

## 백서뇌에서 $\beta$ -fluoroethylacetate에 의한 선택적 신경세포 손상

서울대학교 의과대학 신경과학교실 및 병리학교실<sup>\*\*</sup>, 보라매병원 신경과<sup>\*</sup>

이기형 · 전범석 · 나덕렬<sup>\*</sup> · 박성호<sup>\*</sup> · 지제근<sup>\*\*</sup>

### Selective Neuronal Damage Produced by $\beta$ -fluoroethylacetate Intoxication in Rat Brain

Ki Hyeong Lee, M.D., Beom Seok Jeon, M.D., Duk Lyul Na, M.D.<sup>\*</sup>  
Seong Ho Park, M.D.<sup>\*</sup> and Je G. Chi, M.D.<sup>\*\*</sup>

Department of Neurology and Pathology<sup>\*\*</sup>, Seoul National University College of Medicine,  
Department of Neurology, Boramae City Hospital<sup>\*</sup>.

Beta-fluoroethylacetate has been extensively used as the rodenticide in Korea. In some patients with acute poisoning,  $\beta$ -fluoroethylacetate caused cerebellar dysfunction as a single and persistent neurologic sequela after a period of an acute neurological disorder which is characterized by mental deterioration, seizures, and respiratory failure. But there has been no report of pathological findings to explain neurological deficit.

We tried to verify the histologic changes of the central nervous systems in  $\beta$ -fluoroethylacetate poisoned rats. Silver staining(Gallyas) was used to evaluate the histology.

In acute intoxication experiment with LD50(7mg/Kg),  $\beta$ -fluoroethylacetate elicited acute onset of consciousness deterioration, generalized tonic-clonic seizures and large amplitude tremulous activity involving whole body with full recovery after 24 hours. There was no discernible pathologic change in CNS in acutely poisoned rats. However, when poisoned with sublethal dose(5mg/Kg) daily for five days, a moderate degree of nerve cell degeneration was found selectively in dentate nucleus, Purkinje cell layer, vestibulo-cochlear nucleus and striatum. This change was not seen in hippocampus, cerebral cortex or cerebellar cortex. These findings were well correlated with the previous reports of selective pathology in human 5-FU intoxication cases.

Our preliminary results suggest that  $\beta$ -fluoroethylacetate, a kind of cellular metabolism inhibitor may induce selective neuropathology mainly involving cerebellar output pathway in rats.  
(Korean J Pathol 1995; 29: 277~285)

**Key Words:** Beta-fluoroethylacetate, Dentate nucleus, Cerebellar Purkinje cell, Vestibulocochlear nucleus, Selective neuropathology

## 서 론

Beta-fluoroethylacetate (FEA)는 fluoroacetate의 ethyl ester로서 Kreb's cycle의 aconitase를 억제하여 세포내 에너지대사의 장애를 가져오는 물질로 알려져 있으며<sup>1-3</sup>, 인체중독시에는 퇴행성 소뇌변성질환과 유사한 임상 및 방사선학적 소견이 관찰된 바있다<sup>4,5</sup>.

$\beta$ -fluoroethylacetate의 모화합물인 fluoroacetate의 세포내 작용기전에 대하여는 지금까지 많은 연구가 있어 왔다. 1947년 Bartlett와 Barron<sup>6</sup>은 처음으로 fluoroacetate가 콩팥, 간, 그리고 뇌조직등에서 산소 호흡을 억제한다고 하였고, 1952년 Peters 등<sup>3</sup>은 이 화합물이 체내에서 fluorocitrate로 변하고 이 대사 산물이 사립체내의 효소인 aconitate hydratase를 억제하여 Kreb's cycle 회로를 차단함으로써 에너지 생산을 막고 세포내 ATP의 양을 감소시킨다는 것을 밝혀냈다. 한편 뇌조직에서의 작용기전에 관해서는 1970년 Clarke 등<sup>7</sup>이 fluoroacetate가 신경세포에 의해서는 거의 흡수되지 않고 교세포의 Na<sup>+</sup> 의존성 운반체에 의해 acetate와 경쟁적으로 흡수된 뒤 교세포내의 비교적 적은 에너지대사계만을 억제하므로 전체적인 뇌 조직의 산소 소비량은 줄지 않는다고 보고하였고, Szerb와 Issekutz<sup>8</sup>는 fluoroacetate가 흥분성 신경전달물질인 glutamate가 presynaptic terminal에서 유리되는 것을 촉진시키지는 않지만 교세포에 의한 재흡수를 막음으로써 synaptic cleft의 glutamate양을 증가시킨다고 하였다. 이상과 같이 많은 연구가 있어 왔지만, 어떠한 기전으로 인체 중독례에서 선택적인 소뇌변성이 발생하는 지에 관하여는 아직까지 알려진 바가 없다. 또한 세포내에서의 작용부위는 다르지만 세포내 작용이 유사한 세포호흡 억제제들인 일산화탄소 중독이나 청산중독에서 추체외로계의 병변 및 그에 연관된 증상들이 발생하는 것과는 달리  $\beta$ -fluoroethylacetate 중독에서는 특징적으로 선택적인 소뇌실 조증상을 보이고 있는 점도 흥미있는 사실이라고 하겠다. 그러나 아직까지는 국내외에  $\beta$ -fluoroethylacetate에 의한 인체 중독례에서 부검을 통한 형태학적 검증조차 되어 있지 않은 실정이다.

이에 본 연구는 인체와 증상발현이 비교적 비슷한 것으로 알려져 있는 흰쥐를 대상으로  $\beta$ -fluoroethylacetate에 의한 급성 및 아급성 중독을 일으켜 그 신경병리학적 소견을 관찰함으로써 향후  $\beta$ -fluoroethylacetate의 선택적 신경독성기전을 밝히는데 기초로 삼고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

체중 150~200gm 사이의 Sprague-Dawley 계 흰쥐 수컷을 사용하였다.

### 2. 방 법

1) LD50의 결정: 모두 25 마리의 수컷 흰쥐를 다섯군으로 나누어 각군마다 4mg/Kg, 5mg/Kg, 6mg/Kg, 8mg/Kg, 10mg/Kg의 FEA를 복강내 주입하고 48시간 후 생존여부를 결정하였다. SPSS-PC+ 통계program의 probit method를 이용하여 LD50를 계산하였다.

