

Cyclosporine A 신독성에 미치는 칼슘길항제 (Verapamil) 의 효과에 대한 형태학적 연구

장희경, 김혜숙, 허만하
고신대학교 의학부 병리학교실

Morphologic Effect of Calcium Channel-blocker(Verapamil) on Cyclosporine A Nephrotoxicity

Hee Kyung Chang, Hye Sook Kim, Man Ha Huh

Department of Pathology

Kosin Medical College, Pusan 602-702, Korea

=Abstract=

Effect of calcium channel blocker(CB) on cyclosporin A(C) nephrotoxicity was investigated in the Male Wister rat in a 4-week experiment at the light and electron microscopic level. To accomplish the aim of this study, 25 week old male Wister rats were divided into following 3 experimental groups ; 1 CsA(50mg/kg/day) alone daily per os ; 2. CsA(50mg/kg/day) concomitant administration of CB verapamil(20mg/kg/day) daily per os ; 3. CsA(50mg/kg/day) concomitant administration of verapamil(10mg/kg/day) daily per os.

Morphologically, CsA nephrotoxicity was characterized by the following features ; (1) tubular inclusion bodies corresponding to predominate polymorphous autolysosomes and a small number of markedly enlarged mitochondria ; (2) tubular vacuolization due to dilation of the rough and smooth endoplasmic reticulum ; (3) tubular microcalcification. These morphologic features were limited to the proximal tubules.

Simultaneous administration of CB verapamil with CsA reduced CsA induced morphologic damage of the proximal tubules of the kidney ; especially tubular inclusion bodies were significantly reduced, independent of the dosage of the verapamil.

These histopathological findings are interpreted as morphological manifestations of the effect of calcium channel blocker, verapamil ameliorating CsA nephrotoxicity

Key Word : Cyclosporine A Nephrotoxicity, Calcium Channel-Blocker, Morphologic Effect

서 론

Cyclosporin A(이하 CsA로 표기)는 1978⁶⁾ 이래 임상적으로 장기 이식후 널리 사용되고 있는 면역억제제로서 가장 심각한 부작용으로 신독성을 일으키는 것으로 밝혀져 있다⁹⁾. 그러나 CsA신독성의 발생 기전 및 병리학적인 변화, 특히 국소화적인(topographic)변화가 명확하게 밝혀지지 않고 있을 뿐 아니라, 많은 시도^{2, 10, 22)}에도 불구하고 만성 CsA신독성의 신병성있는 실험 모델도 확정되어 있지 않다. 따라서 CsA투여시 신장에서 일어나는 병리조직학적 변화 및 전자현미경학적 변화에 대한 국소화적 및 경시적인 관점에서의 학문적 연구가 필요하다. 또한 최근에는 칼슘길항제가 CsA신독성을 다소 감소시킬 수 있을 것으로 알려졌다^{33, 34)}. 그러나 칼슘길항제와 CsA의 복합적인 영향에 관하여서는 기능적인 측면에서의 연구³⁰⁾만 이루어지고 있을 뿐, 기전에 관련되어 있을 신장구조의 병리형태학적인 변화에 관한 보고는 국내외에 거의 알려져 있지 않다. 따라서 실험적으로 CsA신독성을 유발시킨 후 신장에서의 병리 형태학적인 변화를 관찰함과 아울러, 칼슘길항제를 CsA와 병용투여하여 칼슘길항제가 CsA신독성에 미치는 영향을 병리형태학적으로 규명하고자 하는 연구는 이 분야에 있어서 중요한 과제가 아닐 수 없다. 그러므로 본 연구자는 칼슘길항제를 CsA와 병용투여하여 칼슘길항제가 CsA신독성에 미치는 영향을 병리형태학적으로 규명하고자 한다.

재료 및 방법

(1) 재료

비교적 인체와 유사한 CsA신독성을 유발시

키는 것으로 알려진 Wistar 백서²²⁾ 수컷, 25주령되는 것을 사용하였다.

(2) 방법

Wistar백서를 1군당 25마리씩 3군으로 나누어 제1군은 CsA단독투여군으로 CsA 50mg/kg을 희생시키기 전날까지 매일 오후2시경에 경구 투여하였다. 제2군은 CsA와 칼슘길항제인 Verapamil의 병용투여군으로 CsA 50mg/kg와 Verapamil 20mg/kg를 희생시키기 전날까지 매일 동시에 경구투여하였다. 제3군은 CsA와 칼슘길항제의 병용투여군으로 제2군보다 Verapamil의 양을 적게 하여 10mg/kg를 CsA 50mg/kg와 함께 매일 동시에 경구투여하였다.

투여시작일로부터 3일, 1주, 2주, 3주, 4주째 각각 5마리의 백서를 희생시켜 신장을 적출하여 사구체 및 세뇨관 부위가 포함되게 종으로 절단하여, 반은 전자현미경 표본 제작용 고정액(0.5% glutaraldehyde, 0.1M phosphate buffer, pH7.4 4.3)에 고정하여 전자현미경 표본 제작과정에 따라 표본을 제작하여 형태학적 변화를 관찰하였다. 나머지 반의 신장은 광학현미경 표본제작을 위하여, 10% 포르말린에 고정시킨 뒤 파라핀 블록을 만들어서 일 반 헤마톡실린-에오진염색과 신사구체 및 세뇨관의 기저막을 관찰하기 위하여 PAS(Periodic Acid Schiff)와 Silver Methenamine(CSM)염색을 시행하였으며, 사구체 경화현상과 간질 조직의 섬유화 현상을 알아보기 위하여 Masson-Trichrome염색을 시행하였다. 또한 신세뇨관 상피세포의 봉입체(inclusion body)존재 유무 및 구성 성분을 확인하기 위하여 Chromotrope aniline blue(CAB)²⁶⁾ 및 Sudan black 지방염색을 시행하였다.

형태학적 관찰시 유의있는 소견을 상대적

으로 정량화하기 위하여 다음과 같은 채점기준을 적용하였다(Criteria of Score).

1) 세포질내 공포형성(vacuolation)은 관찰되지 아니하면 0점, 소수의 세뇨관에 국한되어 변화가 관찰되거나 하나의 세뇨관 단면에서도 일부 세포에만 공포가 관찰되면 1점, 공포가 관찰되는 세뇨관이 50% 미만이면 2점, 공포가 관찰되는 세뇨관이 50% 이상이면 3점으로 하였다.

2) 세포질내 봉입체(inclusion body)는 관찰되지 아니한 경우는 0점, 소수의 세뇨관에 국한되거나, 한 세뇨관의 단면에서 소수의 세포에만 관찰되는 경우를 1점, 세뇨관의 50% 미만에서 하나 이상의 봉입체가 관찰되면 2점, 50% 이상의 세뇨관에서 하나 이상의 봉입체가 관찰되면 3점으로 하였다.

3) 미세석회화(microcalcification)는 관찰되지 아니하면 0점, 일부 세뇨관 상피 세포내에 점상으로 관찰되면 1점, 상피세포의 석회화가 나타나면 3점으로 하였고, 상피세포의 석회화는 관찰되지 아니하였으나 세포 내에서 점상 이상의 석회화가 여러 곳에 관찰되면 2점으로 하였다.

Criteria of Score

1) Vacuolation

0 : no vacuole

1 : rare groups of cells or tubular cross-sections with vacuole

2 : patchy vacuolation(less than 50% of tubules)

3 : wide-spread vacuolation(over 50% of tubules)

2) Inclusion Bodies

0 : No inclusion body

1 : rare-occasional inclusion bodies

2 : many inclusion bodies in some tubular cross-sections

3 : many inclusion bodies in most tubular cross sections

3) Microcalcification

0 : No microcalcification

1 : rare microcalcifications in tubular epithelial cells

2 : occasional microcalcifications in tubular epithelial cells

3 : extracellular microcalcification foci or many intracellular microcalcification foci.

