

Oxalate와 Enrofloxacin 투여한 랫트신장에 대한 병리조직학적관찰

오원석 · 이차수 · 오규실 · 정원일 · 정재용 · 정다희 · 정규식¹

경북대학교 수의과대학

Histopathological Observations on the Renal Injury in Rats Administered with Enrofloxacin and Oxalate

Won-Seok Oh, Cha-Soo Lee, Kyu-Shil Oh, Won-II Jeong, Jae-Yong Chung, Da-Hee Jeong and Kyu-Shik Jeong

Department of Veterinary Pathology
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Abstract : To investigate the renal effects of enrofloxacin administration on rats induced with dehydration or hyperoxaluria, male rats were treated with enrofloxacin of 50 mg to 500 mg/kg b.w.. The microscopical observations of kidney and urine sediment were carried out in the experimental groups. The result obtained were as follows; The male rats deprived of water for 72 hours and administered with enrofloxacin. As enrofloxacin administration dose was increased, clinical signs such as loss of appetite, depression, weakness, and loss of urine output became more severe. In the histopathological findings, there were hyperemia and hemorrhage in renal cortex, vacuolation and necrosis of renal tubular epithelia, proteinous casts within renal tubules. The male rats were orally administered with sodium oxalate and injected with enrofloxacin for 7days. As enrofloxacin administration dose was increased, clinical signs such as the loss of appetite and water consumption, and weakness became more severe. In the histopathological findings, there are hemorrhage of glomeruli and cortical hyperemia, vacuolation and necrosis of tubular epithelia, proteinous casts in renal tubules. In the microscopical findings of urine sediment, there are calcium oxalate crystal (diamond-like type) and magnesium ammonium phosphate crystals (rhomboid). The male rats were intraperitoneally injected with sodium oxalate and administered with enrofloxacin for 7days. As enrofloxacin administration dose was increased, clinical signs such as the loss of appetite and water consumption, weakness were more severe. In the histopathological findings, there were hyperemia and hemorrhage in both glomeruli and renal cortex. Severe necrosis of renal tubular epithelia, bluish materials within renal tubules were also found. In the microscopical findings of urine sediment, there were many calcium oxalate crystals. The present results suggest that enrofloxacin has some injurious effects in rats having dehydration or hyperoxaluria, and clinically, we should consider these renal injury effects when we use enrofloxacin in patients accompanied renal disease, dehydration and hyperoxaluria conditions.

Key words : rat, oxalate, enrofloxacin, kidney, histopathology

서 론

Urine crystal 및 urine stone의 생성은 최근 의학에서 신장질환 중에서 발생빈도가 높은 질환이다. 실제로 개와 고양이에서 Calcium oxalate(39%), Struvite(33%), Urate salts(12%), calcium phosphate(2%) 정도로 결석발생이 보고되어 있다¹. 요결석은 요로계의 어디에서든 생길수 있으나 대부분 신장에서 발생한다. 이 질환은 사람에서 비교적 흔하며, 남자가 여자보다 많고 대개 30세 이후에 발병한다. 가족력, 유전적 소인이 관여하는데 대사장애, 통풍, cystinuria, 원발성 hyperoxaluria 등이 결석발생과 관계가 깊다고 보고하고 있다². 특히 육류단백질의 소비가 높아지거나, 시금치, 콩류, 코코아, 땅콩 등의 수산염 (oxalate)이 많이 포함된 음식의 섭취율이 높아져 hyperoxaluria가 자연적으로 유도된 상태에서 신질환, 사구체나 세뇨관 질환 등과 같은 비뇨기계 질환이

나, 무기질 (특히 칼슘)대사이상이 동반되는 경우, 혹은 선천성이나 유전적인 소인이 있는 경우에 신장내에서나 뇨중에 calcium oxalate crystal이나 calcium oxalate stone³이 발생하게 된다³.

현재 국내에도 노령 애완동물들이 증가되는 추세이며 일 반적으로 비만, 만성탈수증상, 간장애, 신장장애, 심장장애, 호르몬이상, 무기질 대사이상 등의 질환이 있는 경우가 많이 있으며, 그 중 신장관련질환이나 결석증도 많이 발생하고 있다. 최근 소동물 임상에서도 calcium oxalate crystal이 개들의 뇨검사에서 많이 발견되고 있으며, 이것이 calcium oxalate stone³으로 이어지고 있는 것을 볼 수 있다.

또한 동물에서 연령이 많아짐에 따라 체내수분의 함량이 서서히 감소한다고 하며 이는 주로 피하지방의 증가에 기인된다고 한다⁴. 따라서 연령증가와 더불어 탈수상태가 유도되면 연령이 높은 개체나 비만인 개체에서 결석과 같은 신장관련 질환의 발생을 가속화시키는 원인이 되고있다고 한다³.

한편, enrofloxacin(Baytril®, Bayer)는 quinolone계열의 항

¹Corresponding author.
E-mail : jeongks@knu.ac.kr

생제로써 항생제의 효과면에서 탁월함과 부작용이 적다는 잇점이 있어, 최근 산업동물과 소동물임상에서 가장 광범하게 사용하고 있다. 사람에서는 enrofloxacin의 전환물질인 ciprofloxacin이라는 성분명으로 개발된 이 항생제는 그람양성 및 그람음성균을 포함한 광범한 살균효과가 있어 여러 질병(호흡기, 소화기, 피부, 비뇨기 등)에 사용되고 있다⁶.

최근 애완동물의 노령화에 따른 비뇨기계의 악화와 탈수 및 발열의 병력을 가지고 있는 환축에서 enrofloxacin투여시 식욕부진, 구토, 배뇨장애 등의 부작용이 실제 임상에서 때때로 관찰되고 있다. 그러나 탈수나 hyperoxaluria의 상태에서 enrofloxacin의 투여에 대한 신세뇨관이나 사구체의 변화에 대한 보고는 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 수분부족 상태를 유도시킨 실험군과 oxalate를 사용한 실험군에 enrofloxacin을 투여하여 신장의 병적변화를 H-E염색하여 병리조직학적으로 관찰하였던 바, 신장기능이 저하된 개체에 enrofloxacin투여시 나타날 수 있는 신장세포변화에 대한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시동물과 사료

공시된 랫는 Fan 등²⁴의 기술에 따라 200 g~300 g의 웅성 Sprague-Dewely로서 생명공학연구소에서 분양받아 polycarbonate cage에 사육하면서 공시하였다. 사료는 일반 랫전용 pellet사료(삼양사)를 사용하였으며 음수는 실험군에 따라 다르게 급여하였다. 실험군에 사용된 랫는 총 65 마리이며, 실험군은 4개군으로 분류하여 실험하였으며 구체적인 사항은 아래와 같다.

