

신규 항암성 화합물 아크리플라빈과 구아노신 복합체를 흰쥐에 근육주사시 아크리플라빈의 체내분포

송석길 · 정연복*

충북대학교 약학대학 국가지정연구실

(Received May 9, 2005; Revised May 25, 2005)

Distribution of Acriflavine in Rats Following Intramuscular Administration of a Mixture of Acriflavine and Guanosine, a Potential Antitumor Agent

Sukgil Song and Youn Bok Chung*

National Research Laboratory (NRL), College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Abstract — A 1 : 1 mixture of acriflavine (ACF; CAS 8063-24-9) and guanosine is currently being evaluated as a possible antitumor agent in preclinical studies. Guanosine is known to potentiate the anticancer activity of some compounds. However, the distributions of trypaflavine (TRF) or proflavine (PRF) have not been investigated in mammals. We, therefore, investigated the distribution of TRF and PRF after i.m. administration of the combination mixture (ACF and guanosine) at a dose of 30 mg/kg ACF in rats. To analyze TRF and PRF levels in biological samples, we used an HPLC-based method. The calibration curves for TRF and PRF in the samples were linear over the concentration range of 0.05~200 µg/ml. The intra- and inter-day assay accuracies of this method were within ±15% of nominal values and the precision did not exceed 15% of relative standard deviation. The lower limits of quantitation were 50 ng/ml for both TRF and PRF. The distribution of TRF or PRF was determined by 48 h after i.m. administration of the combination mixture at a dose of 30 mg/kg ACF. TRF and PRF were distributed as the following order; kidney>lung>liver>small intestine>muscle. Of the various tissues, TRF and PRF were mainly distributed to the kidney and lung. The concentrations of TRF or PRF in the tissues 24 h after i.m. administration decreased to undetectable levels. The concentrations of TRF or PRF in the blood cells were comparable to those for the plasma. However, the concentrations of TRF or PRF in the both plasma and blood cells 12 h after i.m. administration were not detected. The number of the platelets in the 1 ml of the blood was calculated to be 0.183×10^8 /ml of blood. The PRF concentration in platelets was higher than that of TRF at initial times after i.m. administration of the combination mixture. However, both the TRF and PRF concentrations in the platelets 24 h after i.m. administration of the combination mixture were below the quantifiable limit. In conclusion, the concentrations of TRF or PRF in the various tissues, plasma, blood cells, and platelets decreased to undetectable levels 24 h after i.m. administration of the combination mixture at a dose of 30 mg/kg ACF.

Keywords □ acriflavine, trypaflavine, proflavine, distribution, blood cells, platelets

아크리플라빈(acriflavine, ACF)은 아크리딘 유도체인 3,6-diamino-10-methyl acridinium chloride(trypaflavine, TRF)와 3,6-diamino acridine(proflavine, PRF)의 2:1 복합체로서 황갈색 분말이다. 아크리플라빈은 약한 염기성이며 그 수용액은 강한 형광을 나타낸다.^{1,2)} ACF의 항 트리파노조마 작용이 확인 되었으며,³⁾ 화농성 질환에 외용 또는 정맥주사로서 이용되어 왔다.^{4,5)}

ACF는 조혈기구나 간장 등에 대한 장애는 나타내지 않는다고 보고되고 있다.^{6,7)}

ACF는 원충을 포함한 미생물의 발육을 억제한다.^{8,9)} 그 기전으로는 DNA topology 조절을 제어하는 것으로 보고되고 있다.⁸⁾ ACF는 바이러스, 박테리아에서 돌연변이에 의한 살균효과를 나타내며 항 바이러스 작용을 갖는다. ACF는 간세포에서 DNA의 합성을 현저히 감소시킨다.¹⁰⁾ 또, ACF는 ribose에 손상을 일으켜 이를 비대하게 만들거나 핵인 내의 r-RNA 합성을 저하시켜 ribose 생성을 감소시킨다.³⁾ ACF는 단백질합성을 억제하는 것으로도 나타났다.³⁾ Ca⁺² 채널저해제가 multi-drug resistance 세포

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-261-2824 (팩스) 043-274-0752
(E-mail) chungyb@chungbuk.ac.kr

주에 대한 항암효과를 증가시키는 것으로 알려져 있는데,¹¹⁾ ACF와 Ca^{2+} 이 경쟁적으로 작용하는 경우 항암제에 내성이 생긴 암세포주에 좋은 효과를 나타낼 가능성이 높다. ACF에 의하여 종양세포의 표면항원 변화과정이 촉진되는 것으로 보고된 바 있다.¹²⁻¹⁶⁾

