

총수담관 결찰에 의한 간의 담즙분비정체가 흰쥐의 간기능에 미치는 영향에 대한 약물속도론적 분석

이용복* · 나은영¹ · 주은희 · 정숙진 · 고익배

전남대학교 약학대학, ¹(주)일화 의약품연구과
(1995년 7월 3일 접수)

Pharmacokinetic Analysis of the Effect of Extrahepatic Cholestasis by Common Bile Duct Ligation on Hepatic Function in Rats

Yong-Bok Lee^{*}, Eun-Yeong Na¹, Eun-Hee Joo, Sug-Jin Jeong and Ik-Bae Koh

College of Pharmacy, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
¹R & D Division, Ilhwa Co., Ltd., Guri, Kyunggi-Do, 471-030, Korea

(Received July 3, 1995)

In order to examine the effect of extrahepatic cholestasis induced by common bile duct ligation on the hepatic function, the pharmacokinetics of antipyrine and *d*-propranolol were investigated in rats. In addition, in an attempt to observe the degree of direct hepatic injury, light and electron microscopic observations and conventional pathologic test using serum were performed. Five days after common bile duct ligation, antipyrine(15 mg/kg) and *d*-propranolol(3 mg/kg) were intravenously administrated to the rats, respectively. The total clearances of antipyrine and *d*-propranolol were significantly($p<0.05$) decreased. Because hepatic clearance of antipyrine poorly extracted by the liver and that of *d*-propranolol highly extracted by the liver are respectively dependent on the hepatic intrinsic clearance and the hepatic blood flow, it may be concluded that extrahepatic cholestasis following five days after common bile duct ligation decreased the hepatic intrinsic clearance and the hepatic blood flow. SGPT, SGOT, cholesterol, bilirubin(total bilirubin, direct bilirubin) and alkaline phosphatase were significantly increased($p<0.05$). The proliferation of bile ducts was prominent, and degeneration and necrosis of hepatocytes were observed by light microscope. Also, ultrastructurally, bile canaliculi were containing the amorphous materials and losing microvilli, and SER and RER in hepatocytes were dilated and vacuolated.

Keywords— Extrahepatic cholestasis, Common bile duct ligation, Pharmacokinetics, Antipyrine, *d*-Propranolol

간은 생체에서 담관계를 통하여 담즙을 십이지장으로 배설하는 외분비선 기능과 여러 물질을 합성하여 혈액으로 유리시키는 내분비선 기능을 모두 가지고 있는 기관으로서 산화, 환원, 가수분해, 포합반응 등의 약물대사에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 급성 바이러스성 간염,^{1,2)} 간경변,^{3,4)} 할로탄 간염⁵⁾ 등 간에 질병이 생기면 간에서의 약물 대사과정이 영향을 받게 되어 많은 약물의 체내동태가 변화하게 된다. 특히 이러한 일련의 간질환 발생시 공통된 특징으로서 담즙분비의 정체가 나타나므로 담즙분비의 정체로 인한 간기능의 변화를 고찰하는 것은 간질환시의 공통 특성을

밝힌다는 측면에서 매우 중요하다. 따라서, 흰쥐의 총수담관을 결찰하여 유도시킨 병상모델을 이용하여 간의 담즙분비정체가 간기능에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

총수담관 결찰에 의한 간의 담즙분비정체는 담즙분비의 억제로 인하여 모세담관의 확장과 더불어 간세포나 담즙이 분비되는 경로에 담즙의 축적을 보이고 축적된 담즙이 간세포의 손상을 일으킨다고 보고⁶⁻¹⁰⁾되어 있는 질병상태로서 간에 축적된 담즙은 미크로솜의 구조적 파괴를 가져와 미크로솜 약물 효소계 특히 cytochrome P-450의 활성도를 저해한다고 한다.¹¹⁻¹⁴⁾

*본 논문에 대한 문의는 이 저자에게로

그리고, 이러한 간효소계 활성도의 변화에 중점을 두고 간의 담즙분비정체시 간대사능 의존형인 안티피린, 오르니다졸 등과 같은 약물의 간클리어런스 변화에 관한 연구가 수행된 바 있다.^{1,2)} 그렇지만 담즙울체시 간내압의 증가로 인해 간혈류량의 변화 가능성이 시사되고 있다. 더구나, 간에서의 약물의 클리어런스는 ① 간혈류량과 ② 간을 통과하는 혈액으로부터 약물을 제거하는 간고유대사능에 의존적이므로 총수담관 결찰에 의한 간의 담즙분비정체가 전체적인 간기능에 미치는 영향을 밝히기 위해서는 간효소계 활성도 즉, 간고유대사능뿐만 아니라 간혈류량의 변화도 함께 구명해야 할 필요가 있다.

안티피린은 사람의 혈장 단백 결합률이 10% 이하이고, 체내 여러 조직에 신속하게 분포한다.¹⁵⁾ 또한 간 미크로솜 분획의 약물 산화효소계에 의하여 거의 대사되고, 대사받지 않고 요로 배설되는 양이 5% 이하이며 간추출률이 작다고 알려져 있으므로¹⁶⁾ 그 전신클리어런스는 바로 간클리어런스를 반영하기 때문에 요즘에는 해열 진통제로써보다는 간미크로솜 효소계의 활성도를 측정하는 모델 화합물^{17,18)}로써 사용되는 약물이다.

프로프라놀롤은 협심증, 고혈압, 부정맥에 쓰이는 베타-아드레날린 효능차단제로서 거의 간에서만 대사되고, 미변화체로서 요로 배설되는 양이 1% 이하이며,¹⁹⁾ 간에서의 추출률이 커 전신클리어런스는 바로 간혈류량을 반영한다고 보고되어 있다. 또한 프로프라놀롤은 라세미 혼합물로서 베타-아드레날린 효능 차단제로서의 약리학적 효과는 *l*-형에 의한 것이며²⁰⁾ 이로 인해 간혈류량의 감소를 일으키므로 *dl*-형으로 투여시 자신의 클리어런스를 감소시키지만, *d*-형은 이러한 작용이 없다고 알려져 있다.^{20,21)} 따라서, 총수담관 결찰에 의한 간의 담즙분비정체시 간혈류량의 변화를 관찰하기 위해서 약물 자체의 약리학적 특성에 의한 영향이 없도록 *d*-프로프라놀롤을 사용하였다. 한편, 프로프라놀롤은 약염기성 약물(pKa 9.45)로서 혈중에서 주로 α_1 -acid glycoprotein에 결합하는데, α_1 -acid glycoprotein은 감염, 염증, 암, 외상 등에 의해 증가한다고 알려져 있고,²²⁻²³⁾ 절식시킨 생쥐에서 약물 대사능 특히 microsome subunits에서의 변화가 발생하였다고 보고된 바 있다.²⁴⁾ 따라서 총수담관 결찰에 의한 간의 담즙분비정체가 간기능에 미치는 영향을 약물속도론적으로 구명하기 위해서는 총수담관 결찰시 수술에 의한 α_1 -acid glycoprotein의 증가나 흰쥐의 식욕감퇴가 가져오는 영향도 함께 고려해야 하므로 총수담관 결찰군

