

신경작용제 사린 및 소만 중독에 대한 기니픽에서의 예방패치의 해독 및 뇌보호 효능

송 영 조^{*,1)}

¹⁾ 국방과학연구소 제4기술연구본부

Antidotal and Neuroprotective Efficacies of a Prophylactic Patch against Sarin and Soman Poisonings in Guinea Pigs

Youngjo Song^{*,1)}

¹⁾ The 4th Research and Development Institute, Agency for Defense Development, Korea

(Received 8 September 2020 / Revised 18 January 2021 / Accepted 22 January 2021)

Abstract

This study was designed to evaluate the prophylactic efficacy of a combinational patch system containing physostigmine and procyclidine against sarin and soman using guinea pig. The median lethal dose values of two nerve agents were calculated by a probit analysis of deaths occurring within 24 h. In this study, the values of median lethal dose of sarin and soman were determined to be 33.0 and 26.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in guinea-pigs, respectively. The guinea pigs treated with a prophylactic patch(4×5 cm²) for 24 h were 100 % protected against a challenge of 1.5 LD₅₀. The combinational KMARK-1(atropine and 2-PAM) and prophylactic patch were more effective than a single KMARK-1, a combination of pyridostigmine and KMARK-1 significantly. Epileptiform seizures in the guinea pigs treated with the combinational antidotes led to neuropathological changes, in comparison with intact feature of brain of the animal treated with the patch.

Key Words : Guinea Pig(기니픽), Prophylactic Patch(예방패치), LD₅₀(반수치사량), Neuroprotection(뇌보호), Soman(소만), Sarin(사린)

1. 서 론

신경작용제는 조직에서 Acetylcholinesterase(AChE)를

비가역적으로 저해하여 과 분비, 근섬유다발수축, 진전, 경련, 호흡곤란, 간질 발작과 같은 중독 증상을 일으키고 뇌손상 및 사망에 이르게 한다^{1,2)}. 신경작용제 중독에 대한 치료로 atropine과 같은 콜린성 약물은 무스카린 수용체를 차단하여 AChE의 억제로 인해 상승된 ACh의 효과를 길항하기 위해 투여되고, pyridine-2-

* Corresponding author, E-mail: yj_song@add.re.kr
Copyright © The Korea Institute of Military Science and Technology

aldoxim methylchloride(2-PAM)과 같은 oxime은 정상적인 AChE 활성을 회복시키기 위해 투여된다³⁻⁵. 그러나 AChE와 결합된 신경작용제는 탈 알킬화 후에 더 이상 oxime에 의해 효소로부터 제거될 수 없다. 따라서 수분 이내에 aging이 일어나는 soman에 중독된 경우 oxime과 atropine 만으로는 치료가 어렵다. 따라서 가역적으로 AChE의 효소활성을 억제하여 일정부분의 AChE의 활성부위를 신경작용제가 결합할 수 없도록 만들어 결과적으로 신경작용제 공격으로부터 보호하는 pyridostigmine을 전처치제로 사용한다. 그러나 이 약물 들로만은 신경작용제에 의해 유발되는 seizure를 막아 줄 수 없으므로 생존하더라도 치명적인 뇌 손상을 초래하게 된다^{6,7}. 중추신경계에 대한 약효를 기대할 수 없는 pyridostigmine의 대체약물로 지목된 physostigmine은 혈액 속에서 반감기가 짧고 유효 약물농도 범위가 좁지만 항콜린성 약물을 복합 투여하면 독성은 서로 상쇄되고 약효는 상승되는 매우 이상적인 연구들이 다수 보고되어있다^{8,9}. 이러한 연구결과들을 바탕으로 신경작용제에 대한 NMDA 길항 및 항콜린효과를 지닌 procyclidine과 physostigmine을 주성분으로 하는 복합제 패치를 개발하였다. 본 연구에서는 기니픽을 이용하여 신경작용제 예방패치의 예방방어, 해독촉진, 뇌 보호 효과를 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 시험물질

2.1.1 신경작용제

본 연구에서는 국방과학연구소에서 직접 합성하여 순도 97 %로 확인된 sarin 및 soman을 사용하였다.

