

Selenium이 adriamycin에 의해서 유발되는 랫드 신장병변에 미치는 영향

박은성·이준섭

서울대학교 수의과대학
(1996년 7월 18일 접수)

The effect of selenium on renal lesions induced by adriamycin in rats

Eun-sung Park, Joon-sup Lee

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received July 18, 1996)

Abstract : This study was carried out to investigate the effect of selenium on the adriamycin-induced renal lesions in male Sprague Dawley rats.

A total of 60 Sprague-Dawley male rats were divided into 2 control groups(C1: saline, C2: selenium) and 2 treatment groups(T1: adriamycin, T2: adriamycin+selenium). The rats of the C1 and T1 groups were given normal saline(0.15ml/rat), the rats of the C2 and T2 groups were given sodium selenite(0.5mg/kg) intraperitoneally three days a week for 4 weeks. The treatment groups were dosed intraperitoneally with adriamycin(2mg/kg/day) five days at the second week. Animals were sacrificed at the 1st week, 2nd week and 3rd week after dosing with adriamycin.

The morphologic abnormalities of the glomeruli and tubules in the kidney of male rats were examined histopathologically and electron microscopically. The results obtained were as follows :

The mean body weight of adriamycin dosed group was significantly decreased as compared with that of control group at 4th week($p<0.05$). In adriamycin and selenium dosed group, the mean body weight was decreased until the end of 2nd week but gradually increased from 3rd to 4th week.

The histopathological findings of the renal corpuscle in adriamycin dosed group were parietal epithelial cell proliferation, vacuolization of glomerulus, and thickened basement membrane of the parietal epithelium. Proximal convoluted tubules were significantly dilated and the lumens were filled with renal cast. These lesions were generally not very significant in the rats given adriamycin and selenium.

The electron microscopical findings of the renal glomerulus in the adriamycin dosed group

were focal loss and fusion of the pedicels of the podocyte, and some vacuoles in the cytoplasm of the podocytes. There were numerous cytoplasmic vacuoles in the proximal and distal convoluted tubular cells. However, these ultrastructural changes were not significantly observed in the renal tubules of the rats of adriamycin and selenium dosed group.

These results suggest that selenium may act as an inhibitor of the renal lesions induced by adriamycin in male rats.

Key words : adriamycin, selenium, adriamycin nephrotoxicity.

서 론

Adriamycin은 1967년 Farmitalia Research Laboratories에서 *Streptomyces peucetius var caesius*로 부터 분리동정된 anthracycline group에 속하는 항종양성 항생물질로서 그 구조는 daunorubicin과 매우 유사하다^{1,2}. 이 물질은 악성 림프종, 갑상샘 종양, 유방암, 폐장암, 난소종양, 고환종양, 만성백혈병 등의 치료에 탁월한 효과가 있으며 특히 어린아이의 악성종양에 효과적임이 입증되어 임상적으로 많이 사용되고 있으나 투여용량에 따른 심장독성 등의 부작용이 나타날 수 있어 이와같은 항암제의 사용에는 많은 주의가 필요한 것으로 알려졌다^{10,11,13,44,47}. 또한 adriamycin을 암환자에게 투여하였을 때 호흡곤란, 서맥, 저혈압, 탈모증, 중추신경계장애, 골수장애 등을 일으킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다^{10,12,47}. Adriamycin은 간장과 신장에도 병변을 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 탁월한 항암효과에도 불구하고 이와같은 항암제의 사용에 한계성이 있는 것으로 지적되었다^{8,17}.

한편 adriamycin의 주된 부작용인 심장독성을 감소시키기 위한 여러 연구가 수행되었는 바 selenium을 미리 투여한 토기에 adriamycin을 투여한 결과 심장독성이 감소된 반면¹⁴, 개에 adriamycin을 투여한 후 vitamin E와 selenium을 투여하였으나 심장독성이 감소되지 않았다고 하였다⁴⁵. 이밖에도 실험동물에서 coenzyme Q₁₀ 이 adriamycin으로 인한 심장독성을 감소시키는 효과가 있다고 보고되었다^{15,18,43}. 이와는 반대로 adriamycin의 대사산물인 aglycone I의 조직내 농도를 조사한 결과 α -tocopherol 또는 coenzyme Q₁₀을 미리 투여한 그룹에서는 대조군에 비해 adriamycin을 투여한 후에 신장과 심장에서 aglycone I의 농도가 훨씬 높게 나타나 임상에서 항

암제로서 adriamycin을 α -tocopherol 또는 coenzyme Q₁₀과 병용해서 투여할 때에는 각별한 주의가 필요하다는 보고가 있었다⁴⁰.

또한 adriamycin을 투여한 랫드에 N-acetylcysteine을 투여한 결과 지질과산화(lipid peroxidation)가 억제되었으며³⁶, adriamycin을 투여한 마우스에 소염제의 일종인 ibuprofen을 투여했을 때 생존율이 증가하였고, 체중감소도 억제되었다고 보고하였다²⁶. 마우스와 기니피크에 ascorbate와 adriamycin의 혼합액을 복강내에 투여한 결과 adriamycin을 단독투여하여 나타나는 심장근형질내세막과 가로세관의 확장, 세포질내의 심한 지방적 출현이 현저히 감소되었다고 하였다¹⁹.

최근에는 랫드에 adriamycin을 투여한 후 발생하는 심장근질환이 selenium에 의해 효과적으로 억제된다는 보고가 있었다⁵⁰. 한편 adriamycin에 의한 신장독성과 그 독성완화에 관한 연구가 계속되었는 바 adriamycin에 의한 신장독성 연구보고로는 토기에 adriamycin을 정맥내에 투여한 결과 신장에서 심한 사구체의 공포변성과 세뇨관의 확장 및 기질의 섬유화가 관찰되었으며¹⁷, 랫드에 adriamycin을 정맥내로 투여한 다음 며칠 뒤 단백뇨가 배출되었고, 전자현미경적 소견으로는 사구체 문어발세포 발달기가 심하게 유착된 것이 관찰되었다고 하였다⁸. 이와같은 adriamycin에 의한 신장병변을 완화시키고자, captopril을 혈관내로 투여하여 adriamycin으로 인한 신장병변의 진행을 감소시켜 보고자 하였으나 captopril은 신장병변을 완화시키지 못했다²⁴. 그러나 adriamycin의 신장독성을 감소시키고자 EDTA의 유도체인 ICRF-187을 adriamycin과 병용 투여하였을 때는 adriamycin 투여로 인한 체중감소와 신장병변이 완화되었다고 하였다³. 또한 aluminium hydroxide, d- α -tocopherol 및 superoxide dismutase를 사용해서 이들 병변을 어느 정도 억제시키는 효

과를 보기도 하였다^{33,37,39,48}.

Adriamycin이 항암제로서 탁월한 치료효과가 있는 것은 사실이나 정상조직에도 손상을 주는 부작용을 이룰 수 있는 바 이러한 독성부작용의 기전으로 adriamycin이 DNA와 RNA 합성을 억제하거나 활성산소(free radicals)를 생성하여 세포막이나 사립체막의 불포화성 인지질을 과산화(lipid peroxidation)시켜 정상세포를 손상시키고 기능을 억제한다는 보고가 있었다^{4,22,30-32}. 이와같은 활성산소에 의한 세포조직의 손상을 막기 위하여 몇가지 항산화제 즉, superoxide dismutase, α -tocopherol, ascorbic acid 등을 사용해서 어느 정도의 효과를 보았다고 하였다^{16,25,28,42}.

본 연구에서는 실험동물에서 adriamycin의 심장독성을 줄이는데 효과가 있는 것으로 알려진 항산화제인 selenium을 랫드에 adriamycin과 병용 투여하여 adriamycin에 의해서 유발되는 심장병변에 미치는 selenium의 효과를 알아보고 adriamycin이 심장병변을 일으키는 기전연구의 기초자료를 얻고자 하였다.