에 대해 수술을 동일하게 시행하되 총수담관을 결찰하지 않은 군(sham operation군)과 아무런 처치도 하지 않은 대조군을 설정한 후 안티피린과 *d*-프로프라놀롤을 각각 15 mg/kg, 3 mg/kg 정맥투여하여 약물속도론적 파라메타를 구하고 서로 비교하였으며, 더불어 혈액 임상화학치의 변화, 광학 및 전자 현미경적 관찰을 통하여 간세포, 모세담관, 조면 소포체 및 활면 소포체 등의 변화를 살펴보았다.

실험방법

시약 및 기기

안티피린, *d*-프로프라놀롤 염산염, 메토클로프라미드 염산염(이상 Sigma사, 미국), 페나세틴(합동제약), 메탄올과 아세트니트릴(이상 FSH Laboratory Supplies, HPLC grade, 영국) 등을 사용하였으며 기타 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다. 분석기기로서 형광분광광도계(Perkin Elmer, LS-5, 미국), 자외선/가시부 분광광도계(Perkin-Elmer, Lambda 5, 미국), HPLC(Pye-Unicam, PU 4850, 영국), 미량원심분리기(Kokusan사, H-31, 일본), 임상화학분석기(Gilford사, SBA 300, 미국), 전자현미경(Carl Zeiss 109, 스위스) 등을 사용하였다.

실험동물

서울대학교 동물사육장에서 분양받은 체중 100~150g의 Sprague Dawley 웅성 흰쥐를 각 실험군(대조군, sham operation군, 총수담관 결찰군)으로 분류하고 물과 사료(제일사료사)를 자유로이 공급하여 2주 이상 동일조건(20~25°C, 상대습도 50~60%)에서 사육한 후 체중 200~250 g 범위의 것을 사용하였다.

실험동물 전처리

흰쥐를 에텔로 마취하고 상복부의 털을 제거한 후 복부의 정중선을 3 cm 정도 절개하여 총수담관만을 가볍게 분리해 낸 다음 가능한 한 간의 가까운 부위에 약 5 mm 간격을 두고 1호 견사로 이중 결찰하였다. 결찰사 사이의 총수담관을 자른 후 1호 견사로 수술부위를 촘촘히 봉합해 주었다. 모든 조작은 가능한 한 무균적으로 시행하였고, 수술 후 항생제는 사용하지 않았으며 10% 포비돈 요오드액으로 수술부위를 소독해 주었다. 총수담관 결찰군에 대해 아무런 처치도 하지 않은 대조군과 똑같은 수술을 시행하되 총수담관만을 결찰하지 않은 sham operation군 등 3군으로 분류하여 처치한 후 사료와 물을 자유로이 먹을 수 있게 하였으며

총수담관 결찰에 의한 간의 염증성 병변은 3~5일 후에 최고로 발현되고 15일 이상 결찰시 간경변으로 발전한다는 보고²⁾를 바탕으로 염증성 병변의 영향을 살펴 보고자 5일 후 실험하였다. 전처리한 실험동물 중 실험이 끝난 후에 복부를 열어 보아 복막염이나 복수가 발생한 것은 실험군에서 제외하였다.

체중 및 간 무게 측정

모든 실험동물은 처치 전후에 체중을 측정하였고, 실험이 끝난 후에 즉시 도살하여 간의 무게(습중량)를 측정하였다. 체중은 처치 직전의 무게에 대한 5일 후의 실험 직전의 무게의 비율로써 총수담관 결찰군, sham operation군과 무처리 대조군끼리 비교 검토하였으며 간의 무게는 채혈이 끝난 후 왼쪽 대퇴동맥으로부터 전혈을 빼서 죽인 뒤 즉시 복부를 절개하고 간 문맥을 통해 4°C 생리식염수를 주사하여 혈액을 씻어낸 다음 물기를 여과지로 제거한 후의 무게를 측정하여 이를 체중 100 g당의 무게로써 비교 검토하였다.

혈액 임상화학적 검사

총수담관 결찰군, sham operation군과 무처리 대조군 모두에서 약물 투여 직전에 채혈한 혈청 중의 SGOT, SGPT, 총단백량, alkaline phosphatase, 콜레스테롤, 빌리루빈(총빌리루빈, 직접형 빌리루빈)치를 동일회사(Gilford사, U.S.A)의 kit를 사용하여 임상화학분석기로 측정하였다.

헤마토크릿(hematocrit)의 측정

모든 실험군에서 약물투여 직전에 전혈을 채취한 즉시 헤파린이 기벽에 묻어있는 모세관(Superior[®], W-Germany, 전장 75 mm, 내경 1.1~1.2 mm)에 약 7 cm 높이로 채우고, 모세관의 한쪽 끝을 실리콘 왁스로 막은 다음 12,000 rpm(10,000 g)에서 2분간 원심분리한 뒤, 전체 혈액 길이에 대한 적혈구 부위의 길이 비율로 환산하여 표시하였다(Wintrobe법).²⁵⁾

간조직 관찰

육안적 관찰—모든 실험동물 각군에 대해 에텔로 흡입 마취하고 개복을 통해 전자 현미경적 관찰을 위한 시료를 채취하였고, 그 후 안락사시켰다. 부검을 통해 간의 색조, 경도, 단면상 등을 면밀히 조사하였으며 다른 장기 등도 빌리루빈 착색 등의 이상 유무를 조사하였다.

