

원 저

베라파밀 중독의 쥐 모델에서 지방에멸전 정맥주사의 효과

경상대학교 의학전문대학원 응급의학교실¹, 경상대학교 건강과학연구원², 창원경상대학교병원 응급의학교실³

하대명¹ · 김동훈^{1,2} · 김태윤^{1,2} · 이수훈^{1,2} · 정진희^{1,2} · 이상봉¹ · 임대성³ · 강창우^{1,2}

The Effect of Intravenous Lipid Emulsion in a Rat Model of Verapamil Toxicity

Dae-Myung Ha, M.D.¹, Dong Hoon Kim, M.D., Ph.D.^{1,2}, Taeyun Kim, M.D., Ph.D.^{1,2},
Soo Hoon Lee, M.D.^{1,2}, Jin Hee Jeong, M.D.^{1,2}, Sang Bong Lee, M.D.¹,
Daesung Lim, M.D.³, Changwoo Kang, M.D., Ph.D.^{1,2}

Department of Emergency Medicine, Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju¹,
Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University, Jinju²,

Department of Emergency Medicine, Gyeongsang National University Changwon Hospital, Changwon³, Korea

Purpose: Intravenous lipid emulsion (ILE) has been shown to have significant therapeutic effects on calcium channel blocker overdose in animal studies and clinical cases. In this preliminary experiment, we investigated the hemodynamic changes and survival in a rat model of verapamil intoxication.

Methods: Fourteen male Sprague-Dawley rats were sedated and treated with ILE or normal saline (control), followed by continuous intravenous infusion of verapamil (20 mg/kg/h). Mean arterial pressure and heart rate of rats were monitored during the infusion. In addition, the total dose of infused verapamil and the duration of survival were measured.

Results: Survival was prolonged in the ILE group (32.43±5.8 min) relative to the control group (24.14±4.3 min) ($p=0.01$). The cumulative mean lethal dose of verapamil was higher in the ILE group (4.3±0.7 mg/kg) than in the control group (3.2±0.5 mg/kg; $p=0.017$).

Conclusion: ILE pretreatment prolonged survival and increased the lethal dose in a rat model of verapamil poisoning.

Key Words: Intravenous lipid emulsion (ILE), Verapamil, Intoxication, Poisoning

서 론

우리나라의 식생활이 서구화되고 고령 인구가 늘어나면

서 심혈관계 질환들이 함께 증가하고 있으며, 이에 따라 여러 가지 심혈관계 약물의 사용량도 증가 추세에 있다. 한편 심혈관계 약물들의 처방 및 투약이 증가하면서 최근 수년간 심혈관계 약물중독의 사례 및 이들 약물중독에 의한 치명적인 독성증상 및 높은 사망률들이 보고 되고 있다¹⁾. 또한 심혈관계 약물에 중독된 환자의 치료법에 대한 연구들이 중독학에서 중요한 화두로 제시되고 있다²⁾. 여러 가지 심혈관계 약물 중에서도 특히 칼슘통로차단제나 베타 차단제와 같은 약물의 중독은 혈액학적인 불안정 및 심정지와 같은 치명적 증상과 이에 따른 높은 사망률을 나타낸다고 알려져 있다. 또한 이들 약물 중독에 대한 치료로서 칼슘과 글루카곤 투여, 고농도 인슐린 투여, 혈관수축제

책임저자: 강 창 우
경상남도 진주시 강남로 79
경상대학교 의학전문대학원 응급의학교실
Tel: 055) 750-8216 Fax: 055) 757-0514
E-mail: em6766@gmail.com

투고일: 2017년 12월 31일 1차 심사일: 2018년 1월 2일
게재 승인일: 2018년 2월 27일

* 이 논문은 특정단체의 재정적 지원이나 관련된 이해관계가 없습니다.

투여, 지방에멀전 정맥주사 등에 대한 연구들이 진행되고 있으며 여러 환자 사례들이 보고되고 있다^{3,4)}.

