



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위 논문

6-hydroxydopamine을 이용한 파킨슨병
백서모델에서 그래핀 양자점의 파킨슨병
치료 효과연구

The therapeutic effect of graphene quantum dots in
the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's
disease

울산대학교 대학원

의학과

성한유

6-hydroxydopamine을 이용한 파킨슨병
백서모델에서 그래핀 양자점의 파킨슨병
치료 효과연구

지도교수 전상용

이 논문을 의학박사학위 논문으로 제출함

2022년 2월

울산대학교 대학원

의학과

성한유

성한유의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원장 김 정 훈 (인)

심사위원 전 상 용 (인)

심사위원 박 진 훈 (인)

심사위원 정 상 준 (인)

심사위원 최 일 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2022년 2월

국 문 요 약

목 적 : 파킨슨병은 중뇌의 흑질 밀질부에 분포하는 도파민 신경 세포가 점차 소실되어 발생하며 안정 시 떨림, 경직, 자세 불안정성이 특징적으로 나타나는 만성 진행성의 퇴행성 질환이다. 현재 파킨슨병의 진행을 중단하거나 조절할 수 있는 어떠한 치료법도 개발되지 못한 상황이며, 기존의 도파민 의존 치료방법에서 벗어나 파킨슨병의 병리생리학에 의한 새로운 도파민 치료방법의 개발이 필요하다. 파킨슨병의 병리생리학 연구에 따르면 가장 중요한 질병의 유발인자는 신경염증과 α -synuclein 독성에 의한 신경의 점진적인 소실이다. 파킨슨병의 병인론적 연구에서 신경염증과 α -synuclein 독성을 보호하거나 제거할 수 있다면, 파킨슨병의 원인을 조절할 수 있는 획기적인 치료방법이 될 수 있다. 최근에 개발된 graphene은 탄소의 동소체 중 하나로 대장염에서 항염증 효과가 있음이 입증되었고, 본 연구에서는 이러한 graphene의 항염증 효과를 파킨슨병 동물모델에 적용하여 신경보호 효과를 보고자 하였다.

방 법 : 6-hydroxydopamine (6-OHDA)을 0.1% 도파민 신경의 주요 경로인 내측 전뇌 다발에 주입하여 23마리의 일측성 파킨슨병 백서 모델을 만들었다. 6-OHDA를 주입한 23마리의 랫드는 graphene 주사 여부에 따라 6-OHDA만을 주입한 PD 대조군 그룹(n=10)과 6-OHDA를 주입 후 5일간 graphene을 주입한 Graphene그룹(n=13) 으로 실험하였다. 6-OHDA를 주입 전 7일, 주입 후 7일, 14일에 stepping test를 실시하였고, apomorphine test는 6-OHDA를 주입 후 2주 안에 실시하였다. 조직학적인 변화는 tyrosine hydroxylase (TH) 면역염색과 Nissl 염색방법을 통해 확인하였다.

결 과 : 6-OHDA를 주입 후 일주일 후 stepping test에서 그래핀을 투여한 그룹은 병변 반대 측 앞발에서 보행능력이 대조군과 비교하여 크게 감소하지 않았고, 이는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.001$). Apomorphine test는 6-OHDA를 주입하고 일주일 후 실시하였다. 각각의 쥐를 45분간 실험한 결과 그래핀을 넣은 그룹에서 대조군과 비교하여 병변 반대 측의 회전수가 감소하였고, 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$). 도파민 세포에 특이적인 항체인 tyrosine hydroxylase로 염색한 결과, 대조군과 비교하여 그래핀을 넣은 그룹에서 병변측의 tyrosine hydroxylase 양성 세포가 상당히 많이 관찰되었다.

결 론: 본 연구에서 우리는 최초로 6-OHDA를 이용한 파킨슨병 동물모델에서 그래핀의 항염증 기능을 통해 도파민 신경의 보호 효과가 있음을 행동검사와 조직검사를 통해 확인하였다.

중심단어 : Parkinson disease, graphene, 6-Hydroxydopamine, α -synuclein, anti-inflammatory therapy

차 례

국문요약	i
그림차례	v
1. 서론	1
2. 연구 재료 및 방법	2
2.1. 실험동물	2
2.2. 6-OHDA 병변 기술	2
2.3. 실험그룹과 graphene의 주입	2
2.4. Stepping test	3
2.5. Apomorphine 유발 회전 검사	3
2.6. 조직처리	4
2.7. 면역염색	4
2.8. 이미징, 통계	4
3. 연구 결과	6
3.1. Stepping test결과	6
3.2. Apomorphine 유발 회전 검사 결과	7
3.3. 체중 변화의 관찰	8
3.4. 면역형광염색 결과	9

4. 고찰.....	11
5. 결론.....	14
참고문헌.....	15
영문 요약.....	21

그림 차례

Figure 1. Experimental timeline	3
Figure 2. Stepping tests	6
Figure 3. Apomorphine induced rotation tests	7
Figure 4. Weight change.....	8
Figure 5. Immunofluorescent staining	10,11

1. 서론

파킨슨병은 중뇌의 흑질 밀질부에 분포하는 도파민 신경 세포가 점차 소실되어 발생하며 안정 시 떨림, 경직, 자세 불안정성이 특징적으로 나타나는 만성 진행성의 퇴행성 질환이다.(Beiske, Loge, Rønningen, & Svensson, 2009) 한국에서 파킨슨병의 발생율은 2012년 100,000명당 156.9명에서 2015년 100,000명당 181.3명으로 증가하였다.(Han et al., 2019)

파킨슨병은 선조체에 도파민 분비가 부족해서 발생하기 때문에, 현재 파킨슨병의 치료방법으로 도파민의 전구체인 레보도파로 도파민을 보충 치료하면 파킨슨병의 운동증상이 현저하게 개선될 수 있다.(Marsden & Parkes, 1977) 하지만, 도파민 신경의 소실이 점차 진행될수록, 레보도파에 의해 과잉 분비된 도파민이 조절되기 어렵기 때문에 레보도파 유발 이상운동증이나 운동동요 같은 부작용이 발생하기도 한다.(Bezard, Brotchie, & Gross, 2001) 장기적으로, 레보도파를 투여하였을 때 대부분의 환자에서 레보도파 유발 이상운동증이 나타나며, 이를 개선하기 위한 노력으로 외과적 처치 방법인 뇌심부 자극술이 시행되고 있다.(Benabid, 2003; Thanvi, Lo, & Robinson, 2007)