광학 현미경적 관찰—전자 현미경적 관찰을 위해 채취된 일부의 조직을 제외한 나머지 모든 간조직을 10% 중성 인산 완충 포르말린에 고정하였다. 고정된 간조직은 여러 부위에서 알맞은 크기로 잘라내어 조직

편을 만든 후 에탄올과 키슬렌 탈수를 거쳐 과라핀으로 포매하였다. 포매 조직은 3~4 μm 두께로 박절편을 제작하여 헤마톡실린-에오신 염색을 함과 아울러 5 μm 두께로 박절편을 제작, 빌리루빈과 hematoidin을 위한 Fouchet's staining reaction²⁶⁾을 실시하였다.

전자 현미경적 관찰—마취한 흰쥐의 개복과 더불어 동시에 즉시 채취한 간조직을 1 mm³ 크기로 세절하여 3% glutaraldehyde(0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4)에 전고정한 다음, 다시 1% osmium tetroxide(0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4)에 후고정하였다. 고정된 조직은 각 농도의 에탄올과 propylene oxide로 탈수시켜 epoxy resin(Araldite CT 212)에 포매한 다음 ultramicrotome(LKB-V)을 사용하여 1 μm 두께로 박절하였다. 박절편은 toluidine blue 염색 또는 염기성 fuchsin과 methylene blue 염색을 한 후 광학 현미경으로 관찰 부위를 결정한 다음 40~60 nm 두께로 초박절하였다. 초박절편은 copper grid에 부착시켜 uranyl acetate와 lead citrate의 이중 염색을 실행, Carl Zeiss 109 투과 전자 현미경으로 50 KV 가속 전압하에 관찰하였다.

약물투여 및 혈액채취

각군의 실험동물을 에텔로 가법게 마취시키고 왼쪽 대퇴부 동맥 및 정맥에 폴리에틸렌관(PE-50, Intramedic[®], Clay Adams사)을 삽관하였다. 마취에서 깨어나도록 충분히 방치한 다음, 대퇴부 정맥을 통해 안티피린 15 mg/kg(7.5 mg/ml 생리식염수 용액 사용), d-프로프라놀롤 3 mg/kg(1.5 mg/ml 생리식염수 용액 사용)을 실험동물 각군에 각각 투여하였다. 투여 후 왼쪽 대퇴동맥에 삽입된 카테타로부터 혈액을 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240분(안티피린 투여시는 300분까지)에 채취하여 안티피린 투여시는 원심분리한 후 혈장 100 μl씩을 취하였으며, d-프로프라놀롤 투여시는 혈액 100 μl를 취하였다. 채취한 혈장과 혈액은 정량할 때까지 -20°C에 보관하였다.

정량 방법

안티피린의 정량—Shagel 등의 방법²⁷⁾을 약간 수정하여 사용하였다. 각 시간별로 채취한 혈장 100 μl를 1.5 ml 원심분리관에 옮기고 내부 표준물질인 페나세틴(20 μl/ml)이 들어있는 메탄올 용액 10 μl를 넣은 다음 혼합하였다. 여기에 60%(V/V) 메탄올-물에 녹인 20%(W/V) 황산이온 7수화물 75 μl와 수산화바륨 8수화물 포화 수용액 75 μl를 가하여 15초간 혼합하였다. 이를 5000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층 중

Table I—HPLC Conditions for Determination of Antipyrine in Plasma

Parameters	Conditions
Mobile phase	Methanol:Water(60:40)
Column	μ -Bondapak C ₁₈ column (10 μ m, 3.9 mm \times 300 mm)
Flow rate	1 ml/min
Detector	UV(242 nm)
Temperature	Ambient
Injection volume	10 μ l

Table II—HPLC Conditions for Determination of *d*-Propranolol in Blood

Parameters	Conditions
Mobile phase	Acetonitrile:Water:Acetic acid:Triethylamine(400:700:10:0.15), pH:3.5
Column	μ -Bondapak phenyl cartridge(Radial-PAK [®] cartridge, 10 μ m, 8 mm \times 100 mm)
Detector	Fluorometric detector *excitation wavelength:290 nm *emission wavelength:340 nm
Flow rate	2 ml/min
Temperature	Ambient
Injection volume	50 μ l

10 μ l만을 취하여 HPLC에 주입하였다. 안티피린의 HPLC 분석조건은 Table I과 같다.

***d*-프로프라놀롤의 정량**—Lefebvre 등의 방법²⁸⁾을 개량하여 사용하였다. 각 시간별로 채취한 혈액 100 μ l를 시험관(10 ml teflon-lined screw capped glass tube)에 옮기고 1 ml의 물을 가한 후 내부 표준 물질로서 메토클로프라미드 염산염 용액(20 g/ml 메탄올) 10 μ l와 1N 수산화나트륨 0.1 ml를 가한 다음 잠시 방치하였다가 적혈구의 완전한 파괴를 위하여 초음파 분쇄기(Model US 50, Nihonseiki Kaisha LTD., 일본)로 약 10초 동안 분쇄한 후, 에칠아세테이트 3 ml를 가하였다. 이를 2분 동안 강하게 혼합하고 3500 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 상층의 유기층 2.5 ml를 취하여 시험관에 옮긴 다음, 여기에 0.1N 황산 100 μ l를 가하여 2분동안 강하게 혼합하고 3500 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 상층에 있는 유기층을 조심스럽게 제거한 다음 50 μ l의 수층을 취하여 HPLC에 주입하였다. *d*-프로프라놀롤의 HPLC 분석 조건은 Table II와 같다.

검량선의 작성—안티피린에 대해서는 혈장 중의 약물 농도가 1.5, 4.5, 12, 25, 50, 100 μ g/ml가 되도록

약물을 주입하여 안티피린의 정량법에 따라, *d*-프로프라놀롤에 대해서는 혈액중의 농도가 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 4000 ng/ml가 되도록 약물을 주입하여 *d*-프로프라놀롤의 정량법에 따라 약물을 추출하여 검량선을 작성하였다. 하루에 실험을 3번 시행하여 일내 재현성을 구하였으며 그로부터 4일간 계속 실험을 4번 시행하여 일간 재현성을 구하였다.