2) 급성중독시의 신경병리학적 소견: LD50에 해당하는 용량을 주고 48시간이 지날 때까지 생존한 쥐를 대상으로 아래와 같은 처리과정을 거쳐 조직을 얻고 H & E(hematoxylin and eosin) 염색과 은 염색 (Silver staining, Gallyas 등의 변법<sup>9</sup>)을 실시하여 광학 현미경하에서 대조군(같은 체중의 흰쥐로 동일한 조건하에서 생리적 식염수를 복강내 주입한 것)과 비교하여 형태학적 변화를 검색하였다. 검색부위는 대뇌피질, 선조체, 해마, 흑질, 소뇌, 뇌간의 여섯부분으로 크게 나누어 세부적인 관찰을 하였다.

3) 아급성중독시의 임상상 및 신경병리학적 소견의 관찰: 체중 150~200mg의 흰쥐 8마리를 두 군으로 나누어 실험군은 LD50의 50~75%에 해당하는 용량을 5일동안 연속하여 복강내에 주사하고 임상양상을 관찰하였으며, 대조군은 생리식염수를 주사하여 5일 후 살아있는 흰쥐를 아래와 같은 방법으로 조직을 처리하여 관찰하였다.

4) 동물처치 및 조직고정: 흰쥐에 sodium pentothal을 복강내 주사하여 마취시킨후 흉곽을 절개하여 심장을 노출시킨 뒤, 좌심실을 통하여 생리식염수로 1분 정도, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 4% paraformaldehyde 고정액을 20분동안 관류 시킨후 두 개강을 열고 뇌를 적출한 다음 뇌절단기(brain slicer, Zivic-Miller Laboratory)를 이용하여 선조체, 해마, 흑질, 소뇌의 네부분을 중심으로 나누고 동일한 고정액에 3일 이상 후고정을 하였다.

H & E 염색을 시행할 것은 paraffin block을 만든 후 5 $\mu$ m 두께로 절편을 만들어 염색을 시행하였고, 은염색을 할 것은 냉동절편을 위해서 10~30% sucrose용액에 단계적으로 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 침투시키고 OCT compound로 포매한후 액체질소속에서 미리 냉각시킨 isopentane에 넣어 급속냉동시켰다. 냉동절편

기(Reichert Frigocut)로 흑질 부위는  $16\mu\text{m}$  두께, 다른 부위는  $30\mu\text{m}$  두께의 연속관상절편을 얻은 후 0.1 M phosphate buffer saline에 보관하였다.

5) 은 염색(silver staining): 위에서 얻은 조직절편을 여러개의 격자로 구성된 플라스틱 용기(깊이 3~4cm, meshed bottom)에 각 격자당 2 장씩 분리하여 넣었다.

#### (1) 시약 준비;

##### ① Stock solutions

A: 9%(w/v) NaOH

B: 16%(w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

C: 50%(w/v)  $\text{AgNO}_3$

D: 1.2%(w/v)  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

E: 95% ethanol 300ml와 증류수 600ml에 anhydrous  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.5g을 녹인 다음, 증류수를 더부어서 1 L로 만들었다.

F: 0.5g의 anhydrous citric acid를 15ml의 37% formalin, 100ml의 95% ethanol, 그리고 700ml의 물에 녹인 후 A에서 준비한 용액을 stirrer를 이용하여 pH가 5.8에서 6.1사이가 될때까지 섞고 증류수를 부어 1 L가 될때까지 희석하였다.

G: 0.5%(w/v) acetic acid

위의 용액들을 밀봉된 용기에 넣어 차광된곳에서 실온에 보관하였다.

② Working solutions(염색을 실시하기 1시간전에 준비)

Pretreating solution: A 용액과 D 용액을 동량으로 섞었다.

Impregnating solution: A 용액과 B 용액을 1.5:1의 비율로 섞은 후 혼합용액 100ml당 1ml에서 1.2ml의 C 용액을 첨가하였다.

Washing solution: E 용액 100ml 당 1ml의 D 용액을 섞었다.

Developing solution: F 용액 100ml당 1ml의 D 용액을 섞었다.

#### (2) 염색과정

먼저 조직절편을 증류수에 담가 5분씩 3회 반복하여 세척을 하고, pretreating solution을 5분씩 2회 갈아 담가두었다. 산화반응을 막기위하여 차광을 한 상자내에서 impregnating solution에 15분동안 담가두고 washing solution을 3회 갈아서 총 5분동안 세척하였다. developing solution에 1분이상 담가둔채로 조직절편을 developing solution으로부터 꺼내어 0.05% (w/v) chromium potassium sulfate와 0.5% (w/v) gelatin으로 피막된 acid-cleaned 유리 슬라이드에 올려놓았다. 조직절편이 마르면 0.5%(w/v) acetic acid에 각 10

분씩 3회 교환하여 담가둔 후 증류수로 세척하고 광학현미경하에서 관찰을 하여 다음과 같은 소견이 관찰되면 세포변성이 있는 것으로 판단하였다. 즉, 첫째, 세포질내에 은 과립의 침착이 보이는 것, 둘째, 세포질이 전체적으로 과도하게 염색이 되어 정상적인 세포질이 관찰되지 않는 것이며 단, 주위의 세포들이 모두 전체적으로 과염색된 것은 결과관정에서 제외하였다.

## 결 과

### 1. LD50의 결정

Probit analysis를 이용하여 구한  $\beta$ -fluoroethylacetate의 LD50는 7.1mg/Kg(B.Wt)이었다(95% confidence limit: 5.6~10.4mg/Kg).

