

Paraquat로 처치한 백서에서 Melatonin과 수용성 비타민 E복합 투여가 지질과산화와 생존율에 미치는 영향

김 진 하

고신대학교 의과대학 산업의학교실

The Effect of Combined Treatments with Melatonin and Water-soluble Vitamin E in Lipid Peroxidation and Survival Rate after Paraquat Intoxication in Rats

Jin-Ha Kim

Department of Occupational & Environmental Medicine,
Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Objectives : Paraquat, an oxygen radical-generating agent, is a highly toxic compound for humans and animals. This study was examined the effect of combined treatment of melatonin and Trolox[®] (water-soluble analogue of α -tocopherol) in lipid peroxidation and mortality after paraquat intoxication in rats. **Methods :** Paraquat (20mg/kg) was injected i.p. into Sprague-Dawley rats. After the administration of paraquat, rats were treated with melatonin (10mg/kg), Trolox[®] (100mg/kg), combined melatonin and Trolox[®]. All rats were killed by decapitation 24 hours after paraquat administration and then examined the concentration of malonaldehyde and 4-hydroxyalkenal (MDA + 4-HAE) as indices of lipid peroxidation in rat lung and liver. In a survival study, continuous i.p. infusion of melatonin (50mg/kg/day) for 14 days using Alzet[®] Osmotic pump (2ML2) and Trolox[®] (100mg/kg/day) was injected i.p. after paraquat (20mg/kg) poisoning into rats for 14 days. **Results :** Paraquat alone increased MDA + 4-HAE levels in lung, with this increase being reduced by melatonin and Trolox[®], and also combined treatment with melatonin and Trolox[®] completely reversed this effect. Paraquat at 20mg/kg did not induced any significant change in liver lipid peroxidation. In a result of survival analysis, percent survival was 100 % (8/8, control), 0 % (0/8, paraquat only), 62.5 % (5/8, paraquat + melatonin), 37.5 % (3/8, paraquat + Trolox[®]), 75.0 % (6/8, paraquat + melatonin + Trolox[®]) at 14 days after paraquat intoxication.

Conclusions : These results indicate that melatonin and Trolox[®] protect lipid peroxidation and increase survival time in paraquat intoxicated rats. Combined treatment with melatonin and Trolox[®] seems to have more survival benefit than single agent treatment in paraquat intoxication.

Key words : Paraquat, melatonin, Trolox[®], combined treatment, lipid peroxidation, survival time

I. 서 론

Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride,

methyl viologen)는 1958년에 최초로 개발된 이후 세계적으로 가장 흔히 사용되는 제초제로 독성이 강하여 단일 원인으로 사망률이 최고지만 아직 적절한 치료방법이 확립되어 있지 않아 문제가 되고 있다.¹⁻⁴⁾ 그럼에도 불구하고 널리 사용되는 이유로는 토양입자와 흡착(adsorption) 친화도가 매우 강할 뿐 아니라 토양과 접촉 흡수되면 비활성화 되어 중독성이 없어져 지표수 오염의 위험

교신저자 : 김 진 하
주소: 602-703, 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 산업의학교실
TEL. (051-990)-6368 FAX. 051-242-2618
E-mail: kjh6511@ns.kosinmed.or.kr

이 높지 않는 장점을 가지고 있기 때문이다.^{4, 5)}

우리나라의 경우 paraquat가 23 ~ 25% 첨가된 그라목손[®], 파라코[®], 속사포[®]의 상품명으로 시판되고 있고, 연간 500명 이상의 사망자가 발생하는데 이의 대부분이 자살 목적의 음독으로 인해 발생하는 것으로 알려져 있어 고용량의 급성 중독에 관한 적절한 치료법의 개발이 절실한 실정이다.^{2, 5-7)}

Paraquat의 독성 기전은 superoxide anion을 생성하고 이것이 hydrogen peroxide radical과 hydroxyl radical과 같은 더 독성이 강한 반응성 산소군(Reactive Oxygen Species (ROS))을 형성하여 paraquat의 세포내 환원과 세포환원제(NADPH)의 산화를 통해 생화학적 반응의 파괴와 세포막의 불포화지방산(unsaturated fatty acid)의 변화를 일으키게 된다. 이 중 superoxide에 의한 세포막 지질의 산화(peroxidation)가 세포손상의 가장 중요한 기전으로 알려져 있다.⁸⁻¹¹⁾

포유동물에서는 투여 경로에 따라 paraquat는 빠르게 대부분의 조직에 분포되어 특히 폐와 신장에 고농도로 농축되고, 일반적인 paraquat의 biotransformation은 모든 종에서 연구되지는 않았지만 소변으로 고농도의 unchanged form으로 배설되고 일부는 제한적으로 담즙으로 배설되는 것으로 알려져 있다.^{4, 11-13)}