실험군과 실험방법

실험 제1군. 탈수를 유도한 상태에서의 enrofloxacin (Baytril®, Bayer) 1회투여가 신장에 미치는 영향을 알아보기 위해 웅성랫트 20마리를 공시하여 음수공급을 중단한지 72시간째 enrofloxacin을 체중 kg당 각각 0, 5, 50, 200 mg을 각각 복강으로 4개군에 1회투여한 후 24시간째에 부검하여 임상 및 병리조직학적 검사를 실시하였다 (Table 1).

실험 제2군. Hyperoxaluria 상태에서의 enrofloxacin 장기 투여가 신장에 미치는 영향을 알아보기 위해 웅성랫트 15마

Table 1. Experimental Design 1

Groups (n=20)	Protocol
1 (n=5)	① Deprivation of water for 72 hours ② Enrofloxacin 0 mg/kg
2 (n=5)	① Deprivation of water for 72 hours ② Enrofloxacin 5 mg/kg I.P.
3 (n=5)	① Deprivation of water for 72 hours ② Enrofloxacin 50 mg/kg I.P.
4 (n=5)	① Deprivation of water for 72 hours ② Enrofloxacin 200 mg/kg I.P.

리를 공시하여 3% sodium oxalate를 함유한 물을 7일간 계속급여하고, 매일 1회씩 enrofloxacin을 체중 kg당 각각 0, 50, 100mg을 7일간 피하투여한 다음 부검하여 병리조직학적 검사 및 뇨침사검사를 실시하였다(Table 2).

실험 제3군. Hyperoxaluria 상태에서의 enrofloxacin 장기투여 7일간의 투약을 중지한 경우 신장에 미치는 영향을 알아보기 위해 웅성랫트 15마리를 공시하여 3% sodium oxalate를 포함한 물을 7일간 계속급여하고, 매일 1회씩 7일간 enrofloxacin을 체중 kg당 각각 0, 50, 100 mg을 피하투여한 다음, 7일동안 모든 투약을 중단하고 3% sodium oxalate를 포함하지 않은 수도수를 계속급여하여 실험 14일째 부검하여 병리조직학적 검사 및 뇨침사검사를 실시하였다(Table 3).

실험 제4군. 급성 hyperoxaluria 상태에서의 enrofloxacin 장기투여가 신장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 웅성랫트 15마리를 공시하여 1일째 체중 100 mg당 3 mg의 sodium oxalate를 복강내로 1회 투여하여 급성 hyperoxaluria를 유도한 다음, enrofloxacin을 체중 kg당 각각 0, 50, 500 mg을 매일 1회씩 7일간 복강 내 투여한 후 실험 7일째 부검하여 병리조직학적 검사 및 뇨침사 검사를 실시하였다(Table 4).

이상과 같이 각 실험 군을 통해 음수중단상태에서의 enrofloxacin 일회투여가 신장에 미치는 영향(G1), sodium

Table 2. Experimental Design 2

Groups (n=15)	Protocol
1(n=5)	① 3% sodium oxalate+water P.O. for 7days ② Enrofloxacin 0 mg/kg
2(n=5)	① 3% sodium oxalate+water P.O. for 7days ② Enrofloxacin 50 mg/kg S.C. for 7days
3(n=5)	① 3% sodium oxalate+water P.O. for 7days ② Enrofloxacin 100 mg/kg S.C. for 7days

Table 3. Experimental Design 3

Groups (n=15)	Protocol
1(n=5)	① 3% sodium oxalate + water P.O. for 7days ② Enrofloxacin 0 mg/kg ③ After 7days, normal water +food for 7days
2(n=5)	① 3% sodium oxalate + water P.O. for 7days ② Enrofloxacin 50 mg/kg S.C. for 7days ③ After 7days, normal water +food for 7days
3(n=5)	① 3% sodium oxalate + water P.O. for 7days ② Enrofloxacin 100 mg/kg S.C. for 7days ③ After 7days, normal water +food for 7days

Table 4. Experimental Design 4

Groups (n=15)	Protocol
1 (n=5)	① 30 mg/kg sodium oxalate single dose I.P. ② Enrofloxacin 0 mg/kg S.C. for 7days
2 (n=5)	① 30 mg/kg sodium oxalate single dose I.P. ② Enrofloxacin 50 mg/kg S.C. for 7days
3 (n=5)	① 30 mg/kg sodium oxalate single dose I.P. ② Enrofloxacin 500 mg/kg S.C. for 7days

oxalate를 음수 시킨 후 enrofloxacin 장기투여가 신장에 미치는 영향(G2), G2상태에서 7일간의 투약을 중지하여 자연 치유를 시켰을 경우 신장의 변화(G3), sodium oxalate 1회 투여 후 급성 hyperoxaluria상태에서 enrofloxacin과량투여가 신장에 미치는 영향(G4) 등을 알아보기 위하여 본 실험을 실시한 후 임상 및 병리조직학적으로 추구하였다.

병리조직학적 관찰

각 실험군(Group 1, 2, 3, 4)의 실험동물의 신장조직을 검사하기 위해 부검 후 신장을 절취하여 10% 중성 포르말린 용액으로 고정한 다음 파라핀 포매 처리 후 3-4 μm 두께의 조직절편을 제작하여 통상적인 방법에 따라 H-E염색을 실시하여 관찰하였다.

뇨침사검사

각 실험군의 실험기간도중 일정한 시간에 소변을 채취하여 원심분리를 한 뒤 침전된 뇌침사를 채취하여 슬라이드 글라스에 한 방울 놓고 커버글라스를 덮은 다음 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

탈수유도상태에서의 enrofloxacin 1회 투여가 신장에 미치는 영향(G1), sodium oxalate 투여상태에서의 enrofloxacin 장기투여가 신장에 미치는 영향(G2), G2실험에서 enrofloxacin의 투약을 중지함으로써 신장의 변화(G3), sodium oxalate 1회 투여 후 급성 hyperoxaluria상태에서의 enrofloxacin과량투여가 신장에 미치는 영향(G4) 등을 알아보기 위하여 각 실험군을 통하여 임상 및 병리조직학적으로 추구하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

실험 제1군(G1)

음수가 중단된 랫트에 enrofloxacin을 용량별로 투여시 투여용량이 많아질수록 식욕의 감소 또는 절폐, 침울, 행동둔화, 뇌량의 급격한 감소 등의 임상증상이 나타났으며 폐사는 발견되지 않았다. 실험군은 대조군에 비하여 사구체의 충혈 및 괴사와 세뇨관 상피세포의 공포화, 신장 피질내의 충혈과 출혈(Fig 1) 및 세뇨관내 단백질성 원주 등이 enrofloxacin의 양이 증가함에 따라 점차 심하게 나타나는 것으로 간주되었다(Fig 2).

