

## 비타민 E와 비타민 C 첨가가 Scopolamine에 의한 인지능력 감퇴에 미치는 영향\*

안향숙 · 강순아\*\* · 이일하

중앙대학교 사범대학 가정교육학과, 삼성생명과학연구소 임상영양연구실\*\*

### Effects of Vitamin E and Vitamin C Supplementation on the Decrease in Cognitive Function Induced by Scopolamine

Ahn, Hyang Sook · Kang, Soon Ah\*\* · Lee, Lilha

Department of Home Economics Education, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Clinical Nutritional Research,\*\* Biochemical Research Institute, Samsung Medical Center, Seoul 135-710, Korea

#### ABSTRACT

With the increasing elderly population in Korea, dementia has become a major health problem in Korea. Several studies have been conducted on the association between dementia and dietary intake, especially vitamin E and vitamin C. The purpose of this study was to investigate the effect of vitamin E and vitamin C supplementation on the decrease in cognitive function induced by scopolamine(300mg/kg) in rats. Rats were divided into three groups : control, vitamin C, and vitamin E supplementation(2.4g Vit C or Vit E/100g diet) and fed the diets for 6 weeks. There were significant decreases in active avoidance response and brain acetylcholinesterase activity in the control group, but no significant differences were observed in the vitamin E and C groups after scopolamine treatment. Brain dopamine concentration of vitamin E and C groups was significantly higher than those of control group after scopolamine injection. The concentration of brain norepinephrine also showed similar tendency, even though it was not statistically significant. These results indicate that vitamin E and vitamin C may protect against the cognitive function decrease induced by scopolamine. However, it is still unclear how vitamin E and C influence brain neurotransmitters and improve cognitive function. Further study is needed to elucidate the role of vitamin E and C supplementation in the prevention of dementia. (*Korean J Nutrition* 32(3) : 239~247, 1999)

KEY WORDS : cognitive function · vitamin E · vitamin C · scopolamine · acetylcholinesterase activity.

#### 서론

의학기술이 발달하고 생활이 향상되어 인간의 수명이 길어지면서 노인 인구가 전세계적으로 증가하고 있다. 우리나라에서도 65세 이상의 노인인구는 1985년도 전체인구의 3.8%이었던 것이 1990년도에는 4.7%로 상승추세를 나타내어 2000년도에는 6.1%에 이를것으로 예상되고 있어 전체 인구에서 65세 이상인 노인이 차지하는 비율이 점차 높아지고 있다.<sup>1)2)</sup> 그리고 노인인구가 증가하면서 점차 노인의 건강과 복지문제가 중요한 사회문제가 되고 있으며, 노인이 가진 질환중 치매가 가장 큰 문제로 대두되고 있다. 노인성 치매란 정상적인 기능을 소유하였던 사람에게서 50세 이후

채택일 : 1998년 12월 30일

\*This research was supported by the Chung-Ang University research grants.

에 발생하는 후천적인 질환으로 지적 능력이 감퇴되는 속도가 정상인보다 빠른 상태를 말하며, 여러가지 원인에 의해 발생되는 복합적인 질병이다.<sup>3)4)</sup> 지금까지 지적 능력의 감퇴에 영향을 준다고 알려진 인자로는 나이, 성별, 교육정도, 활동능력, 스트레스를 들 수 있고, 특히 영양상태가 노인의 지적 능력과 관련이 있다고 보고되었다.<sup>5-11)</sup>

현재 국내의에서는 영양상태와 인지능력과의 관련성을 규명하려는 노력이 계속되고 있으며, 이를 바탕으로 노인의 영양 섭취 상태를 개선시켜 인지능력저하를 예방하고자 하는 연구가 지속적으로 많이 시도되고 있다.<sup>9-12)</sup> 영양소 중에서 항산화제인 비타민 E 및 비타민 C와 인지능력의 관계에 관한 연구에 의하면, 노인의 경우 비타민 E나 C 섭취 수준이 높을 때 인지능력이 더 높았고 치매환자의 체내 비타민 E나 C 수준이 정상인보다 낮았다고 보고되었다.<sup>13-15)</sup> 그리고 치매환자에게 비타민 E나 C를 보충시켜줄 경우 병의

진행이 느려져 치료에 도움이 된다고 보고되었다.<sup>16-21)</sup> 영양소 보충이 인지능력저하를 예방하는 긍정적인 효과가 있다는 결과가 나온다면, 노인인구와 노인성 치매환자가 증가하는 이 시점에서 치매로 인한 문제해결에 도움이 될 것으로 보인다.

따라서 본 연구에서는 동물실험을 통하여 영양소중 항산화제인 비타민 E와 비타민 C 첨가가 scopolamine에 의한 인지능력 저하에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 1. 실험 설계 및 내용

본 실험에서는 실험군을 대조군, 비타민 E군, 비타민 C군으로 나누고, 다시 각 군을 scopolamine 비투여군과 scopolamine 투여군으로 나누어 실험하였다.

실험은 Fig. 1과 같이 진행되었다. 각 군을 1주간 고행사료에 적응시킨 다음, 대조군은 일반가루사료로, 비타민 E군과 비타민 C군은 각각 비타민 E와 비타민 C를 일반가루사료에 첨가한 식이(24g/kg diet)로 6주간 사육하면서 shuttle box training을 실시하였다(Table 1). Scopolamine을 투여하기 전의 회피율은 scopolamine을 투여하기 전날에 측정하였다. 각 군을 scopolamine 투여군과 비투여군으로 나누어 scopolamine 투여군의 경우에는 scopolamine을 주사하고 20분 후 shuttle box에서 회피율을 측정한 다음 희생시키고, scopolamine 비투여군은 그대로 희생시킨 다음

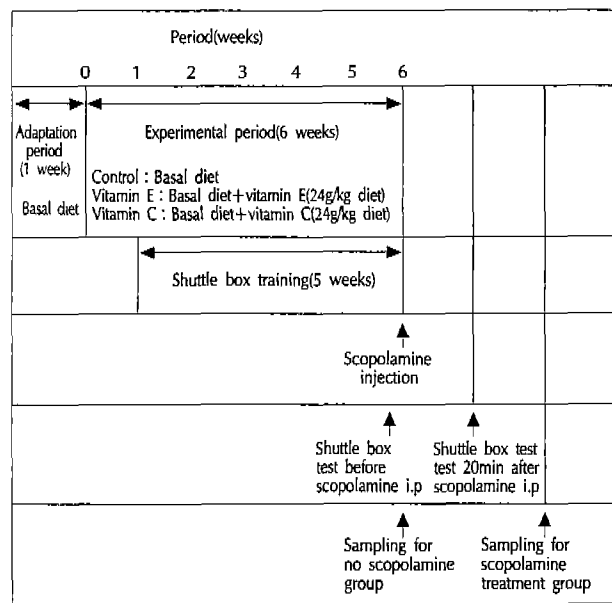


Fig. 1. Experimental design.

