
- 5) Exposure to hypoxia markedly increased the release of [³H]dopamine in the striatal slices.
- 6) The administration of either NMMA or DMTU attenuated the increase of [³H]dopamine release induced by hypoxia in the striatal slices.
- 7) The administration of both NMMA or DMTU markedly attenuated the increase of [³H]dopamine release induced by hypoxia to the extent of the control in the striatal slices.

These results suggest that oxygen free radicals play an important role in cerebral ischemia/reperfusion injury, for which NO seems to be responsible.

Key Words : Ischemia, Reperfusion, Biogenic amine, Dopamine, DMTU, NMMA

서 론

뇌허혈시 신경세포막은 탈분극되어 흥분성 신경전 달성을 위한 glutamate가 유리되는데, 이에 의하여 N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)에 선택적인 전압의존성 (voltage-dependent) 이온통로가 열리며 칼슘이 신경세포내로 축적된다. 신경세포내에 축적된 칼슘은 세관류에 의하여 산소가 다시 뇌로 공급될 경우 신경세포내 산소의존성 nitric oxide synthase (NOS)를 활성화시켜 arginine으로부터 nitric oxide (NO)를 합성하게 하며, 이때 생성된 NO는 세관류에 의하여 생성된 산소유리기인 superoxide 이온 ($O^{\cdot -}$)과 반응하여 peroxynitrite (ONOO⁻)가 되어 치명적인 신경독성을 나타낸다 (Beckman, 1991).

실험적으로 심근경색이 유발된 흰쥐에서 superoxide dismutase와 nitric acid ($NaNO_2$)의 동시에 투여가 세관류시 생성되는 산소유리기로 인한 심근 손상을 감소시켰다는 연구 (Johnson 등, 1990) 및 흰쥐의 선조제조직질편에서 nitroprusside (nitric oxide)가 dopamine의 유리를 촉진하였다는 보고 (Zhu와 Luo, 1992)는 이러한 NO의 신경독성을 입증하여 주고 있다. 그러나, 최근 NO가 NMDA 수용체를 nitrosyl화하여 glutamate에 의한 신경 흥분을 차단하여 신경을 보호한다는 실험결과가 발표되는 등 허혈/세관류시 NO 역할의 이중성이 대한 논란이 계속되고 있다 (Lei 등, 1992).

뇌허혈시 뇌조직 아민함량의 변동에 대하여는 Zervas 등 (1974)의 보고 이래 현재까지 많은 연구가 이루어져 왔다. 박용기 등 (1992)은 3시간 허혈시 대

뇌피질에서 5-HT의 함량이 절반이하로 감소하고 norepinephrine의 함량은 대뇌피질, 해마 및 시상에서, dopamine의 함량은 선조체에서 감소하였다고 보고하였다. 또한 이경운과 김경환(1993)은 뇌허혈 후 재관류시 선조체의 DOPAC 및 HVA의 함량과 DOPAC/dopamine 및 HVA/dopamine 비율은 증가되고 HVA/DOPAC 비율은 감소하였으나 산소유리기 제거물질은 이러한 변동을 재관류 이전 수준으로 감소시켰다고 보고하였다. 이로 미루어 볼때 뇌허혈/재관류후 관찰된 뇌조직 아민의 변동은 산소유리기가 아민성 신경세포에 작용하여 나타난 현상을 시사한다고 볼 수 있다. 그러나 이러한 뇌조직 아민 함량의 변동에 미치는 NO의 역할에 관하여는 아직 뚜렷하게 알려진 바 없다. 산소유리기와 생리현상과의 연관성을 알아보는 연구에서는 산소유리기의 제거물질(scavenger)을 푸어하여 그 효과를 관찰하는 방법이 일반적인데, dimethylithiourea(DMTU)는 산소유리기의 강력한 제거물질로서 반감기도 긴 미 헐-네 장벽(blood-brain barrier)을 쉽게 통과한다는 이점이 있다(Fox, 1984; Bolli 등, 1987; Carrea, 1991). 또한 정상상태에서는 조직내 NO함량이 풍부하므로 NO와 생리현상과의 연관성을 알아보는 연구에서는 NOS 억제제를 푸어하여 NO절필효과를 관찰하는 방법이 일반적인데(Rees 등, 1990), 본 연구에서는 현재까지 알려진 여러 종류의 NOS 억제제 가운데 뇌에 비교적 특이적으로 작용하는 것으로 알려진 N^ω-mono-methyl-L-arginine(NMMA)을 사용하였다(Rees 등, 1990; Moncada 등, 1991; Archer와 Hampl, 1992; Bogle 등, 1992).

따라서 본 연구에서는 DMTU와 NMMA를 이용하여 첫째 뇌허혈후 재관류시 생체내(*in vivo*)에서 NO의 역할을 산소유리기와 연관시켜 뇌조직의 아민성 신경전달물질 변동을 지표로서 살펴보았고, 둘째로는 생체내 실험에 비하여 보다 해석이 용이한 생체외(*in vitro*) 실험으로써 생체내 실험결과를 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 뇌조직 아민 측정

가. 실험동물 및 실험군

실험동물로는 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨

몽구스 80g 내외의 수컷 모래쥐(Mongolian gerbil : *Meriones unguiculatus*)를 사용하였다.

실험군은 크게 대조군, 단순 뇌허혈군, 단순 뇌허혈/재관류군, 약물전처치후 뇌허혈/재관류군으로 나누었으며, 약물전처치군은 다시 NMMA 단독전처치군, DMTU 단독전처치군, NMMA 및 DMTU 병용전처치군으로 나누어 실험하였다.

나. 실험적 뇌허혈 유발 및 재관류

실험동물을 Shintoni 등(1986)의 방법에 따라 secobarbital(30 mg/kg)로 복강내마취한 후 목의 중앙선을 절개하고 경동맥을 미주신경으로부터 조심스럽게 분리하였다. 동맥검자(arterial clamp)를 이용하여 양쪽 경동맥을 동시에 결찰하여 혈류를 유발시켰으며, 혈류/재관류군은 충경동맥 절차 10분후 동맥검자를 풀어주어 혈액을 15분동안 재관류시킨 뒤 회생시켜 뇌조직을 얻었다. 대조군은 혈류/재관류군과 동일한 조작을 시행하되 결찰과정만 생략하였다.