현재 파킨슨병의 진행을 중단하거나 조절할 수 있는 어떠한 치료법도 개발되지 못한 상황이며, (Jankovic & Aguilar, 2008) 기존의 도파민 의존 치료방법에서 벗어나 파킨슨병의 병리생리학에 의한 새로운 도파민 치료방법의 개발이 필요하다. (Moore, West, Dawson, & Dawson, 2005; Przuntek, 2000) 파킨슨병의 병리생리학 연구에 따르면 가장 중요한 질병의 유발인자는 신경염증과 α -synuclein 독성에 의한 신경의 점진적인 소실이다. (Collins, Toulouse, Connor, & Nolan, 2012; Lücking & Brice*, 2000; Moore et al., 2005) 파킨슨병의 병인론적 연구에서 신경염증과 α -synuclein 독성을 보호하거나 제거할 수 있다면, 파킨슨병의 원인을 조절할 수 있는 획기적인 치료방법이 될 수 있다.

최근에 개발된 graphene은 탄소의 동소체 중 하나로 대장염에서 항염증 효과가 있음이 입증되었고, 본 연구에서는 이러한 graphene의 항염증 효과를 파킨슨병 동물모델에 적용하여 신경보호 효과를 보고자 하였다.(Lee et al., 2020)

2. 연구 재료 및 방법

2.1. 실험동물

실험 시작 시 300~350g의 23마리 Wistar male 랫드를 사용하였으며, 밤낮 주기가 각각 12시간으로 설정된 사육공간에 거주하였으며, 모든 실험 절차는 아산생명과학 연구소의 동물 취급 지침에 따르고 (Institutional Animal Care and Use Committee of the Asan Institute for Life Sciences), 승인된 연구계획서에 맞추어 실험을 진행하였다.

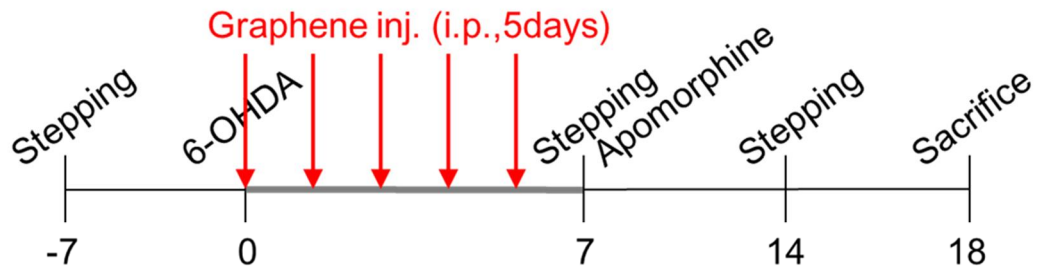
2.2. 6-OHDA 병변 기술

모든 외과적인 처치는 전신마취하에 35 mg/kg zoletil (Virbac S.A., Carros, France)과 5 mg/kg rompun(Bayer, Leverkusen, Germany)을 섞은 혼합용액을 복강 내로 주입하여 실시하였다. 도파민 특이적 신경독소인 6-hydroxydopamine (6-OHDA), 12 μ g을 0.1% 아스코브르산이 포함된 0.9% 생리식염수 4 μ l에 용해 시킨 후 도파민 신경의 주요 경로인 내측 전뇌 다발(medial forebrain bundle)에 주입하여 23마리의 일측성 파킨슨병 백서 모델을 만들었다. 오른쪽 내측 전뇌 다발의 좌표는 tooth bar를 +4.5mm에 위치하고, bregma로부터 AP -2.2mm, L +1.5 mm, dura로부터 V -8.0 mm 지점을 타겟으로 하여 해밀턴 시린지와 자동 미세바늘 펌프를 이용하여 정위적인 방법으로 주입하였다 (Kollensperger et al., 2009). Toxin 주입을 완료하고, 액체가 역류하지 않도록 바늘은 5분 후에 천천히 빼내었다.

2.3. 실험그룹과 graphene의 주입

6-OHDA를 주입한 23마리의 랫드는 graphene 주사 여부에 따라 임의의 두 그룹으로 나누었다. 실험그룹은 6-OHDA만을 주입한 PD 대조군 그룹(n=10)과 6-OHDA를 주입 후 5일간 graphene을 주입한 Graphene그룹(n=13) 으로 실

험하였다. 6-OHDA를 주입 전 7일, 주입 후 7일, 14일에 stepping test를 실시하였고, apomorphine test는 6-OHDA를 주입 후 2주 안에 실시하였다 (Fig. 1.). 주입한 graphene oxide의 농도는 10mg/ml였고, 서울대학교 수의과대학 강경선 교수팀에서 제공받았다.



Group1: PD control (unilateral 6-OHDA), n=10

Group2: Graphene (unilateral 6-OHDA + graphene), n=13

Figure 1. Experimental timeline

2.4. Stepping test

Stepping test는 6-OHDA를 주사하기 1주 전, 주사 후 1, 2주 후 실시하였다. 간략하게 설명하면, 양 뒷발을 실험자가 한 손으로 고정한 후 각각의 앞발을 다른 한 손으로 고정한 후 왼발, 오른발을 번갈아 가며 트레드밀(Jeung Do Bio & Plant Co., Seoul, Korea) 위에 위치하면서 stepping을 유발하였다 (Paille, Henry, Lescaudron, Brachet, & Damier, 2007; Yoon et al., 2013). 이때 트레드밀은 1.8 m/10 s로 셋팅되어 있었다. 모든 실험은 비디오 녹화하였으며, 트레드밀 위에서 짚는 step의 수를 세서 수치화하였다. 각각의 stepping test는 회당 2번 실시하였으며, 수치는 평균으로 나타내었다.

2.5. Apomorphine 유발 회전 검사

Apomorphine 유발 회전 검사는 6-OHDA를 주사하고 2주 내에 실시하였다. 간략하게 설명하면, apomorphine (0.25 mg/kg; Sigma)을 멸균증류수에 용해하여 랫드의 피하에 주사한 후 랫드를 곧바로 automated rotometer (Panlab, Barcelona, Spain)에 위치하고 ipsilateral and contralateral 방향의 회전수를 45

분간 자동으로 계산하였다. 데이터는 net (contralateral - ipsilateral turns) 값을 분당 회전수로 나타내었다.