뇌를 꺼내어 뇌의 acetylcholinesterase activity와 dopamine, norepinephrine 함량을 측정하였다.

#### 2. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 식품의약품 안전본부 실험동물실에서 생산된 발육상태가 양호하고 건강한 5주령의 Wistar계 수컷 흰쥐를 실험에 사용하였다. 흰쥐 26마리를 7일간 실험실 조건하에서 일반고형사료(신촌사료주식회사)에 적응시킨 후 평균 체중이 유사하도록 난괴법에 의하여 대조군(10마리), 비타민 E군(8마리), 비타민 C군(8마리)으로 나누었고, 다시 각 군을 scopolamine 비투여군과 scopolamine 투여군으로 나누었다. 대조군은 일반가루사료(신촌사료주식회사)로, 비타민 E군과 비타민 C군은 각각 비타민 E(dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate, Junsei chemical Co., Ltd., Japan)와 비타민 C(ascorbic acid, Daejung chemical and metal Co., Korea)를 일반가루사료에 첨가한 식이(24g/kg diet)로 6주간 사육하였다. 일반가루사료의 식이조성은 Table 2와

Table 1. Classification of experimental groups

| Group              | Vitamin E <sup>1)</sup><br>(g/kg diet) | Vitamin C <sup>2)</sup><br>(g/kg diet) | Scopolamine<br>treatment<br>(300mg/kg i.p) |   |
|--------------------|--|--|--|---|
| Control<br>(n=10)  | No scopolamine<br>(n=5)                | 0                                      | 0  | - |
|                    | Scopolamine<br>treatment (n=5)         | 0                                      | 0  | + |
| Vitamin E<br>(n=8) | No scopolamine<br>(n=4)                | 24                                     | 0  | - |
|                    | Scopolamine<br>treatment (n=4)         | 24                                     | 0  | + |
| Vitamin C<br>(n=8) | No scopolamine<br>(n=4)                | 0                                      | 24   | - |
|                    | Scopolamine<br>treatment (n=4)         | 0                                      | 24   | + |

1) Vitamin E : dl- $\alpha$ -tocopheryl acetate(Junsei chemical Co., Ltd, Japan)  
2) Vitamin C : ascorbic acid(Daejung chemical and metal Co., Korea)

Table 2. Nutritional composition of the basal diet<sup>1)</sup>

| Nutrient             | %     |
|----------------------|-------|
| Carbohydrate         | 58.0  |
| Crude protein        | 22.0  |
| Fat                  | 3.5   |
| Crude fiber          | 7.0   |
| Total ash            | 9.0   |
| Calcium              | 0.7   |
| Phosphorus           | 0.5   |
| Nutrient supplements | 0.5   |
| Total                | 100.0 |

1) Prepared for rat by Shinchon feed company

같다. 사료와 물은 자유섭취방법(ad libitum)으로 공급하였고, 사육실의 환경조건은 실내온도 23±1℃, 상대습도 55±5%, 명암교대 12시간으로 하였다.

### 3. 인지능력 측정

인지능력을 측정하기 위하여 shuttle box(Electric shock interface, Muromachiikai Co.)를 이용하여 active avoidance test를 실시하였다.<sup>20)</sup> Shuttle box는 gillnet door에 의하여 두 개의 방으로 나누어져 있다. 각 방은 바닥에 전류가 흐르도록 설계된 철판이 깔려있고, 방의 벽면에는 작은 lamp가 설치되어 있다. 실험이 시작되면 쥐가 있는 방의 lamp가 켜져서 환하게 된다. 쥐가 빛이 나와도 다른 방으로 피하지 않고 있으면 이어서 소리가 나오게 된다. 소리가 나와도 쥐가 다른 쪽 방으로 피하지 않으면 바닥에 깔린 철판에 전류가 흐르게 된다. 이 때 쥐가 다른 방으로 피하면 전류가 흐르는 것이 멈추게 된다. 한 회가 끝나면 일정한 시간이 지난 다음 다시 쥐가 있는 쪽의 방에 빛이 들어오면서 같은 실험이 되풀이된다. 실험조건은 initial time(ITI) 20초, first conditioned stimulus(CS1) 3초, second conditioned stimulus(CS2) 3초, unconditioned stimulus(UCS) 3초로 하여 1회(trial)를 총 4 session, 29초로 정하였고, electric shock의 강도는 2.0 mA로 정하였다. 각 session에서 동물이 조건을 회피하여 반대편 방으로 이동하면 자동적으로 한 회가 종료되고 다음 회로 넘어가도록 설계한 다음, 쥐에게 빛(3초), 소리(3초), 전기쇼크(3초, 2.0 mA)를 차례로 주어 빛과 소리만 나와도 다른 방으로 회피하여 전기쇼크를 받지 않을 수 있도록 훈련을 계속 시켰다. 실험결과는 shuttle box에 연결된 컴퓨터에 자동으로 입력되어 출력되도록 하였다. Active avoidance test는 비타민 보충을 계속하면서 각 쥐당 1일에 40회씩의 훈련을 총 7번 실시한 후 측정하였다.

인지능력 저하제로는 scopolamine이 acetylcholine receptor를 차단하므로써 인지능력을 저하시킨다고 보고되어 있어,<sup>23-25)</sup> scopolamine을 인지능력 저하제로 사용하였다. Scopolamine 투여량은 쥐를 대상으로 예비 실험을 통하여 정하였다.

비타민을 첨가한 식이를 제공한지 6주 후에 각 군을 scopolamine 투여군과 비투여군으로 나누었다. Scopolamine을 투여하기 전날에 scopolamine 투여전 회피율을 측정하였고, 그 다음날 scopolamine 투여군은 scopolamine을 복강 주사(300mg/kg body weight)한 20분 후에 shuttle box에 넣어 scopolamine 투여후의 회피율을 측정하였다.

### 4. Acetylcholinesterase activity 측정

Shuttle box로 회피율을 측정한 후 즉시 단두하여 뇌를 꺼내어 좌뇌와 우뇌로 나누었다. 좌뇌를 측정 시료로 삼아 Ellman등의 방법<sup>26)27)</sup>으로 흡광계(Cary 1E, Varian Co., Australia)를 이용하여 acetylcholinesterase activity를 측정하였다. 좌뇌에서 핏줄을 제거한 다음, 좌뇌 20mg에 0.1M phosphate buffer(pH 8.0) 1ml를 넣고 homogenizer로 균질화시켰다. 이 균질용액을 0.4ml 취하여 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0)가 2.6ml 담겨있는 cuvette에 첨가하였다. 여기에 DTNB (Dithiobisnitrobenzoic acid) 100μl를 첨가하여 412nm에서 흡광도를 측정한다. 다음, 0.075M acetylthiocholine iodide substrate를 20μl 넣고 1분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다.