지방에멀전은 전통적으로 정맥 영양을 공급받는 환자들의 영양원으로 제공되거나 프로포폴, 암포테리신과 같은 지질 친화성 약물들의 용매로써 사용되어 왔다. 그러나 최근 임상독성학 분야에서 여러 가지 치명적인 약물들의 해독제로서 지방에멀전에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며, 이들 약물중독의 치료에 있어 극적인 효과들이 보고되고 있다. 지방에멀전 정맥주사는 칼슘통로차단제뿐만 아니라 국소마취제의 일종인 부피바카인, 친지질성 베타차단제, 삼환계항우울제, 항정신병제, 항부정맥제 등의 약물중독 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있다⁵⁻¹¹⁾. 지방에멀전 정맥주사를 이용한 동물실험 및 사례보고에서 칼슘통로차단제 중독에 획기적인 치료효과가 있는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 임상적인 증거는 부족한 실정이다¹²⁻¹⁵⁾.

본 연구에서는 흰쥐에게 지방에멀전을 전 처치로 정맥 주입한 후 칼슘통로차단제인 베라파밀(verapamil)을 중독시켰을 경우 지방에멀전이 흰쥐의 혈액학적 수치 및 생존율을 높이는지에 대해 알아보고자 하였다.

대상과 방법

1. 실험동물 준비

본 연구는 칼슘통로차단제인 베라파밀을 사용한 두 세트의 실험군으로 구성되었으며, 경상대학교의 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인을 받아 계획되고 수행되었다.

본 실험에서는 300-350 g 체중의 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐 총 14마리를 사용하였으며, 이들 흰쥐는 3-7일간 통제된 환경에서 사육하였고, 사육 기간 동안 흰쥐가 자유롭게 먹이 활동과 수분 섭취를 할 수 있게 하였다. 실험 전 흰쥐는 Perspex anesthesia box를 이용하여 이소플루란(isoflurane)으로 흡입마취한 후 케타민(Ketamine, 90

mg/kg, Huons, Republic of Korea)과 자일라진(Xylazine, 10 mg/kg, Bayer, Republic of Korea)을 근주하여 전신마취를 유도하였으며, 흰쥐의 꼬리 정맥에 도관을 삽입하였다. 노즈콘(Nose cone)을 통해 산소 1 L/min과 이소플루란 2%를 이용하여 흡입마취로 흰쥐의 전신마취를 유지하였다. 흰쥐의 발가락과 꼬리에 주기적인 통증 자극을 주어 반응이 없을 경우 적절한 마취가 이루어졌다고 판단하였으며, 흡입마취 중 흰쥐의 항문을 통해 체온계를 삽입하여 동물의 체온을 36.0-37.0°C로 유지하였다. 흰쥐의 좌측 대퇴동맥을 박리하여 24 gauge 혈관 카테터(BD Insyte Autogaurd; Bectone-Dickinson Co., Franklin Lake, NJ, USA)를 삽입하고 평균동맥혈압과 분당 심박수를 측정하였다. 모든 시술이 끝난 후 흰쥐의 안정화를 위해 15분 정도 관찰하였다.

2. 실험 프로토콜

흰쥐를 흡입 마취시키고 약 10-15분 정도 안정기를 가진 이후, 기초 평균 동맥혈압과 분당 심박수를 측정하였고, Hewlett-Packard Virida 24C 모니터(Hewlett-Packard, Boeblingen, Germany)를 사용하여 5분 간격으로 흰쥐의 평균 동맥혈압과 분당 심박수를 기록하였다. Fig. 1에서 보는 것처럼 베라파밀을 이용한 흰쥐 중독모델에서 실린지펌프(IVAC P6000, Alaris Medical Systems, San Diego, CA, USA)를 사용하여 5분 동안 생리식염수 12.4 mL/kg나 지방에멀전 12.4 mL/kg (SMOFlipid 20%, Fresenius Kabi, Uppsala, Sweden)을 정맥 투여하여 전처치한 후 5분 동안 관찰하였다. 이후 다시 5분 동안 흰쥐에게 베라파밀 8 mg/kg/h (Isoptin, Ilsung, Republic of Korea)을 투여하였고, 흰쥐가 사망할 때까지 5분 간격으로 평균 동맥혈압과 분당 심박수를 측정하고 관찰하였다. 지방에멀전의 농도는 전연구 및 견본실험에 의하여 결정하였다¹⁹⁾.