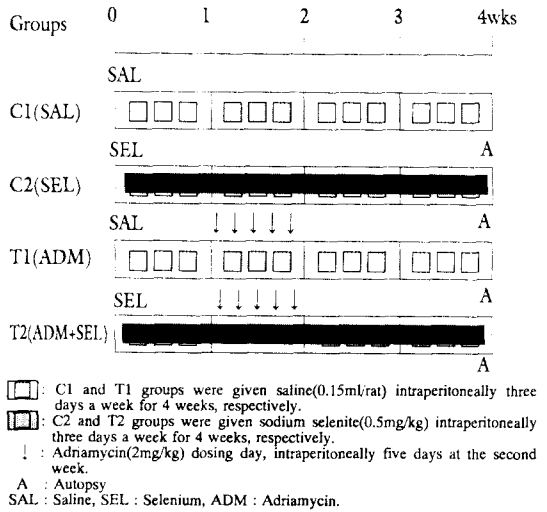
재료 및 방법

실험동물 : 실험동물은 생후 7주령의 Sprague-Dawley 중 수컷 랫드 60마리를 농촌진흥청 수의과학연구소에서 공급받아 2주간 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

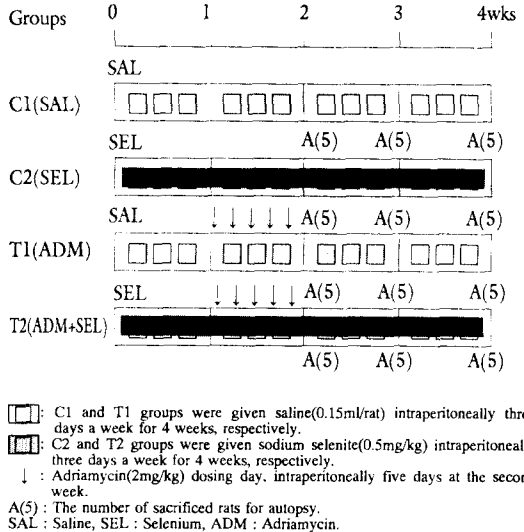
실험기간동안 실험동물은 각각 5마리씩 랫드용 polycarbonate cage에 넣어 관리하였으며 실험실내의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 $60 \pm 5\%$ 를 유지시켰고, 12시간(08:00~20:00)의 인공조명 환경에서 사육하였으며 사료는 실험동물용 사료(삼양사료)를 주었고, 음수로는 수도 물을 자유로이 섭취시켰다.

실험설계 : 실험동물은 대조군과 실험군에 각각 30마리씩 배정하였다(Text-Fig 1). 대조군은 제1대조군(C1)과 제2대조군(C2)으로 나누어 각각 15마리씩 배정한 다음 제1대조군에는 4주동안 하루에 랫드당 0.15ml의 생리적 식염수를 복강내로 투여하였고, 제2대조군에는 랫드 체중 kg당 0.5mg의 sodium selenite(Janssen Chimica, Belgium)를 매주 3회씩 4주간 복강내로 투여하였다. 실험군도 제1실험군(T1)과 제2실험군(T2)으로 나누어 15마리씩 배정한 후 제1실험군에는 제1대조군에서와 같이 생리적 식염수를 4주간 계속해서 투여하되 실험시작후 2주째에 adriamycin® (doxorubicin hydrochloride, 일동제약)을 하루에

랫드 체중 kg당 2mg씩 5일간 각각 복강내로 투여하였다. 제2실험군은 제2대조군에서와 같이 매주 3회씩 4주간 selenium을 투여하되 2주째에는 제1실험군에서와 같은 방법으로 adriamycin을 복강내로 투여하였다(Text-Fig 2).



Text-Fig 1. Experimental design for observation of body weight changes.



Text-Fig 2. Experimental design for light and electron microscopic examinations.

체중측정 : 실험동물은 실험개시일 부터 실험종료일 까지 1주일에 3회씩 약물투여전 매일 같은 시각에 체중을 측정하였으며 동시에 건강상태를 면밀히 관찰하였다.

병리해부학적 관찰 및 신장적출 : 실험시작후 2, 3 및 4주 말에 일정한 수의 랫드를 에테르로 마취시킨 후 병리해부학적 소견을 육안 관찰하였다. 부검시에는 흉강 장기와 복강장기의 상태를 관찰하고 흉수와 복수의 유무를 확인하였으며 신장 등 일부 장기를 적출하여 phosphate buffered solution(4℃, pH 7.2) 용액으로 세척하였다.

현미경적 관찰 :

(1) 광학현미경적 관찰 : 광학현미경적으로 관찰하기 위하여 좌우신장을 각각 채취한 후 종단 및 횡단해서 10% 중성 완충 포르말린 용액에 침적시킨 후 일반적인 조직처리 과정을 거친 다음, 파라핀으로 포매시켰다. 포매가 끝난 조직은 3~5µm 두께의 절편을 만들어 hematoxylin & eosin 염색과 PAS 염색을 하여 광학현미경으로 신사구체와 세뇨관을 중심으로 신장조직의 병변발생 정도를 관찰하였다.

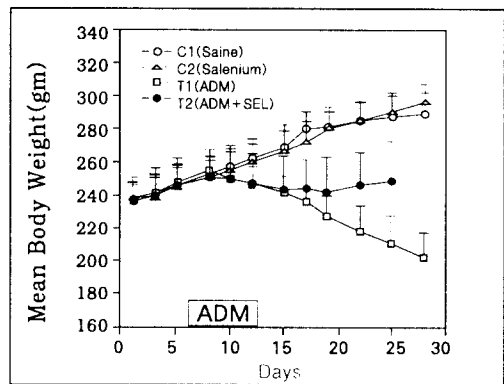
(2) 전자현미경적 관찰 : 신장조직을 투과전자현미경으로 관찰하기 위하여 1mm³ 정도 크기로 작게 세절한 후 0.1M phosphate buffer(pH 7.4, PB)에 녹인 1% paraformaldehyde-1% glutaraldehyde 용액에 3시간동안 전고정하였고, 0.1M PB로 15분간 3회 수세한 뒤 1% osmium tetroxide에 90분간 후고정하였다. 고정된 조직은 0.1M PB로 5분간 3회 수세하여 일반적인 방법에 따라 ethyl alcohol 탈수과정을 거쳐 Epon mixture에 포매하였다. 포매한 조직은 ultramicrotome(Reichert-Jung)을 사용하여 1µm로 박절하여 1% toluidine blue로 염색한 뒤 광학현미경으로 관찰하여 초박절편 부위를 선정하였다. Ultramicrotome으로 초박절편(50~90nm)을 제작한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 병변부위의 세포변화를 투과전자현미경(Hitachi H-7100FA, Japan)으로 관찰하였다.

통계학적 검정 : 각 실험군과 실험기간에 따른 유의성 검정은 Student's *t*-test를 이용하여 검정하였으며, 통계학적 검정결과 $p < 0.05$ 이상일 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

체중의 변화 : 생리적 식염수를 단독투여한 제1대조군(C1) 및 selenium을 단독투여한 제2대조군(C2)은 실험개시부터 실험종료시까지 체중이 꾸준히 증가하였으나 생리적 식염수를 투여하면서 실험개시후 2주에 adriamycin을 투여한 제1실험군(T1)에서는 adriamycin의 투여시작 후부

터 제1, 2대조군에 비하여 실험종료시까지 체중이 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). Selenium을 계속해서 투여하면서 실험개시후 2주에 adriamycin을 투여한 제2실험군(T2)에서도 adriamycin을 단독투여한 제1실험군에서와 마찬가지로 adriamycin의 투여시작 후부터 제1, 2대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있는 감소추세를 보였다($p < 0.05$). 그러나 adriamycin만을 단독투여한 제1실험군과 비교하여 볼 때 제2실험군에서는 체중이 실험개시 후 3주말부터 실험종료시까지 통계학적으로 유의성 있게($p < 0.01$) 증가하였다(Fig 3).



Text-Fig 3. Mean body weight changes of saline(C1), selenium (C2), ADM(T1), and ADM+SEL(T2) groups.

병리해부학적 소견 : 생리적 식염수를 투여한 제1대조군(C1)과 selenium을 투여한 제2대조군(C2)을 실험 개시 후 2, 3 및 4주말에 각각 부검한 결과 별다른 병변이 관찰되지 않았다.

실험개시후 1주일에 제1실험군(T1)과 제2실험군(T2)에 각각 adriamycin을 5일간 투여한 다음 실험개시후 2주말에 부검한 결과 adriamycin을 단독투여한 제1실험군의 복강내에는 소량의 담적색 점액성 복수가 차있었고, 간장의 변연부위가 약간 둔탁한 모습을 나타내었으며, 신장은 정상적인 소견을 보였다. 그러나 adriamycin과 selenium을 병용투여한 제2실험군에서는 모든 장기들이 정상적인 소견을 보였다.

실험개시후 3주말에 부검한 결과 제1실험군에서는 복

강내에 출혈을 동반한 중등도의 복수가 저류되어 있었고, 간장에서는 일부 간엽들의 유착과 종창을 관찰할 수 있었으며 신장은 다소 창백하고 유약한 소견을 보였으나 제2실험군에서는 복강내에서 소량의 복수가 관찰된 것 외에는 정상적인 소견을 보였다.

실험개시후 4주말에 부검한 결과 제1실험군에서는 하악부와 하복부에서 심하게 탈모된 증상이 관찰되었으며 복강내에는 다량의 적색을 띤 복수가 저류되어 있었고 간장의 엷은 심하게 서로 유착되고 종창되었으며 흉강내에는 소량의 담색흉수가 저류되어 있었다. 그러나 제2실험군에서는 복강내에 소량의 복수가 저류되었고 간장이 약간 종창되었을 뿐 그 외에는 별다른 소견을 보이지 않았다.

광학현미경적 소견 : 실험개시후 2, 3 및 4주말에 제1대조군과 제2대조군의 신장조직을 광학현미경으로 관찰한 결과 별다른 변화가 없었다.

