

Lithium-Pilocarpine으로 유발된 중첩경련 흰쥐 모델에서 Ketamine의 항경련 및 신경 보호 효과

고석범 · 박성경 · 손영민 · 김영인

가톨릭대학교 의과대학 신경과학교실

Antiepileptic and Neuroprotective Effect of Ketamine in Lithium-Pilocarpine Induced Status Epilepticus Rat Model

Seok-Bum Ko, M.D., Soung-Kyeong Park, M.D., Young-Min Shon, M.D. and Yeong-In Kim, M.D., Ph.D.

Department of Neurology, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose : To examine the putative seizure-protective properties of ketamine in lithium-pilocarpine induced status epilepticus (LPSE).

Methods : Lithium chloride followed 24 h later by pilocarpine was administered for seizure induction. Ketamine (40 mg/kg) or phenytoin (50 mg/kg) was injected intraperitoneally 10 min or 60 min after the onset of continuous ictal discharge. Then the seizure behavior and EEG were observed and histological changes were compared through Nissl stain at 72 hours.

Results : The antiepileptic effect of ketamine, injected during the early stages of LPSE (10 min after the onset of continuous ictal discharge), was comparable to that of phenytoin. Ketamine was more effective than phenytoin in decreasing spike frequency, when administered on the plateau of LPSE (injection 60 min after onset of continuous ictal discharge electrographically). Anticonvulsant action of

ketamine was confirmed by a less neuronal injury in hippocampus compared with control rats injected with phenytoin.

Conclusions : In prolonged status epilepticus rat model, ketamine was effective as an antiepileptic, but phenytoin was not. Ketamine was also neuroprotective on the neuronal injury in the hippocampus. These results suggest that ketamine might be useful as an antiepileptic drug when standard antiepileptic drugs fail in the treatment of the refractory cases of status epilepticus. (J Korean Epilep Soc 2004; 8(1):26-30)

KEY WORDS : Lithium-pilocarpine induced status epilepticus · Ketamine · NMDA receptor · GABA_A receptor · Neuroprotective effect.

서론

지속적인 중첩경련은 생리학적, 병리학적 변화(GABA_A 수용체의 구조와 기능의 변화 및 NMDA 수용체의 활성화 등)로 인하여 기존의 항경련제(diazepam, Phenobarbital, phenytoin)에 반응성이 저하된다.¹⁻⁶ 최근 지속적인 중첩경련에서 새로운 항경련제의 필요성이 제기 되고

있는데, 특히 마취제 및 진통제로 사용되고 있는 NMDA 수용체 길항제인 ketamine이 항경련제로 사용되어 효과가 있었다는 보고가 있었다.

해마의 구심성 신경(perforant pathway)을 전기 자극하여 만든 중첩 경련 흰쥐 모델에서 후기 중첩경련시기(중첩 경련 30분 이상 경과)에 diazepam,⁷ phenytoin,⁶ phenobarbital⁸ 등을 투여해도 항경련 효과가 없었지만 NMDA 수용체 길항제는 효과가 있었다는 보고와 지속적인 중첩경련 동물실험에서 NMDA 수용체 길항제인 MK-801과 Ketamine이 경련을 효과적으로 조절했다는 보고가 있었다.^{2,9} 또한 4주간의 pentobarbital 치료에도 경련이 조절되지 않던 환자에서 마취 용량의 ketamine을 사용하여 난치성 중첩 경련을 조절하였다는 임상보고¹⁰는 지속적인 중첩경련에서 항경련제로서 ketamine을 사용할 수 있는

Received 15 December 2003

Accepted 19 January 2004

Corresponding author: Yeong-In Kim, M.D., Ph.D., Department of Neurology, The Catholic University of Korea, Kangnam St. Mary Hospital, 505 Banpo-dong, Secho-gu, Seoul 137-701, Korea
E-Mail: nuyikim@cmc.cuk.ac.kr