다. 약물투여

NMMA는 생리식염수에 녹여 8mg/kg을 충경동맥을 결찰하기 1시간 전에 뇌실내로 주사하였다. 뇌실내주사는 모래쥐를 secobarbital 마취하에 뇌정위장치(stereotaxic apparatus)로 머리를 수평으로 고정시키고 정중지상절개(midsagittal incision)하여 정수리점(bregma)을 노출시킨 후, 정수리점에서 우측 1.2mm되는 곳에 드릴을 이용하여 뇌경막에 손상을 입히지 않도록 주의하면서 구멍을 뚫어 평대부가 있는 미세 풀리에틸렌관을 측뇌실내에 삽입하였다. 풀리에틸렌관은 평대부를 중심으로 한쪽은 3.5~4.0mm, 다른 한쪽은 20mm였으며, 짧은 선단을 두개골내로 평대부 직전까지 넣어 선단이 측뇌실에 이르도록 한 후 공기중에 노출된 선단은 열을 가하여 봉하였다. 삽입된 관은 관상봉합선 전방 2mm에 다른 구멍을 뚫어 지름이 0.5mm되는 작은 나사못을 두개골 두께만큼 삽입하여 측뇌실내로 삽입된 관과 함께 치과용 시멘트로 고정하였다. 약들은 미량주사기(micro-syringe)를 이용하여 삽입된 관을 통하여 약 10μl를 5분 이상 천천히 뇌실내로 투여하였다.

DMTU는 500 mg/kg을 생리식염수에 녹여 충경동맥을 결찰하기 직전과 혈류 직후, 즉 재관류 직전에 각각 복강내로 주사하였다.

대조군은 같은 방법으로 동일용량의 생리식염수를 각각 투여하였다.

리. 노조직체취 및 아민측정

실험동물을 단두하여 신속하게 뇌를 죽출한 후 Glowinski와 Iversen(1966)의 방법을 약간 변형하여 얼음 위에서 전두피질(frontal cortex), 선조체(corpus striatum), 해마(hippocampus), 시상(thalamus) 및 사상하부(hypothalamus)를 차례로 분리해출하였다.

채취한 뇌조직은 아민측정을 위해 Wagner등(1982)의 방법을 변형시켜 처리하였다. 즉 조직무게(mg)당 20 μ l 이상의 0.1M perchloric acid(0.25% disodium EDTA 함유)를 가하여 굳질화(homogenization)하고 15분간 얼음 속에 방치한 후 12,500g에서 5분간 원심분리(Eppendorf centrifuge 5414, Brinkmann Instruments, Inc., NY, USA)하여 상층액을 취하였다. 상층액을 nitrocellulose membrane filter(pore size: 0.2 μ m; Gelman sciences, Inc., Ann Arbor, MI, USA)로 역과한 후 10 μ l를 high performance liquid chromatography(HPLC) system(ICI Instruments, KORTECK 35D, Victoria, Australia)에 주입하여 dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid(DOPAC), 5-hydroxytryptamine(5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid(5-HIAA) 및 homovanillic acid(HVA)를 분리하였다. HPLC에서 분리된 물질들은 전기화학검출기(electrochemical detector)로 검출하여 각 물질의 최고점 면적(peak area)을 계산하였다.

아민분리를 위한 column은 Biophase ODS 5 μ m(250 X 4.6 mm; Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN, USA)를 사용하였으며 이 동상(mobile phase)은 pH 3.0으로 맞춘 10% acetonitrile, 90% 0.15M monochloracetic acid buffer(0.32mM sodium octyl sulfonate와 2mM disodium EDTA 함유)를 사용하였고 유입속도는 1.0ml/min으로 하였다. 검출기는 TL-5 glassy carbon working electrode를 장착한 LC 4B/17 전기화학검출기(Bioanalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN, USA)를 사용하였으며 전위는 800mV vs Ag/AgCl로, 민감도는 1nA/V로 하였다.

2. 선조체질편에서의 [³H] dopamine 유리실험

가. 선조체질편 제작

1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 몸무게 80g 내외의 수컷 모래쥐를 단두하여 뇌를 죽출하고 얼음 위에서 양쪽 선조체를 분리하였다. 차가운 영양액을 적신 여과지 위에 선조체를 가로 방향으로 정렬한 후 McIlwain mechanical tissue chopper(The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshall, Surrey, UK)를 이용하여 400 μ m의 연속질편을 얻은 후 95% O₂/5% CO₂ gas로 포화시킨 Krebs-Henseleit 영양액에 선조체질편을 부유시켰다. 영양액의 조성은 113mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 1.2mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 2.5mM CaCl₂, 11mM glucose로 하였으며 영양액에는 dopamine의 대사를 방지하기 위하여 monoamine oxidase(MAO)의 억제제인 nialamide(Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)를 12.5 μ M 첨가하였다.

나. 저산소상태 유발 및 사용약물

4개의 선조체로부터 얻은 질편을 95% O₂/5% CO₂로 포화시킨 영양액 12ml에 담근 뒤 37°C를 유지하면서 30분간 친탕수조(shaking water bath) 내에서 선조체질편이 가볍게 흔들리는 상태로 방치하여 조직을 안정시켰다. 30분후 0.1 μ M의 [³H] dopamine(10 μ Ci, Amersham International plc, Buckinghamshire, England)이첨가된 영양액으로 갈아주고 20분간 방치하여 조직내로 [³H] dopamine이 흡착되도록 하였다. 20분후 동위원소가 없는 정상영양액으로 셋이준 후 선조체질편들을 3ml의 영양액이 든 4개의 바이얼에 무자위로 나누어 담았다. 유리되어 나온 [³H]dopamine이 선조체질편내로 세흡착되는 것을 방지하기 위하여 이때부터 사용되는 영양액에는 dopamine 흡착억제제인 GBR 12909(Research Biochemical Incorporated, Natick, MA, USA)을 10 μ M 첨가하였고 이후 매 10분마다 140분간 반복해서 영양액을 갈아주며 실험을 시행하였다. 60분째에 저산소상태를 유발시켰는데 이는 95% N₂/5% CO₂(용존산소:3ppm 이하)로 포화된 영양액을 사용하여 유발하였다. NMMA 및 DMTU는 저산소 영양액에 노출

하기 10분전부터 실험이 끝날 때까지 계속하여 각각 100 μ M 및 10mM이 되게 영양액내로 투여하였다.

다. 방사능 측정

실험종료시까지 선조체질편에 잔존하는 [³H]dopamine의 선조체질편으로부터 유리된 [³H]dopamine의 방사능을 모두 측정하였다. 즉, 선조체질편은 실험이 끝난 후 1mL의 조직용해제(SOLUENE 100, Packard Instrument Company Inc., Downers Grove, IL, USA)를 가하여 2시간 빙치시켜 조직을 완전히 녹인 후 70 μ L의 glacial acetic acid(Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, USA)를 첨가하여 조직용해제를 중화시켰다. 이중 100 μ L를 취하여 9mL의 liquid scintillation cocktail(READY SAFE, Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)이 든 바이얼에 옮겨 잘 혼들어 준 후 액체섬광계수관(liquid scintillation counter; Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA)으로 방사능을 측정하였다. 각 바이얼로부터 영양액 1mL를 취하여 조직질

편과 같은 방법으로 방사능을 측정하였다.

유리 [³H]dopamine 농도는 연속적으로 14개의 바이얼의 영양액에서 얻은 값과 조직에서 얻어진 값을 모두 합하여 조직으로 섭취된 총방사능량을 구하고 각 바이얼의 영양액에 유리된 방사능량을 총방사능량에 대한 백분율로 나타내었다.