2.6. 조직처리

모든 실험을 종료한 후, 조직 고정을 위해 모든 동물은 마취 후 10,000 IU 헤파린(Hanlim Pharm, Seoul, Korea)을 포함한 생리식염수와 4% paraformaldehyde를 차례로 관류시켰다. 머리를 제거한 후 뇌를 신속히 꺼낸 다음, 4% paraformaldehyde PBS 용액에 12시간 이상 고정시킨 후 탈수를 위해 30% sucrose 용액에 가라앉을 때까지 정치하였고, 이후에는 deep freezer에 보관하였다.

흑질조직(AP -6.0 to -4.8 mm)은 동결조직절편기(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 40 μ m 두께로 자른 후, 0.08% sodium azide (Sigma) PBS용액에 free-floating 상태로 보관하였다.

2.7. 면역염색

일련의 흑질coronal section을 washing buffer(0.5% bovine serum albumin (BSA; Bioworld, Dublin, OH, USA) in PBS (pH 7.4))에 3차례 세척하고, BSA, Triton X-100 (Sigma), sodium azide (Sigma) 등을 포함하는 blocking solution에 조직을 정치시켰다. 이후 다시 washing buffer에 3차례 세척하고, 조직은 1차 항체 용액(Mouse, rabbit anti-TH antibody (1:2,000; Sigma), mouse anti-Iba-1 antibody (1:300; Abcam, Cambridge, UK), 에 12시간 이상 정치시켰다. 다음날 다시 washing buffer에 3차례 세척하고, 조직은 2차 항체 용액 (Alexa Fluor 555, 647 donkey anti-mouse or anti-rabbit IgG (1:1,000; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 2시간 동안 정치시켰다. 다시 washing buffer에 3차례 세척하고, 조직은 fluorescent mounting medium (DAKO, Glostrup, Denmark)를 공급하고 커버슬라이드를 씌웠다.

2.8. 이미징, 통계

형광이미지는 confocal microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with the ZEN microscope software (Carl Zeiss)을 이용하여 얻어내었다. 모든

데이터는 mean \pm standard error로 표기하였으며, 모든 통계분석은 Prism Software (GraphPad, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. Stepping test는 two-way repeated measures ANOVA with Bonferroni post hoc test를 이용하여 분석하였고, 세포 수 분석은 student's t-test와 ImageJ program (National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI, University of Wisconsin))을 이용하였다.

3. 연구 결과

3.1. Stepping test결과

6-OHDA를 주입하기 전 intact 상태에서 stepping test를 실시하여 앞발의 보행능력을 실시한 결과, 모든 쥐에서 병변 측과 병변의 반대 측 앞발이 균등한 보행능력을 보였다(Fig. 2). 6-OHDA를 주입함과 동시에 그래핀 그룹은 그래핀을 5일 동안 복강 내 주입하였고, 6-OHDA를 주입 후 일주일 후 stepping test에서 그래핀을 투여한 그룹은 병변 반대 측 앞발에서 보행능력이 대조군과 비교하여 크게 감소하지 않았고, 이는 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.001$) (Fig. 2D). 이러한 그래핀의 신경보호 효과는 6-OHDA를 주입 후 2주 후에도 계속 유지되었다. 또한, 병변 반대 측/(병변 반대측+ 병변 측)의 비율로 나타내었을 때도 비슷한 양상을 나타내었다 ($p < 0.001$) (Fig. 2B).

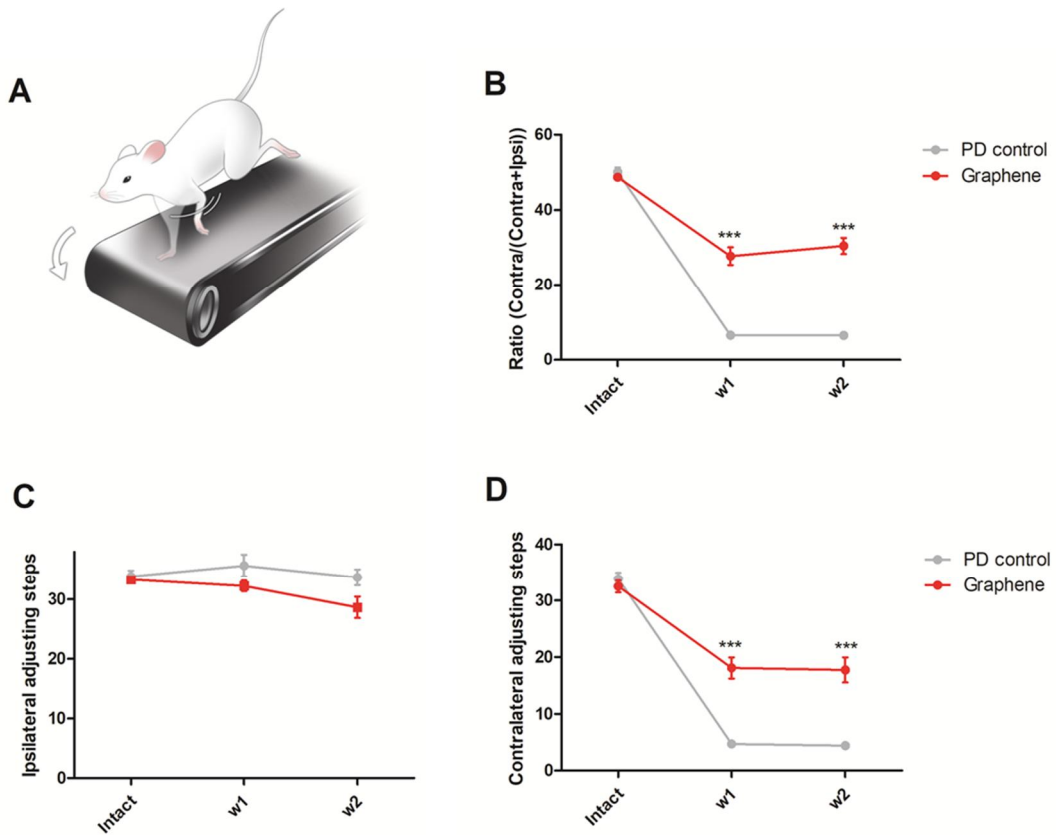


Figure 2. Stepping tests

3.2. Apomorphine 유발 회전 검사 결과

Apomorphine test는 6-OHDA를 주입하고 일주일 후 실시하였다. 각각의 쥐를 45분간 실험한 결과 그래핀을 넣은 그룹에서 대조군과 비교하여 병변 반대 측의 회전수가 감소하였고, 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 3A). 총 45분간의 실험시간을 5분 단위로 나누어 관찰해보니, 그래핀을 넣은 그룹은 초반 15분까지 대조군에 비해 병변 반대 측의 회전수가 감소하였으며, 통계적으로 유의하였다 ($p < 0.01$, $p < 0.05$) (Fig. 3B).

