

연구의 동기와 방향

Cisplatin은 그 사용범위가 광범위하여 고환암, 식도암, 난소암, 방광암, 뇌종양, 위암, 폐암, 자궁경부암, 전립선암, 골육종등의 암에 널리 쓰이며, 특히 생식기 계통의 암에 가장 많이 쓰이는 항암제이나, 그 독성, 즉, 신독성, 이독성, 골수독성, 위장관 장애, allergy등의 독성, 그 중에서도 신장독성이 매우 강하여 사용환자의 사망원인이 되기도 하는 등 임상적인 사용에 큰 제한을 받고 있다. 따라서, cisplatin의 가장 큰 독성인 신독성을 감소시키는 방법을 찾아내는 것은 효과적이면서 안전한 항암요법의 개발이라는 점에서 매우 중요하다고 할 수 있다.

현재 이 신독성을 감소시키기 위해 많은 시도가 크게 세가지 방향에서 이루어지고 있다. 첫째, 신장독성이 적은 유도체를 합성하는 것이며, 그 예로서는 carboplatin(CBDCA)가 있는데, carboplatin은 cisplatin보다 더 안정하며 신독성이 적지만 골수독성이 매우 강하여 부작용도 크다. 두번째로 배설을 촉진시켜 독성을 감소시키는 방법이 있다. 이 중에는 mannitol과 intravenous hydration으로 cisplatin의 신장내 농도를 낮추는 방법이 있는데, mannitol은 배설자체의 촉진작용보다는 non-protein bound 즉, free Pt의 양을 증가시킴으로써 신장내 농도를 감소시켜 주는 것이다. 또, hypertonic saline의 병용투여로 cisplatin의 활성형인 수화형태로 되는 것을 막아 작용을 저하시키는 방법과 cisplatin투여와 동시에 osmotic diuresis를 유도하여 독성을 떨어뜨리는 방법등도 있다. 그러나, 이들 방법은 cisplatin의 반감기를 짧게 하여 항암효과를 저하시키는 결과를 가져온다. 세번째로는 cisplatin의 독성을 감소시키는 물질의 개발을 들 수 있는데, 여기에 관해 그동안 이루어져온 연구에 관해 세가지로 나누어 고찰하면 먼저 Se를 투여하여 생체내 항산화인자인 GSH의 합성을 촉진시켜 체내 방어기전을 상승시키는 것이 있고, 다음으로 bismuth subnitrate등의 중금속을 투여하여 체내에서 metallothionein의 합성을 유도하여 cisplatin과의 결합에 의한 독성감소를 일어나게 하는 것이 있으나, 이 방법은 중금속의 자체독성도 고려하여야 하고 역시 cisplatin의 효과를 감소시킨다는 결과를 가져올 수도 있다. 마지막으로 two-route chemotherapy(TRC)로서 cisplatin과 그 해독물질을 병용투여하는 방법들이 있다. 여기에는 sod. thiosulfate(STS),

diethyldithiocarbamate(DDTC), α -tocopherol, N,N'-diphenyl- p-phenylenediamine, o-(β -hydroxyethyl)-rutoside, medroxyprogesterone acetate, aminooxyacetic acid등의 물질이 연구되었다.

그러나, 이들은 그 물질 자체의 독성이나, 항암작용의 저하등 나름대로 문제점을 안고 있다. 따라서, Cisplatin의 주독성인 신장독성을 억제시키며 약리작용인 항암효과에는 영향을 주지않는 약물을 개발하는 것은 매우 의미있다 하겠다.

신장독성 발현기전

Cisplatin의 신장독성 발현이 암세포에 대한 세포독성에서와 같이 DNA cross linking 과 분해에 의한 것이라면 매우 높은 농도의 Cisplatin이 신장에 축적되어야 하나 실제로는 매우 낮은 농도에서도 발현한다는 점에 착안하여 각종 세포 자극에 따른 독성 증폭을 검토하였다.