인체의 혈소판에 존재하는 40 kD 단백질의 phosphorylation 과정도 ACF를 포함한 아크리딘류의 화합물에 의하여 억제된다.¹⁷⁾ ACF는 혈소판내에 선택적으로 축적된다.¹⁷⁾ 이는 ACF에 존재하는 아민기에 의한 특이적인 현상으로 추정된다. 구조 활성의 상관성 연구에 따르면 아민기를 갖지 않는 아크리딘 화합물은 proteine kinase C(PKC)의 활성을 억제하지 못하는 것으로 나타났다.¹⁸⁾ 이에 비해 ACF는 세포막과 결합할 때 PKC 활성의 억제가 일어나며 ACF의 항암효과는 이 PKC의 억제에 기인한다고 추정된다.¹⁸⁾ ACF 및 PRF 등의 아크리딘유도체들은 L1210 백혈병 세포에 대한 항암활성을 갖는다.¹⁹⁾ PRF는 유리 아민기로 인하여 세포독성이 높아 RNA와 단백질 합성을 저해할 가능성이 높다고 알려져 있다.²⁰⁾ 이처럼, ACF는 항진균작용 및 항바이러스작용이 우수한 것으로 보고되고 있으나 항생제의 출현으로 그 사용이 감소되어 현재에는 외용제 등으로 사용되고 있다. 또한 항암작용에 대해서는 많은 보고가 있을 뿐 실용화되지는 않았다.

구아노신(guanosine)을 다른 항암제와 병용투여시 항암작용을 상승시킨다고 보고되고 있다.²¹⁻²⁸⁾ 즉 5-fluorouracil 등과 구아노신을 병용하면 항암효과가 상승적으로 증진된다. 구아노신에 의한 항암효과 증진은 구아노신에서 나온 ribose-1-phosphate에 의한 uridinecytidine kinase와 pyrimidine phosphorylase 같은 효소의 증가가 일부 기여하는 것으로 추측되고 있다. 그러나 구아노신단독으로 투여될 경우 세포독성 작용이 미약하고, 항암효과는 보고되고 있지 않다.

최근, ACF와 구아노신의 1:1 복합체가 ACF 단독보다 항암효과가 우수하다는 사실이 밝혀졌다. 그러나, 현재까지 ACF에 대한 체내분포에 관한 보고는 없다. 따라서 이 연구에서는 ACF의 체내분포를 검토하고자 하였다. 즉, ACF와 구아노신의 1:1 복합체를 흰쥐에 근육주사한 후 ACF의 각 조직으로의 분포성을 측정 하였다. 한편, ACF는 혈소판내에 선택적으로 축적된다고 알려져 있으므로, 혈소판 관련 부작용을 일으킬 수 있다. 따라서, ACF와 구아노신의 1:1 복합체를 흰쥐에 근육주사한 후 혈액을 혈장, 혈구 및 혈소판으로 분류하여 각각으로의 ACF 분포성을 측정하였다.

실험 방법

시약 및 기기

본 실험에는 다음과 같은 시약을 사용하였다. 아크리플라빈(acriflavine, ACF), 3,6-diamino-10-methyl acridinium chloride

(trypaflavine, TRF) 및 3,6-diamino acridine(proflavine, TRF)는 태림제약주식회사(서울시, 대한민국)에서 구입하였으며, 아세토니트릴(ACN) 및 메탄올(MeOH)은 Fisher Scientific Co. (Pittsburgh, U.S.A.)에서 구입하였다. Phosphoric acid 및 diethyl ether는 Shinyo Pure Chemical Co.(Osaka, Japan)에서, acetic acid는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 기타 시약은 모두 HPLC급 또는 특급을 사용하였다.

기기로써 HPLC(Model PU-980 펌프, UV-975 UV/VIS 검출기, LC-Net II control borwin 기록계, AS-950-10 자동주입기)는 Jasco Co.(Tokyo, Japan)의 기기를 사용하였다. pH 미터(Model 520A)는 Orion Research Inc.(Beverly, U.S.A.), 냉동원심분리기(Model CS-6KR)는 Hitachi Co.(Tokyo, Japan), 탁상용원심분리기(Model Microfuge E)는 Beckman Industries(Fullerton CA, Germany), 냉동고(Model MDF-U50V)는 Sanyo Co.(Osaka, Japan), 진탕기(Model Muti-Pulse)는 Glas-Col Co.(Terre Haute, U.S.A.), 초음파기(Model JAC Ultrasonic 2010)는 Jinwoo Co.(화성시, 대한민국), 호모게나이저(Model Ultra-Turrax T25 basic)는 Ika Werke GmbH & Co.(Staufen, Germany)의 기기를 사용하였다.

실험동물

실험동물로는 숫흰쥐(200~250 g)를 삼육동물센터(경기도, 안성)로부터 구입하여 약학대학 동물사육장에서 항온, 항습 조건하에서 일정기간 사육한 후 사용하였다.

TRF 및 PRF의 HPLC 분석조건

ACF의 구성 화합물인 proflavin(PRF) 및 triapaflavine(TRF)의 분석 조건은 다음과 같다. HPLC 칼럼은 Capcell Pak C_{18} 컬럼(4.6×250 mm, 5 μ m, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 이동상 용매는 0.1% triethylamine 수용액 830 ml를 인산으로 pH 2.2가 되도록 조정된 후 아세토니트릴 170 ml와 혼합하여 사용하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 하였고, UV-검출기 파장은 262 nm에 고정하였다.