### 5. Dopamine과 norepinephrine 함량 측정

뇌의 dopamine과 norepinephrine 함량은 Saller와 Salama<sup>28)</sup>와 Iuvone등<sup>29)</sup>의 방법으로 구하였다. 뇌를 차가운 0.1M phosphate buffer(pH 8.0)에 세척한 후 가능한 한 빨리 혈액을 제거하였다. 뇌를 0.4mM sodium metabisulfite가 포함된 0.1M perchloric acid 3ml를 첨가하여 homogenizer로 균질화시키고 4℃, 4000xg에서 15분간 동안 원심분리하여 상층액을 얻어 분석시까지 냉동보관하였다. 상층액 1ml에 internal Std.(DHBA, dihydroxybenzyl acid) 20μg, 2N NaOH 20μl, activated aluminum 50mg을 첨가하고 1분 동안 vortex mixer로 혼합하였다. 이를 원심분리한 다음 상층액을 제거하고 pellet을 증류수로 두번 세척하였다. 그 후 0.5M perchloric acid 100μl를 첨가하여 vortex mixer로 혼합하고 2000xg에서 10분 동안 원심분리한 다음, 상층액 20μl를 위해 HPLC(Pharmacia Ltd., USA)에 주입하여 dopamine과 norepinephrine 양을 구하였다. Column은 Nova-Pak C<sub>18</sub>(3.9×150mm Waters Co.)을 사용하였고 Pump(Pharmacia Co.), Flow rate(1ml/min), detector는 Electrochemical detector(ECD)를 사용하였다.

### 6. 통계처리

모든 실험분석 결과는 각 실험군의 평균과 표준편차로 나타내었다. 각 실험군의 유의도 검증은 SAS program을 이용하여<sup>30)</sup> 비타민 E 와 C 첨가가 정상군에 비하여 뇌내 신경 전달물질 함량에 유의적인 변화가 있는지를 검증하고자 Duncan's multiple range test를 통하여 각 군간의 차이를 p<0.05수준에서 검증하였다. 동일군에서 scopolamine을 투여한 군과 투여하지않은 군간의 차이를 알아보고자 student's t-test로 p<0.05수준에서 유의성을 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 실험동물의 체중 및 뇌의 무게

각 실험군의 체중 및 뇌의 무게는 Table 3과 같다. 체중과 뇌의 무게는 비타민 E와 C 첨가군 모두 유의적인 차이를 보이지 않았다.

### 2. 비타민 E 및 C 첨가가 전기충격에 대한 회피율에 미치는 영향

Scopolamine을 주사하기 전에는 대조군과 비타민 E 첨가군, 비타민 C 첨가군 간에 전기충격에 대한 회피율에 차이가 없었다. 그러나 scopolamine을 주사한 후에는, 대조군에서는 scopolamine에 의하여 회피율이 크게 낮아져 유의적인 차이를 보였다( $p < 0.05$ ) (Table 4). 따라서 scopolamine이 인지능력을 저하시키는데 효과적임을 나타내었으며, 이는 scopolamine이 치매유발제로 사용 가능함을 보여주었다. Riekkinen 등<sup>31)</sup>에 의하면 scopolamine은 muscarinic acetylcholine receptor antagonist 이어서 scopolamine을 쥐에게 투여하면 water maze와 passive avoidance performance behavior 실험에서 실패율이 높아졌다고 하였고, Hirokawa 등<sup>32)</sup>은 scopolamine 투여시 기억력이 손상되어 radial maze performance test에서

**Table 3.** Body weight and brain weight of each group

| Group           | Body weight (g)                  | Brain weight (g)         |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------|
| Control (n=10)  | 397.80 ± 43.11 <sup>1)ab2)</sup> | 1.51 ± 0.09 <sup>a</sup> |
| Vitamin E (n=8) | 386.75 ± 30.99 <sup>a</sup>      | 1.49 ± 0.11 <sup>a</sup> |
| Vitamin C (n=8) | 383.50 ± 33.24 <sup>a</sup>      | 1.52 ± 0.06 <sup>a</sup> |

1) Mean ± S.D

2) Different superscripts within the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) among groups by Duncan's multiple range test

**Table 4.** Rate of active avoidance response to electric shock in rats during before and after scopolamine treatment

| Group           | Before scopolamine treatment | After scopolamine treatment | Reduction rate           |
|-----------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Control (n=5)   | 99.5 ± 1.1 <sup>1)ab2)</sup> | 39.5 ± 41.8 <sup>a*</sup>   | 60.4 ± 41.8 <sup>a</sup> |
| Vitamin E (n=4) | 95.0 ± 8.4 <sup>a</sup>      | 60.0 ± 32.6 <sup>aNS</sup>  | 37.8 ± 30.7 <sup>a</sup> |
| Vitamin C (n=4) | 80.0 ± 38.4 <sup>a</sup>     | 50.0 ± 18.3 <sup>aNS</sup>  | 15.1 ± 64.4 <sup>a</sup> |

1) Mean ± SD

2) Different superscripts within the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) among groups by Duncan's multiple range test  
NS : Not significant between before scopolamine and after scopolamine group

\* : Symbol indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) between the before scopolamine and after scopolamine group by Student's t-test  
Reduction rate = [(before scopolamine treatment - after scopolamine treatment) / before scopolamine treatment] × 100

분별력이 감소한다고 보고하였는데 본 연구에서도 대조군의 경우 scopolamine 투여시 shuttle box에서의 회피율이 저하되는 것으로 나타났다.

그러나 비타민 E 첨가군과 비타민 C 첨가군은 scopolamine 주사전과 후의 회피율에 유의적인 차이가 없어 비타민 E와 C의 첨가가 scopolamine에 의한 인지능력의 저하를 막아주는 것으로 나타났다.

