

Mongolian Gerbil에서 유발시킨 일과성 전뇌허혈로 인한 Polyamine 함량변동과 해마신경세포손상에 대한 Melatonin 투여의 억제작용

계명대학교 의과대학 가정의학교실,¹ 신경외과학교실,² 약리학교실³
장영식¹ · 김대현¹ · 서영성¹ · 임만빈² · 이성룡³

Effect of Melatonin on Brain Polyamine Contents and Hippocampal Neuronal Damage after Transient Global Ischemia in Mongolian Gerbil

Young-Sik Jang, MD¹, Dae-Hyun Kim, MD¹, Young-Sung Suh, MD¹,
Man-Bin Yim, MD² and Seong-Ryong Lee, MD³

¹Departments of Family Medicine, ²Neurosurgery, and ³Pharmacology, School of Medicine, Keimyung University, Daegu, Korea

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to examine whether melatonin has a neuroprotective effect against hippocampal neuronal damage following transient global ischemia in a gerbil. Polyamine is known to play a role in the pathophysiology of ischemic neuronal damage, we evaluated the influences of melatonin on the polyamine level as well as histology. **Material and Methods :** Male Mongolian gerbils (60-80 g) were used in this study. Transient global ischemia was induced by occlusion of the bilateral common carotid arteries for 3 min with micro-clips. Melatonin was administered immediately after occlusion. The animals were decapitated 24 h after the occlusion for polyamine measurement by a high performance liquid chromatography (HPLC) and 4 days after the occlusion for histological evaluation (hematoxylin and eosin staining). A histological examination was performed by a blinded investigator. **Results :** The hippocampal putrescine level increased compared to sham-operated animals and the increase of putrescine was attenuated by 20 mg/kg melatonin administration. Spermidine and spermine levels didn't show significant changes after ischemia. Hippocampal neuronal damage in the CA1 region was markedly observed in vehicle-treated animals compared to sham-operated animals. Melatonin administration (10 or 20 mg/kg) significantly inhibited hippocampal CA1 neuronal damage after ischemia compared to corresponding vehicle-treated animals ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). **Conclusion :** Melatonin attenuates the putrescine level after transient global ischemia and may have putative neuroprotective effects against global ischemia induced neuronal damage. (Kor J Cerebrovascular Disease 4:46-51, 2002)

KEY WORDS : Global ischemia · Gerbil · Polyamine · Hippocampus · Neuronal damage · Melatonin.

서론

포유류에 존재하는 polyamine은 putrescine, spermidine, 그리고 spermine으로 세 종류가있으며 polyamine은 거의 모든 종류의 세포에 존재하고, 세포의 성장이나 발육에 관여

하는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾²⁶⁾ 내인성 polyamine은 중추신경계에서 다양한 효과를 가지는데 주로 신경전달체나 신경조절물질로 작용한다.²⁸⁾ 또한 뇌내 polyamine은 다양한 종류의 화학 및 물리적 자극 등에 대해 민감하게 반응하며, polyamine의 생합성이 증가되어 축적될 경우 신경세포 손상, 뇌부종 및 혈뇌장벽(blood brain barrier)의 파괴 등을 일으킨다.²²⁾ Polyamine은 세포내 칼슘 함량을 증가시키고⁹⁾ 흥분성 아미노산을 유리시키는 작용을 나타낸다.⁶⁾ Paschen 등¹⁷⁾의 연구에서 허혈과 polyamine의 대사와의 관계를 보고하였는데, 특히 putrescine은 정상적으로 매우 낮은 용량으로 존재하나 외부자극으로 지속적인 함량증가상태가 되

논문접수일: 2001년 12월 14일
심사완료일: 2002년 6월 19일
교신저자: 이성룡, 700-712 대구광역시 중구 동산동 194
계명대학교 의과대학 약리학교실
전화: (053) 250-7478 · 전송: (053) 252-1605
E-mail: srlee@dsmc.or.kr

면 신경세포에 매우 유해하다고 알려져 있다. 따라서 polyamine 대사에 관련된 효소를 억제하여 polyamine의 과다한 축적을 억제함으로써 뇌를 보호하려는 연구들이 시도되고 있다.^{11,4)}