특이성 평가를 위하여, 검체를 처리하여 TRF 및 PRF를 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램에서 약물 및 내부표준물질 피크의 유지시간을 확인하고, 분석조건에서 약물 및 내부표준물질(I.S.)이 기타 혈청 성분들과 잘 분리되는가를 평가하였다. 직선성 평가를 위해서는 TRF 및 PRF 0.05~100 μ g/ml의 농도범위에서 조직균질액, 혈장, 혈구 및 혈소판 시료 각각에 대해서, blank 시료, 표준액과 내부표준물질을 spike 한 혈청시료를 처리하여 분석하였을 때, 혈청 시료로부터 구한 약물 검량선의 계산식으로부터 직선성(n=5)을 평가하였다.

정밀성은 TRF 및 PRF와 내부표준물질의 피크면적비의 표준편차를 TRF 또는 PRF와 내부표준물질의 피크면적비의 평균값

으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 하루에 5번 시행하여 일내 정밀성(%CV)을 구하고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성(%CV)을 구하였다. 정확성(n=5)은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 감도(정량 한계; n=5)는 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 3으로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 농도로 구하였다. 이로부터 조직균질액, 혈장, 혈구 및 혈소판 중 TRF 및 PRF에 대한 본 분석법이 실험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있는가를 평가하였다.

ACF와 구아노신의 1:1 복합체를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 조직분포 실험

흰쥐를 에테르 가볍게 마취시킨 후 수술대에 고정하였다. 흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 ACF와 구아노신 1:1 복합체를 근육주사(ACF로서 30 mg/kg)한 후 일정시간이 경과하였을 때, 흰쥐의 경동맥으로부터 전혈을 탈혈시켜 안락사시켰다. 즉시 개복하여 다음의 주요 조직 및 장기들을 절취하였다. 즉 간장, 신장, 폐, 소장, 근육을 차레대로 적출하였다. 조직적출 시간은 근육주사 후 체내축적성을 검토하기 위해 1, 3, 6, 12, 24, 48시간으로 하였다. 조직을 적출한 후에는 0°C 생리식염수로 세척하여 표면에 존재하는 혈액을 제거하였다. 적출한 각 조직을 pH 7.4 등장 인산염완충액으로 25% 균질액으로 한 후 정량에 사용하였다.

시료중 ACR의 두 구성성분인 TRF 및 PRF의 정량을 위하여 0.05~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도범위에서 양호한 직선관계가 성립되는 검량선을 작성하였다. 균질액 시료 50 μl 에 9-aminoacridine 25 μl (내부표준물질 0.1 μg 함유)를 첨가하여 가볍게 진탕시킨 후 1% acetic acid-MeOH 2.5 ml로 추출, 원심분리(3,000 rpm, 15분)하였다. 상정액 2 ml를 취하여 질소기류하에서 증발시킨 다음 이동상 100 μl 를 가하여 용해시킨 후 25 μl 를 HPLC에 주입하였다.

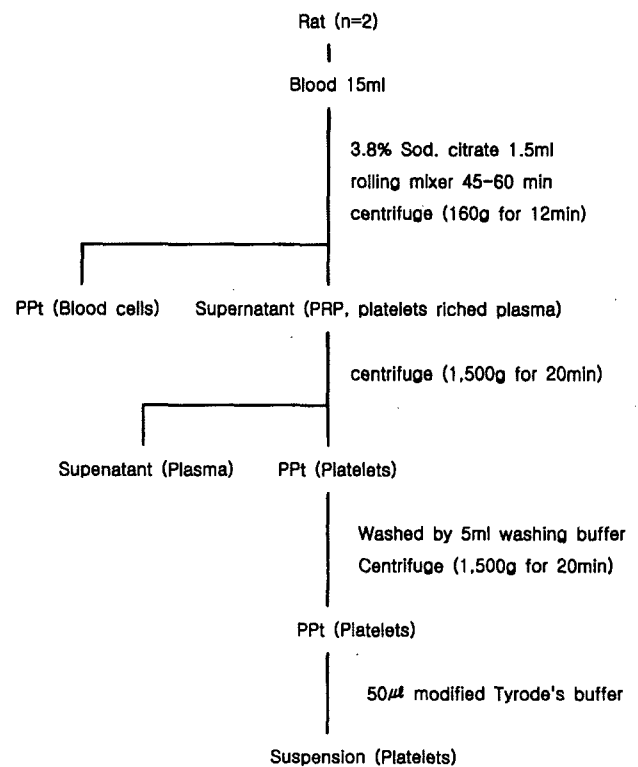
ACF와 구아노신의 1:1 복합체를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 혈장, 혈구 및 혈소판 분포 실험

흰쥐를 에테르 가볍게 마취시킨 후 수술대에 고정하였다. 흰쥐가 마취로부터 회복된 후에 ACF와 구아노신 1:1 복합체를 근육주사(ACF로서 30 mg/kg)한 후 일정시간이 경과하였을 때, 경동맥에 폴리에틸렌튜브(PE-50, Intramedic, Clay Adams, U.S.A)를 삽관한 후 전혈을 채취하였다. 혈액채취 시간은 복합체의 근육주사 후 체내축적성을 검토하기 위해 1, 3, 6, 12, 24, 48 시간으로 하였다. 혈액중 혈소판을 분리하기 위하여 2마리의 흰쥐로부터 15 ml의 혈액(흰쥐 1마리당 7.5 ml)을 채취하였다. 즉, 15 ml의 혈액을 사용하여 다음의 washed platelets 제조방법²⁴⁾에 따라 혈액을 혈장, 혈구 및 혈소판으로 각각 분리하여 각각 PRF 및 TRF의 농도를 분석하여 각각의 분포성을 측정하였다.