실험 제2군(G2)

3% sodium oxalate를 포함한 물을 급여한 결과 hyperoxaluria를 유도할 수 있게되었으며, 실험군의 일부는 식욕감소, 음수량 감소 및 행동둔화가 나타났다. 특히 음수량의 감소로 어느 정도의 수분부족상태가 동반되었다고 본다. 실험군의 소변을 원심분리 하여 침전된 뇌침사를 현미경으로 검사한 결과 다수는 다이아몬드 형태의 calcium oxalate crystal(Fig 3)이 검출되었고 일부는 장방형의 magnesium ammonium

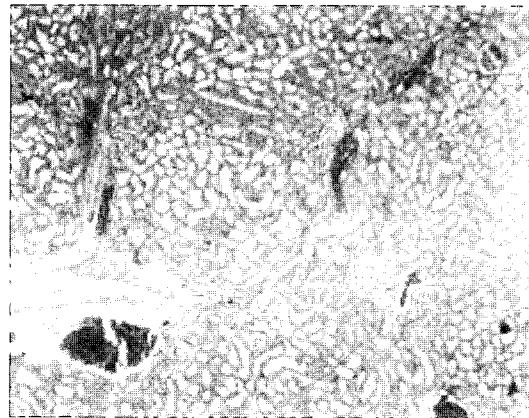


Fig 1. Hyperemia and hemorrhage of renal cortex in the rat deprived of water for 72 hrs and administered with enrofloxacin 200 mg/kg b.w. H-E. $\times 40$.

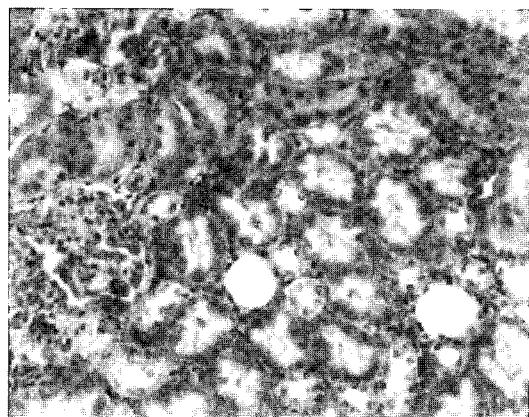


Fig 2. Vacuolation and necrosis of renal tubular epithelia, and proteinous cast within renal tubule are seen in the rat deprived of water for 72 hrs and administered with enrofloxacin 200 mg/kg b.w. H-E. $\times 200$.

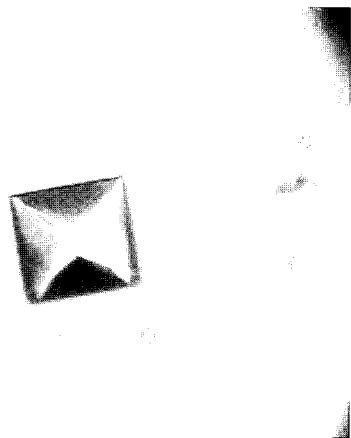


Fig 3. Calcium oxalate crystals(diamond-like type) in urine sediment appeared in the rat administered with 3% sodium oxalate and enrofloxacin 100 mg/kg b.w. for 7days. H-E. $\times 200$.

phosphate crystal이 검출되었다(Fig 4). Enrofloxacin 투여용량이 증가할수록 사구체의 출혈과 괴사 및 낭포형성(Fig 5) 그리고 신장피질의 충혈, 세뇨관의 공포화와 괴사 및 단백질성 요원주 출현 등의 변화가 더욱 증가되는 것으로 인정되었다(Fig 6).

실험 제3군(G3)

3% sodium oxalate를 함유한 물을 급여한 결과 hyperoxaluria를 유도할 수 있게되었으며, 실험군의 일부는 식욕 및 음수량 감소, 행동둔화가 나타났다. 특히 음수량의 감소로 어느 정도의 수분부족상태가 동반되었다고 본다. 실험 7일후 수도수를 급여함으로써 음수량의 급격한 증가가 있었고, 소변량도 증가되었다. 절폐된 식욕도 조금씩 증가하여 행동둔화도 호전이 되었다. Enrofloxacin 투여용량이 증가할수록 사구체의 손상과 신장피질의 충혈, 세뇨관의 공포화와 괴사, 세뇨관내 결정체양의 물질이 현저히 증가되는 것으로 인정되었다(Figs 7, 8). 실험 7일 후 수도수가 급여되면서 실험



Fig 4. Magnesium ammonium phosphate crystals in urine sediment appeared in the rat administered with 3% sodium oxalate and enrofloxacin 50 mg/kg b.w. for 7days. H-E. $\times 200$.

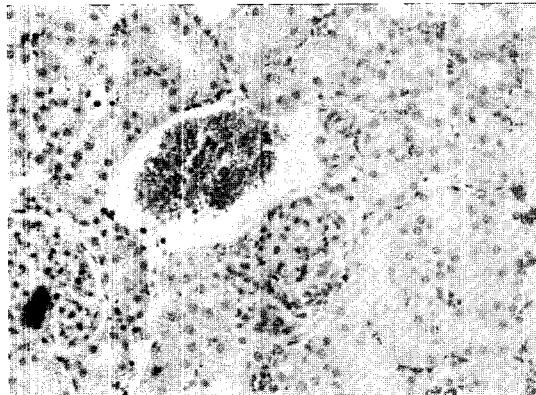


Fig 5. Hemorrhage, necrosis and cyst formation of glomeruli (\uparrow) are seen in the kidney of the rat administered with 3% sodium oxalate and enrofloxacin 100 mg/kg b.w. for 7days. H-E. $\times 200$.

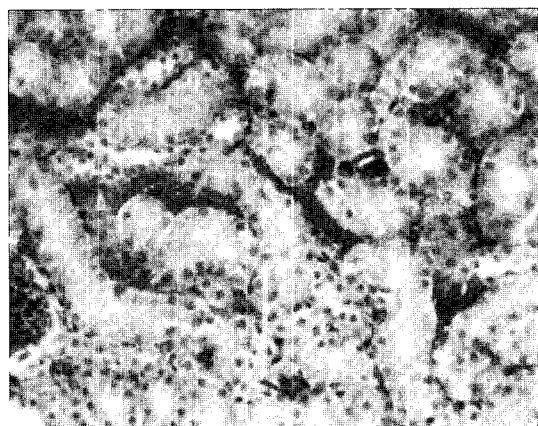


Fig 6. Tubular epithelial vacuolation and necrosis, proteinous cast, and cortical hyperemia and hemorrhage are seen in the kidney of rat administrerred with 3% sodium oxalate and enrofloxacin 100 mg/kg b.w. for 7days. H-E. $\times 400$.