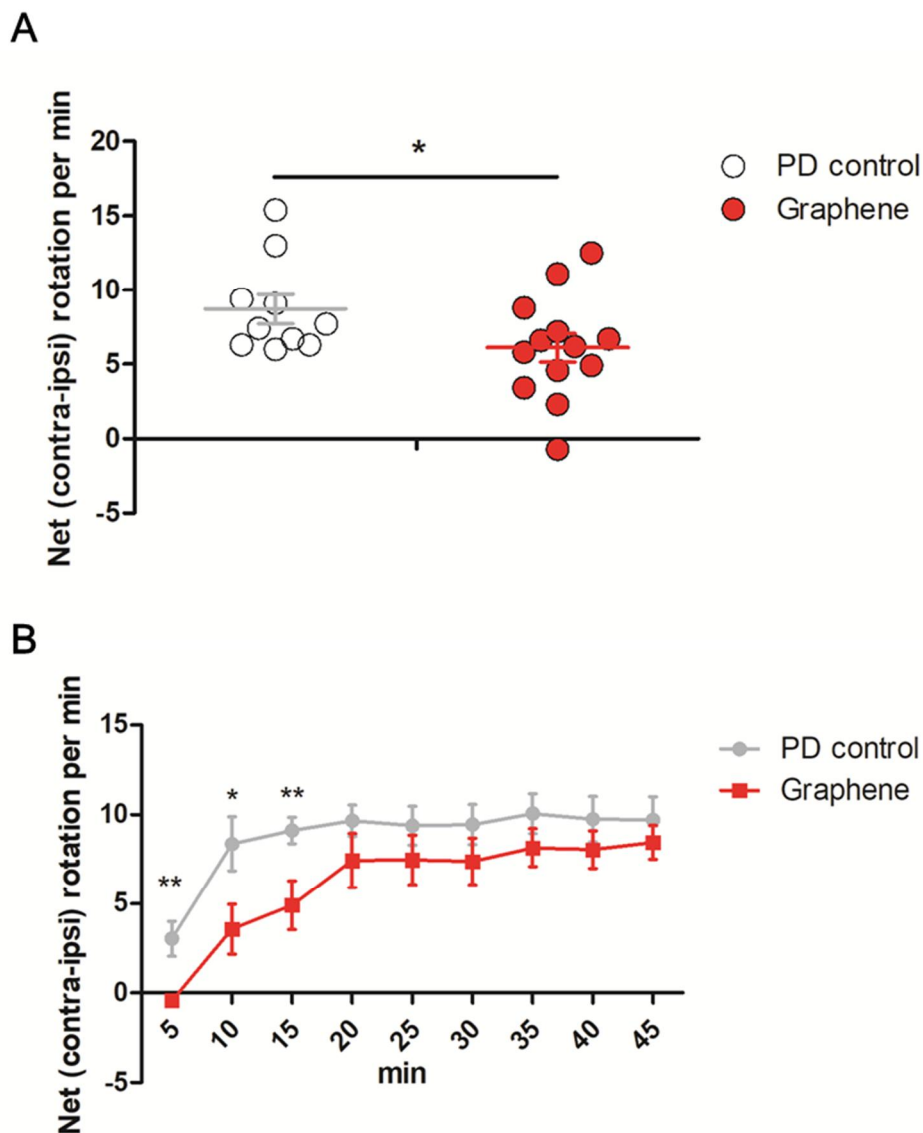


Figure 3. Apomorphine induced rotation tests

3.3. 체중 변화의 관찰

그래핀을 주사하여 유해한 영향이 있는지 알아보기 위하여, 6-OHDA를 주입 전, 그래핀을 주사 후 1주, 2주에 체중을 측정하였다. 그 결과, 그래핀을 넣은 그룹과 대조군의 체중 변화는 거의 나타나지 않았다.

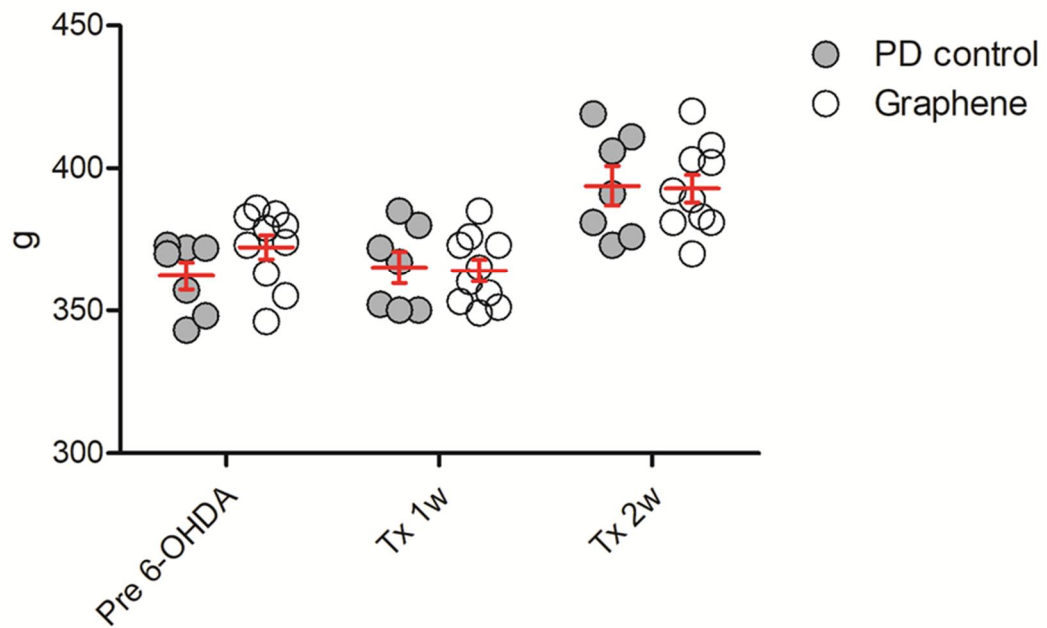


Figure 4. Weight change

3.4. 면역형광염색 결과

행동검사를 마친 모든 쥐를 희생하고, 면역염색을 위한 조직 처리 후 조직 염색을 실시하였다. 도파민 세포에 특이적인 항체인 tyrosine hydroxylase로 염색한 결과, 대조군과 비교하여(Fig. 5A,C) 그래핀을 넣은 그룹에서 (Fig. 5B,D) 병변측의 tyrosine hydroxylase 양성 세포가 상당히 많이 관찰되었다 (Fig. 5 E,F). Microglia와 신경염증의 마커인 Iba-1으로 염색한 결과, 병변 측에서 대조군과 그래핀을 넣은 그룹의 전체적인 Iba-1 양성 세포의 수는 통계적으로 차이를 보이지 않았으나, 활성화되어 크기가 큰 Iba-1 양성 세포의 수는 그래핀을 넣은 그룹에서 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 5G,H).

