

편측신절제 흰쥐에서 Cyclosporin A-유발 신독성에 대한 Verapamil의 효과

강주섭* · 고현철 · 이창호 · 신인철
한양대학교 의과대학 약리학교실

Effects of Verapamil on Cyclosporin A-induced Nephrotoxicity in Uninephrectomized Rat

Ju Seop KANG*, Hyun Chul KOH, Chang Ho LEE and In Chul SHIN

Department of Pharmacology, Hanyang University College of Medicine, Seoul 133-791, Korea

(Received February 20, 1998; accepted April 21, 1998)

Abstract – In this study, the effect of verapamil (VER) on cyclosporin A (CsA)-induced nephrotoxicity was investigated in uninephrectomized rats. Male Wistar rats were administered CsA (50 mg/kg/day, p.o.) or VER (0.5 mg/kg/day, i.p.) with CsA (50 mg/kg/day, p.o.) for 20 days. The urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) activity along with BUN, serum creatinine, creatinine clearance (CLcr), body weight, and 24 hr-urine output were measured and histopathologic changes of kidney were evaluated by light and electron microscopy. The results obtained from this study can be summarized as follows: While NAG activity, BUN and serum creatinine was progressively increased and CLcr significantly decreased in CsA group, VER almost significantly ($p < 0.05$) suppressed and normalized CsA-induced changes in VER+CsA group. While urine output increased until 12th days and thereafter progressively decreased in CsA group, it gradually increased in control and VER+CsA group. While body weight progressively made a gain in control and VER+CsA groups, it significantly ($p < 0.05$) lost in CsA group. On light microscopy, the glomerular hyperemia and proximal convoluted tubular (PCT) dilatation, focal tubular cell vacuolation and necrosis were clearly evident in CsA group, but, were not seen in other groups. Ultrastructural studies revealed thickened glomerular endothelium and basal lamina of capillary, irregular shaped pedicels of podocytes, indistinct slit pores and narrowed bowman's space. The large oval vacuoles with dense debris and phagosome were distributed in apical zone and deformed microvilli and mitochondria were seen in the PCT cell of CsA group. But, glomeruli and PCT cell were relatively preserved in normal appearance in other groups. In conclusion, it is suggested that verapamil has a protective effect on cyclosporine-induced nephrotoxicity in uninephrectomized rats.

Keywords □ cyclosporin, verapamil, uninephrectomized rat, CsA-nephrotoxicity

1970년대 초에 항생제 개발 중에 면역억제작용이 입증된 cyclosporine(CsA)은 세포성 면역을 강력하게 억제하는 작용을 지니므로(Borel 등, 1976과 1977; Cohen 등, 1984) 주로 이식장기의 생존기간을 연장시키기 위하여 사용되어 왔으며, 일부에서는 자가면역성 포도막염(Palestine 등, 1986), 류마치스양 관절염(Berg 등, 1986), 전신성홍반성 낭창(Isenberg 등, 1980) 등의 자가면역질환 치료나 골수이식후 이식편 대 숙주반응을 억제하기 위하여(Zwaan과 Hermans, 1982) 사용되기도 한다.

CsA는 azathioprine과 스테로이드보다 골조공증이나 골

수독성이 약하고 면역억제작용이 강하므로(Calnc 등, 1979) 신장, 심장, 간장, 췌장, 골수 등의 장기이식술에 역사적 전기를 마련하였다. 그러나, 이러한 유용성에도 불구하고 CsA의 혈중농도와 면역억제효과에는 개체차가 심하고 치료효과에 대한 객관적 기준이 없으므로 개인에 대한 적절한 투약계획을 세우는 것이 어려운 문제로 지적되어 왔다(Lemaire 등, 1986). 또한, CsA은 장기간 투여하면 신독성, 간독성, 위장장애, 고혈압, 경련 등의 유해작용을 유발(Koewn 등, 1982; Whiting과 Thomson, 1988; Cleveland 등, 1990)하는데, 이 중에서 가장 심각한 것은 신독성으로서 임상적용을 제한하는 주된 요인이 되고 있다.

CsA의 신독성기전에는 신혈관에 대한 직접작용(Holt 등,

* To whom correspondence should be addressed.

1986)과 교감신경계(Siegl 등, 1983)와 renin-angiotensin-aldosterone(RAAS)계(Perico 등, 1986b) 및 신장의 arachidonate 대사변동(Stahl과 Kudelka, 1986; Perico 등, 1986a와 1986b; Coffman 등, 1987; Elzinga 등, 1987)때문에 오는 신혈관 수축이 중요하게 작용하는 것으로 지적되고 있다. 이에, 본 연구에서는 흰쥐에서 신혈관 저항을 감소시켜 장기 이식 후에 나타날 수 있는 고혈압이나 심혈관 질환치료제로 관심의 대상이 되고 있는 칼슘통로 차단제(Wagner 등, 1986) 중에 verapamil을 CsA와 병합투여하여 CsA 단독투여시에 나타나는 신독성에 대한 verapamil의 영향을 병태생리학적으로 비교 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험동물은 체중 270 gm내외(250-296 gm)의 건강한 Wistar계 웅성 흰쥐 10마리씩을 한 군으로 하여 실험 1주일전에 우측배부를 절개하여 신장주위 지방조직과 부신을 남기고 우측신장을 제거하는 편측신절제를 시행하였고 물과 사료를 자유로이 공급하면서 1주일간 사육한 후 실험을 시행하였다.

실험군은 3주간 매일 1회씩 50 mg/kg의 cyclosporin A (CsA, p.o., Sandimmun[®], Sandoz Co)을 투여한 군과 0.5 mg/kg의 verapamil(VER, i.p., Sigma Co)을 병합투여한 군으로 하였으며, 동량의 생리식염수를 복강내로 투여한 것을 대조군으로 하여 각 군에서 관찰된 성적을 비교검토하였고, 결과(평균±표준편차)의 유의성 검정은 paired t-test로 하였다.