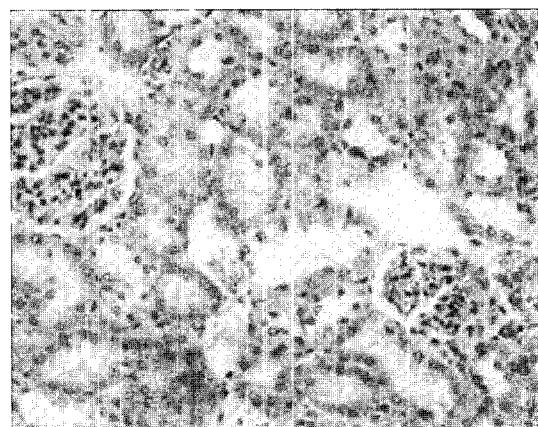


Fig 7. Vacuolation and necrosis of renal tubular epithelia are observed in the rat administered with 3% sodium oxalate and enrofloxacin 100 mg/kg b.w. for 7days. H-E. $\times 200$.

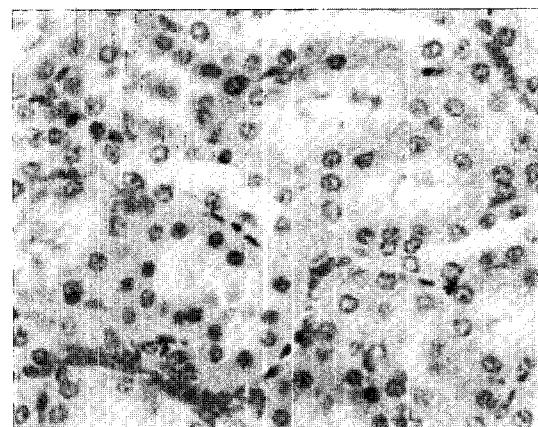


Fig 8. Bluish materials within renal tubule are seen in the rat administered with 3% sodium oxalate and enrofloxacin 100 mg/kg b.w. for 7days. H-E. $\times 400$.

군의 랫들은 탈수와 hyperoxaluria의 상태가 점차 완화되어 식욕과 활력을 되찾았고 Group 2에서보다 임상 및 병리조직학적 검사에서 양호한 상태를 볼 수 있었다. 실험군의 소변을 원심분리 하여 침전된 요침사를 현미경으로 검사한 결과 다수는 calcium oxalate crystal이 검출되었고 일부는 magnesium ammonium phosphate crystal이 검출되었으나, 시간이 갈수록 음수량의 증가 및뇨량의 증가로 요침사검사시뇨내 결정체양이 감소하였다.

실험 제4군(G4)

체중 100 gm당 3 mg의 sodium oxalate를 복강내로 1회 투여하여 급성 hyperoxaluria를 유도할 수 있었으며, 실험군의 일부는 식욕 및 음수량 감소, 행동둔화가 나타났다. enrofloxacin 투여용량이 증가할수록 사구체의 손상과 신장피질의 충혈, 세뇨관의 공포화와 괴사(Fig 11), 세뇨관내 무기

질 침착(Figs 9, 10), 단백질양의 요원주생성 등의 변화가 현저히 진행되는 것으로 관찰되었다. 실험군의 소변을 원심분리 하여 침전된 요침사를 현미경으로 검사한 결과 다수는 calcium oxalate crystal이 검출되었고(Fig 12) 일부는 magnesium ammonium phosphate crystal이 검출되었다. 그리고 enrofloxacin을 체중 500 mg 씩 매일 투여한 군에서 투여후 1일째 1두, 2일째 2두가 폐사 하였으며, 과량의 투여가 폐사의 원인으로 추정되었다.

고 칠

Fluoroquinolone은 새로운 살균성 항생제로써 이들계열에는 nalidixic acid, oxolinic acid, 4-quinolone ring, pefloxacin, enrofloxacin, norfloxacin, fleroxacin 및 ciprofloxacin 등이 있다^{6,9}. Enrofloxacin (Baytril®, Bayer)는 연노랑의 결정체양

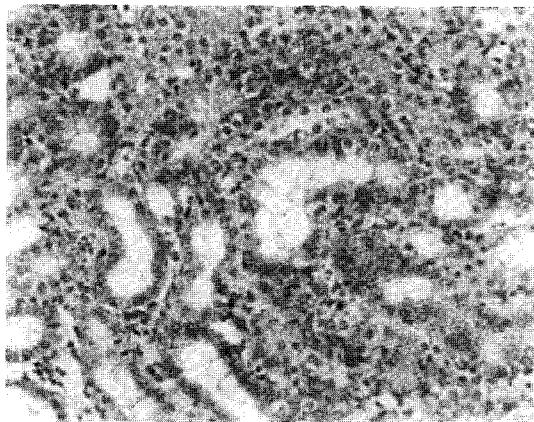


Fig 9. Severe necrosis of renal tubular epithelia and hemorrhage of renal cortex are observed in the rat intraperitoneally injected by sodium oxalate 3 mg/100gm b.w. and administered with enrofloxacin 500 mg/kg b.w. for 7days. H-E. $\times 200$.

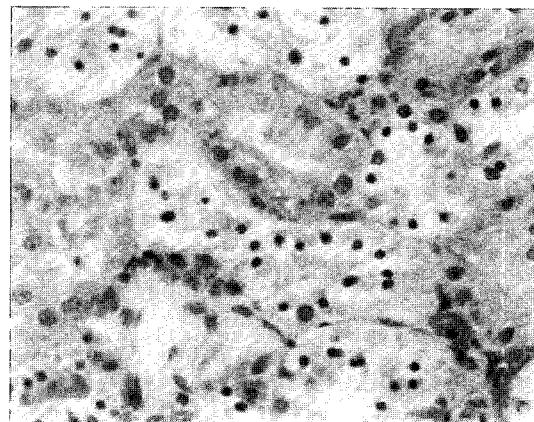


Fig 11. Tubular epithelial necrosis is markedly in the kidney of the rat intraperitoneally injected with sodium oxalate 3 mg/100gm b.w. and was administered with 500 mg/kg b.w. enrofloxacin for 7days. H-E. $\times 400$.

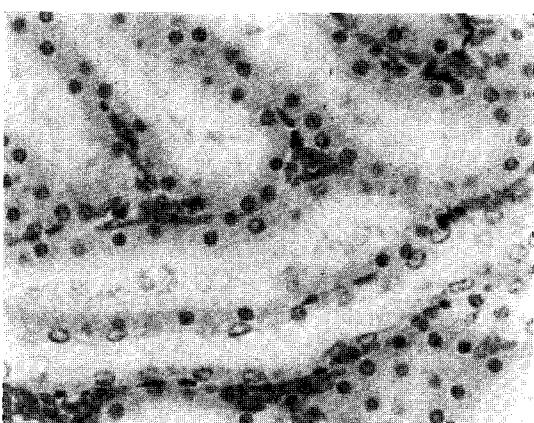


Fig 10. Bluish materials within renal tubule are seen in the rat intraperitoneally injected with sodium oxalate 3 mg/100gm b.w. at first day and was administered with enrofloxacin 500 mg/kg b.w. for 7days. H-E. $\times 400$.

