

고양이의 신장에서 Ethacrynic Acid 가 PAH 분비에 미치는 영향

부산대학교 의과대학 생리학교실

김용근 · 정진섭 · 김주현 · 서덕준 · 이상호

= Abstract =

Effect of Ethacrynic Acid on Renal Tubular Secretion of PAH in Anesthetized Cat

Y.K. Kim, J.S. Jung, J.H. Kim, D.J. Suh and S.H. Lee

Department of Physiology, College of Medicine, Busan National University

The effect of ethacrynic acid(EA) on the renal secretion of PAH was examined in cat kidney. C_{PAH} and T_{PAH} were measured before and after infusion of EA (0.5~50 mg/kg) through the femoral vein.

The following results were obtained:

1) In the dosage range of 0.5 to 25 mg/kg, EA increased the urine flow, and sodium and potassium excretion in dose-dependent manner, but the glomerular filtration rate was decreased as the dosage of EA was increased.

2) C_{PAH} and T_{PAH} were decreased by EA in the dosage range of 3 to 25 mg/kg and 1 to 50 mg/kg, respectively, in dose-dependent manner with the dosage to cause 50% inhibition of about 5 mg/kg.

3) With dosage of 0.5mg/kg, EA appeared to exert a great effect on diuretic response without the influence on T_{PAH} . At 10min after infusion of EA, a potent diuretic effect appeared, while T_{PAH} did not show a significant change. These results suggest that the action mechanism of EA on tubular secretion of PAH may be different from that on natriuresis.

4) With dosage of 5 mg/kg, EA did not inhibit the Na-K-ATPase activity in microsomal fractions from both cortex and medulla.

5) The double reciprocal plot($1/T_{PAH}$ versus $1/P_{PAH}$) suggested that EA inhibited the PAH secretion by a competitive pattern. However, probenecid, a prototypic inhibitor of the organic acid pump, had no influence on both the inhibitory effect of T_{PAH} and the natriuretic effect by EA.

These results suggest that in vivo EA altered tubular secretion of PAH through interactions with receptors that are not identical with the Na-K-ATPase.

서 론

Ethacrynic acid(EA)가 in vitro에서는 고농도에서 Na-K-ATPase를 억제하나^{1,13,26,44}, in vivo 상태에서는 연구자들간에는 일치된 의견을 보이지 않고 있다.

Duggan 및 Noll¹⁷, Nechay 및 Contreras³³, Lie, et al²⁹은 EA를 생체내 주입했을 경우 Na-K-ATPase 활성을 억제한다고 하였으나, London 및 Fitzpatrick³⁰, Sen, et al³⁹은 Na-K-ATPase 활성에 영향이 없다고 하였으며, Inagaki, et al²⁶은 개에서 그리고 Ebel, et al¹⁹은 쥐에서 심한 노배설 및 Na 배설을 증가시키기에

충분한 양을 주입해도 Na-K-ATPase 활성을 억제하지 않는다고 하였고, 최근에 Westenfelder, et al⁴⁶⁾도 개에서 이노작용을 일으키는 농도에서도 Na-K-ATPase 활성을 억제하지 않는다고 보고함으로써 EA가 신장에서 Na-K-ATPase를 억제하여 이노효과를 나타내는 것에 대해서 아직까지 명확히 밝혀지지 않았다.

신세노관을 통한 para-aminohippuric acid (PAH)의 능동적분비의 Na-K-ATPase과는 직접 혹은 간접적으로 연관을 가지고 있음이 보고되고 있어^{4,11,15,22,32,35,40)}, Na-K-ATPase 활성을 억제하는 물질은 PAH의 능동적 이동에 영향을 미칠 수 있는 것으로 생각된다. 그러나 EA가 신세노관에서 PAH이동에 어떻게 영향을 미치는지, 또한 그 영향이 Na-K-ATPase활성과 연관을 가지고 있는지에 대해서는 알 수가 없으며, 이전 연구에서²⁷⁾ 신피질절편에서 EA는 Na-K-ATPase 활성을 억제하지 않는 농도에서도 PAH의 능동적 이동을 억제하고 있음이 밝혀졌으나 생체내 주입했을 경우에도 같은 결과가 나타나는지에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 특히 Robinson, et al³⁶⁾은 개에서 EA가 C_{PAH}에 영향을 미치지 않는다고 하였으며 Friedman 및 Roch-Ramel²¹⁾도 이노효과를 나타낼 때 EA와 유사한 작용기전을 가진 것으로 알려진^{10,12)} furosemide나 bumetanide가 강력한 이노효과를 나타내는 농도에서도 C_{PAH}나 T_{PAH}에 아무런 영향을 미치지 않는다고 보고함으로써 EA를 생체내 주입했을 경우 PAH분비에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 추측하기가 어렵다.

따라서 저자들은 EA를 생체내 주입했을 경우 PAH분비 및 C_{PAH}에 미치는 영향과 Na-K-ATPase활성과의 관계를 규명하기 위하여 본 연구를 시도하였다.

실험재료 및 실험방법

실험재료 : 체중 2.5~3.0 kg 되는 고양이를 암수 구별없이 사용하였다.

외과적처치 : 고양이를 pentobarbital (25 mg/kg)을 정맥내 주입하여 마취시킨 후 기관내 튜브를 설치하여 가능한 자유로이 호흡할 수 있게 하였으며 필요할때 respirator (Narco)에 연결하여 호흡을 유지시켰다.

대퇴동맥 카테터를 설치하여 혈압측정 및 채혈을 하기 위하여 사용하였고, 대퇴정맥내 설치된 카테터로는 약물 및 용액을 주입하였다. 하부부를 약 5 cm 절개하여 방광을 노출시킨 후 방광 바로 아래 위치에서 뇨도를 약 0.5 cm 절개하여 카테터를 방광내로 삽입하여 방광에서 뇨를 채취하였다.