관찰 소견 및 성적

(1) 광학현미경 관찰 소견 및 성적

신장조직의 광학현미경 검색에서는 의미있는 변화가 3군에서 공통적으로 세뇨관에 국한되어 관찰되었으며, 유의한 사구체 및 혈관변화 그리고 간질 섬유화 현상은 관찰되지 아니하였다. 세뇨관 병변은 주로 근위세뇨관에서만 관찰되었는데, 그 소견으로서는 세포질내 불규칙한 공포형성, 세포질내 봉입체, 미세석회화였다. 앞서 성적에서 설정한 채점기준에 따라 채점한 결과는 Table 1과 같다.

1) 세포질내 공포형성은 공통적으로 3군에서 대개 근위세뇨관의 직부에 국한되어 관찰되었으며, 초기에는 공포의 크기가 매우 다양하였으나(Fig. 4, 5, 6), 3, 4주에 이르러서는 이러한 다양성이 다소 완화된 소견을 보였다. 공포 내에서 Sudan black 지방염색에 대한 양성반응은 관찰되지 않았다.

관찰시기는 CsA 단독투여군인 제1군과 제2군, 그리고 제3군에서, 다같이 경구투여 후 3일째부터 나타나기 시작하였으며, 주수가 증가함에 따라 점수가 높아졌다.

2) 봉입체는 호산성 반응을 나타내었으며 3군에서 공히 윤곽이 분명하지 않았고, 크기와 모양이 다양하여서 핵의 크기보다 큰 것도 관찰되었다. 특수조직화학염색의 결과로서는 Sudan black 지방 염색에서는 음성반응을 나타내며, PAS염색에서는 양성반응(Fig. 7)을 보였고, CAB염색에서는 붉게(red)염색되었다(Fig. 8).

봉입체의 출현은 제1군에서는 3일째부터, 제2군은 14일째부터, 제3군은 7일째부터 관찰되기 시작하며 주수의 증가에 따라 점수가 다

소 높아졌다.

3) 미세석회화는 주로 신피질과 수질의 경계부에 있는 근위세뇨관 상피세포에서 관찰되었는데 제1군은 7일째부터, 제2군과 제3군은 14일째부터 소수가 관찰되기 시작하여 주수가 증가함에 따라 점수가 높아졌는데, 공포형성이나 붕입체 관찰에 비해 상대적으로 훨씬 낮은 점수였다(Table 1).

이상의 결과를 통계적으로 검정하기 위하여 "0, 1, 2, 3"를 동일한 시점에서 백서 1마리당 관찰할 수 있는 평균수치로 산출하여 (Table 2) χ^2 -검정을 하였는데, 백서 한 마리당 평균적으로 관찰되는 공포형성은 초기에 제1군에서 다소 높은 빈도를 나타내었으나, 제1, 2, 3군 사이에 통계학적인 유의한 차이

가 인정되지 않았다($P>0.1$, Fig. 1). 붕입체 형성은 병용투여군인 제2, 3군에 비하여 단독투여군인 제1군에서의 관찰 빈도가 의미있게 높았다($P<0.05$ Fig. 2). 미세석회화는 관찰빈도가 적어서 통계처리(χ^2 -test)가 불가능하였으나, 제1군이 제2, 3군보다 다소 높은 빈도를 나타내었다(Fig. 3).

(2) 전자현미경 관찰 소견

전자현미경 검색에서는 제1, 2, 3군에서 공통적으로 내형질세망의 팽창(endoplasmic reticulum dilation) (Fig. 11, 12), 모양이 다양해지고 비대해진 자가 라이소솜(polymorphous enlarged autolysosomes) (Fig. 13-15), 팽창 또는 거대미토콘드리아(swollen or giant mitochondria) Fig. 14, 16), 유리된 리보솜(polyribosome)

Table 1. Results of Histopathological Findings in Proximal Tubule of the Kidney

Observation		Vacuolation				Inclusion Bodies				Microcalcification			
Group	Day	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Group I													
	3	1	1	1	—	2	1	—	—	3	—	—	—
	7	—	2	1	—	2	1	—	—	2	1	—	—
	14	—	2	3	—	—	4	—	—	1	4	—	—
	21	—	1	—	2	—	1	1	1	—	3	—	—
	28	—	—	2	2	—	1	2	1	—	2	1	1
Group II													
	3	1	1	1	—	3	—	—	—	3	—	—	—
	7	—	2	1	1	4	—	—	—	4	—	—	—
	14	—	1	3	—	—	3	1	—	3	—	1	—
	21	—	—	1	2	—	1	2	—	—	3	—	—
	28	—	1	2	1	1	3	—	—	1	3	—	—
Group III													
	3	—	2	1	—	3	—	—	—	3	—	—	—
	7	—	2	1	—	2	1	—	—	3	—	—	—
	14	—	1	4	—	3	2	—	—	3	2	—	—
	21	—	—	1	2	—	2	—	1	1	2	—	—
	28	—	—	1	2	—	—	2	1	—	2	1	—

The numbers denote the number of the rats showing the histopathological findings

(Fig. 13) 등을 관찰 할 수 있었으며, 시간 경과에 따라 그 변화의 정도 및 출현 빈도가 심해지고 많아지는 현상을 보였으며, 제1군에 비해 2, 3군에서 출현빈도 및 변화정도가 감소 또는 완화되는 소견을 보였다. 광학현미경 검색소견과의 상호관계를 보면, 광학현미경에서 공포로 관찰된 부분은 전자현미경에서는 조면 또는 활면내형질세망의 팽창으로 관찰되었으며, CAB염색시에 붉게 염색되는 봉입체는 대부분 다양한 모양의 자가라이소좀(Fig. 13-15) 형태로 관찰되었으나, 때로 거대 미토콘드리아 형태(Fig. 14)로도 소수가 관찰되었다. 3, 4주째의 근위세뇨관 상피세포내에서는 유리된 리보솜이 다수 관찰되었고(Fig. 16), 칼슘침착으로 보이는 소견(Fig. 16)도 세

포질 일부에서 관찰되었다. 솔변연(brush border)의 소실(Fig. 12)도 주수에 무관하게 일부 근위세뇨관 상피세포에서 관찰되었다.

고 안

CsA는 신장, 골수 등 장기 이식후에 일어나는 거부 반응을 예방하기 위한 목적으로 현재까지 가장 널리 사용되고 있는 면역억제제⁴이며 최근에는 자가면역질환 등 면역기전에 의해 발생한다고 알려진 여러 질환들의 치료제로서도 사용되기 시작하였다. 그러나 CsA를 임상적으로 사용함에 있어 가장 큰 문제점은 심각한 부작용인 신독성이다. 따라서 CsA의 임상적 적용 범위의 확대와 더불어 CsA로 치료받은 환자의 신독성에 대한 임상적인, 기

Table 2. Morphologic Effect of a Calcium Channel Blocker(Verapamil)on CsA Nephropathy

Observation		Vacuolation	Inclusion Bodies	Microcalcification
Group	Day			
Group I				
	3	0.33	1	0
	7	0.33	1.33	0.33
	14	1.2	1.6	0.8
	21	2	2.33	1
	28	2.5	2.5	1.75
Group II				
	3	1	0	0
	7	1.75	0	0
	14	1.75	1.25	0.5
	21	3.33	1.67	1
	28	2	0.75	0.7
Group III				
	3	1.33	0	0
	7	1.76	0.33	0
	14	1.8	0.4	0.4
	21	2.33	1.67	0.67
	28	2.33	1.67	1.33