### 2. LD50(=7mg/Kg B.Wt)를 복강내 주사한 후 나타나는 흰쥐의 임상적 변화

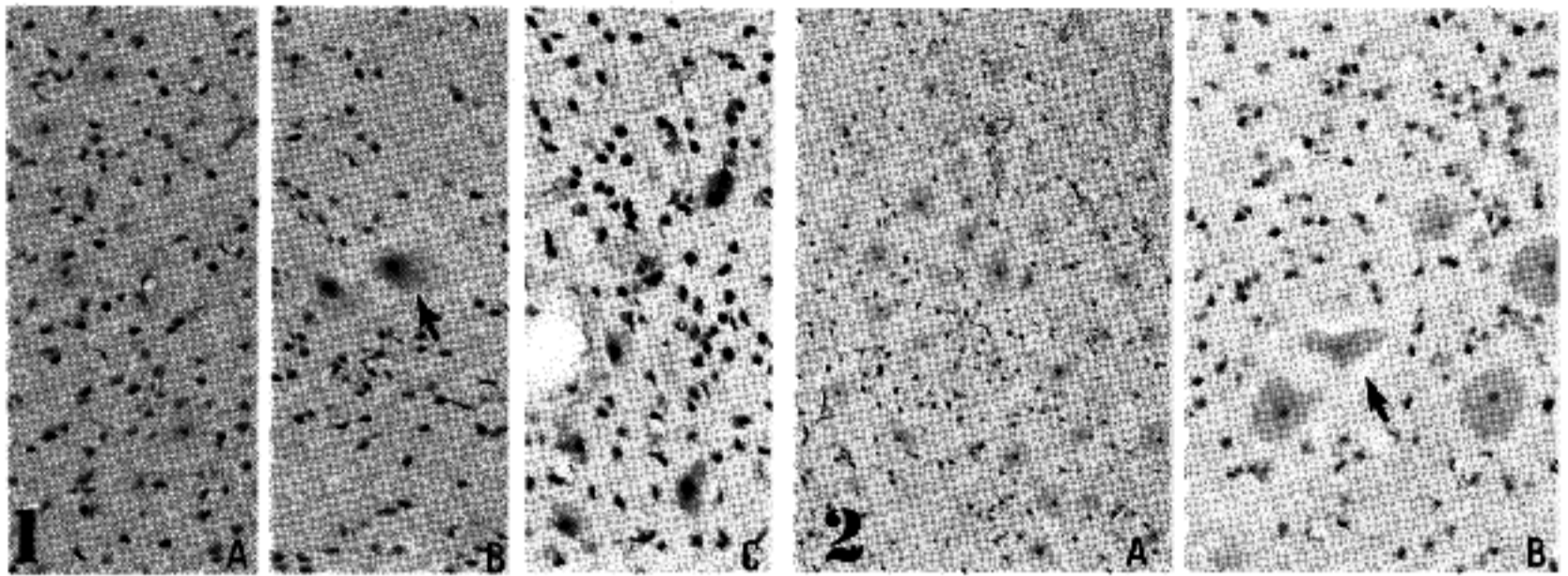
5 마리의 흰쥐들중 48 시간내에 3 마리가 사망하였고 2 마리가 생존하였다. 사망한 쥐들 모두가 24 시간내에 1회에서 3회의 전신성경련을 일으켰으며 경련의 양상은 처음에는 신전기(tonic phase)가 10초에서 30초 정도 있다가 간대성경련기(clonic phase)로 이행하였고 곧바로 postictal stage로 들어가는 것이 관찰되었다. 경련에서 회복한 쥐들은 주위 자극에 대해 매우 예민해 보였으나 잘 움직이려 들지 않았고 통증자극을 쥐서 움직이면 전후좌우로 심한 진전성운동을 보였다. 24 시간이 지나서 생존한 쥐들에서는 어떠한 후유증도 관찰되지 않았다.

### 3. 급성중독시의 신경병리학적 소견

LD50(=7mg/Kg B.Wt)를 복강내 주입하고 48시간 후 생존한 쥐 4 마리를 관류고정하여 H & E 염색과 은 염색을 시행하여 광학현미경하에서 관찰한 결과 대조군과 비교하였을 때 대뇌피질, 선조체, 해마, 흑질, 소뇌 등에서는 특별한 변화를 관찰할 수 없었다.

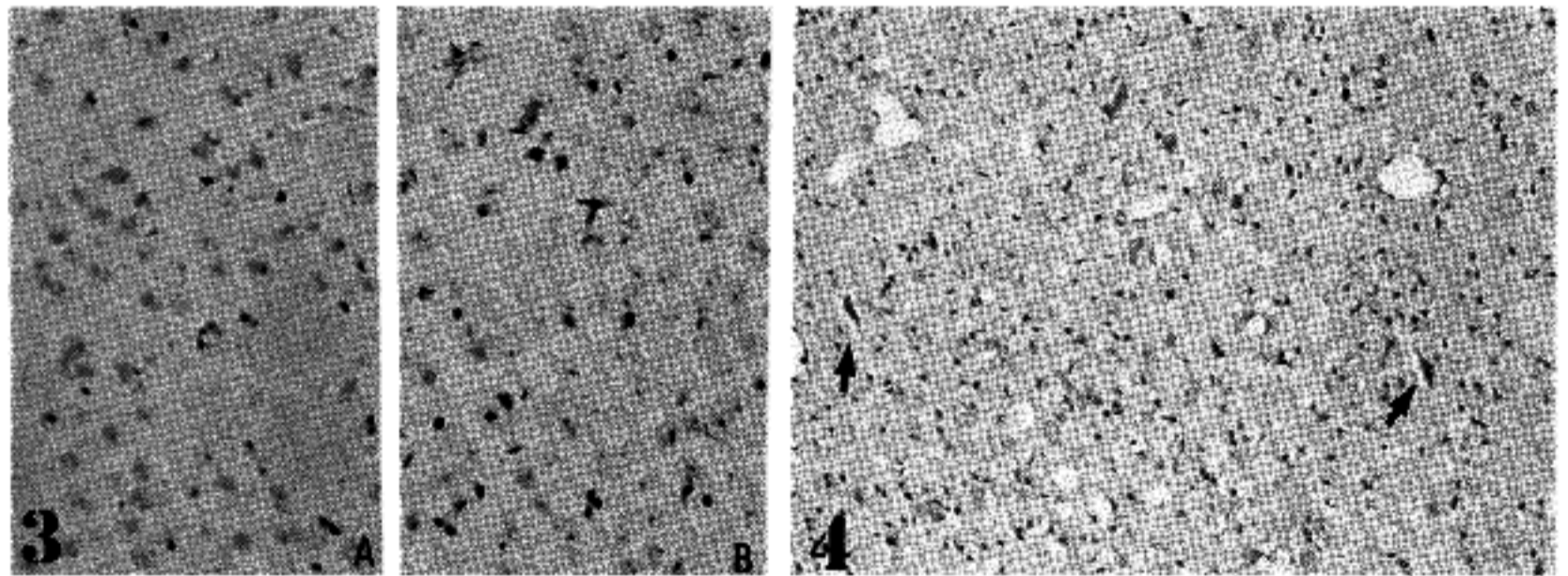
### 4. 아급성중독시의 임상상

4 마리의 실험동물에 LD50의 70%에 해당하는 체중 1Kg 당 5mg의 FEA를 5 일동안 일정한 시간에 복강내 주사하였고, 대조군은 같은 양의 생리식염수를 주사하였다. 5일후 실험군의 동물은 대조군에 비하여 눈에 띄게 행동반경이 줄어들었고 주위 자극에 대해서 거의 움직임을 보이지 않았고, 진전성 운동이나 운동실조증등은 뚜렷하게 관찰되지 않았으나 경사면에 세웠을 때 자세를 유지하는 능력이 저하되