외과적 처치가 끝난 후 0.9% NaCl 용액을 체중의 2% 정도를 약 30분간에 걸쳐 주입한 후 뇨량의 변화가 어느정도 일정하게 된 후 실험을 시작하였다.

Clearance 실험 : PAH 및 insulin을 각각 60 mg/kg 및 50 mg/kg를 정맥내 주입한 후 일정한 농도를 유지하기 위하여 각각 0.5 mg/kg/min 및 1 mg/kg/min를 1 ml/min 속도로 주입하였다.

노 채취는 10분 간격으로 하였고 채혈은 노 채취 중간에 행하였으며 EA나 probenecid 주입하기전 10분 간격으로 60분 동안 얻은 성적을 약물 주입후의 성적과 비교하였다.

EA 주입후 뇨량의 증가로 노배설량이 용액의 주입량 (1 ml/min)보다 증가할 때는 증가하는 양만큼 0.9% NaCl을 주입하였다.

in vivo에서 Na-K-ATPase활성에 관한 효과를 관찰하기 위하여 약물을 5 mg/kg 정맥내 주입하고 30분 후에 신장을 제거하여 피질 및 외부수질부분을 분리한 후 microsome 분획을 얻어 Na-K-ATPase 활성도를 측정하였다²⁸⁾.

노 및 혈장내 PAH 농도는 Smith et al⁴¹⁾의 방법으로, insulin은 Schreiner 방법³⁷⁾으로 측정하였고, Na 및 K의 농도는 flame photometer로써 측정하였다.

사구체 여과율은 insulin의 혈장제거율로써 계산하였고, 세노관을 통한 PAH 분비량(T_{PAH})은 배설량에서 여과량을 뺀 수로 계산하였다. 신혈류량을 측정하는 electromagnetic flowmeter로 신동맥에서 기록하였다.

실험 결과

1) EA의 이노작용

EA를 0.5에서 50 mg/kg 되게 정맥내 1회 주입하고 EA의 이노효과를 관찰한 결과(표 1) EA의 주입용량이 0.5 mg/kg일때 뇨량이 약 2배 정도 증가하였으며 25 mg/kg일때는 약 5배 정도 증가하였다.

사구체 여과율에 대한 EA의 효과는 약물의 주입량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보여 25 mg/kg의 EA에서 약 44% 억제되었다.

Na이나 K의 배설율도 0.5 mg/kg에서 약 2배 정도 증가하였으며 25 mg/kg에서 Na의 배설율은 약 6배, K의 배설율은 약 3.5배 증가하였고 이보다 많은 용량인 50 mg/kg에서는 Na의 배설율이나 뇨량이 25 mg/kg에서와 비교하여 감소하는 경향을 보였다.

EA를 1회 주입하여 나타난 이노효과는 약물을 주입

Table 1. Effect of EA on Urine Flow, Glomerular Filtration Rate(GFR), and Fractional Excretion of Sodium(FE_{Na}) and Potassium(FE_K)

EA (mg/kg)	Urine Flow (ml/min)			GFR (ml/min)			FE _{Na} (%)			FE _K (%)		
	B	E	E/B×100	B	E	E/B×100	B	E	E/B×100	B	E	E/B×100
0.5	0.26 ±0.03	0.47 ±0.04	175.53 ±17.24	10.39 ±1.82	10.56 ±2.59	104.01 ±18.27	4.00 ±0.28	8.11 ±1.16	202.50 ±40.98	33.21 ±3.26	61.02 ±10.01	184.52 ±29.88
1	0.31 ±0.04	0.72 ±0.08	229.07 ±41.85	7.31 ±0.30	6.15 ±0.53	84.33 ±18.25	5.51 ±1.32	19.49 ±3.48	342.27 ±28.58	57.80 ±4.41	107.33 ±12.64	181.70 ±40.79
3	0.27 ±0.03	0.74 ±0.16	272.64 ±42.28	7.0 ±1.18	5.19 ±1.33	74.00 ±25.82	6.09 ±0.58	26.22 ±1.17	438.86 ±56.05	51.15 ±8.72	96.71 ±12.59	187.04 ±45.67
5	0.49 ±0.03	1.40 ±0.07	280.81 ±43.41	7.17 ±0.39	4.59 ±0.43	64.33 ±11.90	5.10 ±0.14	24.74 ±4.25	472.31 ±39.55	35.07 ±15.27	92.00 ±15.27	269.71 ±37.02
10	0.56 ±0.06	1.81 ±0.23	342.72 ±59.50	4.37 ±0.83	3.20 ±0.98	74.89 ±11.22	6.52 ±1.65	35.85 ±10.21	547.64 ±20.71	61.07 ±8.93	156.97 ±8.93	255.76 ±69.71
25	0.20 ±0.04	0.95 ±0.14	485.16 ±68.79	3.88 ±0.29	2.23 ±0.32	56.33 ±9.73	6.53 ±1.73	38.57 ±5.84	585.43 ±63.34	43.30 ±6.97	148.94 ±20.33	349.61 ±45.97
50	0.23 ±0.02	0.90 ±0.07	417.50 ±67.42	4.20 ±0.72	2.50 ±0.24	59.66 ±11.19	6.32 ±2.42	31.26 ±1.33	505.36 ±28.64	61.93 ±4.98	197.41 ±63.27	374.45 ±96.68

The animals were loaded with a volume of 0.9% NaCl equal to 2% of their body weight.

After six basal clearance periods at steady urine flow, EA was given intravenously.

Samples of arterial blood and urine were taken every 10 min.

B, basal clearance periods during 60 min.

E, experimental clearance periods during the 40 min beginning with the maximal effect after the infusion of EA.

Experimental values indicate the mean±SE from 2 cats in each concentration of EA.

수준에서 60분까지 유지되었다(그림 1).