Washed platelets 제조

흰쥐 2마리로부터 혈액 15 ml를 미리 항응고제인 sodium citrate(3.8%) 1.5 ml이 들어 있는 cornical tube로 채혈하였다. 채취한 혈액을 rolling mixer에서 45분간 방치한 후 상온에서 160 g (770 rpm)에서 12분간 원심분리하였다. 상정액은 혈소판을 함유한 혈장(PRF, platelets riched plasma), 침전물은 혈구(적혈구 및 백혈구)로 분리된다.²⁴⁾ 따라서, 상정액을 조심스럽게 취해 1,500 g (2,000 rpm)에서 20분간 원심분리하면, 상정액은 혈장, 침전물은 혈소판으로 분리된다. 상정액(혈장) 일정량을 분석을 위하여 취하고 나머지 혈장을 제거한 후, 침전물(혈소판)을 다음과 같이 세척하였다. 즉, 2 mM EDTA를 포함한 washing buffer(129 mM NaCl, 0.8 mM KH_2PO_4 , 8.9 mM NaHCO_3 , 2.8 mM KCl, 0.8 mM MgCl_2 , 5.6 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) 5 ml를 가한 후 조심스럽게 현탁시켜 1,500 g(2,000 rpm)에서 20분간 다시 한번 원심분리하여 세척하였다. 상정액을 제거한 후 최종 침전물인 혈소판을 얻어 0.35% BSA가 함유된 modified Tyrode's buffer(129 mM NaCl, 0.8 mM KH_2PO_4 , 8.9 mM NaHCO_3 , 2.8 mM KCl, 0.8 mM MgCl_2 , 5.6 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) 일정량(50 μl)에 현탁시킨 후 정량에 사용하였다(Scheme I).

혈소판 최종 현탁액 일정량을 취하여 Coulter counter(model: Z1, Coulter Electronics Ltd., Luton, UK)로 혈소판 개수를 측정하였으며, 이로부터 흰쥐의 혈액 1 ml당 혈소판 개수 및 혈소



Scheme I - Procedure of the preparation of washed platelets.

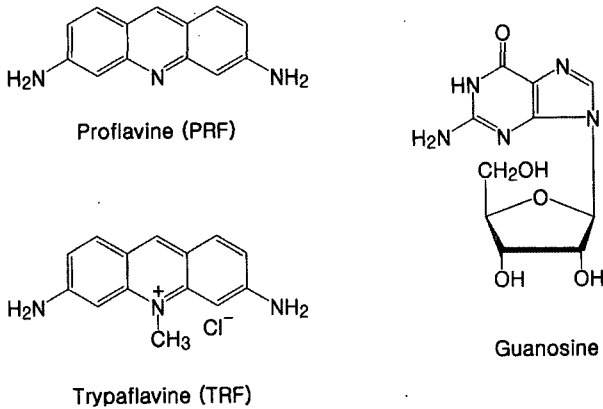


Fig. 1 - Structure formula of trypaflavine (TRF) and proflavine (PRF), and guanosine. The combination mixture consists of acriflavine (ACF; 2:1 mixture of TRF and PRF) and guanosine at a ratio of 1:1.

판 개수당 PRF 및 TRF의 분포량을 산출하였다.

혈장, 혈구 및 혈소판 시료중 ACR의 두 구성성분인 TRF 및 PRF의 정량은 상기의 조직분포 실험항과 같은 방법으로 하였다. 즉, 각 시료(혈장 50 μ l, 혈구 50 mg, 혈소판시료 50 μ l)에 9-aminoacridine 25 μ l(내부표준물질 0.1 μ g 함유)를 첨가하여 가볍게 진탕시킨 후 1% acetic acid-MeOH 2.5 μ l로 추출, 원심분리(3,000 rpm, 15분)하였다. 상정액 2 ml를 취하여 질소기류하에서 증발시킨 다음 이동상 100 μ l를 가하여 용해시킨 후 25 μ l를 HPLC에 주입하였다.