통계처리 및 약물속도론적 분석

각 약물의 혈장 및 혈액 중의 농도는 비선형 최소자승 회귀분석 프로그램인 RSTRIP²⁹⁾에 의해 striping하여 초기치를 구한 후 가중치 2(혈장중 약물농도 제곱의 역수)를 사용하여³⁰⁾ curve fitting하였다. Fitting의 적합도를 Akaike's information criterion (AIC)값³¹⁾에 따라 결정한 결과, 혈장 및 혈액중 농도 추이는 2개의 자연지수항 방정식($Ae^{-at} + Be^{-bt}$)에 가장 잘 fitting되었다. 시간 0 부터 ∞ 까지의 혈장 및 혈액중 약물농도-시간 곡선하 면적(AUC)은 trapezoidal 방법에 따라 계산한 값과 최종 채혈시점의 약물농도를 최종 소실상 기울기로 나누어 외삽하여 구한 값을 더하여 구하였다. 다른 약물속도론적 파라메타 즉 전신클리어런스(CLt), 체순환용파트먼트의 겉보기 분포용적(V_c), 정상상태에서의 겉보기 분포용적(V_{ss}), 말초용파트먼트의 겉보기 분포용적(V_p) 및 콤파트먼트간 이송 속도상수는 Gibaldi등³²⁾의 수식에 따라 구하였다. 모든 측정치와 계산치는 산술평균 \pm 표준오차(S.E.)로 나타내었으며 Student's t-test로 유의성을 검증하여 $p < 0.05$ 인 경우만을 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

체중 및 간 무게의 변화

처치 직전의 무게에 대한 총수담관 결찰 5일 후의 실험 직전의 무게의 비로써 비교한 체중의 변화는 무처리 대조군은 실험 직전의 체중에 비해 5일 동안 11% 증가했음에 비해 sham operation군은 6%의 감소를 보였고, 총수담관 결찰군은 11%의 감소를 보였다.

도살시 체중 100 g당의 무게비로써 비교한 간의 무게는 sham operation군과 무처리 대조군에 비하여 총수담관 결찰군에서는 유의성($p < 0.05$) 있는 증가를 보였다. 이와 같은 간 무게의 변화는 간의 담즙분비정체시 간세포와 담관내에 축적된 담즙과 담관의 증식으로 인해 증가하는 것으로 보이며 Reichen 등³³⁾과 Keeffe 등³⁴⁾의 보고와 유사한 결과를 보여주었다.

Table III—Physiological Changes^a

Parameters	No treatment	Sham operation	Bile duct ligation
No. of animals	8	6	7
Weight factor ^{a1}	1.11±0.01	0.94±0.03 [†]	0.89±0.02**
Liver weight ^{b1}	3.30±0.09	3.09±0.11	4.00±0.13**
Hematocrit ^{c1}	0.47±0.01	0.47±0.01	0.47±0.01
Total prot.(g/dl)	6.90±0.19	6.98±0.29	7.40±0.10
SGOT(IU/l)	110.41±7.24	154.52±33.09	590.30±113.42**
SGPT(IU/l)	63.21±4.53	76.50±14.82	213.00±51.18**
Alk.phosp.(IU/l)	168.22±17.32	186.80±45.70 [†]	283.01±20.31**
Cholest.(mg/dl)	74.22±6.37	60.3409±1.89	120.31±27.51**
Bilirubin(mg/dl)			
—Total	0.29±0.02	0.27±0.07	6.37±1.89**
—Direct	0.12±0.02	0.13±0.21	5.77±1.92**

^{a1}Weight after treatment/weight before treatment.

^{b1}Liver weight/100 g body weight.

^{c1}Determined by Wintrobé's method.

[†]Results are given the Mean±S.E.

**p<0.05, between no, sham and bile duct ligated groups.

[†]p<0.05, between no and sham operated groups.

(Table III)

혈액 임상화학적 변화

실험 각군의 혈액 임상화학적치의 변화는 Table III과 같았다. 5일 동안의 총수담관 결찰에 의해 SGOT, SGPT, 콜레스테롤, 빌리루빈(총빌리루빈, 직접형 빌리루빈)치는 sham operation군과 무처리 대조군에 비하여 유의성(p<0.05) 있는 증가를 보였으며, alkaline phosphatase치는 무처리 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.05) 증가를 보인 반면 총단백량은 유의성 있는 변화가 없었다. 한편, Wintrobe법²⁵⁾에 의해 측정된 헤마토크릿치는 각군 모두에서 유의성 있는 변화를 보이지 않았다.

약물의 정량

안티피린의 정량—페나세틴을 내부 표준물질로 하여 HPLC로 분석한 흰쥐 혈장 중의 안티피린의 크로마토그램을 Fig. 1에 나타내었다. 안티피린과 페나세틴은 각각 8.8분대, 6.1분대에서 피크가 나타났으며 흰쥐 혈장중 성분과의 간섭 현상은 일어나지 않았다. 피크 높이비 법에 따라 검량선을 구한 결과, 혈장중 농도 1.5 µg/ml에서 100 µg/ml 범위에서 상관계수(γ)가 0.9957로서 양호한 직선성을 나타내었으며, 일내 재현성은 변동계수가 11.29인 4.5 µg/ml를 제외하고는 비교적 좋은 결과를 보여주고 있다. 일간 재현성은 모두 변동계수가 8% 이내로서 좋은 결과를 나타내고 있으며, 상관계수(γ)가 0.9991로서 좋은 직선성을 보여주고 있다. 신호대 잡음비(S/N ratio)를 4로 하였을 때 정량

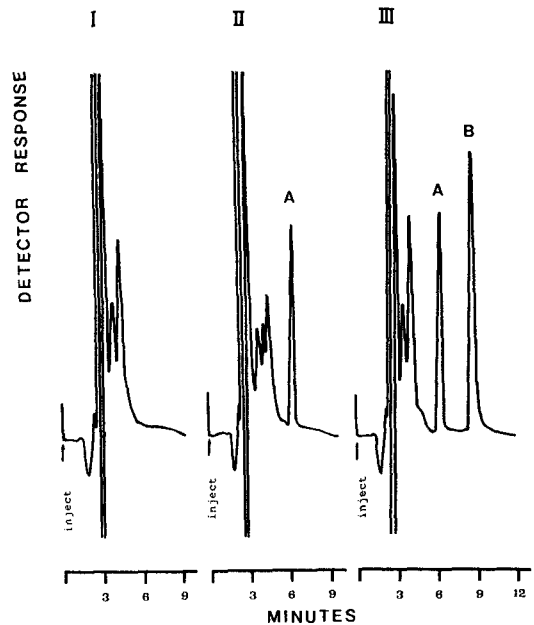


Figure 1—Representative chromatograms.