가능성을 제시하고 있다. 지속적인 중첩경련에서는 glutamate가 방출되어 흥분성 독성에 의해 연결 후 신경세포사를 유발시키는데¹¹⁻¹⁴ ketamine은 중첩 경련에 의한 신경세포사에 대하여 보호 효과를 가지는 장점도 있다.^{15,16}

이러한 연구 결과들을 바탕으로 본 연구에서는 lithium-pilocarpine으로 유발된 중첩경련을 조기 중첩경련 시기(뇌파상 지속적 발작 뇌파가 나오고 10분 경과 후)와 후기 중첩경련 시기(뇌파상 지속적 발작 뇌파가 나오고 60분 경과 후)로 나누어 ketamine이 중첩경련 및 세포 손상에 미치는 영향을 기존의 항경련제인 phenytoin과 비교하고자 하였다.

방 법

재료(실험 동물)

실험동물로는 6주 이상 동일한 조건에서 사육된 250~400 gm의 Sprague-Dawley계의 흰쥐 수컷 50마리를 사용하였으며 실험 기간 중 사료는 시판 고품 사료(제일 사료 주식회사)를 먹여 사육하였다.

뇌파 기록

중첩 경련을 유발시키기 1주일 전에 뇌파 전극을 고정하였다. 흰쥐에게 ketamine 60 mg/kg과 xylene 13 mg/kg를 복강 내 주사하여 마취시킨 다음 정위고정기 위에 올려놓고 두개골을 노출시켰다. 치과용 천공기를 이용하여 양쪽 전두골과 두정골에 구멍을 내고, 김영인 등¹⁷이 고안한 경막외 전극을 심은 뒤 골 시멘트와 치과용 아크릴로 고정시키고 피부를 봉합하였다.

일주일 후에 실험쥐를 투명한 plexiglass cage에서 자유로이 움직일 수 있게 하면서 뇌파를 측정하였다. 뇌파기(Nihon Koden model, Japan)는 1 Hz의 저주파 필터, 70 Hz의 고주파 필터 및 60 Hz의 notch filter를 사용하였고 뇌파 용지의 기록 속도는 15 mm/sec로 하였다.

중첩 경련 모델

Lithium을 3 mEq/kg의 용량으로 복강 내 주사하고 24시간 후에 pilocarpine을 30 mg/kg의 용량으로 복강 내 주사하였다. 주사 후 행동 양상 및 뇌파를 관찰하면서 전신성 중첩 경련을 확인하였다. 중첩 경련이 유발된 후 분비물 증가로 인한 기도 흡입을 방지하기 위해 지속적 발작 뇌파를 확인한 이후에 methylscopolamine(1 mg/kg)을 복강 내 주사하였다.¹⁸

중첩경련 군은 뇌파 상 지속적 발작 뇌파가 나오는 시

점으로부터 10분 후에 ketamine 또는 phenytoin을 투여한 조기 중첩경련 군(Early-Ketamine or Early-Phenytoin)과 60분 후에 ketamine 또는 phenytoin을 투여한 후기 중첩경련 군(late-Ketamine or Late-Phenytoin)으로 나누었다.¹⁹

대조 군과 실험 군

조기 중첩경련 군 및 후기 중첩경련 군을 ketamine(40 mg/kg)투여 군(early-Ketamine, late-Ketamine), phenytoin(50 mg/kg)투여 군(early-Phenytoin, late-Phenytoin), 처치를 하지 않은 대조 군으로 재분류하였다. ketamine 혹은 phenytoin을 투여한 시점으로부터 0.5, 1, 2, 3시간 경과 후에 뇌파의 변화 양상을 관찰하고, 각 시점에서 10초 동안 발생하는 경련 파의 수를 측정하였다.

조직학적 관찰

경련 발생으로부터 72시간 후에 Urethane으로 마취한 다음 가슴을 열고 심장을 거쳐 상행대동맥에 20게이지 바늘을 삽입, 결찰하고 관류하였다. 헤파린이 든 생리 식염수 300 ml와 4% paraformaldehyde 300 ml를 130 cm H₂O의 압력으로 관류하여 고정한 후 뇌를 적출 하였다. 적출 된 뇌는 4% paraformaldehyde에서 4℃를 유지하면서 하룻밤 동안 고정한 다음 30% sucrose 용액에 담근 후 완전히 가라앉은 것을 확인한 다음 액화 질소로 동결시켰다. 동결시킨 조직을 30 μm로 절단하여 cresyl violet stain을 시행하였다.