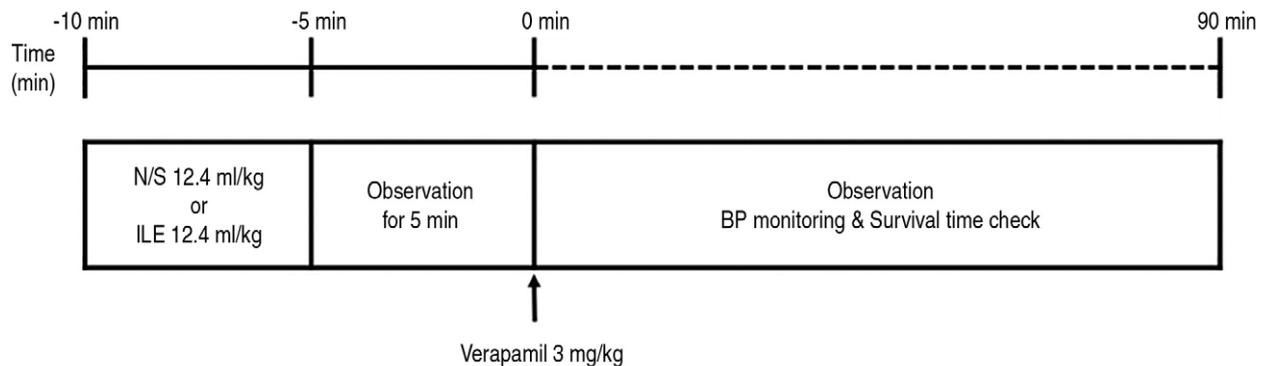


Fig. 1. Study protocol of animal experiment.

3. 통계분석

본 실험에서 자료 분석은 SPSS software, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 생존실험은 Kaplan-Meier 분석법을 사용하고, 평균 동맥혈압 및 분당 심박수는 Student's t-test를 시행하여 비교하였다. 각 측정치의 값은 평균±표준오차로 표시하고 유의 검정 수

Table 1. Baseline characteristics (mean±SD)

	NS (n=7)	ILE (n=7)	<i>p</i>
Weight (g)	322.4±14.2	325.8±11.5	0.889
MAP (mmHg)	86.0±6.2	88.0±6.4	0.882
HR (beats/min)	224.1±19.6	218.5±22.0	0.560

MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate, NS: normal saline, ILE: intravenous lipid emulsion

준은 $p < 0.05$ 로 하였다. 두 군의 변수들의 정규성 검증은 Shapiro-Wilk 검증을 실시하였다.

결 과

Table 1에 나타난 것처럼 총 14마리 실험 흰쥐의 체중, 평균동맥혈압, 분당 심박수 등 기본 특성은 생리식염수군 (322.4 ± 14.3 g, 86.0 ± 6.2 mmHg, 224.1 ± 19.6 bpm)과 지방에멀전군(325.8 ± 11.5 g, 88.0 ± 6.4 mmHg, 218.5 ± 22.0 bpm) 사이에 유의한 차이는 없었다. Fig. 2에서 보는 것처럼 베라파밀 중독모델에서 흰쥐의 생존시간은 생리식염수군에서 24.14 ± 4.3 분인데 반하여 지방에멀전군에서 32.43 ± 5.8 분으로 유의하게 늘어난 것을 알 수 있다 ($p=0.01$). 측정된 베라파밀의 치사량은 지방에멀전군(4.3 ± 0.7 mg/kg)에서 생리식염수군(3.2 ± 0.5 mg/kg)에 비

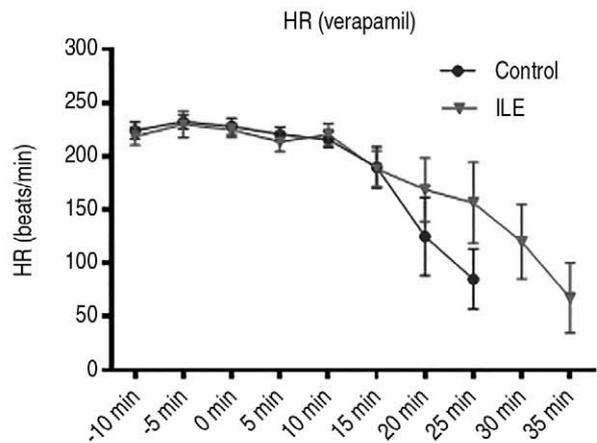
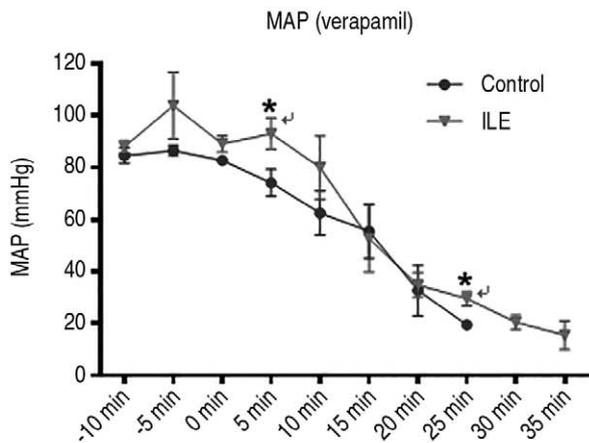