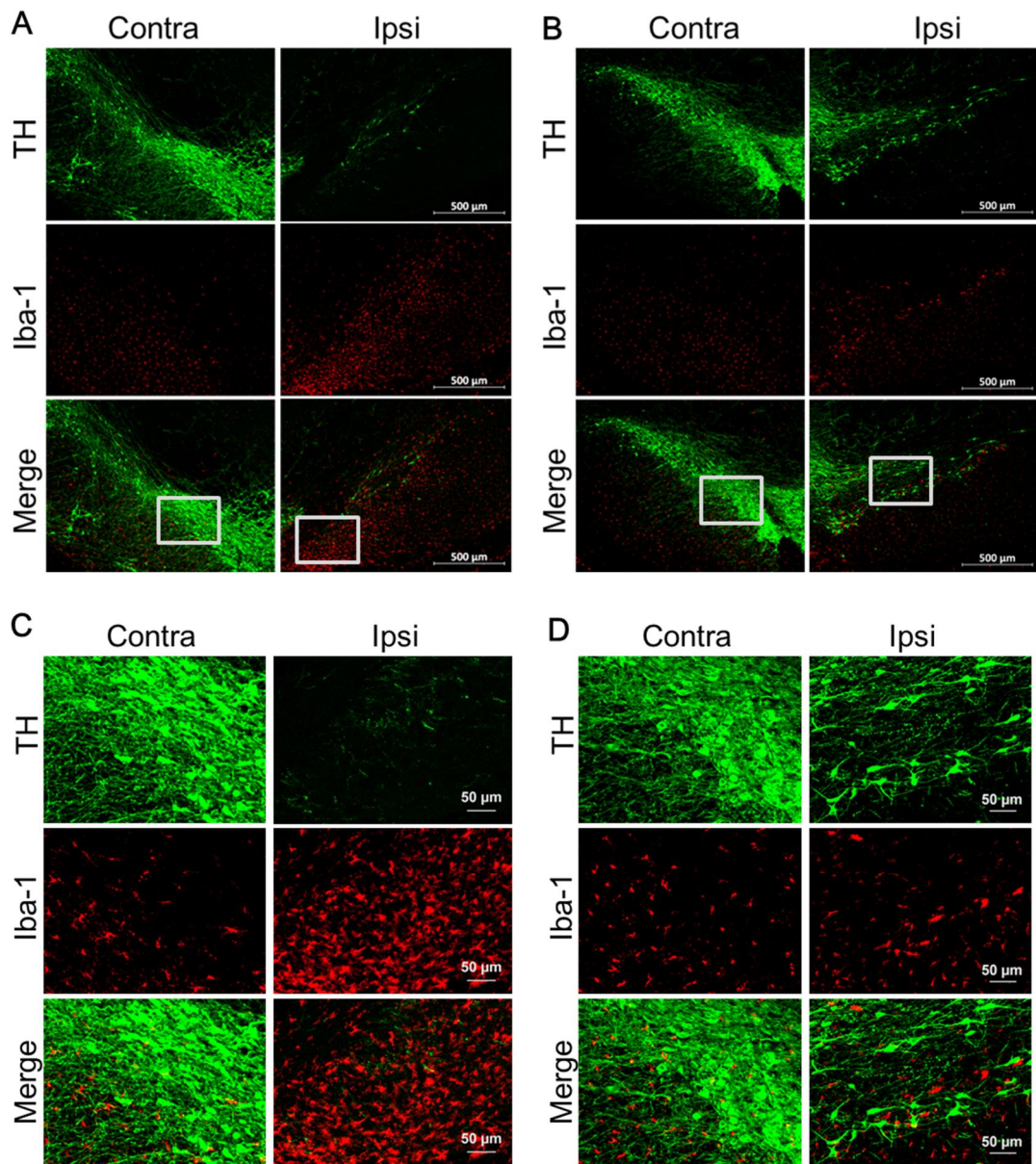


Figure 5. Immunofluorescent staining

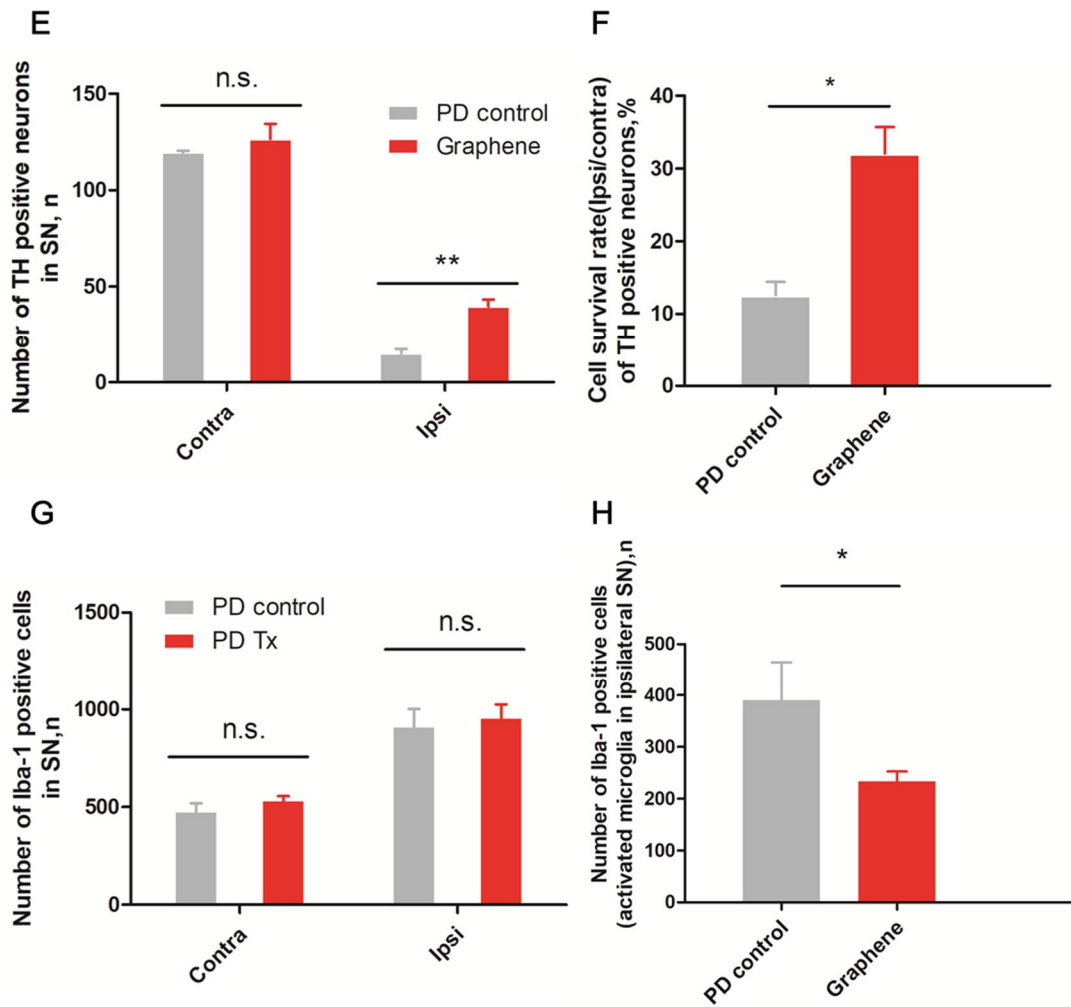


Figure 5. Immunofluorescent staining

4. 고찰

파킨슨병의 병인론적 연구의 의하면 신경염증에 의한 도파민 신경의 소실이 발생할 수 있는 데(Galvan & Wichmann, 2008; Wang, Liu, & Zhou, 2015), 본 연구에서는 이러한 신경염증을 조기에 그래핀을 이용하여 제거함으로써 파킨슨병의 유발을 방지하고자 하였다. 선행 연구에서 그래핀은 대장염에서 항염증 효과가 있음이 입증되었고, 혈관 뇌 장벽 통과가 가능하여 뇌 내에서도 항염증 효과를 발휘할 수 있을 것이라고 예상하였다.(Lee et al., 2020; Mendonca et a

1., 2015) 우리는 또한 선행 연구에서 6-OHDA와 A53T α -synuclein 과발현 바이러스를 이용한 파킨슨병 모델을 제조한 후, 시상 하핵과 다리 속핵을 광자극으로 억제하여 파킨슨병의 중요 증상인 akinesia와 levodopa induced dyskinesia를 개선하였고, 행동검사와 조직검사 등을 통해 입증하였다. (Yoon et al., 2016; Yoon, Nam, Choi, Min, & Jeon, 2020; Yoon et al., 2014)

본 연구에서는 도파민 특이적 신경독소인 6-OHDA을 내측 전뇌다발(medial forebrain bundle)에 주입하여 도파민 신경이 2~3일 내로 90퍼센트 이상 사멸하는 모델을 제조하였으며 (Schober, 2004; Simola, Morelli, & Carta, 2007), 6-OHDA를 주입과 동시에 그래핀을 복강 내로 투여하여 도파민 신경의 사멸을 억제하고자 하였다. 이때, 6-OHDA는 도파민 신경의 미토콘드리아 complex I에 산화스트레스를 발생시켜 최종적으로 도파민 신경을 파괴하는 기전을 가지고 있다.