

흰쥐에서 nitrone 계 항산화제인 α -phenyl-*n*-tert-butyl nitrone(PBN)의 뇌 투과성 및 체내동태

이나영 · 강영숙[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received January 21, 2002; Revised February 20, 2002)

The Blood-Brain Barrier Permeability and Pharmacokinetics of Nitrone Based Spin Trapping Agent, α -Phenyl-*n*-tert-Butyl Nitron (PBN) in Rats

Na-Young Lee and Young-Sook Kang[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — The nitrone-based free radical trapping reagent, α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron (PBN) has been proposed as therapeutic agent for stroke. We used this for model drug of development of new drug for neuroprotection. The purpose of this study was to evaluate the blood-brain barrier (BBB) permeability of PBN in Sprague-Dawley (SD) rats. The BBB transport of PBN was investigated in SD rats using internal carotid artery perfusion (ICAP) method at a rate of 4 ml/min for 15 second. We also obtained pharmacokinetic parameters of PBN using single intravenous injection technique. When we estimated BBB permeability of PBN with ICAP method, the brain volume of distribution of PBN was $60.0 \pm 12.0 \mu\text{l}$. The brain uptake of PBN after IV injection at 120 min was $0.15 \pm 0.01\% \text{ID/g}$. The PBN was transported to the brain through the BBB well in rats, because PBN is small molecule (MW 177) and lipid-soluble (log P 1.23) compound.

Keywords □ α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron (PBN), blood-brain barrier (BBB) permeability

*In vivo*에서 허혈에 의해 유도된 free radical이 세포 손상을 일으킨다는 사실은 이미 여러 논문에서 밝혀져 있다.¹⁾ 그러므로 이러한 산화적 스트레스를 억제하는 물질은 허혈에 의해 유도된 뇌졸중의 치료에 효과를 나타낼 것으로 기대 되어진다. α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron(PBN)은 nitrone-based spin trapping agent의 하나로써 free radical과 결합하여 상대적으로 안정한 부산물을 형성하는 radical scavenger로 작용한다.²⁾ 실제로 PBN이 global ischemia 동물 모델에서 뇌손상을 억제시키는 결과를 나타낸다는 것이 보고되어 있고³⁾ 흰쥐의 focal ischemia 모델에서도 역시 뇌신경 손상을 보호하는 작용을 나타낸다는 것이 보고되었다.^{4,5)} 또한 free radical에 의해 유발되는 질환인 간질, 노화 등을 억제하는 효과가 있다는 것이 보고되어 있다.^{6,7)}

그러나 약물이 뇌혈관이나 뇌세포 내에 작용하기 위해서는 혈액-뇌관문을 통과하여야 하는데 실제로 PBN의 혈액-뇌관문의 투과성을 정확히 평가한 연구보고는 거의 찾아보기 어렵다. 그래

서 본 연구에서는 뇌신경 손상을 보호하는 물질의 개발을 위하여 우선 PBN을 모델 물질로 사용하여 PBN의 뇌 투과성을 내경동맥 관류법(internal carotid artery perfusion method, ICAP법)과 정맥투여법(*in vivo* intravenous injection technique)을 이용하여 실험하고 혈액중의 약물량과 뇌 투과량을 high performance liquid chromatography(HPLC)법으로 정량하여 검토하였다.

실험방법

시약 및 기기

α -Phenyl-*n*-tert-butyl nitron (Fig. 1)은 Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 생리식염수와 헤파린은 중외제약 제품을, 마취제로 사용한 염산 ketamine은 유한양행 제품을, 근이완제인 xylazine은 Sigma에서 각각 구입하여 사용하였다.

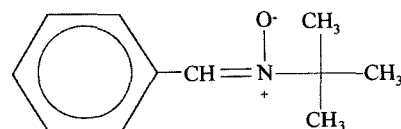


Fig. 1 – Chemical structure of PBN used in the present study.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9562 (팩스) 02-715-9498
(E-mail) yskang@sdic.sookmyung.ac.kr

Acetonitrile은 HPLC용으로 덕산이화학(주)에서 구입하였다. 기타 기약은 일급 이상의 제품을 덕산이화학(주)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 기기는 원심분리기 (한일 과학 산업(주), Union 55R, Micro 17TR), Infusion/withdrawal pump(KD Scientific, model 210), thermal blanket (temperature control unit, Letica, HB10 1/2), bipolar coagulator (Union Medical Co., Surgitor UM 880-A), 단두기 (대중기기), pH meter (Mettler, deltz 340), balance (Sartorius, AC2115), freeze dryer system (LABCONCO 7522900), 수술 기구 등이다. 한편 Sprague-Dawley (SD)계 웅성 흰쥐는 샘타코에서 구입하여 일주일간 동물실에서 사육하여 사용하였다.