Fig. 2. Hemodynamic parameters among treatment group in verapamil poisoning. The data area reported as mean±standard error of the mean (* $p < 0.05$). MAP: mean arterial pressure, HR: heart rate, Control: normal saline, ILE: intravenous lipid emulsion

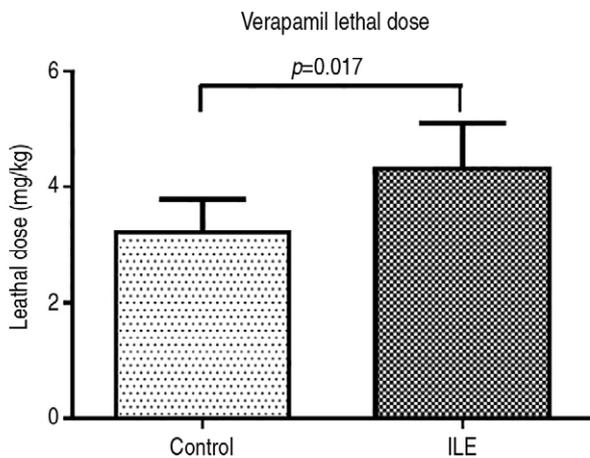


Fig. 3. Lethal dose in verapamil poisoning ($p=0.017$). Control: normal saline, ILE: intravenous lipid emulsion

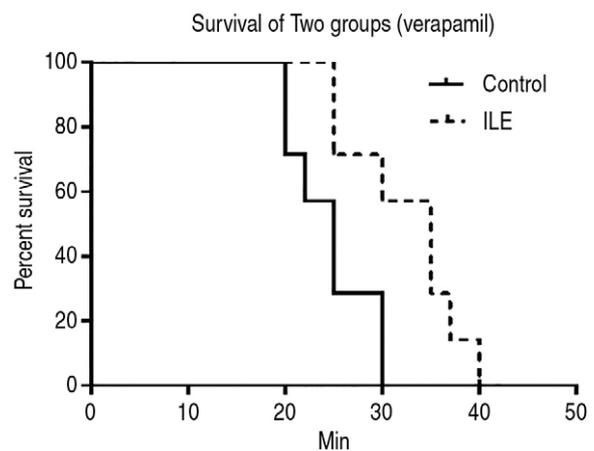


Fig. 4. Kaplan-Meier survival analysis in verapamil poisoning ($p=0.011$). Control: normal saline, ILE: intravenous lipid emulsion

하여 높은 농도로 나타났다(Fig. 3, $p=0.017$). 또한 Kaplan-Meier 생존곡선은 Fig. 4에 나타나 있다.

고 찰

본 연구에서 흰쥐를 지방에멀전으로 전 처치 했을 때, 베라파밀을 지속적으로 투여하여 중독된 흰쥐에서는 생존기간이 늘어나고 베라파밀의 치사량이 증가되는 것으로 나타났다. 또한 지방에멀전군에서 흰쥐의 평균동맥압은 통계적으로 의미 있게 증가한 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 지질친화성 약물에 중독된 흰쥐에 있어 지방에멀전의 효과에 대한 이전 연구의 결과들을 뒷받침한다¹⁴⁻¹⁷.