Adriamycin을 단독투여한 후 1주일(실험개시후 2주일)에 제1실험군(T1)의 신장에서는 사구체 모세혈관이 어느정도 변형된 모습으로 관찰되었으며 근위극세뇨관내강이 다소 확장되고 이들 세뇨관 상피세포질내에서는 약간의 공포가 형성된 것이 관찰되었다(Fig 1). 그러나 adriamycin과 selenium을 병용해서 투여한 제2실험군(T2)에서는 제1실험군에서 관찰한 사구체 모세혈관의 변형된 모습과 세뇨관의 확장 및 세뇨관 상피세포질내에서 공포변성이 관찰되지 않았으며 비교적 정상적인 구조를 나타내었다(Fig 2).

Adriamycin을 단독투여한 후 2주일(실험개시후 3주일)에 제1실험군의 신장에서는 1주말에 관찰한 소견에 비하여 사구체 내피세포내에서 보다 더 많은 공포가 관찰되었으며 일부 세뇨관에서도 국소적으로 공포가 관찰되었고 세뇨관 사이에 분포된 혈관은 부분적으로 충혈되어 있었다(Fig 3). 제2실험군에서는 제1실험군에서와 달리 사구체 내피세포와 세뇨관 상피세포질내에서 공포를 별로 관찰할 수 없었다(Fig 4).

Adriamycin을 단독투여한 후 3주일(실험개시후 4주일)에 제1실험군의 사구체 주머니 상피세포는 증생되고 비대되었으며 핵의 형태가 다소 변형된 것으로 보였다(Fig 5). 이와 같은 소견을 보이는 신소체의 사구체 모세혈관은 배열이 불규칙하게 변형되어 있었다. 그리고 이들 벽세포에 부착된 기저막은 현저하게 비후되어 있었고 인접한 부위의 결합조직이 다소 증가한 것으로 관찰

되었다(Fig 5). 또한 근위극세뇨관은 흔히 확장되어 있었고 확장된 세뇨관의 내강에는 초자양 물질이 저류되어 있었으며 이들 물질속에서는 대소크기의 공포가 형성된 것이 다수 관찰되었다(Fig 7). 또한 근위극세뇨관 상피세포는 현저하게 공포변성된 것으로 관찰되었다(Fig 9). 제2실험군에서도 국소적으로 경미하게 사구체에서 공포가 보였고 세뇨관 일부에서 초자양 물질이 저류된 것이 관찰되었으나 저류된 물질속에서 공포는 보이지 않았다(Figs 6, 8). 그러나 제2실험군에서는 제1실험군에 비하여 약간의 병변소견을 나타내었다(Fig 10).

전자현미경적 소견 : 실험개시일 부터 실험종료시까지 4주동안, 생리적 식염수를 투여한 제1대조군과 selenium을 단독투여한 제2대조군에서는 별다른 세포의 변화를 관찰할 수 없었다.

Adriamycin을 투여한 후 3주일(실험개시후 4주일)에 제1실험군 및 제2실험군의 사구체 모세혈관을 전자현미경으로 관찰한 결과 adriamycin을 단독투여한 제1실험군에서는 사구체 모세혈관을 덮고 있는 사구체 문어발세포(podocyte)의 작은 돌기인 발돌기(pedicels)가 다소 손상되거나 서로 융합된 것으로 보였으며 이들의 전자밀도도 균일하지 않았다(Fig 11). 또한 문어발세포의 세포질에서는 약간의 공포가 관찰되었다. Adriamycin과 selenium을 병용투여한 제2실험군에서도 일부 사구체 문어발세포의 발돌기가 다소 융합된 것으로 관찰되었으나 세포질내에서 공포는 볼 수 없었다(Fig 12).

실험개시일 부터 실험종료시까지 4주동안, 생리적 식염수를 투여한 제1대조군과 selenium을 단독투여한 제2대조군 신장의 근위극세뇨관 상피세포의 소견은 정상이었다. 그러나 adriamycin을 투여한 후 3주일에 제1실험군에서는 근위극세뇨관 상피세포의 세포질에서 대소크기의 공포가 다수 관찰되었으며, 사립체내에서도 소수의 작은 공포가 보였다(Fig 13). 제2실험군의 근위극세뇨관 상피세포의 세포질에서는 전자밀도가 낮은 물질이 차 있는 약간의 공포가 보였으나 사립체의 변화는 없는 것으로 보였다(Fig 14).

실험개시일 부터 실험종료시 까지 4주동안, 생리적 식염수를 투여한 제1대조군과 selenium을 단독투여한 제2대조군 신장의 원위극세뇨관 상피세포에서는 별다른 변화가 보이지 않았으나 제1실험군의 원위극세뇨관 상피세포는 심한 공포변성으로 세포질의 많은 부분이 변형된 것으로 관찰되었다(Fig 15). 그러나 제2실험군의 원

위곡세뇨관 상피세포의 형태와 구조에는 뚜렷한 변화가 없는 것으로 보였다(Fig 16).

고 찰

Adriamycin은 가장 널리 사용되는 종양치료제의 하나로서 특히 급성백혈병, 림프종, 및 대다수의 종양치료에 효과적임이 입증되었다¹⁰. 그러나 adriamycin은 심장독성, 간장독성, 신장독성 등의 부작용을 유발할 수 있는 큰 결점을 갖고 있다³².

Adriamycin은 실험적으로 실험동물의 신장병변을 유발시킬 수 있는 것으로 알려져 있는데 adriamycin을 랫드에 투여한 결과 신사구체의 비대, 공포병성, 사구체의 경화, 사구체 주머니 상피세포 기저막과 세뇨관 상피세포 기저막의 비후, 간질조직의 섬유화와 단핵세포의 침윤 등이 나타났다고 하였다. 한편 단백질이 출현하고 이어서 원위곡세뇨관의 산화성 물질형성, 세뇨관 상피세포 기저막의 파손으로 인해 간질의 염증이 촉진된다고 하였다^{7-9,20,21,24,34}.

또한 랫드에 adriamycin을 1회 투여하여, 투여후 4일내지 5일에 단백질이 배설되는 신증후군을 유발시킨 다음 시기별로 관찰한 결과 단백질 배설은 adriamycin 투여후 4주 내지 5주일에 최고에 도달함을 알 수 있었다고 하였다⁸. 시기별로 신장조직을 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰한 결과 adriamycin 투여후 28시간에는 광학현미경상으로 별다른 변화를 보이지 않았으나 13일에는 사구체에서 약간의 공포가 형성된 것을 관찰할 수 있었고 일부 세뇨관 내강에서만 산화성 물질이 관찰되기도 하였다⁸. 전자현미경소견으로는 adriamycin 투여후 28시간에 문어발세포의 발달기들이 국소적으로 융합되었으며, 13일에는 문어발세포의 발달기들이 심하게 융합된 것을 볼 수 있었고, 문어발세포의 세포체내에서는 세포질 붕입체들도 관찰되었으며 28일 후에는 이러한 소견들이 더욱 심하게 관찰되었다는 보고가 있었다⁸. 마찬가지로 랫드에 adriamycin을 투여하여 신증후군을 야기시킨 다음 관찰한 결과 단백질은 국소 사구체경화증과는 관계가 없었으며, 세뇨관의 요원주 형성이 신장손상 진행의 가장 큰 요소인 것으로 보고되었다⁷.

본 실험에서는 adriamycin을 랫드 체중 kg당 2mg씩 5회 복강내로 투여한 결과 실험종료일까지 꾸준한 체중의 감소를 보였고 하악부위와 복부쪽에서 심한 탈모현

상을 보였다. 특히 adriamycin 투여후 나타나는 탈모현상은 암환자를 대상으로한 여러 연구에서 공통적인 부작용으로 언급되었으며, adriamycin 투여를 중단한 후부터 다시 회복되었다고 보고하였다^{10,11,13,44,47}. 또한 토끼와 개에 adriamycin을 각각 투여하였을 때에도 체중감소와 탈모현상이 나타난 것으로 보고되었다⁹. Adriamycin을 비롯한 대부분의 항암제는 암세포는 물론 세포분열이 왕성한 정상세포(골수세포, 위장관 상피세포, 모낭)에도 피해를 입혀 정도의 차이는 있으나 골수기능장애, 위장장애, 탈모증 등 부작용이 거의 모든 환자에서 발생된다고 한다⁵¹.

본 연구에서는 adriamycin 투여후 복수와 흉수의 저류 및 간장의 간엽사이에서 심한 유착과 종창을 관찰할 수 있었으며 병리조직학적으로는 사구체내에서의 공포형성과 신소체 벽세포 기저막의 비후, 신소체 벽세포의 비대 및 세뇨관의 확장과 세뇨관 내강에 초자양 물질이 저류된 것이 관찰되었다. 특히 확장된 세뇨관내강에 초자양 물질이 저류된 소견은 Bertani *et al*⁷과 Hall *et al*²⁴이 관찰한 결과와 같았으며, Fajardo *et al*¹⁷과 Okasora *et al*³³의 보고에서도 확장된 원위 세뇨관내강에 단백질성 요원주가 관찰되었다고 하였다. 또한 사구체내에 공포가 형성되고, 사구체 벽세포 기저막의 비후와 사구체 벽세포의 비대 및 증생소견도 Fajardo *et al*¹⁷과 Hall *et al*²⁴의 관찰소견과 일치하였다.