2.1.2 예방패치 성분

본 연구에서는 삼양화학기술연구소로부터 제공받은 신경작용제 예방패치를 4×5 cm² 크기로 절단하여 사용하였으며 4×5 cm² 크기 기준 예방패치의 성분은 physostigmine 3.6 mg과 procyclidine 14.2 mg이다.

2.1.3 해독제

본 연구에서는 현재 미국에서 전처치제로 사용되고 있는 pyridostigmine을 예방패치와 비교하기 위하여 pyridostigmine(Sigma Aldrich, MO, USA) 0.026 µg/kg 용량으로 사용하였고, 현재 군에서 보유하고 있는 해독

제인 KMARK-1과 의 병용투여 효과를 확인하기 위하여 atropine sulfate(Sigma Aldrich, MO, USA)와 2-PAM(Sigma Aldrich, MO, USA)을 각각 2 mg/kg, 25 mg/kg 용량으로 사용하였다.

2.2 동물

일본으로부터 수입한 5주령 수컷 기니픽(Guinea Pig; Hartley, SPF)을 사용하였다. 동물 실험은 국방과학연구소 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 수행하였다(ADD-IACUC-15-20, ADD-IACUC-16-18, ADD-IACUC-16-19).

2.3 Sarin 및 soman 반수치사량 산정

본 연구에서는 예방패치의 예방방어, 해독촉진, 뇌 보호 평가를 위해 기니픽을 이용하여 반수치사량 산정 시험을 실시하였다. Sarin과 soman에 대한 반수치사량 산정시험을 실시하기 위하여 참고문헌에서의 sarin과 soman의 반수치사량(sarin: 42 µg/kg, soman: 28 µg/kg)을 참고하여 각각 20~60 µg/kg, 7.5~30 µg/kg 용량을 기니픽에 피하투여하였다⁷. 작용제 투여 24 h 후 폐사를 확인하였고 probit analysis법을 이용하여 반수치사량을 산정하였다.

2.4 예방패치의 예방 방어 효능평가

반수치사량 산정시험 결과를 바탕으로 예방패치의 예방 방어 효능을 수행하였다. 기니픽의 등 부위를 제모하고 예방패치를 부착한 후 테이핑을 하여 패치가 손상되지 않도록 하였다. 시험은 총 4그룹으로 그룹별 5마리의 기니픽을 무작위로 배치하였다. 그룹 1-2는 4×5 cm² 크기의 예방패치를 24 h 부착 후 sarin 및 soman을 1.5 LD₅₀ 용량으로 공격하였고, 그룹 3-4는 대조군으로 패치를 부착하지 않고 sarin 및 soman을 1.5 LD₅₀ 용량으로 공격하였으며 임상 증상 및 24 h 후 폐사율을 확인하였다.

2.5 예방패치의 해독 촉진효과 평가

Sarin과 soman에 대한 신경작용제 예방패치와 KMARK-1의 병용투여에 대한 효과를 확인하기 위하여 총 6개의 그룹을 구성하여 시험을 수행하였다. 각 그룹은 5-7마리의 기니픽이 무작위로 배치되었다. 그룹 1과 그룹 4는 예방패치를 부착하고 24시간 뒤 sarin과 soman 5.0 LD₅₀을 각각 투여하고 1분 후 KMARK-1을 투여하였다. 그룹 2와 그룹 5는 pyridostigmine을 근육

투여하고 30분 후 sarin과 soman 5.0 LD₅₀을 각각 투여하고 1분 후 KMARK-1을 근육 투여하였다. 또한 그룹 3과 그룹 6은 대조군으로 전처치 없이 sarin과 soman 5.0 LD₅₀을 각각 투여하고 1분 후 KMARK-1을 투여하여 생존율을 확인하였다.