The numbers denote the number of the rats showing positive findings

Vacuolation : $X_p > 0.1$, paired t-test(Group I, II; Group I, III, $P > 0.1$)

Inclusion : $X_p < 0.05$, paired t-test(Group I, II; Group I, III, $P < 0.05$)

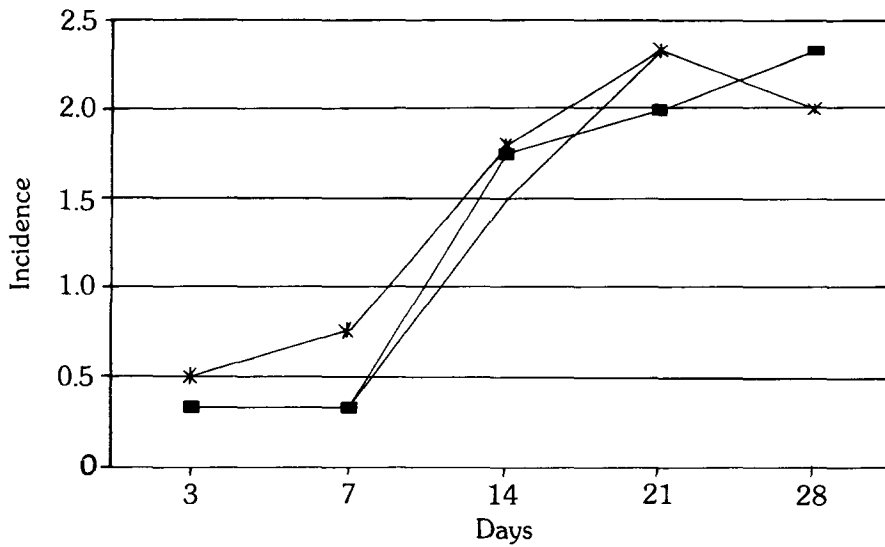


Fig. 1. Comparative Incidence of Tubular Vacuolation

■ : Group I, + : Group II, ※ : Group III

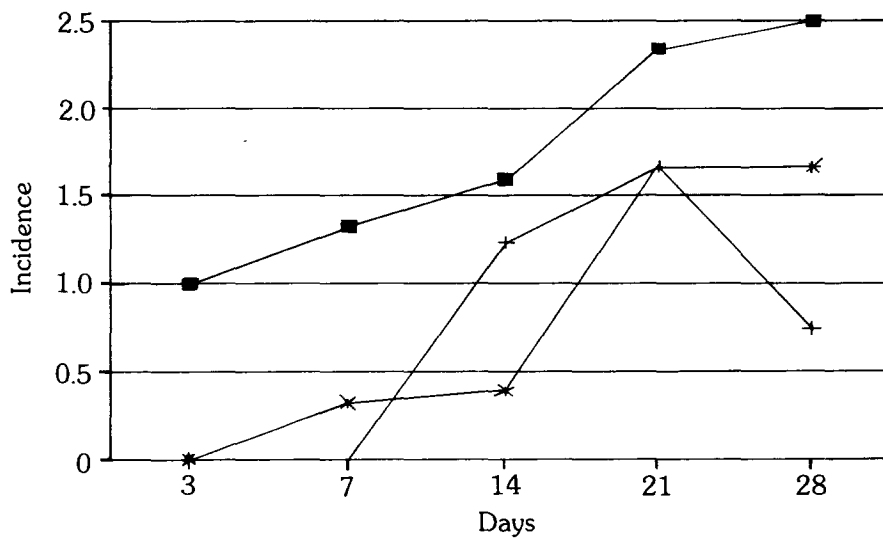


Fig. 2. Comparative Incidence of Tubular Inclusion

■ : Group I, + : Group II, ※ : Group III

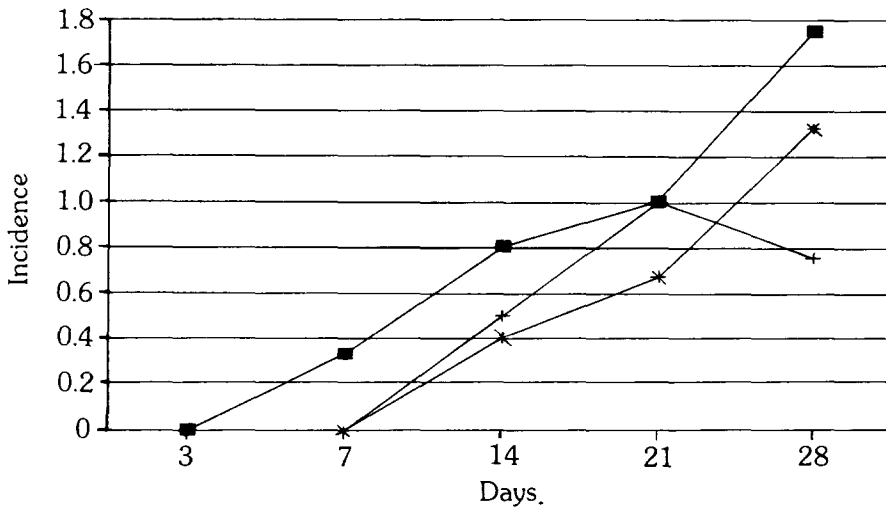


Fig. 3. Comparative Incidence of Tubular Microcalcification
 ■ : Group I, + : Group II, * : Group III

능화적인 측면에서의 연구가 많이 이루어지고 있으며, 또한 인체의 신생검조직에서 관찰되는 형태학적인 변화에 대한 연구도 최근들어 많이 보고되고 있으나 보고자마다 이견^{7,19)}이 있으며, 아직도 정확한 신독성 발생 기전이나 병리학적인 변화가 확립되어 있지 않다. 또한 이러한 CsA 신독성을 예방하거나 다소라도 경감시키기 위한 여러 시도^{4,18,22)}들이 있어 왔는데, 그중에서도 Wagner 등³⁾이 칼슘길항제가 CsA로 치료받는 동종 신이식 수용자의 초기 이식 기능에 이로운 영향을 끼친다는 사실을 증명하고 난 뒤부터, 칼슘길항제와 CsA 병용투여에 대한 연구가 임상 및 기능학적인 측면에서 이루어지고 있다. 그러나, 아직은 이에 대한 병리학적인 측면에서의 연구는 국내외에서 접하기 힘들다. 따라서 저자는 실험동물에서 신독성을 유발시켜서 광학 및 전자현미경적으로 병리형태학적인 변화를 관찰하고, CsA 신독성을 임상적으로 다소 경감시킬 수 있을 것으로 알려진 칼슘길항제를 CsA와 동시에 병용 투여함으로써 형태학적인 변화에도 어떤 영향을 미칠 수 있을 것인지를

규명하고자 하였다.