결과 및 고찰

TRF 및 PRF의 HPLC 분석

포유류의 생체시료중 ACR의 구성 화합물인 TRF 및 PRF의 정량에 관한 보고는 없다. 따라서 이 연구에서는 저자 등이 확립하여 검증이 완료된 방법(unpublished data)으로 흰쥐의 혈장, 혈구, 혈소판 및 조직중 TRF 및 PRF의 농도를 분석하였다. 즉, 혈장 및 조직중의 TRF 및 PRF는 1% 초산 함유 메탄올로 추출한 후 농축하여 HPLC에 주입하였다. 실험방법항의 HPLC 분석조건에서 정량하였을 때 혈장에서의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 혈장에서 PRF 및 TRF는 각각 유지시간이 17.3 \pm 0.2 및 19.3 \pm 0.3분으로 재현성 있게 분리되었으며 정량한계는 0.05 μ g/ml이었다. 혈장에서의 TRF 및 PRF의 검량선은 각각 피크면적비=(1.457 \times 농도(μ g/ml)+0.00671) 및 피크면적비=(1.481 \times 농도(μ g/ml)+0.00734)이었다. 각각 농도 0.05~200 μ g/ml 범위에서 양호한 직선성($r>0.999$, $p<0.01$)을 나타내었다. 또한, 이 농도 범위에서 TRF 및 PRF의 일내 및 일간 정확성과 정밀성 편차(coefficient variance(c.v.), %)는 모두 15% 이하로 나타났다. 혈구, 혈소판 및 조직 균질액에서의 검량선은 혈장의 검량선과 유

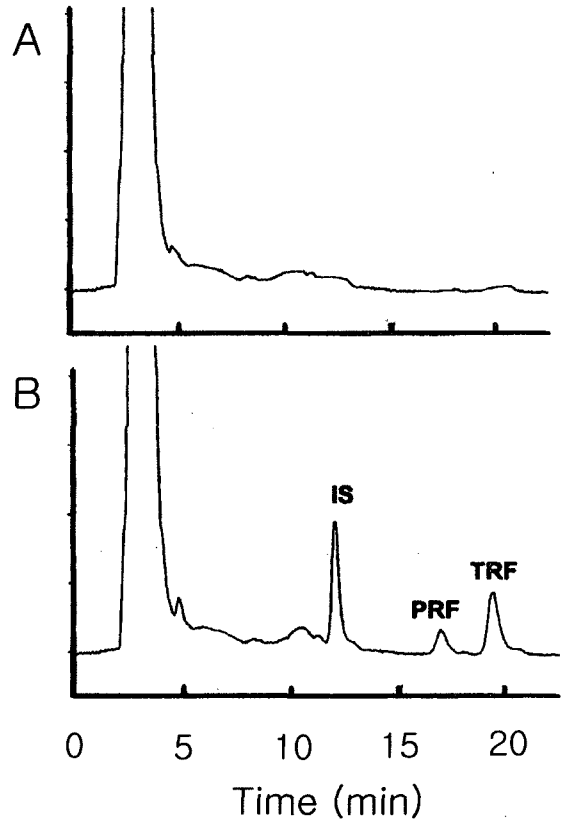


Fig. 2 - Representative chromatograms of TRF and PRF in plasma. 9-Aminoacridine (25 μ l of 4 μ g/ml) was added as an internal standard (IS). Upper panel (a) represents a chromatogram of blank samples, while the lower panel (b) represents a chromatogram of biological samples after the administration of the combination mixture (ACF and guanosine). The blank samples show that there are no peaks that interfere with the TRF, PRF, and IS signals.

의한 차이를 보이지 않았으며, 각각 농도 0.05~200 μ g/ml 범위에서 양호한 직선성($r>0.999$, $p<0.01$)을 나타내었고 TRF 및 PRF의 일내 및 일간 정확성과 정밀성 편차(coefficient variance (c.v.), %)도 모두 15% 이하이었다. 따라서, 이 실험에서 사용한 TRF 및 PRF의 HPLC 분석법은 충분한 특이성, 직선성, 감도, 정확성 및 정밀성이 있음을 알 수 있었다. TRF 및 PRF의 혈장에서의 추출률은 모두 95% 이상을 나타내었다.

ACF와 구아노신의 1:1 복합체를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 조직분포

ACF와 구아노신 1:1 복합체(ACF로서 30 mg/kg)를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 각 조직 분포량-시간 패턴을 Fig. 3에 나타내었다. ACF의 근육주사 후 TRF 및 PRF의 체내분포성을 측정하기 위하여 혈장중 농도, 담즙배설 및 요중배설을 우선 검토하였다. TRF 및 PRF의 담즙배설은 12시간까지, 요중배설은 24시간까지 지속됨을 확인하였다. 따라서, 본 연구에서는 TRF 및