현재까지 지질친화성 약물중독에 대한 지방에멀전의 효과에 대한 메커니즘은 몇 가지 유용한 가설로 설명되고 있다. 여러 가지 가설 중에 가장 유력한 이론들은 지방에멀전이 지질친화성 독성물질을 혈관 내에서 분리시켜서 생물학적으로 비활성화된 조직으로 재배치시킨다는 “Lipid sink” 현상, 대사성 중독 과정에서 ATP 합성을 위한 지방산의 이용을 증가시킨다는 이론, 직접적인 심근수축증가 및 이온채널에 대한 효과에 대한 이론 등이다¹⁸⁻²³.

“Lipid sink” 현상은 지방에멀전의 치료 효과를 설명하는 가장 유용하게 받아들여지는 이론으로, 지방에멀전이 지질 친화성 독성 약물들을 격리시키는 일종의 지질 구획을 만들어서 혈관 내의 수용성 혈액으로부터 분리시킨다는 가설이다. 이러한 관점에서 부피바카인, 부프로피온, 라모트리진, 할로페리돌과 같은 지질 친화성 약물들이 지방에멀전에 의하여 효과적으로 제거된 연구들이 다수 보고되었다. 따라서 “Lipid sink” 이론에 의하면 베라파밀과 같은 칼슘통로차단제 중독에 의한 심정지 환자에서 지방에멀전의 정맥주사에 의하여 효과적으로 치료되었다는 메커니즘을 충분히 설명할 수 있다. 한편, Inoue와 Horikoshi는 유기용매의 독성 및 지질 친화성을 표현하는 지표로서 Log P (octanol/water)값을 제안하였는데, P는 옥탄올과 물의 동일 물 혼합액에 대한 유기 용매의 분배 계수(partition coefficient)를 의미한다¹⁹. 일반적으로 Log P값이 높을수록 지질 친화성이 높으므로, 지방에멀전에 의한 치료효과가 클 것으로 예측할 수 있다. 본 실험에 사용된 베라파밀은 지질 친화성 약물로 Log P값이 4.7이며, 이는 다른 칼슘통로차단제인 딜티아젠펜(diltiazem)과 니카르디핀(nicardipine)은 각각 2.8과 3.6인데 비하여 높은 값을 가지고 있다²⁰. “Lipid sink” 이론은 지방에멀전에 의한 칼슘통로차단제 독성의 치료 효과를 충분히 설명할 수 있으며, 향후 다른 지질 친화성 약물 중독의 사례에도 충분히 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 두 번째

메커니즘은 지방에멀전이 심근세포 내로 지방산을 충분히 공급함으로 심근의 에너지원으로 사용되는 ATP 합성능력을 개선시킴으로 심장의 기능을 회복시킨다는 이론이다²¹⁻²². 세 번째로, 지방에멀전은 심근 세포막의 이온채널들과 상호작용함으로써 결과적으로 심장의 수축 기능을 회복시킨다는 이론으로, 지방산이 심근 세포주변에 있는 칼슘 이온의 세포 내 유입을 증가시켜서 전압 의존성 칼슘이온 채널을 직접 활성화시키게 되고 결국 심근의 수축력을 강화시킨다는 것이다^{23,24}.

물론 지방에멀전에 의한 심폐소생에 있어 “Lipid sink” 메커니즘은 완전하지 못하며, 여러 가지 실험적인 반론들이 있는데, Cave 등과 Harvey 등은 토끼를 실험동물로 사용한 지질 친화성 독성 약물 중독 모델에서 지방에멀전의 “Lipid sink” 효과를 발견하지 못하였음을 보고하였다^{25,26}.