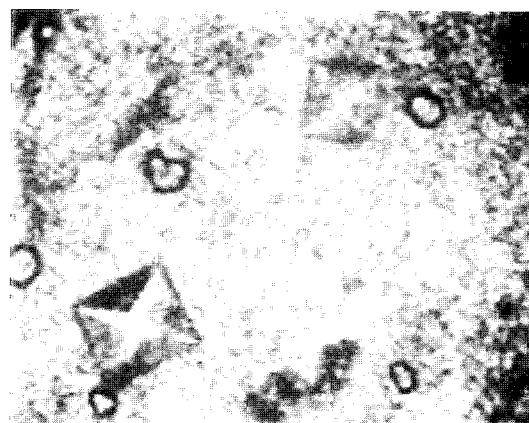


Fig 12. Many calcium oxalate crystals in urine sediment appeared in the rat intraperitoneally with injected with sodium oxalate 3 mg/100gm b.w. and administered with enrofloxacin 500 mg/kg b.w. for 7days. H-E. $\times 200$.

분말이며, 약한 수용성이다. 사람에서 많이 사용하는 ciprofloxacin과 구조적으로 비슷하며, 연관성이 있다¹¹. Enrofloxacin은 piperazinyl ring에 ethyl group이 부가되어 있는 살균제로써 감수성이 있는 세균에 대해 투여후 20-30분내에 세포사를 일으킨다. 이 항생제는 그람양성 및 음성균에 효과적이며 세균의 증식기나 정지기 모두에서 효과가 있는 항생제이다^{8,13}.

포유류에서 위장관으로 흡수가 빠르고 용이하며, 작용기간은 길고 배설은 주로 신장을 통해서 이루어진다. 몇몇의 경우를 제외하고, fluoroquinolone의 부작용은 그 약제들의 효능에 비해 심하게 나타나지 않는다고 보고되어있다⁷. 약물의 분포는 유아의 연골이나 중추신경계, 비뇨기계 및 소화기계이나 사람에서는 피부발진이 보고되기도 했다⁷. 그리고 암컷 원숭이에서 고농도로 투여시 배아소실이 발생한다고 발표되었다⁷. 실제 임상에서는 enrofloxacin의 많은 사용과 더불어 어린 동물에서는 연골발생이상을 유발시키고 있으며, 애완동물의 노령화에 따른 비뇨기계의 이상상태(hyperoxaluria, crystalluria, 신염, 신질환 등)와 탈수 및 발열의 병력을 가지고 있는 환축에서는 식욕부진, 구토 등의 위장관계통의 이상을 발생시키고 있으며, 발생은 적지만 과민반응이나 crystalluria, 중추신경계의 이상(어지럼증, 흥분)이 발생할 가능성이 있다고 하였다⁸.

Nouaille-Degorce 등¹⁰은 인위적으로 신장 제거술을 실시한 랫트에서 enrofloxacin과 유사한 계열인 ciprofloxacin의 투여가 신부전에 미치는 영향과 약물 동태학에 대해 보고한 바가 있고, 특히 probenecid는 enrofloxacin과 ciprofloxacin의 세뇨관을 통한 배설을 차단함으로써 이를 항생제의 혈중농도를 높이고 반감기를 증가시킨다는 보고가 있다⁸. 한편 enrofloxacin이 소변내에서 고농도로 존재하게 되면 산성 pH에서 결정체를 형성하게 되며 이러한 결정체는 신장을 손상시키는데 관여한다고 하고있다¹². 이러한 문제는 소변의 pH가 낮은 육식수나 신장의 기능이 저하된 상태의 동물을 치료할 경우 고려해야할 사항이라는 것을 본 실험을 통해서 확인할 수 있었다. Ciprofloxacin 투여시 때때로 crystalluria를 발생시킨다는 보고가 있기 때문에, ciprofloxacin이나 enrofloxacin으로 치료시에는 탈수된 상태가 되지 않도록 해야한다고 보고되고 있다⁸. 이와 같은 사실은 본 실험을 통해서도 enrofloxacin 투여와 동시에 음수차단과 oxalate 투여시에 일치된 임상소견과 아울러 신장의 손상을 관찰할 수 있었고, 뇨침사 검사에서 요결정체 등을 관찰할 수 있었다. 그러나 본 실험에서는 Polarized filter를 이용한 신세뇨관내의 결정체에 대한 검사는 실시되지 않았으며 앞으로 더 연구해야할 과제로 사료된다.

한편 최근 사람과 동물에서 결석유발의 주요원인으로 주목받고 있는 hyperoxaluria에 대한 연구에서 Khan 등^{14,29,49,60}과 Adhirai 등¹⁵은 급성 hyperoxaluria가 신장손상과 calcium oxalate 결석형성에 미치는 영향에 대한 조사에서, 저농도의 (3 mg/100 gm b.w. or 7 mg/100 gm b.w.) sodium oxalate 투여 시에는 발생된 결정체는 신장에 손상을 크게 주지않고

7일 이내 신장을 통해 배설되지만, 고농도(10 mg/100 gm b.w.)의 sodium oxalate 투여 시에는 7일 이후에까지 신장내 정체가 되고, 정체된 결정체는 신사구체 상피손상을 일으키는데 관여하는 효소의 분비를 촉진시킨다고 보고한 사실은 본 연구에서의 결과와 거의 일치된다고 보나, 저농도 3 mg/100 gm b.w.의 sodium oxalate 투여 시에도 enrofloxacin을 동시에 투여함으로써 신장의 손상을 관찰할 수 있었고, 이와 같은 사실에서 enrofloxacin이 hyperoxaluria 상태에서 신장에 손상을 줄 수 있음을 본 실험을 통해 알 수 있었다.

Lenin 등¹⁶과 Vidya 등¹⁸은 hyperoxaluria가 calcium oxalate stone 형성에서 가장 위험한 요인중의 하나이며, calcium oxalate crystals 형성 및 침착은 신세뇨관 손상을 유발한다고 보고하였다. 이는 본 실험에서도 sodium oxalate 와 enrofloxacin의 동시 투여 시 calcium oxalate 출현과 신세뇨관 상피세포의 손상이 관찰되었다. Toblli 등¹⁹과 Kalaiselvi 등²⁰ 그리고 Kok 등⁴⁸에 의하면 hyperoxaluria가 신장간질에 병변을 일으키는 원인으로도 인정하고 있으며, 이는 만성신부전을 일으키기도 한다고 보고하였다. 또한 calcium oxalate crystal과 지속적인 hyperoxaluria는 신장에 괴사뿐만 아니라 apoptosis도 유도됨이 밝혀졌다^{14,22,23}. 그리고 Fan 등²⁴과 Lee 등²⁵은 testosterone의 calcium oxalate 발생에서 estradiol보다 훨씬 많은 영향을 끼치게 되어 응성의 개체에서 결석이 자성보다 더 많이 발생함을 연구하였다. ThamilSelvan 등^{26,28,54}은 oxalate와 calcium oxalate crystals의 신장상피세포를 손상시킨다는 연구를 하였으며, Muthukumar 등²⁷과 Hering 등^{44,45} 그리고 KoK 등⁴⁶은 calcium oxalate 정체와 oxalate의 지질과산화로 신세뇨관 상피세포의 손상을 일으키고 결석을 형성하게 된다고 보고하고 있다. 본 실험에서 응성 랫트를 사용한 것도 바로 이러한 이유에서이며 calcium oxalate crystal 형성과 신세뇨관 및 시구체의 괴사가 인정되었다.