신경 손상 평가

신경 손상의 평가를 위해 해마의 CA1과 CA3 영역의 피라미드 신경원체를 광학 현미경(BX-50F, Olympus, Japan)으로 관찰하여 살아 있는 세포의 수를 세었다. CA1은 치아 이랑(dentate gyrus) 위까지의 측단 부위를 기준으로 하고, CA2는 신경띠(neuronal band)의 궁륭부(convexity) 외측에 인접한 부위로, CA3는 치아 이랑의 위사지의 측단 부위와 신경띠 궁륭부 외측 사이 부분으로 각각 정하였다.²⁰ 손상 받은 세포는 변성되어 핵의 모양이 위축되고 핵농축(pyknosis)을 보인다고 알려져 있으나, 이것만으로 세포들 간의 명확한 구분이 어려울 때가 있어 Stummer 등²¹의 방법을 따라 신경 손상을 평가하였다. 정량적인 신경 손상의 비교를 위해 현미경 400배의 배율에서 보이는 모든 정상 세포를 세었다. 2개의 연속 절단 표본으로부터 같은 부위에서 좌, 우 양측의 수를 세어 평균값을 구하였다.

통계적 처리

각 실험 군에서 얻은 모든 측정치는 각각 평균±표준편차로 표시하고, 통계적 유의성은 student's t test로 검증하였고 유의수준은 p<0.05로 하였다.

결 과

경련의 관찰

Lithium을 전처치한 실험동물에 pilocarpine을 투여한 후 일반적으로 나타나는 콜린 성 징후는 methylscopolamine을 투여함으로써 경감되었다. 냄새 맡기와 저작 운동이 증가하면서 운동성 경련이 시작되고 점차 악화되어 wet-dog shake와 rearing and falling의 양상을 관찰할 수 있었다. 중첩경련(뇌파 상 지속적 발작 뇌파)의 시작은 pilocarpine 투여 후 62.30±21.31분에 발생하였다.

뇌파의 관찰

10초 동안 발생한 경련 파의 수를 대조 군과 비교하였을 때, 조기 중첩경련 군에서는 ketamine과 phenytoin이 모두 경련 조절에 효과가 있었으나, 후기 중첩경련 군에서는 ketamine만 항경련 효과가 있었다. 특히 ketamine의 항경련 효과는 투여 30분 후부터 관찰되었다(Fig. 1, Table 1).

신경병리

중첩경련 군에서의 신경 세포보호 효과를 평가하기 위해 해마(CA1 및 CA3)에서 살아있는 세포 수를 측정하여 대조 군과 비교하였다. 조기 중첩경련 군에서는 ketamine과 phenytoin이 대조 군과 비교하여 유의한 세포 손상 경감을 보였다(p<0.05) (Fig. 2). 그러나 후기 중첩경련 군에서는 ketamine을 투여한 군(Late-Ketamine)에서 CA1 및 CA3의 세포 수(평균 36.7개 및 16.7개)가 대조 군에 비해 유의하였으나(p<0.05), phenytoin을 투

Table 1. The effects of ketamine and phenytoin on lithium-pilocarpine induced status epilepticus (LPSE). Ketamine decreased the spike frequency during LPSE, and this was significant starting from half an hour of LPSE. In control group, spike frequency was not decreased in the time course of status epilepticus (* : p<0.05 compared with control)