본 연구는 고농도의 지방에멀전 전 처치가 베라파밀에 중독된 흰쥐에 미치는 효과에 대한 예비실험이며, 임상적으로 활용하기에는 여러 가지 제한 점이 있다. 먼저 본 연구에서는 인체에 투약하기에는 비교적 높은 고농도의 지방에멀전(ILE 12.4 ml/kg)을 전처치하였다. 하지만 이전의 흰쥐 실험에서 다양한 농도의 지방에멀전(10-19 ml/kg)을 투약한 사례들이 있었고¹⁸, Perez 등은 베라파밀에 중독된 쥐과 동물모델에서 지방에멀전의 최적농도는 18.6 ml/kg로 결정하였던 사례들이 있었다²⁷. 또한 본 연구에서 베라파밀을 정맥 투여한 것은 인체를 대상으로 대량의 베라파밀을 경구 투여한 임상적 연구와는 일치하지 않을 수도 있다. 그러나 베라파밀을 경구 투여한 경우, 정맥 투여한 경우보다 약물의 반응속도가 늦거나 인체 내에서 일정한 농도를 유지하지 못할 수도 있으며, 동일한 독성을 나타내는데 더 높은 농도의 베라파밀이 필요할 수도 있다고 생각되었으며, 베라파밀을 정맥 투여하는 것이 객관적인 결과를 얻는데 있어 더 유용하다고 판단하였다. 세 번째로 지방에멀전은 전처치로 투여하기보다는 베라파밀 중독 이후에 투여해야 한다는 점인데, 이전 심혈관계 약물의 중독 모델을 참고하여보면 칼슘통로차단제나 베타차단제와 같은 약물의 독성이 흰쥐에게 나타나는 시간이 매우 빨라서 지방에멀전을 처치하기 전에 흰쥐가 사망할 것으로 예측되었다. 따라서 본 연구에서는 지방에멀전을 베라파밀 중독 후 투여하기 보다는 전 처치로 투여하는 것이 더 합당하다고 판단되었다. 네 번째로, 임상적으로 지방에멀전은 단독으로 사용하기 보다는 다른 해독제들과 병용하여 투여하는 것이 유리하나, 본 연구에서는 지방에멀전과 다른 해독제와의 상호작용은 고려하지 못하였다. 다섯 번째로 본 연구에서 흰쥐의 혈청 및 조직 내 베라파밀의 농도는 측정하지 못하였다. 마지막으로 실험에 사

용된 흰쥐의 개체 수가 총 14마리이고 매우 적었다. 향후 베라파밀과 같은 칼슘통로차단제 중독에 대한 지방에열전의 메커니즘 및 임상적 활용방법에 대한 추가적인 실험 및 조사가 이루어져야 할 것이다.

이러한 제한 점들에도 불구하고 본연구는 고농도 정맥에열전의 전처치가 베라파밀과 같이 지질 친화성 약물에 중독된 쥐과 동물 모델에서 개체의 생존기간을 향상시키고 최종 치사량을 증가시킨다는 것을 실험적으로 확인했다는 점에서 의미가 있다고 사료된다.

결론

쥐과 동물을 모델로 한 베라파밀 중독 실험에서 지방에열전의 전 처치가 흰쥐의 생존기간을 늘리고 베라파밀의 치사농도를 높였다.

ORCID

Dae-Myung Ha (<https://orcid.org/0000-0002-3339-4945>)

Changwoo Kang (<https://orcid.org/0000-0002-2045-3213>)