Oxalate 대사는 랫트와 사람에서 거의 동일한 것으로 사료되며, 이것은 실험으로 결석증을 유도한 랫트와 사람의 신결석 형성사이에 많은 유사점이 있어, calcium oxalate 결석 랫트 모델이 사람의 신결석 형성의 기전을 연구하는데 사용될 수 있다고 하였다^{17,32,33}. 신결석의 형성은 복잡한 과정과 신세뇨관에서의 crystal의 정체 등 여러단계들을 거친 결과로써 나타난다고 보고하고 있다^{2,34-39}. Kumar 등⁴⁰은 3% ammonium oxalate로 hyperoxaluria를 유도하여, gentamicin sulfate를 주사하여 근위세뇨관 손상시킨 결석형성 랫트 모델을 연구하였다. 또한 ethylene glycol과 gentamicin sulfate를 이용하여 신장세포의 손상과 관계하여 발생하는 calcium oxalate crystalluria를 연구한바 있다⁴¹. 그리고 Hebert 등⁴²과 Prentice 등⁶¹은 ethylene glycol을 투여하여 사람과 동물에서의 hyperoxaluria 발생에 대해 보고한바 있고, 개에서도 부동액중독시 hyperoxaluria가 많이 발생한다는 보고도 있다⁴³.

본 실험에서 oxalate 투여시 calcium oxalate 형성을 볼 수 있었고 이와같은 소견은 enrofloxacin 동시 투여시 더욱 현

저하였으며, gentamicin과 ethylene glycol 투여 시에 일어날 수 있는 신장의 소견과 일치된다고 본다. 최근 사람에서 결석이 많이 발생되고, 이에 대한 연구가 많아지고 있는 상태에서 hyperoxaluria와 결석모델연구가 활발히 진행되고 있다고 보고^{57,58}되고 있는데, 사람에서도 많이 사용되는 항생제인 ciprofloxacin이 신장질환과 관련된 환자 치료시 주의를 기울일 필요가 있음을 본 연구를 통해서도 알 수 있었으며, enrofloxacin 투여에 의한 랫트도 이와 같은 연구에 결석형성 관련모델로 이용될수 있다고 사료되었다.

Khan 등⁴⁹은 웅성 랫트에서 calcium oxalate crystal과 magnesium ammonium phosphate crystal이 검출된 것을 보고한 바 있으며 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 볼 수 있었다. Massey 등⁵⁰은 콩이나 콩을 재료로한 음식물들이 그 영양적인 잇점 때문에 소비가 증가하고 있으나 oxalate의 포함도는 비교적 높은 편이며, 이러한 oxalate가 음식으로부터 흡수되게되면 대사되지 않은 상태로 소변으로 배설되게 되고, 이 과정에서 칼슘을 생성시키는 불용해성의 염에 부착하여 신결석으로 형성되어 침착하게 된다고 했으며, calcium oxalate와 관련된 신장이나 노결석의 병력을 가진 사람에게서 그 개별적인 oxalate의 소모가 권장량을 훨씬 능가하고 있어 심각한 문제를 일으키고 있음을 보고했다. Schmiedl 등²¹은 고콜레스테롤과 지방이 풍부한 음식을 급여하여 hyperlipidemia를 유도한 랫트에서 hyperoxaluria와 신장세포에 미네랄 침착에 의한 신경화증에 대하여 연구하였다. Bernhard⁵¹와 Hess 등⁵²은 과도한 육류 단백질 섭취와 같은 '나쁜 식사습관들'은 hyperoxaluria (mild metabolic hyperoxaluria), hypocitraturia 그리고 hyperuricosuria를 유도하여 결석과 크리스탈형성에 많은 영향을 주고 있음을 강조하였다. Nguyen 등⁵³은 고단백식이가 신결석 질환을 위한 위험적인 요소로 받아들여지고 있다는 사실과 육류단백질의 섭취가 oxaluria에 영향을 미치고 있는 것은 사실이지만, 건강한 개체와 결석생성개체에서의 병적발생에 대해서는 상호 의견이 대립되고 있다는 사실을 보고했다. 결석 환자가 가급적 섭취량을 줄여야 하는 음식은 수산(水酸)이 많은 시금치, 코코아, 감자, 땅콩, 흥차 등이며 이들은 생체에 hyperoxaluria를 유도할 수 있으며, calcium oxalate 결석유발가능성이 높을 수 있다는 것을 본 실험을 통해서도 알 수 있었으며, 특히 hyperoxaluria에서의 항생제 사용이나 신장질환 치료 시에는 사람이나 동물에서 모두 이러한 사항을 고려해야한다고 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 수분부족이나 hyperoxaluria가 유도된 상태에서의 enrofloxacin 투여가 신장손상에 영향을 미칠 수 있다는 것을 알 수 있었다. 특히 enrofloxacin은 중증감염상태에서 선택될 수 있는 항생제이기에 노령 환축에 대한 사용에서는 개체의 탈수나 신기능에 유의하여 사용할 필요가 분명히 있다. 이미 aminoglycosides(gentamicin, neomycin 등)계열과 sulfonamide 계열의 항생제는 입상에서 신독성과 신장세포파괴 등의 부작용이 많이 보고되어 있어서 신질환 환자에서 사용상 주의를 기울이고 있고^{5,59},

enrofloxacin은 몇 가지의 부작용⁶을 제외하고는 이미 오래 전부터 그 효능에 비하여 부작용이 드물다고 알려져 있으며, 특히 수분부족상태나 hyperoxaluria가 유도된 상태에서의 enrofloxacin의 투여시 신세뇨관이나 사구체의 병리조직학적 변화에 대한 보고는 거의 찾아볼 수 없었다. 따라서 이 연구를 통해 신장의 기능이 좋지 못하거나, 심한 수분부족시, 나아가 환축이 자연적인 탈수나 hyperoxaluria가 유도된 상태라면 enrofloxacin의 과량투여시 신세뇨관이나 사구체의 변성 및 괴사, 결정체나 결석까지도 발생시킬 수 있는 가능성 이 있다는 것을 알아냄으로써 enrofloxacin을 사용시에 주의를 기울여서 오·남용에 의해 발생될 수 있는 신장손상을 막고, 이 항생제를 올바르게 사용함에 있어 참조가 될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