인지능력과 비타민 E 및 비타민 C와의 관련성에 대한 연구를 살펴보면, Rue 등<sup>9)</sup>은 비타민 E 섭취수준이 높은 노인이 공간 시각적인 회상 능력이 더 뛰어나다고 보고하였고, Rosenberg와 Miller<sup>12)</sup>는 비타민 E 결핍이 신경 및 행동에 영향을 줄 수 있다고 하였다. Tohgi 등<sup>13)</sup>은 알츠하이머 환자의 경우 뇌의 비타민 E 농도가 정상인보다 매우 낮았다고 보고하였다. Zaman 등<sup>14)</sup>에 의하면 알츠하이머 환자와 뇌경색성 치매 환자의 혈중 비타민 E 수준이 대조군보다 유의적으로 낮았고, Jeandel 등<sup>15)</sup>은 알츠하이머 환자의 혈청 비타민 E 수준이 건강한 대조군보다 유의적으로 낮았다고 하였다. Sano 등<sup>16)</sup>은 알츠하이머 환자를 비타민 E로 치료할 경우 병의 진전이 느려진다고 하였고, Van Dyke<sup>17)</sup>는 과량의 비타민 E와 비타민 C가 알츠하이머 환자에게 도움이 된다고 보고하였다.

그리고 Goodwin 등<sup>18)</sup>은 혈중 비타민 C 농도가 낮으면 기억이나 비언어적인 추상적 사고의 점수가 낮게 나타났다고 하였다. Barabas 등<sup>19)</sup>은 건강한 성인과 노인성 치매환자의 혈액중 비타민 C 수준을 비교하여 본 결과, 노인성 치매환자의 혈액중 비타민 C 수준이 건강한 성인의 30% 수준으로 현저히 낮았다고 보고하였다. Nes 등<sup>20)</sup>은 치매인 여자노인의 비타민 C 섭취상태가 정상인 여자노인의 비타민 C 섭취상태보다 낮았다고 하였다. Parnetti 등<sup>21)</sup>에 의하면 알츠하이머 환자에게 Citicoline과 비타민 C를 3개월간 보충시켜 본 결과 기억력, 일상적인 활동의 수행능력이 대조군보다 개선되었다. 그리고 de Angelis와 Furlan<sup>22)</sup>은 scopolamine을 투여할 때 비타민 C를 함께 투여하면 scopolamine에 의해 기억력이 저하되는 것을 막아주는 효과가 있었다고 보고하였는데 본 연구 결과 이와 비슷한 경향을 보였다.

### 3. 비타민 E 및 C 첨가가 뇌내 acetylcholinesterase activity에 미치는 영향

본 실험에서 얻은 각 실험군의 acetylcholinesterase activity는 Table 5과 같다.

Acetylcholinesterase activity는 비타민 C 첨가군에서 낮게 나타났다( $p < 0.05$ ). 쥐의 경우 비타민 C는 뇌의 acetylcholinesterase activity를 낮추는 것으로 보아 뇌내 신

경전달물질생성 및 전달에 영향을 주는 것으로 나타났다. 그러나 scopolamine을 주사한 후에는 세군간에 유의적인 차이가 없었다(Table 5).

Acetylcholinesterase activity에 대한 scopolamine의 영향을 보면, 대조군의 acetylcholinesterase activity는 scopolamine 주사군이 비주사군보다 유의적으로 낮게 나타나(Fig. 2) shuttle box에서의 회피율이 유의적으로 낮아지는 것과 같은 경향을 보였다. 그러나 비타민 E군과 비타민 C군은 scopolamine 주사군과 비주사군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Acetylcholinesterase에 대한 연구에서, 김문정과 김선희<sup>27)</sup>는 acetylcholinesterase activity를 측정하는 것이 인지능력을 간접적으로 측정할 수 있는 방법이라고 하였다. 그리고 Davis<sup>33)</sup>는 알츠하이머 환자의 편도핵, 해마, 대뇌피질에서 acetylcholinesterase activity가 감소되었다고 하였고, 윤군애<sup>34)</sup> 역시 쥐의 경우 나이가 들면서 뇌의 acetylcholinesterase activity가 감소한다고 보고하였다. Iyo 등<sup>35)</sup>에 의하면 알츠하이머 환자가 대조군보다 뇌의 acetylcholinesterase activity가 낮았다고 보고하였고, Shen<sup>36)</sup> 역시 치매환자의 뇌척수액내 acetylcholinesterase 수준이

낮아 치매의 임상적인 진단을 하는데 사용될 수 있을 것이라고 하였다. 또 Oishi등<sup>37)</sup>은 알츠하이머 환자 10명, 혈관성 치매환자 10명, 건강한 대조군 10명을 대상으로 하여 연구한 결과 이들의 인지능력을 검사할 수 있는 지표로 이용되는 MMSE(mini-mental state examination, 인지능력을 측정하기 위해 개발된 도구로 인지능력 점수가 높을수록 MMSE 점수가 높다) score가 높을수록 뇌척수액(cerebrospinal fluid)내 acetylcholinesterase 농도가 유의적으로 높았다고 보고하였다.

그리고 Itoh등<sup>38)</sup>은 scopolamine 투여시 뇌의 acetylcholinesterase 수준이 낮아졌다고 하였고, Hirokawa등<sup>39)</sup>은 scopolamine 투여시 판단력의 정확성이 감소하고 뇌의 acetylcholinesterase 함량이 감소했다고 보고하여 본 실험 결과와 유사한 결과를 보였다. 본 연구에서도 scopolamine을 투여하였을때 shuttle box로 측정된 active avoidance test에서의 전기자극 회피율과 acetylcholinesterase activity가 유의적으로 낮아졌다. 그러나 비타민 E와 C를 첨가하였을 때에는 그와 같은 결과가 나타나지 않았다. 그러므로 선행 연구와 본 연구결과를 종합하여 볼 때 비타민 E와 C 첨가시 acetylcholinesterase activity의 저하와 인지능력의 감퇴를 막아주는 효과가 있었다.

그러나 현재 알츠하이머 환자의 치료제로 많이 사용되고 있는 tacrine(tetrahydroaminoacrine THA)을 비롯한 여러 종류의 약물은 acetylcholinesterase inhibitor이다.<sup>39-43)</sup> 따라서 알츠하이머 환자의 치료시에는 acetylcholinesterase의 작용을 억제하는 것이 인지능력을 개선시키는데 도움이 되는 것을 고려해 볼 때, 뇌내 acetylcholinesterase 수준과 인지능력과의 관련성에 대해서는 보다 많은 연구가 필요한 것으로 보인다.