그 결과 Neutrophil과 Cisplatin을 같이 incubation함에 의해 일차 토끼의 근위세뇨관 세포에대한 독성이 cisplatin 단독 일 때에 비해 수십배 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

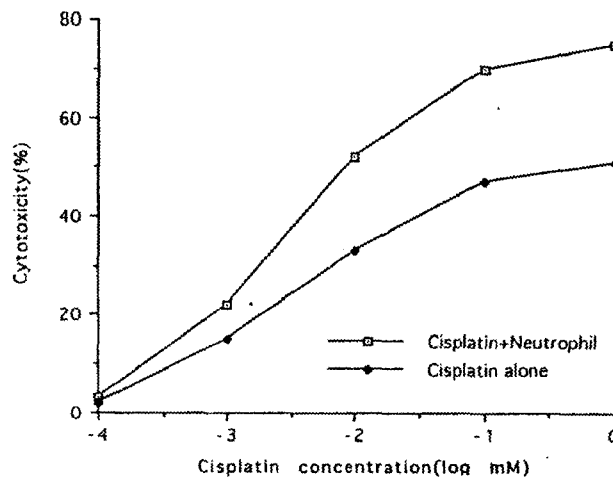


Fig 1. Effect of neutrophil on cisplatin cytotoxicity to cultured rabbit kidney proximal tubular cells.

또한, cisplatin의 neutrophil 자극에 의해 외부로 분비된 세포독성 물질에 대해서는 oxygen radical scavenger에 의해 신장세포에 대한 세포독성이 저하되며 활성산소의 specific scavenger효소인 SOD, catalase에 의해 완전히 억제됨으로서 활성산소가 독성

의 주체임을 알 수 있었다. 실제 superoxide anion 과 반응하여 formazan을 형성하는 NBT의 환원정도가 cisplatin 자극 농도, 시간 의존적으로 증가하였다.

신장세포에 있어서도 세포독성이 나타남과 동시에 과산화지질 생성량을 나타내는 MDA의 증가 및 세포막 구성 인지질중 과산화에 의해 분해되기 쉬운 phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE)의 현저한 감소가 나타났으며 radical scavenger를 가함으로써 MDA생성량 감소 및 PC, PE의 양적 변화가 나타나지 않는 결과를 보여주었다.

Table I. Changes of phospholipid composition by cisplatin and neutrophil cotreatment.

Addition	SM	PC	PS+PI	PE
Control	29	27	25	22
Cisplatin alone	28	24	26	22
Cisplatin+Neutrophils	27	11	25	9
Cisplatin+Neutrophils	28	25	27	21
+ BIIT				
Cisplatin+Neutrophils	29	20	24	21
+ Vit C				

이들 결과를 종합해보면, 신장으로 배설되는 cisplatin이 주위 혈관으로 부터 neutrophil을 유도하여 자극하고 이 과정에서 분비된 활성 산소 라디칼들이 신장의 근위 세뇨관에 독성을 나타냄을 알 수 있었다.

신장독성 발현 억제물질 검색

In vivo에서 cisplatin이 신장독성을 나타내는 용량을 찾기 위해 cisplatin을 용량을 달리하여 투여해 보았다. 그 결과 cisplatin 용량이 3mg/kg에서 부터 신장독성이 유발되기 시작하여 10mg/kg에서는 상당한 신장독성을 나타내었지만 8mg/kg이상에서는 다수의 rat이 사망하기 시작하였다. 따라서 rat이 사망하지 않으면서 뚜렷한 신장독성을 나타낸 5mg/kg을 신장독성 유발용량으로 잡고 다음 실험에 착수하였다. 또한 Body weight의 변화도 cisplatin의 투여용량을 늘릴수록 현저한 감소를 나타냈다.

Cisplatin 에 의한 신장독성 억제제로서는 항산화제가 매우 유력하며 그런의미에서 다량복용에 의한 부작용이 거의 없으며 면역증강 효과도 기대 할 수 있는 Vit C 에 대해 억제효과를 검토해 보았다.

Vitamin C의 투여용량을 달리하여 투여하여 본 결과 Vitamin C의 용량을 증가시킬수록 신장독성 억제효과가 증가하였으며, cisplatin과 Vitamin C의 molar ratio 1:10에서 가장 크게 cisplatin의 신장독성을 억제하였다. Vitamin C를 cisplatin과 Vitamin C의 molar ratio 1:10에서 cisplatin의 투여시기를 달리하여 투여해본 결과 동시투여나 후투여한 군보다 한시간 전 투여한 에서 간독성은 유발시키지 않고 cisplatin의 신장독성만을 크게 감소시켰다. 또 다른 신장독성 지표인 creatinine치도 BUN치와 비슷한 경향을 나타내었다.