2.6 아세틸콜린에스터라제 효소활성의 억제 평가

아세틸콜린에스터라제 활성을 분석하여 약물에 의한 억제율을 평가하였다. 폐치 부착 전 채혈한 혈액과 작용제 투여 후 채혈한 혈액을 이용하여 기준에 보고된 시험법¹⁾을 참고하여 분석하였다.

2.7 예방패치의 뇌보호 효과 평가

신경작용제 예방패치의 뇌 보호 효과를 확인하기 위하여 5개의 그룹을 구성하여 시험을 수행하였다. 각 그룹은 5마리의 기니픽이 무작위로 배치되었다. 그룹 1은 정상 기니픽 군으로 전 처치, 후 처치, 작용제 투여가 없는 그룹이고 그룹 2는 대조군으로 sarin 1.5-2.0 LD₅₀만 투여해야 하지만 sarin을 투여한 그룹은 24시간까지 생존할 수 없기 때문에 생존을 위하여 atropine과 2-PAM을 투여하였다. 그럼에도 불구하고 폐사하는 경우가 많아서 생존 개체가 5마리 이상이 될 때까지 반복실험하였다. 그룹 3은 예방패치를 부착하고 24 h 뒤 sarin 2.0 LD₅₀을 투여하였다. 그룹 4는 전 처치 없이 soman 1.5 LD₅₀을 투여하고 그룹 2와 마찬가지로 atropine과 2-PAM을 투여하였고 생존 개체가 5마리 이상이 될 때까지 추가 실험하였다. 그룹 5는 예방패치를 24 h 부착한 후 soman 2.0 LD₅₀을 투여하였다. 그룹 6은 pyridostigmine을 전처치하고 soman 1.5 LD₅₀을 투여한 후 atropine과 2PAM을 투여하였다. 작용제 투여 5 h~1주일 후 관류 고정하였고 뇌 조직 슬라이드를 제작하여 뇌 보호 효과를 확인하였다.

2.7.1 병리조직 평가

뇌보호 효과는 신경작용제 중독 후 가장 심하게 손상을 받는 (1) cerebral cortex, (2) hippocampus, (3) thalamus, (4) cortical amygdala, (5) pyriform cortex에서의 신경작용제 예방패치 처치 유무에 따른 뇌세포 괴사 및 주위 뇌조직의 변성 정도를 지표로 평가하였다¹⁾. 통계학적 분석은 상용으로 사용되는 SPSS statistics 프로그램을 이용하였고 유의수준은 P<0.05로 설정하였으며 Mann-Whitney U-test를 통해 대조군과의 유의성을 확인하였다(Table 1).

Table 1. Scoring of brain histopathology

점수	뇌조직의 변성 정도
0점	정상소견
1점	미미함(뇌세포 사망 및 조직손상 범위가 1~10 %)
2점	약함(뇌세포 사망 및 조직손상 범위가 11~25 %)
3점	중등도(뇌세포 사망 및 조직손상 범위가 26~45 %)
4점	심함(뇌세포 사망 및 조직손상 범위가 46~60 %)
5점	극히 심함(뇌세포 사망 및 조직손상 범위가 60 % 이상)

3. 결 과

3.1 Sarin 반수치사량 산정 결과

Sarin에 대한 기니픽 반수치사량 산정시험 결과는 Table 2와 같이 나타났고 probit analysis에 의해 33.04 µg/kg으로 산정되었다.

Table 2. Animal responses against sarin

그룹	투여 용량 (µg/kg)	폐사개체/ 전체개체	투여 경로	관찰 및 판정
G1	60	5/5	피하	작용제 투여 24시간 후 기준
G2	40	15/15		
G3	35	3/5		
G4	30	1/5		
G5	20	0/5		

3.2 Soman 반수치사량 산정 결과

Soman에 대한 기니픽 반수치사량 산정시험 결과는 Table 3과 같이 나타났고 probit analysis에 의해 26.696 µg/kg으로 산정되었다.