2) C_{PAH}와 T_{PAH}에 대한 EA의 영향

EA의 주입량이 0.5 mg/kg일 때는 T_{PAH}나 C_{PAH}에 어떤 영향을 미치지 못하였으며 C_{PAH}는 1 mg/kg에서도 거의 영향을 받지 않았다(표 2, 그림 2). 그러나 이보다 주입량이 증가할 때는 주입량에 비례해서 C_{PAH} 및 T_{PAH}의 감소현상이 나타나 5 mg/kg에서 약 50% 억제되었다. 특히 EA의 주입량이 증가함에 따라 GFR의 감소가 현저하게 나타남에도 T_{PAH}의 감소가 크게 나타나는 것으로 보아 EA는 신장에서 PAH의 분비를 강력하게 억제하는 것으로 보이며, 그러나 50 mg/kg에서도 EA는 T_{PAH}를 완전 억제하지는 못하였다.

EA를 주입한 후 C_{PAH} 및 T_{PAH}에 대한 효과를 시간에 따라 관찰한 결과(그림 3) 10분에는 기초상태와 차이가 없었으며 주입후 20분부터 억제효과가 나타나기 시작하였다. 이노효과는 EA를 주입한 후 10분에도 크게 나타난 것과 비교하면 PAH분비에 대한 EA의 효과가 이노작용보다 늦게 일어나는 것으로 생각되며 이는 이노효과에 대한 EA의 작용기전과 PAH분비에 대한 작용기전이 서로 다를 것이라는 점을 알시키고 있다.

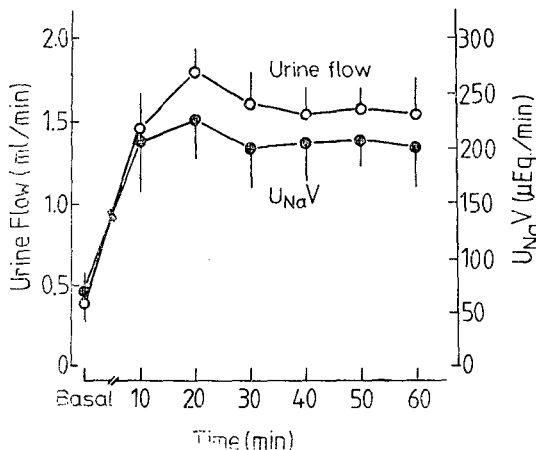


Fig. 1. Change of urine flow and sodium excretion (U_{NaV}) as a function of time after single infusion of ethacrynic acid(EA) 5 mg/kg.

한 후 20분에 최대효과가 나타났으며 약물 주입후 10분에도 20분과 큰 차이가 없는 효과가 나타났다. 30분 이후에 나타난 이노효과는 10분에서와 거의 일치하는

Table 2. Effect of EA on C_{PAH} and T_{PAH}

EA (mg/kg)	C_{PAH} (ml/min)			T_{PAH} (mg/min)		
	B	E	E/B×100	B	E	E/B×100
0.5	38.11±5.17	39.27±6.55	101.48±7.62	0.41±0.01	0.46±0.05	110.67±8.80
1	51.84±8.82	50.37±11.69	97.77±8.55	1.10±0.29	0.72±0.15	66.02±2.72
3	57.15±15.25	38.36±10.31	16.78±10.22	1.68±0.14	0.85±0.11	50.70±8.45
5	36.91±5.35	18.84±3.63	50.43±5.47	0.91±0.09	0.44±0.03	49.80±2.80
10	29.34±4.75	10.68±2.50	35.12±10.18	0.69±0.13	0.28±0.10	38.37±10.40
25	17.96±1.25	4.31±0.54	23.34±6.18	1.37±0.21	0.28±0.05	20.77±3.90
50	23.19±6.40	6.06±2.45	25.17±7.35	1.19±0.28	0.10±0.02	8.39±2.94

B, basal clearance periods; E, experimental clearance periods; C_{PAH} , renal clearance of PAH; T_{PAH} , renal tubular secretion of PAH.

Experimental values indicate the mean±SE from 2 cats in each concentration of EA.

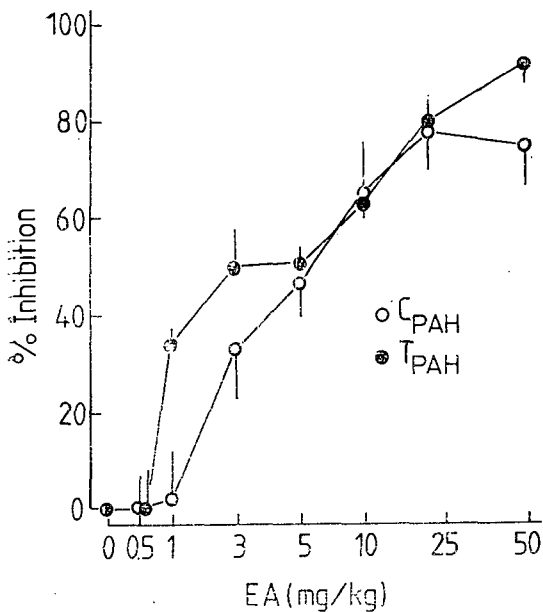


Fig. 2. Change of C_{PAH} and T_{PAH} with increasing doses of EA. Each point represents the mean±SE from 2 cats.

본 실험 결과 고양이의 정상 C_{PAH} 및 T_{PAH} 는 각각 37.71 ± 9.01 ml/min 및 1.09 ± 0.13 mg/min 으로 나타났다.