Mihatsch 등^{17,19)}은 사람에서의 CsA 신독성을 발생 시기와 임상소견을 기준으로 하여 다음과 같은 3가지형으로 구분하였다. : 1) 장기간의 무뇨, 핏뇨를 특징으로 하는 환자에서 볼 수 있으며, 병리학적으로는 미만성 간질 섬유화를 특징으로 하는 상호작용 신독성 : 2) 정상 신조직 또는 세뇨관 주위 모세혈관 울혈 또는 CsA-tubulopathy 등의 형태학 소견을 보이는 급성 신독성 : 3) CsA-arteriopathy 또는 세뇨관 위축을 동반하거나 하지 않은 간질 섬유화 소견을 보이는 만성 신독성. 최근까지 사람에서의 이런 3가지형의 신독성을 여러 실험동물에서 재연시켜 보고자 하는 노력들^{18,22)}이 있어 왔는데, 급성 신독성만을 실험동물에서 유발시킬 수 있다고 알려져 있다. 이러한 실험적으로 유발시킨 신독성의 구조적 변화는 CsA의 용량, 실험동물의 종, 연령, 성별 등에 따라 차이가 있는데^{10,22)}, 특히 Wister 백서가 가장 좋은 실험모델로 신이식 환자에서 쓰는 용량의 5배 정도인 고투여량(high CsA dose : (≥ 50 mg/kg/day)을

투여한 백서에서 가장 사람에서와 비슷한 신독성 병변을 재현할 수 있었다고 Blair 등³⁾, Jean 등¹²⁾은 보고하고 있다. 또한 Jean 등¹²⁾은 Wister 백서에서 일어나는 신독성을 전자현미경으로 관찰하고는 사람이 CsA 만성 신독성의 믿을만한 동물 모델은 Wister 백서라고 하였다. 또 일반적으로 암(female) 백서가 수(male) 백서 보다 CsA에 저항성이 보다 강하다고 한다²²⁾. 따라서 본 연구에서는 실험동물로는 수컷 Wister 백서를 사용하였으며, CsA는 매일 1회 50mg/kg의 용량으로 경구로 투여하였다. 만성 CsA 신독성의 특징적인 변화로 Thiru 등³⁰⁾은 사람에서는 세뇨관상피세포내의 거대 미토콘드리아, 등척성 공포형성(isometric vacuolization), 미세석회화, 신세뇨관의 위축 등과 같은 세뇨관 변화, 세동맥벽의 비후 등의 세동맥 변화, 그리고 간질의 섬유화 등의 변화가 관찰되며, 가끔은 혈소판 혈전이나 경화현상이 사구체에서 관찰되기도 한다고 하였다. 그러나, Ryffel 등²²⁾이나 Mihatsch 등¹⁸⁾은 실험동물에서는 사구체나 세동맥의 변화는 거의 유발되지 않으며, 특징적인 변화가 신세뇨관 중에서도 근위세뇨관에 국한되어 관찰된다고 하였는데, Wister 백서에서의 CsA 신독성시 특징적인 변화로는 상피세포내의 붓입체, 비등척성 공포형성, 미세석회화 소견을 들고 있다. 그러나, Blair 등³⁾이나 Whiting 등^{35, 36)}은 Sprague-Dawley 백서에서 근위세뇨관 상피세포의 공포형성과 괴사 그리고 일부 세포의 탈락만을 관찰할 수 있었다고 하였는데, 이러한 형태학적인 차이는 종이 다른데서 기인한다고 생각할 수 있을 것 같다. 본 검색에서 관찰가능한 53마리에서는 근위세뇨관에만 의미있는 변화가 관찰되었는데, 상피세포내의 공포형성이 51마리(96.23%), CAB염색에 붉게 염색되는 세포질 붓입체 출현이 33마리(62.26%), 미세석회화형성이 27마리(50.94%)에서 관찰되었고, 이러한 광학현미경 검색의 결과는 Mihatsch 등¹⁸⁾이나 Ryffel 등²²⁾의 연구 결과와 일치된다고 하겠다. 또 Mihatsch 등¹⁸⁾은 공포와 붓입체는

투여시작 후 3일째부터, 미세석회화는 투여시작 후 5일째부터 관찰되기 시작하여 시간경과에 따라 빈번하게 관찰된다고 하였는데, 본 연구에서도 공포와 붓입체는 3일째부터 미세석회화는 7일째부터 관찰되기 시작하여 주수가 경과함에 따라 빈도 역시 많아졌다. 단지 동시점에서 관찰되는 평균 수치를 비교해보면(Fig. 3) 본검색에는 Mihatsch 등¹⁸⁾이나 Ryffel 등²²⁾의 결과보다 붓입체와 미세석회화가 다소 적게 관찰되었는데, 이는 본 연구에서 경구투여를 함으로써 흡수율이 감소되었고 생체이용률 또한 개체마다 심한 차이를 보이기 때문이라고 생각된다. 그러나 Thiru 등³⁰⁾이 사람의 CsA 신독성시 세뇨관 상피세포내에서 관찰된다고 한 거대 미토콘드리아가 본 Wister 백서를 대상으로한 실험에서도 CAB염색에서 붉게 염색된다는 점으로 볼 때, Wister 백서가 인체와 가장 유사한 CsA 신독성 실험모델이라는 Jean 등²⁰⁾의 의견도 지지할 수 있는 결과라고 하겠다. 전자현미경 검색에서 Whiting 등^{35, 36)}은 조면 및 활면내형질세망의 팽창, 라이소좀 형성의 증가, 골수구모양의 붓입체(myeloid body)가 관찰된다고 하였으며, Blair 등³⁾도 활면내형질세망의 팽창 및 공포형성, 라이소좀 수의 증가, 골수구모양체(myeloid figures) 형성을 관찰할 수 있다고 하였고, Pfaller 등²¹⁾은 지방적, 자가 및 이식세포, 라이소좀 증식, 리보솜소체, 솔변연의 용해 등을 관찰할 수 있었다고 하였다. 그러나, 본 전자현미경 검색에서는 세포내 붓입체로 광학현미경에서 관찰되었던 부분에 국한되어 형태가 다양하며 골기소체, 이중막잔존물 또는 미토콘드리아 격막들의 일부가 포함되어 있는 거대한 자가라이소좀(Fig. 13)들이 관찰되었으며, 이는 세포막 성분의 교체가 비특이적으로 증가된 결과라고 추측된다. 사람에서는 광학현미경상의 붓입체가 전자현미경에서는 거대 미토콘드리아로 관찰 되는데 반해^{14, 30)} 본 연구에서는 대부분이 자가라이소좀 형태로 관찰되었고 일부에서만 거대 또는 심하게 팽창된 미토콘드리아가 관찰되었는데, 이 관찰 결과

는 실험동물에서는 거의 라이소솜 형태로 관찰된다고 한 Jean 등¹²⁾이나 Mihatsch 등¹⁸⁾, Ryffel 등²²⁾의 연구결과와 일치된다고 할 수 있다. 그러나, 아직도 이런 라이소솜들이 외부에서 영입된 약제 등으로 인한 이중식작용에서 기원하는 것인지 또는 동종식작용에서 기원하는 것인지에 대한 논란이 있는데¹⁸⁾, 본 연구에서는 일부 라이소솜내에서 골기소체나 막성잔존물, 미토콘드리아 격막 등이 관찰되는데 비추어, 적어도 부분적으로 동종식작용 기원을 지지할 수 있다고 하겠다. 광학현미경에서 특징적으로 세뇨관상피세포내 크기가 다양한 공포형성이 관찰되었는데, Thomson 등³¹⁾은 다량의 CsA를 투여하는 경우에 실험동물에서도 등척성 공포형성을 관찰할 수 있다고 하였으나, 본 검색에서는 관찰되지 않았으며, 이는 Mihatsch 등¹⁸⁾과 Ryffel 등²²⁾의 관찰소견을 지지하는 결과이다. 이러한 공포들이 전자현미경 검색에서는 내형질세망, 특히 조면 내형질세망의 팽창으로 관찰되었을 뿐 Pfaller 등¹²⁾은 본 연구 결과와 같이 공포형성은 내형질세망의 팽창에 의한 것이라고 보고하였으며, 특히 Jean 등¹²⁾은 공포의 내용물은 매우 미세한 과립상인 변성된 단백질일 것이라고 하였다. 그러나, 저자의 현미경 관찰에서는 공포내에서 변성된 단백질로 생각되는 전자고밀도 물질은 관찰되지 아니하였으며, 공포화된 세포의 일부에서 솔변연이 가끔 소실되어 관찰되기도 하였는데, 이는 Beck 등¹¹⁾의 연구에 보고되어 있듯이 아미노산과 당의 이동에 결함이 생기고, 효소노가 나타나는 원인이 될 것이라고 생각된다. 본 검색에서는 Jean 등¹²⁾이 전자현미경 검색에서 관찰한 것과 같은 수입세동맥 중막의 근세포 괴사 등은 관찰되지 않았는데, 이는 전자현미경 검색에서의 제한된 관찰 범위 때문인지 또는 Mihatsch 등¹⁸⁾이나 Ryffel 등²⁴⁾의 보고와 같이 Sprague-Dawley 백서나 Wister 백서를 포함한 정상 혈압 백서에서는 세동맥 변화가 거의 유발되지 않으며, 단지 특발성 고혈압 백서에서만 세동맥의 중막괴사 및 고혈압성 맥관장애