전자현미경적 소견으로는 사구체의 문어발세포 발달기가 흔히 불규칙하게 배열되었고 이들의 일부는 소실되거나 서로 융합되었으며, 이 세포의 세포질내에서는 약간의 공포를 관찰할 수 있었다. 이와같은 소견은 Fajardo *et al*¹⁷과 Bertani *et al*⁸ 및 Okasora *et al*³³이 관찰한 소견과 일치하였다. 한편 adriamycin을 단독투여한 제1실험군의 근위곡세뇨관 상피세포에서는 사립체내에 형성된 약간의 공포와 함께 세포질내에 많은 공포가 형성된 것이 관찰되었으나 이와같은 세포의 미세용모는 정상적인 소견을 보였다. 이들 상피세포의 미세용모가 adriamycin 투여 후에도 정상적인 소견을 보인 것으로 미루어 보아 신장병변을 유발시키는 유독성 물질이 흔히 근위곡세뇨관 상피세포의 미세용모를 탈락시키는 것과는 다르다는 것을 알 수 있었다. 원위곡세뇨관 상피세포 질내에서도 많은 공포가 관찰되었는데 근위곡세뇨관이 나 원위곡세뇨관 상피세포질내에서의 공포형성은 과립형질내세망의 수조(cisternae)가 확장해서 생긴 것으로 생

각된다.

한편 이러한 adriamycin의 신장독성을 완화시키거나 억제시키기 위한 몇몇 연구가 이루어졌는 바, 마우스에 adriamycin 투여 3일 전부터 dextran sulfate를 투여한 결과 생존율이 증가하였고 사립체의 기능이 향진되었다고 보고하였다⁴¹. 또한 랫드에 adriamycin을 투여하여 단백뇨를 유발시킨 다음 superoxide dismutase를 투여한 결과 단백뇨가 현저하게 감소하였다고 하였다³³. Adriamycin 단독투여군에서는 혈관사이세포의 증식과 중등도의 혈관사이기질의 확장 및 대부분의 원위세뇨관에서 산호성 물질이 가득 차있는 것을 관찰할 수 있었으나, superoxide dismutase 병용투여군에서는 별다른 형태학적 이상소견을 관찰할 수 없었다고 하였다³³.

Adriamycin 단독투여군의 투과전자현미경소견으로는 문어발세포 발달기의 심한 소실과 이들 세포질내의 작은 공포변성 및 재흡수된 단백질입자들이 나타났으나 superoxide dismutase 병용투여군에서는 문어발세포 발달기의 국소적인 소실만 관찰됨으로써 활성산소(oxygen free radical)가 adriamycin에 의한 단백질유발을 억제하는 역할을 한다는 간접적인 증거를 제시한 바 있다³³.

Adriamycin을 혈관내로 투여하여 사구체 경화증을 유발시킨 랫드에 aluminium hydroxide를 고용량, 중등도 용량, 저용량으로 구분해서 각각 경구투여한 결과 사구체 경화증은 aluminium hydroxide를 고용량으로 투여한 그룹에서 가장 큰 억제효과를 보인 반면, 세뇨관의 변화는 중등도 용량을 투여한 그룹에서 더 큰 억제효과를 보였다고 보고하였다³⁹. 또한 d- α -tocopherol을 adriamycin 투여 하루 전과 하루 후에 각각 경구로 투여하였을 때 광학현미경적으로 adriamycin 단독투여군에서는 사구체 모세혈관과 사구체주머니와의 유착이 관찰되었으며 세뇨관 상피세포의 위축과 확장된 내강에서 요원주가 보였고 단핵세포가 침윤된 간질경화증이 관찰되었으나 d- α -tocopherol 병용투여군에서는 이와같은 병변이 상대적으로 미약하였다고 보고하였다⁴⁸. 한편 adriamycin을 투여한 랫드에 저단백사료를 급여함으로써 사구체 기저막의 anionic site의 주된 구성분인 glycosaminoglycan 생산에 직접적인 효과가 있으며, 단백뇨와 사구체신염을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다⁶.

Selenium은 1817년에 스웨덴의 화학자인 Berzelius에 의해서 발견된 이래로 많은 산업적인 목적으로 사용되었을 뿐만아니라, 의학용으로도 많이 사용되었다³⁵.

Selenium은 glutathion peroxidase의 기본성분으로 체내에서 세포막의 지질과산화(lipid peroxidation)를 막아서 세포를 보호하는 것으로 알려져 있다^{27,38}. 일찍이 사람과 몇몇 가축에서 selenium 결핍으로 인한 조직의 퇴행성 변화, 생식능력의 저하, 발육부진, 심맥관계통질환 및 종양발생에 대한 조직세포의 민감성이 증가하였다고 하는 연구결과가 발표된 바 있다²⁷. 또한 selenium에 중독된 소, 면양, 말 등의 가축에서 이상행동, 호흡곤란, 설사, 심한 복통 및 전신마비 등이 주된 중독증상으로 알려졌으며, 이들 가축 뿐만아니라 랫드와 마우스와 같은 실험동물에서도 과량의 selenium이 함유된 사료를 섭취했을 때는 이와같은 증세가 민감하게 나타났다고 보고하였다^{27,35}. 그리고 소, 면양, 돼지, 가금류 등 주로 가축에 대해서만 selenium의 사료첨가물로서의 권장용량과 독성유발가능한 용량이 제시되었을 뿐 실험동물에 대한 selenium의 독성유발가능성이 있는 용량에 대한 자료는 아직까지 제시되지 않았다. 단지 selenium 중독을 유발시키는 데 관련된 몇가지 요인들로는 투여(급여) 용량, 빈도, selenium 화합물의 특성, 동물의 선천적인 민감성, selenium 섭취후 체외부로의 배출시간 등이 제시되었으며, 여러가지 종류의 가축에 대한 selenium의 최소한의 독성유발이 가능한 용량을 정확히 측정하기가 아직까지는 어려운 것으로 알려졌다³⁵.

한편 이러한 selenium의 가축에서의 결핍증이나 과잉섭취로 인한 중독증의 유발에 관한 내용보다는 항산화제로서 selenium을 이용하여 질병의 치료나 예방효과를 높이고자 여러가지 연구가 수행되었는 바 실험적으로 selenium 뿐만아니고 vitamin E, coenzyme Q₁₀ 등의 항산화제도 랫드에 투여한 결과 적혈구에서의 지질과산화 억제효과가 있었다고 하는 연구결과가 보고되었다⁴⁹. 또한 랫드에 vitamin E와 selenium을 투여하여 사염화탄소에 의해서 유발되는 지질과산화도 억제하였다는 연구결과도 보고된 바 있다²³. 특히 항암제로 널리 사용되는 cisplatin의 신장독성을 억제하기 위해서 selenium을 투여한 결과 cisplatin의 신장독성을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려졌는데 이와같은 selenium의 효과는 이 물질의 대사산물인 selenol이 신장에서 cisplatin-selenol complex를 형성한 결과라고 보고하였다⁵. 최근에는 약역학적으로 조사한 결과 selenium은 cisplatin의 항암작용에 별로 영향을 미치지 않으면서 cisplatin의 신장독성을 억제한다는 연구결과가 보고되었다⁴⁶.

본 실험에서는 최근 adriamycin이 신장독성을 유발시키는 여러가지 가능성이 있는 기전들 가운데 특히 활성산소(free radical)가 정상세포의 세포막 불포화 인지질을 과산화시킴으로써 조직의 정상적인 기능을 억제하고 이들의 구조를 변화시킨다는 여러가지 연구결과^{4,22,31,37}와 더불어 이미 adriamycin에 의한 랫드 심장병변을 selenium을 사용하여 완화시켰다고 하는 연구보고⁵⁰를 토대로 하여 활성산소의 포착제(scavenger)로서 selenium을 사용하였다. 따라서 본 실험에서는 이와같은 효과가 있는 항산화제인 selenium을 adriamycin의 투여 1주일 전부터 랫드의 복강내로 투여한 결과 adriamycin을 단독투여한 제1실험군과 비교하여 광학현미경적 소견으로 사구체 모세혈관의 경미한 변화 이외는 별다른 변화를 찾아볼 수 없었으며, 전자현미경소견에서는 국소적인 문어발세포 발달기의 소실과 융합이 있었으나 adriamycin을 단독투여한 제1실험군에 비해서 병변이 미약하였고 세뇨관 상피세포의 변화는 뚜렷하지 않았다. Selenium과 adriamycin을 병용해서 투여한 제2실험군이 adriamycin만 단독투여한 제1실험군에 비하여 신장병변이 경미한 소견을 보인 이유로는 adriamycin이 조직내에서 활성산소를 생성하는 과정에서 selenium이 작용하여 활성산소의 생성을 효과적으로 차단함으로써 신장세포의 사립체막에서 지질과산화물을 억제하여 세포의 손상을 줄인 것으로 생각된다.