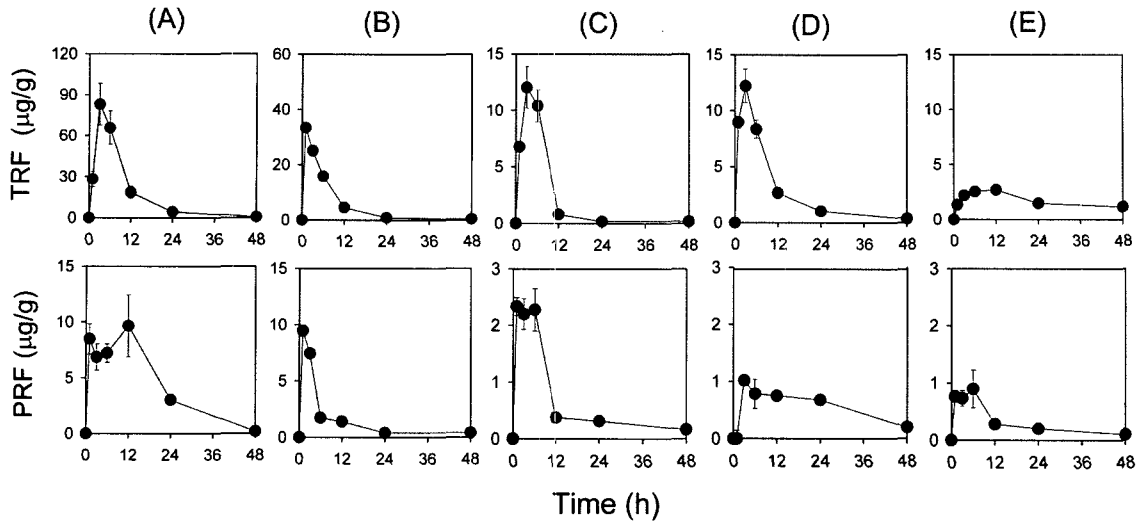


Fig. 3 – Concentration-time profiles of TRF and PRF in the kidney (A), lung (B), liver (C), small intestine (D), and muscle (E) after i.m. administration of the combination mixture (ACF and guanosine) at a dose of 30 mg/kg ACF. Each point represents the Mean±S.E. (n=3).

PRF의 체내분포를 근육주사 후 48시간까지 측정하였다.

TRF 및 PRF의 분포성은 신장>폐>간장>소장>근육의 순서로 나타났으며, 특히 신장 및 폐로의 분포가 높았다. TRF는 투여량이 PRF에 비해 2배 높은 것을 고려하더라도 PRF에 비해 높은 조직중 농도를 보였다. 한편, 혈장중 농도는 6시간 이후에는 검출되지 않았다. ACF와 구아노신 1:1 복합체(ACF로서 30 mg/kg)를 근육주사한 후 최대 혈장중농도(C_{max})는 1분대(t_{max})에서 PRF 및 TRF 모두 약 2.6~2.7 µg/ml이었다. Fig. 3에 나타낸 조직중 농도-시간 그래프를 보면, TRF의 경우 근육주사 후 6시간까지 높은 값을 보이나, 24시간 이후에는 최대 혈장중 농도(C_{max}) 이하로 감소함을 알 수 있다. PRF의 경우에는 TRF와 비슷한 양상을 보였으나, TRF에 비해 낮은 조직중 농도를 보였다. 이상을 종합하면, PRF 및 TRF는 조직으로의 이행성이 매우 높으나, 24시간 이후에는 체내에서 소실되는 것으로 추정된다.

ACF와 구아노신의 1:1 복합체를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 혈장 및 혈구 농도

ACF와 구아노신 1:1 복합체(ACF로서 30 mg/kg)를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 혈장중 농도-시간 곡선 및 혈구 농도-시간 곡선을 Fig. 4에 나타내었다. 복합체 근육주사시 TRF 및 PRF의 AUC는 정맥주사시의 AUC값을 용량으로 환산한 값에 비해 약 0.7~0.9배 정도로 나타났다. 즉, 절대생체이용률(ABA%)이 약 70~90%이었다(unpublished data). 또한, 정맥주사의 결과에 비해 근육주사시 높은 혈장중 농도를 장시간 유지하며 생체이용률이 비교적 높은 사실은 복합체의 투여경로로서 정맥주사보다 근육주사가 보다 유리하다는 것을 나타내 주고 있다. 따라서, 본 연구에서는 복합체의 근육주사 후 체내분포성을 측정하였다.

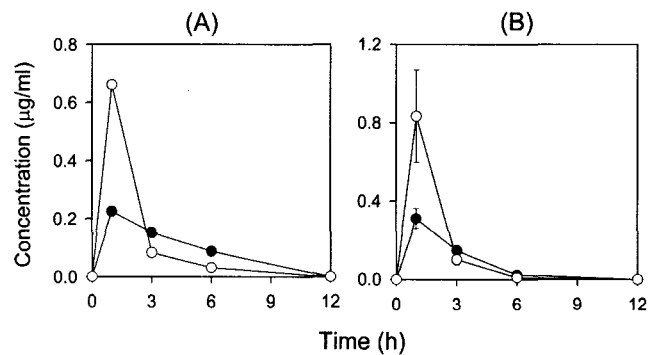


Fig. 4 – Concentration-time profiles of TRF or PRF in the plasma (A) and blood cells (B) after i.m. administration of the combination mixture (ACF and guanosine) at a dose of 30 mg/kg ACF. Each point represents the Mean±S.E. (n=3).