가 유발되기 때문인지는 결론내리기 힘들다 하겠으며, 이를 규명하기 위해서는 보다 광범위한 관류 고정(perfusion fixation)방법을 이용한 병리학적 검색이 필요하다고 하겠다.

Ryffel 등²²⁾은 특발성 고혈압 백서에 CsA와 함께 칼슘길항제인 Verapamil을 20mg/kg/day로 사료에 섞어서 같이 투여했을 때 혈압상승이나 임상적인 혈청기준 척도에 영향을 미치는 것은 아니며 조직학적 변화 그중에서도 특히 세동맥병변을 감소시키며, 세뇨관 병변도 다소 감소시킬 수 있을 것이라고 하였다. 그러나 아직은 이에 대한 연구뿐 아니라 Verapamil의 용량과 조직학적 변화의 경감과의 상관관계에 대한 국내외 문헌을 접할 수 없었기에 본 연구에서는 Verapamil의 용량을 10mg/kg(제3군), 20mg/kg(제2군)으로 달리 하여 실험을 진행하였다. 본 연구 결과에서도 Verapamil과의 병용투여군에서 붕입체는 의미 있는 감소 소견을 나타내었고, 공포형성이나 미세석회화는 유의한 감소는 아니지만 다소 감소하는 현상을 보였으나, 제2군과 제3군사이에 유의한 차이가 인정되지 않았는데, 이로써 Verapamil의 용량과 조직학적 변화사이에는 큰 상관관계가 없는 듯이 보인다. 칼슘길항제가 CsA 신독성을 감소시키는 기전으로는 우선 세포 상해의 중요한 인자로서 알려져 있는 칼슘에 대한 길항작용을 들 수 있는데^{8, 13, 16, 27)} 특히 칼슘이 신장손상에 미치는 영향으로는 사구체 기능 및 구조, 신동맥, 혈관, 그리고 세뇨관에 이르는 광범위한 것으로 생각되나 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 이론적으로는 칼슘길항제가 신손상을 예방 또는 감소시킬 수 있을 것으로 생각되며, CsA로 인한 신독성 또한 감소시킬 수 있을 것으로 추측된다. Wagner 등³⁴⁾은 칼슘길항제가 CsA 혈중 농도를 상승시키면서도 CsA신독성을 다음과 같은 4가지 기전으로 감소시킬 수 있을 것이라고 보고하였다. 즉 칼슘길항제는 CsA의 세뇨관-사구체 귀환기전을 불활성화시키고, CsA로 인한 수입세동맥 수축을 이완시키며, 초여과계수(GFR)를 정상화시킬 수

있고, 또한 CsA가 세뇨관 상피세포로 흡수되는 것을 억제하여 세포내의 CsA 축적을 감소시킴으로써 세뇨관 상피세포 상해를 경감시킬 수 있을 것이라는 가설을 제의하였다. Kohlhaw 등⁵⁾도 칼슘길항제가 간의 cytochrome P-450 system에서 CsA와 상호경쟁적으로 작용하며, 지방세포 및 신세뇨관 상피세포 등 세포내의 축적을 억제함으로써 CsA 혈중 농도를 상승시킨다고 하였다¹¹⁾.

본 연구 결과는 CsA 혈중 농도를 반영한다고 알려진 공포형성은 칼슘길항제 병용투여군에서 의미있는 감소가 없는 반면, 직접적인 세포 상해로 인한 소기관인 자가식작용의 형태인 거대 자가라이소좀인 붕입체는 의미 있는 감소를 보인 현상으로 미루어 볼 때 칼슘길항제가 CsA의 세뇨관 상피세포내로의 축적을 억제한다는 Wagner 등³⁴⁾, Kohhaw 등¹⁵⁾의 가설과 Chandrasekharam 등⁷⁾이 분리배양된 근위세뇨관 상피세포에서 칼슘길항제가 칼슘뿐 아니라 CsA의 흡수까지 억제한다는 사실을 보고하면서 아마도 근위신세뇨관 상피세포막에 있는 CsA 이동/결합 부위와 칼슘 이동 통로가 상호작용을 하거나, 밀접한 연관성이 있을 것이라고 한 학설을 지지한다고 할 수 있다.

따라서, 본 연구 결과로서 CsA와 칼슘길항제를 병용투여하면 CsA 단독투여시보다도 신세뇨관 손상을 감소시킬 수 있다고 병리형태학적으로 해석할 수 있는 소견이 확인되었다. 앞으로 이러한 연구 결과를 인체에 임상적으로 적용하는 연구가 기대되며, 이 때 관찰되는 인체에서의 병리형태학적 변화와 실험동물에서 관찰되는 본 연구 결과를 비교하는 연구 또한 필요하다고 사료된다.

결 론

장기 이식후 널리 사용되는 면역억제제인 CsA의 반복 투여시 신장에서 일어나는 형태학적인 변화를 관찰하고, 임상적으로 CsA 신독성을 다소 감소시키는 것으로 알려진 칼슘길항제인 Verapamil을 CsA와 병용투여할 때,

CsA 단독투여시에 일어나는 신장의 형태학적 변화에 미치는 영향의 여부를 알아보기 위하여 본 연구를 시행하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CsA 단독 및 Verapamil 병용투여시 관찰되는 신장의 형태학적 변화는 CsA 단독 투여군과 CsA와 Verapamil 병용투여한 군에서 공통적인 소견을 보였다. 병리형태학적 변화는 근위세뇨관에 국한되어 관찰되었는데, 광학현미경 검색의 형태학적 변화로서는 세뇨관 상피에 공포 형성과 호산성 붕입체, 그리고 미세석회화가 특징적이었으며, 전자현미경적 검색에서 조면 및 활면 내형질세망의 팽창, 다양한 모양의 거대 자가라이소좀과 심하게 팽창된 미토콘드리아, 그리고 세포내의 칼슘 침착으로 해석되는 전자고밀도 물질이 관찰되었으며, 이러한 소견들은 투여기간과 투여량에 비례하여 그 출현 빈도와 정도가 심한 것으로 관찰되었다.

2. 상피세포내의 공포 형성과 미세석회화는 CsA 단독 투여군에 비해 칼슘길항제의 병용투여군에서 다소의 감소는 있었으나 의미 있는 차이가 인정되지 아니하였고, 세포질내 붕입체는 Verapamil의 병용투여군에서 의미 있는 감소를 나타내었다. 이러한 현상은 Verapamil 투여량(20mg/kg, 10mg/kg)과는 무관한 것으로 인지되었다.

따라서 이러한 결과는 CsA 신독성시 CsA와 함께 칼슘길항제를 병용투여하면 신세뇨관 손상을 다소 감소시킬 수 있다는 병리형태학적인 근거로 해석된다.