3) Na-K-ATPase 활성에 대한 EA의 영향

T_{PAH} 를 약 50% 억제하는 5 mg/kg의 EA를 정맥내 주입하고 그 효과가 최대로 나타나는 30분에 신장을 제거하여 Na-K-ATPase 활성을 측정함으로써 in vivo

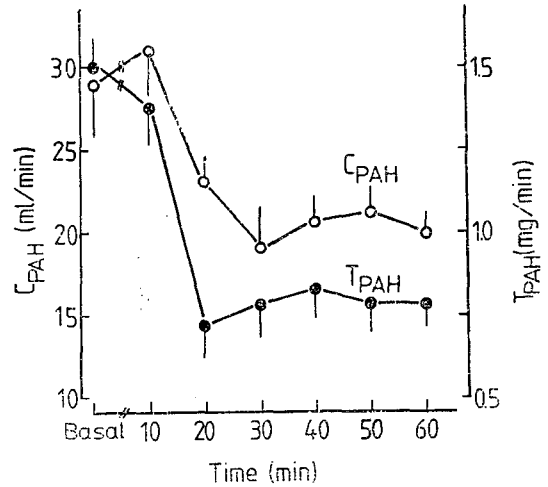


Fig. 3. Change of C_{PAH} and T_{PAH} as a function of time after EA single infusion (5 mg/kg). Each point represents the mean±SE from 2 cats.

상태에서 효소활성에 대한 EA의 효과를 관찰한 결과 (그림 4) 피질이나 수질 부분의 Na-K-ATPase 활성은 EA의 주입에 의해 영향을 받지 않았다.

이러한 결과로 보아 고양이의 신장에서 EA는 Na-K-ATPase 활성에 대한 영향없이 PAH 분비를 억제시킬 뿐만 아니라 이뇨작용도 이 효소의 억제없이 나타나는 것으로 생각된다.

4) EA에 의한 T_{PAH} 억제기전

EA 및 furosemide를 포함한 다른 많은 이뇨제들이 probenecid에 의해 그들 약물들의 신장을 통한 분비

Table 3. Effect of combination of probenecid and EA.

Inhibitor	C _{PAH}	% Inhibition	T _{PAH}	% Inhibition
Basal	40.47±4.29	—	1.39±0.05	—
EA (5 mg/kg)	21.47±2.30	46.95	0.68±0.06	51.08
Basal	31.32±0.24	—	1.01±0.09	—
Porenecid (30 mg/kg)	12.33±1.70	60.63	0.27±0.09	23.27
Basal	30.20±4.05	—	1.25±0.12	—
EA + Probenecid	5.42±0.44	82.50	0.14±0.02	88.80

Experimental values indicate the mean±SE from 3 cats.

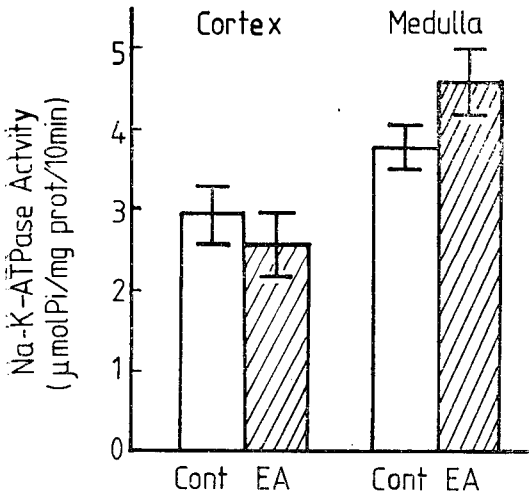


Fig. 4. In vivo effect of EA on Na-K-ATPase activity of renal microsomal fraction. Kidney was removed at 30 min after EA single infusion and microsomal fraction was prepared.

Each value represents the mean±SE from 6 cats.

Cont, kidney of control cat untreated with EA.

EA, kidney of cat treated with EA (5 mg/kg).

및 이노작용이 상경적으로 억제됨으로서 이들 약물들이 근위세뇨관에서 PAH와 같은 유기산의 분비과정과 동일한 기전에 의해 분비될 것으로 알려져 있다³¹⁻³⁵). 따라서 EA가 고양이의 신장에서 PAH분비를 상경적으로 억제하는 지를 관찰하기 위하여 5 mg/kg의 EA가 주입되었을 때와 약물이 주입되지 않았을 때 혈장내 PAH 농도 변화에 대한 T_{PAH}량을 측정하여 double reciprocal plot를 한 결과(그림 5) EA는 PAH를 상경적으로 억제하는 양상을 보이고 있다.

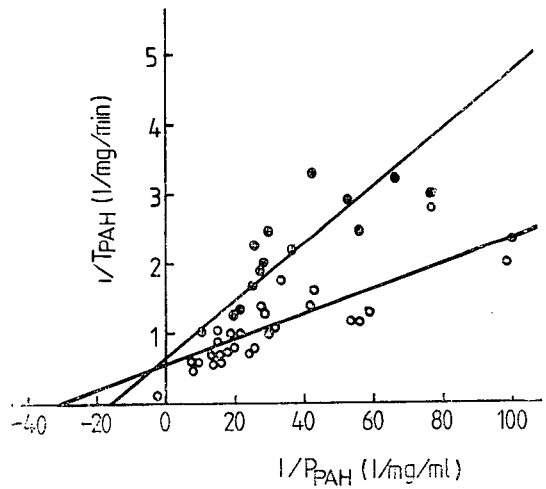


Fig. 5. Double reciprocal plot of the amount of PAH secreted and the plasma concentration of PAH in the absence (○) and in the presence (●) of EA (5 mg/kg).