동물은 대사 cage에서 사육하였고 2일 간격으로 24시간 요를 채집하여 1일 요배설량과 요중 N-acetyl-β-D-glucosaminidase(NAG) 활성 및 creatinine 농도를 측정하였으며, 체중은 1주일간격으로 측정하였다. 실험최종일(3주후)에는 심장천자로 혈액을 채취한 후 BUN과 creatinine 농도 및 creatinine 제거율을 측정하였고 신장조직을 적출하여 조직학적 검색을 시행하였다. Creatinine과 BUN 농도는 자동화학 분석기(SBA-300, Gilford Co)로 측정하였고, 요 중 NAG 활성은 Horak 등(1981)의 방법으로 측정하였고, 그 활성은 효소활성에 대한 요농축도의 영향을 제거하기 위하여 요 중 creatinine 배설량에 대한 비로 환산하였다. 조직학적 검색은 적출한 신장조직을 10% 중성 formalin 용액에 24시간

동안 고정하고, 수세, 탈수한 후 paraffin으로 포매하고 6 μm의 연속절편을 만들어 hematoxylin과 eosin으로 이중염색하여 광학현미경으로 관찰하였고, 적출한 신조직 소편은 2% glutaraldehyde-2.5% paraformaldehyde phosphate 용액에 전고정하여 phosphate buffer로 수세, 1% osmic acid로 후고정, 탈수, Epon 812로 포매한 후 ultramicrotome(MT-2, Sorvall Porter-Blum, USA)으로 600Å의 두께로 세절하여 각 절편을 uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 전자현미경(Hitachi H-600)으로 관찰하였다.

실험결과

요중 NAG 활성(U/mg of urine creatinine)

대조군은 편측신절제로 3.7±1.5가 5.0±0.3로 35% 상승되었으나, CsA군은 투여전 3.7±1.4였던 것이 14일에는 18.9±6.0으로 최고치에 도달한 후 서서히 감소하였고, VER+CsA군은 투약 후 평균치가 6.4±0.8로 대조군보다 28%가 상승되었으나 CsA군치의 48%로 유의하게(p<0.05) 억제되었다(Table I).

BUN 농도(mg/dl)와 혈청 creatinine 농도(mg/dl)

대조군은 15.6±2.4에서 16.6±2.6, 0.41±0.07에서 0.45±0.11로 각각 8.2%와 9.8%가 증가하였으나 CsA군은 18.3±2.8에서 54.1±22.5와 0.37±0.09에서 0.85±0.13으로 각각 3배와 2.3배로 현저히(p<0.05) 증가되었고 VER+CsA군에서는 각각 1.4배로 증가하였으나 CsA군치의 40.1%로 유의하게(p<0.05) 억제되었다(Table II).

Creatinine 제거율(ml/min)

대조군에서는 미약하게 상승하였으나, CsA군은 0.40±0.06에서 0.30±0.06으로 75%로 유의하게(p<0.05) 감소하였고, VER+CsA군은 0.39±0.04에서 0.92±0.08로 236%로 유의하게(p<0.05) 증가하였다(Table II).

요배설량(ml/24 hr)

대조군은 20일간 평균 배설량이 10.9±0.64로 비교적 일정하게 유지하였고, CsA군은 12일까지는 대조군과 큰 차이가 없었으나 14일이후는 유의하게(p<0.05) 감소되어 20일간 평균 배설량이 8.6±1.76으로 대조군보다 25.5%가 감소되었다. 그러나, VER+CsA군에서는 평균 배설량이 10.9

Table I. The effects of CsA administration and verapamil+CsA coadministration on urinary NAG activity (U/mg of urine creatinine) in uninephrectomized rat

| Group | Date | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 20 |
|---------|------|---------|---------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Control | | 3.7±1.5 | 4.7±1.2 | 5.1±1.5 | 4.9±0.8 | 5.3±1.5 | 4.6±1.2 | 5.1±1.3 | 4.9±1.3 | 5.3±0.7 | 5.1±1.3 |
| CsA | | 3.7±1.4 | 5.4±2.1 | 7.5±3.6 [†] | 10.2±4.3 [†] | 13.2±3.8 [†] | 13.6±3.9 [†] | 15.9±8.5 [†] | 18.9±6.0 [†] | 14.2±9.5 [†] | 13.1±8.6 [†] |
| VER+CsA | | 3.8±1.3 | 5.7±1.2 | 6.2±2.3 | 5.9±2.9 [†] | 6.7±3.7 [†] | 5.6±2.1 [†] | 7.4±1.8 [†] | 6.2±2.5 [†] | 6.3±3.2 [†] | 7.9±2.3 [†] |

Control: saline only; CsA: 50 mg of CsA/kg p.o. once a day for 20 days; VER+CsA: 0.5 mg of verapamil/kg i.p.+50 mg of CsA/kg p.o. once a day for 20 days. The results are mean±SD(n=10). [†]p<0.05 vs Control, [‡]p<0.05 vs CsA.

Table II. The effects of CsA administration and verapamil+CsA coadministration on serum biochemical data after 3 weeks in uninephrectomized rat

| Group | Date | BUN (mg/dl) | | Creatinine (mg/dl) | | Cl.cr (ml/min) | |
|---------|------|-------------|------------------------|--------------------|-------------------------|----------------|-------------------------|
| | | 0 | 21 | 0 | 21 | 0 | 21 |
| Control | | 15.7±2.4 | 16.6±2.6 | 0.41±0.07 | 0.45±0.11 | 0.38±0.05 | 0.41±0.06 |
| CsA | | 18.3±2.8 | 54.1±22.5 [†] | 0.37±0.09 | 0.85±0.13 [†] | 0.40±0.06 | 0.30±0.06 [†] |
| VER+CsA | | 16.6±2.8 | 23.2±2.3 ^{†*} | 0.39±0.07 | 0.53±0.13 ^{†*} | 0.39±0.04 | 0.92±0.08 ^{†*} |

Control: saline only; CsA: 50 mg of CsA/kg p.o. once a day for 20 days; VER+CsA: 0.5 mg of verapamil/kg i.p.+50 mg of CsA/kg p.o. once a day for 20 days. The results are mean±SD(n=10). [†]p<0.05 vs Control, *p<0.05 vs CsA.

Table III. The Effects of CsA administration and verapamil+CsA coadministration on urine outflow(ml/24 hr) in uninephrectomized rat

| Group | Date | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 20 |
|---------|------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Control | | 8.3±1.2 | 9.6±1.1 | 10.9±0.9 | 10.9±1.3 | 11.5±1.4 | 10.7±2.0 | 11.3±1.3 | 11.6±1.4 | 11.4±1.4 | 10.4±3.5 |
| CsA | | 8.8±2.4 | 8.0±1.2 | 7.6±1.7 | 8.3±2.0 | 11.1±2.9 | 11.2±3.5 | 10.4±3.0 | 6.8±1.0 [†] | 7.1±1.4 [†] | 7.3±1.5 [†] |
| VER+CsA | | 8.4±1.0 | 8.5±1.9 | 9.6±2.8 | 9.8±2.6 | 11.3±2.0 | 12.0±1.9 | 11.9±2.2 | 11.6±1.9 [†] | 11.4±2.0 [†] | 11.7±2.0 [†] |

Control: saline only.; CsA: 50 mg of CsA/kg p.o. once a day for 20 days.; VER+CsA: 0.5 mg of verapamil/kg i.p.+50 mg of CsA/kg p.o. once a day for 20 days. The results are mean±SD(n=10). [†]p<0.05 vs Control, *p<0.05 vs CsA.