주요 조직 및 혈소판 분포성을 측정하기 위한 시간대인 48시간까지의 혈장 및 혈구농도를 측정하였다(Fig. 5). 혈장 및 혈구중의 PRF 및 TRF의 농도는 12시간 이후에는 검출되지 않았다. ACF와 구아노신 1:1 복합체(ACF로서 30 mg/kg)를 근육주사한 후 TRF 및 PRF는 혈구로의 분포성이 높았으며, 혈구중 약물농도는 혈장 농도와 유사한 값을 보였다.

ACF와 구아노신의 1:1 복합체를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 혈소판 분포

ACF와 구아노신 1:1 복합체(ACF로서 30 mg/kg)를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 혈소판 농도-시간 곡선을 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5(A)는 혈액 1ml로부터 얻은 혈소판중의 TRF 및 PRF의 양을 나타내었다. 한편, 혈소판 최종시료를 Coulter

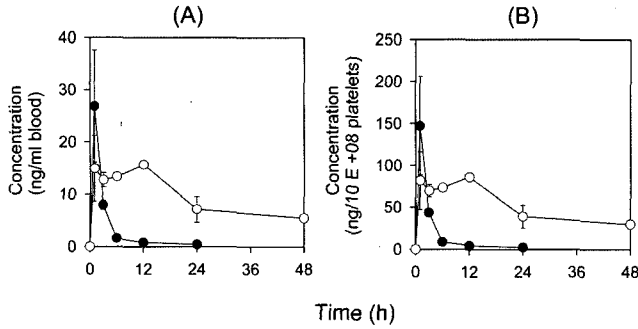


Fig. 5 - Concentration-time profiles of TRF or PRF in the platelets after i.m. administration of the combination mixture (ACF and guanosine) at a dose of 30 mg/kg ACF. Each point represents the Mean±S.E. (n=3). (A) TRF or PRF in the platelets obtained from 1 ml of blood; (B) TRF or PRF in the 10⁸ platelets.

counter로 측정된 결과, 혈액 1 ml 중에는 0.183×10⁸개의 혈소판이 존재하는 것으로 계산되었다. 이를 토대로, 혈소판 1.0×10⁸개수당 TRF 및 PRF의 양을 Fig. 5(B)에 나타내었다.

복합체 근육주사 후 1시간대에서 PRF는 TRF에 비해 약 2배 정도의 높은 혈소판 농도를 보였으나, 이후 급격히 감소되어 24시간이후에는 검출되지 않았다. 이에 비해 TRF의 혈소판 농도는 초기시간대에서는 PRF에 비해 낮았으나 48시간까지 지속적인 경향을 나타내었다.

결 론

흰쥐의 혈장, 혈구, 혈소판 및 조직중 TRF 및 PRF의 분석법의 정량한계는 0.05 µg/ml이었으며, 이 실험에서 사용한 TRF 및 PRF의 HPLC 분석법은 각각 0.05~200 µg/ml 농도 범위에서 충분한 특이성, 직선성, 감도, 정확성 및 정밀성이 있음을 알 수 있었다.

ACF와 구아노신 1:1 복합체(ACF로서 30 mg/kg)를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 주요 장기 및 조직중 농도를 48시간까지 측정하여 분포성 및 축적성을 검토하였다. TRF 및 PRF의 분포성은 신장>폐>간장>소장>근육의 순서로 나타났으며, 특히 신장 및 폐로의 분포가 높았다. TRF는 투여량이 PRF에 비해 2배 높은 것을 고려하더라도 PRF에 비해 높은 조직중 농도를 보였다. PRF 및 TRF는 조직으로의 이행성이 매우 높으나, 24시간 이후에는 체내에서 소실되었다.

ACF와 구아노신 1:1 복합체(ACF로서 30 mg/kg)를 근육주사한 후 TRF 및 PRF의 혈장 및 혈구중 농도는 12시간 이후에는 검출되지 않았다. 또한, 혈구중 약물농도는 혈장 농도와 유사한 값을 보였다. ACF와 구아노신 1:1 복합체(ACF로서 30 mg/kg)를 근육주사한 후 혈액 1 ml 중에는 0.183×10⁸개의 혈소판이 존재한다고 계산되었다. 근육주사 후 1시간대에서 PRF는 TRF에