따라서 이와같은 결과가 EA와 PAH가 동일한 분비 기전을 가짐으로써 나타나는 것인지를 확인하기 위하여 신장에서 유기산의 분비를 상경적으로 억제하는 물질 중 대표적인 약물로 알려진^{36,45}) probenecid에 의해 EA의 작용이 영향을 받는지를 관찰하였다(그림 6, 표 3). Probenecid를 30 mg/kg 1회 주입후 혈장내 약물의 농도를 일정하게 유지하기 위하여 36 mg/kg/h 농도를 계속 주입한 결과 T_{PAH}는 현저히 억제되어 주입을 시작한지 20분 후에 약 70% 억제되었다. Probenecid주입을 시작한지 40분 후에 probenecid의 계속 주입상태에서 T_{PAH}를 약 5%억제시키는 EA 용량인 5 mg/kg을 1회 주입하고 계속 6 mg/kg/h로 주입한 결과 EA주입을 시작한지 20분에 T_{PAH}는 EA주입전과 비교하여 약 50%정도의 유의한 억제 현상을 보였다.

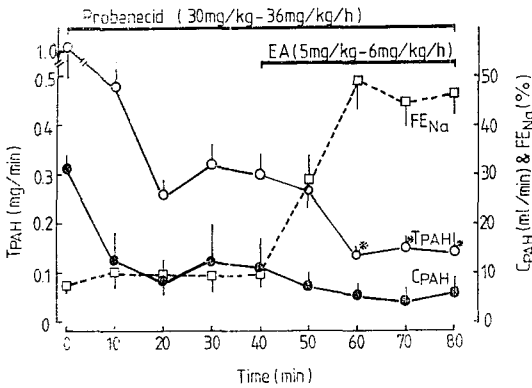


Fig. 6. Effect of probenecid on EA-induced natriuresis, C_{PAH} and T_{PAH} inhibition. Probenecid was intravenously given as a priming dose of 30 mg/kg followed by the continuous infusion of 36 mg/kg/h. EA was infused as a priming dose of 5 mg/kg followed by the continuous infusion of 6 mg/kg/h. All values indicate the mean \pm SE from 3 cats.

*, Significantly different from value of 40 min ($p < 0.05$).

Probenecid에 의해 억제되었던 C_{PAH} 도 EA에 의해 더욱 억제되는 현상을 보였으나 개체간에 차이가 많기 때문에 통계적인 유의성은 인정되지 않았다.

따라서 T_{PAH} 에 미치는 EA의 효과는 probenecid에 의해 영향을 받지 않는 것으로 생각되며 특히 이러한 사실은 Na의 배설에 대한 EA의 효과가 probenecid에 의해 전연 영향을 받지 않는 결과로서도 뒷받침된다(그림 6).

또한 EA와 probenecid를 동시에 투여했을 때도 C_{PAH} 및 T_{PAH} 의 억제정도가 각 약물을 단독 투여했을 때 보다 증가되어 있다. 그러나 본 실험에서 5마리중 2마리에서는 probenecid에 의해 억제되었던 T_{PAH} 가 EA의 주입으로 미미한 억제현상이 나타났으나 이때에도 EA에 의한 Na의 배설을 증가는 probenecid에 의해 영향을 받지 않았다.

따라서 EA가 PAH의 분비를 억제할 때 전적으로 상경적으로만 작용하는 지에 대해서는 본 실험의 결과로서 확인하기가 어렵다.

고 찰

1) EA의 이뇨작용

EA는 동물의 신장에서 Henle의 thick ascending limb에서 NaCl의 재흡수를 억제함으로써 주 이뇨작용을 나타내는 것으로 밝혀졌으며^{9,38)} Beyer, et al⁷⁾은 개에서 EA의 5 mg/kg에서 Na의 배설이 최대에 달한다고 하였으나 Steen, et al⁴³⁾은 개에서 10 mg/kg 용량까지 Na의 배설이 증가되며 근위세뇨관에서 HCO_3^- 에 의해 일어나는 NaCl의 수동적 재흡수는 더 높은 용량 즉 50 mg/kg까지도 그 억제 정도가 증가된다고 하였다.

본 실험 결과 뇨량, Na 및 K의 배설율이 25 mg/kg까지 증가하는 경향을 보임으로서 Steen, et al⁴³⁾이 지적한대로 EA가 5 mg/kg보다 높은 농도에서도 이뇨작용이 더욱 증가되는 것으로 생각된다.

본 실험에서 EA가 사구체 여과율을 감소시켰는데, 성격은 나타내지를 않았지만 본 실험에서 EA를 주입했을 때 신장 혈류량은 증가시키거나 혹은 변화를 초래하지 않았기 때문에 이러한 감소가 신장 혈류량의 변화와는 무관한 것으로 추측되었다.

EA 및 furosemide가 사구체 여과율을 감소시킨다는 사실은 많은 연구자들에 의해 보고^{14,31,43,44,46)}되었는데 이들 대부분이 신장 혈류량은 증가하거나 거의 변화없이 사구체 여과율이 감소된다고 보고함으로써 본 실험의 결과와 일치하였다. 신장 혈류량이 증가하거나 변하지 않는데도 사구체 여과율이 감소하는 점에 대해서는 Friedman과 Roch-Ramel²¹⁾이 furosemide 주입 후 사구체 여과율에 어떤 변화를 유발시키지 않고도 신장 혈류량이 증가하는 것은 약물이 사구체의 구성성 및 원심성 소동맥 양쪽 혈관을 확장하기 때문인 것으로 추측된다고 보고하고 있어 신장 혈류량이 증가하거나 변하지 않더라도 사구체 여과율은 감소할 수도 있다는 것은 쉽게 추측할 수 있다.