Table 3. Animal responses against soman

그룹	투여 용량 (µg/kg)	폐사개체/ 전체개체	투여 경로	관찰 및 판정
G1	30	14/15	피하	작용제 투여 24시간 후 확인
G2	25	1/5		
G3	20	0/10		
G4	15	0/10		
G5	10	0/5		
G6	7.5	0/5		

3.3 예방패치 방어 효능 결과

예방패치의 방어 효능평가 시험결과 sarin과 soman 1.5 LD₅₀에 대해 100% 방어하였다(Fig. 1).

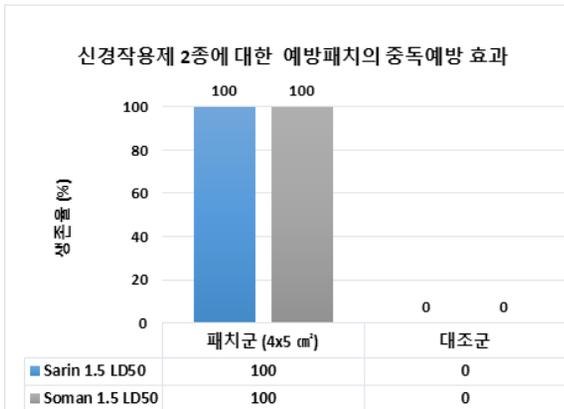


Fig. 1. Efficacy of patch against sarin and soman

3.4 예방패치 해독촉진 효과 평가 결과

예방패치의 해독촉진 효과 평가결과 sarin 5.0 LD₅₀에 대해 패치와 atropine + 2-PAM을 함께 처치한 그룹은 100 % (5/5) 생존하였고, pyridostigmine과 atropine + 2-PAM을 함께 처치한 그룹은 60 % (3/5)의 생존율을 보였으며 atropine + 2-PAM만 투여한 대조군은 14.7 % (1/7) 생존하였다(Fig. 2).

또한, soman 5.0LD₅₀에 대해 패치와 atropine + 2-PAM을 함께 처치한 그룹은 80 % (4/5) 생존하였고, pyridostigmine과 atropine + 2-PAM을 함께 처치한 그룹은 20 % (1/5)의 생존율을 보였으며 atropine + 2-PAM만 투여한 대조군은 모두 폐사하여 0 % (0/5)의 생존율을

을 보였다(Fig. 3).

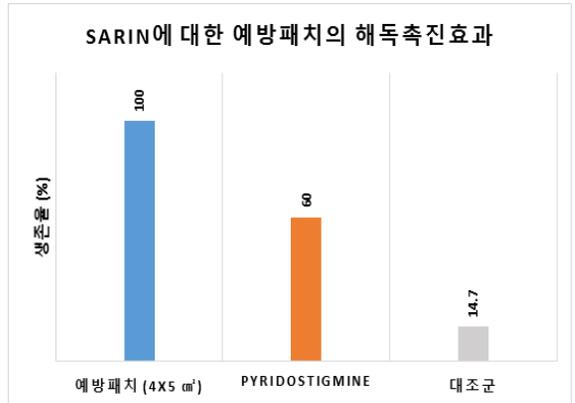


Fig. 2. The combinational effects of the prophylactic patch and therapeutic antidotes against sarin

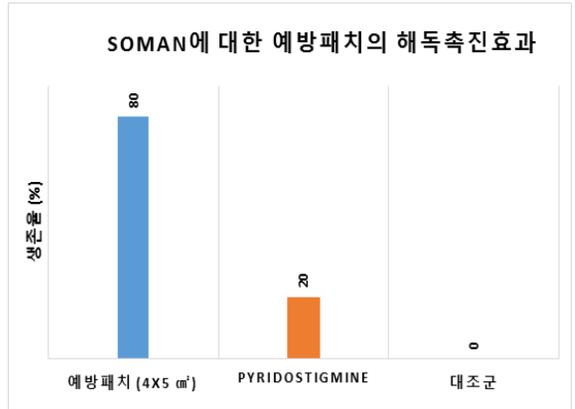


Fig. 3. The combinational effects of the prophylactic patch and therapeutic antidotes against soman

