Mongolian Gerbil에서 유발시킨 전뇌허혈에 의한 해마 Polyamine 함량변동 및 신경세포손상에 대한 Melatonin의 영향

계명대학교 의과대학 약리학교실 및 *마취과학교실

이 성 룡 · 전 재 규*

= Abstract =

Effect of Melatonin on the Changes of Hippocampal Polyamine Content and Neuronal Damage Following Transient Global Ischemia in Mongolian Gerbil: a Study of the Differences of Pre- and Post-ischemic Treatment

Seong Ryong Lee, M.D., and Jae Kyu Cheun, M.D.*

Departments of Pharmacology and *Anesthesiology, School of Medicine,
Keimyung University, Daegu, Korea

Background: We designed this study to examine whether melatonin has a neuroprotective effect against hippocampal neuronal damage following transient global ischemia in a gerbil. Because polyamine is known to participate in the process of ischemic neuronal damage, we examined the influence of melatonin on the polyamine level as well as histology. In particular, we examined the difference between pre- and post-ischemic treatments of melatonin by using the above mentioned parameters.

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 microclips. Melatonin was administered 1 h before or 1 h after occlusion. The animals were dissected 4 days after the occlusion for polyamine measurement by a high performance liquid chromatography (HPLC) and histological evaluation (hematoxylin and eosin staining). A histological examination was performed by a blinded investigator.

Results: The hippocampal putrescine (PU) level increased compared to sham-operated animals and the increase of PU was attenuated by melatonin administration (pre- or post-ischemic treatment). Spermidine (SD) and spermine (SM) 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. Both pre- and post-ischemic melatonin administration significantly inhibited hippocampal CA1 neuronal damage compared to corresponding vehicle-treated animals ($P < 0.01$, respectively).

Conclusions: Melatonin attenuates the polyamine response following transient global ischemia and may have putative neuroprotective effects against global ischemia-induced neuronal damage. There is no difference in neuroprotective effects of melatonin between pre- & post-ischemic treatments. (Korean J Anesthesiol 2001; 40: 664~670)

Key Words: Brain: global ischemia. Equipment: high performance liquid chromatography; rotary microtome. Pharmacology: melatonin; polyamine.

논문접수일 : 2001년 3월 28일

책임저자 : 전재규, 대구시 중구 동산동 194, 계명대학교 의과대학 마취과학교실, 우편번호: 700-712

Tel: 053-250-7231, Fax: 053-252-1605, E-mail: c1963@dsmc.or.kr

본 연구는 1998년도 동산의료원 특수과제 연구비의 지원으로 이루어졌음.

서 론

포유류에서 자연적으로 존재하는 polyamine은 putrescine, spermidine 및 spermine 등이며 polyamine은 거의 모든 살아있는 세포에 존재하며 세포의 성장이나 발육에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 내인성 polyamine은 중추신경계에서 다양한 효과를 가지는 것으로 알려져 있는데 주로 신경전달체나 신경조절 물질로 작용한다.³⁾ 또한 뇌내 polyamine은 다양한 종류의 화학적, 물리적 및 대사성 자극 등에 의해 민감하게 반응하며 polyamine의 생합성이 증가되어 축적되면 신경세포 손상, 뇌부종 및 혈뇌장벽(blood brain barrier)의 파괴 등을 일으킨다. Polyamine은 세포 내 칼슘 함량을 증가시키고^{4,5)} 흥분성 아미노산을 유리시키는 작용을 나타낸다.⁶⁾ Paschen 등은⁷⁾ 그들의 연구에서 허혈과 polyamine의 대사와의 관계를 보고하였는데, 특히 putrescine은 정상적으로는 매우 낮은 용량으로 존재하나 외부자극에 의해 지속적인 함량 증가상태는 신경세포에 매우 유해하다고 알려져 있다. 따라서 polyamine 대사에 관련된 효소를 억제하여 polyamine의 과다한 축적을 억제하여 뇌를 보호하려는 연구들이 시도되고 있다.^{8,9)}