**Fig. 1.** Dentate nucleus neurons. Silver staining ( $\times 200$ ). (a) Healthy looking dentate nucleus neurons in a control animal. (b) Mildly affected dentate nucleus neurons in a treated animal showing intracytoplasmic silver granules (arrow) with darkly clumped nuclei. (c) Severely affected dentate nucleus neurons in a treated animal showing diffuse silver precipitates with cell shrinkage.

**Fig. 2.** Vestibulo-cochlear nucleus. Silver staining. (a) Healthy looking vestibular nucleus neurons in a control animal. (100). (b) Mildly affected superior vestibular nucleus neurons in a treated animal showing intracytoplasmic silver precipitates ( $\times 200$ ) with deformed cell morphology (arrow).



**Fig. 3.** Striatal neurons. Silver staining ( $\times 200$ ). (a) Normal striatum in a control animal. (b) Severely affected striatal neurons in a treated animal.

**Fig. 4.** Scattered degenerating dentate nucleus neurons in a treated animal. H & E staining ( $\times 200$ ). Note the pyknotic nuclei and basophilic cytoplasm with deformed cell morphology (arrows).

이 있었다.

### 5. 아급성중독시의 병리소견

약을 처음 주입한지 6일째 되는 날 실험군과 대조군의 쥐를 모두 관류고정하고 각군을 절반씩 나누어 H & E 염색과 은 염색을 하여 광학현미경하에서 관

찰하였다. 실험군 동물의 은 염색절편에서 대뇌 피질과 흑질, 해마 등은 뚜렷한 신경세포 변성의 소견이 관찰되지 않았으나, 소뇌의 지상핵(dentate nucleus)(Fig. 1. A, B, C)과 전정-청신경(vestibulo-cochlear nucleus)(Fig. 2. A, B) 및 선조체(striatum)(Fig. 3)에서 다양한 정도의 신경세포 변성 소견이 관찰되었고 소

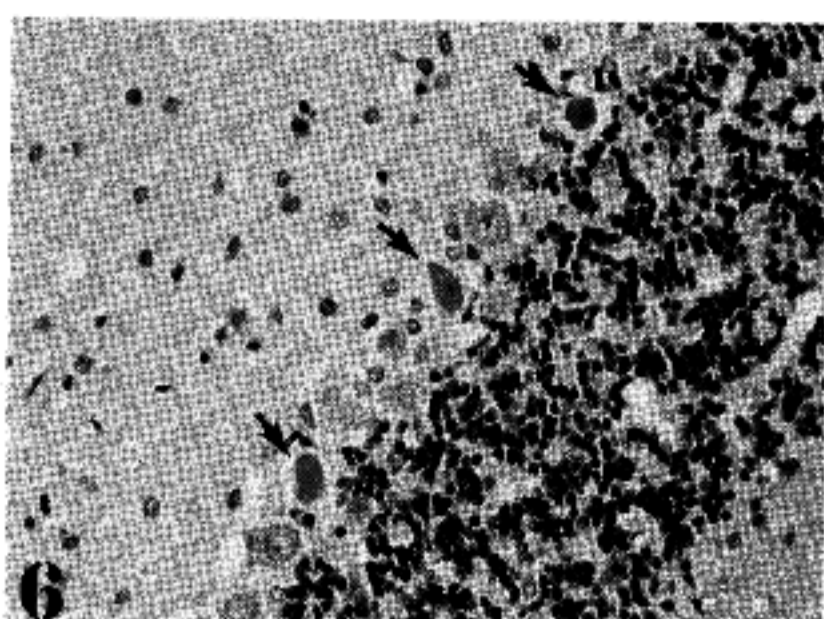
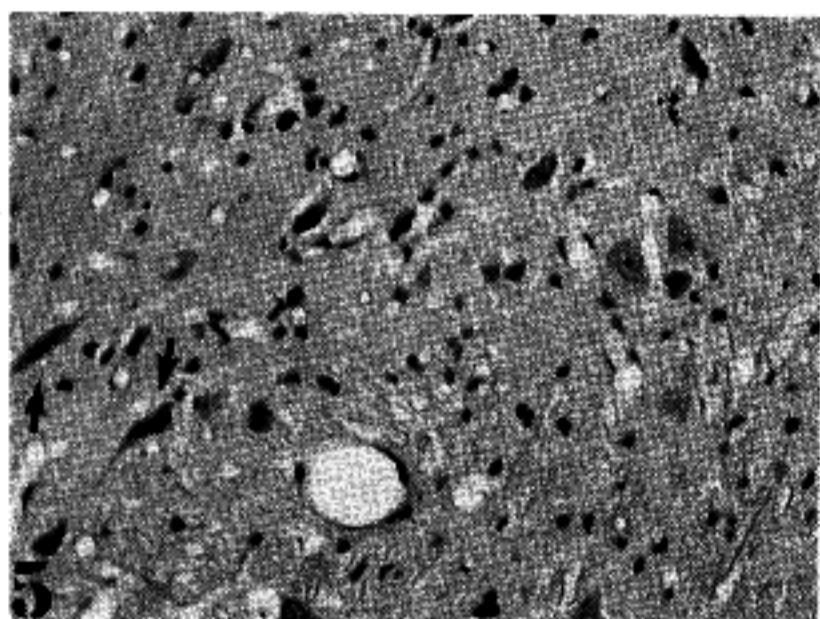


Fig. 5. A few degenerating vestibular nucleus neurons(arrows) in a treated animal. H & E staining( $\times 200$ ).