2) C_{PAH} 와 T_{PAH} 에 대한 EA의 영향

Torretti, et al⁴⁴⁾과 Robinson, et al³⁶⁾은 개에서 EA가 C_{PAH} 에 어떤 변화를 주지 못한다고 하였으며 Friedman과 Roch-Ramel²¹⁾도 고양이에서 furosemide의 5 mg/kg 농도에서 C_{PAH} 의 변화가 나타나지 않는다고 하였다. 그러나 본 실험에서 EA의 주입 용량이 3mg/kg에서 C_{PAH} 가 억제되기 시작하여 25 mg/kg에서는 약 77%의 억제되는 결과를 보였다. 본 실험의

결과가 다른 연구자의 보고와 다르게 나타난 점에 대해서는 정확히 알 수 없으나 본 실험에서 C_{PAH} 는 혈장 내 PAH 농도 변화에 따라 많은 변화를 보여 혈장 내 PAH 농도가 낮을 때는 C_{PAH} 가 최고 136에서, 혈장 PAH가 높을 때는 최저 2.5 ml/min 까지 변동함으로써 혈장 PAH를 어떤 수준에서 일정하게 유지시켜 주느냐에 따라 실험결과에 많은 차이를 나타낼 것으로 생각되며, Eggleton과 Habib²⁰⁾도 고양이에서 혈장 PAH 농도가 증가함에 따라 C_{PAH} 는 감소한다고 보고하였다.

또한 EA가 일반적으로 신장혈류량을 증가시키기 때문에 세뇨관에서 PAH의 분비가 EA에 의해 다소 영향을 받더라도 PAH 배설물에는 큰 차이가 없을 것으로 생각할 수 있다. Friedman과 Roch-Ramel²¹⁾도 고양이에서 PAH의 extraction은 감소하여도 C_{PAH} 가 변하지 않는 것은 신장혈류량 증가를 의미한다고 하였다. 그러나 본 실험에서 EA가 사구체여과율 뿐만 아니라 T_{PAH} 를 강력하게 억제하기 때문에 기초상태와 EA를 처리했을때 혈장 PAH를 일정하게 유지시켜 준다면 C_{PAH} 는 억제될 것으로 생각된다.

Robinson, et al¹⁹⁾도 신장의 근위세뇨관에서 유기산과 동일한 기전에 의해 분비되는 것으로 알려진 EA가 C_{PAH} 에 변화를 초래하지 않는 점에 대해서는 이해할 수 없는 결과라고 하였다.

C_{PAH} 에 미치는 EA의 효과에 대한 본 실험의 결과가 다른 연구자들^{21,36,44)}과 일치하지 않는 점은 PAH 배설에 미치는 EA의 효과에 대해서 중점적으로 추구한 보고들을 얻지 못하였기 때문에 그 원인을 분석하기가 어렵다.

본 실험에서 EA가 T_{PAH} 를 강력하게 억제하였으나 Friedman과 Roch-Ramel²¹⁾은 고양이에서 bumetanide가 강력한 이뇨효과를 나타내는 농도에서도 T_{PAH} 에 영향을 미치지 못한다고 보고함으로써 EA가 PAH분비에 미치는 효과가 bumetanide와 다른 것인지는 본 실험의 결과로서는 알 수가 없다.

3) T_{PAH} 에 대한 EA의 억제기전

EA가 *in vitro*에서 Na-K-ATPase 활성을 억제하고 있고^{1,13,16~18,26,30,33,34,44)} Nechay와 Contreras³³⁾는 EA가 ouabain과 같이 Na-K-ATPase를 억제함으로써 이뇨효과를 나타낼 것으로 추측하고 있기 때문에 EA가 PAH 분비를 억제하는 기전이 Na-K-ATPase를 억제함으로써 나타날 가능성이 있다. 그러나 본 실험 결과 T_{PAH} 를 약 50% 억제하는 EA의 용량을 생체내 주입 하므로 Na-K-ATPase 활성에 대한 영향을 관찰한 결과

EA가 효소 활성에도 어떤 영향을 미치지 못하였으며 이와같은 결과는 EA가 Na-K-ATPase 영향없이 물질 이동에 영향을 미친다는 연구자들^{26,40,46)}의 보고와 일치하였다.

EA를 생체내 주입후 Na-K-ATPase를 측정할 때는 *in vivo*에서 직접하지 못하고 microsome분획을 얻어 측정하기 때문에 만약 약물이 가역적으로 결합한다면 효소분리 과정에서 EA가 제거될 수 있기 때문에 결과가 다르게 나타날 가능성이 있다. 그러나 이전 연구²⁷⁾에서 고양이의 신장 Na-K-ATPase에 대한 EA의 작용은 비가역적임을 밝힌 바 있다. 따라서 EA가 *in vivo* 상태에서 50% T_{PAH} 를 억제하는 농도에서도 신장 Na-K-ATPase 활성을 억제하지 못하는 것으로 보아 EA가 T_{PAH} 를 억제하는 것은 Na-K-ATPase와 다른 기전에 의해서 나타날 것으로 추측된다. 또한 EA의 주입후 이뇨효과는 모든 경우에서 10분에도 강력한 효과가 나타났으나 T_{PAH} 의 억제효과는 EA 주입 10분에는 크게 영향이 없고 20분에는 나타났기 때문에 T_{PAH} 에 대한 억제기전과 이뇨작용에 대한 작용기전은 다른 것으로 생각된다.

EA는 근위세뇨관에서 PAH와 같은 유기산의 분비 기전에 의해 분비될 것으로 추측되고 있기 때문에⁶⁾ EA가 T_{PAH} 를 억제하는 기전이 PAH와 동일한 운반체를 이용하기 때문인지를 구명하기 위하여 혈장 PAH 농도 변화에 대한 T_{PAH} 변화를 관찰하여 Lineweaver-Burk plot한 결과 EA는 상경적 억제양상을 보였다. 그러나 고농도의 probenecid에 의해서 EA의 작용효과가 전연 영향을 받지 않음으로서 EA가 PAH와 동일한 운반체를 이용함으로써 T_{PAH} 를 억제하는지에 대해서는 명확히 결론 지우기가 어렵다.