(Glinka, Tipton, & Youdim, 1996; Kulich, Horbinski, Patel, & Chu, 2007) 그래핀은 암세포의 미토콘드리아에서 산화스트레스를 발생시켜 암세포 성장을 저해하는 특징을 가지고 있지만, (Jaworski et al., 2019) 도파민 세포에서는 α -synuclein 응집체를 제거함으로써 행동증상을 완화시키고, 신경보호 효과를 갖는 등의 양면성을 가지고 있다.(Kim et al., 2018)

본 연구에서 그래핀을 6-OHDA 유발 파킨슨병 모델에 5일간 투여한 결과, stepping test에서 대조군과 비교하여 그래핀을 투여한 실험군에서 akinesia 증상이 감소함을 알 수 있었고, (Figure 2) apomorphine 유발 회전검사에서도 대조군과 비교하여 그래핀을 투여한 실험군에서 회전수가 감소하였다.(Figure 3) 이를 통해 6-OHDA가 도파민 신경에 유발한 신경독소에 대해 그래핀은 신경보호 효과가 있음을 입증하였다. 또한, 그래핀을 투여했을 때 대조군과 비교하여 별다른 체중 변화를 관찰하지 못하였고, 이를 통해 그래핀의 독성 효과는 미미한 것으로 판단하였다.(Figure 4)

다음으로 우리는 그래핀의 신경보호 효과를 조직에서 관찰하기 위해 면역형광염색을 실시하였다. 면역형광염색 결과 대조군에 비해 그래핀을 투여한 그룹에서 TH양성세포가 상당히 많이 관찰되었고, 행동검사에 나타난 신경보호 효과와 결과가 일치함을 알 수 있었다.(Figure 5A,B) 두 번째로 그래핀의 항 염증능력을 확인하기 위해, microglia와 항염증마커인 Iba-1로 염색한 결과, 대조군에 비

해 그래핀을 투여한 그룹에서 활성화된 Iba-1 양성세포가 적게 관찰됨을 알 수 있었다. 이를 통해 그래핀이 항염증 능력을 갖고 있다는 것을 다시 한번 확인하였고 (Lee et al., 2020), 이를 통한 도파민 신경의 신경보호 효과가 나타남을 확인하였다.