Table IV. The effects of CsA administration and verapamil + CsA coadministration on body weight(gm) in uninephrectomized rat

| Group | Date | 0 | 7 | 14 | 21 |
|---------|------|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control | | 254.0±8.6 | 267.5±7.7 [†] | 279.1±8.3 [†] | 290.0±7.6 [†] |
| | | 0 | 13.5±3.4 | 25.1±3.1 | 36.0±7.0 |
| CsA | | 262.5±13.1 | 248.8±13.0 ^{†*} | 234.9±18.5 ^{†*} | 231.7±22.4 ^{†*} |
| | | 0 | -13.9±9.5 | -27.6±21.7 | -24.9±13.8 |
| VER+CsA | | 254.8±8.8 | 260.7±10.85 [*] | 270.8±14.3 ^{†*} | 278.4±12.9 ^{†*} |
| | | 0 | 5.9±4.8 | 16.0±7.8 | 23.6±5.6 |

Control : saline only.; CsA : 50 mg of CsA/kg p.o. once a day for 20 days.; VER+CsA : 0.5 mg of verapamil/kg i.p. + 50 mg of CsA/kg p.o. once a day for 20 days. The results are mean±SD(n=10). [†]p<0.05 vs Date 0, *p<0.05 vs Control, *p<0.05 vs CsA.

±1.3으로 대조군과 비슷하였으며 14일이후에는 CsA군에서 관찰된 요량감소를 완전히 해소하였다(Table III).

체중(gm)

대조군에서는 3주일후 290.0±7.6으로 14.2%가 증가하였으나, CsA군에서는 231.7±22.4로 11.7%가 감소하였다. VER+CsA군에서는 278.4±12.9로 9.3%의 증가하여 CsA에 의한 체중감소는 억제되었으나, 대조군의 65.5%로서 CsA의 영향을 완전히 억제하지는 못하였다(Table IV).

신조직의 조직학적 소견

신조직의 hematoxylin 및 eosin 이중염색 소견

대조군의 신조직에서는 총혈, 사구체의 변성, 세뇨관 상피세포의 증창, 공포 형성, 괴사 및 염증세포 침윤 등의 병변은 관찰되지 않았으나, CsA투여군에서는 사구체의 총혈과 근위곡세뇨관의 확장 및 상피세포의 공포형성, 탈락, 괴사 등의 병변이 관찰되었다. 그러나 VER+CsA투여군의 신조직에서는 거의 대조군과 유사한 소견을 보여주었다(Fig. 1).

신조직의 전자현미경적 소견

대조군의 사구체는 모세혈관 내피세포(END)의 유창구조가 선명하였고, 기저막(BM)은 일정한 두께와 균일한 전자

밀도를 지닌 구조로 구성되어 있었고 기저막 외측에는 족세포(Po)의 세포족(Pe)이 일정한 간격으로 배열되어 세극막(slit membrane)을 이루고 있었다(Fig. 2). 근위 곡요세관 상피세포는 세포첨부에 일정한 크기의 수많은 미세융모(Mv)와 미세융모밑의 세포질에는 다수의 사립체(M)가 있으며, 세포중앙에는 원형의 핵(N)이 자리잡고 있었고, 이웃하는 상피세포와의 세포연접(Jc)이 보였으며, 핵주위에는 소수의 Golgi체(Go)와 조면내형질 세망(RER)이 분포되어 있었다(Fig. 3). CsA군의 사구체는 모세혈관 내피세포와 기저막이 두꺼워지고, 족세포의 세포족이 불규칙하게 융합되고 불분명한 세공과 Bowman 씨강(BS)이 좁아져 보였고(Fig. 4), 근위 곡요세관 상피세포는 핵은 둥근 형태로 존재하지만, 세포첨부에는 전자밀도가 큰 물질을 함유하는 대형 난원형의 소포체(V2)와 수많은 자가 용해소체(L)가 분포되어 있었으며, 미세융모와 사립체의 모양도 불규칙하게 변형되어 있었다(Fig. 5). VER+CsA군의 사구체는 모세혈관과 유창구조는 약간 두꺼워 보였지만, Bowman 씨강과 족세포의 세포족은 정상으로 보였으며(Fig. 6), 근위 곡요세관 상피세포에서는 미세융모, 사립체, 핵은 정상으로 보였고, 핵 주위

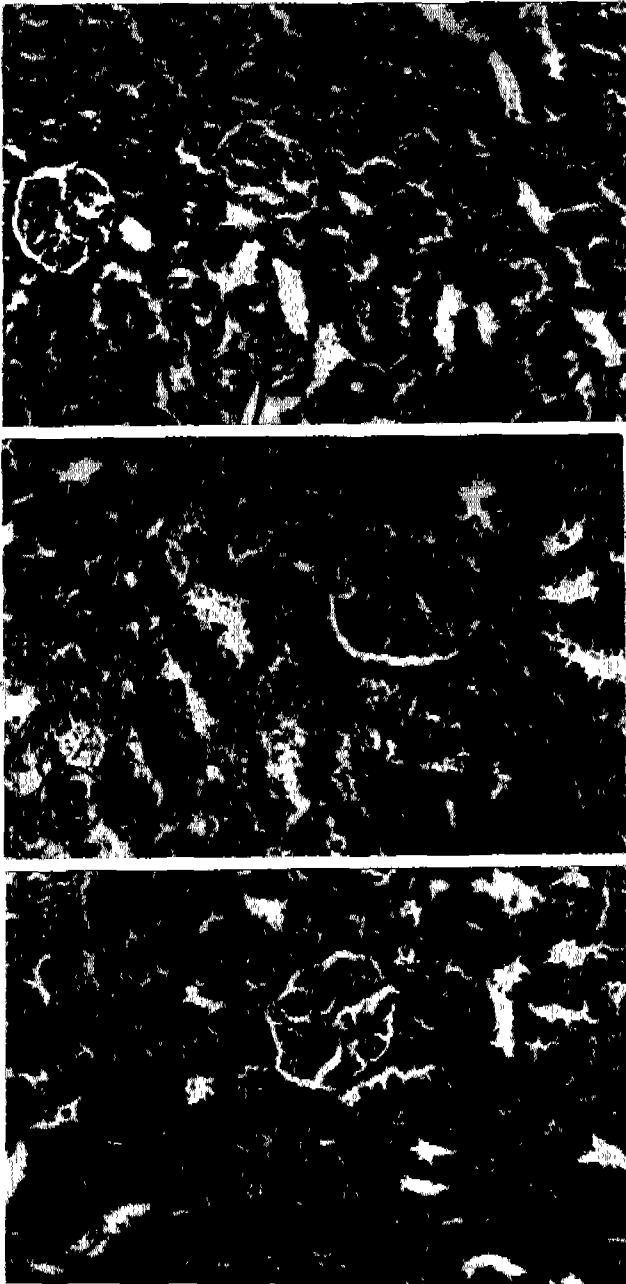


Fig. 1. Light microscopic appearances of rat kidney. No pathologic changes are observed in control rat (A) and VER+CsA cotreated rat (C). Glomerular hyperemia, focal proximal tubular dilatation, epithelial vacuolation, desquamation and necrosis are observed in CsA treated rat (B). Hematoxylin and eosin stain. $\times 200$.