Standard dose curve 작제

헤파린이 첨가된 혈액을 (heparin 100 unit/ml) 1,000 g에서 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 흰쥐를 희생하고 뇌를 꺼내어 실험에 사용하였다. 혈장 100 μ l에 PBN이 각각 1, 2, 5, 10 μ g의 도도록 넣고 chloroform 0.5 ml로 5분간 추출하였다. 추출액을 4°C에서 800 g, 10분간 원심분리하여 유기층만을 취하고 freeze dryer에 적용하여 용매를 완전히 날린 후 acetonitrile 100 μ l에 녹여 그 중 50 μ l를 HPLC에 적용하였다. 뇌를 약 1 g이 되도록 취하고 생리완충액 (PB, 10 mM HEPES, 141 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.8 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 1 mM NaH₂PO₄, 10 mM D-glucose, pH 7.4) 500 μ l를 넣고 균질화한 후 PBN이 각각 1, 2, 5, 10, 20, 50 μ g이 되도록 homogenate에 넣고 chloroform 3 ml로 5분간 추출하였다. 4°C에서 800 g, 10분간 원심분리하여 유기층만을 취하고 freeze dryer에 적용하여 용매를 완전히 날린 후 acetonitrile 200 μ l에 녹여 pore size가 0.2 μ m인 syringe filter (National Scientific Co.)를 사용하여 여과하고 그 중 100 μ l를 HPLC에 적용하였다.

내경동맥 관류법(Internal carotid artery perfusion technique, ICAP법)

250~300 g의 웅성 흰쥐에 ketamine (100 mg/kg)과 xylazine (2 mg/kg)을 근육 주사하여 마취시키고 이미 보고된 논문의 방법대로 목부위를 절개하여 혈관들을 전기결찰하였다.⁸⁾ 오른쪽 외경동맥에 PE-10관 (Natsume Co.)을 삽입하여 infusion pump에 연결하였다. 수술하는 동안에는 thermal blanket을 이용하여 흰쥐의 체온을 37°C로 유지하였다. PBN 100 μ g을 1% DMSO에 녹이고 Krebs-Henseleit buffer (KHB, pH 7.4: 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂FO₄, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose, 10 g/dl BSA)를 잘 혼합하여 4 ml/min으로 주입함과 동시에 총경동맥을 결찰하였다. 주입후 정확히 15초가 되었을 때 즉시 단두하여 뇌를 적출하고 무게를 측정한 후 PB 500 μ l를 넣고 균질화한 후

chloroform으로 5분간 추출하였다. 추출액을 4°C에서 800 g, 10분간 원심분리하여 유기층만을 취하고 freeze dryer에 적용하여 용매를 완전히 날린 후 acetonitrile 200 μ l에 녹여 pore size가 0.2 μ m인 syringe filter(National Scientific Co.)를 사용하여 여과한 후 그 중 100 μ l를 HPLC에 적용하였다.

ICAP법을 이용한 후에 뇌의 분포용적 (volume of distribution, V_D)과 뇌투과 고유상수 (permeability-surface area product, PS)를 구하는 식은 다음과 같다.

$$V_D (\mu\text{g}) = \frac{[\text{brain 중 PBN}(\text{g})/\text{brain}(\text{g})]}{[\text{Perfusate 중 PBN}(\text{g})/\text{perfusate}(\mu)]}$$

$$PS (\mu\text{min/g}) = V_D \text{ perfusion time}$$

정맥투여법(Single intravenous injection method)