송과선 호르몬인 melatonin은 신경내분비계에서 중요한 역할을 하며¹²⁾ 강력한 항산화제로 알려져 있다.^{20,27)} Cho 등³⁾의 보고에 의하면 melatonin은 백서에서 유발시킨 전뇌 허혈에서 해마 CA 1 부위의 신경세포를 보호한다고 하였다. 또한 gerbil에서 전뇌허혈에 의한 nitric oxide 및 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)의 생성을 억제한다고 알려져 있다.⁵⁾

본 연구는 Mongolian gerbil에서 전뇌허혈에 의한 polyamine의 함량변동 및 해마신경세포손상을 관찰하고, 이에 대한 melatonin 투여의 억제작용을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

본 실험에 사용된 Mongolian gerbil은 몸무게 60~80 g의 용성으로 같은 장소에서 동일한 사료로 1주일 이상 사육한 후 사용하였다.

2. 전뇌허혈 유발 수술 및 약물 투여

Chloral hydrate(400 mg/kg)를 실험동물의 복강내에 투여하여 마취하고 목 중앙에 2 cm 정도의 피부를 절개한 후 양측 총경동맥을 주위신경 정맥들로부터 조심스럽게 분리한 후 미세 클립(microclip)으로 3분간 결찰 한 후 재관류하였다. 재관류는 육안으로 확인하였고 이후 피부를 봉합하였다. 저체온의 영향을 배제하기 위해 열판(heating pad) 및 백열등을 이용하여 직장온도를 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 로 유지하였다.

Melatonin(Sigma Chemical Co., St. Luise, MO)은 100% ethanol에 녹인 후 최종 ethanol의 농도가 5% 이하가 되도록 증류수로 희석시켰으며, 투여 용량은 5, 10, 및 20 mg/kg으로 하였다. 약물투여는 복강내로 투여하였다.

3. 실험군

본 실험의 허혈 유발 시간은 3분이었다. 본 실험의 대상 군들은 sham 수술군(n=9)으로 마취 후 총경동맥을 노출시키고 허혈 및 약물처치를 하지 않은 대조군으로 하였으며, 허혈 손상군으로 melatonin 투여 량과 동일한 양의 5% ethanol을 허혈손상 직 후에 투여한 vehicle 투여군(n=10)과 melatonin 처치군으로 melatonin(5, 10, 및 20 mg/kg)을 허혈유발 직 후에 투여한 군(각각 n=10, 10, 13)으로 나누었다.

4. Polyamine 추출 및 측정

Polyamine의 추출과정은 Spragg 및 Hutchings의 방법²⁵⁾에 준하여 실시하였다. 수술 4일째 실험동물을 희생시킨 후 대뇌를 꺼내어 해마를 즉시 분리한 후 Eppendorf 튜브에 담아 -70°C 에 보관하였다. 해마조직을 유리 마쇄기(glass homogenizer)로 용량 10배에 해당하는 0.4 M perchloric acid 용액(2 mM disodium EDTA 및 4×10^{-5} M의 1,8-diaminooctane을 함유)을 첨가 한 후 균질화시켰다. 원심분리(12,000 g, 4°C , 15 min) 후 상층액을 추출하여 진공 건조시킨 후 1 M의 sodium bicarbonate용액 100 μl 를 넣어 용해시킨 후 300 μl 의 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluoride(FNBT) 시약을 넣어 60°C 에서 20분간 반응시키고 40 μl 의 1 M histidine를 첨가하여 5분간 추가반응 시킨 후 얼음으로 냉각시켰다. 그 후 2 ml의 2-methylbutane으로 2회 polyamine을 추출했다. 10분간 원심분리 후 유기용매층을 분리하여 다른 튜브에 옮겨, 진공건조 시킨 후 메탄올로 재용해 시켰다. 재용해시킨 용액 20 μl 를 크로마토그래피 기기에 적용시켜 분석하였다. 크로마토그래피에 이용된 이동상(mobile phase)은 acetonitrile과 증류수의 비율을 85대 15로 하였고 항상 사용전 탈기(degassing) 후 사용하였고 이동상의 유속은 분당 1 ml로 하였으며 한 샘플당 약 20분의 분석시간이 소요되었다. Column은 Rainin사의 ODS C18 column(250 mm \times 4 mm)을 사용하였다. Polyamine 분석은 자외선(ultraviolet) 검출기를 이용해 242 nm에서 측정하였다.