본 연구에서는 몇가지 제한점을 가지고 있다. 첫번째는 이번 연구가 파킨슨병 초기에 도파민 신경세포에서 발생하는 neuro-inflammation에 대한 그래핀의 항염증작용을 확인하기 위해 (Lee et al., 2020), 그래핀 그룹에 6-OHDA를 주입함과 동시에 그래핀을 복강 내 주입하였기 때문에 두 그룹에서 6-OHDA에 의해 동일한 파킨슨 모델이 만들어졌는지 비교 확인하는 검사가 없었다. 추후 연구에서는 이것에 대한 추가적인 검사가 필요할 것이다. 두번째 제한점은 그래핀 농도 및 주입 경로에 따른 신경보호 효과의 차이에 대한 연구가 부족한 것이다. 그래핀 양자점이 뇌혈관장벽을 투과할 수 있다고 알려져 있고 (Kim et al., 2018), 그래핀 주입의 편이성을 고려하여 본 연구에서는 그래핀을 복강 내로 주입하였으나 혈관내 및 두개강내 주입과의 차이에 대해서 확인하지 않았다. 또한 그래핀 적정 용량의 도출에 관한 연구가 추후 필요할 것으로 사료된다. 향후 임상 적용시에는 그래핀의 인체내 대사 과정 및 배설 과정뿐만 아니라 그래핀이 인체내 축적 되었을 때 발생할 수 있는 예상치 못한 부작용들에 대한 연구가 필요할 것이다.

그래핀은 oxide와 여러 가지 유도체들이 있으며, 표면이 여러 가지 물질과 결합이 가능하여 여러 가지 약물과 biomolecule들의 운반체로서의 역할이 가능하고, 높은 biocompatibility를 갖고 있기 때문에 scaffold 또는 암세포치료에도 유용하게 사용될 수 있다. (Huang et al., 2018; Jiang et al., 2020; Yang et al., 2019) 하지만 파킨슨병에서 그래핀을 이용한 치료방법을 연구한 사례는 극히 제한적이다. 본 연구에서는 6-OHDA를 이용한 파킨슨병 동물모델에서 그래핀의 신경보호 효과를 최초로 증명하였다. 하지만, 그래핀이 체내에서 ROS를 생산하는 등 양면성을 가지고 있기 때문에, (Pelin et al., 2018) 향후 임상에 그래핀 치료를 적용하기 위해서는 적극적인 독성검사가 필수적이다.

5. 결 론

본 연구에서 우리는 최초로 6-OHDA를 이용한 파킨슨병 동물모델에서 그래핀의 항염증 기능을 통해 도파민 신경의 보호 효과가 있음을 행동검사와 조직검사를 통해 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Beiske, A. G., Loge, J. H., Rønningen, A., & Svensson, E. (2009). Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. *PAIN*®, 141(1), 173-177.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.12.004>
2. Benabid, A. L. (2003). Deep brain stimulation for Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(6), 696-706. doi:<https://doi.org/10.1016/j.conb.2003.11.001>
3. Bezard, E., Brotchie, J. M., & Gross, C. E. (2001). Pathophysiology of levodopa-induced dyskinesia: Potential for new therapies. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(8), 577-588. doi:10.1038/35086062
4. Collins, L. M., Toulouse, A., Connor, T. J., & Nolan, Y. M. (2012). Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 62(7), 2154-2168. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.01.028
5. Galvan, A., & Wichmann, T. (2008). Pathophysiology of parkinsonism. *Clin Neurophysiol*, 119(7), 1459-1474. doi:10.1016/j.clinph.2008.03.017
6. Glinka, Y., Tipton, K. F., & Youdim, M. B. (1996). Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. *J Neurochem*, 66(5), 2004-2010.
doi:10.1046/j.1471-4159.1996.66052004.x

7. Han, S., Kim, S., Kim, H., Shin, H.-W., Na, K.-S., & Suh, H. S. (2019). Prevalence and incidence of Parkinson's disease and drug-induced parkinsonism in Korea. *BMC Public Health*, 19(1), 1328. doi:10.1186/s12889-019-7664-6
8. Huang, C., Wu, J., Jiang, W., Liu, R., Li, Z., & Luan, Y. (2018). Amphiphilic prodrug-decorated graphene oxide as a multi-functional drug delivery system for efficient cancer therapy. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 89, 15-24. doi:10.1016/j.msec.2018.03.017
9. Jankovic, J., & Aguilar, L. G. (2008). Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 4(4), 743-757. doi:10.2147/ndt.s2006
10. Jaworski, S., Strojny, B., Sawosz, E., Wierzbicki, M., Grodzik, M., Kutwin, M., . . . Chwalibog, A. (2019). Degradation of Mitochondria and Oxidative Stress as the Main Mechanism of Toxicity of Pristine Graphene on U87 Glioblastoma Cells and Tumors and HS-5 Cells. *Int J Mol Sci*, 20(3). doi:10.3390/ijms20030650
11. Jiang, W., Chen, J., Gong, C., Wang, Y., Gao, Y., & Yuan, Y. (2020). Intravenous delivery of enzalutamide based on high drug loading multifunctional graphene oxide nanoparticles for castration-resistant prostate cancer therapy. *J Nanobiotechnology*, 18(1), 50. doi:10.1186/s12951-020-00607-4
12. Kim, D., Yoo, J. M., Hwang, H., Lee, J., Lee, S. H., Yun, S. P., . . . Ko, H. S. (2018). Graphene quantum dots prevent alpha-synucleinopathy in Parkinson's disease.

Nat Nanotechnol, 13(9), 812-818. doi:10.1038/s41565-018-0179-y

13. Kollensperger, M., Stefanova, N., Pallua, A., Puschban, Z., Dechant, G., Hainzer, M., . . .
Wenning, G. K. (2009). Striatal transplantation in a rodent model of multiple
system atrophy: effects on L-Dopa response. *J Neurosci Res*, 87(7), 1679-1685.
doi:10.1002/jnr.21972
14. Kulich, S. M., Horbinski, C., Patel, M., & Chu, C. T. (2007). 6-Hydroxydopamine induces
mitochondrial ERK activation. *Free Radic Biol Med*, 43(3), 372-383.
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.028
15. Lee, B. C., Lee, J. Y., Kim, J., Yoo, J. M., Kang, I., Kim, J. J., . . . Kang, K. S. (2020).
Graphene quantum dots as anti-inflammatory therapy for colitis. *Sci Adv*, 6(18),
eaaz2630. doi:10.1126/sciadv.aaz2630
16. Lücking, C. B., & Brice*, A. (2000). Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cellular
and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(13), 1894-1908. doi:10.1007/PL00000671
17. Marsden, C. D., & Parkes, J. D. (1977). SUCCESS AND PROBLEMS OF LONG-TERM
LEVODOPA THERAPY IN PARKINSON'S DISEASE. *The Lancet*, 309(8007), 345-
349. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)91146-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)91146-1)
18. Mendonça, M. C., Soares, E. S., de Jesus, M. B., Ceragioli, H. J., Ferreira, M. S.,
Catharino, R. R., & da Cruz-Hofling, M. A. (2015). Reduced graphene oxide
induces transient blood-brain barrier opening: an in vivo study. *J*