Fig. 6. Patchy degenerating Purkinje cells in a treated animal. H & E staining( $\times 200$ ). Note the eosinophilic cytoplasm and shrinkage of Purkinje cells.

뇌피질의 조롱박신경세포층(Purkinje cell layer)에서도 부분적으로 변성이 관찰되었다. 명반의 주위로 뚜렷한 교세포의 증식은 볼 수 없었으며 대조군에서는 이러한 변화가 관찰되지 않았다.

한편 실험군의 H & E 염색에서는 역시 세포체의 위축과 핵의 과염성이 나타나는 등의 신경원 변성 소견이 소뇌 치상핵(Fig. 4), 뇌교의 전정-청신경핵(Fig. 5), 그리고 소뇌피질 조롱박신경세포층(Fig. 6)에서 관찰되었으나 대조군에서는 이러한 변화가 나타나지 않았다.

### 고 찰

본 연구는 세포호흡억제제로 알려진  $\beta$ -fluoroethylacetate를 흰쥐에 투여하여 급성 및 아급성중독시 발생하는 임상양상이 인체 중독례에서와 유사한지를 알아보고 그 신경병리학적 소견을 확인하고자 하였다. 그 결과 소량의 약물을 반복투여한 실험군에서 소뇌의 심부핵신경, 조롱박신경세포와 선조체 및 전정신경핵의 변성이 관찰되었고 한편 대뇌피질, 해마, 후질등에서는 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었다.

Chenoweth(1951)<sup>10</sup>는 fluoroacetate의 급성중독시 나타나는 임상양상이 종에 따라 다른 것을 확인하여, 이를 크게 4 군으로 분류하였고, 그에 따르면 사람과 흰쥐는 경련과 의식혼탁등의 신경계증상과 순환계증상이 주요한 증상을 나타내는 동일한 군에 속한다고 하였다. 이러한 증상들은 fluoroacetate와 작용기전이 유사하다고 생각되는 세포호흡 억제제인 일산화탄소 중독<sup>11</sup>이나 cyanide 중독에서도 볼 수 있는

것으로서 큰 관심을 끌지 못하였다. 그러나 최근에 국내에서  $\beta$ -fluoroethylacetate에 의한 7 명의 인체중독례에서 급성기가 지나간 후 그 후유증으로 단지 소뇌기능실조만 남게 된다는 보고가 있은후 새로이 주목을 받게되었다. 급성 혹은 만성 중독시 소뇌실조증상을 일으키는 약물로는 phenytoin<sup>12</sup>, 알콜<sup>13</sup>, Ara-C<sup>14</sup>, 5-FU<sup>15</sup>, Sodium azide<sup>16</sup> 등이 알려져 있다. 이 들중 azide는 cytochrome oxidase 억제제로서 fluoroacetate와 유사하게 세포호흡 억제제로 작용하는데, 일산화탄소나 cyanide와는 달리 누적효과가 있으며 원숭이에게 소량(5mg/Kg)을 수주간 반복해서 투여할 경우 무도병양상의 불수의 운동을 보이고 부건을 하였을 때 선조체를 비롯한 기저핵의 광범위한 괴사소견이 관찰되었다고 한다. 한편 Mettler와 Sax<sup>16</sup>는 과량(8-16mg/Kg)의 azide를 Rhesus monkey에 투여하여 급성기에 의식장애와 경련이 발생하고 회복기에 들어서면서 소뇌기능실조증이 나타나고 부건시 소뇌의 조롱박 신경세포층(Purkinje cell layer)이나 소뇌피질의 괴사 및 소실을 관찰하였다. 또한 5-FU는 소화기종양을 비롯한 여러 악성종양의 항암치료에 광범위하게 쓰이는 항암치료제로서 Kocnig와 Patel<sup>15</sup>에 따르면, 이 약물로 치료받은 환자들중 2%에서 의식장애와 운동장애 및 소뇌, 전정기능의 이상을 동반한 급성신경장애가 발생하며, 투약을 중지하면 이러한 증상이 회복된다고 하였고 급성중독에 의한 부검례에서 올리브핵과 소뇌의 치상핵 신경세포의 변성, 그리고 소뇌 과립세포의 소실이 발견된다고 하였다. 이들은 이러한 변화가 5-FU 자체의 신경독성보다는 그 대사산물인 fluoroacetate에 의해 유발될 것으로

생각하였고 그 증거로서 5-FU의 투여시 fluoroacetate 중독시 발생하는 것과 같이 체내의 citrate가 증가하는 것을 제시하였다. 따라서 fluoroacetate 의 중독시 소뇌기능의 이상이 나타날 수 있으리라는 것은 예측할 수 있는 사실이다.

본 실험에서는 LD50에 해당하는 용량인 체중당 7mg의  $\beta$ -fluoroethylacetate를 복강내 주사하였을 때 인체중독례와 유사하게 보행시 운동 및 균형실조 등의 임상양상을 보여 쥐의 중독 실험을 통한 신경병리의 형태학적 검증이 부분적으로 인체 중독례의 신경병리학적 소견을 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것이라고 생각되었다.

본 실험에서는 변성된 신경세포(degenerating neuron)를 좀더 빠르고 정확하게 관찰하기 위하여 동일 부위를 둘로 나누어 은 염색과 H & E 염색을 동시에 실시하였는데, 은 염색은 물리화학적인 성질을 이용하여 은 침전이 degenerating presynaptic nerve terminal의 osmiophilic lysosome에 선택적으로 침착되는 것을 이용하는데, 비교적 신뢰성이 높은 것으로 알려진 Gallyas 등<sup>9</sup>의 방법을 사용하였다. 이 방법의 장점은 염색시 결합의 원인을 쉽게 파악하여 이를 수정할 수 있고 비특이적인 염색이 교섬유(glial fibrils), 적혈구, 단세포핵에만 국한되며, 배경의 염색성이 낮아 변성되는 신경세포를 잘 관찰할 수 있다는 점이다. 은 염색과 H & E 염색을 비교하였을 때, 은 염색이 훨씬 감수성이 높은 것을 알 수 있었으며 특이도(specificity)를 입증하기 위하여 이미 확실히 병리기전이나 병변의 위치가 밝혀진 6-OH-DOPA를 흰쥐의 기저핵에 stereotactic injection하여 비교하였을 때 유사한 소견이 퇴행성 신경원세포에 관찰되는 것을 확인한 바 있다<sup>17</sup>.