송과선 호르몬 melatonin은 신경내분비계에서 중요한 역할을 하며¹⁰⁾ 강력한 항산화제로 알려져 있다.^{11,12)} Cho 등의¹³⁾ 보고에 의하면 melatonin에 의해 백서에서 유발시킨 전뇌허혈에서 해마 conus ammonis (CA) 1 부위의 신경세포를 보호한다고 하였다. 또한 melatonin은 모래쥐에서 전뇌허혈에 의한 nitric oxide 및 cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 생성 증가를 억제한다고 알려져 있다.¹⁴⁾

이 연구에서는 Mongolian gerbil에서 전뇌허혈에 의한 polyamine의 함량변동을 알아보고, 항산화제인 melatonin의 투여가 polyamine의 반응에 영향을 주는 지 관찰하였다. 또한 조직학적인 관찰로 해마신경세포의 손상을 억제하는지와 허혈 전·후 투여시점의 차이를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

실험동물

본 실험에 몸무게 60-80 g의 웅성 Mongolian

gerbil (n = 47)을 같은 장소에서 동일한 사료로 1주일 이상 사육한 후 사용하였다.

전뇌허혈 유발 수술 및 약물 투여

Chloral hydrate (400 mg/kg)를 복강내에 투여하여 마취시킨 후 목 중앙에 2 cm 정도의 피부를 절개한 후 양측 총경동맥을 주위신경 정맥들로부터 조심스럽게 분리한 후 미세 클립(microclip)으로 3분간 결찰한 후 재관류를 실시하였다. 재관류는 육안으로 확인하였고 이후 피부를 봉합하였다. 저체온으로 인한 영향을 배제하기 위해 열관 및 백열등을 이용하여 직장온도를 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다.

Melatonin (Sigma Chemical Co., USA)을 100% ethanol에 녹인 후 최종 ethanol의 농도가 5% 이하가 되도록 증류수로 희석시켰으며 투여 용량은 각각 20 mg/kg으로 하였다. 약물투여는 복강내 투여를 실시하였다.

실험군

본 실험의 군은 다음과 같은데 sham 수술군(n = 8)으로 마취 후 총경동맥을 노출시키고 허혈 및 약물처치를 하지 않은 대조군이며, 허혈 전 vehicle 투여군(n = 9)으로 melatonin 투여량과 동일한 양의 5% ethanol을 허혈손상 1시간 전에 복강내 투여한 군, 허혈 후 vehicle 투여군(n = 8)으로 melatonin 투여량과 동일한 양의 5% ethanol을 허혈손상 1시간 후에 복강내 투여한 군, 허혈 전 melatonin 처치군(n = 13)으로 melatonin (20 mg/kg)을 허혈손상 1시간 전에 복강내 투여한 군, 허혈 후 melatonin 처치군(n = 9)으로 melatonin (20 mg/kg)을 허혈손상 1시간 후에 복강내 투여한 군 등이다.

Polyamine 추출 및 측정

Polyamine의 추출과정은 Spragg 및 Hutchings의 방법에¹⁵⁾ 준하여 실시하였다. 수술 24시간 후 실험동물을 희생시켜 대뇌를 꺼내어 해마를 즉시 분리한 후 Eppendorf 튜브에 담아 -70°C 에 보관하였다. 해마조직을 유리 균질기(glass homogenizer)로 용량 10 배에 해당하는 0.4 M perchloric acid 용액(2 mM disodium EDTA 및 4×10^{-5} M의 1,8-diaminooctane을 함유)을 첨가한 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 μ l의 4-fluoro-3-nitrobenzotri-fluoride (FNBT) 시약을 넣어 60°C에서 20분간 반응시키고 40 μ l의 1 M histidine를 첨가하여 5분간 추가반응시킨 후에 얼음으로 냉각시켰다. 그 후 2 ml의 2-methylbutane으로 2회 polyamine을 추출해내었다. 10분간 원심분리 후 유기용매층을 분리하여 다른 튜브에 옮겨, 진공건조시킨 후 메탄올로 재용해시켰다. 재용해시킨 용액 20 μ l를 크로마토그래피 기기에 적용시켜 분석하였다. 크로마토그래피에 이용된 이동상(mobile phase)은 acetonitrile과 증류수의 비율을 85대 15로 하였고 항상 사용 전 탈기(degassing)를 시킨 후 사용하였고 이동상의 유속은 분당 1 ml로 하였고 한 샘플당 약 20분의 분석시간이 소요되었다. Column은 Rainin사의 ODS C18 column (250 mm $\times$ 4 mm)을 사용하였다. Polyamine 분석은 ultraviolet 검출기로 242 nm에서 측정하였다.