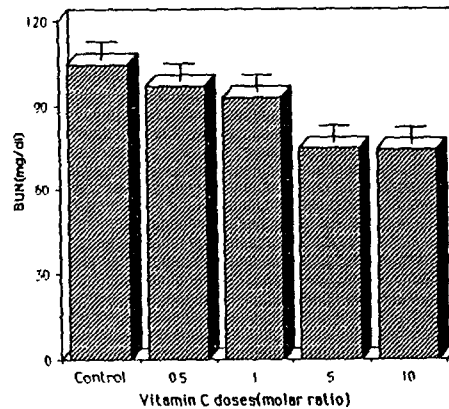


Fig. 2. Effects of Vitamin C doses on BUN levels at 4 days after cisplatin injection. Vitamin C was administered simultaneously with cisplatin (5 mg/kg). Control animals were given injection of cisplatin alone. Data are given as means \pm S.E.

이와 같이 많은 양의 Vitamin C가 필요한 것은 Vitamin C가 체내 여러조직에서 필요로 하는 물질이기에 다른 radical scavenger에 비해 고용량의 Vitamin C가 요구되었다고 생각할 수 있겠다. 또한 한시간 전투여한 군에서 있어서 효과가 좋았던 것은 Vitamin C가 미리 target site에 분포된 뒤 cisplatin이 생성시키는 free radical을 제거함으로써 신장독성 억제효과를 가져온 것이라 생각된다. 하지만 동시투여나 후투여 한 군에서는 이미 cisplatin이 free radical을 생성한 뒤에 target site에 분포되므로 전투여한 군보다는 못한 효과를 가져온 것이라 생각된다.

Brazilin은 cisplatin과 brazilin의 molar ratio 1:0.5에서 가장 크게 cisplatin의 신장독성을 억제하였으며 이보다 고용량이나 저용량에서는 낮은 독성억제효과를 나타내었다. 또한 투여시기를 달리하여 독성억제 효과를 보았을 때는 전투여나 후투여한 군보다는 cisplatin과 동시투여했을때 가장 우수한 신장독성 억제효과를 나타내었다. Creatinine치도 BUN치와 비슷한 경향을 나타내었고 간독성도 유발시키지 않았다. 이는 brazilin이 BHA와 비슷한 pattern으로 적용하여 microsomal enzyme을 유도했기 때문에 독성감소 효과를 보이지 않은 것으로 보인다. 또한 동시투여한 군에서 효과가 좋았던 것은 brazilin의 대사가 빨라서 빨리 배설되므로 brazilin이 target site에 분포되어

radical scavenge 기능을 나타내는 시간과 cisplatin이 free radical을 내놓는 시간과 일치해서 전투여나 후투여한 군보다는 동시투여한 군에서 우수한 효과를 나타낸 것으로 사려된다.

이러한 radical scavenger들이 cisplatin의 신장독성을 감소시켰다는 것은 cisplatin의 신장독성 원인 물질이 free radical임을 시사한다 하겠다.

또한 cisplatin 신장독성의 원인 물질인 free radical을 radical scavenger들이 직접 제거한 것인지, 세포내 독성제거 단백질인 metallothionein을 유도해서 metallothionein에 의한 것인지를 알아보기 위해 신장에서 metallothionein를 측정해 본 결과 metallothionein의 유도는 일어나지 않았다. 이는 free radical을 radical scavenger들이 직접 제거하여 cisplatin의 신장독성을 감소시킨 것이라 할 수 있겠다.

Radical scavenger를 cisplatin과 동시투여하는 것은 cisplatin의 암세포에 대한 세포독성 역시 억제될 수 있다는 추측을 가능하게 하므로 radical scavenger 투여에 따른 항암효과의 변화를 검토하였다.

Radical scavenger들을 cisplatin과 병용투여했을 때 brazilin을 제외한 BHA와 Vitamin C에 있어서는 항암효과의 감소는 가져오지 않고 오히려 평균생존일수를 두배 이상 늘린다는 결과를 보여 BHA와 Vitamin C는 cisplatin의 항암효과는 감소시키지 않고 신장독성만을 감소시켰다는 것을 알 수 있었다. Brazilin에 있어서는 cisplatin 단독투여했을 때와 비슷한 평균생존일수를 보였으며 특히 암세포만을 투여한 대조군보다 빠른 시간내에 사망함으로써 암세포 증식속도에 영향을 주기 보다는 신장독성 억제효과가 거의 나타나지 않거나 cisplatin과의 복합독성에 의한 사망이 나타난 것으로 판단된다. BHA, Vitamin C, brazilin과 암세포만을 투여한 군은 암세포만을 투여한 군과 별차이를 보이지 않았다.