Key : (I); blank rat plasma, (II); rat plasma spiked with 0.2 µg of phenacetin(A, internal standard), (III); plasma sample 60 min after intravenous administration(15 mg/kg) of antipyrine(B).

한계는 0.3 µg/ml이었으며 수용액의 평균피크 높이에 대한 추출 시료의 피크 높이 비로부터 구한 추출 회수율(%)은 96.4±2.8이었다.(Table IV)

Table IV—Reproducibility of Antipyrine

Plasma antipyrine concentration (µg/ml)	Intra-day CV(%) ^{a)} (n=3)	Inter-day CV(%) ^{b,c)} (n=4)
1.5	4.71	7.69
4.5	11.29	5.99
12	5.76	6.77
25	4.76	3.01
50	9.20	3.40
100	8.11	2.50

^{a)}Linear regression equation, $Y=0.1394X+0.0827$, $\gamma=0.9957(p<0.01)$.

^{b)}Linear regression equation, $Y=0.1458X-0.0931$, $\gamma=0.9991(p<0.01)$.

^{c)}Analyzed over four days.

Table V—Reproducibility of *d*-Propranolol

Blood <i>d</i> -propranolol concentration (ng/ml)	Intra-day CV(%) ^{a)} (n=3)	Inter-day CV(%) ^{b,c)} (n=4)
50	4.30	8.89
100	5.14	5.20
200	4.46	5.70
500	2.45	2.15
1000	1.87	2.99
2000	4.98	2.23
4000	2.56	0.98

^{a)}Linear regression equation, $Y=0.0028X+0.1072$, $\gamma=0.9979(p<0.01)$.

^{b)}Linear regression equation, $Y=0.0029X+0.1367$, $\gamma=0.9979(p<0.01)$.

^{c)}Analyzed over four days.

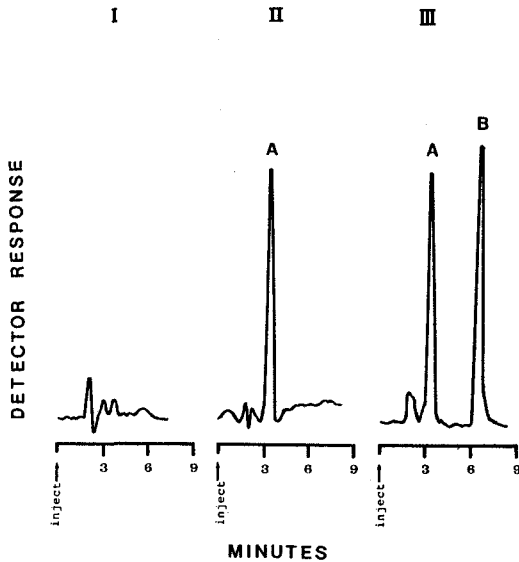


Figure 2—Representative chromatograms.

Key : (I); blank rat blood, (II); rat blood spiked with 0.2 µg of metoclopramide(A, internal standard), (III); blood sample 90 min after intravenous administration(3 mg/kg) of *d*-propranolol(B).

***d*-프로프라놀롤의 정량**—메토클로프라미드를 내부 표준물질로 하여 HPLC로 분석한 흰쥐 혈액 중 *d*-프로프라놀롤의 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 내부 표준물질인 메토클로프라미드는 3.6분대에서, *d*-프로프라놀롤은 6.6분대에서 피크가 나타났으며 흰쥐 혈액 중 성분과의 간섭 현상은 나타나지 않았다. 검량선을 피크 높이비 법으로 작성한 결과, 혈액 중 농도 50 ng/ml에서 4000 ng/ml 범위에서 상관계수(γ)가 0.9979이고 일내 재현성이 모두 6% 이내로서 양호한 직선성을 보여주고 있으며, 일간 재현성도 모두 9% 이내

이고 상관계수(γ)가 0.9976으로 좋은 직선성을 보여주고 있다. 신호대 잡음비를 4로 하였을 때 정량 한계는 20 ng/ml이었으며 수용액의 평균피크 높이에 대한 추출 시료의 피크 높이 비로부터 구한 추출 회수율(%)은 86.4 ± 3.2 이었다.(Table V)

이상의 결과로부터 상기 정량법들은 안티피린과 프로프라놀롤의 약물속도론적 파라메타를 구하는데 있어 양호한 재현성과 충분한 감도를 갖고 있는 정량법임을 알 수 있었다.

간의 병리 조직학적 관찰

육안적 소견—Sham operation군과 무처리 대조군의 간은 정상의 간 색조인 암갈색을 보인 반면, 총수담관 결찰군의 간은 담즙 색소의 착색으로 인하여 황색 내지 황갈색의 색조를 보였고 전자의 간에 비해 보다 단단한 경도를 보였다.

광학 현미경적 소견—Sham operation군은 무처리군과 마찬가지로 정상의 형태학적 구조 및 성상을 보였다.(Fig. 3-1) 그러나, 총수담관 결찰군에서는 현저한 담관 증식과 간세포 변성 피사 등 상당한 변화를 보였다. 가장 뚜렷한 소견은 담관의 증식으로, 그의 증식은 문맥역에서 가장 심하였고, 소엽 주위부를 따라 진행되는 양상을 보였으며, 간소엽내로 침습해 들어가는 소견을 보이기도 하였다.(Fig. 3-2) 증식 중인 담관의 세포들은 원형 또는 난원형의 크고 창백한 핵을 가진 큰 입방상 또는 원주상의 세포들로서 관상의 배열을 하고 있거나 혹은 불규칙한 위관상(pseudoductular formation)의 배열을 취하고 있었다.(Fig. 3-2) 정상 세포(Kupffer cell)의 증식도 또한 두드러졌으나(Fig. 3-2와 3-3), 호중구를 비롯한 염증 세포의 침윤은 매우