$\beta$ -fluoroethylacetate의 LD50에 해당하는 용량(체중 1Kg 당 7mg)을 한번 주사하였을 때에는 어떠한 병변도 나타나지 않았지만, 소량(체중 1Kg 당 5mg)씩 5일간 계속 주사한 군에서는 일관되게 소뇌의 치상핵과 전정신경, 그리고 선조체의 선택적 신경원변성을 확인할 수 있었다. 이것은  $\beta$ -fluoroethylacetate가 누적작용이 있음을 시사하는 것으로서 이 약물이 Krebs's cycle의 aconitase를 경쟁적으로 길항하는 것이 아니고 효소와 비가역적으로 결합하여 새로운 효소가 생산될때까지 작용한다고 하는 주장<sup>18</sup>과 잘 일치한다고 하겠다.

본 실험에서 사용된  $\beta$ -fluoroethylacetate는 일산화탄소, cyanide와 작용부위는 다르지만 기본적으로는 사립체내 세포호흡 억제제로서, 이에 해당되는 약물로는 이외에도 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahy-

dropyridine)를 비롯하여, AOAA(aminoxyacetic acid), 3-NP(3-nitropropionic acid)등을 들 수 있다. 이 약물들은 공통적으로 체내 중독시 선택적인 신경병변이 나타나는 것으로 알려져있다. 국내에서 특히 많이 발생하는 일산화탄소나 cyanide 중독의 경우 선택적으로 기저핵과 대뇌백질의 괴사가 오는 것으로 알려져있고, Beal 등<sup>19</sup>은 3-NP를 소량으로 1개월간 흰쥐에 주사하여 선택적인 선조체의 병변을 확인하였으며 특징적으로 선조체를 지나는 신경축색에는 변화가 없었다고 한다. 또한 Beal 등<sup>20</sup>은 AOAA를 선조체내에 직접 주사하여 헌팅톤병의 병리소견과 유사하게, 중간크기의 spiny neuron에만 영향을 미치고 NADPH-diaphorase containing large neuron에는 변화가 없다는 것을 입증하였다. 한편 파킨슨씨병의 유용한 동물모델을 만드는데 쓰이고 있는 MPTP의 경우에도 생쥐나 사람에 투여하였을 때 파킨슨씨병의 증상을 일으키고 선택적으로 뇌흑질 도파민 신경세포의 변성을 일으키는 것으로 알려져 있다<sup>21</sup>.

Fluoroacetate를 비롯한 여러 사립체내 세포호흡 억제제들에서 부위는 다르지만, 비교적 선택적으로 신경 병변이 발생하는 것에 대해서는 많은 가설이 제기되고 있다. 그중 대표적인 것으로는 Albin과 Greenamyre<sup>22</sup>, Beal<sup>23</sup>이 제시하고 있는 'secondary excitotoxicity'의 개념을 들 수 있는데, 그에 따르면, 사립체내의 에너지 대사가 저해되면, 정상적으로 신경세포가 흥분성 신경전달물질에 의해 탈분극되었을 때 다시 재분극되기위해서 ligand-gated calcium channel이 막전압의존성  $Mg^{2+}$  차단에 의하여 닫혀야 되는데, 이과정에서 필요한 고에너지인산(ATP 등)을 생산하지 못함으로 해서 지속적으로 칼슘 통로가 열리게 되고 그 결과 세포가 죽게 된다는 것이다. 또한 신경세포는 부위마다, 에너지대사의 활성도, 흥분성 아미노산의 자극정도, 흥분성 아미노산 수용체의 종류가 다르고, 칼슘 항상성 및 free radical scavenger의 함유정도가 다르기 때문에 선택적인 병변이 발생할 것이라고 주장하였다. 이러한 주장의 근거로 AOAA<sup>20</sup>, 3-NP<sup>19</sup>의 직접 혹은 정맥내 주사시 대뇌피질로부터 흥분성 아미노산 자극을 많이 받는 선조체에 병변이 오며, 그중에서도, 특히 NMDA(N-Methyl-D-Aspartate) 수용체가 많은 것으로 알려진 medium sized spiny neuron에만 이러한 변성이 오며, NMDA 수용체 길항제의 일종인 MK-801을 같이 투여하였을 때 병변이 줄어드는 것을 들었다.

또한 MPTP는 정맥주사시 단가아민 신경전달물질 흡수체에 의해 흡수되어 선택적으로 단가아민성 신경원을 침범하는 것으로 알려져 있는데, 이때에도

MK-801이나 CPP와 같은 NMDA 수용체 길항제로 흑질의 도파민 신경세포의 변성을 막을 수 있다고 하였다<sup>24</sup>.

Fluoroacetate 중독시 소뇌와 기저핵의 선택적인 신경 병변의 기전에 대해서는 아직까지 확실하게 밝혀진 바가 없다. Bartlett와 Barron<sup>6</sup>은 1947년에 처음으로 이 약물이 acetate가 관여하는 생화학반응의 경쟁적 억제제로 작용할 것이라는 가설을 내놓았고 Peters<sup>25</sup>는 1957년 fluoroacetate가 체내에서 대사되면서 fluorocitrate가 형성됨으로써 Kreb's cycle의 aconitase enzyme를 경쟁적으로 억제하여 에너지 대사를 저해한다고 주장하였다. 비록 fluoroacetate를 주입시 경련이 발생하는 것에 비추어 이것이 중추신경계에 영향을 미치는 것은 틀림없지만, fluorocitrate로의 대사가 뇌실질에서 이루어지는지 혹은 다른 장기에서 대사가 되어 뇌로 이동하는지에 대해서는 확실하지 않았다<sup>26</sup>. 이에 대해서 Clark 등<sup>7</sup>은 tricarboxylic acid cycle이 metabolic intermediate가 풍부한 'large pooled energy cycle'과 비교적 intermediate가 적은 'small pooled synthetic cycle'로 구획이 지어지며, fluoroacetate는 'synthetic cycle'에만 작용하여 뇌실질내의 전체적인 에너지 대사에는 별영향을 미치지 않고, glutamate와 glutamine과 같은 아미노산의 합성을 저하시키며, glutamate에서 glutamine으로의 전환시 ATP가 많이 소비되므로 glutamine이 더욱 많이 감소된다는 가설을 제시하였다. 그후 이러한 'small pooled synthetic cycle'의 분획이 뇌교세포(glial cell)에 존재하며, fluoroacetate와 acetate를 경쟁적으로 운반하는 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-dependent carrier가 뇌교세포에 선택적으로 존재한다는 것이 밝혀졌다<sup>27</sup>. Tricarboxylic acid cycle의 분획가설은 세포면역화학적 방법으로 교세포내에 glutamine synthetase<sup>28</sup>와 glutamate dehydrogenase<sup>29</sup>가 비교적 많이 존재한다는 보고에 의해서도 확인되고 있다. 또한 Szerb와 Issekutz<sup>30</sup>는 흰쥐의 대뇌 해마절편에서 fluoroacetate를 주입하였을때 glutamine의 세포내 농도와 세포외 유리가 줄고 glutamate의 세포외 농도가 약간 증가하나, 여기에 전기적인 자극을 가하면서 glutamine을 첨가하면 glutamate의 농도가 크게 늘어나는것을 확인함으로써 fluoroacetate에 의하여 선택적으로 교세포의 대사가 억제되고 그 결과 전기자극으로 presynaptic terminal에서 유리된 glutamate가 교세포에 의해서 흡수되지 못하므로 신경연접부위에 축적된다는 가설을 입증하였다. 따라서 fluoroacetate중독시에는 생리적인 상태에서도 흥분성 아미노산(glutamate, aspartate)이 과잉축적되므로 glutamate 수용체가 많이 분포하고 평상시 흥분성아미