3.5 아세틸콜린에스터라제 효소활성 측정 결과

기니픽에게 4x5 cm² 크기의 예방패치 부착 시 최대 효소억제율은 평균 69.6 %로 6 h 후에 나타났고, 72 h에서의 효소억제율은 평균 26.9 %로 확인되어 패치 부착 군에서 6~72 h에서 모두 20 % 이상의 효소억제율을 보였다. 예방패치를 24 h 동안 부착한 후 soman (GD)을 피하 투여하였을 때 1 h 후에는 효소억제율이 평균 80.9 %까지 급증하였고 2시간 후 평균 83.9 %까지 효소억제율이 올라갔다가 이후 패치 부착기준 48 h까지 75.5 % 효소가 억제된 상태를 유지하였다(Fig. 4, 5).

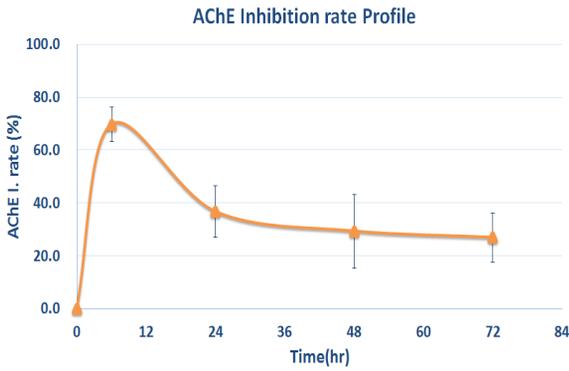


Fig. 4. Inhibition rate of blood ChE activity during 3-day attachment with a patch(4×5 cm²)

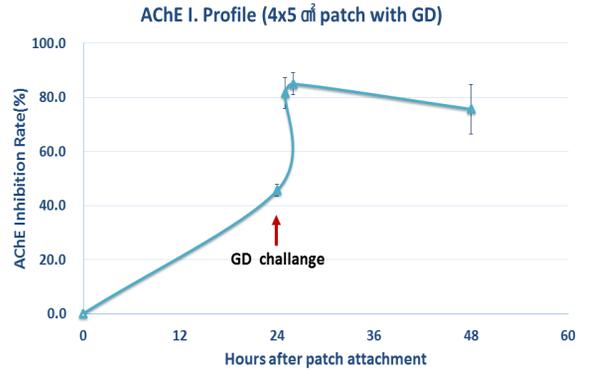


Fig. 5. Inhibition rate of blood ChE activity after soman challenge

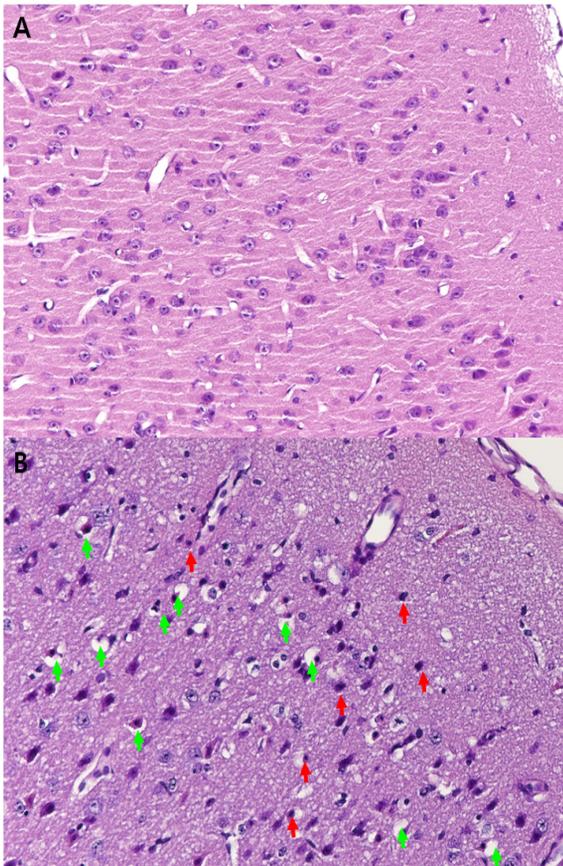


Fig. 6. Brain histopathology A. Cerebral cortex of patch group. B. Cerebral cortex of control group(red arrow : neuronal necrosis, green arrow : neuronal vacuolation)