5. 조직학적 검사

허혈유발 4일 후 chloral hydrate로 gerbil을 깊이 마취시키고 흉곽을 열고 좌심실을 통해 헤파린(heparin)으로 처리된 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.2)과 10% formalin 고정액으로 관류시켰으며 우심방을 절개하여 용액이 흘러나오도록 하였다. 두개골에서 뇌를 꺼낸 후 10% formalin으로 추가 고정시켰다(24 시간). 뇌를 파라핀으로 embedding 시키고 rotary microtome을 이용하여 6 μm 두께의 관상절편(coronal section)을 제작하였다.¹⁰⁾ 관상절편을 hematoxylin 및 eosin으로 염색하였다. 해마 CA1 부위의 신경세포손상정도는 정상 신경세포를 현미경하에서 counting 하여 결정하였다(좌·우 양측 해마의 CA1 부위 중 1 mm 길이에 존재하는 정상 추상세포를 관찰하여 평균의 수치 결정).⁷⁾

6. 시 약

Putrescine, spermidine, spermine, 및 1, 8-diaminooctane은 Sigma사(Sigma Chemical Co., USA)의 제품을 사용하였다. FNBT는 Aldrich사(Sigma-Aldrich Chemical

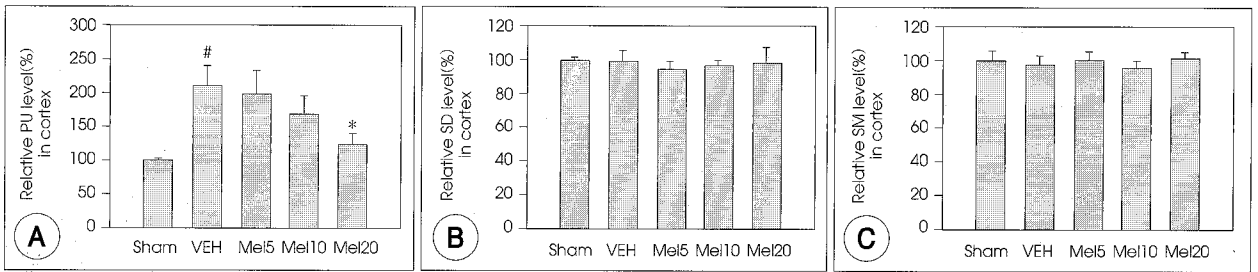


Fig. 1. Changes of putrescine (A), spermidine (SD), and spermine (SM) levels (%) in the gerbil cortex after 3 min of transient global ischemia and effects of melatonin administration. # : $p < 0.05$ in comparison with sham-operated gerbils, * : $p < 0.05$ in comparison with vehicle-treated gerbils (VEH). Sham : sham-operated (n=4), VEH : vehicle-treated (n=4), MEL5, MEL10, and MEL20 : melatonin-treated gerbils (5, 10, and 20 mg/kg, respectively ; n=4, 4, and 5, respectively).

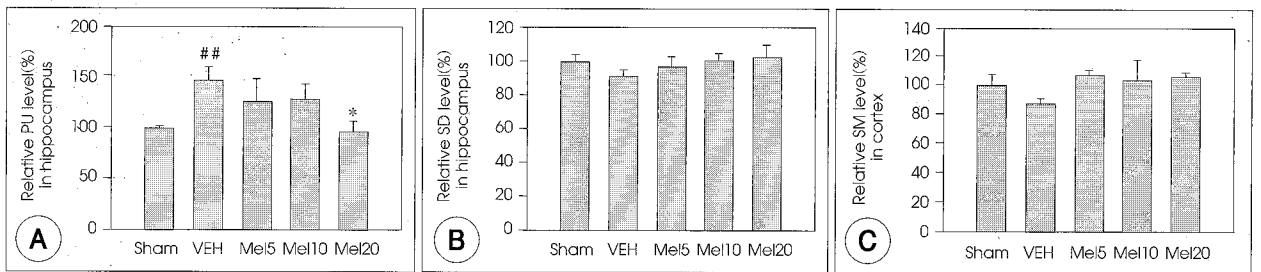


Fig. 2. Changes of putrescine (A), spermidine (SD), and spermine (SM) levels (%) in the gerbil hippocampus after 3 min of transient global ischemia and effects of melatonin administration. ## : $p < 0.01$ in comparison with sham-operated gerbils, * : $p < 0.05$ in comparison with vehicle-treated gerbils (VEH). Sham : sham-operated (n=4), VEH : vehicle-treated (n=4) ; MEL5, MEL10, and MEL20 : melatonin-treated gerbils (5, 10, and 20 mg/kg, respectively ; n=4, 4, and 5, respectively).