노산의 함량이 높은 뇌부위가 흥분성 독작용에 의해 더 쉽게 손상받으리라는 추측을 할 수 있겠다. 사람의 신경계에는 glutamate 수용체의 일종인 NMDA (N-methyl-D-aspartic acid)수용체가 척수, 대뇌피질, cuneate nucleus, 미상핵, 외측슬상체(lateral geniculate body), 해마, 활차신경핵(cochlear nucleus), 후각대뇌피질(olfactory corte.)과 소뇌에 많이 존재하는 것으로 알려져 있는데, 본 실험의 결과와 5-FU 중독시에 병변이 관찰된 선조체, 치상핵, 전정신경핵과 비교적 잘 일치하는 점<sup>15</sup>, 그리고 사립체유전자의 돌연변이로 사립체내 전자전달계의 이상이 생겨 발생하는 mitochondrial encephalomyopathy의 일종인 MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers)증후군의 주된 병리소견이 소뇌 치상핵과 올리브핵인 점을 고려해본다면<sup>31-36</sup>, 이러한 추측은 비교적 설득력이 있을 것으로 보인다. 한편 fluoroacetate 중독시 심장독성으로 말미암아 일시적으로 저혈압이 생김으로써 뇌혈류가 떨어져 신경병변이 발생한다는 가설은 흔히 뇌혈류의 장애시 자주 침범되는 해마가 거의 영향을 받지 않았다는 점을 볼때 가능성이 떨어질 것으로 생각된다. 그러나 위에서 기술한 바와 같이 흥분성 아미노산의 분포가 많은 부위들 중에서도 거의 영향을 받지 않는 부위가 있고 치상핵은 흥분성 신경전달물질의 영향보다는 주로 조롱박신경원의 억제성신경전달물질인 GABA의 영향을 받는다는 점 등은 흥분성 신경독성 이외의 다른 요소가 중요한 역할을 할 것이라는 추측을 하게하며 이는 앞으로 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다. 향후 신경세포 변성시 비특이적으로 동반되는 교세포증식을 알 수 있는 항GFAP(Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein) 면역염색과 특정 신경전달물질에 대한 면역화학 염색을 실시함으로써 병변이 있는 부위중에서도 주로 어떠한 세포가 침범되는지와 그 세포들의 기능적 측면에 대해서 확실한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각되며, 아울러 각 부위별로 단위면적당 변성세포의 수를 비교함으로써 이번 실험의 결과를 확인할 수 있을 것으로 생각되었다.

## 결 론

흰쥐에  $\beta$ -fluoroethylacetate를 복강내 주사하여 임상적 변화를 관찰하고, 은염색 및 H & E 염색을 시행하여 형태학적 변화를 살펴본 결과는 다음과 같다.

1) LD50를 투여한 급성중독군에서는 경련과 의식장애, 호흡저하등의 증상이 있었으며, 수시간이내에

회복기에 들어서면서 소뇌실조증상을 보이다가 24시간이 지나면 전혀 후유증이 남지 않았으며 조직학적 변화도 관찰되지 않았다.

2) LD50의 반응량을 5일간 계속 투여한 동물에서는 행동반경의 감소, 자극과민성등을 보였고, 은염색을 시행하였을 때, 소뇌의 치상핵, 조롱박신경세포, 전정-청신경핵, 그리고 선조체를 침범하는 선택적 신경세포 변성을 관찰할 수 있었다.