Table 5. Brain acetylcholinesterase activity of each group

| Group     | No scopolamine                          | Scopolamine treatment              |
|-----------|---|------------------------------------|
|           | (Change in absorbance/min) <sup>†</sup> |                                    |
| Control   | 0.270 ± 0.084 <sup>1)3a2)</sup> (n=5)   | 0.178 ± 0.015 <sup>3)*</sup> (n=5) |
| Vitamin E | 0.215 ± 0.051 <sup>ab)</sup> (n=4)      | 0.219 ± 0.034 <sup>NS)</sup> (n=4) |
| Vitamin C | 0.143 ± 0.063 <sup>b)</sup> (n=4)       | 0.185 ± 0.057 <sup>NS)</sup> (n=4) |

† : The values were obtained from 20mg of brain per ml of 0.1M phosphate buffer(pH 8.0)

1) Mean ± SD

2) Different superscripts within the same column indicate significant difference(p<0.05) among groups by Duncan's multiple range test

NS : Not significant between no scopolamine and scopolamine treatment group

\* : Symbol indicates significant difference(p<0.05) between the no scopolamine treatment group and scopolamine treatment group by Student's t-test

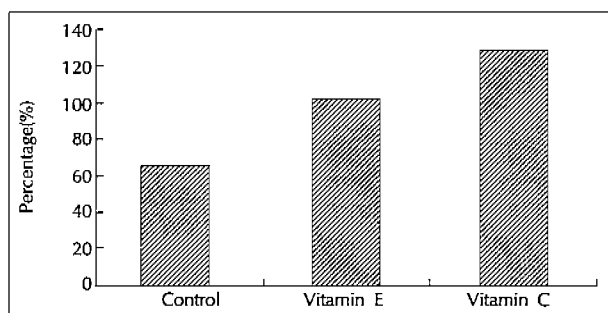


Fig. 2. Percentages of mean brain acetylcholinesterase activity for scopolamine groups to values for matched no scopolamine groups.

#### 4. 비타민 E 및 C 첨가가 뇌내 dopamine 함량에 미치는 영향

뇌내 dopamine 함량은 scopolamine을 주사하지 않았을 때에는 각 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다(Table 6). 그러나 scopolamine을 주사한 후에는 대조군의 뇌내 dopamine 농도가 비타민 E군과 C군보다 유의적으로 낮았다. 그리고, scopolamine 주사군과 비주사군 간에도 유의적인 차이는 없었으나, 비타민 E나 C 투여가 효과가 있는 경향이였다(Fig. 3).

이러한 결과는 아마도 scopolamine을 주사하면 dopamine의 산화가 증가한다고 보고한 Champan등<sup>44)</sup>의 연구에서와 같은 경향이 아닌가 생각되며, 비타민 E와 C 같은 항산화 비타민의 투여로 비타민 E군과 C군에서 dopamine의

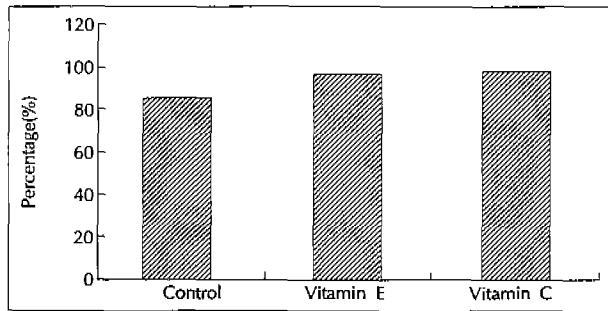
**Table 6.** Dopamine concentrations in brain of each group

| Group     | No scopolamine                         | Scopolamine treatment                |
|-----------|--|--------------------------------------|
|           | (ng/g brain weight)                    |                                      |
| Control   | 1243.1 ± 341.6 <sup>1)3a2)</sup> (n=5) | 1054.6 ± 208.3 <sup>bNS)</sup> (n=5) |
| Vitamin E | 1558.3 ± 108.2 <sup>a)</sup> (n=4)     | 1502.6 ± 291.1 <sup>aNS)</sup> (n=4) |
| Vitamin C | 1497.0 ± 287.6 <sup>a)</sup> (n=4)     | 1464.7 ± 177.1 <sup>aNS)</sup> (n=4) |

1) Mean ± SD

2) Different superscripts within the same column indicate significant difference (p < 0.05) among groups by Duncan's multiple range test

NS : Not significant between no scopolamine and scopolamine treatment group



**Fig. 3.** Percentages of mean brain dopamine concentrations for scopolamine groups to values for matched no scopolamine groups.

농도 저하가 억제된 것으로 보인다. 그리고 Sano<sup>16)</sup>에 의하면 비타민 E가 뇌의 catecholamine 수준을 증가시키고, 산화적인 손상(oxidative damage)을 막아 신경이 손상되는 것을 감소시켜서 알츠하이머병의 진행을 느리게 한다고 보고되었는데, 본 실험에서도 비타민 E나 C 첨가군의 dopamine 수준이 대조군보다 유의적으로 높아, 비타민 E와 C 첨가가 dopamine의 산화를 막아주는 효과가 있는 것으로 나타났다.

치매와 dopamine과의 관련성에 대한 연구에서, Itoh<sup>45)</sup>은 알츠하이머 환자와 혈관성 치매환자를 포함한 32명의 치매환자의 뇌중 dopamine 대사를 연구한 결과, 치매가 심하게 진행됨에 따라 dopamine 대사에 장애가 왔다고 보고하였다. Nitta와 Nabeshima<sup>46)</sup>는 알츠하이머병의 모델로 쥐의 뇌에 mini-osmotic pump를 이용하여 betaamyloid protein을 주입하여 인위적으로 치매적인 betaamyloid-infused rat를 만들었는데, 이 쥐들은 기억력이 떨어지고, 뇌의 피질(cortex)과 해마(hippocampus), 선조체(striatum)에서 방출되는 acetylcholine과 dopamine 수준이 대조군보다 낮았다고 보고되었다.

본 실험에서도 scopolamine 투여시 인지능력이 유의적으로 낮았고 뇌내 dopamine 함량이 낮았으며 이러한 경향은 비타민 E나 C 첨가군보다 대조군에서 더욱 뚜렷하였다. 따라서 비타민 E와 C 첨가시에는 뇌내 dopamine 함량 저하가 억제되고, 이것이 인지능력의 감퇴를 막아주는데 도움

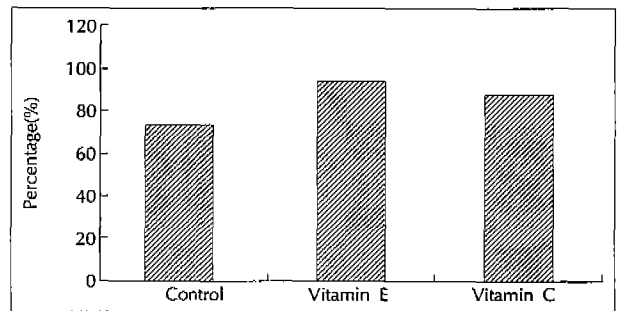
**Table 7.** Norepinephrine concentrations in brain of each group

| Group     | No scopolamine                       | Scopolamine treatment              |
|-----------|--------------------------------------|------------------------------------|
|           | (ng/g brain weight)                  |                                    |
| Control   | 229.7 ± 86.3 <sup>1)3a2)</sup> (n=5) | 170.0 ± 71.1 <sup>aNS)</sup> (n=5) |
| Vitamin E | 252.3 ± 87.6 <sup>a)</sup> (n=4)     | 236.0 ± 26.7 <sup>aNS)</sup> (n=4) |
| Vitamin C | 246.6 ± 94.0 <sup>a)</sup> (n=4)     | 217.5 ± 73.9 <sup>aNS)</sup> (n=4) |

1) Mean ± SD

2) Different superscripts within the same column indicate significant difference (p < 0.05) among groups by Duncan's multiple range test

NS : Not significant between no scopolamine and scopolamine treatment group



**Fig. 4.** Percentages of mean brain norepinephrine concentrations for scopolamine groups to values for matched no scopolamine groups.