Selenium이 adriamycin에 의해서 유발되는 신장병변을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었으나 연구기간을 연장해서 보다 더 구체적이고 종합적인 연구가 이루어지는 것이 바람직하다고 생각된다.

결 론

본 연구는 항산화제인 selenium이 adriamycin에 의해서 유발되는 랫드의 신장병변에 미치는 억제효과를 조사할 목적으로 실시하였다. 랫드를 실험군과 대조군으로 나

는 다음, 실험군은 adriamycin만을 투여한 제1실험군(T1), selenium과 adriamycin을 병용투여한 제2실험군(T2)으로 구분하고, 대조군은 생리적 식염수만을 투여한 제1대조군(C1)과 selenium만을 투여한 제2대조군(C2)으로 구분하여 이들 랫드의 체중변화를 비교해서 관찰하고 일정한 수의 랫드를 실험개시후 2, 3 및 4주에 각각 부검하여 신장조직을 병리해부학적, 광학현미경적 및 전자현미경적으로 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 부검시 평균체중은 adriamycin을 단독투여한 제1실험군(T1)이 제1, 2대조군(C1, C2)에 비하여 실험개시부터 실험종료시까지 유의성 있게 감소($p<0.05$)하였다. Adriamycin과 selenium을 병용투여한 제2실험군(T2)도 제1, 2대조군에 비하여 유의성 있게 감소($p<0.05$)하였다. 제2실험군은 제1실험군과 비교하여 체중이 3주 초까지는 차이가 없었으나 3주 말부터 실험종료시까지 유의성 있게($p<0.01$) 증가하였다.

2. Adriamycin을 투여한 후 복수의 저류, 간장의 유착 및 종창을 관찰하였는데 이러한 소견들은 제1실험군에서 현저하였으나 제2실험군에서는 정도가 미약하였다.

3. Adriamycin을 투여한 각 실험군에서 관찰한 신장의 광학현미경적 소견으로는 신소체 벽세포 기저막의 비후, 사구체의 공포형성, 확장된 세뇨관내의 초차양 물질의 저류, 세뇨관상피세포의 공포변성이었다. 이와같은 소견들은 제1실험군에서 뚜렷하였으나 제2실험군에서는 뚜렷하지 않았다.

4. 전자현미경적 관찰소견으로는 제1실험군에서 사구체 문어발세포 발달기의 소실과 융합, 문어발세포질내의 공포변성 및 근위극세뇨관과 원위극세뇨관 상피세포질내의 심한 공포형성이었다. 이와같은 소견들은 제2실험군에서는 정도가 미약하거나 뚜렷하지 않았다.

이상의 결과들을 종합해볼 때, selenium은 랫드에 adriamycin을 투여한 후 발생하는 신장질환을 어느 정도 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

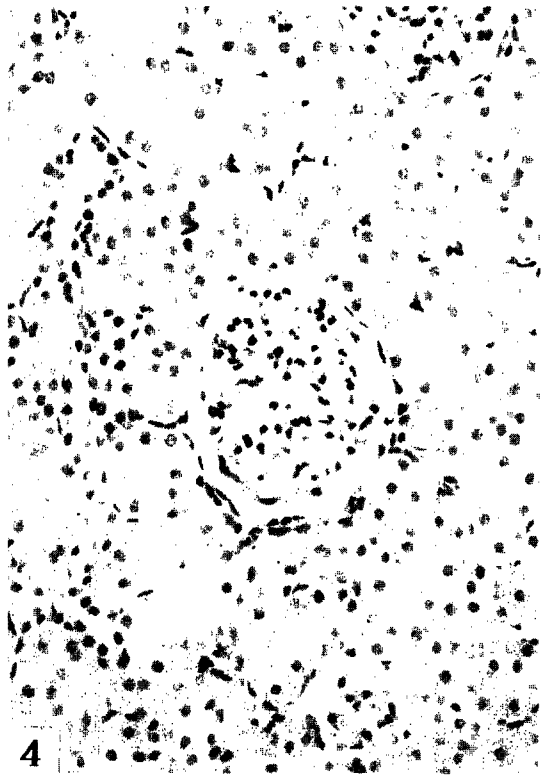
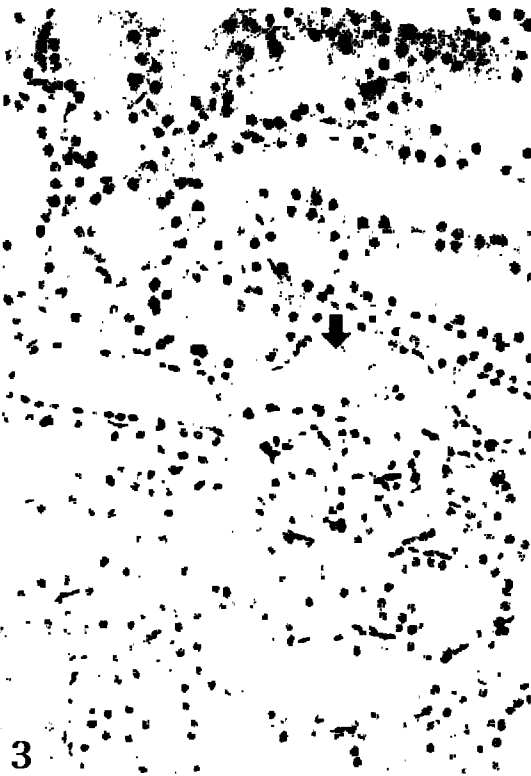
Legends for figures

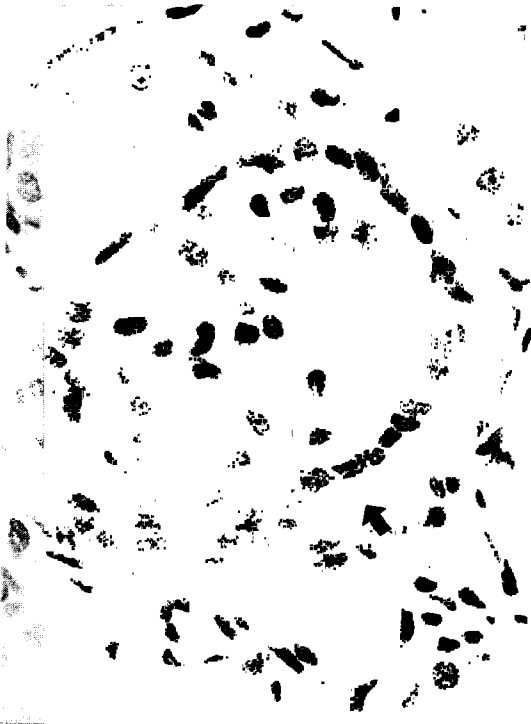
Light microscopic findings

- Fig 1. Renal cortex from a rat 1 week after receiving adriamycin. Some small vacuoles in the glomerulus are seen and the glomerulus appears to be slightly disorganized. H&E. $\times 200$.
- Fig 2. Renal cortex from a rat given selenium for 2 weeks and 1 week after receiving adriamycin. The glomerulus and tubules are almost normal in appearance. H&E. $\times 200$.
- Fig 3. Renal cortex from a rat 2 weeks after receiving adriamycin showing some vacuoles in the glomerulus (arrow) and several tubules are vacuolized. H&E. $\times 200$.
- Fig 4. Renal cortex from a rat dosed with selenium for 3 weeks and 2 weeks after receiving adriamycin showing almost normal glomerular and tubular appearances. H&E. $\times 200$.
- Fig 5. Glomerulus of kidney from a rat 3 weeks after receiving adriamycin showing distinctly thickened basement membrane of the parietal capsular epithelium (arrow) and some proliferation of the parietal cells. The glomerular capillary is distorted. PAS. $\times 400$.
- Fig 6. Glomerulus of kidney from a rat dosed with selenium for 4 weeks and 3 weeks after receiving adriamycin showing almost normal in appearance. PAS. $\times 400$.
- Fig 7. Renal tubules of a rat 3 weeks after receiving adriamycin showing several distended tubules, and most tubules are filled with hyaline cast. Numerous vacuoles are seen in hyaline cast. PAS. $\times 200$.
- Fig 8. Renal tubules of a rat given selenium for 4 weeks and 3 weeks after receiving adriamycin showing less severe pathologic tubular lesions than that of Fig. 7. PAS. $\times 200$.
- Fig 9. Renal cortex from a rat 3 weeks after receiving adriamycin showing numerous large clear vacuoles in the proximal tubules (arrow) and the glomerulus appears to be disorganized. H&E. $\times 400$.
- Fig 10. Renal cortex from a rat given selenium for 4 weeks and 3 weeks after receiving adriamycin shows almost normal in appearance. H&E. $\times 400$.