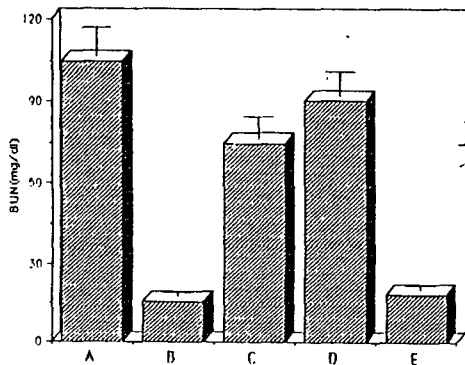


Fig. 3. Effects of Vitamin C treatment time on BUN levels at 4 days after cisplatin administration to rats. Rats received an intraperitoneal injection of cisplatin (5 mg/kg). Control animals were given saline. Data are given as means \pm S.E. (n=6). A: Cisplatin alone, B: Pretreatment, C: Simultaneous treatment, D: Posttreatment, E: Control.

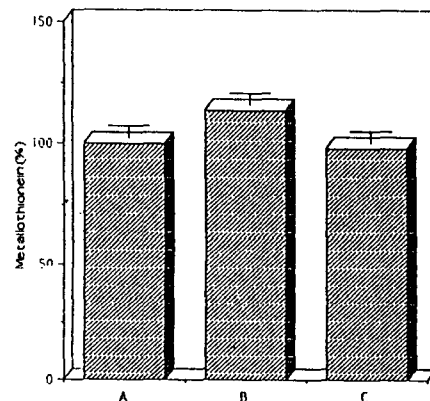


Fig. 4. Effects of Vitamin C on induction of metallothionein in cisplatin treated rats. Rats received intraperitoneal injection of cisplatin (5 mg/kg) and Vitamin C. Control animals were given saline. Data are given as means \pm S.E. (n=6). A: Control, B: Cisplatin alone, C: Cisplatin+Vitamin C.

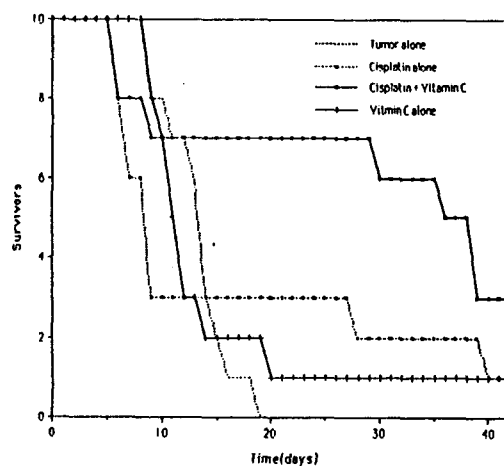


Fig. 5. Effects of Vitamin C on antitumor activity of cisplatin in ICR mice inoculated with sarcoma 180 tumor cells (n=10). Rats received intraperitoneal injection of cisplatin and Vitamin C. Control animals were given injection of saline.

Table II. Effects of Vitamin C treatment time on levels of creatinine, sGPT, sGOT in cisplatin treated rats^a

	Creatinine (mg/dl)	sGPT (Karmen unit)	sGOT (Karmen unit)
Control	0.09 ± 0.04	19.5 ± 1.1	30.5 ± 5.3
Cisplatin alone	2.12 ± 0.30	14.1 ± 0.3	33.3 ± 4.8
Cisplatin + Vitamin C			
Pretreatment	0.20 ± 0.01	7.9 ± 0.4	54.3 ± 2.4
Simultaneous treatment	0.57 ± 0.00	12.2 ± 2.2	4.0 ± 0.0
Posttreatment	1.03 ± 0.11	10.2 ± 0.7	45.3 ± 2.6

^aRats received intraperitoneal injection of cisplatin (5 mg/kg). Control animals were given saline. Data are given as means ± S.E. (n=6).

Table III. Effects of Vitamin C on antitumor activity of cisplatin in ICR mice inoculated with sarcoma 180 tumor cells (n=10)^a

	Survival ^b (%)	Incidence ^b Tumors (%)	MST (days)	T/C (%)
Tumor alone	80	75	13.4 ± 1	100
Cisplatin alone	30	0	>16.3 ± 4	>122
Cisplatin + Vitamin C	70	0	>29.1 ± 5	>217
Vitamin C alone	80	75	15.0 ± 3	112

^aRats received intraperitoneal injection of cisplatin (5 mg/kg). Data are given as means ± S.E. (n=10).

^bSurvival and incidence tumors were measured at day 9.