REFERENCES

1. 권영주, 이규백, 등 : 실험적 허혈성 급성 신부전 모델에 대한 칼슘길항제의 효과, 대한 내과학회 잡지 2 37권 제4호 : 519-526, 1989
2. Becak W, Scharer K, Waldherr R, Schmidt-Gayk H : Inhibition of renal gluconeogenesis by cyclosporin A in rats. Abstract congress of the EDTA-European. Re-

- nal Association Brussel, 1985.
3. Belitsky P, Ghose T, et al : Tissue distribution of cyclosporin A in The mouse ; a clue to toxicity ? Clinical Nephrology 25(Suppl. 1) : 27-29, 1986.
4. Blair JT, Thomson AW, et al : Toxicity of the immune suppressant cyclosporin A in the rat. J.Path. 138 : 163-178, 1982.
5. Borel JF, Lahest KJ, Hodgkin P : Cyclosporin A ; Models for the mechanism of action. Thansplant Proc. 15(Supple. 1) : 26, 1983.
6. Brunner FP, Hermle M, et al : Mannitol potentiates cyclosporin nephrotoxicity. Clinical Nephrology 25(Supple. 1) : 130-136, 1986.
7. Calne RY, White DJG, et al : Cyclosporin A in patient receiving renal allografts from cadaver donors. Lancet 2 : 1323-1327, 1987.
8. Chandrasekharam NN, David BN, et al : Cyclosporin A transport in isolated renal proximal tubular cells : Inhibition by calcium channel blockers. Biochemical and Biophysical Research Communication 157(No.3), 1226-1230, 1988.
9. Cheung JY, Bonventre JV, et al : Calcium and ischemic injury. NEJM. 314 : 1670-1676, 1986.
10. Cohn DJ, Strom TB, et al : yclosporine : A new immunosuppressive agent for organ transplantation. Ann. Intern. Med. 101 : 667-682, 1984.
11. Duncan JL, Thomson AW, et al : Cyclosporine-induced renal structural damage : influence of dosage, strain, age and sex with reference to the rat and guinea pig. Clinical Nephrology 25(Suppl.1) : 14-17, 1986.
12. Elzinga L, Vicki E, et al : Modification of experimental nephrotoxicity with fish oil as the vehicle for cyclosporine. Transplantation 43(No.2) : 271-274, 1987.
13. Jean F, Brigitte K, et al : Light and Electron Microscopic changes in the kidney of wister rats following treatment with cyclosporin A. Ultrastructural pathology 11 : 435-448, 1987.
14. Goldfard D, Iainer A, et al : Ischemic acute renal failure in the rat. Proceedings of the society of Experimental Biology and Medicine 172 : 389-392, 1983.
14. Hay R, Tammi K, et al : Alterations in molecular structure of renal mitochondria associated with cyclosporin A treatment. Clinical Nephrology 25(Suppl. 1) : 23-23, 1986.
16. Kohlhaw K, Wongeik K, et al : Effect of the calcium channel blocker Diltiazem on cyclosporin A blood levels and dose requirements Transplantation Proc. 20(No.2, Suppl. 2) : 572-574, 1988.
17. Mihatsch MJ, Thiel G, et al : Morphological findings in kindey transplants after treatment with cyclosporine. Transplant Proc. 15 : 2821-2835, 1983.
18. Mihatsch MJ, Ryffel B, et al : Morphology of cyclosporine nephrotoxicity in the rat. Clinical Nephrology 25(Suppl. 1) : 2-8, 1986.
19. Mihatsch MJ, Thiel G, et al : Morphology of cyclosporine nephropathy. Prog. Allegy 38 : 447-457, 1986.
20. Bryan D, Myer MB, et al : Cyclosporine-associated chronic nephropathy. NEJM.311(No.11) : 699-705, 1984.
21. Pfaller W, Kotanko P, et al : Morphological and biochemical observations in rat nephron epithelial following cyclosporin A(CsA) treatment. Clinical Nephrology 25(Suppl. 1) : 105-110, 1986.
22. Ryffel B, Siegl H, et al : Experimental cyclosporine nephrotoxicity. In Kidney trans-

- plant rejection : Diagnosis and Treatment. edited by G.Melville Marcel Dekker IWC, 1986, p383-409.
23. Ryffel B, Wilson J, et al : Problems of cyclosporine localization in the renal tissue. *Clinical Nephrology* 25(Suppl. 1)34-36, 1986.
24. Ryffel B. Petric R, et al : Nephrotoxicity cyclosporine in spontaneously hypertensive rats. Effects on blood pressure and vascular lesions. *Clinical Nephrology* 25(Suppl 1) : 193-198, 1986.
25. Ryffel B, Foxwell BJ, et al : Metabolites of Cyclosporine Biologic Significance of cyclosporine Metabolites. *Transplantation Proc.* 20(No.2, Supple 2) : 575-584, 1988.
26. Scheuer PJ : Liver biopsy interpretation. 3rd ed. Bailliers Lunden 1978, p15.
27. Scheuer et al : Cellular calcium in ischemic acute renal failure : Role of calcium entry blockers. *Kidney International* 32 : 313-321. 187.
28. Sibly RK, et al and Najarian JS : Morphology of cyclosporine nephrotoxicity and acute rejection in patients immunosuppressed with cyclosporine and prednisone. *Surgery* 94(No.2) : 225-234, 1983.
29. Stahl RAK, Kudelka S : Chronic cyclosporin A treatment reduces prostaglandin E₂ formation in isolated glomeruli and papilla of rat kidneys. *Clinical Nephrology* 25(Suppl. 1) : 78-82, 1986.
30. Thiru S, Calne RY : Giant mitochondria, renal transplant biopsy and Cyclosporine A. *Lancet* 2 : 147, 1981.
31. Thomason AW, Whiting PH, et al : Pathologic changes developing in the rat during a 3 week course of high dosage cyclosporin A and their reversal following drug withdrawal. *Transplantation* 32 : 221-227, 1981.
32. Verpooten GA, Wybo I, et al : Cyclosporine nephrotoxicity : Comparative cytochemical study of rat kidney and human allograft biopsies. *Clinical Nephrology* 25(Suppl. 1) : 18-22, 1986.
33. Wagner K, Neumayr MH : Prevention of delayed graft function in cadaver kidney transplants by diltiazem. *Lancet* 2 : 1355-1356, 1985.
34. Wagner K, Henkel M, et al : Interaction of calcium blockers and cyclosporine. *Transplantation Proc.* 20(No.2, Suppl. 2) : 561-568, 1988.
35. Whiting PH, Thomson AW, et al : Experimental Cyclosporin A nephrotoxicity. *Br. J. Exp. Path.* 63 : 88-94, 1982.
36. Whiting PH, Simpson JG, et al : Pathological Changes in rats receiving cyclosporin A at immunotherapeutic dosage for 7 weeks. *Br. J. Exp. Path.* 64 : 437-444, 1983.