PBN의 pharmacokinetic profile을 측정하기 위하여, 이미 보고된 논문의 방법⁹⁾과 마찬가지로 ketamine (100 mg/kg)과 xylazine (2 mg/kg)을 근육주사하여 마취시킨 250~300 g 흰쥐의 대퇴동맥과 대퇴정맥에 PE-50관 (Natsume Co.)을 삽입하였다. PBN 0.5 mg을 2% DMSO로 용해시키고 20% Polyethylene glycol 200과 Ringes Herpes buffer (RHB, 10 mM HEPES, 141 mM NaCl, 4 mM KCl, pH 7.4)로 잘 혼합하여 1 ml가 되도록 만들고 대퇴정맥을 통해 정확히 500 μ l가 되도록 투여하였다. 약액을 투여한 후 대퇴동맥에서 0.25, 1, 2, 5, 15, 30, 60, 120분에 혈액을 취하고 120분에 단두하였다. 채취한 혈액을 원심분리하여 얻은 혈장을 chloroform으로 5분간 추출하고 4°C에서 800 g, 10분간 원심분리하여 유기층만을 취하고 freeze dryer에 적용하여 용매를 완전히 날린 후 acetonitrile 100 μ l에 녹여 그 중 50 μ l를 HPLC에 적용하였다. 적출한 뇌는 PB 500 μ l를 넣고 균질화한 후 chloroform으로 5분간 추출하여 유기층만을 취하고 freeze dryer에서 용매를 완전히 날린 후 acetonitrile 200 μ l에 녹여 pore size가 0.2 μ m인 syringe filter를 사용하여 여과하고 그 중 100 μ l를 HPLC에 적용하였다.

HPLC 분석

HPLC 분석은 Shimadzu LC-10AS gradient liquid chromatographic system을 사용하여 UV detector로 280 nm에서 측정하였다. Column은 C18 reverse phase column (CLC-ODS 5 μ m, 4 mm 250 mm)을 사용하였다. HPLC 이동상은 A액과 B액을 각각 0.1% phosphoric acid in water, 0.1% phosphoric acid in acetonitrile로 구성하여 A액과 B액을 각각 4:6의 비율로 하고 flow rate는 1 ml/min로 적용하였다.

Pharmacokinetic parameter 분석

Pharmacokinetic parameter는 각 peak 넓이를 농도로 환산하여 UCLA Health Science Computing Facilities에서 개발한

derivative-free nonlinear regression analysis (PARBMDP, Biomedical Compute P Series)를 이용하여 biexponential equation에 적용하여 계산하였다.

$$A(t) = A_1e^{-k_1t} + A_2e^{-k_2t}$$

여기에서 A(t)는 혈장 중 약물 농도의 %ID/ml이며 ID는 투여량이다.

Data는 $weight=1/(concentration)^2$ 를 이용하였다. 정맥 투여 120분 후 PBN의 뇌의 분포용적(V_D , ml/g)은 투여 후 120분에서의 뇌의 약물농도를 뇌의 무게로 나눈 값을 같은 시간의 종말 혈장 중의 약물농도를 혈장용적으로 나누어서 얻어진 값이다. 전신 혈장 중 클리어런스 (CL), steady-state 분포용적 (V_{dss}), 혈장중 농도-시간 곡선하면적 (area under the plasma concentration-time curve, AUC)과 평균체류시간(mean residence time, MRT)은 Gibaldi와 Perrier의 정의에 따라 A_1 , A_2 , k_1 , k_2 로부터 구하였다.¹⁰⁾

PBN의 뇌투과 고유상수 (permeability-surface area product, PS)는 다음과 같이 계산되었다.

$$PS = \frac{[V_D - V_0]C_p(T)}{\int_0^T C_p(t)dt}$$

$C_p(T)$ = 종말기의 혈장중 농도

V_0 = 혈관내용적 표시체의 장기분포용적

V_D = 뇌에서의 물질의 분포용적

정맥 투여 일정 시간 후에 뇌내로 송달된 약물량은 %ID/g로 나타내어지며 다음과 같이 PS와 AUC로 나타내어진다.

$$\%ID/g(t) = PS \times AUC(t)$$

$$AUC(t) = \int_0^t C_p(t)dt$$

실험결과 및 고찰

Nitron계 항산화제인 PBN의 뇌 투과성을 내경동맥 관류법(ICAP)과 정맥투여법으로 검토하기 위하여 얻어진 대표적인 chromatogram을 Fig. 2에 나타내었다. A, B, C는 각각 실험에 사용한 injectate의 peak, ICAP법으로 PBN을 내경동맥으로 주입한 후 15초에서 적출한 뇌에서 얻은 peak, PBN을 정맥투여한 후 120분에서 적출한 뇌에서 얻은 peak이다. HPLC에 적용한 후 약 4.3분에서 PBN의 peak를 얻을 수 있었다. HPLC chromatogram의 결과를 바탕으로 혈장과 뇌에서의 PBN의 standard dose curve를 작성한 결과 직선 상관계수가 각각 $r^2=0.995$, $r^2=0.963$ 인 회귀직선을 얻을 수 있었고 이 직선을 사용하여 혈장과 뇌 내의 PBN의 농도를 정량하였다.