Paraquat 노출로 인해 관찰된 인간과 동물의 높은 사망률은 대부분 폐손상에 의한 호흡부전 때문으로, 이는 paraquat에 대한 해독제(antidote)는 물론이고 독성효과를 개선시키는 효과적인 치료제조차도 없기 때문이다.^{1, 4, 8-11)} 그래서 현재는 paraquat 중독을 치료하기 위한 방법으로 paraquat의 조직내에 축적되는 것을 방지하기 위한 Fuller's earth나 bentonite의 주입, 위세척, 강력한 이뇨제의 사용, hemodialysis와 hemoperfusion 등을 시행하고 있으나 이들 치료 방법들의 결과는 역시 실망스럽고 사망률도 여전히 높은 실정이다.^{8, 14-18)} 하지만 paraquat의 독성 작용이 대부분 산소유리기를 통해 초래된다는 사실이 밝혀진 이후 많은 연구자와 임상 의사들은 paraquat 독성 치료에 superoxide dismutase (SOD), vitamin C, vitamin E, iron chelator인 deferoxamine, N-Acetylcysteine, metallothionein 등의 다양한 항산화제로 동물 실험과 환자들에게 적용하였으나 그 결과는 여전히 만족스럽지 못하다.^{4, 13-15)} 그 이유로는 이들 항산화

제들은 분자량이 높고 전하를 가져서 목표 세포의 세포막을 통과하기 어렵거나 체내 반감기가 매우 짧아 치료 효과를 기대하기 어렵거나 용해도 문제로 인해 체내의 분포가 힘들기 때문인 것 등을 들 수 있다.¹⁹⁻²¹⁾ 이 중 특히 vitamin C는 조직 손상이 진행되고 있는 경우 오히려 더 oxidative damage를 야기하는 것으로 보고되고 있어 치료에 활용하기는 어렵고, iron chelator인 deferoxamine (DFO)도 지속적인 정맥투여로 인해 가역적인 시력저하와 다른 전신적 부작용의 발생 가능성이 높은 것으로 알려져 있다.²²⁻³⁵⁾

동물의 송과선(pineal gland)에서 분비되는 melatonin (5-methoxy-N-acetyl tryptamin)은 체내 반감기가 30분 정도로 짧으나 분자량이 적고 높은 지방친화성과 어느 정도의 친수성을 가져 비교적 세포막의 투과성이 높은 것으로 보고되고 있다.³⁶⁻⁴⁰⁾ 그래서 paraquat에 노출시킨 동물실험에 melatonin을 처치할 경우 lipid peroxidation과 glutathione depletion의 reversal로 인해 paraquat에 의한 간과 폐의 손상을 보호하여 사망률을 감소시켰고, hydroxy radical, peroxy radical과 유리 산소를 제거하는 항산화효과와 체내 항산화효소인 glutathione peroxidase를 자극함으로써 세포 보호 작용을 향상시킴과 동시에 산화적 손상으로부터 세포막을 안정화시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.³⁶⁻⁴⁰⁾ 또한 paraquat 중독에 있어 vitamin E는 백서에서 부족할 경우 폐 손상이 더 악화되어 생존시간이 짧아지거나 생존율이 감소되는 것으로 보고되고 있다.²⁶⁾ 그러나 동물실험에서 산화물에 의한 체내 손상이 발생된 경우에 vitamin E의 투여는 손상을 개선시키지 못하였다.^{9, 31-32)} 이는 vitamin E가 항산화능력이 없는 것이 아니라 지용성으로 인한 체내 흡수와 분포, 세포막의 통과 어려움 때문으로 생각하고 있다.³⁴⁾ 최근에 들어 antioxidant liposome 또는 low molecular weight SOD mimetics가 치료적 효과를 증대시킨다는 보고되고 있는데 이는 세포내 운반을 증가시키기 때문이고, 항산화제의 효능을 증가시키기 위해서 폐에 직접 항산화제를 운반시키는 투여 방법의 향상인 intratracheal instillation은 폐의 손상을 효과적으로 방어하였지만 응급상황에 실제 적용하기에는 어려움이 있다.^{4, 41-44)} 그래서 paraquat 중독의 치료 결과를 향상시키기 위해서는 응급 상황에 적용이 쉽고, 다량의 투여로 인한 부작용이

없는 항산화제의 복합투여가 환자의 치료 성적을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 이전 동물 실험에서 치료적 항산화효과가 입증되고 환자에게도 적용이 용이한 melatonin과 수용성 vitamin E(Trolox[®])의 복합투여가 세포손상의 가장 중요한 기전인 세포막 지질의 산화 정도를 실험동물의 폐와 간 조직의 malonaldehyde 및 4-hydroxyalkenal(MDA + 4-HAE) 농도를 조사함으로써 이를 평가하고 아울러 이들 약제의 복합투여가 실제 생존율에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 연구 목적

Paraquat를 처치한 실험동물에서 치료성적을 향상시키기 위해서는 먼저 생체내의 반응성 산소군(ROS)의 생성과 분포를 방지하여야 한다. 이는 먼저 iron 분포의 효율적인 제어를 통한 효소적 불활성 형태로 ·OH의 생성을 차단, catalase 또는 glutathione peroxidase에 의한 peroxide의 제거가 필요하다. 항산화제의 효과적인 수준의 유지를 통해 반응성 대사성 산소유리기의 제거와 유리기(free radical)에 대한 체내 방어 수준의 회복, 특히 glutathione level을 효과적으로 유지시키는 것이다.⁴⁶⁾ 이러한 조건을 충족시키는 이상적인 paraquat 중독의 항산화제 치료는 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, membrane lipid peroxidation에 대한 세포내외적 방어 능력을 제공하는 것이다.⁴⁾ 따라서 본 연구는 응급 치료가 요구되는 환자에게도 적용이 용이한 melatonin과 수용성 비타민 E인 Trolox[®]의 복합 투여의 효과를 파악하기 위하여 실험동물에서 복합 투여가 폐와 간 조직의 지질과산화도와 생존율에 미치는 영향을 조사하였다.