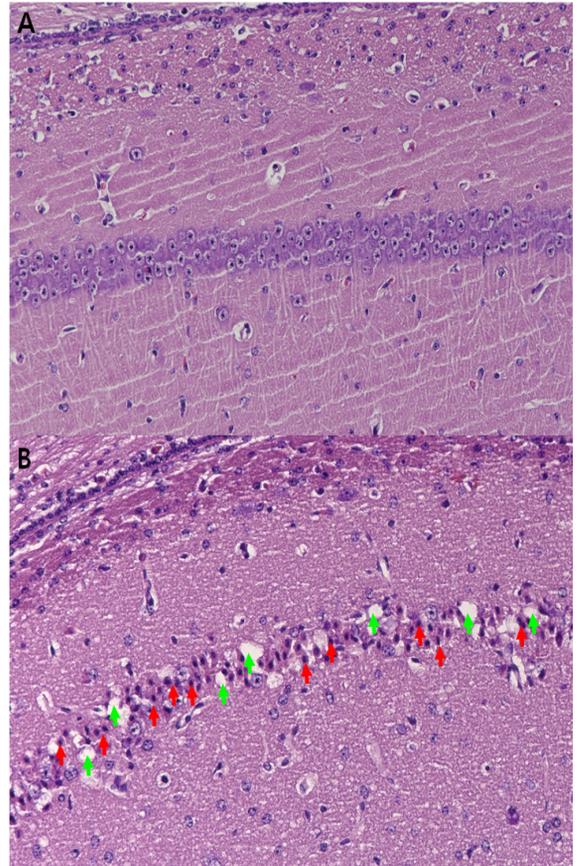


Fig. 7. Brain histopathology A. Hippocampus of patch group. B. Hippocampus of control group(red arrow : neuronal necrosis, green arrow : neuronal vacuolation)

3.6 예방패치 뇌 보호 효과 결과

신경작용제 예방패치의 뇌 보호 효과를 확인하기 위하여 신경작용제 sarin을 처치한 G2, G3의 뇌의 각 관찰부위별 뇌 손상 정도를 평가한 결과, 평균값±표준 오차 값은 Table 4와 같았다. 군간 총합(sum)에 대한 비교평가 시 예방패치를 부착한 G3의 뇌 손상(brain damage) 점수(0.8±0.4)는 KMARK-1을 투여한 대조군 G2군의 뇌손상 점수(11.4±0.9)보다 통계학적으로 유의적으로 낮았다(P<0.05). 신경작용제 soman를 처치한 G4, G5, G6군의 뇌의 각 관찰부위별 뇌 손상 정도를 평가한 결과 평균값±표준오차 값은 Table 4와 같았다. 예방패치를 부착한 시험군(G5)에서 뇌손상 정도가 가장 적었으며, 그 다음으로 atropine + 2-PAM을 후처치한 시험군(G4)이, pyridostigmine을 전처치하고 atropine + 2PAM을 후처치한 시험군(G6)보다 뇌손상 정도가 미약하게 상대적으로 적었다. 군간 총합(sum)에 대한 비교평가 시 G5의 등급(0.2±0.2)은 G4의 등급(13.0±1.2)과 G6의 등급(17.3±0.3)에 대하여 통계학적으로 유의적인 차이를 보였다(P<0.05). 병리조직 검경 시 패치를 부착한 군에서는 세포 손상이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 6, 7).