Co., USA)의 제품을 사용하였다. Acetonitrile은 J.T. Baker 사(J.T.Baker Co., USA)의 제품을 사용하였다.

7. 통계분석

본 실험의 결과 분석(polyamine 및 조직학)은 ANOVA 및 post hoc Scheffe's test를 이용해 시행하였다. 모든 실험 결과는 평균±표준오차로 표시하였고, p값이 0.05 미만 일 때 통계학적으로 의의가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

1. 허혈에 의한 Polyamine의 반응에 대한 melatonin의 영향

대뇌피질의 putrescine 함량은 대조군에 비하여 허혈군에서 110% 증가하였으며 melatonin 20 mg/kg 투여 군에서는 억제되었으며($p < 0.05$), melatonin 5 및 10 mg/kg 투여 군에서는 억제되지 않았다. 해마의 putrescine 함량은 대조군에 비하여 허혈군에서는 46% 증가하였으며 melatonin 20 mg/kg 투여군에서 유의하게 억제되었으며($p < 0.05$), melatonin 5 및 10 mg/kg 투여에 의해 억제되지 못하였다 (Figs. 1 and 2). 대뇌피질 및 해마의 spermidine과 spermine 함량들은 허혈로 인한 유의한 함량변동을 보이지 않았으며 melatonin 투여군에서도 함량 변동에 영향을 주지 않았다(Figs. 1 and 2).

2. 조직학적 소견

Gerbil의 조직 절편에 대한 광학현미경하의 관찰소견은 해마 CA1 부위의 추체신경세포가 허혈-재관류로 현저히 파괴되었으며($p < 0.01$), 이러한 신경세포 손상은 melatonin의 10 mg/kg 및 20 mg/kg 투여에 의해 각각 유의하게 억제되었다(각각 $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$, Figs. 3 and 4). 그러나 저용량인 5 mg/kg 투여에 의해서는 신경세포 손상을 억제시키지 못하였다.

고 찰

본 연구에서 고용량의 melatonin의 투여가 일과성 전뇌허혈에 의해 유발된 해마의 추체신경세포 손상을 억제하였고 허혈손상과 밀접한 polyamine의 함량, 특히 putrescine의 함량증가를 억제하였음을 관찰하였다.

뇌내 polyamine함량은 간질발작, kainate의 투여에 의한 흥분성 뇌신경손상, 허혈에 의한 손상 등 다양한 자극이나 손상에 의해 영향을 받을 수 있으며, 또한 손상기전에 주요한 기전이 되기도 한다.¹¹⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾²⁰⁾ Polyamine 중 putrescine 함량은 세포괴사 정도와 밀접한 관계가 있다. 또한 polyamine은 괴사가 진행되는 신경세포에서 분비되어 이웃하는 다른 신경세포들의 NMDA수용체에 결합하여 흥분성 신경독