III. 연구재료 및 방법

가. Animal

몸무게가 250g내외의 Spargue-Dawley male rat 80마리를 (주) 비오링크에서 구입하여 Plexiglas cage에 cage당 4마리씩 1주일 이상 창문이 없고 22 ± 1 °C로 온도를 유지되고 조명은 오전 7시에 켜고 오후 9시에 소등하는 동물 사육실 환경에 적응시켜 실험에 사용하였으며

standard laboratory chow와 water ad lib으로 사육하였다.

나. Chemical

paraquat (purity 98%, CAS 1910-42-5)와 melatonin (CAS 73-31-4)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA)의 제품을 사용하였고, Trolox[®](purity 98%, water-soluble analogue of α-tocopherol, CAS 53188-07-01)는 CALBIOCHEM[®] 에서 구입하여 사용하였으며 이외의 실험에 사용하는 모든 시약은 Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, USA)를 사용하였다.

지질과산화물인 malonaldehyde (MDA)와 4-hydroxyalkenals (4-HAE)의 분석은 BIOXYTECH[®] LPO-586[™] kit를 OXIS International, Inc.에서 구입하여 측정하였다.

다. 방법

실험 1. 폐와 간 조직의 지질과산화도

1주간의 순응기간을 거친 40마리의 Spargue-Dawley계 백서를 각각 8마리씩 대조군(control), paraquat 단독 투여군(PQ), paraquat 투여 후 melatonin 단독 투여군(PQ+MT), paraquat 투여 후 Trolox[®] 단독 투여군(PQ+TL), paraquat 투여 후 melatonin과 Trolox[®] 복합 투여군(PQ+MT+TL)으로 나누어서 실험하였다.

먼저 paraquat를 saline에 용해시켜 체내 melatonin level이 낮게 유지되는 오전 10시에 실험 동물에 20mg/kg의 용량으로 복강 내로 주사하였다.

melatonin의 투여는 absolute ethanol로 용해시킨 melatonin(전체 알콜 농도가 4%) 10mg/kg 용량으로 paraquat 투여 30분 후에 1회 투여하였다.

Trolox[®] 투여는 paraquat 투여 30분 후 melatonin 투여와 동일한 방법으로 100mg/kg의 용량으로 1회 복강내 주사하였다.

paraquat 투여 24시간 후에 경추 탈골로 동물을 즉사시킨 다음 간, 폐를 적출하여 액화질소(-120 °C)에 고정 한 후 deep freezer(-74 °C)에 보관하였다. 측정 당일 조직을 ice-cold NaCl (0.9%)에 세척하여 혈액성분을 제거하고 여과지로 수분을 제거한 후 무게를 측정하고 조직 100mg당 1 ml의 ice-cold Tris-HCl buffer(20mM, pH 7.4)와

Paraquat로 처리한 백서에서 Melatonin과 수용성 비타민 E복합 투여가 지질과산화와 생존율에 미치는 영향

분쇄과정의 산화를 방지하기 위하여 0.5M butylated hydroxytoluene(BHT) 10 μ l을 첨가한 다음 조직분쇄기로 분쇄하여 균등액(homogenate)을 만들었다. 이후 3,000 g로 10분간 원심 분리하여 상층액(supernatant)을 취하여 즉시 분석에 사용하였다.

지질과산화물인 malonaldehyde(MDA) 4-hydroxyalkenals (4-HAE)의 분석은 BIOXYTECH[®] LPO-586[™] kit를 사용하여 Spectrophotometer (model U-3000, HITACHI, JAPAN)를 이용하여 586nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험 2. 생존율

paraquat 독성에 대한 melatonin과 Trolox[®]의 치료 효과를 평가하기 위한 생존율은 다음과 같이 조사하였다.

1주간의 순응기간을 거친 40마리의 Spargue-Dawley계 백서를 각각 8마리씩 대조군(control), paraquat 단독 투여군(PQ), paraquat 투여 후 melatonin 단독 복강내 지속 투여군(PQ+MT), paraquat 투여 후 Trolox[®] 단독 투여군(PQ+TL), paraquat 투여 후 melatonin 복강내 지속 투여와 Trolox[®] 복합 투여군(PQ+MT+TL)으로 나누어서 14일간 생존율을 조사하였다.

melatonin의 복강내 지속 투여는 paraquat 복강내 투여 1시간 전에 absolute ethanol로 용해시킨 melatonin(전체 알코올 농도가 4%)을 1일 50mg/kg에 해당하는 14일 분량을 2ml로 제조하여 Alzet[®] Osmotic pump (2ML2)에 주입한 다음 실험동물에 chloral hydrate를 복강내 주사(100mg/kg)하여 마취시킨 후 회복하여 복강내에 삽입하였다.

대조군을 포함한 melatonin 비투여군들에게는 saline 2ml를 Alzet[®] Osmotic pump (2ML2)에 주입한 다음 동일한 방법으로 복강내에 삽입하였다.