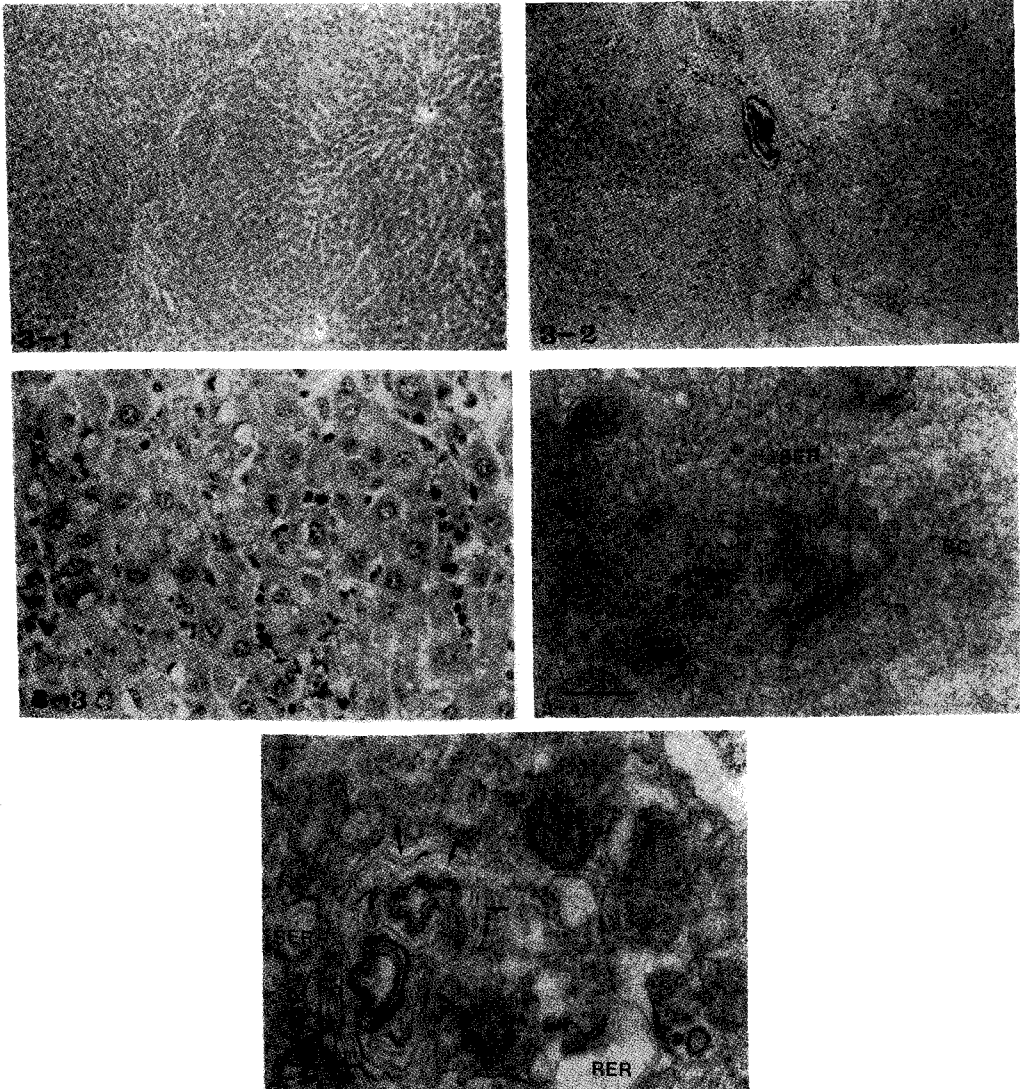


Figure 3— Microscopic observations of rat liver.

Key : **3-1:** Intact, normal rat liver, five days after sham operation(H & E. $\times 100$), **3-2:** Bile duct proliferation in portal and peribular areas, five days after ligation of common bile duct. Proliferation of Kupffer cell and extension of bile ducts into parenchyma are also noted(H & E. $\times 100$), **3-3:** Hyaline and fatty degeneration and necrosis of hepatocytes, five days after ligation of common bile duct. Kupffer cell proliferation and biliary canalicular dilation (arrows) are also noted(H & E. $\times 400$), **3-4:** An electron micrograph of dilated bile canaliculi(BC) showing amorphous materials and paucity of microvilli. Note dilation and vesiculation of smooth endoplasmic reticulum(GC: Golgi complex, SER: Smooth endoplasmic reticulum, RER: Rough endoplasmic reticulum, Mi: Mitochondria, P: Peroxisome)(uranyl acetate & lead citrate), **3-5:** An electron micrograph of the cholestatic hepatocyte showing the electron-dense, lamellar configurations(arrows). Vesiculation and vacuolation of endoplasmic reticulum and dissociation of ribosome are also seen(SER: Smooth endoplasmic reticulum, RER: Rough endoplasmic reticulum, Mi: Mitochondria)(uranyl acetate & lead citrate).

드물었다. 간세포는 유리질 변성(hyaline degeneration), 지방 변성 및 괴사의 소견과 아울러 세포 분열상을 보이는 재생을 수반하고 있어서 그 크기가 다소 부동하고 배열 또한 전체적으로 매우 불규칙

하였다.(Fig. 3-3) 핵은 또한 그 크기가 다소 부동하였고, 큰 핵을 갖고 있는 경우에는 염색질의 변연화 및 2~3개의 뚜렷한 핵인이 관찰되었으며 모세담관은 확장된 소견을 보였다.(Fig. 3-3)

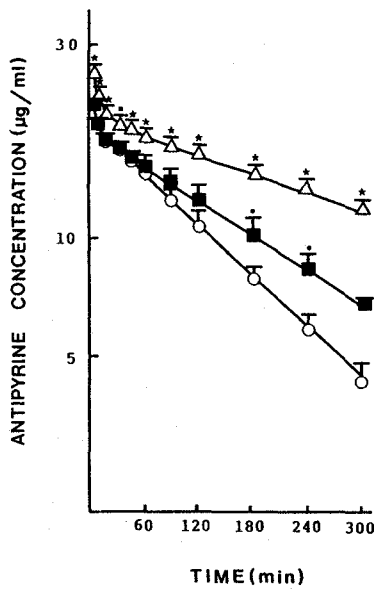


Figure 4—Mean plasma concentration-time profiles of antipyrine after intravenous administration (15 mg/kg) to rats ($n=6\sim 8$). Vertical bar represents the standard error of the mean.

Key : -○-; No treatment, -■-; Sham operation, -△-; Bile duct ligation, ★ $p<0.05$ between no, sham and bile duct ligated group, ■ $p<0.05$ between no and bile duct ligated group, ● $p<0.05$ between no and sham operation group.