	Hours of monitoring after pilocarpine injection			
	05 hr	1 hr	2 hr	3hr
	Spikes / 10 secs			
Control (n=6)	140 ±3.1	120 ±2.2	111 ±3.0	100 ±2.1
Early-Ketamine (n=6)	20.3±2.1*	13.1±1.9*	11.5±1.3*	11.2±0.9*
Early-Phenytoin (n=6)	31.5±2.8*	20.9±3.1*	18.8±1.9*	15.1±1.5*
Late-Ketamine (n=6)	48.0±4.6*	23.3±3.9*	20.5±2.1*	17.5±0.9*
Late-Phenytoin (n=6)	130.1±8.9	100.2±7.8	89.5±4.9	79.0±8.1

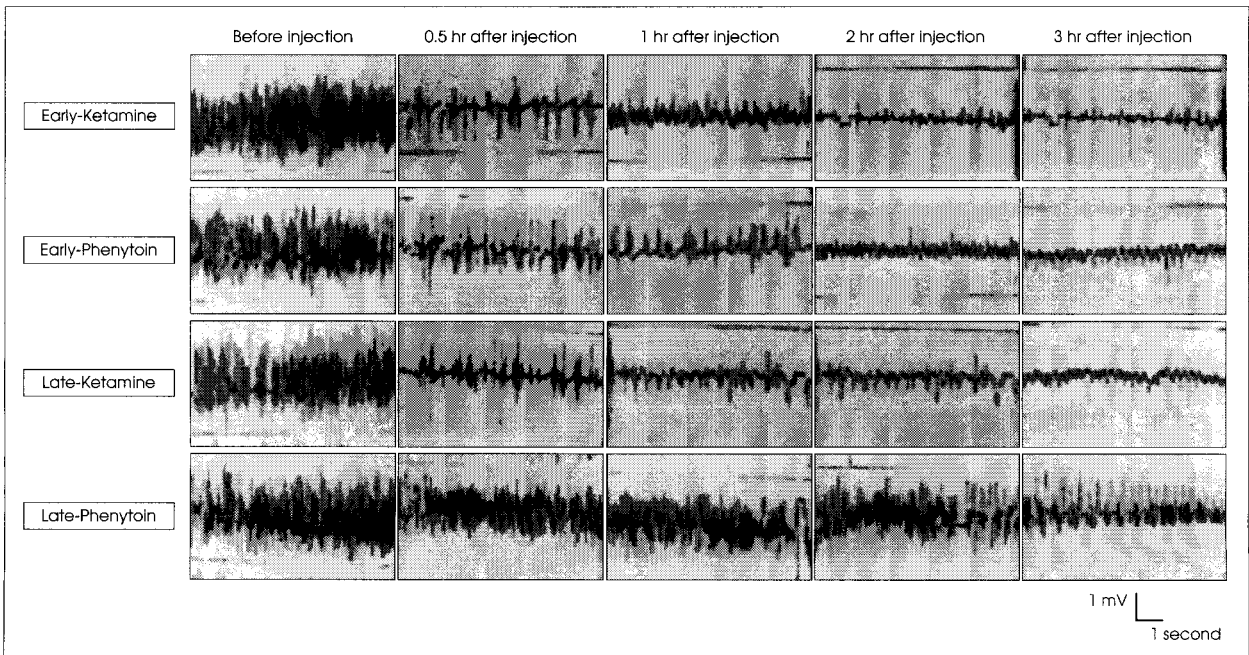


Fig. 1. Representative electrographic activity in the dentate gyrus taken at four time points of li-pilocarpine induced status epilepticus in ketamine-and phenytoin-treated rats. Note that ketamine-treated rats show attenuated or no seizure activity at the time points when the phenytoin-treated rats continue to seize. 10 min after the onset of status epilepticus, rats were treated with ketamine or phenytoin (Early-Ketamine, Early-Phenytoin). 60 min after the onset of status epilepticus, rats were treated with ketamine or phenytoin (Late-Ketamine, Late-Phenytoin).