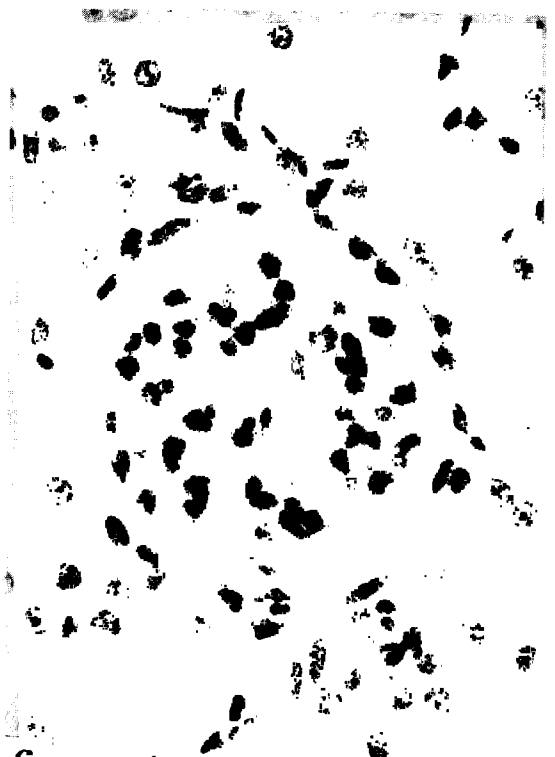
Electron microscopic findings

- Fig 11. Podocyte of renal glomerulus in the renal cortex of a rat 3 weeks after receiving adriamycin shows small cytoplasmic vacuoles, partial loss and fusion of the pedicels (arrow). $\times 10,000$.
- Fig 12. Pedicels of podocyte from a rat dosed with selenium for 4 weeks and 3 weeks after receiving adriamycin shows partial fusion of the pedicels. $\times 10,000$.
- Fig 13. Renal proximal tubular cell from a rat 3 weeks after receiving adriamycin showing numerous cytoplasmic vacuoles (arrow) and some small vacuoles in the mitochondria. $\times 5,000$.
- Fig 14. Renal proximal tubular cell from a rat dosed with selenium for 4 weeks and 3 weeks after receiving adriamycin showing small numbers of cytoplasmic vacuoles filled with electron lucent materials. $\times 2,500$.
- Fig 15. Renal distal tubular cell from a rat 3 weeks after receiving adriamycin showing severe vacuolization (arrow) and disorganization of the structure of the cell. $\times 3,500$.
- Fig 16. Renal distal tubular cell from a rat given selenium for 4 weeks and 3 weeks after receiving adriamycin showing relatively normal structure. $\times 4,000$.

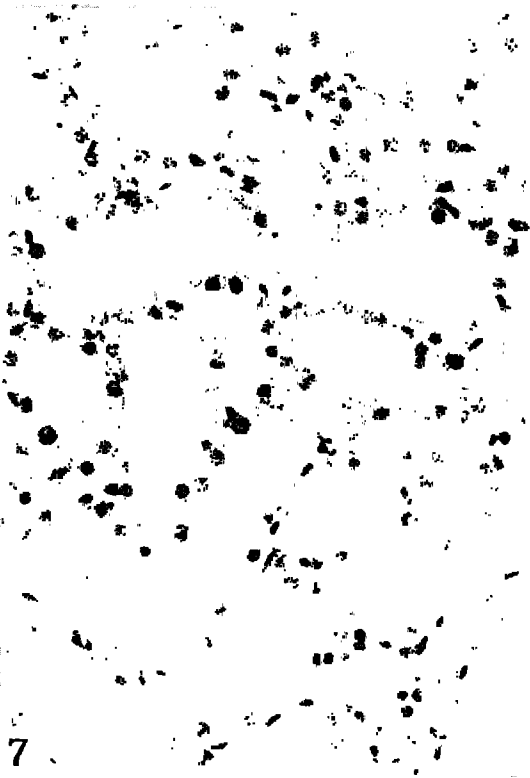




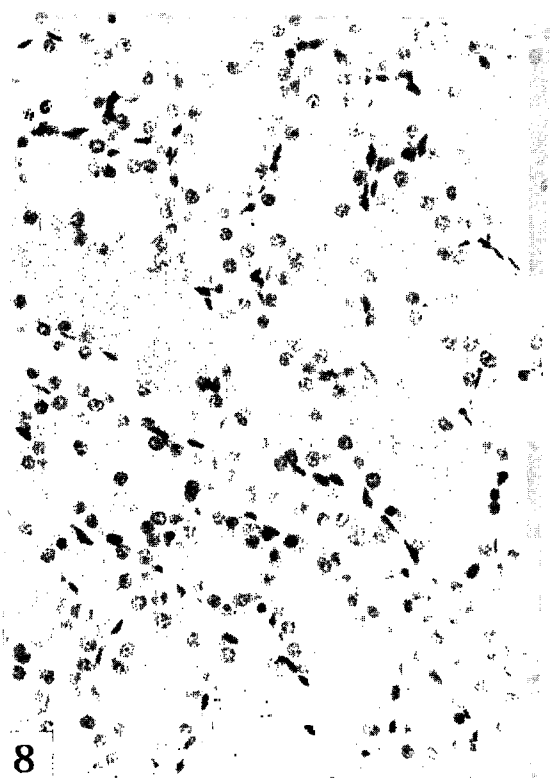
5



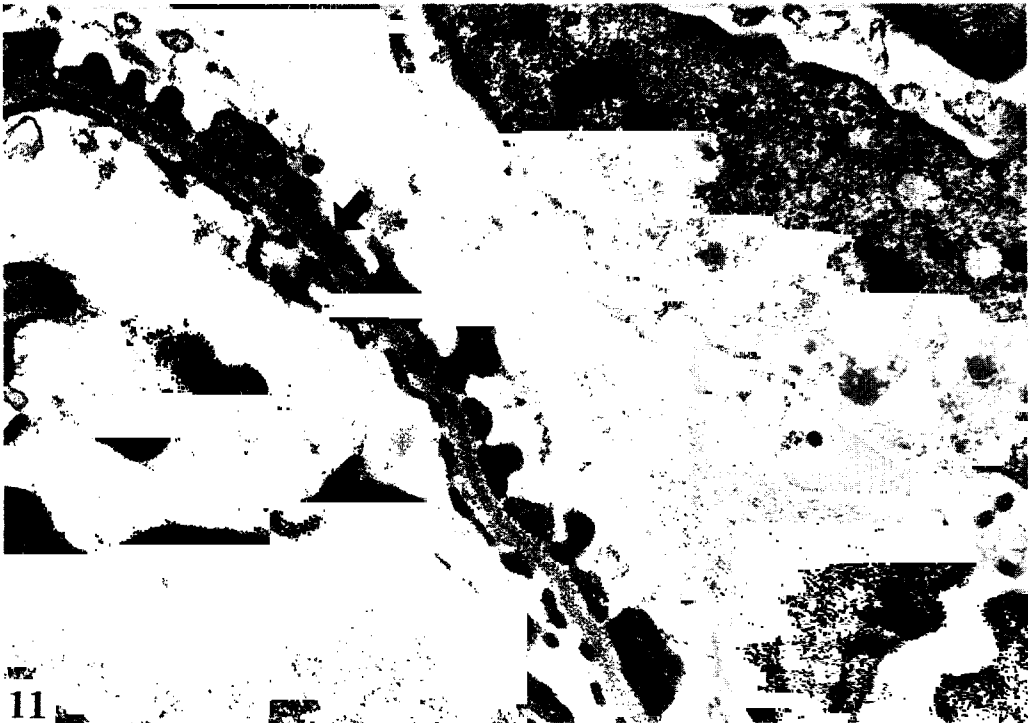
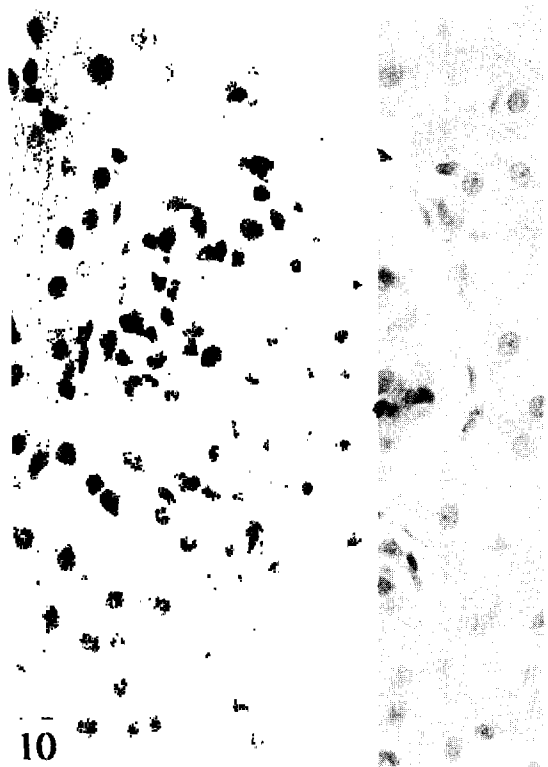
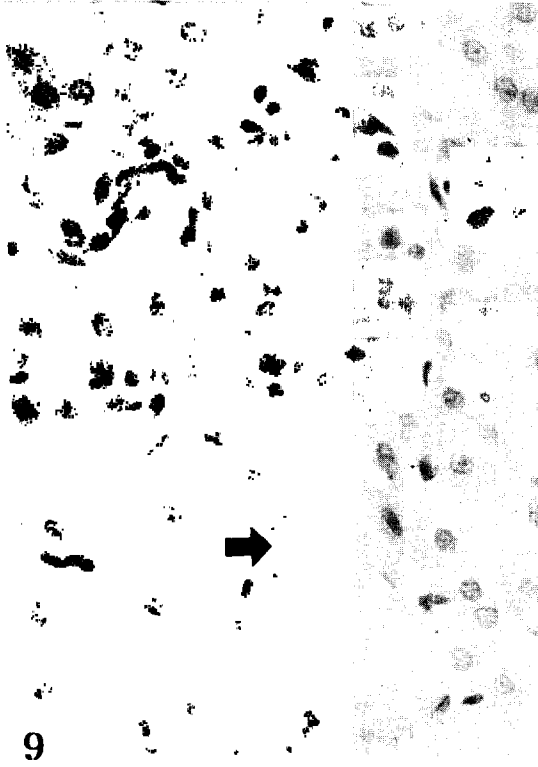
6