흰쥐의 대퇴정맥으로 PBN을 투여한 후 120분간의 혈장 중 %ID/ml을 Fig. 3에 나타내었다. PBN은 혈장 중에서 biexponential equation에 따라 소실됨을 알 수 있었다. PARBMDP program을 이용하여 계산된 PBN의 pharmacokinetic parameter는 Table I에 나열하였다. 120분까지의 PBN의 혈장 중 농도 곡선하 면적(AUC)은 45.7 ± 6.2 %ID·min/ml, 혈장 중 전신 클리어런스 (CL)는 6.24 ± 0.81 ml/min/kg, 소실 반감기는 약 57분을 나타내었다. PBN을 대퇴정맥으로 투여한 후 120분에서의 뇌 투과량과 뇌투과 고유상수 (PS)는 Fig. 4에 나타내었다. PBN의 뇌 투과량을 표시하는 %ID/g 값은 0.15 ± 0.01 이었다. ICAP 방법으로 PBN을

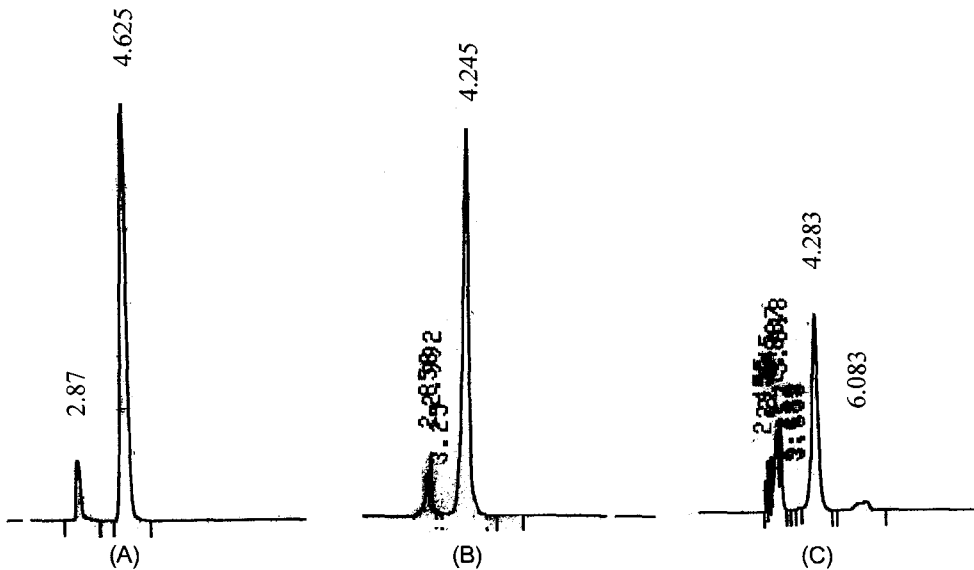


Fig. 2 - Typical chromatograms from HPLC injection of injectate (A), brain extract obtained at 0.25 min after internal carotid artery perfusion (B), brain extract obtained at 120 min after intravenous injection (C) of PBN

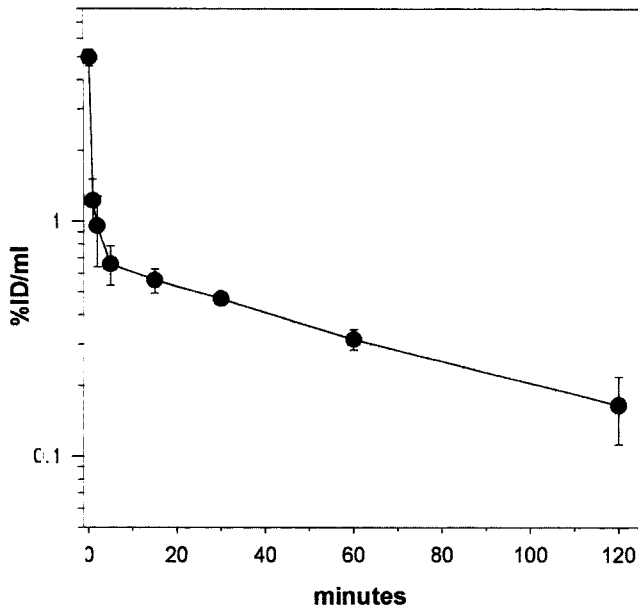


Fig. 3 – Plasma clearance profile of PBN in SD rats after intravenous injection of the injectate for up to 120 min. Data values are means \pm S.E.M. (n=3).