에는 다양한 크기의 포식소체(Ph)가 관찰되었다(Fig. 7).

고 찰

CsA는 1970년 항생제 개발 중에 노르웨이와 미국 일부



Fig. 2. Electron micrograph of glomerulus of control rat kidney. Glomerular capillary (Ca) and their endothelium (END) seems to be intact. Basement membrane (BM) of glomerular filtration membrane is seen electrolucently. The podocytes (Po) and their pedicles (Pe) are well developed. The Bowman's spaces are regular in shape. The red blood cell (RBC) is within capillary lumen. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 27000$.

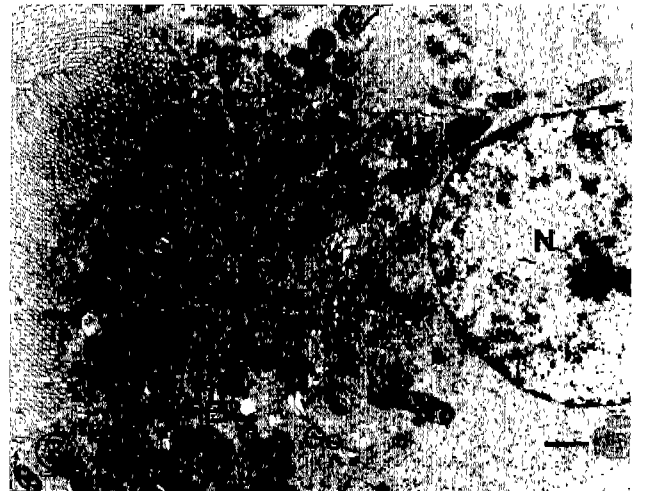


Fig. 3. Electron micrograph of epithelial cell of proximal convoluted tubule (PCT) of control rat kidney. There are abundant microvilli (Mv) at apical surface. The nucleus (N) is located more toward base than apex; numerous mitochondria (M), Golgi complex (Go), and rough endoplasmic reticulum (RER) are distributed in apical zone of cytoplasm. The epithelial cell is attached to adjacent PCT cell by junctional complex (Jc). Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 10000$.

지방의 토양 진균류인 *Cylindrocarpon lucidum* Brooth와 *Tolyposcladium inflatum* Gams의 추출물에서 분리된 분자량 1202.6 dalton의 11개 아미노산으로 구성된 환상구조로 지질 친화성을 지닌 oligopeptide이다(Dreyfuss 등, 1976). CsA



Fig. 4. Electron micrograph of glomerulus of CsA-treated rat kidney. The glomerular endothelial cell (END) and basement membrane (BM) are thickened. The irregular shaped pedicles (Pe) of podocytes (Po), indistinct fenestrations and narrowed Bowman's space are seen. Fenestration pores of capillary endothelium are not seen. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 18000$.

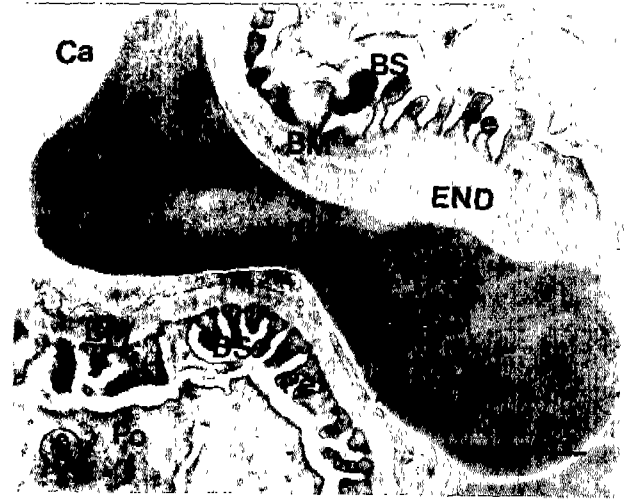


Fig. 6. Electron micrograph of glomerulus of VER+CsA-cotreated rat kidney. Glomerular endothelial cell (END) and basement membrane (BM) are slightly thickened and fenestration pores of capillary endothelium are seen. The pedicles (Pe) of podocyte (Po) are intact and Bowman's spaces (BS) is within capillary lumen. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 27000$.



Fig. 5. Electron micrograph of epithelial cell of proximal convoluted tubule (PCT) of CsA-treated rat kidney. The large oval vacuoles (V2) with dense debris and phagosomes (Ph) are distributed in apical zone of PCT cell. The microvilli (Mv) and mitochondria (M) are irregular shaped. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 8000$.



Fig. 7. Electron micrograph of epithelial cell of proximal convoluted tubule (PCT) of VER+CsA-cotreated rat kidney. There are abundant normal microvilli (Mv) at the apical surface. The round nucleus and cytoplasmic organelles, mitochondria (M), pinocytotic vesicles (Pv), autophagocytic vesicles (APV) and basement membrane (BM) are intact. Uranyl acetate and lead citrate stain. $\times 10000$.

가 결합하는 세포내수용체는 calmodulin과 cyclophilin이며 (Hess와 Colombani, 1986), 세포에서 이동경로는 칼슘통로와 공간적으로 밀접하게 연관되어 있고 칼슘의 세포내 유입에 영향을 주므로 CsA에 의한 칼슘-의존성 세포대사의 변화가 CsA의 신독성과 밀접하게 관련된다고 하였다 (Nagineni 등, 1987). CsA 유해작용은 대부분 일과성이고

가역적이지만 장기이식시의 장기간 CsA를 투여할 때 고려할 것은 신독성이며 (Cohen 등, 1984), 사람은 동물보다 민감하므로 치료량에서도 신독성이 나타나는 수가 있다고 하였다 (Blair 등, 1982; Castro 등, 1983). 그러나, 비가역적인 CsA 신부전은 드물고 수주내에 나타나는 가역적인 신독성

에서 BUN과 혈청 creatinine 농도는 투약을 중지하면 감소되지만 CsA의 혈중 농도나 투여량과 비례하지 않을 수도 있다고 한다(Cohen 등, 1984).