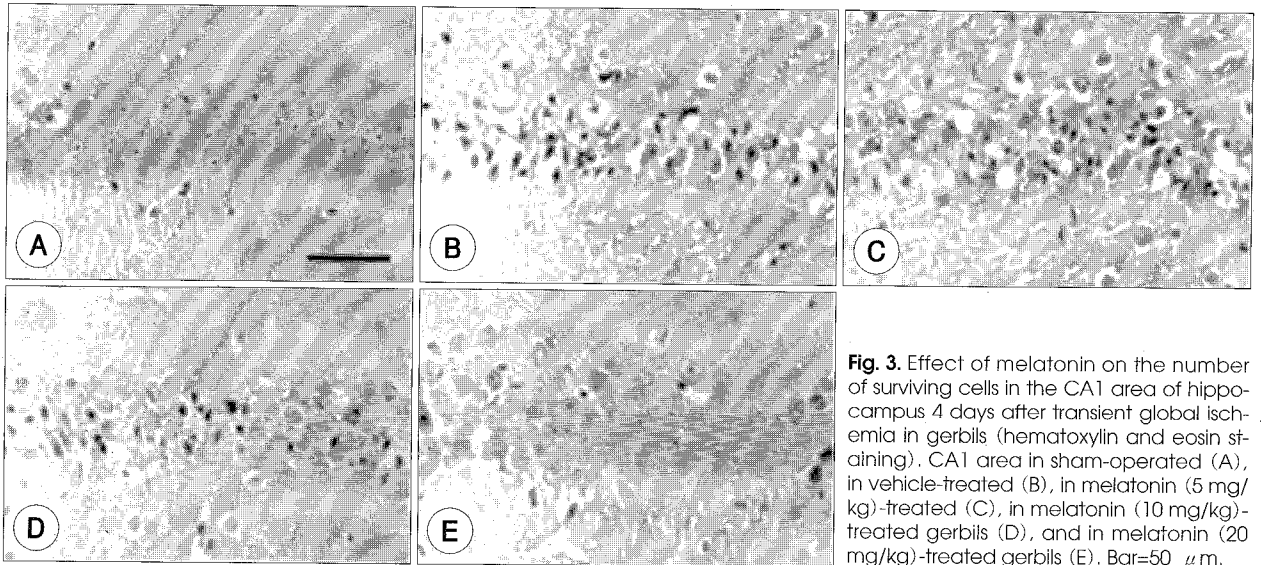


Fig. 3. Effect of melatonin on the number of surviving cells in the CA1 area of hippocampus 4 days after transient global ischemia in gerbils (hematoxylin and eosin staining). CA1 area in sham-operated (A), in vehicle-treated (B), in melatonin (5 mg/kg)-treated (C), in melatonin (10 mg/kg)-treated gerbils (D), and in melatonin (20 mg/kg)-treated gerbils (E). Bar=50 μ m.

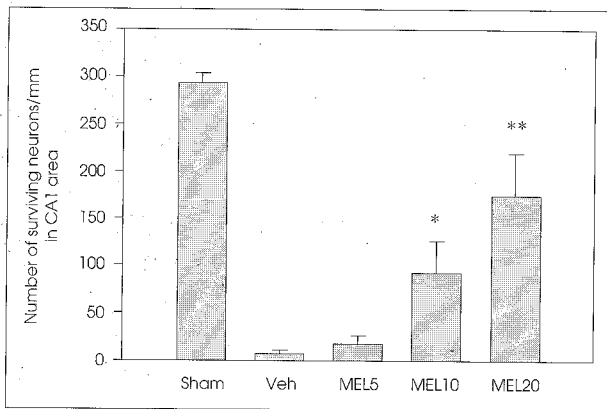


Fig. 4. Effect of melatonin on the number of surviving cells in the hippocampal CA1 area 4 days after transient global ischemia in gerbils. There are significant differences in number of surviving neurons between vehicle-treated and melatonin-treated gerbils (10 and 20 mg/kg, respectively). Data are presented as the mean \pm S.E.M. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ in comparison with sham-operated gerbils: Sham : sham-operated (n=5), VEH : vehicle-treated (n=6) ; MEL5, MEL10, and MEL20 : melatonin-treated gerbils (5, 10, and 20 mg/kg, respectively : n=5, 6, and 8, respectively).

작용으로 악영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 또한 polyamine은 세포내의 칼슘이온 함량을 증가시킴으로써 신경세포손상을 유발하는 것으로 알려져 있다.

Polyamine은 허혈-재관류에 기인된 뇌조직의 부종 및 신경세포소실에 중요한 작용을 하는 것으로 알려져 있으며,⁴⁾¹⁷⁾ 냉각(cold)에 의해 유발된 뇌손상과 관련된 것으로 알려져 있다.⁹⁾ Paschen 등¹⁷⁾은 흰쥐의 전뇌허혈 모델에서 polyamine 생성 시 주요 속도조절단계 효소인 ornithine decarboxylase(ODC)의 활성 억제제인 alpha-difluoromethylornithine(DFMO)을 처치하므로써 putrescine 함량이 유의하게 감소한 것을 관찰하였고, Baskaya 등¹⁾은 ODC

를 억제시키면 허혈에 의한 부종형성이 억제된다고 보고하였다. 일과성 전뇌허혈에 의해 해마 CA1 부위의 신경세포가 선택적으로 손상을 입는데,²³⁾ Paschen 등¹⁷⁾은 세포손상을 선행하여 해마의 polyamine 함량변동을 전뇌허혈 및 재관류를 실시 후 측정하여 polyamine의 생화학적 중요성을 보고하였다.