비해 약 2배 정도의 높은 혈소판 농도를 보였으나, 이후 급격히 감소되어 24시간 이후에는 검출되지 않았다. 이에 비해 TRF의 혈소판 농도는 48시간까지 지속적인 경향을 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 지원 국가지정연구실사업(National Research Lab. Program)의 연구과제(#M1-0302-00-0069)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Macadam, R. F. and Williamson, J. : Drug effects on the fine structure of Trypanosoma rhodesienses: acriflavine, ethidium and antrycide. *Annal. Tropic. Med. Parasitol.* **68**, 291 (1974).
- 2) Canellakis, E. S. and Chen, T.-K. : Relationship of biochemical drug effects to their antitumor activity-I. *Biochem. Pharmacol.* **28**, 1971 (1979).
- 3) Boss, S., Gothoskar, B. P. and Ranadive, K. J. : Studies of biological macromolecules: II. Effect of acriflavine exposure on the synthesis of macromolecules in liver cells *in vivo*. *Experimental Cell Res.* **42**, 89 (1966).
- 4) Borisova, O. F., Shchyolkna, N. K. and Tchurikov, N. A. : Relative stability of AT and GC pairs in pararell DNA duple x formed by a natural sequence. *FEBS Letter* **322**, 304 (1993).
- 5) Wadler, S. and Wiernik, P. H. : Partial reversal of doxorubicin resistance by forskolin and 1,9-dideoxyforskolin in murine sacoma S180 variants. *Cancer Res.* **48**, 539 (1988).
- 6) Chakraborty, N. G., Bose, S. R. and Joy Chowdhury, J. R. : Acriflavine-induced surface changes in three tumor cell types and differential sensitivity to lectins. *Tumori* **70**, 127 (1984).
- 7) Chakraborty, N. G., Boss, S. R. and Joy Chowdhury, J. R. : Enhancement of immunogenisity of tumor cells by modification of cell surface with acridine dyes. *Indian J. Experi. Biol.* **18**, 927 (1980).
- 8) Chakraborty, N. G. and Boss, S. R. : Protective immunity by chemically modified tumor cell antigens extracted by 3 M KCl. *Neoplasma* **34**, 427 (1987).
- 9) Roth, D., London, M. and Manjon, M. : Binding specificity and affinity of acriflavine for nucleic acids. *Stain Tech.* **42**, 125 (1967).
- 10) Ferey, L., Herlin, P., Marnay, J., Mandard, A.-M., Catania, R., Lubet, P., Lande, R. and Bloyet, D. : Pararosanilline or acriflavine-schiff staining of epoxy embedded tissue periodic acid oxidation in ethanol: a method suitable for morphometric and fluorometric analysis of glycogen. *Stain Tech.* **61**, 107 (1986).
- 11) Wuthrich, C., Deranleau, D. A., Eubler, D. and Luscher, E. F. :

- Human blood platelet secretions: optical multichannel analyser measurements using acriflavine as a release indicator. *Biochemistry* **23**, 1224 (1984).
- 12) Hannun, Y. A. and Bell, R. M. : Aminoacridines, Potent inhibitors of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **263**, 5124 (1988)
 - 13) Kimura, M., Okabayashi, I. and Kato, A. : Acridine derivatives. III. Preparation and antitumor activity of the novel acridinyl-substituted uracils. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 697 (1989).
 - 14) Scholtissek, C. and Becht, H. : Action of acridine on RNA and protein synthesis and on active transport in chick embryo cells. *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 585 (1966).
 - 15) Iigo, M. and Hoshi, A. : Effect of guanosine on antitumor activity of fluoinated pyrimidines against P388 leukemia. *Cancer Chemotherapy Pharmacol.* **13**, 86 (1984).
 - 16) Iigo, M. and Hoshi, A. : Influence of molar ratio on the combination effect of 5-fluorouracil with guanosine 5'-monophosphate on P388 and L1210 leukemias. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol* **20**, 411 (1984).
 - 17) Iigo, M. and Hoshi, A. : Potentiation of antitumor activity of 5-fluoro-2'-deoxyuridine by guanosine 5'-monophosphate. *J. Pharm. Dyn.* **7**, 67 (1984).
 - 18) Iigo, M., Kuretani, K. and Hoshi, A. : Relationship between antitumor effect and metabolites of 5-fluorouracil in combination treatment with 5-fluorouracil in ascites sarcoma 180 tumour system. *Cancer Res.* **43**, 67 (1983).
 - 19) Iigo, M., Miwa, M., Ishtsuka, H. and Nitta, K. : Potentiation of the chemotherapeutic action of 5'-deoxy-fluorouridine in combination with guanosine and related compounds. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **19**, 61 (1987).
 - 20) Iigo, M., Nakajima, Y., Kuretani, K. and Hoshi, A. : Potentiation of the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil by combination with guanosine 5'-monophosphate. *Gann* **74**, 291 (1983).
 - 21) Osswald H. and Yussef, M. : Potentiation of the chemotherapeutic action of 5-fluorouracil by combination with cytidine or guanosine on HRS-Sacoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol* **93**, 241 (1979).
 - 22) Santelli, G. and Valeriote, F. : *In vivo* enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity to AKR leukemia cells by thymidine in mice. *J. Natl., Cancer Inst.* **61**, 843 (1978).
 - 23) Goodman, M. G. Weigle, W. O. : Manifold amplification of *in vivo* immunity in normal and immunodeficient mice by ribonucleosides derivatized at C8 of guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3452 (1983).
 - 24) Choi, S. Y., Kim, M. H., Lee, S. H., Jung, Y. S., Baik, E. J., Ryu, C. K. and Moon, C. H. : Antiplatelet action of 2-bromo-3-(3,5-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-1,4-naphthalenedione (TPN2). *J. Applied Pharmacol.* **7**, 227 (1999).