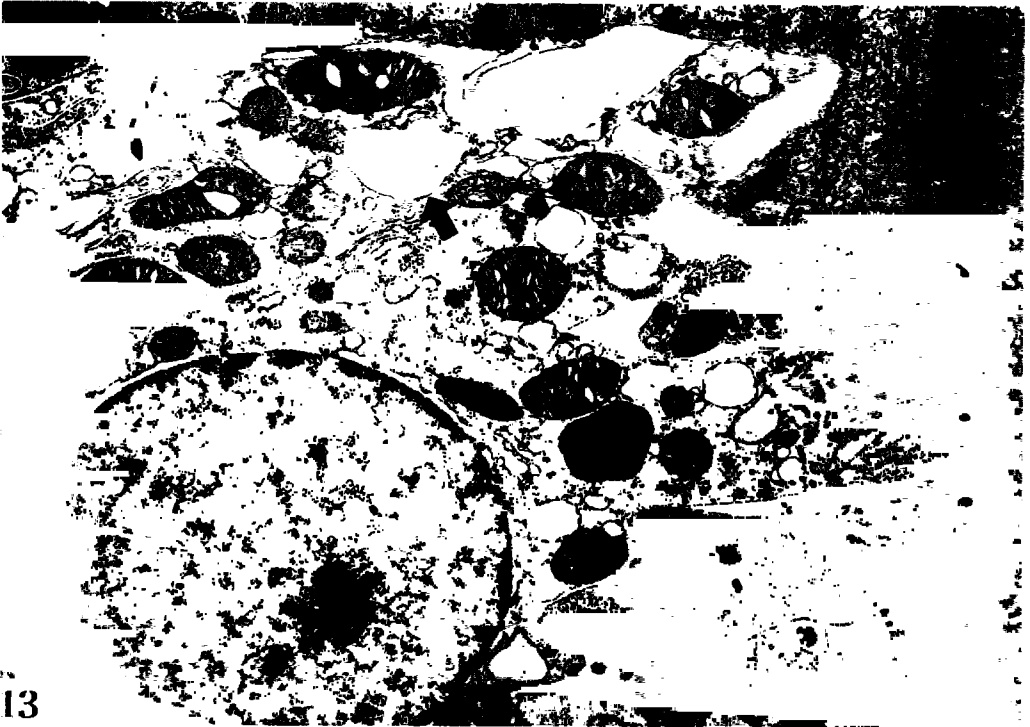


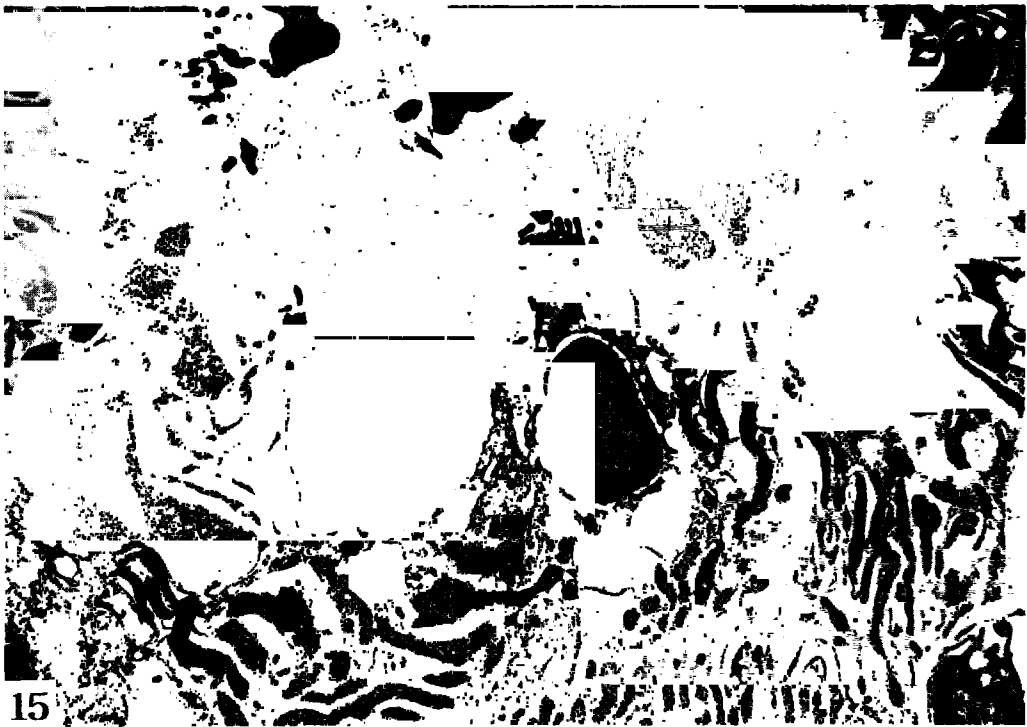
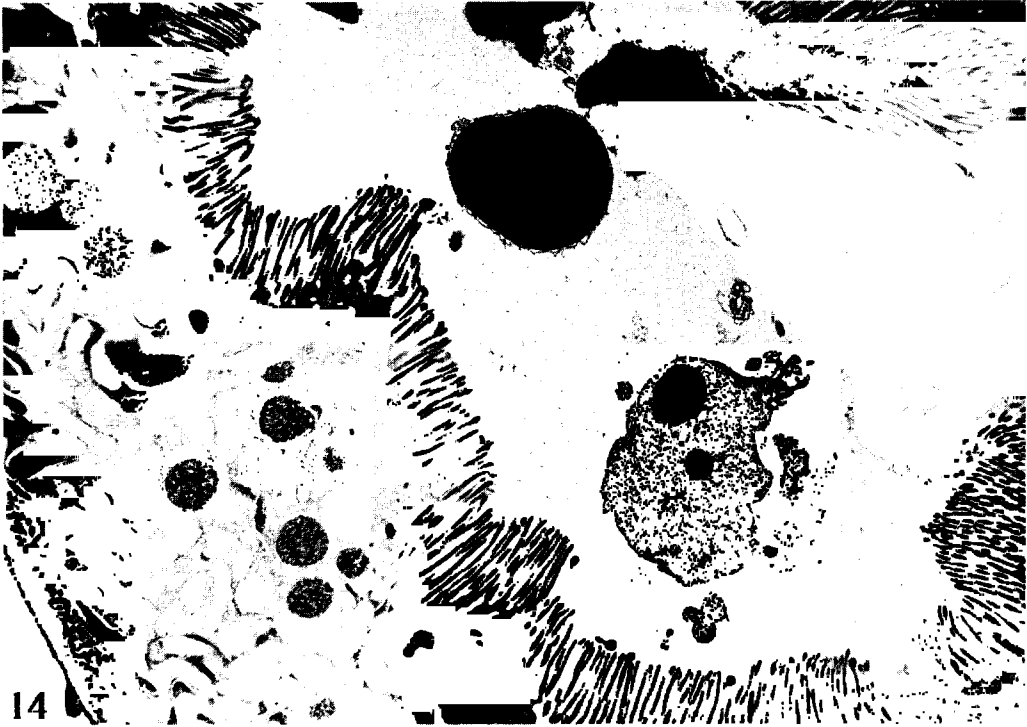
7



8









참 고 문 헌

1. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, *et al.* Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*, 11: 1101-1110, 1969a.
2. Arcamone F, Franceschi G, Penco S, *et al.* Adriamycin (14-hydroxydaunomycin) a novel antitumor antibiotic. *Tetrahedr Lett*, 13: 1007-1010, 1969b.
3. Baba H, Stephens LC, Strebel FR, *et al.* Protective effect of ICRF-187 against normal tissue injury induced by adriamycin in combination with whole body hyperthermia. *Cancer Res*, 51: 3568-3577, 1991.
4. Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, *et al.* Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicol*, 95: 1-9, 1995.
5. Baldew GS, Mol JGJ, De Kanter FJJ, *et al.* The mechanism of interaction between cisplatin and selenite. *Biochem Pharmacol*, 41: 1429-1437, 1991.
6. Benjelloun AS, Merville P, Cambar J, *et al.* Effects of a low-protein diet on urinary glycosaminoglycan excretion in adriamycin-treated rats. *Nephron*, 64: 242-248, 1993.
7. Bertani T, Cutillo F, Zoja C, *et al.* Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. *Kidney Int*, 30: 488-496, 1986.
8. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, *et al.* Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats (sequence of pathologic events). *Lab Invest*, 46: 16-23, 1982.