조직학적 검사

실험동물을 허혈 96시간 후 diethyl ether로 깊이 마취시키고 흉곽을 열고 좌심실을 통해 헤파린(heparin) 처리된 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2)과 10% formalin 고정액으로 관류시켰다. 두개골에서 뇌를 꺼낸 후 10% formalin에 보관하여 추가 고정시켰다(24-72시간). 뇌를 파라핀으로 embedding시키고 bregma 후방 1.5 mm 정도 부위에서부터 rotary microtome을 이용하여 6 μ m 두께의 관상절편(coronal section)을 제작하였다. 관상 뇌절편을 hematoxylin 및 eosin으로 염색하였다.¹⁴⁾ 해마 CA1 부위의 신경세포 손상 정도는 정상 신경세포를 현미경하에서 counting하여 결정하였다(좌·우 양측 해마의 CA1 부위 중 1 mm 길이에 존재하는 정상 추상세포를 관찰하여 평균의 수치 결정).¹⁵⁾

시약

Putrescine, spermidine, spermine 및 1,8-diaminooctane은 Sigma사(Sigma Chemical Co., USA)의 제품을 사용하였다. FNBT는 Aldrich사(Sigma Chemical Co., USA)의 제품을 사용하였다. Acetonitrile은 J.T. Baker사 J.T. Baker Co., USA)의 제품을 사용하였다.

통계분석

본 실험의 결과 분석(polyamine 및 조직학)은

ANOVA 및 post hoc Scheffe's test를 이용해 시행하였다. 모든 실험 결과는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였고, P값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 의의가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

허혈에 의한 polyamine의 반응에 대한 melatonin의 영향

Putrescine 함량은 대조군(7.57 ± 0.31 nmol/g tissue)에 비하여 허혈 손상군들(허혈전 vehicle 투여군; 24.30 ± 5.83 nmol/g tissue, 허혈 후 vehicle 투여군; 23.99 ± 5.2 nmol/g tissue)에서 유의하게 증가를 보였고(각각 $P < 0.05$, Fig. 1) 이 증가는 melatonin의 허혈 전 및 허혈 후 투여에 의해 각각 억제되었다(각각 $P < 0.05$, Fig. 1). Spermidine과 spermine은 허혈손상에 의해 유의한 변동을 보이지 않았으며 역시 melatonin 투여가 함량 변동에 영향을 주지 않았다(Fig. 2와 3).

조직학적 소견

Gerbil의 조직 절편에 대한 광학현미경하의 관찰소

Fig. 1. Changes of putrescine levels in the gerbil hippocampus after global ischemia and effects of melatonin administration. Putrescine levels are given nmol/g wet tissue. * $P < 0.05$ in comparison with pre-ischemic or post-ischemic vehicle-treated gerbils (pre-V or post-V). Sham: sham-operated ($n = 4$); Pre-V: pre-ischemic vehicle-treated ($n = 5$); Post-V: post-ischemic vehicle-treated ($n = 4$); Pre: pre-ischemic melatonin-treated ($n = 7$); Post: post-ischemic melatonin-treated gerbils ($n = 4$).