이 되는 것으로 나타났다.

### 5. 비타민 E 및 C 첨가가 뇌내 norepinephrine 함량에 미치는 영향

Norepinephrine 수준은 각 군간에 유의적인 차이가 없었다(Table 7). 그러나, scopolamine 주사군과 비주사군을 비교했을때 대조군에서는 scopolamine 주사군의 norepinephrine 수준이 매우 낮은 경향이었으나, 비타민 E와 C군에서는 큰 차이가 없었다(Fig. 4).

Norepinephrine과 치매와의 관계를 조사한 연구에 의하면, 여러 연구에서 알츠하이머 환자는 뇌의 norepinephrine이 감소하였다고 보고되었다.<sup>4)47)48)</sup> Rossor<sup>47)</sup>에 의하면 알츠하이머 환자의 경우 대뇌피질, 시상하부의 norepinephrine 수준이 감소하였다. 다른 연구에서도 역시 알츠하이머 환자는 대뇌피질의 norepinephrine 농도가 감소하고 norepinephrine 합성효소인 dopamine β-hydroxylase의 활성이 감소되었다고 보고되었다. 그러나 알츠하이머 환자를 부검하여 측정된 norepinephrine은 젊은 환자의 경우에는 감소되어 있기는 하지만 질병의 중증도와는 관련이 없었고, norepinephrine의 주요 대사물이 젊은 환자의 경우에는 유의하게 증가되었지만 나이가 들어 발병한 경우에는 그렇지 않았다.<sup>48)</sup> 그리고 치매와 혈액의 norepinephrine 수준에 대한 연구를 보면, Lawlor<sup>49)</sup>은 나이, 발병나이, 성별을 보정한 뒤에도 peripheral noradrenergic marker인

혈장의 MHPG(3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol)이 인지능력의 손상과 유의적인 상관관계를 보였다. 또 Ahlskog등<sup>50)</sup>은 파킨스씨병 환자의 혈장 norepinephrine 농도가 유의적으로 증가했다고 보고하였다. 그러나 Vitiello 등<sup>51)</sup>은 알츠하이머환자와 정상인 노인의 혈장 norepinephrine 수준에 유의적인 차이가 없었다고 하였고, Oishi등<sup>37)</sup>은 알츠하이머 환자 10명, 혈관성 치매환자 10명, 건강한 대조군 10명을 연구한 결과 이들의 MMSE(mini-mental state examination) score과 norepinephrine 농도 사이에 유의적인 음의 상관관계가 있었다고 보고하여 치매와 norepinephrine과의 관련성에 대한 여러 연구결과는 일관된 경향을 보이고 있지 않았다.

그런데 동물을 대상으로 한 실험을 보면, norepinephrine 수준이 낮을 경우 scopolamine에 의해 인지능력이 감퇴되는 정도가 더 심해지는 것으로 보고되었다. Ohno등<sup>52)</sup>에 의하면 쥐에게 약물을 사용하여 hippocampus의 norepinephrine 농도를 현저하게 감소시킨 후에 쥐의 기억능력을 검사하였으나 영향을 주지 못하였다. 그러나 적은 양의 scopolamine을 투여하였을 때 대조군에서는 기억능력(working memory task)에 변화가 나타나지 않았지만, 이 norepinephrine 농도를 감소시킨 쥐들은 three-panel runway task 실험을 하여 쥐에게 네번의 선택을 하게 하였을 때, 세개의 panel-gate 중에서 잘못된 두개의 panel을 선택하여 통과하려고 시도하는 잘못을 범하는 횟수가 유의적으로 증가하였다고 하였다. 따라서 Ohno등은 이 결과로 미루어 볼 때 쥐의 경우 기억기능에 관련되는 신경전달과정에 있어서 hippocampal muscarinic/noradrenergic interaction이 있을 것이라고 하였다. 또한 Vanderwolf와 Baker<sup>53)</sup> 역시 6-hydroxydopamine을 사용하여 norepinephrine을 고갈시킬 경우, scopolamine에 의한 판단력의 비정확성을 더욱 증가시켰다고 보고하였다.

그러나 여러 연구에서 norepinephrine 수준이 낮을 경우 scopolamine에 의해 인지능력이 더 많이 감퇴하는 것으로 나타났는데, 본 실험에서는 scopolamine 주사후 각군의 norepinephrine 수준 사이에 유의적인 차이가 없었다. 본 실험에서도 인지능력이 유의적으로 낮아진 대조군의 norepinephrine 수준이 비타민 E군과 C군보다 많이 낮아 선행 연구와 비슷한 경향이었으나 통계적으로 유의한 차이가 있다는 결과를 얻지 못하였는데, 이는 아마도 각군당 실험동물 수가 너무 적었기 때문에 나타난 결과로 보인다. 그리고 쥐에게 비타민 C가 필수적인 영양소가 아님<sup>54,55)</sup>을 고려하여 보면, 본 실험에서의 비타민 C 첨가량이 너무 과량이었던 것으로 보인다. 따라서 후속 연구에서 실험동물의 수를 늘

리고 비타민 C의 첨가량을 다소 줄여 실험을 한다면 통계적으로 유의적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 요약 및 결론

본 연구는 동물실험을 통하여 비타민 E와 비타민 C 첨가가 scopolamine에 의한 인지능력 저하에 어떤 영향을 미치는지 알아보코자 실시되었다.

연구 결과를 보면, scopolamine 주사전과 주사후 회피율을 비교하였을 때, 대조군의 경우는 주사전보다 주사후의 회피율이 유의적으로 낮아진 반면(p<0.05), 비타민 E군과 비타민 C군은 주사전과 후의 회피율에 유의적인 차이가 없었다.