참고문헌

- Mowry JB, Spyker DA, Cantilena LR Jr, Bailey JE, Ford M. 2012 annual report of the American Association Of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 30th annual report. *Clin Toxicol (Phila)* 2013;51:949-1229.
- Shepherd G. Treatment of poisoning caused by beta-adrenergic and calcium-channel blockers. *Am J Health Syst Pharm* 2006;63:1828-35.
- Jamaty C, Bailey B, Larocque A, Notebaert E, Sanogo K, Chauny JM. Lipid emulsions in the treatment of acute poisoning: a systematic review of human and animal studies. *Clin Toxicol (Phila)* 2010;48:1-27.
- St-Onge M, Dube P, Glosselin S, Guimont C, Godwin J, Archambault P, et al. Treatment for calcium channel blocker poisoning: A systemic review. *Clin Toxicol. (Phila)* 2014; 52:926-44.
- Rosenblatt MA, Abel M, Fischer GW, Itzkovich CJ, Eisenkraft JB. Successful use of a 20% lipid emulsion to resuscitate a patient after a presumed bupivacaine-related cardiac arrest. *Anesthesiology* 2006;105:217-8.
- Foxall G, McCahon R, Lamb J, Hardman JG, Bedford NM. Levobupivacaine-induced seizures and cardiovascular collapse treated with Intralipid. *Anaesthesia* 2007;62:516-8.
- Litz RJ, Popp M, Stehr SN, Koch T. Successful resuscitation of a patient with ropivacaine-induced asystole after axillary plexus block using lipid infusion. *Anaesthesia* 2006;61:800-1.
- Sirianni AJ, Osterhoudt KC, Calello DP, Muller AA, Waterhouse MR, Goodkin MB, et al. Use of lipid emulsion in the resuscitation of a patient with prolonged cardiovascular collapse after overdose of bupropion and lamotrigine. *Ann Emerg Med* 2008;51:412-5, 415 e1.
- Weinberg G, Di Gregorio G, Hiller D, Hewett A, Sirianni A. Reversal of haloperidol-induced cardiac arrest by using lipid emulsion. *Ann Intern Med* 2009;150:737-8.
- Yoav G, Odelia G, Shaltiel C. A lipid emulsion reduces mortality from clomipramine overdose in rats. *Vet Hum Toxicol* 2002;44:30.
- Heinonen JA, Litonius E, Backman JT, Neuvonen PJ, Rosenberg PH. Intravenous lipid emulsion entraps amitriptyline into plasma and can lower its brain concentration-an experimental intoxication study in pigs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2013;113:193-200.
- Bologa C, Lionte C, Coman A, Sorodoc L. Lipid emulsion therapy in cardiodepressive syndrome after diltiazem overdose-case report. *Am J Emerg Med* 2013; 31:1154.e3-1154.e4.
- Tebbutt S, Harvey M, Nicholson T, Cave G. Intralipid prolongs survival in a rat model of verapamil toxicity. *Acad Emerg Med* 2006;13:134-9.
- Cave G, Harvey MG, Castle CD. The role of fat emulsion therapy in a rodent model of propranolol toxicity: a preliminary study. *J Med Toxicol* 2006;2:4-7.
- Bania TC, Chu J, Perez E, Su M, Hahn IH. Hemodynamic effects of intravenous fat emulsion in an animal model of severe verapamil toxicity resuscitated with atropine, calcium, and saline. *Acad Emerg Med* 2007;14:105-11.
- Kang C, Kim DH, Kim SC, Lee SH, Jeong JH, Kang TS, et al. The effects of intravenous lipid emulsion on prolongation of survival in rat model calcium blocker toxicity. *Clin Toxicol (phila)* 2015;53:540-4.
- Christian M, Pallasche E, Wahl M, Mycyk M. Lipid Rescue 911: Are poison centers recommending intravenous fat emulsion therapy for severe poisoning? *J Med Toxicol* 2013;9:231-4.
- Weinberg GL, Ripper R, Murphy P, Edelman LB, Hoffman W, Strichartz G, et al. Lipid infusion accelerates removal of bupivacaine and recovery from bupivacaine toxicity in the isolated rat heart. *Reg Anesth Pain Med* 2006;31:296-303.
- Sangster J. Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry. (secondary). Wiley Series in Solution Chemistry. 2. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 1997:17.

20. Available at: <http://www.wolframalpha.com>. accessed December 27, 2017.
21. Van de Velde M, Wouters PF, Rolf N, Van Aken H, Flameng W, Vandermeersch E. Long-chain triglycerides improve recovery from myocardial stunning in conscious dogs. *Cardiovasc Res* 1996;32:1008-15.
22. Stehr SN, Ziegeler JC, Pexa A, Oertel R, Deussen A, Koch T, et al. The effects of lipid infusion on myocardial function and bioenergetics in l-bupivacaine toxicity in the isolated rat heart. *Anesth Analg* 2007;104:186-92.
23. Huang JM, Xian H, Bacaner M. Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6452-6.
24. Mottram AR, Valdivia CR, Makielski JC. Fatty acids antagonize bupivacaine-induced I(Na) blockade. *Clin Toxicol (Phila)* 2011;49:729-33.
25. Cave G, Harvey M, Quinn P, Heys D. Hypertonic sodium bicarbonate versus intravenous lipid emulsion in a rabbit model of intravenous flecainide toxicity: no difference, no sink. *Clin Toxicol (Phila)* 2013;51:395-7.
26. Harvey M, Cave G, Ong B. Intravenous lipid emulsion-augmented plasma exchange in a rabbit model of clomipramine toxicity: survival, but no sink. *Clin Toxicol (Phila)* 2014;52:13-9.
27. Perez E, Bania TC, Medlej K, Chu J. Determining the optimal dose of intravenous fat emulsion for the treatment of severe verapamil toxicity in a rodent model. *Acad Emerg Med* 2008;15:1284-9.