Fig. 2. Changes of spermidine levels in the gerbil hippocampus after transient global ischemia and effects of melatonin administration. Spermidine levels are given nmol/g wet tissue. Sham: sham-operated ($n = 4$); Pre-V: pre-ischemic vehicle-treated ($n = 5$); Post-V: post-ischemic vehicle-treated ($n = 4$); Pre: pre-ischemic melatonin-treated ($n = 7$); Post: post-ischemic melatonin-treated gerbils ($n = 4$).

Fig. 3. Changes of spermine levels in the gerbil hippocampus after global ischemia and effects of melatonin administration. Spermine levels are given nmol/g wet tissue. Sham: sham-operated ($n = 4$); Pre-V: pre-ischemic vehicle-treated ($n = 5$); Post-V: post-ischemic vehicle-treated ($n = 4$); Pre: pre-ischemic melatonin-treated ($n = 7$); Post: post-ischemic melatonin-treated gerbils ($n = 4$).

견은 해마 CA1 부위의 신경세포가 허혈손상에 의해 현저히 파괴되었으며($P < 0.01$), 이러한 신경세포손상은 melatonin의 허혈전·후 투여에 의해 각각 유의하게 억제되었다(각각 $P < 0.01$, Fig. 4 및 5).

고 찰

이 연구에서 melatonin의 투여에 의해 일과성 전뇌

허혈에 의한 해마신경세포의 손상을 억제하고 또한 허혈손상에 밀접한 polyamine의 함량, 특히 putrescine의 함량증가를 억제하였음을 관찰하였다.

Polyamine은 세포 성장, 암발생, 및 조직 손상 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.^{1,8,18)} 뇌내 polyamine 함량은 간질발작, kainate의 투여에 의한 흥분성 뇌 신경손상, 허혈에 기인된 손상 등 다양한 자극이나 손상에 의해 영향을 받을 수 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 손상기전에 주요한 기전이 되기도 한다.¹⁹⁻²²⁾ Polyamine 중 putrescine 함량이 세포괴사 정도와 밀접한 관계가 있다. 또한 polyamine은 괴사가 진행되는 신경세포에서 분비되어 이웃하는 다른 신경 세포들의 NMDA수용체에 결합하여 흥분성 신경독작용에 더욱 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,^{7,8)} 냉각(cold)에 의해 유발된 뇌손상에 관련된 것으로 알려져 있다.²³⁾ Paschen 등은⁷⁾ 흰쥐의 전뇌허혈 모델에서 polyamine 생성에 있어 주요 rate-limiting 효소인 ornithine decarboxylase (ODC)의 활성 억제제인 alpha-difluoromethylornithine (DFMO)을 처리하여 putrescine 함량이 유의하게 감소한 것을 관찰하였고, 또한 Baskaya 등은⁹⁾ ODC를 억제시킨 후 허혈에 의한 부종형성이 억제된다고 보고하였다. 일과성 전뇌허혈에 의해 해마 CA1 부위의 신경세포가 선택적으로 손상을 입는데,²⁴⁾ Paschen 등은⁷⁾ 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 있으며²⁵⁾ 흥분성 신경독작용에 의한 apoptosis성 신경세포사를 줄인다는 보고가 있다.²⁶⁾

본 연구에서는 전뇌허혈에 의한 지연성 신경세포사를 관찰하기 위하여 3분간 양측 총경동맥을 결찰 후 96시간 동안의 재관류시켰고 이에 의한 현저한

Fig. 4. 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 pre-ischemic vehicle-treated (B), in Pre: pre-ischemic melatonin-treated (C), in post-ischemic vehicle-treated (D), and in Post: post-ischemic melatonin-treated gerbils (E). Bar = 100 μ m.