CsA에 의한 신장의 형태학적 변화는 사구체, 세뇨관, 간질, 혈관 등에 나타날 수 있으며, 조직학적 병변이 없는 기능적 이상으로부터 신장이식 후 지속적인 빈뇨 및 무뇨증 환자에서 발견되는 미만성 간질 섬유화, 투여량에 비례하여 급성으로 나타나는 근위극세뇨관에 대한 독성, 장기투여시에는 세뇨관이 위축되는 간질성 섬유화와 모세혈관 울혈과 사구체 혈전 등으로 다양하게 나타날 수 있다고 한다(Mihatsch 등, 1986와 1988). 신결제나 신장신경 제거 또는 신장이식을 받은 동물에 25 mg/kg의 CsA을 2-4주 동안 매일 투여하면 GFR의 감소 및 신세뇨관성 효소노증, 근위극세뇨관 세포의 공포형성, 괴사, 기저부의 지질공포 형성, 상피세포의 활면내형질 세포의 소포형성 및 확장, 용해소체 증가 등의 조직학적 병변이 관찰되었고 이런 급성병변은 가역적이고 투여용량에 비례하므로(Thomson 등, 1984; Bertani 등, 1987), 투여량을 줄이거나 투여를 중지하면 더 이상 진전되지 않으며(Thomson 등, 1981과 1984; Vanrenterghem 등, 1987), 이것들은 사구체와 세뇨관기능의 저하와도 관련이 된다고 하였다(Battle 등, 1986; Gnutzmann 등, 1986). CsA는 일차적으로 사구체의 구심성 소동맥을 수축시켜 사구체 혈류를 감소시키므로(Cunningham 등, 1983), renin-angiotensin-aldosterone system(RAAS)을 자극시키거나(Siegl과 Ryffel, 1982; Perico 등, 1986a), PGE₂ 합성이 감소되며(Stahl과 Kudelka, 1986), thromboxane(TX) 합성을 증가시키는 것은(Perico 등, 1986a과 1986b; Coffman 등, 1987; Elzinga 등, 1987) 교감신경계가 자극받기 때문인 것 같다고 한다(Siegl 등, 1983). 따라서, 신장조직에서 TXA₂의 합성이 증가되고 PGI₂의 합성이 감소하면 PGI₂/TXA₂ 비율이 감소하므로 신혈류가 변화하게 된다(Perico 등, 1986a). 그러므로, PGI₂나 16,16-dimethyl PGE₂ 및 CL135, 574를 투여하면 저하된 신기능을 호전시킬 수 있으며(Bennett 등, 1988), 소화성 궤양 치료제인 misoprotol(PGE₁ 동속체)은 CsA의 면역억제작용과 관계없이 CsA 급성신독성을 억제할 수 있었고(Paller, 1988), 항혈소판 제제인 p-aminobenzoic acid-N-D-mannoside(K-MAP)도 CsA 신독성을 방지할 수 있었다고 하였다(Teraoka 등, 1988). Eicosanoid 합성 억제물질인 eicosapentanoic acid(EPA)가 풍부한 어유제제는 신피질의 TXB₂ 함량을 감소시켜 CsA에 의한 신기능 저하와 조직손상을 방지할 수 있었고(Elzinga 등, 1987), dopamine도 CsA에 의한 신장의 혈류 역학적 변화를 방지할 수 있었다고 하였다(Conte 등, 1988).

CsA는 체액과 전해질 항상성 유지에 필요한 atrial natriuretic peptide(ANF)의 분비를 억제하므로 CsA의 투여를 중지하면, ANF가 정상적으로 분비되어 TXB₂의 배설과

GFR이 점차 회복된다고 한다(Oaks 등, 1988). 선택성 TXA₂ 수용체 길항제인 UK-38,485(Perico 등, 1986a; Ahonen 등, 1990)와 KT2-962(Kim 등, 1992) 및 TXA₂ 합성효소 억제제인 dazmegrel은 CsA에 의한 TXA₂의 합성과 요중 NAG 활성을 억제하고, 신세뇨관 상피세포에 나타나는 여러가지 조직학적 병변들이 방지되었다고 하였다(Gladue와 Newborg, 1991). 환위에 단기간 CsA를 투여하면 GFR이 감소하고 RAAS의 활성이 증가되며 신장에서 arachidonate 대사에 변화가 오기 때문에 혈청 renin 활성 및 사구체의 TXA₂ 합성과 TXB₂의 요배설이 증가하고 근위세뇨관에서의 흡수율이 증가하며 신혈관 저항이 증가하고 GFR의 감소하므로 혈청 creatinine과 BUN의 증가, 요소 제거율의 감소가 나타난다 한다(Whiting 등, 1982).

본 실험에서도 편측 신결제 환위에 25 mg/kg의 CsA를 3주간 복강내로 투여한 결과 심한 체중감소와 요량의 감소 및 혈청 creatinine과 BUN 농도의 상승, creatinine 제거율 감소 등의 기능적 신부전과 신세뇨관 상피세포의 손상지표인 요중 NAG 활성이 증가하였다. 또한, hematoxylin 및 eosin 이중염색 조건에서는 사구체의 충혈과 근위극세뇨관 내강의 확장 및 상피세포의 공포형성, 괴사, 탈락 등이 보였고, 전자현미경 조건에서는 사구체 모세혈관 기저막의 비후, Bowman 씨 강의 축소, 족세포 세포족의 유합과 유창공의 소실 등과 신세뇨관 상피세포의 핵과 미세용모 및 사립체의 변형, 세포질내의 자식공포 수의 증가와 전자밀도가 높은 세포잔재를 함유하는 대형 난원형 소포체 등이 관찰되었다. 이들 병변 중에서 요중 NAG 활성이 증가된 것과 신세뇨관 상피세포에 나타나는 세포내 자식공포와 전자밀도가 높은 대형 난원형 소포체등의 조직학적 병변과 사구체에서 관찰된 병변들은 일차적으로 CsA가 칼슘과 함께 세포내로 이동하여 축적되고 이차적으로는 혈관수축과 같은 혈류 역학적 변화가 복합적으로 작용하여 신장세포가 손상된 것이며 CsA가 신혈관을 수축시켜서 신혈류가 감소되고 RAAS의 활성이 변하고 신장세포에서 arachidonate 대사의 변동등이 복합적으로 작용하여 기능적인 이상이 발생된 것으로 사료되었다.