Alzet[®] Osmotic pump (2ML2) 복강내 삽입 1시간 후에 saline에 용해시킨 paraquat를 20mg/kg의 용량으로 복강내로 주사하고 대조군에는 동일 용량의 saline을 복강내 주사하였다.

Trolox[®] 투여는 paraquat 투여 후 30분에 전체 알코올 농도가 4%로 용해시킨 100mg/kg를 1회 복강내로 주사한 이후 1일 1회로 14일간 복강내 주사하였고, 대조군과 Trolox[®] 비투여군들에게는 동일 용량의 saline을 14일간 1일 1회 복강내 주사하였다. 이들 실험동물의 생존율을

14일간 1일 간격으로 관찰하였다.

라. 통계분석

한글판 SPSS 12.0 통계프로그램을 이용하여 폐와 간 조직의 지질과산화도와 생존기간의 평균값 비교는 Mann-Whitney U test와 Kruskal-Wallis test로 비교하였고, 생존율은 1일 단위로 Kaplan-Meier 방법으로 구하였으며 각 군간의 생존율 차이는 Breslow test (Generalized Wilcoxon test)로 비교하였다. 이때 유의수준은 0.05로 하였다.

IV. 연구결과

1. 폐와 간 조직의 지질과산화도

Paraquat 투여 24시간 후에 경추 탈골로 동물을 죽사시킨 다음 간, 폐를 적출하여 Malonaldehyde + 4-hydroxyalkenal (MDA + 4-HAE)의 농도로 측정한 지질과산화도 결과는 Table 1과 같다.

PQ 투여군의 폐에서 MDA + 4-HAE의 농도는 1.82 ± 0.73 nmol/mg protein으로 대조군 1.41 ± 0.62 nmol/mg protein에 비해 통계적으로 유의하게 증가($P < 0.01$)하였으나 간에서는 유의한 증가를 보이지 않았다.

PQ+MT 투여군과 PQ+TL 투여군의 폐에서도 지질과산화도가 대조군에 비해 상승하였지만 통계적으로 유의하지는 않았으며, 간에서는 차이를 보이지 않았다.

그러나 PQ투여군에 비해 폐에서 MDA + 4-HAE의 농도는 PQ+MT 투여군이 1.48 ± 0.25 nmol/mg protein, PQ+TL 투여군 1.53 ± 0.68 nmol/mg protein으로 통계적으로 유의하게 낮았다($P < 0.05$). 한편 PQ+MT+TL 투여군의 폐의 MDA + 4-HAE 농도는 1.21 ± 0.31 nmol/mg protein으로 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 낮았으며($P < 0.05$), PQ 투여군 1.82 ± 0.73 nmol/mg protein에 비해 매우 유의하게 낮은 지질과산화도를 보였다($P < 0.01$).

2. 생존율

이들 실험동물의 생존율을 14일간 1일 간격으로 관찰한 결과는 Fig. 1.과 같다.