해마 CA1 부위의 신경세포손상이 허혈 1시간 전·후의 melatonin 투여에 의해 각각 유의하게 억제되었고 두 가지 투여 시점에 따른 차이는 없었다. 이러한 결과는 백서에서 전뇌허혈모델을 이용한 Cho 등의¹³⁾ 실험에서와 마찬가지로 melatonin투여에 의한 신경세포손상에 대한 보호작용을 확인할 수 있었다. 그들의 보고에서는 10 mg/kg의 melatonin을 허혈 30분전 혹은 1시간 후 복강내 투여하여 해마 CA1부위의 신경세포를 허혈손상으로부터 보호하지 못하였

다. 본 실험에서는 melatonin의 용량을 증가시킨 즉, 20 mg/kg으로 투여하였는데 허혈 1시간 전 혹은 후 1회 투여에 의해 신경세포손상이 보호되었다. 이 연구에서는 Cho 등의¹³⁾ 결과와는 달리 허혈재관류 1시간 전 및 후 약물투여 모두에서 효과가 있는 것으로 보아 전뇌허혈손상에 대한 melatonin의 방어효과는 투여량 및 투여시기가 매우 중요한 것으로 사료된다.

한편 신경세포손상과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려진 polyamine 특히 손상기전에 관여하는 putrescine

Fig. 5. 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 (pre-ischemia and post-ischemia, respectively). Data are presented as the mean $\pm$ S.E.M. * $P < 0.01$ in comparison with sham-operated gerbils. Sham, sham-operated ($n = 4$); Pre-V, pre-ischemic vehicle-treated ($n = 4$); Post-V, post-ischemic vehicle-treated ($n = 4$); Pre: pre-ischemic melatonin-treated ($n = 6$), and Post: post-ischemic melatonin-treated gerbils ($n = 5$).

의 함량변동이 허혈-재관류에 의해 증가하였고 이 증가를 melatonin이 억제함으로써 melatonin은 polyamine 대사에 영향을 주는 것으로 보인다. Melatonin에 의한 putrescine의 함량저하를 통해 신경세포손상이 억제됨을 알 수 있었으며 spermidine 함량은 유의성은 없었으나 다소 증가하였다. Carter 등은²⁷⁾ 그들의 보고에서 흰쥐 대뇌피질에서 영구적 중뇌동맥 폐쇄에 따른 손상에서 spermidine의 유리를 관찰하였다. 또한, 이들 실험에서 putrescine 분비는 중뇌동맥 폐쇄 후 실험 동물 중 40% (2/5)의 동물에서 유의하게 증가하였다. 반면 spermine은 대조군 혹은 중뇌동맥 폐쇄군에서 대뇌피질에서 분비가 이루어진 증거는 전혀 없었다. 이 실험에서도 역시 spermidine과 spermine은 melatonin에 의한 유의한 함량변동을 보이지 않았다. Paschen 등은⁷⁾ 모래쥐를 이용하여 전뇌허혈에 의한 polyamine의 함량변동을 관찰하였는데 재관류 후 putrescine의 현저한 증가 및 허혈손상 정도에 비례하게 putrescine의 함량증가를 보고하였다. 또한 그들의 보고에서 매우 심한 정도의 신경조직괴사에서 spermidine과 spermine이 오히려 감소한 것으로 보고하였는데 이 연구에서 보이는 spermidine

과 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. 이 연구에서 허혈에 의한 spermidine과 spermine의 함량에 유의한 변동이 없었는데 일반적으로 외부 자극에 의해 뇌내 polyamine 중 spermidine과 spermine의 함량의 경우 유의한 변동이 없거나 오히려 유의하게 감소한다는 연구와²⁷⁾ 일치하는 결과다. 일반적으로 심한 허혈손상과 미약한 허혈손상은 그 병리생리적 손상이 다른 것으로 널리 알려져 있는데 즉 허혈시간이 긴 심한 손상의 경우 괴사형태의 세포사가 주가 되며, 미약한 허혈손상에 의해서는 주로 apoptosis형태의 세포사가 일어나는 것으로 보고되었다.²⁸⁾ Polyamine이 이러한 신경세포사 차이에 어떻게 관여되는지는 추후에 실험이 필요할 것으로 생각된다.