CsA는 주로 간장의 cytochrome P450(CYP) 효소계에서 대사되므로(Beveridge, 1982; Wood 등, 1983), phenobarbital, Aroclor 1254(Cunningham 등, 1983과 1984), isoniazid, rifampin(Langhoff와 Madsen, 1983), phenytoin(Keown 등, 1982과 1983)과 같은 CYP 효소계를 활성화시키는 약물을 미리 투여하거나 CsA와 병합투여하면 CsA의 대사가 촉진되어 신독성은 감소되는데 면역억제효과에는 영향이 없다고 하였다. 반면에 CYP 효소계를 억제하는 erythromycin(Ptachcinski 등, 1985), androgen(Miller와 Ekelund, 1985), ketoconazole(Ferguson 등, 1982), cimetidine(Wood 등, 1983) 등은 CsA 대사를 억제하므로 CsA 농도가 상승되어 독성이

증가될 수 있다고 한다(Cunningham 등, 1984). 칼슘통로 차단제도 CYP 효소계에서 대사되므로 병합투여하면 CsA의 대사를 방해하여(Pochet과 Pirson, 1986) CsA 혈중농도가 상승되어 면역억제작용과 독성을 증가시킬 가능성이 있다고 보고되었으나(Tesi 등, 1987), Rooth 등(1988)은 verapamil은 CsA에 의한 신장의 혈액순환 장애를 부분적으로 방지할 수 있다고 하였다(Rooth 등, 1988).

한편, 신장세포에서 칼슘통로 차단제는 혈관수축시에 동원되는 칼슘이동을 차단하여 혈관저항을 감소시킬 수 있지만, 신혈류와 GFR에 대한 영향은 칼슘통로 차단제의 종류에 따라 다르다. 그러나, angiotensin II 투여, 내인성 혈관수축 물질의 증가, 마취, 외과적 손상과 같이 신혈관의 기초긴장도가 증가된 상태에서 칼슘통로 차단제의 혈관이완작용이 강화되는데, 이것은 신혈관의 긴장도에 대한 신경과 호르몬에 대한 작용때문이라 할 수 있다. 칼슘통로 차단제는 다른 혈관이완제와는 달리 주로 구심성 소동맥의 저항을 감소시키고, 간접적으로 신장의 TX 합성과 신세뇨관의 Na 이온의 재흡수를 억제하며, TGF에 대한 영향으로 GFR를 증가시키고(Loutzenhiser와 Epstein, 1985), 외피질부에서 방수질대로 신장내 혈류이동을 유도한다고 한다(Abe 등, 1983). 또한, 개에서 verapamil은 신혈관을 이완시켜 renin 분비를 억제하고(Roy 등, 1983), nifedipine은 고혈압환자에서 혈청 aldosterone 량을 감소시켰다고 하였다(Resnick 등, 1982). 허혈상태에서는 신장의 혈관평활근세포내로 칼슘이 유입되므로 칼슘통로 차단제는 혈관근육세포내로 칼슘이동을 억제하여 혈관을 이완시키고 혈류를 촉진시키므로 허혈상태가 호전될 수 있다고 하였다(Braunwald, 1982).

급성 허혈성 또는 신독성 물질에 의한 신손상은 신세뇨관 세포손상에서 시작되며, 세포막이 손상되고 괴사되는 것은 칼슘이동이 밀접하게 관여하므로 손상되거나 괴사된 세포내에는 칼슘이 고농도로 축적하게 된다. 칼슘 매개 손상의 표적부위는 원형질막, 사립체막, 활면소포체막, 세포골격구조들이며, 이때 칼슘은 phospholipase 자극, 막투과력의 변화, 세포골격의 구조와 기능을 변화시켜 세포내 칼슘의 재분포와 유입으로 인하여 세포내에 축적되므로 세포가 손상받게 된다(Humes, 1986). 사립체는 세포내 칼슘의 중요한 완충장소이고 손상초기에는 사립체의 칼슘흡수가 매우 활발해지며 심하게 손상되어도 칼슘흡수는 지속되므로(Greenawalt 등, 1964), 세포내 칼슘분포와 이동에 영향을 주는 약물들은 세포손상을 억제할 수 있을 것이라고 한다(Humes, 1986). CsA의 신세뇨관 세포독성의 원인에 CsA의 상피세포내 축적도 관여되는데, 그 기전은 세포막에 존재하는 칼슘통로와 CsA가 이동하는 장소가 구조적으로 밀접하므로 이들 구조의 긴밀한 상호작용이 CsA의 신독성 유발에 관여될 가능성이 있고, 칼슘통로 차단제는 근위극세뇨관 상피세포에서 칼슘과 CsA의 이동을 억제하여 CsA가

세포내에 축적되는 것을 억제할 수 있다고 한다(Nagineni 등, 1987). 본 실험에서도 편측신절제 흰쥐에 50 mg/kg의 CsA(p.o.)과 0.5 mg/kg의 VER(i.p.)을 병합투여한 결과, CsA에 의한 체중감소, 요량의 변동, 요중 NAG 활성도의 증가, BUN과 혈중 creatinine 농도의 상승, creatinine 제거율 감소 등의 신기능저하와 사구체와 세뇨관 상피세포에 야기된 조직학적 병변이 상당히 억제되었다. 이상의 결과는 CsA에 의한 신혈관 수축작용 때문에 신혈류가 감소되고 RAAS의 활성이 변하고 신장세포에서 arachidonate 대사의 변동등이 복합적으로 작용하여 발생하는 기능적인 이상에 대한 VER의 길항작용이라고 볼 수 있었으며, 칼슘과 함께 CsA가 세포내로 이동하여 축적되어 발생하는 세포내 칼슘이동과 밀접하게 관련된다는 CsA 신독성 기전에 대하여 VER이 길항적으로 작용한 것이라고 할 수 있었다. 따라서, 편측신절제 흰쥐에서 관찰된 CsA의 신장기능 독성과 조직학적 병변에 대하여 VER은 방어적인 효과가 있는 것으로 판단되었으며, CsA와 VER의 병합요법은 간세포의 CYP 효소계에 대한 상호작용으로 VER에 의하여 CsA의 대사가 억제되므로 CsA의 투여용량을 줄일 수 있고 CsA에 의한 신독성도 억제할 수 있는 잇점이 있다고 사료되었다.