3. 통계학적 분석

모든 실험자료는 평균±표준오차로 표현하였으며, 통계학적 분석은 analysis of variance(ANOVA)를 이용하였고 각군간의 비교는 Scheffe's F-test로 검정하였으며, p값이 0.05 미만인 경우를 통계학적으로 의의있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 정상 뇌조직의 부위별 dopamine과 5-HT 및 그 대사산물 함량

뇌조직내 dopamine 함량은 선조체에서 10641±

Table 1. Effects of NMMA and/or DMTU on ischemia/reperfusion-induced changes of biogenic amine concentrations in gerbil brains

Amines	Site	Sham control	Ischemia	Ischemia/reperfusion			
				no pre-treatment	NMMA	DMTU	NMMA+DMTU
DA	Frontal cortex	47± 4(8)	44± 2(8) [†]	56± 5(8) [†]	54± 8(8) [†]	52± 6(3) [†]	49± 2(3) [†]
	Corpus striatum	10641±479(8)	9763±841(8)	11733±799(7)	12651±850(8)	14251±393(3)	14316±687(4)
	Thalamus	83± 13(7)	84± 10(7)	107± 13(7)	103± 16(7)	112± 18(3)	91± 6(4)
	Hypothalamus	278± 36(8)	247± 13(8)	278± 29(8)	289± 25(8)	324± 10(3)	297± 19(6)
DOPAC	Corpus striatum	1389±231(9)	1479±163(9)	3521±257(10) ^{**}	3639±124(9)	2673±117(5) ^{**}	2803± 84(6) ^{**}
HVA	Corpus striatum	1398±140(8)	1523±147(8) [*]	1878± 63(9)	1782±182(9)	1407± 81(4) [*]	1120± 55(4) [*]
5-HT	Hippocampus	99± 13(8)	82± 9(8)	132± 17(9)	112± 25(8)	119± 7(3)	121± 21(3)
	Frontal cortex	759± 27(6)	662± 19(6)	651± 30(6)	569± 48(7)	684± 81(4)	670± 26(3)
	Corpus striatum	492± 27(8)	462± 30(8)	421± 30(6)	480± 79(8)	597± 45(4)	584± 55(4)
	Hippocampus	360± 32(8)	428± 40(8)	368± 44(9)	308± 31(9) ^{**}	386± 27(3)	334± 26(4) ^{**}
5-HIAA	Thalamus	501± 58(7)	471± 35(8)	433± 74(8)	362± 62(8)	504±103(3)	526±116(3)
	Frontal cortex	185± 7(6)	166± 5(6)	210± 17(7)	222± 19(7)	217± 23(3)	232± 24(4)
	Corpus striatum	220± 14(9)	211± 11(8)	258± 22(8)	271± 35(8)	279± 31(4)	301± 29(3)
	Hippocampus	156± 11(8)	177± 12(12)	208± 14(8) [*]	185± 16(12)	198± 11(4)	215± 14(4)
Thalamus	228± 23(7)	227± 27(8)	228± 26(8)	209± 34(8)	288± 45(3)	275± 42(3)	
	Hypothalamus	206± 26(7)	221± 16(6)	243± 16(6)	231± 24(7)	282± 35(3)	241± 22(3)

DA: dopamine, DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, HVA: homovanillic acid, 5-HT: 5-hydroxytryptamine, 5-HIAA: 5-hydroxyindoleacetic acid

Numbers in parentheses denote the number of animals.

Values are means±S.E. expressed as ng/g of tissue.

*p<0.05, **p<0.01 compared to the sham control group

[†]p<0.05 compared to the no pre-treatment group

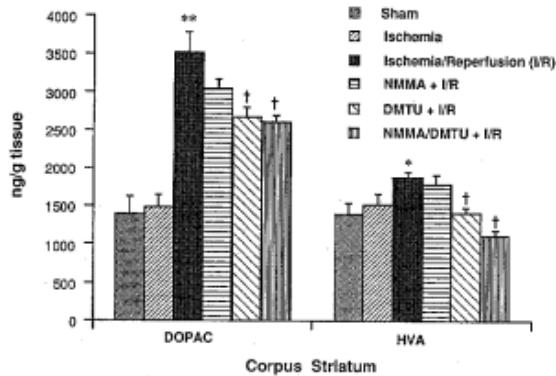
479 ng/g으로 가장 높았으며, 전두피질, 해마, 시상 및 시상하부의 함량은 각각 47 ± 4 ng/g, 29 ± 2 ng/g, 83 ± 13 ng/g, 278 ± 30 ng/g이었다. 대사산물은 선조체에서 DOPAC은 1389 ± 231 ng/g, HVA는 1398 ± 140 ng/g이 검출되었다(Table 1).

뇌조직내 5-HT 함량은 전두피질에서 759 ± 27 ng/g으로 가장 높았으며, 선조체, 해마, 시상의 함량은 각각 492 ± 27 ng/g, 360 ± 32 ng/g, 501 ± 58 ng/g이었고, 시상하부에서는 검출되지 않았다. 대사산물인 5-HIAA는 전두피질, 선조체, 해마, 시상, 시상하부가 각각 185 ± 7 ng/g, 220 ± 14

ng/g, 156 ± 11 ng/g, 228 ± 23 ng/g, 206 ± 26 ng/g이었다(Table 1).

2. 뇌혈관/재관류에 의한 뇌조직 부위별 dopamine, 5-HT 및 그 대사산물 함량의 변동

양쪽 층경동맥을 10분간 결찰한 후 선조체의 DOPAC 함량은 대조군치 1389 ± 231 ng/g에 비하여 1479 ± 163 ng/g으로 증가하였으나 통계학적 유의성은 없었다. 그러나 결찰 10분후 15분간 재관류 시켰을 때 선조체의 DOPAC 함량은 3521 ± 257 ng/g으로 의의있게 증가하였으며 HVA 함량 역시



homovanillic acid. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared to the sham group, † $p<0.05$ compared to the ischemia/reperfusion group

Fig. 1. Effects of NMMA and/or DMTU on dopamine metabolism in corpus striatum of gerbil brains. Ischemia/reperfusion was induced by bilateral ligation of common carotid arteries for 10 minutes and reperfused for 15 minutes. NMMA(8mg/kg, icv) was administered 1 hour before ligation and DMTU(500mg/kg, ip) was given just before and immediately after ligation. DA: dopamine, DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, HVA: homovanillic acid. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ compared to the sham group, † $p<0.05$ compared to the ischemia/reperfusion group

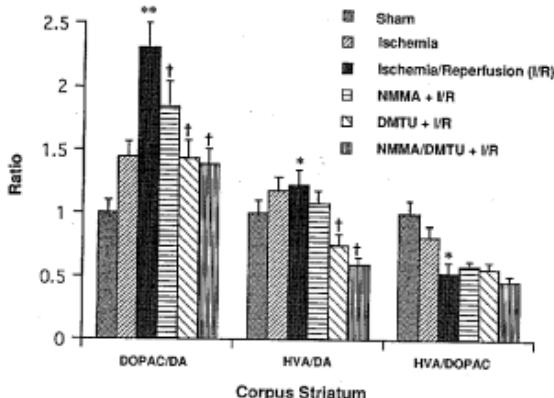


Fig. 2. Effects of NMMA and/or DMTU on dopamine turnover rate in corpus striatum of gerbil brains. Legends are the same as Fig. 1.