Table I – Pharmacokinetic parameters of PBN obtained with intravenous injection technique in SD rats

parameter	PBN
A_1 (%ID/ml)	9.14 \pm 2.89
A_2 (%ID/ml)	0.67 \pm 0.05
k_1 (min ⁻¹)	2.71 \pm 1.00
k_2 (min ⁻¹)	0.013 \pm 0.001
$t_{1/2}$ (min)	
Distribution	0.39 \pm 0.19
Elimination	57.1 \pm 7.4
AUC ₀₋₁₂₀ (%ID · min/ml)	45.7 \pm 6.2
AUC _t (%ID · min/ml)	59.6 \pm 11.6
V_{dss} (ml/kg)	478 \pm 13
CL _t (ml/min/kg)	6.24 \pm 0.81
MRT (min)	77.5 \pm 10.5

Pharmacokinetic parameters were estimated from plasma profile data up to 120 min in SD rats. Data values are means \pm S.E.M (n=3)

$t_{1/2}$: half time, V_{dss} : volume of distribution at the steady-state
CL_t : plasma clearance, MRT : mean residence time

경동맥이 적용하였을 때 뇌의 분포용적 (V_D)과 뇌투과 고유상수 (PS) 값을 구하여 Table II에 나타내었다. PBN의 뇌 분포용적은 60.0 \pm 12.0 μ l/g이었다.

ICAP법은 흰쥐의 혈류속도인 1.25 ml/min보다 빠른속도인 4 ml/min로 물질을 infusion하여 물질이 혈액의 영향을 받거나 혈관에 축적되는 것을 방지하면서 뇌로 이행시키는 방법이다.⁸⁾ ICAP법으로 PBN의 뇌 이행량을 조사한 결과 혈관 용적 표지자인 sucrose의 뇌 분포용적과 비교하였을 때 약 10배 정도 큰 값을 나

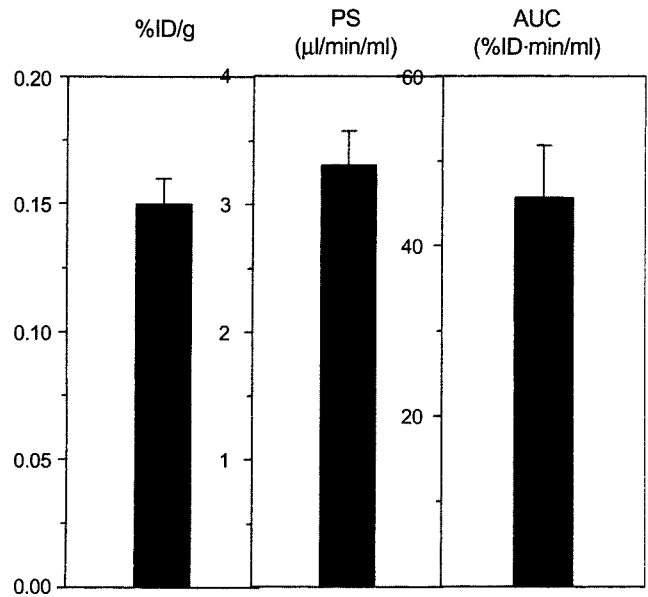


Fig. 4 – The brain delivery amount measured as %ID/g of brain, the blood-brain barrier permeability surface area (PS) product and under the plasma concentration curve at 120 min for PBN. Values are expressed as means \pm S.E.M. (n=3).

Table II – The blood-brain barrier permeability of PBN using ICAP method

brain uptake	PBN
V_D (μ l/g)	60.0 \pm 12.0
PS (μ l/min/g)	240 \pm 48

Brain were perfused for 15 second at rate 4 ml/min by internal carotid artery perfusion method in rats. Data values are means \pm S.E.M. (n=3)

타내었다.¹¹⁾ 분자량이 약 400-600 Da이하인 소분자 약물일 경우 물-옥탄올 분배계수 (log P) 즉, 지용성이 클수록 뇌 투과성 (PS)은 커진다는 논문의 보고가 있다.¹²⁾ 이와 같이 PBN이 뇌 내로 비교적 많은 양이 이행되는 것은 PBN이 분자량이 적고(MW 177), 지용성 (log P 1.23)인 약물이기 때문일 것으로 사료된다.