최근 뇌손상과 관련 그 중요성이 증가하는 뇌내 물질 중 하나인 melatonin은 송과선에서 serotonin으로부터 합성되며 항암작용, 노화억제, 수면유도 및 시차적응 등의 여러 측면에서 사회적으로도 많은 사람들의 관심을 끄는 신경 호르몬이다. Melatonin은 강력한 항산화제로 알려져 있으며²¹⁾ 흥분성 신경독작용에 의한 apoptosis성 신경세포사를 줄인다는 보고가 있다.²⁴⁾ 본 연구에서는 전뇌허혈에 의한 지연성 신경세포사를 관찰하기 위하여 3분간 양측 총경동맥을 폐쇄한 후 96시간 동안 재관류시켰고 이로 인한 해마 CA1 신경세포손상이 melatonin 투여(10, 혹은 20 mg/kg)에 의해 유의하게 억제되었으나 저용량에 의해서는 손상을 억제하지 못하였다. 이러한 결과는 백서에서 전뇌허혈 모델을 이용한 Cho 등³⁾의 실험과 같이 melatonin투여로 인한 신경세포손상에 대한 보호작용을 확인 할 수 있었다. 그들의 보고에서는 10 mg/kg의 melatonin을 허혈 30분전 혹은 1시간 후 복강내 투여하였으나 해마 CA1부위의 신경세포를 허혈손상에서 보호하지 못하였다. 본 실험에서는 10 mg/kg의 용량을 허혈 직 후에 투여하여 손상을 억제하였고 고용량 즉, 20 mg/kg으로 투여하여 현저한 신경세포손상억제를 관찰할 수 있었다. 본 연구에서 관찰된 전뇌허혈손상에 대한 melatonin의 방어효과는 투여량 및 투여시기가 매우 중요한 것으로 사료된다.

한편 신경세포손상과 깊은 관련이 있는 것으로 알려진 polyamine 특히 손상기전에 관여하는 putrescine의 함량변동이 대뇌피질 및 해마 모두에서 허혈-재관류에 의해 증가하였고 이러한 증가는 melatonin 20 mg/kg의 투여로 인해 억제되므로써 melatonin이 polyamine 대사에 영향을 주는 것으로 보인다. 그러나 조직학적 소견에서 신경세포 보호작용을 보인 10 mg/kg의 투여 후 putrescine의 함량은 유의한 억제를 보이지 않았는데 이는 melatonin의 다른 보호작용기전에 의한 것으로 생각되며 이에 대한 추가의 연구가 필요할 것으로 보인다. 한편, spermidine과 spermine 함량은 허혈에 의해 유의한 변동을 보이지 않았으며 melatonin의 투여에 의해서도 유의한 함량변동을 보이지 않았다. Carter 등²⁾은 그들의 보고에서 흰쥐 대뇌피질에서 영구적 중뇌동맥 폐쇄에 따른 손상에서 spermidine의 유리를 관찰하였다. 또한, 이들 실험에서 putrescine 분비는 중뇌 동맥 폐쇄 후 실험 동물 중 40% (2/5)의 동물에서 유의하게 증가하였다. 반면 spermine은 대조군 혹은 중뇌동맥 폐쇄군에서 대뇌피질에서 전혀 분비가 이루어진 증거는 없었다. 이 실험에서도 역시 spermidine과 spermine은 melatonin에 의한 유의한 함량변동을 보이지 않았다. Paschen 등¹⁷⁾은 gerbil에서 전뇌허혈로 인한 polyamine의 함량변동을 관찰한 결과 재관류 후 putrescine이 현저하게 증가하였고 허혈손상 정도에 비례하게 putrescine의 함량이 증가하였다. 또한 그들의 보고¹⁷⁾에서 심한 신경조직괴사에서 spermidine과 spermine이 오히려 감소한 것으로 보고하였는데 본 연구에서 보이는 spermidine과 spermine의 결과와의 차이는 허혈손상 정도의 차이에서 비롯되는 것으로 생각된다. 전뇌허혈에 기인된 ODC의 활성화에 의한 putrescine 함량증가는 S-adenosylmethionine decarboxylase를 활성화시켜 spermidine과 spermine의 함량 증가를 예상할 수 있으나, 전뇌허혈에 의해 spermidine/spermine N¹-acetyltransferase (SSAT) 역시 활성화되어 이로 인해 spermidine과 spermine의 아세틸화가 일어나 putrescine으로의 전환이 촉진되어 spermidine과 spermine의 함량이 유의하게 증가하지 않거나 오히려 감소할 수 있는 것으로 생각된다. 본 연구에서 허혈로 인한 spermidine과 spermine의 함량에 변동이 없었던 것은 외부자극에 의해 뇌내 polyamine 중 spermidine과 spermine의 함량의 경우 유의한 변동이 없거나 오히려 유의하게 감소한다는 연구²⁾와 일치하는 결과다. 일반적으로 심한 허혈손상과 미약한 허혈손상은 그 병리생리적 손상이 다른 것으로 알려져 있는데 즉 허혈시간이 긴 심한 손상의 경우 괴사형태의 세포사가 증가 되며, 미약한 허혈손상에 의해서는 주로 apoptosis형태의 세포사가 일어나는 것으로 보고되었