전자 현미경적 소견—총수담관 결찰군에서는 모세담관이 확장되고(Fig. 3-4), 그의 미세용모가 수적으로 감소되었으며(Fig. 3-4) 잔존한 미세용모는 종창 및 둔화된 소견을 보였다. 모세담관의 관강에는 무정형의 물질이 충전되어 있는 경우가 많았고 때로는 간세포의 세포질로부터 방출된 것으로 보이는 다양한 형태의 구조물이 관찰되었다. 유동(sinusoids)내에서는 mye-

lin 구조물을 비롯한 다양한 형태의 구조물 및 호산체(acidophilic body)가 관찰되었다. 변성된 간세포의 핵은 외변이 불규칙하고 염색질이 변연된 소견을 보였다. 간세포의 세포질내에서는 형질내 세망의 확장과 공포화(vacuolation)(Fig. 3-4와 3-5), 리보솜의 해리(Fig. 3-5), 미토콘드리아의 크리스타에(cristae) 소실 및 공포, 지방적 그리고 담즙 물질로 보이는 미세한 과립상 또는 무정형의 침착물, 총판상 구조물(lamellar structure)(Fig. 3-5)이 관찰되었다.

약물속도론적 분석

안티피린의 체내동태—실험동물 각군에 대해 흰쥐 kg당 15 mg의 안티피린을 대퇴 정맥내로 투여하여 얻어진 혈장 중 농도추이를 Fig. 4에 나타내었으며 이들 곡선들로부터 RSTRIP²⁹⁾ 프로그램을 이용하여 구한 약물속도론적 파라메타를 Table VI에 나타내었다. Sham operation군과 무처리 대조군에 비하여 총수담관 결찰군에서 혈장중 약물농도가 유의성($p<0.05$) 있게 증가하고 있으며 특히 β 상에서의 기울기가 작아지고 있음을 볼 수 있었다. Sham operation군과 무처리 대조군에 비해 총수담관 결찰군에서 K_{10} 과 분포 후상에서의 반감기와 전신클리어런스가 유의성($p<0.05$) 있게 감소하였으나, 분포용적 등 다른 파라메타는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

d-프로프라놀롤의 체내동태—실험동물 각군에 대해 흰쥐 kg당 3 mg의 d-프로프라놀롤을 대퇴 정맥내로 투여하여 얻어진 혈중 농도추이를 Fig. 5에 나타내었으며 이들 곡선들로부터 RSTRIP²⁹⁾ 프로그램을 이용하여 구한 약물속도론적 파라메타를 Table VII에 나타내었다. Sham operation군과 무처리 대조군에 비하여 총수담관 결찰군에서 혈중농도가 유의성($p<0.05$)

Table VI—Pharmacokinetic Parameters of Antipyrine^a

Parameters	No treatment	Sham operation	Bile duct ligation
$K_{12}(\text{min}^{-1})$	0.12 ± 0.05	0.11 ± 0.06	0.04 ± 0.02
$K_{10}(\text{min}^{-1})$	0.006 ± 0.002	0.016 ± 0.00	$0.002 \pm 0.001^{**}$
$K_{21}(\text{min}^{-1})$	0.09 ± 0.03	0.13 ± 0.06	0.06 ± 0.02
Vc(ml/kg)	421.75 ± 77.84	531.19 ± 93.34	24.09 ± 57.41
Vp(ml/kg)	387.60 ± 65.74	285.09 ± 84.10	256.91 ± 54.41
Vdss(ml/kg)	809.33 ± 24.65	811.09 ± 57.67	781.00 ± 13.97
AUC($\mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{ml}$)	4132.77 ± 49.69	5492.37 ± 79.54	$12117.18 \pm 61.72^{**}$
CLt(ml/min/kg)	3.72 ± 0.42	2.74 ± 0.22	$1.23 \pm 0.09^{**}$
$t_{1/2\alpha}$ (min)	3.08 ± 0.62	7.13 ± 4.94	17.82 ± 11.68
$t_{1/2\beta}$ (min)	160.76 ± 20.76	208.62 ± 10.83	$453.05 \pm 27.68^{**}$

^aMean \pm S.E.

^{**} $p<0.05$, between no, sham and bile duct ligated group.

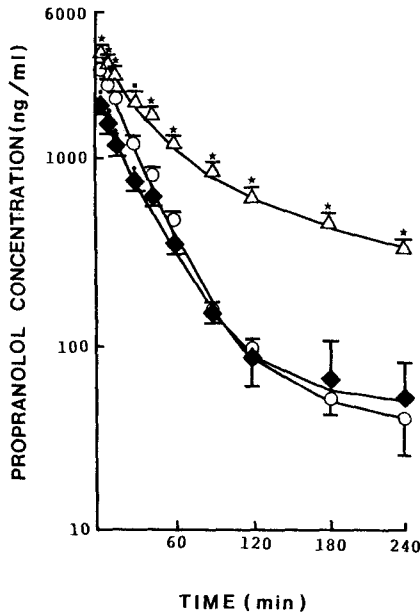


Figure 5— Mean blood concentration-time profiles of *d*-propranolol after intravenous administration (3 mg/kg) to rats (n=6-8). Vertical bar represents the standard error of the mean.
 Keys : -○-: No treatment, -◆-: Sham operation, -△-: Bile duct ligation, ★p<0.05 between no, sham and bile duct ligated group, ■p<0.05 between no and bile duct ligated group, ●p<0.05 between no and sham operation group.

있게 증가하고 있음을 볼 수 있다. 총수담관 결찰군에서 전신클리어런스와 Vc가 유의성(p<0.05) 있게 감소하고 있음을 볼 수 있다.

고 찰

5일 동안의 총수담관 결찰시 총담관으로의 담즙의 배설이 전혀 이루어질 수 없으므로 담즙이 요로 빠져 나오게 되고 이 때문에 요가 노랗게 되는 것을 관찰할 수 있었으며, 무균 상태에서 결찰이 이루어지지 못한 경우 복수가 생기거나 복벽에 염증이 생기게 되고 전체적으로 장관이 황갈색을 띄게 되는 것을 볼 수 있었다. 따라서, 이러한 실험동물은 실험군에서 제외하였으며, 결찰하는 기간 동안 염증의 발생을 막기 위해서 수술부위를 10% 포비돈 요오드액으로 소독하여 주었으며 가능한 한 무균적인 깨끗한 환경을 유지하여 주었다.