참고문헌

- Abe, Y., Komori, T. and Miura, K.(1983). Effects of the calcium antagonist nifedipine on renal function and renin release in dogs. *J. Cardiovas. Pharmacol.* **5**, 254-259.
- Ahonen, J., Isoniemi, H. and Eklund, B. (1990). Thromboxane receptor antagonist in renal transplantation. *Transplantation Proc.* **22**, 1370-1379.
- Battle, D. C., Gutterman, C., Tarka, J. and Prasad, R. (1986). Effect of short-term cyclosporine A administration on urinary acidification. *Clin. Nephrol.* **25**, S62-S69.
- Bennett, W. M., Elzinga, L. and Kelley, V. (1988). Pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: Role of eicosanoids, prostaglandin profile. *Transplantation Proc.* **20**, 628-633.
- Berg, K. J., Forre, O., Bjerkhoel, F., Amundsen, E., Djoeseland, O., Rugstad, H. E. and Westre, B. (1986). Side effects of cyclosporin A treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Kidney Int.* **29**, 1180-1187.
- Bertani, T., Perico, N., Abbate, M., Battaglia, C. and Remuzzi, G. (1987). Renal injury induced by long-term administration of cyclosporin A to rats. *Am. J. Pathol.* **127**, 569-579.
- Beveridge, T. (1982). Pharmacokinetics and metabolism of cyclosporin A, in White DJG (ed): cyclosporin A: Proceedings of an international conference on cyclosporin A, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 35-44.
- Blair, J. T., Thompson, A. W., Whiting, P. H., Davidson, R. J. L. and Simpson, J. G. (1982). Toxicity of the immune suppressant cyclosporin A in the rat. *J. Pathol.* **138**, 163-178.
- Borel, J. F., Feuer, C., Gubler, H. U. and Staehelin, H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic

- agent. *Agents Actions* **6**, 468-475.
- Borel, J. F., Feuer, C., Magnee, C. and Staehelin, H. (1977). Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* **32**, 1017-1025.
- Braunwald, E. (1982). Mechanism of action of calcium channel-blocking agents. *N. Engl. J. Med.* **307**: 1618-1627.
- Calne, R. Y., Thiru, S. and McMaster, P. (1979). Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet*, 1033-1036.
- Castro, L. A., Hillerbrand, G., Land, W., Schneider, B., Gunther, K. and Gurland, H. J. (1983). Cyclosporine in patients with oligoanuria after cadaveric kidney transplantation. *Transplantation Proc.* **15**, 2699-2701.
- Cleveland, C. B., Francke, D. E. and Heller, W. M. (1990). AHSF Drug Informations 90, American Society of Hospital Pharmacist, Montgomery USA, pp. 2163-2169.
- Coffman, T., Carr, D. R. and Yarger, W. E. (1987). Evidence that renal prostaglandin and thromboxane production is stimulated in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* **43**, 282-285.
- Cohen, D. J., Loertscher, R. and Rubin, M. F. (1984). Cyclosporine; A new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Ann. Int. Med.* **101**, 667-682.
- Conte, G., Sabbatini, M., Napodano, P., Nicola, L., Gigliotti, G., Fuiano, G., Testa, A., Russo, D., Esposito, C., Libetta, C., Dal Canton, A. and Andreucci, V. E. (1988). Dopamine counteracts the acute renal effects of cyclosporine in normal subjects. *Transplantation Proc.* **20**, 563-567.
- Cunningham, C., Whiting, P. H., Burke, M. D., Wheatley, D. N. and Simpson, J. G. (1983). Increasing the hepatic metabolism of cyclosporine abolishes nephrotoxicity. *Transplantation Proc.* **15**, 925-932.
- Cunningham, C., Gavin, M. P., Whiting, P. H., Burke, M. D., Macintyre, F., Thomson, A. W. and Simpson, J. G. (1984). Serum cyclosporine levels, Hepatic drug metabolism and renal tubulotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 2857-2861.
- Dreyfuss, M., Harri, E., Hoffmann, H. and Kobel, H. (1976). Cyclosporin A and C, new metabolites from *Trichoderma polysporum*. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **3**, 125-133.
- Elzinga, L., Kelley, V. E., Houghton, D. C. and Bennett, W. M. (1987). Modification of experimental nephrotoxicity with fish oil as the vehicle for cyclosporine. *Transplantation* **43**, 271-276.
- Ferguson, R. M., Sutherland, D. E. R., Simmons, R. L. and Najarian, J. S. (1982). Ketoconazole, cyclosporine metabolism and renal Transplantation [letter]. *Lancet*, 882-883.
- Gerkens, J. F. and Brank, R. A. (1980). The influence of sodium status and furosemide on canine acute amphotericin B nephrotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**, 306-311.
- Gladue, R. P. and Newborg, M. F. (1991). The protective effects of the thromboxane synthetase inhibitor, dazmegrel on nephrotoxicity in cyclosporine-treated rats. *Transplantation* **52**, 837-841.
- Gnutzmann, K. H., Hering, K. and Gutsche, M. B. (1986). Effect of cyclosporine on diluting capacity of the kidney. *Clin. Nephrol.* **25**: S51-S56.
- Greenawalt, J., Rossi, C. and Lehninger, A. (1964). Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* **23**, 21-38.
- Hess, A. D. and Colombani, P. M. (1986). Mechanism of action; In *Vitro* studies, *Prog. Allergy* **38**, 198-221.
- Hiedemann, H. T., Gerkens, J. F. and Spickard, W. A. (1983). Amphotericin B nephrotoxicity in human decreased by salt repletion. *Am. J. Med.* **75**, 476-479.
- Holt, D. W., Marsden, J. T., Johnston, A. Bewick, M. and Taube, D. H. (1986). Blood cyclosporin concentrations and renal allograft dysfunction. *Br. Med. J.* **293**, 1057-1059.
- Horak, E., Hopfer, S. M. and Sunderman, F. W. (1981). Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity. *Clin. Chem.* **27**, 1180-1185.
- Humes, H. D. (1986). Role of calcium in pathogenesis of acute renal failure. *Am. J. Physiol.* **250**, F579-F589.
- Isenberg, D. A., Snaith, M. L. and AL-Khader, A. A. (1980). Cyclosporin relieves arthralgia, causes angioedema. *N. Eng. J. Med.* **303**, 754.
- Keown, P. A., Stiller, C. R. and Laupacis, A. L. (1982). The effects and side effects of cyclosporine: Relationship to drug pharmacokinetics. *Transplantation Proc.* **14**, 659-661.
- Keown, P. A., Stiller, C. R. and Sinclair, N. R. (1983). The clinical relevance of cyclosporine blood levels as measured by radioimmunoassay. *Transplantation Proc.* **15**, 2438-2441.
- Kim, K. S., Kang, J. S. and Suh, T. K. (1992). Effects of selective thromboxane A₂ receptor antagonist, KT2-962 on cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *J. Hanyang Med. Coll.* **12**, 541-566.
- Langhoff, E. and Madsen, S. (1983). Rapid metabolism of cyclosporine and prednisone in kidney transplant patient receiving tuberculostatic treatment. *Lancet*, 1031.
- Lemaire, M., Maurer, G. and Wood, A. J. (1986). Pharmacokinetic and metabolism. *Prog. Allergy* **38**, 93-107.
- Loutzenhiser, R., Horton, C. and Epstein, M. (1985). Effects of diltiazem and manganese renal hemodynamics; Studies in the isolated perfused rat kidney. *Nephron* **39**, 382-385.
- Mauer, G. (1985). Metabolism of cyclosporine, *Transplantation Proc.* **17**, 19-26.
- Mihatsch, M. J., Thiel, G., Spichtin, H. P., Oberholzer, M., Brunner, F. P., Harder, F., Olivieri, V., Bremer, R., Stocklin, E., Torhorst, J., Gudat, F., Zollinger, H. U. and Loertscher, R. (1983). Morphological findings in kidney transplants after treatment with cyclosporine. *Transplantation Proc.* **15**, 2804-2835.
- Mihatsch, M. J., Ryffel, B., Hermle, M., Brunner, F. P. and Thiel, G. (1986). Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. *Clin. Nephrol.(suppl 1)*, 52-58.
- Mihatsch, M. J., Thiel, G. and Ryffel, B. (1988). Histopathology of cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation Proc.* **20**, 759-771.
- Miller, B. B. and Ekelund, B. (1985). Toxicity of cyclosporine during treatment with androgens. *N. Engl. J. Med.* **313**, 1416.
- Nagineni, C. N., Misra, B. C. and Lee, D. B. N. (1987). Cyclosporin A-calcium channels interaction; a possible mechanism for nephrotoxicity. *Transplantation Proc.* **19**, 1358-1364.