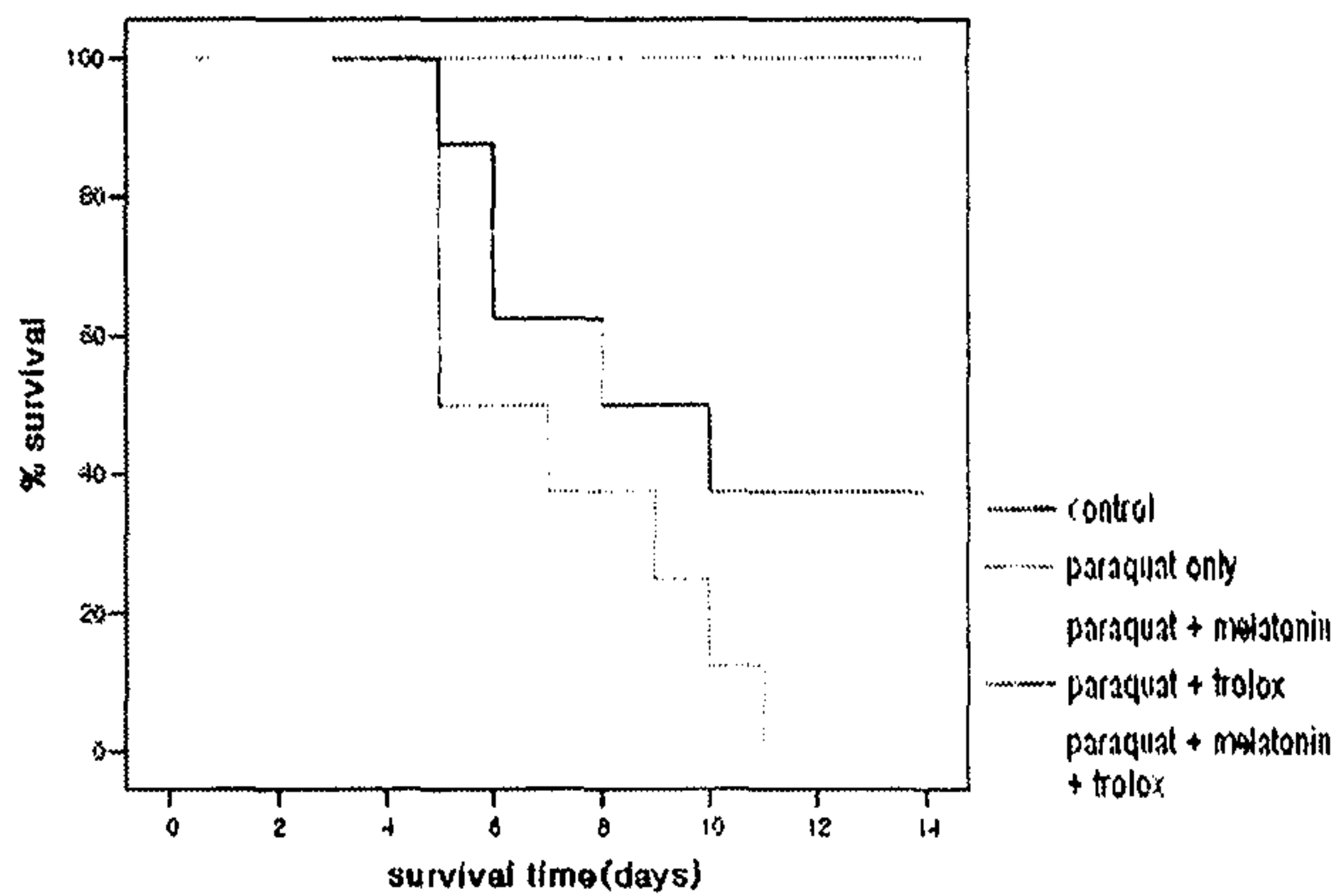


Fig 1. Effects of melatonin(50mg/kg/day $\times$ 14days), Trolox[®](100mg/kg/day $\times$ 14days) and combination treatment with melatonin and Trolox[®] on the survival of Sprague-Dawley rats after poisoning with paraquat.

Table 1. Effect of melatonin(10mg/kg), Trolox[®](100mg/kg) and combination treatment with melatonin and Trolox[®] on paraquat(20mg/kg) induced lipid peroxidation in lung and liver of Sprague-Dawley rats

Malonaldehyde +4-hydroxyalkenals concentration(nmol/mg protein)	Survival times(days)	
	Mean $\pm$ SD	
	Lung	Liver
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD
Control	1.41 $\pm$ 0.62	0.83 $\pm$ 0.14
Paraquat	1.82 $\pm$ 0.73**	0.71 $\pm$ 0.17
Paraquat + melatonin	1.48 $\pm$ 0.25 [†]	0.84 $\pm$ 0.23
Paraquat + Trolox [®]	1.53 $\pm$ 0.68 [†]	0.86 $\pm$ 0.21
Paraquat + melatonin + Trolox [®]	1.21 $\pm$ 0.31 ^{††}	0.82 $\pm$ 0.17

Lipid peroxidation is represented by Malonaldehyde +4-hydroxyalkenals concentrations.

Significantly different from control : *P < 0.05, **P < 0.01.
Significantly different from Paraquat : [†]P < 0.05, ^{††}P < 0.01.

대조군은 14일까지 100%(8/8) 생존하였고, PQ 투여군은 8마리 100% 사망하였다. PQ+MT 투여군은 8마리 중 5마리가 생존하여 62.5%의 생존율을 보였고, PQ+TL 투여군은 3마리가 생존하여 37.5%, PQ+MT+TL 투여군은 6마리가 생존하여 75%의 생존율을 보였다. PQ+TL 투여군에 비해 PQ+MT+TL 투여군은 통계적으로 유의하게

생존율이 높았다(P<0.01).

14일간 각 군의 생존시간은 Table 2.와 같다.

Table 2. Effects of melatonin(50mg/kg/day $\times$ 14days), Trolox[®](100mg/kg/day $\times$ 14days) and combination treatment with melatonin and Trolox[®] on the survival times of Sprague-Dawley rats after poisoning with paraquat.

	Survival times(days)
	Mean $\pm$ SD
Control	14.0 $\pm$ 0.0
Paraquat	6.0 $\pm$ 2.7
Paraquat + melatonin	11.0 $\pm$ 4.6
Paraquat + Trolox [®]	9.0 $\pm$ 4.4
Paraquat + melatonin + Trolox [®]	11.1 $\pm$ 5.3
Total	10.2 $\pm$ 4.6

Significant differences by Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test

전체 평균 생존일은 10.2 $\pm$ 4.6일, 대조군은 14일, PQ 투여군 6.0 $\pm$ 2.7일, PQ+MT 투여군 11.0 $\pm$ 4.6일, PQ+TL 투여군 9.0 $\pm$ 4.4일, PQ+MT+TL 투여군 11.1 $\pm$ 5.3일로 조사되었다. PQ 투여군에 비해 PQ+MT 투여군, PQ+TL 투여군, PQ+MT+TL 투여군 모두 평균 생존 시간은 길었으나 통계적 유의성은 없었고 PQ+MT 투여군, PQ+TL 투여군, PQ+MT+TL 투여군 간에도 평균 생존 시간은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

V. 고 찰

Paraquat의 독성 작용으로 심각한 중독을 일으키는 것은 잘 알려진 사실이지만 세포 손상을 일으키는 기전은 아직까지 완전히 이해되지 않고 있다.⁸⁻¹³⁾ 여러 연구자들은 paraquat의 산화-환원 반응의 결과로 산소유리기가 발생되어 산소유리기 자체와 세포막 지질의 산화로 인해 조직의 손상이 일어난다는 가설과 독성은 전적으로 세포막의 지질의 산화에 의해 발생한다고 보고하고 있다.⁴⁶⁻⁴⁹⁾