EA나 furosemide의 신세뇨관 분비에 대한 probenecid의 효과에 대해서는 연구자들간에 상당한 차이를 나타내고 있다. Beyer, et al⁷⁾, Hook 및 Williamson²⁵⁾은 probenecid가 EA와 furosemide의 분비를 억제하여 이뇨효과를 방지한다고 하였으나, Brater⁸⁾는 probenecid가 사람에서 furosemide의 이뇨효과를 증가시킨다고 하였고, Friedman과 Roch-Ramel²¹⁾은 고양이에서 probenecid가 furosemide의 이뇨효과는 억제하지만 bumetanide의 작용은 억제하지 못한다고 하였다. 특히 EA는 그의 이뇨작용이 세뇨관강내에서 작용하는 것으로 밝혀졌기 때문에¹⁰⁾ EA가 유기산의 분비와 동일한 기전에 의해 이동된다면 probenecid에 의해 EA의 이뇨효과가 나타나지 않아야 함에도 본 실험 결과에서는 probenecid 존재하에서도 EA의 이뇨효과

가 영향을 받지 않았다.

Friedman과 Roch-Ramel²¹⁾은 probenecid가 개에서는 bumetanide의 분비를 억제하지만 고양이에서는 억제하지를 못하기 때문에 동물간에 probenecid의 작용이 다를 것으로 추측하였다. 또한 Barany^{2,3)}는 신세뇨관의 유기산 음이온 이동기전에 multiple transport system이 존재하기 때문에 bumetanide가 PAH나 furosemide와는 다른 음이온 분비기전에 의해 이동할 것으로 추측하였다.

따라서 본 실험에서 T_{PAH}억제에 대한 EA의 작용이 probenecid에 의해 영향을 받지 않는 것은 EA가 상경적으로 PAH분비를 억제하지 않기 때문인지, 아니면 동물 차이에서 오는 것인지는 본 실험의 결과로서는 명확히 설명하기가 어려우며 더욱 추구해 보아야만 확실할 것으로 생각된다.

결 론

Ethacrynic acid(EA)가 고양이의 신장에서 C_{PAH} 및 T_{PAH}에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 EA의 용량을 0.5~50 mg/kg를 주입한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) EA의 주입 용량이 0.5~25 mg/kg까지는 노랑, Na 및 K의 배설율이 모두 용량에 비례해서 증가하였으며, 사구체여과율은 용량에 비례해서 감소하였다.

2) T_{PAH} 및 C_{PAH}는 각각 EA 용량이 1 mg/kg 및 3 mg/kg 일때 부터 억제되기 시작하였으며 50 mg/kg에서는 T_{PAH}는 약 92% 억제되었고, 5 mg/kg 용량에서 약 50% 억제되었다.

3) EA 주입 후 10분에 이뇨효과가 크게 나타났는데 반해 T_{PAH}에 대한 효과는 유의한 변화를 보이지 않았으며, 0.5 mg/kg의 낮은 농도에서도 T_{PAH}에 대한 영향 없이 이뇨작용은 크게 나타남으로써 이뇨작용과 T_{PAH} 억제작용에 대한 EA의 작용기전이 다른것으로 생각된다.

4) EA 5 mg/kg을 생체내 주입한 결과 Na-K-ATPase활성에는 영향이 없었다.

5) EA는 Lineweaver-Burk plot 결과 PAH와는 상경적 억제양상을 보였지만 probenecid에 의해서는 EA의 작용이 영향을 받지 않았다.

이상의 결과들로 보아 EA는 고양이의 신장에서 C_{PAH} 및 T_{PAH}를 강력히 억제하는 작용을 가지고 있으며 이와같은 작용은 Na-K-ATPase활성에 영향없이 이 효소와는 다른 기전에 의해서 그의 효과를 나타낼 것으로

추측된다.

REFERENCES

- 1) Banerjee, S.P., Dhanna, V.K. and Sen, A.K.: *Inhibition of sodium-and potassium-dependent adenosine triphosphatase by ethacrynic acid: Two modes of action. Mol. Pharmacol.*, 6:680, 1970.
- 2) Bárány, E.H.: *Inhibition by hippurate and probenecid of in vitro uptake of iodipamide and o-iodohippurate. A composite uptake system for iodipamide in choroid plexus, kidney cortex and anterior uvea of several species. Acta Physiol. Scand.*, 86:12, 1972.
- 3) Bárány, E.H.: *The liver-like anion transport system in rabbit kidney, uvea and choroid plexus. II. Efficiency of drugs and other anions as inhibitors. Acta Physiol. Scand.*, 88:491, 1973.
- 4) Beauchene, R.E., Fanestil, D. D. and Barrows, C.H.: *The effect of age on active transport and sodium-potassium-activated ATPase activity in renal tissue of rats. J. Gerontol.*, 20:306, 1965.
- 5) Beyer, K.H.: *The mechanism of action of chlorothiazide. Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 71:363, 1958.
- 6) Beyer, K.H. and Baer, J.E.: *The site and mode of action of some sulfonamide-derived diuretics. Med. Clin. North Am.*, 59:735, 1975.
- 7) Beyer, K.H., Baer, J.E., Michaelson, J.F. and Russo, H.F.: *Renotropic characteristics of ethacrynic acid: A phenoxyacetic saluretic-diuretic agent. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 147:1, 1965.
- 8) Brater, D.C.: *Effects of probenecid on furosemide reponse. Clin. Pharmacol. Ther.*, 24:548, 1978.
- 9) Burg, M.B.: *Tubular chloride transport and the mode of action of some diuretics. Kidney Int.*, 9:189, 1976.
- 10) Burg, M.B. and Green, N.: *Effect of ethacrynic acid on the thick ascending limb of Henle's loop. Kidney Int.*, 4:301, 1973.
- 11) Burg, M.B. and Orloff, J.: *Effect of strophanthidin on electrolyte content and PAH accumulation of rabbit kidney slices. Am. J. Physiol.*,