대조군치 1398 ± 140 ng/g에 비하여 1878 ± 63 ng/g으로 의의있게 증가하였다. 그러나 다른 부위에서는 dopamine 및 그 대사산물의 함량변동을 관찰할 수 없었다. 5-HT와 그 대사산물의 변동은 미약하였으며 다만 해마에서만 5-HIAA의 함량증가가 관찰되었다(Table 1, Fig. 1).

Table 2. Effects of NMMA and/or DMTU on dopamine release from striatal slices exposed to hypoxic environment for 10 minutes

Tube No. (min.) ^a	Control (%) ^b	Hypoxia ^c		
		no pre-treatment (8) ^d	NMMA4(10) ^e	DMTU ^f (8) ^d
1(50)	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0
2(60)	81.9 \pm 4.8	126.8 \pm 10.4 [*]	102.6 \pm 4.5 [*]	101.3 \pm 7.4 [*]
3(70)	71.0 \pm 5.7	88.4 \pm 9.1	84.1 \pm 2.8	81.1 \pm 6.2
4(80)	71.3 \pm 4.2	80.9 \pm 6.7	71.1 \pm 2.4	66.0 \pm 5.4
5(90)	60.4 \pm 5.6	67.1 \pm 7.7	66.0 \pm 5.7	63.0 \pm 9.1
6(100)	57.3 \pm 8.0	62.4 \pm 8.4	55.5 \pm 4.6	55.2 \pm 7.2
7(110)	57.3 \pm 8.0	62.4 \pm 8.4	55.5 \pm 4.6	44.8 \pm 6.2
8(120)	54.8 \pm 7.5	57.6 \pm 9.5	51.4 \pm 5.8	51.1 \pm 5.7
9(130)	53.9 \pm 7.5	59.4 \pm 6.0	51.0 \pm 3.8	48.8 \pm 4.4
10(140)	47.4 \pm 7.8	54.4 \pm 6.1	45.6 \pm 3.4	42.3 \pm 4.1

^aHypoxia was induced by changing the incubation media aerated with 95% N₂/5% CO₂ gas for 10 minutes(tube No. 1 and 2).

^bNumbers in parentheses denote the elapsed time from the starting point(0 minute) of hypoxia, unit as a minute.

^cNumbers in parentheses denote the number of animals.

^dNMMA 100 μ M was added into the incubation media from tube No. 1 during the experiment.

^eDMTU 10mM was added into the incubation media from tube no. 1 during the experiment.

Values are means \pm S.E. expressed as percentage of total release.

^{*}p<0.05 compared to the control group

^gp<0.05 compared to the no pre-treatment group

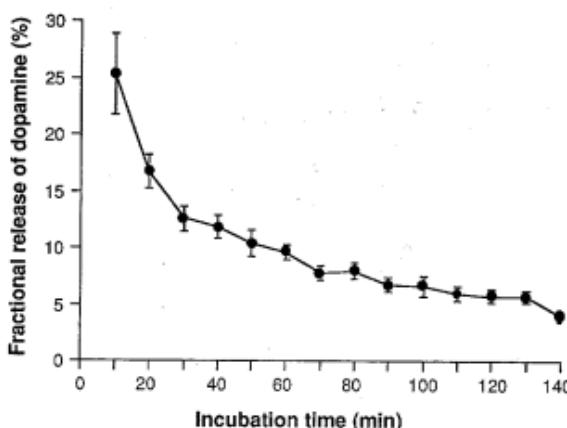


Fig. 3. Spontaneous release of [³H]dopamine from gerbil striatal slices.

3. NMMA 또는 DMTU 전처치가 허혈/제관류에 의한 뇌조직 부위별 dopamine, 5-HT 및 그 대사산물 함량변동에 미치는 영향

NMMA 전처치후 허혈/제관류시에는 아민 및 그 대사산물의 함량은 단순 허혈/제관류군에 비하여 유의한 차이가 없었다. 그러나 DMTU 전처치후 허혈/제관류시에는 단순 허혈/제관류군에서 보였던 선조체의 DOPAC 및 HVA 함량증가가 유의하게 억제되었다. 즉 DOPAC 함량은 단순 허혈/제관류군치 3521 ± 257 ng/g에 비하여 2603 ± 84 ng/g으로 현저히 억제되었고, HVA 함량은 단순 허혈/제관류군치 1878 ± 63 ng/g에 비하여 1407 ± 81 ng/g으로 의의있게 억제되었다. NMMA와 DMTU를 동시에 전처치한 후 허혈/제관류시켰을 때 역시 단순 허혈/제관류군에서 보았던 선조체의 DOPAC 및 HVA 함량증가가 유의하게 억제되었다. DOPAC 함량은 단순 허혈/제관류군치 3521 ± 257 ng/g에 비하여 2603 ± 84 ng/g으로 현저히 억제되었고, HVA 함량은 단순 허혈/제관류군치 1878 ± 63 ng/g에 비하여 1120 ± 55 ng/g으로 의의있게 억제되었다(Table 1, Fig. 1).

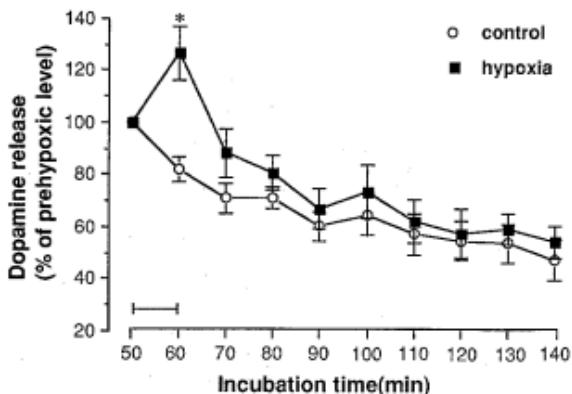


Fig. 4. Hypoxia-induced changes of $[^3\text{H}]$ dopamine release from striatal slices. Hypoxia was induced by changing 95% N_2 /5% CO_2 -saturated buffer for 10 minutes indicated by horizontal bar.