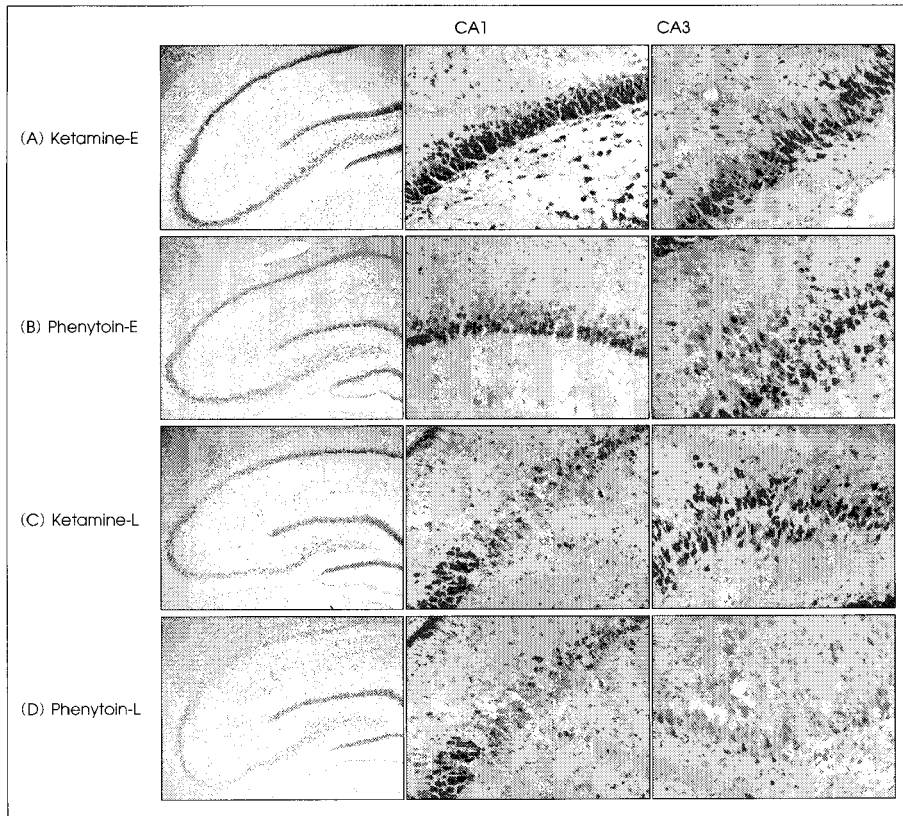


Fig. 2. Neuropathologic alterations in the lithium-pilocarpine induced status epilepticus rat model. 10 min after SE, rat was administered ketamine (A) and phenytoin (B). 60 min after SE, rat was administered ketamine (C) and phenytoin (D). Neuronal damage was assessed by counting the number of viable neurons over CA1 or CA3 ($\times 40$ over hippocampus, $\times 200$ over CA1, CA3, Cresyl violet Nissl stain).

Table 2. The number of viable neurons in lithium-pilocarpine induced status epilepticus. Rats treated with only ketamine, not phenytoin, were protected from severe neuronal injury of CA1 and CA3 hippocampi (* : $p < 0.05$ compared with control)

	CA1	CA3
	No of viable neurons	No of viable neurons
Control (n=6)	7.9 \pm 1.23	2.3 \pm 0.98
Early-Ketamine (n=6)	48.2 \pm 2.43*	29.8 \pm 3.39*
Early-Phenytoin (n=6)	43.9 \pm 3.22*	24.3 \pm 3.31*
Late-Ketamine (n=6)	36.7 \pm 2.98*	16.7 \pm 3.19*
Late-Phenytoin (n=6)	16.7 \pm 1.21	9.8 \pm 0.87

여한 군(Late-Phenytoin)에서의 CA1 및 CA3의 세포 수(평균 29.7개 및 9.8개)는 대조 군과 큰 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$) (Fig. 2, Table 2). 세포 손상의 정도는 경련 파의 횟수와 상관성이 있었다($p < 0.05$).

고 찰

본 연구를 통하여 지속적인 중첩경련에서 항경련 효과가 phenytoin 보다 ketamine이 더 효과적이었고 또한 ketamine은 신경 세포 보호 작용이 있음을 확인할 수 있

었다.