Sodium oxalate를 투여한 웅성 랫트에서 enrofloxacin (Baytril® Bayer) 투여시 신장손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여, enrofloxacin을 단기간 혹은 장기간 투여한 후 임상 및 병리조직학적 소견을 추구하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

음수공급차단으로 수분부족상태를 유발시킨 웅성 랫트에서 enrofloxacin 투여용량에 따라 식욕감소 및 절폐, 침울, 행동둔화, 소변량의 급격한 감소 등의 임상증상이 심하게 나타났으며, 실험군이 대조군에 비하여 사구체의 충출혈, 신장피질 내의 충출혈 및 세뇨관의 공포화와 괴사와 세뇨관내 단백질 성 원주출현 등이 enrofloxacin의 투여용량이 증가함에 따라 점차 심하게 나타나는 것으로 간주되었다. Sodium oxalate를 음수와 함께 급여하고 enrofloxacin을 투여시 식욕감소, 음수량 감소 및 행동둔화가 나타났다. 사구체의 충출혈과 괴사 그리고 신장피질내 충출혈, 세뇨관상피의 공포화와 괴사, 단백질성 요원주 등이 enrofloxacin 투여용량이 증가함에 따라 더욱 심해지는 것이 인정되었다. 실험군의 소변을 원심분리하여 침전된 요침사를 현미경으로 검사한 결과 다수는 calcium oxalate crystal이 검출되었고 일부는 magnesium ammonium phosphate crystal이 검출되었다. Sodium oxalate를 복강내로 투여하여 급성 hyperoxaluria를 유도한 후 enrofloxacin을 투여한 결과 실험의 랫트 일부는 식욕 및 음수량감소, 행동둔화가 나타났다. 과량(500 mg/kg b.w.)의 enrofloxacin 투여시 사구체의 충출혈과 신장 피질내 충출혈, 세뇨관의 공포화와 괴사, 단백질성 요원주, 무기질 침착 등의 변화가 더욱 심해지는 것으로 인정되었다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 랫트에서 수분부족이나 hyperoxaluria가 유도된 상태에서 enrofloxacin이 신장의 사구체와 세뇨관을 손상시킬 수 있다는 것을 알 수 있었으며, 본 실험의 결과로 미루어 보아 임상치료 견지에서 탈수상태나 hyperoxaluria 상태의 다른 포유류 등에서도 유사병변을 일으킬 가능성을 배제하지 않을 수 없다고 사료 되었다.

Acknowledgements

This work was supported by the Brain Korea 21 Project in 2003.

참 고 문 헌

1. Ross SJ, Osborne CA, Lulich JP, Polzin DJ, Ulich LK, Koehler LA, Bird KA, Swanson LL. Canine and feline nephrolithiasis. Epidemiology, detection and management. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999; 29(1): 231-250.
2. 병리학. 대한병리학회편. 고문사, 1991: 937-938.
3. 해리슨내과학. 해리슨내과학 편찬위원회편. 도서출판 청담. 1997: 1430-1435.
4. 가축생리학. 제3판. 도서출판 광일문화사. 1996: 397.
5. 독성 병리도감. 청구문화사. 2001: 77-83.
6. Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS. The fluoroquinolone antimicrobials : Structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cornell Vet* 1990; 80: 173-186.
7. Ball P. Ciprofloxacin and overview of adverse experiments. *J Antimicrob Chemother*, 1986; 18(suppl D): 187-193.
8. Veterinary Drug Handbook. 3rd ed Iowa State. Plumb. 1998: 238-241.
9. Neer TM. Clinical pharmacologic features of fluoroquinolone antimicrobial drugs. *J Am Vet Med Assoc* 1988; 193: 577-580.
10. Nouaille-Degorce B, Veau C, Dautrey S, Tod M, Laouari D, Carbon C, Farinotti R. Influence of Renal Failure on Ciprofloxacin Pharmacokinetics in Rats. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 289-292.
11. Rao GS, Ramesh S, Ahmad AH, Tripathi HC, Sharma LD, Malik JK. Effect of endotoxin-induced fever and probenecid on disposition of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravascular administration of enrofloxacin in goats. *J Vet Pharmacol Therap* 2000; 23: 365-372.
12. Schluter G. Ciprofloxacin : Review of potential toxicologic effects. *Am J Med.*, 1987; 82(suppl 4A): 91-93.
13. Bayer Corporation. Baytril®(enrofloxacin) 3.23% Concentrate Antimicrobial Solution Guide Sheet. 2001: 1.
14. Khan SR, Shevock PN, Hackett RL. Acute hyperoxaluria, renal injury and calcium oxalate urolithiasis. *J Urol* 1, 1992; 47: 226-230.
15. Adhirai M, Sakthivel R, Selvam R. Effect of cyclosporin A treatment on renal calcium oxalate binding in experimental hyperoxaluria. *Mol Cell Biochem* 2002; 236: 1-5.
16. Lenin M, Thiagarajan A, Nagaraj M, Varalakshmi P. Attenuation of oxalate-induced nephrotoxicity by eicosapentaenoate-lipoate(EPA-LA) derivative in experimental rat model. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2001; 65: 265-270.
17. Sidhu H, Allison MJ, Chow JM, Clark A, Peck AB. Rapid reversal of hyperoxaluria in a rat model after probiotic administration of Oxalobacter formigenes. *J Urol* 2001; 166: 1487-1491.
18. Vidya L, Varalakshmi P. Control of urinary risk factors of stones by betulin and lupeol in experimental hyperoxaluria. *Fitoterapia*. 2000; 71: 535-543.
19. Toblli JE, Ferder L, Stella I, Angerosa M, Inserra F. Protective role of enalapril for chronic tubulointerstitial lesions of hyperoxaluria. *J Urol* 2001; 166:275-280.
20. Selvam R, Kalaiselvi P. Studies on calcium oxalate binding proteins: effect of lipid peroxidation. *Nephron* 2001; 88:163-167.
21. Schmiedl A, Schwille PO, Bonucci E, Erben RG, Grayczyk A, Sharma V. Nephrocalcinosis and hyperlipidemia in rats fed a cholesterol- and fat-rich diet: association with hyperoxaluria, altered kidney and bone minerals, and renal tissue phospholipid-calcium interaction. *Urol Res* 2000; 28: 404-415.
22. Khan SR, Thamilselvan S. Nephrolithiasis: a consequence of renal epithelial cell exposure to oxalate and calcium oxalate crystals. *Mol Urol* 2000; 4: 305-312.
23. Khan SR, Hackett RL. Retention of calcium oxalate crystals in renal tubules. *Scanning Microsc* 1991; 5: 707-712.
24. Fan J, Chandhoke PS, Grampsas SA. Role of sex hormones in experimental calcium oxalate nephrolithiasis. *J Am Soc Nephrol, Suppl* 1999; 14: 376-380.
25. Lee YH, Huang WC, Chiang H, Chen MT, Huang JK, Chang LS. Determinant role of testosterone in the pathogenesis of urolithiasis in rats. *J Urol* 1992; 147: 1134-1138.
26. Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells : results of in vivo and in vitro studies. *J Nephrol Suppl* 1998: 66-69.
27. Muthukumar A, Selvam R. Renal injury mediated calcium oxalate nephrolithiasis, Role of lipid peroxidation. *Ren Fail* 1997; 19(3): 401-408.
28. Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR. Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* 1997; 157: 1059-1063.
29. Khan SR. Animal models of kidney stone formation, An analysis. *World J Urol* 1997; 15: 236-243.
30. Khan SR. Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development. *Urol Res* 1995; 23: 71-79.
31. Khan SR, Hackett RL. Hyperoxaluria, enzymuria and nephrolithiasis. *Contrib Nephrol* 1993; 101: 190-193
32. Khan SR. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis and the formation of human urinary stones. *Scanning Microsc* 1995; 9: 89-100.
33. de Bruijn WC, Boeve ER, van Run PR, van Miert PP, de Water R, Romijn JC, Verkoelen CF, Cao LC, Schroder FH. Etiology of calcium oxalate nephrolithiasis in rats. I. Can this be a model for human stone formation? *Scanning Microsc* 1995; 9: 103-14.
34. Coe FL, Parks JH. Pathophysiology of kidney stones and strategies for treatment. *Hosp Pract* 1988; 23: 145-168.
35. Finlayson B. Calcium stones : Some physical and clinical aspects, ed. by David D.S. : In Calcium metabolic in renal failure and nephrolithiasis. Wiley, New York 1977: 337-382
36. Finlayson B. Physicochemical aspects of urolithiasis. *Kidney Int* 1978; 13: 344-360.
37. Finlayson B, Khan SR, Hackett RL. Theoretical chemical models of urinary stone, ed. by Wickham J.E.A., Colin Burk A. In Renal tract stone - metabolic basis and clinical practice. Churchill Livingstone, New York 1990: 133-147
38. Kok DJ, Khan SR. Calcium oxalate nephrolithiasis, a free or fixed particle disease. *Kidney Int* 1994; 46: 847-854.
39. Pak CY. Etiology and treatment of urolithiasis. *Am J Kidney Dis* 1991; 18: 624-637.