9. Bertazzoli C, Chieli T, Ferni G, *et al.* Chronic toxicity of adriamycin: a new antineoplastic antibiotic. *Toxicol Appl Pharmacol*, 21: 287-301, 1972.
10. Blum RH, Carter SK. Adriamycin, a new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Inter Med*, 80: 249-259, 1974.
11. Bonadonna G, Monfardini S, De Lena M, *et al.* Clinical evaluation of adriamycin, a new antitumor antibiotic. *Brit Med J*, 3: 503-506, 1969.
12. Bonadonna G, Monfardini S. Cardiac toxicity of daunorubicin. *Lancet*, 1: 837, 1969.
13. Carter SK. Adriamycin, a review. *J Natl Cancer Inst*, 55: 1265-1274, 1975.
14. Dimitrov NV, Hay MB, Siew S, *et al.* Abrogation of adriamycin-induced cardiotoxicity by selenium in rabbits. *Am J Pathol*, 126: 367-383, 1987.
15. Domae N, Sawada H, Matsuyama E, *et al.* Cardiomyopathy and other chronic toxic effects induced in rabbits by doxorubicin and possible prevention by coenzyme Q₁₀. *Cancer Treat Rep*, 65: 79-91, 1981.
16. Duthie GG. Lipid peroxidation, *Euro J Clin Nutri*, 47: 759-764, 1993.
17. Fajardo LF, Eltringham JR, Stewart JR, *et al.* Adriamycin nephrotoxicity. *Lab Invest*, 43: 242-253, 1980.
18. Folkers K, Choe JY, Combs AB. Rescue by coenzyme Q₁₀ from electrocardiographic abnormalities caused by the toxicity of adriamycin in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75: 5178-5180, 1978.
19. Fujita K, Shinpo K, Yamada K, *et al.* Reduction of adriamycin toxicity by ascorbate in mice and guinea pigs. *Cancer Res*, 42: 309-316, 1982.
20. Güezmes A, Fernández F, Garajo F, *et al.* Glomerular morphometry of adriamycin-induced focal and segmental glomerulosis in the rat. *Am J Nephrol*, 12: 437-441, 1992.
21. Giroux L, Smeesters C, Boury F, *et al.* Adriamycin and adriamycin-DNA nephrotoxicity in rats. *Lab Invest*, 50: 190-196, 1984.
22. Goodman J, Hochstein P. Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem Biophys Res Comm*, 77: 797-803, 1977.
23. Hafeman DG, Hoekstra WG. Protection against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in the rat by dietary vitamin E, selenium, and methionine as measured by ethane evolution. *J Nutr*, 107: 656-665, 1977.
24. Hall RL, Wilke WL, Fettman MJ. The progression of adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats and the effect of captopril. *Toxicol Appl Pharmacol*, 82: 164-174, 1986.
25. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease : Where are we now? *J Lab Clin Med*, 199: 598-620, 1992.
26. Inchiosa MA, Smith CM. Effect of ibuprofen on doxorubicin toxicity. *Res Comm Chem Path Pharmacol*, 67: 63-78, 1990.
27. Kaneko JJ. Selenium, In: *Clinical biochemistry of domestic animals*. 4th ed, Academic Press, Inc : 772-776, 1989.
28. Kehrer JP. Free radical as mediators of tissue injury and disease, *Crit Rew Toxicol*, 23: 21-48, 1993.
30. Kim SH, Kim JH. Lethal effect of adriamycin on the division cycle of HeLa cells. *Cancer Res*, 32: 323-325, 1972.
31. Mimnaugh EG, Trush MA, Bhatnagar M, *et al.* Enhancement of reactive oxygen-dependent mitochondrial membrane lipid peroxidation by the anticancer drug adriamycin. *Biochem Pharmacol*, 34: 847-856, 1985.
32. Myers CE, McGuire WP, Liss RH, *et al.* Adriamycin : the role of lipid peroxidation in cardiac toxicity and tumor response. *Science*, 197: 165-167, 1977.
33. Okasora T, Takikawa T, Utsunomiya Y, *et al.* Suppressive effect of superoxide dismutase on adriamycin nephropathy. *Nephron*, 60: 199-203, 1992.
34. Olson HM, Capen CC. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin(adriamycin) in the rat : morphologic and biochemical investigations. *Toxicol Appl Pharmacol*, 44: 605-616, 1978.
35. Osweiler GD, Carson TL, Buck WB, *et al.* Selenium, in : *clinical and diagnostic veterinary toxicology*. 3rd ed,

- Kendall/Hunt Publishing Company Dubuque, Iowa : 132-142, 1985.
36. Powell SR, McCay PB. Inhibition of doxorubicin-initiated membrane damage by N-acetylcysteine : possible mediation by a thiol-dependent, cytosolic inhibitor of lipid peroxidation. *Toxicol Appl Pharmacol*, 96: 175-184, 1988.
 37. Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, *et al.* Evidence for the role of oxygen radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest*, 51: 396-403, 1984.
 38. Rotruck JK, Pope AL, Ganther HE, *et al.* Selenium : biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179: 588-590, 1973.
 39. Sanai T, Okuda S, Onoyama K, *et al.* Effect of different doses of aluminium hydroxide on renal deterioration and nutritional state in experimental chronic renal failure. *Min Electr Met*, 17: 160-165, 1991.
 40. Shinozawa S, Fukuda T, Araki Y, *et al.* Effect of dextran sulfate on the survival time and mitochondrial function of adriamycin(doxorubicin)-treated mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 79: 353-357, 1985.
 41. Shinozawa S, Gomita Y, Aradi Y. Tissue concentration of doxorubicin (adriamycin) in mouse pretreated with α -tocopherol or coenzyme Q₁₀. *Acta Med Okayama*, 43: 195-199, 1991.
 42. Slater TF. Free-radical mechanism in tissue injury. *Biochem J*, 222: 1-15, 1984.
 43. Solaini G, Landi L, Pasquali P, *et al.* Protective effect of endogenous coenzyme Q₁₀ on both lipid peroxidation and respiratory chain inactivation induced by an adriamycin-iron complex. *Biochem Biophys Res Comm*, 147: 572-580, 1987.
 44. Tan C, Etcubanas E, Wollner N, *et al.* Adriamycin an antitumor antibiotic in the treatment of neoplastic diseases. *Cancer*, 32: 9-17, 1973.
 45. Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol*, 99: 13-42, 1980.
 46. Vermeulen NPE, Baldew GS, Los G, *et al.* Reduction of cisplatin nephrotoxicity by sodium selenite. Lack of interaction at the pharmacokinetic level of both compounds. *Drug Metab Dispos*, 21: 30-36, 1993.
 47. Wang JJ, Cortes E, Sinks LF, *et al.* Therapeutic effect and toxicity of adriamycin in patients with neoplastic disease. *Cancer*, 28: 837-843, 1971.
 48. Washio M, Nanishi F, Okuda S, *et al.* Alpha-tocopherol improves focal glomerulosclerosis in rats with adriamycin-induced progressive renal failure. *Nephron*, 68: 347-352, 1994.
 49. Zamora R, Hidalgo FJ, Tappel AL. Comparative antioxidant effectiveness of dietary β -carotene, vitamin E, selenium and coenzyme Q₁₀ in rat erythrocytes and plasma. *J Nutr*, 121: 50-56, 1991.
 50. 남상윤, 이준섭. Selenium과 verapamil이 adriamycin에 의해서 유발되는 랫드 심장병변에 미치는 영향에 관한 병리조직학적 연구. 서울대학교 수의대는 문집, 18: 1-29, 1993.
 51. 홍사석, 이우주, 조규철 등. 이우주의 약리학 강의, 3판. 의학문화사, 서울 : 630-632, 1993.