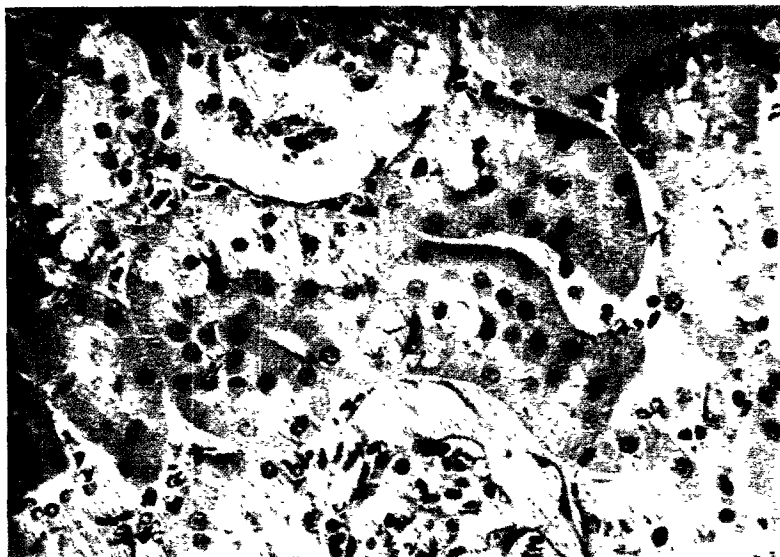


Fig. 4.(+)Tubular vacuolation in the straight part of the proximal tubules.(x200, H-E)

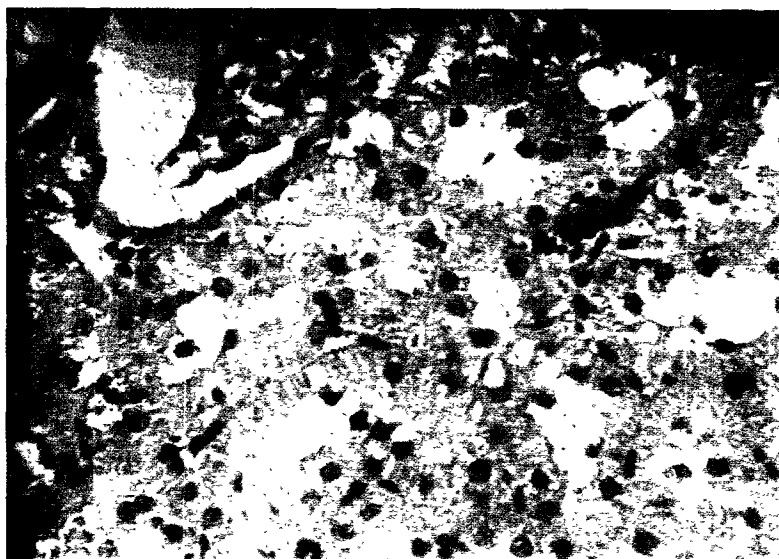


Fig. 5. : (++) Irregular tubular vacuolation.(x200, H-E)

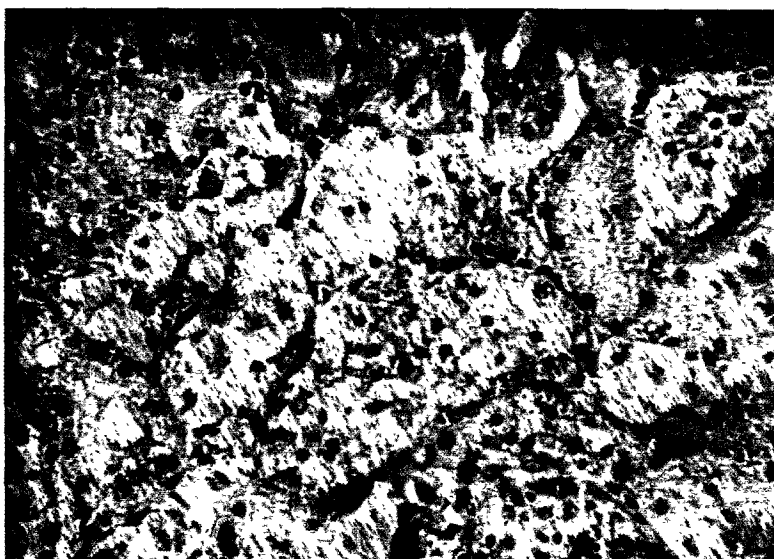


Fig. 6. : (+ + +) Tubular vacuolation.(x200, H-E)

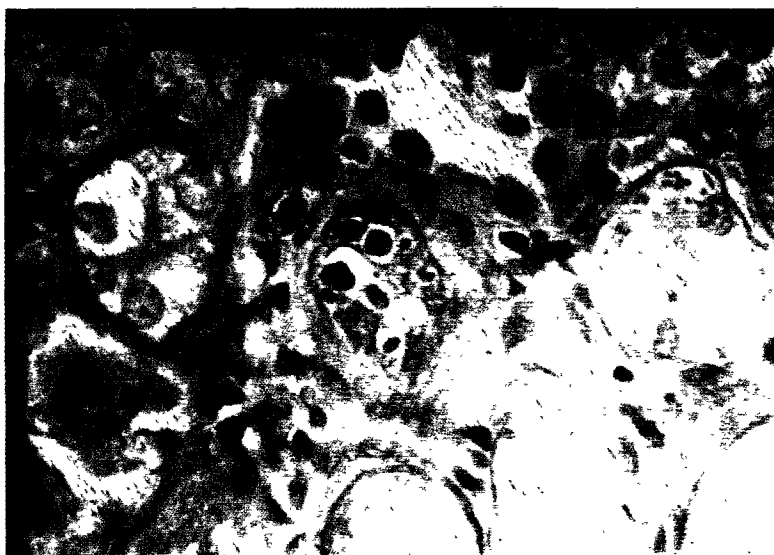


Fig. 7. : (+) PAS(+) Tubular inclusion bodies.(x200, PAS)

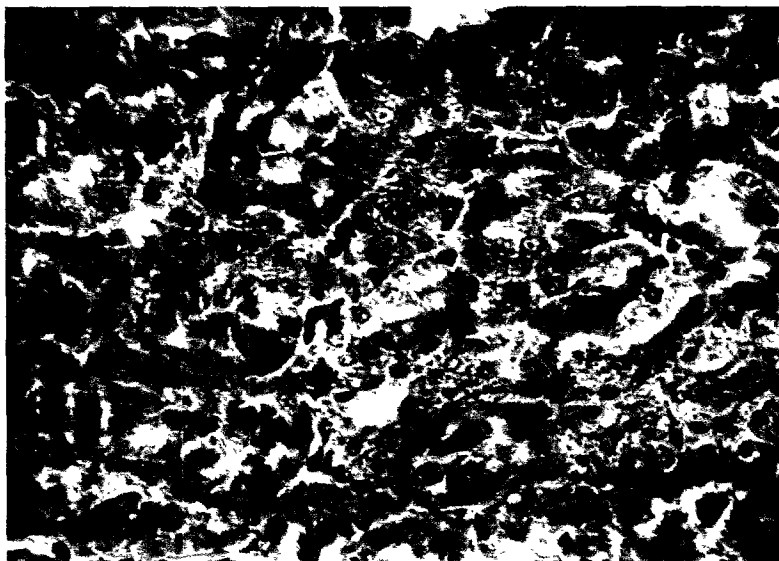


Fig. 8. : (+ + +) CAB-(red) Tubular inclusion bodies.(x200, CAB)

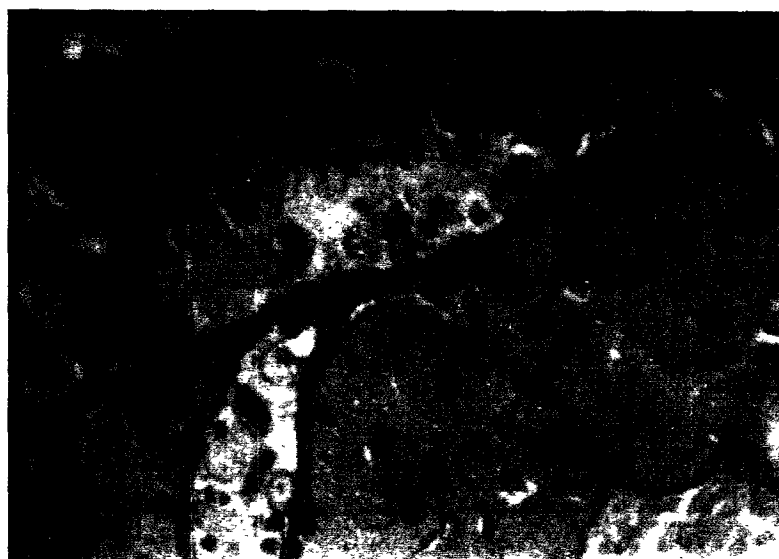


Fig. 9. : (+) spotty microcalcification in tubular epithelial cells.(x200, PAS)