Acetylcholinesterase activity는 scopolamine 비주사군의 경우 비타민 C 첨가군에서 낮게 나타났으나(p<0.05), scopolamine을 주사했을 때에는 세군간에 유의적인 차이가 없었다. Scopolamine 주사군과 비주사군의 acetylcholinesterase activity를 비교하여 보면, 대조군은 scopolamine 주사군이 비주사군보다 유의적으로 낮았으나, 비타민 E군과 비타민 C군은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 뇌내 dopamine 수준은 scopolamine을 주사하지 않은 경우 세군간에 유의적인 차이가 없었으나, 주사후에는 대조군의 함량이 비타민 E군이나 C군보다 유의적으로 낮았다. Scopolamine 주사후, 주사군의 뇌내 dopamine 함량은 비주사군보다 낮은 경향이었지만 세군 모두 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 뇌내 norepinephrine 함량은 주사군과 비주사군 모두에서 대조군이 비타민 E군이나 C군보다 낮게 나타났으나 유의적이지 않았고, scopolamine 주사후 주사군의 뇌내 norepinephrine 함량이 비주사군보다 유의적이지는 않았지만 역시 낮은 경향이였다.

이상을 종합하여 보면, scopolamine 투여시에는 전기자극에 대한 회피율과 뇌내 acetylcholinesterase activity가 유의적으로 낮아지고 뇌내 dopamine, norepinephrine 수준이 감소되는 경향을 보이지만, 비타민 E와 C 첨가군에서는 회피율과 뇌내 acetylcholinesterase activity, dopamine, norepinephrine 수준 저하가 어느 정도 보완되었다. 따라서 비타민 E와 C 첨가는 뇌내 신경전달물질에 영향을 미쳐 scopolamine에 의해 인지능력이 감퇴되는 것을 방지하는 것으로 보인다.

## Literature cited

- 1) Kim SH, Kim WY. Aging -Daewoo science library-. Mineum Co., 1995

- 2) Board of Statistics. Future estimation of population, 1991
- 3) Binstock RH, Post SG, Whitehouse PJ. Dementia and Aging -Ethics, Values, and Policy Choices-. The John Hopkins Univ. Press, 1992
- 4) Gruetzner H. Alzheimer's -A caregiver's guide and sourcebook-. Wiley, 1988
- 5) Stern Y, Gurland B, Tatanichi TK, Tang MX, Wilder D, Mayeux R. Influence of education and occupation on the incidence of Alzheimer's disease. *JAMA* 271 : 1004-1010, 1994
- 6) Raser GE, Singh PN, Bennett H. Variables associated with cognitive function in elderly California seventhday adventists. *Am J Epidemiol* 143 : 1181-1190, 1996
- 7) Elias MF, Robbins MA, Schultz NR, Streeten DH, Elias PK. Clinical significance of cognitive performance by hypertensive patients. *Hypertension* 9 : 192-197, 1987
- 8) Kim SH, Yoo CH, Kim SH, Lee SS, Kang MH, Chang NS. Family nutrition -Daewoo science library-. Mineum Co., 1996
- 9) Rue AL, Koehler KM, Wayne SJ, Chiulli SJ, Haaland KY, Garry PJ. Nutritional status and cognitive functioning in a normally aging sample : A 6-y reassessment. *Am J Clin Nutr* 65 : 20-29, 1997
- 10) Growdon JH, Wurtman RJ. Dietary influences on the Synthesis of Neurotransmitters in the brain. *Nutrition Reviews* 37(5) May : 129-136, 1979
- 11) Park SO, Han SS, Ko YS, Kim YJ, Lee HS, Kang NE, Lee JH, Kim WK, Kim SH. A study on the relation between dietary intake and cognitive function in the elderly. *Kor J Diet Cult* 7(2) : 149-155, 1992
- 12) Rosenberg IH, Miller JW. Nutritional factors in physical and cognitive function of elderly people. *Am J Clin Nutr* 55 : 1237S-1243S, 1992
- 13) Tohgi H, Abe T, Nakanishi M, Hamato F, Sasaki K, Takahashi S. Concentrations of gamma-tocopherol and its quinone derivative in cerebrospinal fluid from patients with vascular dementia of the Binswanger type and Alzheimer type dementia. *Neuroscience Letter* 174(1) : 73-76, 1994
- 14) Zaman Z, Roche S, Fielden P, Frost PC, Niriella DC, Cayley ACD. Plasma concentrations of vitamin A and E and carotenoids in Alzheimer's disease. *Age Aging* 21(2) : 91-94, 1992
- 15) Jeandel C, Nicolas MB, Dubois F, Nabet-Belleville F, Penin F, Cuny G. Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology* 35(5-6) : 275-282, 1989
- 16) Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grudman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's disease cooperative study. *N Engl J Med* 336(17) : 1216-1222, 1997
- 17) Van Dyke K. The possible role of peroxytrite in Alzheimer's disease : A simple hypothesis that could be tested more thoroughly. *Medical Hypotheses* 48(5) : 375-380, 1997
- 18) Goodwin JS, Good JM, Gerry PJ. Association between nutritional status and cognitive functioning in a healthy population. *JAMA* 249 : 2917-2921, 1983
- 19) Barabas J, Nagy E, Degrell I. Ascorbic acid in cerebrospinal fluid -A possible protection against free radicals in the brain. *Arch Gerontol Geriatr* 21(1) : 43-48, 1995
- 20) Nes M, Sem SW, Rouseau B, Bjorneboe GEA, Engedal K, Trygg K, Pedersen JL. Dietary intakes and nutritional status of old people with dementia living at home in Oslo. *Europ J Clin Nutr* 42(7) : 581-593, 1988
- 21) Parnetti L, Ambrosoli L, Abate G, Azzini C, Balestreri R, Barotorelli L, Bordin A, Crepaldi G, Cristianini G, Cucinotta D, Cuzzupoli M, De Candia O, Fabris F, Maggioni M, Scarpa R, Villardita C, Girardello R, Poli A, Senin U. Posatirelin for the treatment of late-onset Alzheimer's disease : A double blind multicentre study vs citicoline and ascorbic acid. *Acta Neurol Scand* 92(2) : 135-140, 1995
- 22) de Angelis L, Furlan C. The effects of ascorbic acid and oxiracetam on scopolamine-induced amnesia in a habituation test in aged mice. *Neurobiology of Learning & Memory* 64(2) : 119-124, 1995
- 23) Kang SY, Kim SH, Kim TG, Jung KK, Ko HS, Huh YB, Lee SD, Lee YK. Biochemical study on Alzheimer's disease(1). The annual report of KFDA Vol 1, pp.497-503, 1996
- 24) Ridley BM, Barratt NG, Baker HF. Cholinergic learning deficits in the marmoset produced by scopolamine and ICV hemicholinium. *Psychopharmacology* 83 : 340-345, 1984
- 25) Harvey AL. Natural and Synthetic Neurotoxins. Academic Press, 1993
- 26) Ellman GL, Courtney D, Andres V Jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* Vol. 7 : 88-95, 1961
- 27) Kim MJ, Kim SH. Effect of DHA and environmental enrichment on brain fatty acid composition and acetylcholinesterase activity. *Kor J Nutr* 29(1) 32-40, 1996
- 28) Saller CF, Salama AI. Rapid automated analysis of biogenic amines and their metabolites using reversed-phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chrom* 309 : 287-298, 1984
- 29) Iuvone PM, Boatright JH, Bloom MM. Dopamine mediates the light-evoked suppression of serotonin N-acetyltransferase activity in retina. *Brain Res* 418 : 314-324, 1987
- 30) Cho IH. SAS and statistics consulting. Jeil economic research institute, 1993
- 31) Riekkinen P Jr, Schmidt B, Stefanski R, Kuitunen J, Riekkinen M. Metrifonate improves spatial navigation and avoidance behavior in scopolamine-treated, medial septum-lesioned and aged rats. *Europ J Pharm* 309(2) : 121-130, 1996
- 32) Hirokawa S, Nose M, Ishige A, Amagaya S, Oyama T, Ogihara Y. Effect of Hachimi-jio-gan on scopolamine-induced memory impairment and on acetylcholine content in rat brain. *J Ethnopharmacology* 50(2) : 77-84, 1996
- 33) Davis P. Neurotransmitter-related enzymes in senile dementia of the Alzheimer type. *Brain Res* 171 : 319-327, 1979
- 34) Yoon GA. Influence of dietary linolenic acid/linoleic acid ratio on brain lipid composition and acetylcholinesterase activity in different aged rat. *Kor J Nutr* 28(8) : 706-716, 1995
- 35) Iyo M, Namba H, Fukushi K, Shinotoh H, Nagatsuka S, Suhara T, Sudo Y, Suzuki K, Irie T. Measurement of acetylcholinesterase by positron emission tomography in the brains of healthy controls and patients with Alzheimer's disease. *Lancet* 349(9068) : 1805-1809, 1997
- 36) Shen ZX. The significance of the activity of CSF cholinesterases in dementias. *Medical Hypothesis* 47(5) : 363-376, 1996
- 37) Oishi M, Mochizuki Y, Yoshihashi H, Takasu T, Nakano E. Laboratory examinations correlated with severity of dementia. *Annals of Clinical & Laboratory Science* 26(4) : 340-345, 1996
- 38) Itoh T, Michijiri S, Murai S, Saito H, Nakamura K, Itsukaichi O, Fujiwara H, Ookubo N, Saito H. Regulatory effect of danggui-shaoyao-san on central cholinergic nervous system dysfunction in mice. *Am J Chinese Med* 24(3-4) : 205-217, 1996
- 39) Gottfries CG. Therapy options in Alzheimer's disease. *Br J Clin Practice* 48(6) : 327-330, 1994
- 40) Knapp MJ, Knopman DS, Solomon PR, Pendlebury WW, Davis CS, Gracon SI. A 30-week randomized controlled trial of high-dose Tacrine in patients with Alzheimer's disease. *JAMA* 271(13) : 985-991
- 41) Davis KL, Thal LJ, Gamzu ER, Davis CS, Woolson RF, Gracon SI, Drachman DA, Schneider LS, Whitehouse PJ, Hoover TM, Morris JC, Kawas CH, Knopman DS, Earl NL, Kumar V, Doody RS. A double-blind, placebo-controlled multicenter study of Tacrine for Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 327(18) : 1253-1259, 1992
- 42) Farlow M, Gracon SI, Hershey LA, Lewis KW, Sadowsky CH, Dolan-Ureño J. A controlled trial of Tacrine in Alzheimer's disease. *JAMA*