* $p < 0.05$ compared to the control group

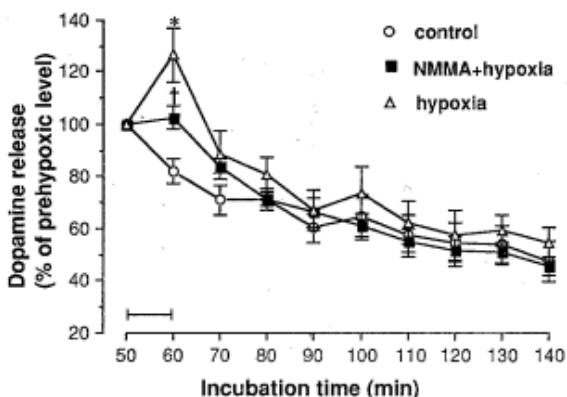


Fig. 5. Effect of NMMA on hypoxia-induced changes of $[^3\text{H}]$ dopamine release from striatal slices.

* $p < 0.05$ compared to the control group
† $p < 0.05$ compared to the hypoxia group

4. NMMA 또는 DMTU 전처치가 허혈/재관류에 의한 뇌조직 부위별 dopamine 및 5-HT 전환률 변동에 미치는 영향

단순 허혈/재관류시 선조체에서의 HVA/DOPAC 비율은 대조군치 1.007에서 0.533으로 감소되었으며, DOPAC/dopamine 비율은 대조군치 0.131에서 0.300으로, 또 HVA/dopamine 비율은 대조군치 0.131에서 0.300으로, 또 HVA/dopamine 비율은 대조군치 0.131에서 0.160으로 dopamine 전환률(turnover rate)이 증가하였다. NMMA로 전처치후 허혈/재관류시 선조체에서의 DOPAC/do-

pamine 비율은 단순 허혈/재관류군치 0.300에 비하여 0.240으로 감소되었고, DMTU로 전처치후에는 0.188로 현저히 감소되었다.

HVA/dopamine 비율 역시 DMTU 전처치에 의하여 단순 허혈/재관류군치 0.160에 비하여 0.099로 감소되어 유의한 억제를 보였다. NMMA와 DMTU로 동시에 전처치한 후 허혈/재관류시켰을 때 선조체에서의 DOPAC/dopamine 비율 및 HVA/dopamine 비율은 단순 허혈/재관류군치에 비하여 각각 0.182와 0.078로 감소되었으나 DMTU 단독전처치시와는 별다른 차이가 없었다 (Table 1, Fig. 2).

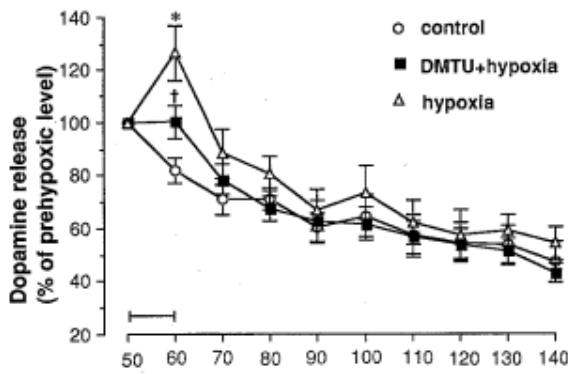


Fig. 6. Effect of DMTU on hypoxia-induced changes of $[^3\text{H}]$ dopamine release from striatal slices. Legends are the same as Fig. 5.

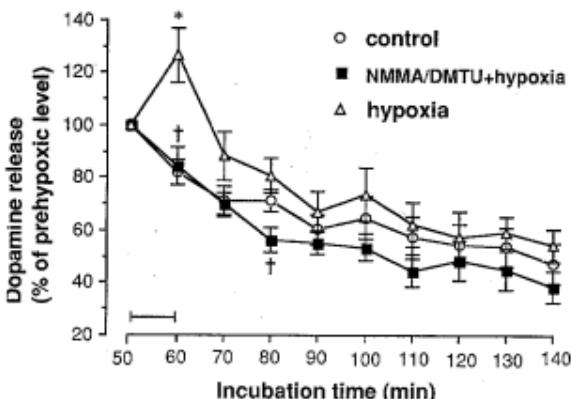


Fig. 7. Effects of both NMMA and DMTU on hypoxia-induced changes of $[^3\text{H}]$ dopamine release from striatal slices. Legends are the same as Fig. 5.

5. 정상 선조체질편의 [³H]dopamine 유리

정상 영양액내에서 선조체질편은 자발적으로 [³H]dopamine을 유리하였는데 첫 10분째의 유리량은 전체 [³H]dopamine 유리량의 $25.2 \pm 4.0\%$ 였으며 이후 유리량은 점차 감소하여 마지막 140분째는 $6.8 \pm 0.2\%$ 가 유리되었다. 대부분에 있어서 40-50분경부터 유리량이 안정되었으므로 50-60분에 저산소영양에 노출 또는 악물투여를 실시하였으며 이후에는 incubation 후 50분값을 기준(100%)으로 하여 백분율로 표시하였다(Table 2, Fig. 3).

6. 저산소상태 노출에 의한 [³H]dopamine 유리 변동에 대한 NMMA 및 DMTU의 효과

선조체질편 incubation 60분째에 저산소영양에 10분간 노출시킨 직후의 [³H]dopamine 유리는 $126.8 \pm 10.4\%$ 로서 대조군의 $81.9 \pm 10.4\%$ 로서 대조군의 $81.9 \pm 4.8\%$ 에 비하여 의미있게 증가하였다. 선조체조직 incubation 50분째 100μM NMMA 또는 10mM DMTU를 침가한 후 60분째 10분간 저산소영양에 노출하였을 때 [³H]dopamine 유리량은 각각 $102.6 \pm 4.5\%$, $101.3 \pm 7.4\%$ 로서 단순 저산소상태 노출군과 비슷하였으나 대조군과 차이를 보이지 않았다(Table 2, Fig. 4, 5, 6, 7).

고 찰

허혈성 뇌손상의 정도는 허혈상태의 정도 및 기간과 깊은 관계가 있으므로 혈류 및 산소의 재공급이 가장 중요하고 근원적인 치료방법으로 알려져 있다(Murdoch와 Hall, 1990). 본 예비실험에서는 5분간 허혈을 유발한 경우보다 10분간 허혈을 유발한 경우에서 선조체내의 DOPAC 함량이 현저하게 증가하여 허혈성 뇌손상의 정도와 허혈기간과의 관계를 실제로 입증할 수 있었다. 한편 최근 연구들에 의하면 허혈 당시보다 오히려 혈액이 재판류되어 산소가 허혈된 조직으로 재공급될 때 뇌조직이 더 심

하게 손상된다고 하는데(McCord, 1985), 본 실험에서도 허혈 자체보다는 허혈후 재판류 시 손상 정도가 더 심한 것을 확인할 수 있었으며, 이경은과 김경환(1993)의 실험에서와 마찬가지로 뇌허혈/재판류 시 5-HT 및 그 대사산물보다는 dopamine 및 그 대사산물의 변화가 현저하였다. 이는 허혈성 손상에 대한 신경발달의 감수성이 5-HT성 신경보다는 catecholamine성 신경이 더 크며(Weinberger 등, 1983; Sarna 등, 1990), 5-HT 대사는 잠시간의 허혈에 더욱 영향을 받기 때문일 것으로 생각된다(박용기 등, 1992).