Table 4. Results of brain histopathology

그룹	기니픽 뇌(부위별)					
	Cerebral cortex	Hippo-campus	Thalamus	Cortical amygdala	Pyriform cortex	Sum
G1	0.0±0.0	0.4±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.2	0.6±0.2
G2	4.0±0.0	1.4±0.2	2.0±0.0	1.8±0.5	2.2±0.4	11.4±0.9
G3	0.2±0.2	0.0±0.0	0.4±0.2	0.2±0.2	0.0±0.0	0.8±0.4*
G4	3.2±0.5	3.4±0.4	1.8±0.2	2.8±0.2	1.8±0.5	13.0±1.2
G5	0.2±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.2#†
G6	4.0±0.0	4.3±0.7	2.3±0.3	3.7±0.3	3.0±0.0	17.3±0.3

G1; Normal, G2; Atropine + 2-PAM against Sarin 1.5-2.0 LD₅₀, G3; Patch against Sarin 2.0 LD₅₀, G4; Atropine + 2-PAM against Soman 1.5 LD₅₀, G5; Patch against Soman 2.0 LD₅₀. Data are expressed as Mean ± S.E.M., the symbol * represents statistical significance of P values less than 0.05, with respect to G2 group. The symbol † and # represent statistical significance of P values less than 0.05, with respect to G4 and G6 group, respectively.

4. 결론

Carbamate의 전처치가 발작과 뇌 손상을 감소시킨다고 보고되어있었기 때문에 우리 팀은 carbamate 중 하나인 physostigmine을 포함하는 예방제 개발을 위한 연구들을 해왔다. Physostigmine과 procyclidine을 신경작용제 soman을 투여하기 전 피하투여하여 랫과 기니픽에서 효능을 확인하였고^[10], physostigmine과 procyclidine을 포함하는 osmotic minipump를 이용하여 랫에서 신경작용제 soman에 대한 효능이 있는 것을 확인하였으며^[11] physostigmine과 procyclidine을 포함하는 예방패치가 개에서 신경작용제 soman 중독을 예방하는 효능이 있는 것을 확인하였다^[12]. 본 연구에서는 procyclidine과 physostigmine을 주성분으로 하는 복합제 패치인 신경작용제 예방패치의 예방방어효능을 기니픽을 이용하여 평가하였다. 연구를 진행하기 위하여 Probit 법을 이용해 기니픽에서 sarin과 soman에 대한 반수치사량을 산정하였다. 신경작용제 sarin의 반수치사량은 33.042 µg/kg (29.033 ~ 35.533 µg/kg), soman의 반수치사량은 26.696 µg/kg (23.323 ~ 28.360 µg/kg)으로 산정되었다. Sarin의 경우에는 기존에 보고되어 있던 반수치사량(42 µg/kg) 보다 낮게 산정되었고, soman의 경우에는 기존에 보고되어 있던 반수치사량(28 µg/kg)과 비슷하게 산정되었다^[7].

패치에 대한 예방방어율을 평가한 결과 sarin 1.5 LD₅₀에 대해 100 % 방어하였고 soman 1.5 LD₅₀에 대해 100 % 방어하였다. 해독 촉진 효과에서는 KMARK-1 단독으로 투여했을 때보다 패치와 KMARK-1을 병용으로 사용 시 방어능이 유의적으로 상승하는 결과를 확인할 수 있었다.

패치 부착 후 아세틸콜린에스터라제 억제율을 평가한 결과 6시간째 최고 억제율을 보이고 24시간 췌에는 평균 40-50 %을 억제율을 보였다. 또한 72시간까지도 20-30 % 억제율이 관찰되어 6~72시간 사이에는 모두 20 % 이상의 효소억제율이 관찰되었다. 신경작용제 투여 후 가장 심하게 손상을 받을 것으로 예상되는 뇌의 cerebral cortex, hippocampus, thalamus, cortical amygdala 및 pyriform cortex에서 신경작용제 예방패치 처치 유무에 따른 뇌 손상 정도를 평가하기 위해 수행되었다. 본 시험 여건 하에서, 양성대조군 대비 예방패치군의 뇌손상 정도가 통계학적 유의성을 보이며 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 physostigmine과 procyclidine을 포함하는 예방패치는 기존연구에서 수행한 beagle

dog에서의 효능평가 결과와 마찬가지로 신경작용제 sarin과 soman 중독에 대한 예방, 해독 및 뇌 보호 효능이 있는 것으로 판단된다^[12].