- 268(18) : 2523-2529, 1992
- 43) Bores GM, Huger FP, Petko W, Mutlib AE, Camacho F, Rush DK, Selk DE, Wolf V, Kosley RW JR, Davis L, Vargas HM. Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics : Acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics* 277(2) : 728-738, 1996
- 44) Chapman CA, Yeomans JS, Blaha CD, Blackburn JR. Increased striatal dopamine efflux follows scopolamine administered systemically or to the tegmental pedunculopontine nucleus. *Neuroscience* 76(1) : 177-186, 1997
- 45) Itoh M, Meguro K, Fujiwara T, Hatazawa J, Iwata R, Ishiwata K, Takahashi T, Ido T, Sasaki H. Assessment of dopamine metabolism in brain of patients with dementia by means of 18F-fluorodopa and PET. *Ann Nucl Med* 8(4) : 245-251, 1994
- 46) Nitta A, Nabeshima T. Experimental techniques for developing new drugs acting on dementia -Alzheimer's disease animal model induced by beta-amyloid protein. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 16(3) : 85-90, 1996
- 47) Rossor MN, Iversen LL, Reynolds GP, Mountjoy CQ, Roth M. Neurochemical characteristics of early and late onset types of Alzheimer's disease. *Br Med J Vol* 288 31 : 961-964, 1994
- 48) Suh Y. Biochemistry and molecular biology of dementia. *Kor J Psychopharmacol Vol* 3. No 1 : 13-21, 1992
- 49) Lawlor BA, Bierer LM, Ryan TM, Schmeidler J, Knott PJ, Williams LL, Mohs RC, Davis KL. Plasma 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) and clinical symptoms in Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 38(3) : 185-188, 1995
- 50) Ahlskog JE, Uitti RJ, Tyce GM, O'Brien JF, Petersen RC, Kokmen E. Plasma catechols and monoamine oxidase metabolites in untreated Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neurol Sci* 136(1-2) : 162-168, 1996
- 51) Vitiello B, Veith RC, Molchan Se, Martinez RA, Lawlor BA, Radcliffe J, Hill JL, Sunderland T. Autonomic dysfunction in patients with dementia of the Alzheimer type. *Biological Psychiatry* 34(7) : 428-433, 1993
- 52) Ohno M, Yoshimatsu A, Kobayashi M, Watanabe S. Noradrenergic DSP-4 lesions aggravate impairment of working memory produced by hippocampal muscarinic blockade in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 57(1-2) : 257-261, 1997
- 53) Vanderwolf CH, Baker GB. The role of brain noradrenaline in cortical activation and behavior : A study of lesions of the locus coeruleus, medial thalamus and hippocampusneocortex and of muscarinic blockade in the rat. *Behavioural Brain Research* 78(2) : 225-234, 1996
- 54) Gerald F, Combs JR. The vitamins. Fundamental aspects in nutrition and health. Academic Press, 1991
- 55) Lawrence JM. Handbook of vitamins. Nutritional, biochemical, and clinical aspects. Marcel dekker Inc., 1984