모래쥐의 뇌동맥계는 경동맥 순환계와 척추-뇌저동맥 순환계간의 연결이 미약한, 매우 독특한 구조를 이루고 있다. 모래쥐는 뇌저동맥의 말단에서 기시하는 후대뇌동맥의 첫 분절은 없거나 발달되지 않아 인간이나 흰쥐 등 다른 포유류와는 달리 후대뇌동맥은 혈류의 대부분을 척추-뇌저동맥 순환계가 아니라 경동맥 순환계로부터 공급받게 된다(Levine과 Payan, 1966; Kahn, 1972; Harrison 등, 1973). 따라서 경동맥의 결찰만으로도 허마, 시상후외측부, 중뇌 후측부 등, 후대뇌동맥이 공급하는 부위를 포함한 대뇌 전체에서 허혈성 손상을 축부순환없이 충분히 유발시킬 수 있기에 본 실험에서 혈동률을 사용하였다.

일찍이 산소유리기는 뇌를 포함한 여러 장기에서 허혈성 손상과 관련이 있다고 알려져 왔는데(Hallsworth, 1985; Siesjö 등, 1989), 이에 대한 증거는 superoxide dismutase(SOD), catalase, allopurinol, deferoxamine 등 산소유리기 제거제들을 전처치한 결과 허혈성 손상을 경감할 수 있다고 보고한 여러 연구들에서 찾아볼 수 있다(Patt 등, 1988; Martz 등, 1989 & 1990; Beckman 등, 1990; Imaizumi 등, 1990). 현재까지 알려진 여러 산소유리기 제거제 가운데 본 연구에서는 dimethylthiourea(DMTU)를 사용하였다. 그 이유로는 첫째로 지방용해성이 높아 혈-뇌 장벽을 통한 뇌내의 확산이 용이하고, 둘째로 반감기가 길며, 셋째로 hydroxyl기 생성 외에는 백혈구의 다른 기능을 방해하지 않으며, 네째로 hydroxyl기, 과산화수소(hydrogen peroxide), 차아염소산(hypochlorous acid) 등에 대한 강력한 제거물질이기 때문이다(Fox, 1984; Carrea, 1991; Lundgren 등, 1992). 실근의 허혈

후 재관류 손상에 있어서도 산소유리기가 중요한 작용을 하는데, DMTU를 투여한 뒤 심근의 수축력이 현저하게 회복되었다고 한다(Bolli 등, 1987). DMTU는 또한 산소유리기가 관계하는 여러 병과 정, 예를 들어 활성화된 중성구 또는 purine-xanthine oxidase에 의한 폐부종이나 폐의 산소독성 혹은 방사선 조사후 폐손상 등을 예방할 수 있다고 한다(Fox 등, 1984). 본 실험을 통하여 DMTU도 다른 산소 유리기 제거제들과 마찬가지로 뇌허혈 및 재관류로 인한 손상을 예방하는 데 있어서 강력한 작용을 한다는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다. 아울러 산소유리기 가운데 작용기전이 다소 상이하면서도 강력한 작용을 지닌 것으로 알려진 allopurinol이나 SOD를 DMTU와 함께 투여한다면 그 효과가 더욱 상승적이 될 것으로 생각한다.

본 실험에서는 정상 영향액내에서 선조체질편의 차별적인 [³H]dopamine 유리량은 20분째에 지나면서 급격히 줄어들기 시작하여 40-50분경부터 안정되었기에 50-60분째에 저산소상태 노출 또는 암풀투여를 실시하였다. 저산소상태에 노출된 후 선조체질편에서의 유리량이 증가하여 흰쥐의 선조체질편을 이용하여 실험한 Milusheva 등(1992)의 실험과 일치된 결과를 보여주었다. 본 실험에서는 저산소상태에 노출함으로써 증가되었던 선조체에서의 [³H]dopamine 유리가 NMMA 및 DMTU를 전처치함으로써 억제되었는데, 이 결과는 선조체에서의 [³H]dopamine 및 L-arginine에 의하여 흰쥐의 선조체질편으로부터 dopamine 유리가 용량에 비례하여 증가하였고, NMMA는 L-arginine에 의하여 증가되었던 dopamine 유리를 억제하는 효과가 있었으며, NOS의 보조인자(cofactor)인 NADPH는 이와 반대로 L-arginine에 의하여 증가되었던 dopamine 유리를 증폭시키는 효과가 있었다고 보고한 Zhu와 Luo(1992)의 실험결과와 유사하였다.

NO의 반감기는 무척 짧기 때문에 NO 합성의 경량화는 매우 어려우며, 따라서 NO의 생물학적 영향에 대한 연구가 주로 NOS 억제제를 사용하여 이루어지고 있다. NOS 억제제로는 L-arginine 유사체(analogue)가 대표적으로 본 실험에서 사용된 N^ω-monomethyl-L-arginine(L-NMMA) 외에도 N^ω-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME), N-iminoethyl-L-ornithine(L-NIO) 등이 있는데

친화력에 있어서 다소 차이가 있는 것으로 알려져 있다(Ressemel, 1990; Moncada 등, 1991; Archer와 Hampl, 1992; Bogle 등, 1992). 배양된 조직내에서 glutamate에 의한 신경독성작용은 NOS 억제제에 의하여 차단될 뿐 아니라 마우스, 흰쥐, 고양이 등에서 뇌의 허혈성 손상도 감소되는 것으로 보아 NO가 신경독성작용을 매개하는 것으로 추측되고 있는데(Nowicki 등, 1991; Dawson 등, 1992), 본 실험에서도 NOS 억제제를 사용한 후 뇌조직 아민활량의 증가가 억제되었던 것으로 보아 NO가 신경독성작용을 매개한다는 사실을 확인할 수 있었다. 하지만 NOS 억제제가 뇌허혈손상에 별다른 영향을 미치지 못하거나 오히려 뇌허혈손상을 더 악화시킨다는 일련의 생체내실험들을 통하여 볼 때(Yamamoto 등, 1992; Kuhar 등, 1993), NO가 허혈발생후 초기 수분내에는 신경보호작용을, 이후에는 신경독성작용을 나타낸다는 주장도 있다(Pelligrino 등, 1993). NMMA는 혈-뇌 장벽을 통과하지 못할 뿐만 아니라 전신부여 시 용량에 비례하여 동맥압을 상승시키기 때문에(Moncada 등, 1991) 본 실험에서는 NMMA를 뇌실내주사하였다.