- Neild, G. H., Reuben, R. and Hartley, R. B. (1985). Glomerular thrombi in renal allografts associated with cyclosporin treatment. *J. Clin. Pathol.* **38**, 253-258.
- Oaks, T. E., Myers, J. L. and Magovern, J. A. (1988). The effect of cyclosporine on atrial natriuretic peptide in goats. *Transplantation Proc.* **20**, 549-550.
- Palestine, A. G., Austin, H. A. and Balow, J. E. (1986). Renal histopathologic alterations in patients treated with cyclosporine for uveitis. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1293-1298.
- Paller, M. S. (1988). The prostaglandin E1 analog Misoprostol reverses acute cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* **20**, 634-637.
- Perico, N. M.(a), Benigni, A., Zoja, C., Delaini, F. and Remuzzi, G. (1986). Functional significance of exaggerated renal thromboxane A₂ synthesis induced cyclosporin A. *Am. J. Physiol.* **251**: F581-F587.
- Perico, N. M.(b), Zoja, C., Benigni, A., Ghilardi, F., Gualandris, L. and Remuzzi, G. (1986). Effect of short-term cyclosporine administration in rats on renin-angiotensin and thromboxane A₂; Possible relevance to the reduction in glomerular filtration rate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **239**, 229-235.
- Pochet, J. M. and Pirson, Y. (1986). Cyclosporin-Diltiazem Interaction. *Lancet*, 979.
- Ptachcinski, R. J., Carpenter, B. J. and Burckart, G. J. (1985). Effect of erythromycin on cyclosporin levels. *N. Engl. J. Med.* **313**: 1416-1417.
- Resnick, L. M., Sealey, J. E. and Laragh, J. H. (1982). Calcium metabolism and the renin aldosterone system determine the acute blood pressure response to calcium channel blockers (abstract). *Circulation* **66**, 107.
- Rooth, P., Dawidson, I. and Diller, K.(1988). Protection against cyclosporine-induced impairment of renal micro-circulation by verapamil in mice. *Transplantation* **45**, 433-437.
- Roy, M. W., Guthrie, G. P. Jr. and Holladay, F. P. (1983). Effects of verapamil on renin and aldosterone in the dog and rat. *Am. J. Physiol.* **245**: E410-E416.
- Siegl, H. and Ryffel, B. (1982). Effect of cyclosporin on renin-angiotensin-aldosterone system. *Lancet*, 1274-1282.
- Siegl, H., Ryffel, B., Petric, R., Shoemaker, P., Muller, A., Donatsch, P. and Mihatsch, M.(1983). Cyclosporine, the renin-angiotensin-aldosterone system, and renal adverse reaction. *Transplantation Proc.* **15**, 503-507.
- Sraer, J., Wolf, C. and Oudinet, J. P. (1987). Human glomeruli release fatty acids which stimulate thromboxane synthesis in platelets. *Kidney Int.* **32**, 62-68.
- Stahl, R. A. K. and Kudelka, C. (1986). Chronic cyclosporin A treatment reduces prostaglandin E₂ formation in isolated glomeruli and papilla of rat kidneys. *Clin. Nephrol.* **25**, 78-82.
- Teraoka, S., Sanaka, T. and Sato, H.(1988). Prevention of cyclosporine-associated nephrotoxicity by K-MAP. *Transplantation Proc.* **20**, 179-182.
- Tesi, R. J., Hong, J., Butt, K. M. H., Jaffe, B. M. and McMullen, M. A. (1987). In Vivo Potentiation of cyclosporine immunosuppression by calcium antagonists. *Transplantation Proc.* **19**, 1382-1384.
- Thomson, A. W., Whiting, P. H. and Blair, J. T. (1981). Pathological changes developing in the rat during a three week course of high dosage cyclosporin A and their reversal following drug withdrawal. *Transplantation* **32**, 271-277.
- Thomson, A. W., Whiting, P. H. and Simpson, J. G. (1984). Cyclosporine; Immunology, toxicity and pharmacology in experimental animals. *Agents Actions* **15**, 306-327.
- Thurau, K. (1975). Modification of angiotensin-mediated tubuloglomerular feedback by extracellular volume. *Kidney Int.* **8**, S202-S205.
- Vanrenterghem, Y., Waer, M., Roels, L., Lerut, T. and Michiels, P.(1987). Is cyclosporine-associated nephrotoxicity progressive ? *Transplantation Proc.* **21**, 4031-4032.
- Wagner, K. and Neumayer, H-H. (1986). Diltiazem and economic use of cyclosporin. *Lancet* **1**, 523.
- Welch, W. J. and Wilcox, P. (1988). Modulating role for thromboxane in the tubuloglomerular feedback response in the rat. *J. Clin. Invest.* **81**, 1843-1849.
- Whiting, P. H., Thomson, A. W., Blair, J. T. and Simpson, J. G. (1982). Experimental cyclosporin A nephrotoxicity. *Br. J. Exp. Pathol.* **63**, 88-94.
- Whiting, P. H. and Thomson, A. W. (1988). Pathological effects of cyclosporin A in experimental models. *Cyclosporin*, pp. 303-323.
- Wood, A. J., Mauer, G., Niederberger, W. and Beveridge, T. (1983). Cyclosporine; pharmacokinetics, metabolism and drug interactions. *Transplantation Proc.* **15**, 2409-2415.
- Zwaan, I. E. and Hermans, J. (1982). Bone marrow transplantation for leukemia-european results in 264 cases. *Exp. Hematol.* **10**, 64-69.