그러나 paraquat에 노출될 경우 폐, 간, 뇌의 microsome에서 지질의 산화가 증가되는 것으로 보고되고 있는 것

으로 보아 산소유리기에 의한 손상보다는 세포막 지질의 산화로 인해 조직의 손상이 더 중요할 것으로 판단하고 있다.^{8-11, 46-49)}

이러한 산소유리기와 세포막 지질 산화를 방어하는 능력이 보고된 항산화제 중 멜라토닌은 높은 지방 친화성과 어느 정도의 친수성을 지니고 있을 뿐만 아니라 체내에서 발생된 hydroxyl radical과 peroxy radical을 제거하는 능력도 지니고 있다.³⁶⁻⁴¹⁾ 또한 다양한 화학물질에 의해 생성되는 bacterial lipopolysaccharide, kainate, H₂O₂와 같은 물질에 방어하는 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있으나, 체내 반감기가 30분으로 연속적인 투여가 되지 않을 경우 그 효과를 기대하기가 어렵다.³⁵⁻⁴⁰⁾

vitamin E의 paraquat 독성을 보호하는 기전은 분명하지 않지만 항산화제 특성을 가지고 지질 산화를 예방하거나 superoxide anion의 생성을 방해하여 독성을 낮추는 것으로 알려져 있다.³⁰⁻³²⁾

그러나 지용성의 성질로 인해 정상 동물에 Vitamin E를 투여하였을 경우 산화물에 의한 손상을 개선시키지 못하고, 다만 수용성 비타민 E인 Trolox[®]를 처치할 경우 vitamin E의 항산화제 효과가 증가되는 것으로 보고되고 있다.³¹⁻³⁴⁾

일부 연구에 의하면 백서를 대상으로 투여하는 melatonin 농도를 달리하여 측정된 폐와 간의 지질과산화는 투여하는 paraquat가 40mg/kg 이상일 때 간의 지질과산화가 높아졌으며 그 후 melatonin의 투여로 지질과산화는 낮아지는 것으로 보고되고 있다.³⁶⁻³⁷⁾

본 연구에서는 Melchiorri 등³⁶⁾이 paraquat 20mg/kg를 복강내로 투여하기 30분전에 melatonin 10mg/kg를 투여한 이후 매 6시간 마다 24시간동안 투여하여 측정된 폐와 간의 지질과산화 정도와 유사한 결과를 보였다. 이는 melatonin이 paraquat 투여로 발생한 반응성 산소를 제거하거나 이를 억제하였기 때문인 것으로 생각된다. Trolox[®]를 투여한 경우에도 폐에서 paraquat에 의해 증가된 지질과산화를 낮추는 작용을 하였지만 melatonin보다는 효과가 적었는데 이는 Pieri 등⁵⁰⁾이 peroxy radical을 제거하는 능력을 유리산소흡수능력(oxygen radical absorbing capacity, OARC_{perox})으로 Trolox, vitamin C, GSH, melatonin을 상대적으로 비교한 결과 각각 1: 1.12: 0.68: 2.04로 melatonin의 지질과산화를 낮추는 능력이

Trolox[®]보다 2배 정도 큰 것으로 보고한 내용과 비슷한 결과를 보였다. 뿐만 아니라 melatonin과 Trolox를 복합 투여한 결과 오히려 대조군보다 낮은 지질과산화도를 나타낸 것은 물론이고 paraquat 단독 투여군보다 유의하게 낮은 지질과산화를 보인 것으로 보아 초기 paraquat 중독으로 인한 paraquat radical과 반응성 산소에 의한 손상을 차단함을 보여주었다.

본 연구에서 paraquat 20mg/kg를 처치한 백서의 생존율은 melatonin을 복강내 연속 투여할 수 있는 osmotic pump을 삽입한 경우와 paraquat 투여 후 30분에 복강내로 Trolox[®] 100mg/kg투여한 이후 1일 1회로 14일간 복강내 투여로 나타난 생존율은 Asbeck 등²³⁾이 보고한 연속적인 deferrosamine 정맥투여(50mg/kg/24h)로 조사한 14일 생존율 50%(3/6)보다 melatonin 복강내 연속 투여가 높은 생존율을 보였다. 이는 멜라토닌의 연속적인 단독 투여일지라도 deferrosamine 연속적인 단독 투여보다 항산화 효과가 뛰어남을 의미하는 것으로 볼 수 있다. 또한 연속적인 deferrosamine 정맥투여(100mg/kg/24h)의 14일 생존율 66.7%(4/6)보다 melatonin과 Trolox 복합 투여의 생존율이 75%(6/8)으로 높아 melatonin과 Trolox 복합투여가 paraquat 중독에 치료적 효과가 더 우수함을 알 수 있다.

수용성 비타민 E인 Trolox[®]를 단독으로 처치한 경우 송광선 등⁴⁹⁾이 paraquat투여 2일전부터 위관(gastric tube)로 일일 100mg/kg의 vitamin E 투여 7일간의 생존율 33%(8/24)보다 paraquat 투여 30분 후부터 복강내로 1일 투여하였음에도 더 높은 37.5%(3/8) 생존율을 보여 vitamin E의 흡수를 향상 시킬 경우 치료 효과를 향상시킬 수 있다.