이 실험에서 실시한 3분간의 허혈손상에서는 putrescine이 가장 매우 민감하게 반응하는 것으로 관찰되었다. 따라서 polyamine 중 putrescine의 함량변동이 신경세포손상을 가늠하는 생화학적 척도로 의미를 가질 수 있을 것으로 사료된다. 결론적으로 melatonin 20 mg/kg의 허혈 1시간 전 및 1시간 후 투여는 전뇌허혈에 의한 해마신경세포손상에 대한 보호작용을 가지며 putrescine은 중요한 생화학적 척도가 될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Tabor CW, Tabor H: Polyamines. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 749-90.
2. Pegg AE: Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J* 1986; 234: 249-62.
3. Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB: Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci* 1991; 48: 469-98.
4. Koenig H, Goldstein AD, Lu Ch-Y: Polyamines

- regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. *Nature* 1983; 305: 530-4.
5. Iqbal Z, Koenig H: Polyamines appear to be second messengers in mediating Ca^{++} fluxes and neurotransmitter release potassium-depolarized synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133: 563-73.
6. Bondy SC, Walker CH: Polyamines contribute to calcium-stimulated release of aspartate from brain particulate fractions. *Brain Res* 1986; 371: 96-100.
7. Paschen W, Rohn G, Meese CO, Djuricic B, Schmidt-Kastner R: Polyamine metabolism in reversible cerebral ischemia: effect of α -difluoromethylornithine. *Brain Res* 1988; 453: 9-16.
8. Dempsey RJ, Carney JM, Kindy MS: Modulation of ornithine decarboxylase mRNA following transient ischemia in the gerbil. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991; 11: 979-85.
9. Baskaya MK, Rao AM, Puckett L, Prasad MR, Dempsey RJ: Effect of difluoro- methylornithine treatment on regional ornithine decarboxylase activity and edema formation after experimental brain injury. *J Neurotrauma* 1996; 13: 85-92.
10. 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* 1987; 68: 384-91.
11. Reiter RJ: Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-33.
12. Tan DZ, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ: Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1993; 1: 57-60.
13. Cho S, Joh TH, Baik HH, Dibinis C, Volpe BT: Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res* 1997; 755: 335-8.
14. Guerreto JM, Reiter RJ, Ortiz GG, Pablos MI, Sewerynek E, Chuang JI: 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* 1997; 23: 24-31.
15. Spragg BP, Hutchings AD: High-performance liquid chromatographic determination of putrescine, spermidine, and spermine after deprivation with 4-fluoro-3-nitrobenzotrifluoride. *J Chromatogr* 1983; 258: 289-92.
16. Lee SR, Cheun JK: Propofol administration reduces hippocampal neuronal damage induced by kainic acid in rats. *Neurol Res* 1999; 21: 225-8.
17. Izumiyama K, Kogure K: Prevention of delayed neuronal death in gerbil hippocampus by ion channel blockers. *Stroke* 1988; 19: 1003-7.
18. Brand K: Role of ornithine decarboxylase on glycolytic enzyme induction during thymocyte proliferation. *J Biol Chem* 1987; 262: 15232-5.
19. Pajunen AEI, Hietala OA, Virransalo E-L, Piha RS: Ornithine decarboxylase in mouse brain effect of electrical stimulation. *J Neurochem* 1978; 30: 281-3.
20. 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* 1990; 55: 780-7.
21. Martinez E, de Vera N, Artigas F: Differential response of rat brain polyamines to convulsant agents. *Life Sci* 1991; 48: 77-84.
22. Paschen W, Hallmayer J, Mies G: Regional profile of polyamines in reversible cerebral ischemia of Mongolian gerbils. *Neurochem Pathol* 1987; 7: 143-56.
23. 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* 1989; 52: 101-9.
24. 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* 1990; 247: 571-4.
25. Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A: Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60: 2255-71.
26. 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* 1998; 12: 725-31.
27. Carter C, Poignet 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* 1995; 9: 129-40.
28. 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* 1998; 5: 321-9.