다.¹⁴⁾ Polyamine이 이러한 신경세포사 차이에 어떻게 관여되는지는 추후에 실험이 필요할 것으로 생각된다.

이 실험에서 유발시킨 일과성 전뇌허혈로 인한 polyamine의 증가는 putrescine이 가장 민감하게 반응하는 것으로 관찰되었다. 따라서 polyamine 중 putrescine의 함량변동이 신경세포손상을 가늠하는 생화학적 척도로 의미를 가질 수 있을 것으로 사료된다. 이상의 연구결과 melatonin 투여는 전뇌허혈에 의한 putrescine의 함량억제 및 해마신경세포손상에 대한 보호작용을 가지며 임상적으로 허혈성 신경손상 억제에 이용될 수 있는 근거를 제시하였다고 판단된다.

결론

본 연구는 강력한 항산화제로 알려진 melatonin의 투여가 gerbil에서 유발시킨 일과성 전뇌허혈에 의한 polyamine 함량 및 해마신경세포손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였는데 전뇌허혈 후 대뇌피질 및 해마의 putrescine (PU) 함량이 대조군에 비해 유의하게 증가하였으며 이러한 증가는 melatonin의 투여에 의해 각각 유의하게 억제되었다. Spermidine (SD)과 spermine (SM) 함량은 허혈에 의해 유의한 변동을 보이지 않았으며 melatonin의 투여에 의해서도 유의한 변동이 없었다. 전뇌허혈로 인한 조직학적 소견의 변화는 CA1 부위의 추체신경세포들이 현저히 파괴되었으며 melatonin의 투여(10 mg/kg 및 20 mg/kg)에 의해 허혈에 의한 손상이 유의하게 억제되었다. 본 연구의 결과를 미루어 보아 melatonin의 투여에 의해 뇌허혈손상을 억제할 수 있을 것으로 사료되며 임상적으로 뇌신경손상을 억제할 수 있는 방안을 제시하였다고 생각된다.

중심 단어 : 전뇌허혈 · Gerbil · Polyamine · 해마 · 신경세포 손상 · Melatonin.