이는 paraquat 중독 환자 관리의 전략은 중독의 toxicokinetics의 modification으로 흡수를 감소시키거나, 제거를 촉진시키기 위해서 기존에 알려진 항산화제의 복합 투여가 더 효과적임을 시사하는 것으로 볼 수 있다.

VI. 결 론

이상적인 파라콰트 중독의 항산화제 치료 기전은 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical의

직접적인 세포막 지질과산화에 대한 세포내·외의 방어를 제공하는 것이다. 본 연구 결과 melatonin과 Trolox[®]의 복합 투여는 paraquat 처치 rat의 지질과산화를 방어하고 생존율을 향상시켜 항산화제의 복합요법이 더 효과적인 것으로 조사되었다. 그러므로 이후 다른 항산화제의 복합 효과에 관한 연구가 수행되어야 할 것이다.

참고 문헌

- 1) Higenbottam T, Crome P, Parksinon C, Nunn J : Further clinical observations on the pulmonary effects of paraquat ingestion. *Thorax* 34: 161-165, 1979
- 2) 홍세용 : 농약중독 치료 지침서. 서울, 고려의학, 1998, 106-112
- 3) A. Meister, M.E. Anderson : Glutathione. *Ann. Rev. Biochem* 52: 711-760, 1983
- 4) Zacharias E. Suntres : Role of antioxidants in paraquat toxicity. *Toxicology* 180: 65-77, 2002
- 5) 이은영, 김영통, 양종오, 홍세용 : paraquat(paraquat) 폐 손상의 장기 예후. *대한내과학회지* 65(3) : 308-314, 2003
- 6) Sagar GR : Uses and usefulness of paraquat. *Hum Toxicol* 6: 7-11, 1987
- 7) 이은영, 황규윤, 양종오, 홍세용 : 급성 paraquat(paraquat) 중독의 조기 예후 예측인자: 602예 분석. *대한내과학회지* 64: 625-631, 2003
- 8) J.A. Vale, T.J Meredith, B.M. Buckle : Paraquat poisoning: clinical features and immediate general management. *Hum. Toxicol* 6: 41-47, 1987
- 9) T. Yasaka, K. Okudaira, H. Fujito. : Further studies of lipid peroxidation in human paraquat poisoning. *Arch. Intern. Med* 146: 681-685, 1986
- 10) H. Sies : Antioxidant activity in cells and organs. *Am Rev Respir Dis* 136: 478-480, 1987
- 11) M.S. Rose, L.L. Smith, I. Wyatt : Evidence for the energy-dependent accumulation of paraquat into rat lung. *Nature* 252: 314-315, 1974
- 12) T.E. Gram : Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. *Pharmacol. Rev* 49: 297-341, 1997
- 13) C. Bismuth, R. Garnier, F.J. Baud, J. Muszynski, C. Keyes : Paraquat poisoning. An overview of the current status. *Drug Safety* 5: 243-251, 1990
- 14) C. Bismuth, R. Garnier, S. Dally, P.E. : Fournier and J.M. Scherrmann. Prognosis and treatment of paraquat poisoning. A review of 28 cases. *J Toxicol Clin Toxicol* 19 : 461-474, 1982
- 15) D.N. Bateman : Pharmacological treatments of paraquat poisoning. *Hum Toxicol* 6: 57-62, 1987
- 16) T.J. Meredith, J.A. Vale : Treatment of paraquat poisoning in man: methods to prevent absorption. *Hum Toxicol* 6: 49-55, 1987
- 17) A.T. Proudfoot, L.F. Prescott, D.R. Jarvie : Haemodialysis for paraquat poisoning. *Hum Toxicol* 6: 69-74, 1987
- 18) E.C. Hampson, S.M. Pond : Failure of haemoperfusion and haemodialysis to prevent death in paraquat poisoning. A retrospective review of 42 patients. *Med Toxicol Adv Drug Exp* 3: 64-71, 1988
- 19) B.A. Freeman, J.F. Turrens, Z. Mirza, J.D. Crapo and S.L. : Young. Modulation of oxidant lung injury by using liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase. *Fed Proc* 44: 2591-2595, 1985
- 20) M. Patel, B.J. Day : Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *TIPS* 20: 359-364, 1999
- 21) V.R. Muzykantov. Delivery of antioxidant enzyme proteins to the lung. *Antiox. Redox Signal* 3: 39-62, 2001
- 22) S.A. Kang, Y.J. Jang, H. Park : In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Rad Res* 28: 93-107, 1998
- 23) B.S. Van Asbeck, F.C. Hillen, H.C. Boonen, Y. de Jong, J.A. Dormans, N.A. van der Wal, J.J. Marx, B. Sangster : Continuous intravenous infusion of deferoxamine reduces mortality by paraquat in vitamin E-deficient rats. *Am Rev Respir Dis* 139: 769-773, 1989
- 24) M.C. Cagnoli, C. Atabay, E. Kharlamova, H. Manev : Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* 18: 222-226, 1995
- 25) G.W. Burton : Vitamin E: molecular and biological function. *Proc Nutr Soc* 53: 251-262, 1994
- 26) E.R. Block : Potentiation of acute paraquat toxicity by vitamin E deficiency. *Lung* 156: 195-203, 1979
- 27) J.N. Roehm, J.G. Hadley, D.B. Menzel. Antioxidants vs lung disease. *Arch Intern Med* 128: 88-93, 1971
- 28) J.R. Bucher, R.J. Roberts : Tocopherol (vitamin E) content of lung, liver, and blood in the newborn rat and human infant: influence of hyperoxia. *J Pediatr* 98: 806-811, 1981
- 29) M.E. Knight, R.J. Roberts : Tissue vitamin E levels in newborn rabbits after pharmacologic dosing: influence of dose, dosage form and route of administration. *Dev Pharmacol Ther* 8: 96-106, 1985
- 30) C.K. Chow : Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad Biol. Med* 11: 215-232, 1991
- 31) L.J. Ramazzotto, R. Engstrom : Dietary vitamin E and the effects of inhaled nitrogen dioxide on rat lungs. *Environ Physiol Biochem* 5: 226-234, 1975
- 32) R.J. Stephens, D.J. Buntman, D.S. Negi, R.M. Parkhurst, D.W. Thomas : Tissue levels of vitamin E in the lung and the cellular response to injury resulting from oxidant gas exposure. *Chest* 83: 37S-39S, 1983
- 33) D.L. Warren, D.M. Hyde, J.A. Last : Synergistic interaction of ozone and respirable aerosols on rat lungs. IV. Protection by quenchers of reactive oxygen species. *Toxicology* 53: 113-133, 1988
- 34) H.L. Newmark, W. Pool, J.C. Bauernfeind, E. De Ritter :