본 실험에서는 NMMA의 허혈/재관류 손상에 대한 억제효과가 예상보다 미약하였는데, 이는 조직내에 함유되어 있는 L-arginine을 완전히 제거할 수 없었기에 조직내에 잔존하여 있던 L-arginine에 의하여 NMMA의 활성도가 경쟁적으로 방해받아 NO의 생성을 완전히 억제하지 못하였기 때문이 아니었을까 생각한다.

NO는 뇌허혈시 뇌혈류를 유지하고 혈소판이나 백혈구의 응집 또는 부착을 억제할 뿐만 아니라(Moncada 등, 1991; Nishimura 등, 1991) NMDA 수용체도 차단하는 신경보호작용을 보이나, NO가 과잉생성될 경우에는 오히려 신경독성작용을 나타낸다고 한다(Manzoni 등, 1990; Choi, 1993; Snyder, 1993). 즉 NO의 산화-환원 상태에 따라 NO(nitric oxide) 상태에서는 O₂⁻(superoxide anion)과 작용하여 ONOO⁻(peroxynitrite)를 형성하여 신경독성작용을 보이게 되며, NO⁺(nitrosonium ion)의 상태에서는 NMDA 수용체의 thiol기와 작용하여 신경전달을 차단하여 신경보호작용을 나타낸다고 한다(Lipton 등, 1993). 임상적으로 흔히 사용되는 nitroso 화합물인 nitrogly-

cerin은 대사되어 NO 와 S-nitrosoprotein (RS-NO; NO' equivalent)을 형성하는데 (Ipnarro 등, 1981; Noacker Feelisch, 1991), 이 S-nitrosoprotein은 NMDA 수용체를 S-nitrosyl화하여 칼슘의 세포내 과량유입 및 NMDA 수용체에 의한 신경독성을 감소시킨다 (Lipton 등, 1993). 이때 nitroglycenn이 S-nitrosothiol intermediate로부터 NO를 생성하는 반응은 매우 느린데 nitroglycerin에 신경독성이 거의 없는 이유는 바로 여기에 있다 (Noack과 Feelisch, 1991; Lei 등, 1992; Lipton 등, 1993). 한편 임상적으로 허혈 사용되는 sodium nitroprusside는 nitroglycerin과 대조적으로 강한 NO의 성격을 지닌 nitroso 화합물인 cysteine이나 ascorbate와 같은 전자공여체 (electron donor)가 미량 존재할 경우 쉽게 NO를 형성하여 신경독성을 유발할 수 있다고 알려져 있다 (Dawson 등, 1991; Lei 등, 1992; Lipton, 1993; Zhang과 Iadecola, 1993). 따라서 이들 nitroso 화합물은 같은 물질이라 하더라도 체내에서 어떠한 조건 아래 놓여 있는가에 따라 신경을 보호할 수도 있고 신경을 손상시킬 수도 있을 것으로 생각된다.

한편 선조체질편에서의 [³H]dopamine 유리량은 저산소상태에 노출한 직후 가장 많았는데, 이것은 저산소상태에 노출한지 10분이 지나 정상영양으로 실험조건을 정상화시킨 직후에 일종의 재판류순상에 의하여 선조체질편에서 [³H]dopamine 유리량이 가장 많으리라면 예상과 상이하였다. 이는 아마도 체내상태와 동일한 환경을 조성할 수 없는 체외실험의 특성 때문일 것으로 생각되며, 특히 선조체의 구심성 및 원심성 섬유가 차단된 조직질편 상태에서의 반응이기에 선조체와 연결된 다른 구조물들과 관련된 실험이 앞으로 필요하리라고 본다.

결 론

모래쥐 (*Mongolian gerbil: Meriones unguiculatus*)에서 뇌허혈/재판류시 뇌조직 아민 및 그 대사산물의 함량변동과 선조체조직질편에서 저산소노출시 [³H]dopamine 유리에 대한 N²-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) 및 dimethylthiourea (DMTU)의 효과를 검색하여 다음과 같은 결론

을 얻었다.

1) 양쪽 충경동맥을 결찰하여 10분간 허혈을 유발한 후 15분간 재판류시켰을 때 선조체에서는 DOPAC 및 HVA 함량이 증가하고 DOPAC/dopamine 및 HVA/DOPAC 비율이 감소되었으나 전두피질 및 해마의 생체내 아민은 별다른 영향을 받지 않았다.

2) NMMA를 전처치하였을 때 선조체의 DOPAC 및 HVA 함량은 단순 허혈/재판류군과 차이가 없었으나 허혈/재판류로 증가되었던 DOPAC/dopamine 비율은 의의있게 감소되었다.

3) DMTU 전처치는 허혈/재판류로 증가되었던 선조체의 DOPAC 및 HVA 함량을 감소시켰으며, 허혈/재판류로 증가되었던 DOPAC/dopamine 및 HVA/dopamine 비율도 의의있게 감소하였다.

4) NMMA와 DMTU를 동시에 전처치하였을 경우 허혈/재판류로 증가되었던 선조체의 DOPAC 및 HVA 함량과 DOPAC/dopamine 및 HVA/dopamine 비율이 감소되었으며, NMMA 또는 DMTU 단독 처치시보다 그 효과가 현저하였다.

5) 선조체질편의 [³H]dopamine 유리는 저산소영양에 노출함으로써 증가되었다.

6) 선조체질편을 저산소영양에 노출하기 전 NMMA 또는 DMTU를 투여하였을 때 저산소영양에 노출로 야기된 [³H]dopamine 유리증가는 억제되었다.

7) 저산소영양에 노출하기 전 NMMA와 DMTU를 동시에 투여하였을 때 저산소영양에 노출로 야기된 [³H]dopamine 유리증가는 각각 단독으로 투여하였을 때보다 현저하게 억제되어 대조군치와 비슷한 수준으로 감소되었다.

이상의 결과로 보아 허혈/재판류 손상으로 인한 뇌조직 아민의 변동에는 산소유리기가 중요한 역할을 하며, 이때 NO가 악화인자로 작용한다고 생각한다.