정맥투여법을 이용하여 PBN의 뇌 이행량을 구했을 때에도 이와 유사한 결과를 나타내었다. *In vivo*에서 정맥투여 후 진통효과를 보이는 morphine의 경우 brain uptake는 약 0.08 %ID/g을 나타내었고¹³⁾ BBB에 존재하는 transferrin receptor를 통해 뇌 내로 이행하는 neutral avidin-OX26 conjugate (NLA-OX26)의 경우에는 약 0.2 %ID/g을 나타내었다.¹⁴⁾ 실험 결과 PBN은 morphine에 비해서는 2배 가량 많은 양이, BBB에 수용체가 존재하는 NLA-OX26와 유사한 정도로 뇌로 이행되는 것을 알 수 있었다. PBN을 정맥투여하고 120분에서의 brain chromatogram을 살펴보면(Fig. 2) 약 6분에서 대사체의 peak를 볼 수 있으며 본 실험에서는 intact한 PBN peak인 4.3분대의 것만을 계산에 사용하였다.

결 론

이상의 결과에서 α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron (PBN)의 뇌 이행량을 정맥투여법과 내경동맥 관류법 (ICAP)의 두 가지 방법으로 살펴본 결과 유의한 뇌 이행량을 나타내었다. 그러므로 PBN은 뇌로 이행하여 free radical에 의해 유도된 여러 뇌신경 질환에 효과를 나타내며, 이를 모델물질로 사용하여 새로운 치료제의 개발이 가능하리라 사료된다.

감사의 말씀

본 연구의 일부는 숙명여자대학교 2002년도 교내 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

문 헌

- 1) Facchinetti F, Dawson V. L. and Dowson T. M. : Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cell. Mol. Neurobiol.* **18**, 667 (1998).
- 2) Knecht K. T. and Mason R. P. : *In vivo* spin trapping of xenobiotic free radical metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 185 (1993).
- 3) Phillis J. and Clough-Helfman C. : Protection from cerebral ischemic injury in gerbils with the spin trap agent α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron (PBN). *Neurosci. Lett.* **116**, 315 (1990).
- 4) Cao X. and Phillis J. : α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron reduced cortical infarct and edema in rats subjected to focal ischemia. *Brain Res.* **644**, 267 (1994).
- 5) Zhao Q., Pahlmark K., Smith M. L. and Siesjo B. K. : Delayed treatment with the spin trap α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol. Scand.* **152**, 349 (1994).
- 6) He Q. P., Smith M. L., Li P. A. and Siesjo B. K. : Necrosis of the substantia nigra, pars reticulata, in flurothyl-induced status epilepticus is ameliorated by spin trap α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron. *Free Radical Biol. Med.* **22**, 917 (1997).
- 7) Edumatsu R., Mori A. and Packer L. : The spin trap α -phenyl-*n*-tert-butyl nitron prolongs the life span of the senescence accelerated mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **211**, 847 (1995).
- 8) Takasato Y., Rapoport S. I. and Smith Q. T. : An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J. Physiol.* **247**, H484 (1984).
- 9) Kang Y.S., Saito Y. and Pardridge W.M. : Pharmacokinetics of [³H]biotin bound to different avidin analogues. *J. Drug Target.* **3**, 159 (1995).
- 10) Gibaldi, M. and Perrier, D. : Pharmacokinetics, Marcel Dekker Inc., New York p. 1 (1982).
- 11) 강영숙, 김유정 : 생쥐에 있어서 약물의 혈액-뇌관문 투과성 평가를 위한 간편한 *in vivo* 방법. *약제학회지* **30**, 99 (2000).
- 12) Levin VA. : Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J. Med. Chem.* **23**, 682 (1982).
- 13) Wu D., Kang Y. S, Bickel U. and Pardridge W. M. : Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine. *Drug Metabol. Distrib.* **25**, 768 (1997).
- 14) Kang Y. S and Pardridge W. M. : Use of neutral avidin improves pharmacokinetics and brain delivery of biotin bound to an avidin-monoclonal antibody conjugate. *J. Pharm. Exp. Ther.* **269**, 344 (1994).