총수담관이 결찰된 흰쥐의 간은 육안상 정상보다 노란 빛을 띄는 것이 관찰되었고, 간의 무게가 증가하는 것은 담즙분비정체시 간세포나 담관내의 담즙분비 정체와 문맥역의 소담관 증식 때문으로 사료되며 이는 Reichen 등³³⁾과 Keeffe 등³⁴⁾의 보고와 유사한 소견을 보여주고 있다. 또한 소담관과 간세포에 풍부하게 존재하고 있는 것으로 알려진 alkaline phosphatase와 간세포에 풍부하며 간세포의 변성이나 괴사시에 의의 있는 증가를 보이는 SGOT, SGPT가 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 콜레스테롤과 빌리루빈(총빌리루빈, 직접형 빌리루빈)도 증가한 것으로 보아 간의 담즙분비정체로 인한 간기능의 감소가 일어났음을 알 수 있었다. 그러나, 혈청 중 총단백량은 sham operation군과 무처리 대조군에 비하여 유의성(p<0.05) 있게 증가하지 않았다. 이는 수술의 영향으로 인하여 발생될 수 있으리라 예측하였던 α₁-acid glycoprotein의 증가^{22, 23)}가 일어나지 않았음을 나타내는 것이라 생각된다. 그리고 sham operation군과 대조군 사이에서 안티피린

Table VII— Pharmacokinetic Parameters of *d*-Propranolol^f

Parameters	No treatment	Sham operation	Bile duct ligation
K ₁₂ (min ⁻¹)	0.02±0.003	0.01±0.005	0.01±0.001
K ₁₀ (min ⁻¹)	0.02±0.007	0.03±0.007	0.01±0.002
K ₂₁ (min ⁻¹)	0.01±0.005	0.01±0.001	0.01±0.002
Vc (ml/kg)	1480.37±231.64	858.19±10.86*	742.46±35.81**
Vp (ml/kg)	12977.89±10353.77	6034.15±4601.51	902.59±69.84
Vdss (ml/kg)	14458.37±10268.24	6892.15±4607.21	1645.05±57.08
AUC (μg · min/ml)	101256.81±21040.03	151035.37±51888.21	313774.87±52962.6**
CLt (ml/min/kg)	35.25±10.84	23.00±5.70	9.88±1.43**
t _{1/2α} (min)	20.76±1.56	18.16±1.25	21.27±1.81
t _{1/2β} (min)	881.25±699.19	654.84±450.03	165.02±29.26

^fMean±S.E.

*p<0.05, between no and sham operated groups.

**p<0.05, between no, sham and bile duct ligated groups.

- 457-451 (1978).
- 22) K.M. Piafsky, Olof Borga, I. Ordar-Cederlof, C. Johnsson and F. Sjoqvist, Increased plasma protein binding of propranolol and chlorpromazine mediated by disease-induced elevations of plasma α_1 -acid glycoprotein, *N. Engl. J. Med.*, **299**(26), 1435-1439 (1978).
 - 23) N. Terao and D.D. Shen, Alteration in serum protein binding and pharmacokinetics of l-propranolol in the rat elicited by the presence of an indwelling venous catheter, *J. Pharmac. Exp. Ther.*, **227**(2), 369-374 (1983).
 - 24) R.L. Dixon, R.W. Shultice and J.R. Fouts, Factor affecting drug metabolism by liver microsomes: IV. Starvation, *Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.*, **103**, 333-339 (1960).
 - 25) M.M. Wintrobe, G.R. Lee and D.R. Boggs, *Clinical hematology*, 7th ed. Lea and Febiger, Philadelphia (1974).
 - 26) E. Haas, Fifty diagnostic special stains for surgical pathology, J.B. Lippicott Company, Philadelphia & Toronto, pp. 33-34 (1981).
 - 27) L. Shargel, W.M. Cheung and B.C. Yu Andrew, High-pressure liquid chromatographic analysis of antipyrine in small plasma samples, *J. Pharm. Sci.*, **68**(8), 1052-1055 (1979).
 - 28) M.A. Lefebvre, J. Girault and J.B. Fourtillan, β -Blocking agents: Determination of biological levels using high performance liquid chromatography, *J. Liquid. Chromatogr.*, **4**(3), 483-488 (1981).
 - 29) M.L. Lamson, RSTRIP-Polyexponential curve stripping/least squares parameter estimation, user handbook, MicroMath Inc., Salt Lake City, Utha (1987).
 - 30) H.G. Boxenbaum, S. Riegelman and R.M. Elashoff, Statistical estimations in pharmacokinetics, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **2**, 123-136 (1974).
 - 31) K. Yamaoka, T. Nakagawa and T. Uno, Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations, *ibid.*, **6**, 165-178 (1978).
 - 32) M. Gibaldi and D. Perrier, *Pharmacokinetics* 2nd ed., Marcel Dekker, New York, p. 91 (1982).
 - 33) J. Reichen and G. Paumgartner, Relationship between bile flow and Na^+ , K^+ -adenosine triphosphatase in liver plasma membranes enriched in bile canaliculi, *J. Clin. Invest.*, **60**, 429-435 (1977).
 - 34) E.M. Keeffe, B.F. Scharschmidt, N.M. Blankenship and R.K. Ockner, Studies of relations among bile flow, liver plasma membrane Na^+ , K^+ -ATPase, and membrane microviscosity in the rat, *J. Clin. Invest.*, **64**, 1590-1596 (1979).
 - 35) R.A. Branch, Drugs as indicators of hepatic function, *Hepatology*, **2**(1), 97-105 (1982).
 - 36) A. McLean, P. du Souich and M. Gibaldi, Noninvasive kinetic approach to the estimation of total hepatic blood flow and shunting in chronic liver disease- a hypothesis, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **25**(2), 161-175 (1979).
 - 37) H. Shibuya, Experimental study on rat hepatic injury by copper: Effect of copper overload on the cholestatic liver induced by bile duct ligation, *北海道醫學雜誌*, **62**, 434-439 (1987).
 - 38) J. Kountouras, B.H. Billing and P.J. Scheuer, Prolonged bile duct obstruction: A new experimental model for cirrhosis in the rat, *Br. J. Exp. Path.*, **65**, 305-312 (1984).