REFERENCES

- 박용기, 서정백, 박혜련, 김경환(1992) : 실험적 뇌허혈로 인한 신경전달물질 변동 및 이에 대한 nimodipine의 효과, 대한신경과학회지 10:515-530
이경운, 김경환(1993) : 허혈/재판류로 인한 뇌조직 아민 변동과 free radical과의 관련성, 대한신경과학회

- Archer SL, Hampl V(1992) : *N²-monomethyl-L-arginine causes nitric oxide synthesis in isolated arterial rings: trouble in paradise.* *Biochem Biophys Res Comm* 30:590-596
- Beckman JS(1991) : *The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury.* *J Dev Physiol* 15:53-59
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA(1990) : *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1620-1624
- Bogle RG, Moncada S, Pearson JD, Mann GE (1992) : *Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell L-arginine transporter.* *Br J Pharmacol* 105:768-770
- Bolli R, Zhu WX, Hartley CJ, Michael LH, Repine JE, Hess ML, Kukreja RC, Roberts R (1987) : *Attenuation of dysfunction in the postischemic 'stunned' myocardium by dimethylthiourea.* *Circulation* 76:458-468
- Carrea FP, Leenesky EJ, Repine JE, Shikes RH, Horwitz LD(1991) : *Reduction of canine myocardial infarct size by a diffusible reactive oxygen metabolite scavenger: Efficacy of dimethylthiourea given at the onset of reperfusion.* *Circ Res* 68:1652-1659
- Choi DW(1993) : *Nitric oxide : Foe or friend to the injured brain?* *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9741-9743
- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Breit DS, Snyder SH(1991) : *Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6368-6371
- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH(1992) : *A novel neuronal messenger molecule in brain:the free radical, nitric oxide.* *Ann Neurol* 32:297-311
- Fox RB(1984) : *Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rats by a hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea.* *J Clin Invest* 74:1456-1464
- Fox RB, Harada RN, Tate RM, Repine JE (1983) : *Prevention of thiourea-induced pulmonary edema by hydroxyl radical scavengers.* *J Appl Physiol* 55:1456-1459
- Furchtgott RF, Zawadzki JV(1980) : *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* *Nature* 288:373-376
- Glowinski J, Iversen LL(1966) : *Regional studies of catecholamines in the rat brain-I.* *J Neurochem* 13:655-668
- Halliwell B(1985) : *Oxidants and human disease: some new concepts.* *FASEB J* 1:358-364
- Harrison MJG, Brownbill D, Lewis PD, Russell RWR(1973) : *Cerebral edema following carotid artery ligation in the gerbil.* *Arch Neurol* 28:389-391
- Ignarro LJ, Lipton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA (1981) : *Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates.* *J Pharmacol Exp Ther* 218:739-749
- Imaiizumi S, Woolworth V, Fishman RA, Chan PH(1990) : *Liposome-entrapped superoxide dismutase reduces infarction in cerebral ischemia in rats.* *Stroke* 21:1312-1317
- Johnson F, Tsao P, Lefer AM(1990) : *Synergism between superoxide dismutase and sodium nitrite in cardioprotection following ischemia and reperfusion.* *Am Heart J* 119:530-537
- Kahn K(1972) : *The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil.* *Neurology* 22:510-515
- Kuluz JW, Prado RJ, Dietrich WD, Schleien CL, Watson BD(1993) : *The effect of nitric*

- oxide synthase does not reduce volume after reversible focal cerebral ischemia in conscious rats. *Stroke* 24:2023-2029
- Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HSV, Hartman J, Sucher NJ, Lipton SA(1992) : Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* 8:1087-1099
- Levine S, Payan H(1966) : Effects of ischemia and other procedures on the brain and retina of the gerbil. *Exp Neurol* 16:255-262
- Lipton SA(1993) : Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists:open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trends Neurosci* 16:527-532
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS(1993) : A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632
- Lundgren J, Smith ML, Siesj BK(1992) : Effects of dimethylthiourea on ischemic brain damage in hyperglycemic rats. *J Neurol Sci* 113:187-197
- Manzoni O, Prezeau L, Marin P, Deshager S, Bockaert J, Fagni L(1992) : Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron* 8:653-662
- Martz D, Rayos G, Schielke GP, Betz AL (1989) : Allopurinol and dimethylthioureas reduce brain infarction following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 20: 488-494
- Martz D, Beer M, Betz AL(1990) : Dimethylthioureas reduces ischemic brain edema without affecting cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:352-357
- McCord JM(1985) : Mechanisms of disease-oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Eng J Med* 312:159-163
- Milusheva E, Doda M, Pasztor E, Lajtha A, Sershen H, Vizi ES(1992) : Regulatory interactions among axon terminals affecting the release of different transmitters from rat striatal slices under hypoxic and hypoglycemic conditions. *J Neurochem* 59:946-953
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA : Nitric oxide(1991) : Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-142
- Murdoch J, Mall R(1990) : Brain protection: physiological and pharmacological considerations. Part I: The physiology of brain injury. *Can J Anesth* 37:663-671
- Nishimura H, Rosenblum WI, Nelson GH, Boynton S(1991) : Agents that modify EDRF formation alter antiplatelet properties of brain arteriolar endothelium in vivo. *Am J Physiol* 261:H15-H21
- Nowicki JP, Duval D, Poignet H, Scatton B (1991) : Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J pharmacol* 204:339-340
- Patt A, Harken AH, Burton LK, Rodell TC, Piermattei D, Schorr WJ, Parker NB, Berger EM, Horesh IR, Terada LS, Linas SL, Cheronis JC, Repine JE(1988) : Xanthine oxidase-derived hydrogen peroxide contributes to ischemia reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Clin Invest* 81:1556-1562
- Pelligrino DA(1993) : Saying NO to cerebral ischemia. *J Neurosurg Anesthesiol* 5:221-231
- Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HH, Moncada S(1990) : Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101: 746-752
- Sarna GS, Obrenovitch TP, Matsumoto T, Symon L, Curzon G(1990) : Effect of transient cerebral ischemia and cardiac arrest on brain extracellular dopamine and serotonin as determined by in vivo dialysis in the rat. *J Neurochem* 55:937-940

- Shintomi K, Itakawa T, Yoshimoto K, Ogawa Y, Fukushima T, Matsuoka Y : Pharmacological study of nicergoline(1) (1986) : Protective effect on ischemic brain damage in animals. *Folia Pharmacol Japon* 87:427-434
- Siesj BK, Agardh CD, Bengtsson F (1989) : Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1:165-211
- Snyder SH (1993) : Janus faces of nitric oxide. *Nature* 364:577
- Wagner J, Vitali P, Palfreyman MG, Zralka M, Huot S (1982) : Simultaneous determination of 3,4-dihydroxyphenylalanine, 5-hydroxytryptophan, norepinephrine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid, serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in rat cerebrospinal fluid and brain by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Neurochem* 38:1241-1254
- Weinberger J, Cohen GC, Nieves-Rosa J (1983) : Nerve terminal damage in cerebral ischemia:Greater susceptibility of catecholamine nerve terminals relative to serotonin nerve terminals. *Stroke* 14:986-989
- Yamamoto S, Golani EV, Berger SB, Reis DJ (1992) : Inhibition of nitric oxide synthesis increases focal ischemic infarction in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:717-726
- Zarvas NT, Hori H, Negora M, Wurtman RJ, Larin F, Lavigne MH (1974) : Reduction in brain dopamine following experimental cerebral ischemia. *Nature* 247:283-284
- Zhang F and Iadecola C (1993) : Nitroprusside improves blood flow and reduces brain damage after focal ischemia. *Neuroreport* 4: 559-562
- Zhu XZ, Luo LG (1992) : Effect of nitroprusside(nitric oxide) on endogenous dopamine release from rat striatal slices. *J Neurochem* 59:932-935