40. Kumar S, Sigmon D, Miller T, Carpenter B, Khan S, Malhotra R, Scheid C, Menon M. A new model of nephrolithiasis involving tubular dysfunction/injury. *J Urol* 1991; 146(5): 1384-1389.
41. Hackett RL, Shevock PN, Khan SR. Cell injury associated calcium oxalate crystalluria. *J Urol* 1990; 144: 1535-1538.
42. Hebert JL, Auzepp P, Durand A. Acute human and experimental poisoning with diethylene glycol. *Sem Hop* 1983; 59(5): 344-349.
43. Nelson. Small Animal Internal Medicine. Mosby. 2nd edi 1998: 638-645.
44. Hering F, Bigalke KH, Lutzeyer W.. Interaction of hyperuricuria and hyperoxaluria on renal calcium oxalate stone formation. *Adv Exp Med Biol* 1980; 122A: 99-107.
45. Tiselius HG, Berg C, Fomander AM, Nilsson MA. Effect of citrate on the different phases of calcium oxalate crystallization. *Scan Microsc* 1993; 7: 381-389.
46. Kok DJ. Intratubular crystallization event. *World J Urol* 1997; 15: 219-228.
47. de Water R, Noordermeer C, Theo H Van der Kwast, Horst Nisse, Egbert R Boeve, Kok DJ, Schorder FH. Calcium Oxalate Nephrolithiasis : Effect of Renal Crystal Deposition on the Cellular Composition of the Renal Interstitium. *Am J Kid Dis* 1999; 33(4): 761-771.
48. de Water R, Noordermeer C, Adriaan B, Houtsmuller, Nigg AL, Stijnen T, Fritz H, Schroder, Kok DJ. Role of Macrophages in Nephrolithiasis in rats : An Analysis of the Renal Interstitium. *Am J Kid Dis* 2000; 36(3): 615-625
49. Khan SR, Hackett RL. Urolithogenesis of Mixed Foreign Body Stones. *J Urol* 1987; 138: 1321-1328.
50. Massey LK, Palmer RG, Horner HT. Oxalate Content of Soybean seeds(Glycin max: Leguminosae), Soyfoods, and Other Edible Legumes. *J Agric Food Chem*, 2001; 49: 4262-4266.
51. Hess B. 'Bad dietary habits' and recurrent calcium oxalate nephrolithiasis. *Nephrol. Dial. Transplant* 1998; 12: 1033-1038.
52. Chen CL, Fang HC, Chou KJ, Wang JS, Chung HM. Acute Oxalate Nephropathy After Ingestion of Star Fruit. *Am J Kidney Dis* 2001; 37(2): 418-422.
53. Nguyen QV, Kalin A, Drouve U, Casez JP, Jaeger P. Sensitivity to meat protein intake and hyperoxaluria in idiopathic calcium stone former. *Kid Intern* 2001; 59: 2273-2281.
54. Thamilselvan S, Hackett RL, Khan SR. Lipid peroxidation in ethylene glycol induced hyperoxaluria and calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* 1997; 157(3): 1059-63.
55. Thamilselvan S, Khan SR. Oxalate and calcium oxalate crystals are injurious to renal epithelial cells: results of in vivo and in vitro studies. *J Nephrol* 1998; 11(Suppl 1): 66-69.
56. Hess B, Nakagawa Y, Parks JH, Coe FL. Molecular abnormality of Tamm-Horsfall glycoprotein in calcium oxalate nephrolithiasis. *Am J Physiol*, 1991; 265: 784-791.
57. Finlayson B, Khan SR, Hackett RL. Theoretical chemical models of urinary stone. In: Wickham JEA, Colin Burk A(eds) *Renal tract stone-metabolic basis and clinical practice*. Churchill Livingstone, New York 1990: 133-147.
58. Khan SR. Animal model of kidney stone formation : an analysis. *World J Urol* 1997; 15: 236-243.
59. Josepoviz C, Levine R, Farruggella T, Kaloyanides GJ. Comparative effects of aminoglycosides on renal cortical and urinary phospholipids in the rat. *Proc Soc Exp. Biol Med* 1986; 182(1): 1-5.
60. Khan SR, Woodward JC. Calcium oxalate urolithiasis, rat. in Jones TC, Mohr U, Hunt RD(eds) : *Urinary System. Monographs on Pathology of Laboratory Animals*. 1986: 355-360.
61. Prentice DE, Majeed SK. Oral toxicity of polyethylene glycol(PEG200) in monkeys and rats. *Toxicol Lett* 1978; 2: 119-122.