REFERENCES

- 1) Baskaya MK, Rao AM, Puckett L, Prasad MR, Dempsey RJ. Effect of difluoromethylornithine treatment on regional ornithine decarboxylase activity and edema formation after experimental brain injury. *J Neurotrauma* 13: 85-92, 1996
- 2) Carter C, Poinet H, Carboni S, Fage D, Voltz C, Scatton B. Release of spermidine from the rat cortex following permanent middle cerebral artery occlusion. *Fundam Clin Pharmacol* 9:129-40, 1995
- 3) Cho S, Joh TH, Baik HH, Dibinis C, Volpe BT. Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res* 755:335-8, 1997
- 4) Dempsey RJ, Carney JM, Kindy MS. Modulation of ornithine decarboxylase mRNA following transient ischemia in the gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 979-85, 1991
- 5) Guereto JM, Reiter RJ, Ortiz GG, Pablos MI, Sewerynek E, Chuang JJ. Melatonin prevents increases in neuronal nitric oxide and cyclic

- GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Pineal Res* 23:24-31, 1997
- 6) Iqbal Z, Koenig H. Polyamines appear to be second messengers in mediating Ca^{++} fluxes and neurotransmitter release potassium-depolarized synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 133:563-73, 1985
 - 7) Izumiya K, Kogure K. Prevention of delayed neuronal death in gerbil hippocampus by ion channel blockers. *Stroke* 19:1003-7, 1988
 - 8) Koenig H, Goldsteine AD, Lu Ch-Y. Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. *Nature* 305:530-4, 1983
 - 9) Koenig H, Goldsteine AD, Lu CY. Blood-brain barrier breakdown in cold-injured brain is linked to a biphasic stimulation of ornithine decarboxylase activity and polyamine synthesis: both are coordinately inhibited by verapamil, dexamethasone, and aspirin. *J Neurochem* 52:101-9, 1989
 - 10) Lee SR, Kim SP, Kim JE. Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils. *Neurosci Lett* 281:183-6, 2000
 - 11) Lee YK, LeeSR, Kim CY. Melatonin attenuates the changes in polyamine levels induced by systemic kainic acid administration in rat brains. *J Neurol Sci* 178:124-31, 2000
 - 12) Maestroni GJM, Conti A, Pierpaoli W. Role of the pineal gland in immunity: II. circadian synthesis and release of melatonin modulates the antibody response and antagonizes the immunosuppressive effect of corticosterone. *Clin Exp Immunol* 68:384-91, 1987
 - 13) Martínez E, de Vera N, Artigas F. Differential response of rat brain polyamines to convulsant agents. *Life Sci* 48:77-84, 1991
 - 14) Mehmet H, Yue X, Penrice J, Cady E, Wyatt JC, Sarraf C, Squier M, Edwards AD. Relation of impaired energy metabolism to apoptosis and necrosis following transient cerebral hypoxia-ischaemia. *Cell Death Differ* 5:321-9, 1998
 - 15) Pajunen AEI, Hietala OA, Virransalo E-L, Piha RS. Ornithine decarboxylase in mouse brain effect of electrical stimulation. *J Neurochem* 30:281-3, 1978
 - 16) Paschen W, Hallmayer J, Mies G. Regional profile of polyamines in reversible cerebral ischemia of Mongolian gerbils. *Neurochem Pathol* 7:143-56, 1987
 - 17) Paschen W, Rohn G, Meese CO, Djuricic B, Schmidt-Kastner R. Polyamine metabolism in reversible cerebral ischemia: effect of α -difluoromethylornithine. *Brain Res* 453:9-16, 1988
 - 18) Pegg AE. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 234:249-62, 1986
 - 19) Reed LJ, de Belleruche J. Induction of ornithine decarboxylase in cerebral cortex by excitotoxin lesion of nucleus basalis: association with postsynaptic responsiveness and N-methyl-D-aspartate receptor activation. *J Neurochem* 55:780-7, 1985
 - 20) Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 9:526-33, 1995
 - 21) Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 60:2255-71, 1997
 - 22) Schmitz MP, Combs DJ, Dempsey RJ. Difluoromethylornithine decreases postischemic brain edema and blood-brain barrier breakdown. *Neurosurgery* 33:882-8, 1993
 - 23) Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honore T. 2, 3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo (F) quinoxaline; a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247:571-4, 1990
 - 24) Skaper SD, Ancona B, Facci L, Franceschini D, Giusti P. Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by enhanced excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway. *FASEB J* 12:725-31, 1998
 - 25) Spragg BP, Hutchings AD. High-performance liquid chromatographic determination of putrescine, spermidine, and spermine after deprivation with 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluoride. *J Chromatogr* 258:289-92, 1983
 - 26) Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53:749-90, 1984
 - 27) Tan DZ, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1:57-60, 1993
 - 28) Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci* 48:469-98, 1991