후 기

실험에 도움을 주신 김창환, 허경행, 김왕수, 유치호, 정성태 박사님께 감사드립니다.

References

- [1] JH McDonough, TM Shih, "Pharmacological Modulation of Soman Induced Seizures," *Neuroscience & Behavior Review*, Vol. 17, pp. 203-215, 1993.
- [2] TM Shih, TA Koviak, BR Capricio, "Anticonvulsants for Poisoning by the Organophosphorus Compound Soman: Pharmacological Mechanisms," *Neuroscience & Behavior Review*, Vol. 15, pp. 349-362, 1991.
- [3] DE Lenz, D Yeung, JR Smith, RE Sweeney, LA Lumley, DM Cerasoli, "Stoichiometric and Catalytic Scavengers as Protection against Nerve Agent Toxicity: A Mini Review," *Toxicology*, Vol. 233, pp. 31-39, 2007.
- [4] TM Shih, SM Cuniho, JH McDonough, "Control of Nerve Agent Induced Seizures is Critical for Neuroprotection and Survival," *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 188, pp. 69-80, 2003.
- [5] AL, Vrdoljak, M Calic, B Radic, S Berend, D Jun, K Kuca, Z Kovarik, "Pretreatment with Pyridium Oximes Improves Antidotal Therapy against Tabun Poisoning," *Toxicology*, Vol. 228, pp. 41-50, 2006.
- [6] T Myhrer, NH Nguyen, JM Andersen, P Aas, "Protection against Soman-Induced Seizures in Rat : Relationship Among Doses of Prophylactics, Soman, and Adjuncts," *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol 196, pp. 327-336, 2004.
- [7] KD Spradling, JF Dillman, "Toxicology of Chemical Warfare Nerve Agent," *Advances in Molecular Toxicology*, Vol. 5, pp. 111-144, 2011.
- [8] Y Meshulam, R Davidovici, A Wengier, A Levy, "Prophylactic Transdermal Treatment with Physostigmine and Scopolamine against Soman Intoxication in Guinea-Pigs," *Journal of Applied Toxicology*, Vol. 15, pp. 263-266, 1995.
- [9] IH Philippens, BPC Melchers, B Oliver, PLB Bruijnzeel, "Scopolamine Augments the Efficacy of Physostigmine against Soman Poisoning in Guinea Pigs," *Pharmacology Biochemical, Behavior*, Vol. 65, pp. 175-182, 2000.
- [10] YB Kim, KC Cheon, GH Hur, TS Phi, SJ Choi, D Hong, JK Kang, "Effects of Combinational Prophylactics Composed of Physostigmine and Procyclidine on Soman-Induced Lethality, Seizures and Brain Injuries," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 11(1), pp. 15-21, 2002.
- [11] EK Choi, D Park, JM Yon, GH Hur, YC Ha, JH Che, J Kim, S Shin, JY Jang, SY Hwang, YH Seong, DJ Kim, JC Kim, YB Kim, "Protection by Sustained Release of Physostigmine and Procyclidine of Soman Poisoning in Rats," *European Journal of Pharmacology*. Vol. 505(1-3), pp. 83-91, 2004.
- [12] WS Kim, Y Cho, JC Kim, ZZ Huang, SH Park, EK Choi, S Shin, SY Nam, JK Kang, SY Hwang, YB Kim, "Protection by a Transdermal Patch Containing Physostigmine and Procyclidine of Soman Poisoning in Dogs," *European Journal of Pharmacology*, Vol. 525(1-3), pp. 135-142, 2005.