중첩경련은 시간경과에 따라 항경련제에 대한 반응이 감소되는 기전으로 GABAA 수용체의 구조 혹은 기능의 변화와^{1,3,5,22,23} NMDA 수용체의 활성화 및 알려지지 않은 여러 기전이 작용한다고 알려져 있다.⁶⁻⁸ 본 연구에서 ketamine과 phenytoin이 모두 초기 중첩경련 시기에는 경련조절에 효과가 있었으나 후기 중첩경련 시기에서는 ketamine만 항경련 효과가 관찰되었다. 이는 NMDA 수용체가 “use-dependent”하여 경련이 반복되어야 활성화되므로 항경련 효과는 중첩경련의 시간 경과에 따라 더욱 효과적이라는 이전 보고와 일치한다.⁹

NMDA 수용체 길항제가 항경련제 인가에 대해서는 아직 이견이 있으나,²⁴⁻²⁶ NMDA 수용체 길항제가 일반 항경련제와 달리 경련의 burst firing 빈도는 감소시키지 못해도, burst firing의 후반부(late component)를 구성하는 칼슘 작용을 억제하는 것을 고려할 때, NMDA 수용체 길항제가 항경련 효과와 동시에 신경 세포보호효과도 나타냄을 의미한다.⁸

Borris 등⁸은 self-sustained status epilepticus 흰쥐 모델에서 ketamine이 호흡 마비와 다른 치명적인 부작용을 유발하지 않으면서 효과적으로 항경련 효과를 보이는 용량(ED 50)을 58 mg/kg라고 하였으며, 150 mg/kg

를 투여한 경우에 20%가 호흡마비를 보였고 200 mg/kg를 투여한 경우에는 100% 모두 호흡마비를 보였다고 한다. 그러나 용량에 대해서는 정형화된 연구가 좀더 필요할 것으로 생각되며, 이 연구에서는 Borris 등의 연구결과를 바탕으로 40 mg/kg의 ketamine을 사용하였다.

Ketamine의 반감기는 2~3시간이고, 간에서 cytochrome P450 매개 산화 과정을 통해 대사되어 약리학적으로 활동성이 있는 norketamine 대사물로 변환되는데,^{10,27} 항경련 효과는 NMDA 수용체의 phencyclidine 인식 부위에 부착하여 작용한다.²⁸ Ketamine은 단독 사용으로 경쟁적, 비경쟁적인 NMDA 수용체 길항 작용에 의하여 후대상회전(cingulate)과 팽대 후방 피질(retrosplenial cortex)에 일시적인 세포질내 공포화를 유발시키며 이로 인하여 일시적인 정신증상이 유도될 수 있다. 이런 병리 소견은 24시간 이내에 가역적으로 정상화되며, 항콜린 약제나 diazepam, phenobarbital을 병용 투여하면 이러한 일시적인 장애를 억제할 수 있다.¹¹ 따라서 임상적으로 ketamine을 사용할 때에는 midazolam, diazepam, 또는 phenobarbital을 병용 투여해서 정신증상이 발생되지 않도록 주의해야 한다.

Ketamine은 중첩 경련의 항경련제 목록에는 언급되어 있지 않으나,²⁹ 기존 약물에 비하여 지속적인 항경련 효과가 있는 점과 더불어 강력한 신경 보호 효과가 있다는 장점을 고려할 때 난치성 경련에 유효한 치료제로 이용될 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 향후 중첩경련에서 ketamine의 치료효과가 확립되기 위해서는 더 많은 실험이 필요할 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Walton NY, Treiman DM. Response of status epilepticus induced by lithium and pilocarpine to treatment with diazepam. *Exp Neurol* 1988;191:267-75.
2. Bertram EH, Lothman EW. NMDA receptor antagonists and limbic status epilepticus: a comparison with standard anticonvulsants. *Epilepsy Res* 1990;5:177-84.
3. MacDonald RL, Olsen RW. GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:569-602.
4. DeLoreszo RJ, Pellock JM, Towne A, Boggs JG. Epidemiology of status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* 1995;12:316-25.
5. Kapur J, Macdonald RL. Rapid seizure-induced reduction of benzodiazepine and Zn²⁺sensitivity of hippocampal dentate granule cell GABAA receptors. *J Neurosci* 1997;17:7532-40.
6. Mazarati AM, Balwin RA, Sofia RD, Wasterlain CG. Felbamate in experimental model of status epilepticus. *Epilepsia* 2000;41(2):123-7.
7. Mazarati AM, Wasterlain CG. NMDA receptor antagonists abolish the maintenance phase of self-sustaining status epilepticus. *Neurosci Lett* 1999;265:187-90.