- Biopharmaceutic factors in parenteral administration of vitamin E. *J Pharm. Sci* 64: 655-657, 1975
- 35) 조문식, 김준순 : Paraquat 중독 치료시 Deferoxamine에 의한 가역적 시력저하를 보인 증례. *대한안과학회지* 45: 1397 - 1401, 2004
- 36) D. Melchiorri, R.J. Reiter, A.M. Attia, M. Hara, A. Burgos, G. Nistico : Potent protective effect of melatonin on in vivo paraquat-induced oxidative damage in rats. *Life Sci* 56: 83-89, 1995
- 37) D. Melchiorri, G.G. Ortiz, R.J. Reiter, E. Sewerynek, W.M. Daniels, M.I. Pablos, G. Nistico. : Melatonin reduces paraquat-induced genotoxicity in mice. *Toxicol Lett* 95: 103-108, 1998
- 38) Danela Melchiorri, Russel J. Reiter, Ewa Sewerynek, W.M. Daniels, Masayuki Hara, Lidun Chen, Giuseppe Nistico : Paraquat Toxicity and Oxidative Damage reduction by melatonin. *Biochemical Pharmacology* 51: 1095-1099, 1996
- 39) R.J. Reiter : Oxidative damage to nuclear DNA: amelioration by melatonin. *Neuroendocrinol Lett* 20: 145-150, 1999
- 40) M.I. Pablos, J.I. Chuang, R.J. Reiter, G.G. Ortiz, W.M.V. Daniels, E. Sewerynek, D. Melchiorri : Time course of melatonin-induced increase in glutathione peroxidase activity in chick tissues. *Biol Sign* 4: 324-330, 1996
- 41) J.J. Garcia, R.J. Reiter, G.G. Ortiz, C.S. Oh, L. Tang, B.P. Yu, G. Escames : Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J Membr Biol* 162: 59-65, 1998
- 42) A. Ledwozyw : Protective effect of liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase on bleomycin-induced lung injury in rats. I. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Acta Vet Hung* 39: 215-224, 1991
- 43) M. Langner, T.E. Kral : Liposome-based drug delivery systems. *Pol J Pharmacol* 51: 211-222, 1999
- 44) R.V. Padmanabhan, R. Gudapaty, I.E. Liener, B.A. Schwartz, J.R. Hoidal : Protection against pulmonary oxygen toxicity in rats by the intratracheal administration of liposome-encapsulated superoxide dismutase and catalase. *Am Rev Respir Dis* 132: 164-167, 1985
- 45) M. Petty, J.M. Grisar, J. Dow, W. De Jong : Effects of an alpha-tocopherol analogue on myocardial ischaemia and reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol* 179: 241-242, 1990
- 46) A.D. Dodge : The mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. *Endeavour* 30: 130-135, 1971
- 47) I. Fridovich, H.M. Hassan : Paraquat and the exacerbation of oxygen toxicity. *Trends Biochem Sci* 109: 113-115, 1979
- 48) P. Honore, P. Hantson, J.P. Fauville, A. Peeters, P. Manieu : Paraquat poisoning. 'State of the art'. *Acta Clin Belg* 49: 220-228, 1994
- 49) 송광선, 이원연, 조도연, 용석중, 신계철 : Paraquat에 의한 급성폐손상에서 Vitamin E처치가 기관지폐포 세척액내 세포조성에 미치는 영향. *결핵 및 호흡기질환* 44: 1332-1342, 1997
- 50) C. Pieri, M. Marra, F. Moroni, R. Recchioni, F. Marcheseli : Melatonin: A peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* 55: 271-276, 1994