이러한 소견은 대사산물인 fluoroacetate가 중요한 병인으로 생각되는 5-FU 중독시의 신경병리소견이나, 세포내 대사 장애가 원인으로 생각되고 있는 사립체뇌근병증(mitochondrial encephalomyopathy)의 일종인 MERRF(myoclonic epilepsy ragged-red fiber)증후군의 병리소견과 유사하였으며 따라서  $\beta$ -fluoroethylacetate는 세포내 대사억제제의 일종으로서 백서에서 주로 소뇌신경계를 침범하는 선택적인 신경병변을 일으키는 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Clark DD. Fluoroacetate and fluorocitrate: Mechanism of action. *Neurochemical research* 1991; 16: 1055-8.
- Liebecq C, Peters RA. The toxicity of fluoroacetate and the tricarboxylic acid cycle. *Biochim Biophys Acta* 1949; 3: 215-30.
- Peters RA. Lethal synthesis(Croanian lecture). *Proc R Soc Lond[Biol]* 1952; 139: 10-170.
- Trahes J, Rason N, Avrahami E. Computed tomography demonstration of brain damage due to acute sodium monofluoroacetate poisoning. *Clin Toxicol* 1983; 20: 85-92.
- BS Jeon, DL Na, SH Park, KW Lee, JK Roh, SB Lee, Myung HJ, KH Chang. A study on selective cerebellar degeneration following  $\beta$ -fluoroethylacetate poisoning. *Seoul J Med* 1992; 33: 195-202.
- Bartlett GR and Barron ESG. The effect of fluoroacetate on enzymes and on tissue metabolism. Its use for the study of the oxidative pathway of pyruvate metabolism. *J Biol Chem* 1947; 170: 67-82.
- Clarke DD and Nicklas WJ. Tricarboxylic acidcycle metabolism in brain, Effect of fluoroacetate on the labelling of glutamate, aspartate, glutamine and  $\beta$ -aminobutyrate. *Biochem J* 1970; 120: 345-51.
- Szerb JC. and Issekutz B. Increase in the stimulationinduced overflow of glutamate by fluoroacetate, a selective inhibitor of the glial tricarboxylic cycle. *Brain Research*, 1987; 410: 116-20.
- Gallyas F, Wolff JR, Bottcher H, Zaborszky L. A reliable and sensitive method to localize terminal degeneration and lysosomes in the central nervous system. *Stain Technology*. 1980; 55: 299-306.
- Chenoweth MB, Kandel A, Johnson LB, Bennett DR. Factors influencing fluoroacetate poisoning. Practical treatment with glycerol monoacetate. *J Pharmacol Exp Ther* 1951; 102: 31-49.
- BS Jeon, SB Lee. A clinical study on delayed neurological sequelae secondary to carbon monoxide poisoning. (abstract) *Neurology* 1989; 39(Suppl 1): 235.
- Ghatak NR, Santoso RA, McKinney WM. Cerebellar degeneration following long-term phenytoin therapy. *Neurology* 1976; 26: 818-20.
- Victor M, Adams RD, Mancall EL. A restricted form of cerebellar cortical degeneration occurring in alcoholic patients. *Arch Neurol* 1959; 1: 579-688.
- Winkelman MD, Hines JD. Cerebellar degeneration caused by high-dose cytosine-arabioside: a clinicopathological study. *Ann Neurol* 1983; 14: 520-7.
- Koenig H and Patel A. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity: the role of Krebs cycle inhibition by fluoroacetate. *Arch Neurol*. 1970; 23: 155-60.
- Mettler FA, Sax DS. Cerebellar cortical degeneration due to acute azide poisoning. *Brain*. 1972; 95: 505-16.
- 전범석. 6-Hydroxydopamine에 의한 쥐의 흑색 Dopamine신경세포 병변의 분포. *대한신경과학회지* 1992; 10; 4: 531-8.
- Clarke DD. Fluoroacetate and Fluorocitrate: Mechanism of Action. *Neurochemical Research* 1991; 16-9: 1055-58.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 1993; 13: 4181-92.
- Beal MF, Swartz KJ, Hyman BT, Storey E, Finn SF, Koroshetz W. Aminooxyacetic acid results in excitotoxic lesions by a novel indirect mechanism. *J Neurochem* 1991; 57: 1068-73.
- Langston JW, Ballard PA Jr. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* 1989; 309: 310.
- Albin RL and Greenamyre JT. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* 1992; 42: 733-738.
- Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative



- illnesses? *Ann Neurol* 1992; 31: 119-30.
24. Turski L, Bressler K, Rettig KJ, Loeschmann PA, Wachtel H. Protection of substantia nigra from MPP<sup>+</sup> neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 1991; 349: 414-8.
  25. Peters RA, *Adv. Enzymol* 1957; 18: 113.
  26. Morselli PL, Garattini S, Marcucci F, Mussini E, Rewersky W, Valzelli L, Peters RA. The effect of injection of fluorocitrate into the brains of rats. *Biochem Pharmacol* 1968; 17: 195-202.
  27. Muir D, Berl S, Clarke DD. Acetate and fluoroacetate as possible markers for glial metabolism in vivo. *Brain Res* 1986; 380: 336-40.
  28. Norenberg MD. Immunohistochemistry of glutamine synthetase. In: Hertz L, Kvarnemo E, McGeer G, Schousboe A, eds. *Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system*. Alan R. Liss, Inc 1983: 95-111.
  29. Aoki C, Milner TA, Sheu KFR, Blass JP, Pickel VM. Regional distribution of astrocytes with intense immunoreactivity for glutamate dehydrogenase in rat brain: Implications for neuron-glia interactions in glutamate transmission. *J Neurosci* 1987; 7: 2214-31.
  30. Szerb JC and Issekutz B. Increase in the stimulation-induced overflow of glutamate by fluoroacetate, a selective inhibitor of the glial tricarboxylic cycle. *Brain Res* 1987; 410: 116-120.
  31. Berkovic SF, Carpenter S, Evans A, Karpati G, Shoubridge EA, Andermann F, Meyer E, Tyler JL, Diksic M, Arnold D, Wolfe LS, Andermann E, Hakim AM. Myoclonus epilepsy and ragged red fibers (MERRF): A clinical, pathological, biochemical, magnetic resonance spectrographic and positron emission tomographic study. *Brain* 1989; 112: 1231-60.
  32. Fukuhara N, Tokiguchi S, Shirakawa K, Tsubaki T. Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers(mitochondrial abnormalities): disease entity or asyndrome? Light and electronmicroscopic studies of two cases and review of literature. *J Neurol Sci* 1980; 47: 117-33.
  33. Lombes A, Mendell JR, Nakase H, Barohn RJ, Bonilla E, Zeviani M, Yates AJ, Omerza J, Gales TL, Nakahara K, Rizzuto R, Engel WK, DiMauro S. Myoclonic epilepsy and ragged-red fibers with cytochrome oxidase deficiency: neuropathology, biochemistry, and molecular genetics. *Ann Neurol* 1989; 26: 20-33.
  34. Nakano T, Sakai H, Amano N, Yagishita S, Itoh Y. An autopsy case of degenerative type myoclonus epilepsy associated with Friedreich's ataxia and mitochondrial myopathy. *Brain & Nerve* 1982; 34: 321-32.
  35. Sasaki H, Kuzuhara S, Kanazawa L, Nakanishi T, Ogata T. Myoclonus, cerebellar disorder, neuropathy, mitochondrial myopathy, and ACTH deficiency. *Neurology* 1983; 33: 1288-93.
  36. Takeda S, Wakabayashi K, Ohama E, Ikuta F. Neuropathology of myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers (Fukuhara's disease). *Acta Neuropathol(Berl)* 1988; 75: 433-40.
-