Nanobiotechnology, 13, 78. doi:10.1186/s12951-015-0143-z

19. Moore, D. J., West, A. B., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*, 28, 57-87.
doi:10.1146/annurev.neuro.28.061604.135718
20. Paille, V., Henry, V., Lescaudron, L., Brachet, P., & Damier, P. (2007). Rat model of Parkinson's disease with bilateral motor abnormalities, reversible with levodopa, and dyskinesias. *Mov Disord*, 22(4), 533-539. doi:10.1002/mds.21308
21. Pelin, M., Fusco, L., Martin, C., Sosa, S., Frontinan-Rubio, J., Gonzalez-Dominguez, J. M., . . . Tubaro, A. (2018). Graphene and graphene oxide induce ROS production in human HaCaT skin keratinocytes: the role of xanthine oxidase and NADH dehydrogenase. *Nanoscale*, 10(25), 11820-11830. doi:10.1039/c8nr02933d
22. Przuntek, H. (2000). Non-dopaminergic therapy in Parkinson's disease. *J Neurol*, 247 Suppl 2, II19-24. doi:10.1007/pl00007756
23. Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and tissue research*, 318(1), 215-224.
24. Simola, N., Morelli, M., & Carta, A. R. (2007). The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotox Res*, 11(3-4), 151-167. doi:10.1007/BF03033565
25. Thanvi, B., Lo, N., & Robinson, T. (2007). Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment. *Postgrad Med*

J, 83(980), 384-388. doi:10.1136/pgmj.2006.054759

26. Wang, Q., Liu, Y., & Zhou, J. (2015). Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener*, 4, 19. doi:10.1186/s40035-015-0042-0
27. Yang, Y. F., Meng, F. Y., Li, X. H., Wu, N. N., Deng, Y. H., Wei, L. Y., & Zeng, X. P. (2019). Magnetic Graphene Oxide-Fe(3)O(4)-PANI Nanoparticle Adsorbed Platinum Drugs as Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *J Nanosci Nanotechnol*, 19(12), 7517-7525. doi:10.1166/jnn.2019.16768
28. Yoon, H. H., Min, J., Hwang, E., Lee, C. J., Suh, J. K., Hwang, O., & Jeon, S. R. (2016). Optogenetic Inhibition of the Subthalamic Nucleus Reduces Levodopa-Induced Dyskinesias in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Stereotact Funct Neurosurg*, 94(1), 41-53. doi:10.1159/000442891
29. Yoon, H. H., Min, J., Shin, N., Kim, Y. H., Kim, J. M., Hwang, Y. S., . . . Jeon, S. R. (2013). Are human dental papilla-derived stem cell and human brain-derived neural stem cell transplantations suitable for treatment of Parkinson's disease? *Neural Regen Res*, 8(13), 1190-1200. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.13.004
30. Yoon, H. H., Nam, M. H., Choi, I., Min, J., & Jeon, S. R. (2020). Optogenetic inactivation of the entopeduncular nucleus improves forelimb akinesia in a Parkinson's disease model. *Behav Brain Res*, 386, 112551. doi:10.1016/j.bbr.2020.112551

31. Yoon, H. H., Park, J. H., Kim, Y. H., Min, J., Hwang, E., Lee, C. J., . . . Jeon, S. R. (2014).

Optogenetic inactivation of the subthalamic nucleus improves forelimb akinesia
in a rat model of Parkinson disease. *Neurosurgery*, 74(5), 533-540; discussion
540-531. doi:10.1227/NEU.0000000000000297

Abstract

Objectives: Parkinson's disease (PD) develops as dopaminergic neurons which distributed in the substantia nigra pars compacta of midbrain are progressively destroyed and is chronically and slowly progressing neurodegenerative disease featuring resting tremor, rigidity, and bradykinesia. There has been no treatment methods developed to stop and control the progression of Parkinson's disease to date, and it is necessary to invent a new treatment method based on pathophysiology of Parkinson's disease. According to pathophysiology of Parkinson's disease, the most important factors causing the disease is progressive destruction of the neurons from neuroinflammation and α -synuclein toxicity. If neuroinflammation and α -synuclein toxicity can be protected or removed through pathological research on Parkinson's disease, it can be revolutionary treatment method to control the causes of Parkinson's disease. The recently invented graphene is one of allotrope of carbons, which has been proven to be effective in anti-inflammation, and in this study, we are going to report its neuroprotective effects by applying the anti-inflammatory effect to Parkinson's disease animal model.

Methods: We made 23 rat models of unilateral Parkinson's disease by injecting 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into medial forebrain bundle, which is the main pathway for dopaminergic neurons. The 23 rats with 6-OHDA injection were experimented according to the number of graphene injection: PD control groups (n=10) treated only with 6-OHDA; and Graphene groups (n=13) treated with graphene for five days after 6-OHDA. Stepping test was performed at 7 days pre-6-

OHDA injection, 7 days and 14 days post-6-OHDA injection, and apomorphine test was performed within 2 weeks post-6-OHDA injection. Histologic change was determined through tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining and Nissl staining method.

Results: In the stepping test at 7 days post-6-OHDA injection, the step ability of forelimb of the opposite side of the lesion in graphene treated groups were not significantly decreased compared to control groups, and it was statistically significant ($p < 0.001$). Apomorphine test was performed after 7 days post-6-OHDA injection. Each rat was observed for 45 minutes, and the result was the number of rotations of the opposite side of the lesion was decreased in graphene treated groups compared to that of control groups, and it was statistically significant ($p < 0.05$). In the result of staining with tyrosine hydroxylase, an antibody for dopaminergic-specific neuron, considerably large amount of tyrosine hydroxylase positive cells was observed in the lesion side of the graphene treated groups compared to that of control groups.

Conclusion: This study is the first to determine protective effect of dopaminergic neurons through ant-inflammatory effect of graphene using behavior test and immunohistochemical study in Parkinson's disease animal models using 6-OHDA.

Key words: Parkinson disease, graphene, 6-Hydroxydopamine, α -synuclein, anti-inflammatory therapy