Fig. 10. : (+ + +) Extracellular calcification obliterate the lumen of the tubule.(x200, PAS)

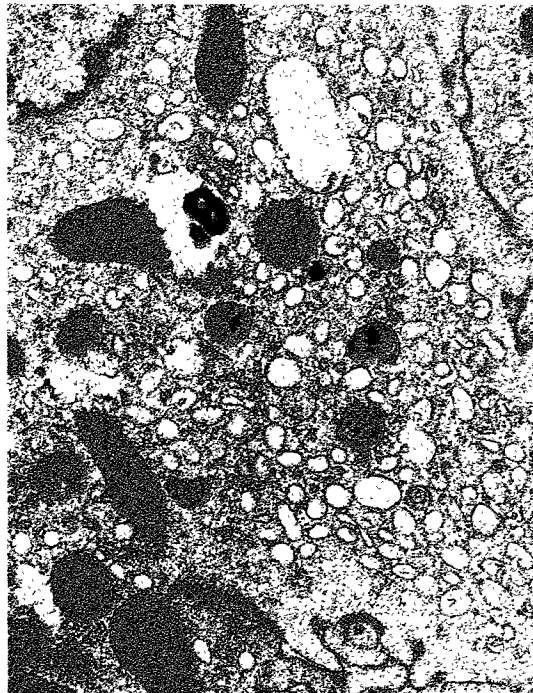


Fig. 11.A part of proximal tubule with dilation of endoplasmic reticulum (ER), 3 day after CsA administration.(E-M, x15000)

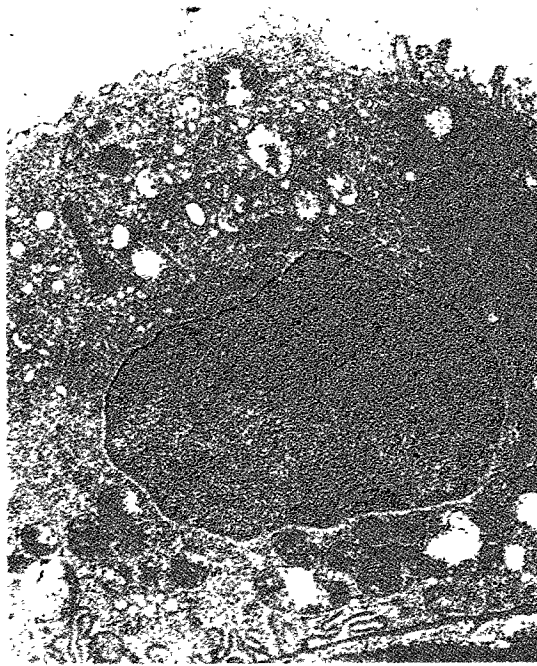


Fig. 12 : Proximal tubule of the kidney of Wistar rat, 7 days after start of CsA administration, showing of brush border and dilatation of ER.(E-M, x8000)

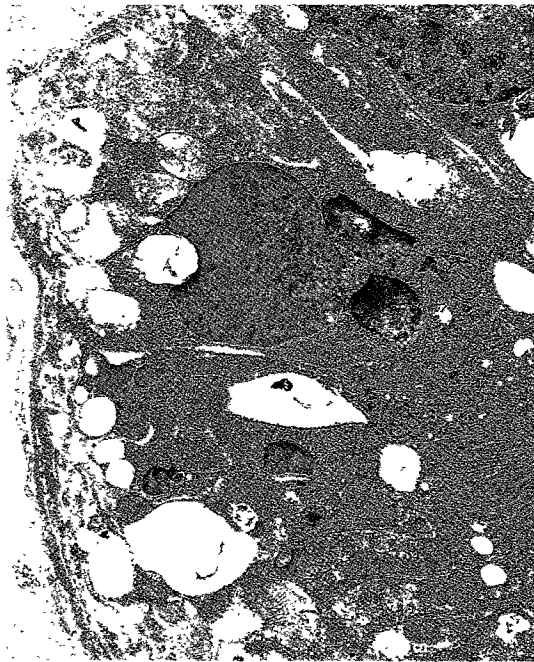


Fig. 13 : Proximal tubule, 21 days after CsA concomitant with Verapamil(20mg/kg) administration, showing markedly dilated E-R, increased and enlarged autolysosomes, and swollen mitochondria.(E-M,x5000)

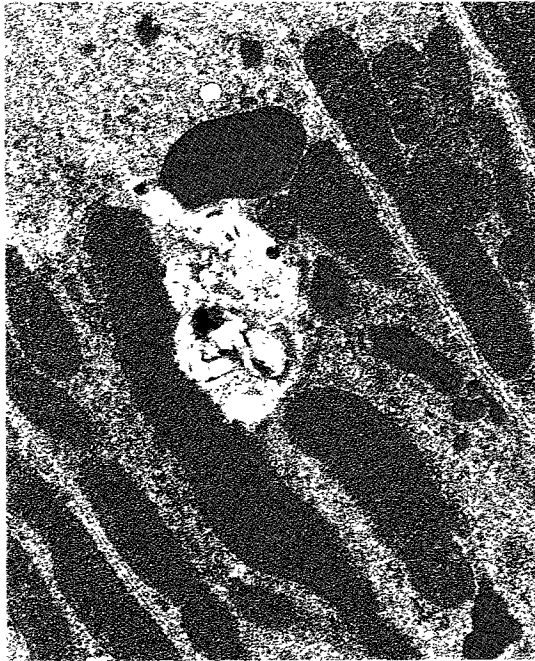


Fig. 14 : Autolysosomes with markedly enlarged and degenerated mitochondrias.(E-M, x5000)



Fig. 15 : Autolysosomes containing remnants of membraneous material and mitochondrial cristae.(E-M, x1500)

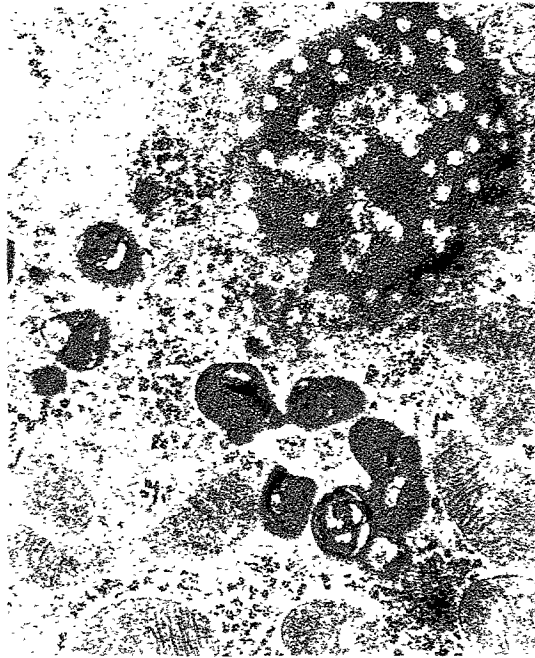


Fig. 16 : Proximal tubule, 21 days after CsA administration, showing numerous polyribosomes, degraded and swollen mitochondrias, and calcification.(E-M, x10000)