8. Borris DJ, Bertram EH, Kapur J. Ketamine controls prolonged status epilepticus. *Epilepsy Res* 2000;42:117-22.
9. Williamson JM and Lothman EW. The effect of MK-801 on kindled seizures: implications for use and limitations as an antiepileptic drug. *Ann Neurol* 1989;26:85-90.
10. Sheth RD, Gidal BE. Refractory status epilepticus: Response to ketamine. *Neurology* 1998;51:1765-6.
11. Olney JW, Labruyere JW, Price MT. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* 1989;244:1360-2.
12. Clifford DB, Zorumski CF, Olney JW. Ketamine and MK-801 prevent degeneration of thalamic neurons induced by focal cortical seizures. *Exp Neurol* 1989;105:272-9.
13. Meldrum B. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res* 1991;10:55-61.
14. Wasterlain CG, Fujikawa DG, Penix L, Sankar R. Pathophysiological mechanism of brain damage from status epilepticus. *Epilepsia* 1993;34(Suppl 1):S37-S53.
15. DeGiorgio CM, Tomiyasu U, Gott PS, Treiman DM. Hippocampal pyramidal cell loss in human status epilepticus. *J Clin Neurophysiol* 1992;33:23-7.
16. Fujikawa DG, Daniels AH, Kim JS. The competitive NMDA receptor antagonist CGP 40116 protects against status epilepticus induced neuronal damage. *Epilepsy Res* 1994;17:207-19.
17. Kim YI, Lee KS, Kim BS, Kim YJ, Chun MH, Kim MS. Characteristics of Lithium-Pilocarpine Seizure Model: Behaviors, Electroencephalography, Fos Expression and Neuropathologic changes. *J Korean Neurol Assoc* 1996;14:74-88.
18. Morrisett RA, Jope Rs, Snead III OC. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Exp Neurol* 1987;97:193-200.
19. Treiman DW, Walton NY, Wichboldt C, Degiorgio C. Predictable in sequence of EEG changes during generalized convulsive status epilepticus in the rat. *Neurology* 1987;37:244-5.
20. Amaral DG and Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 1989;31:571-91.
21. Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke* 1994;25:1862-9.
22. Kapur J and Coulter DA. Experimental status epilepticus alters GABA_A receptor function in CA1 pyramidal neurons. *Ann Neurol* 1995;38:893-900.
23. Kapur J. Status epilepticus in epileptogenesis. *Curr Opin Neurol* 1999;12:191-5.
24. Meldrum BS, Croucher MJ, Badman G, Collins JF. Antiepileptic action of excitatory amino acid antagonists in the photosensitive baboon, Papio papio. *Neurosci Lett* 1983;39:101-4.
25. Meldrum BS, Chapman AG, Patel S, Swan JH. *Competitive NMDA Antagonists as Drug*, IRL Press, Oxford 1989:207-16.
26. Chapman AG and Meldrum BS. Noncompetitive NMDA antagonists protect against sound-induced seizures in DBA/2 mice. *Eur J Pharmacol* 1989;66:201.
27. Kohrs R and Duries ME. Ketamine: Teaching an old drug new tricks. *Anesth Analg* 1998;87:1186-93.
28. Lodge D and Johnson KM. Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11:81-6.
29. Lowenstein DH. Status epilepticus: an overview of the clinical problem. *Epilepsia* 1999;40(Suppl 1):S3-S8.