- 202:565, 1962.
- 12) Burg, M., Stover, L., Cardinal, J. and Green, N.: *Furosemide effect on isolated perfused tubules. Am. J. Physiol.*, 225:119, 1973.
 - 13) Charnock, J.S., Potter, H.A. and Mcke, D.: *Ethacrynic acid inhibition of $(Na^+ + K^+)$ -activated adenosine triphosphatase. Biochem. Pharmacol.*, 19:1637, 1970.
 - 14) Clapp, J.R., Nottebohm, G.A. and Robinson, R.R.: *Proximal site of action of ethacrynic acid importance of filtration rate. J. Physiol.*, 220: 1355, 1971.
 - 15) Dantzler, W.H.: *Effects of K^+ , Na^+ , and ouabain on urate and PAH uptake by snake and chicken kidney slices. Am. J. Physiol.*, 217: 1510, 1969.
 - 16) Davis, P.W.: *Inhibition of renal Na^+ , K^+ -activated adenosine triphosphatase activity by ethacrynic acid. Biochem. Pharmacol.*, 19: 1983, 1970.
 - 17) Duggan, D.E. and Noll, R.M.: *Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon a membrane adenosine-triphosphatase of renal cortex. Arch Biochem. Biophys.*, 19:388, 1965.
 - 18) Duggan, D.E. and Noll, R.M.: *Effects of ethacrynic acid upon membrane ATPase of dog kidney in vivo and vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139:762, 1972.
 - 19) Ebel, H., Ehrich, J., Desanto, N.G. and Doerken, U.: *Plasma membrane ATPase of dog kidney in vivo and in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139:762, 1972.
 - 20) Eggleton, M.G. and Habib, Y.A.: *Excretion of para-aminohippurate by the kidney of the the cat. J. Physiol.*, 110:458, 1950.
 - 21) Friedman, P.A. and Roch-Ramel, F.: *Hemodynamic and natriuretic effects of bumetanide and furosemide in the cat. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 203:82, 1977.
 - 22) Gerencser, G.A. and Hong, S.K.: *Roles of sodium and potassium ions on p-aminohippurate transport in rabbit kidney slices. Biochim. Biophys. Acta*, 406:108, 1975.
 - 23) Homeida, M., Roberts, C. and Pranch, R.A.: *Influence of probenecid and spironolactone on furosemide kinetics and dynamics in man. Clin. Pharmacol. Ther.*, 22:402, 1977.
 - 24) Honari, J., Blair, A.O. and Cutler, R.E.: *Effects of probenecid on furosemide kinetics and natriuresis in man. Clin. Pharmacol. Ther.*, 22:395, 1977.
 - 25) Hook, J.B. and Williamson, H.E.: *Influence of probenecid and alterations in acid-base balance of saluretic activity of furosemide. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 149:404, 1965.
 - 26) Inagaki, C., Marinez-Maldonado, M. and Schwartz, A.: *Some in vivo and in vitro effects of ethacrynic acid on renal Na-K-ATPase. Arch. Biochem. Biophys.*, 158:421, 1973.
 - 27) Kim, Y.K.: *Effects of ouabain and ethacrynic acid on active PAH transport and Na-K-ATPase activity of cat kidney slices. J. Busan Med. Coll.*, 20:11, 1980.
 - 28) Kim, Y.K.: *Effect of ethanol on PAH transport and Na-K-ATPase in renal cortical slices of cat. J. Busan Med. Coll.*, 22:215, 1982.
 - 29) Lie, M., Sejerster, O.M., Raeder, M. and Kill, F.: *Comparison of renal responses to ouabain and ethacrynic acid. Am. J. Physiol.*, 226: 1221, 1974.
 - 30) London, E.J. and Fitzpatrick, D.F.: *Ethacrynic acid and kidney cell metabolism. Biochem Pharmacol.*, 21:1561, 1972.
 - 31) Martinez-Maldonado, M., Tsaparas, N., Inagaki, C. and Schwartz, A.: *Interactions of digoxin and ethacrynic acid with renal sodium-potassium activated adenosine triphosphatase. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 188:605, 1974.
 - 32) Maxild, J., Moller, J.V. and Sheikh, M.I.: *Involvement of Na-K-ATPase in p-aminohippurate transport by rabbit kidney tissue. J. Physiol.*, 315:189, 1981.
 - 33) Nechay, B.R. and Contreras, R.R.: *In vivo effect of ethacrynic acid on renal ATPase in dog and rat. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 183: 117, 1972.
 - 34) Nechay, B.R., Palmer, R.F., Chinoy, D.A. and Posey, V.A.: *The problem of $Na^+ + K^+$ -adenosine*

- triphosphatase as the receptor for diuretic action of mercurials and ethacrynic acid. J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 157:599, 1967.
- 35) Podevin, R.A. and Boumemdil-Podevin, E.F.: Monovalent cation and ouabain effects on PAH uptake by rabbit kidney slices. *Am. J. Physiol.*, 232:F289, 1977.
- 36) Robinson, J.W.L., Mirkovitch, V. and Sepulveda, F.V.: A comparison of the effects of ouabain and ethacrynic acid on the dog kidney in vivo and in vitro. *Pflügers Arch*, 371:9, 1977.
- 37) Schreiner, G.E.: Determination of inulin by means of resorcinol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 74:177, 1950.
- 38) Seldin, D.W., Eknoyan, G., Suki, W.N. and Rector, F.C.: Localization of diuretic action from the pattern of water and electrolyte excretion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 139:328, 1966.
- 39) Sen, A.K., Tobin, T. and Post, R.L.: A cycle for ouabain inhibition of sodium-and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 24:6596, 1969.
- 40) Silva, P., Torretti, J., Hayslett, J.P. and Epstein, F.H.: Relation between Na-K-ATPase activity and respiratory rate in the rat kidney. *Am. J. Physiol.*, 230:1432, 1976.
- 41) Smith, H.W., Finkelstein, N., Allminosa, L., Crawford, B. and Graber, M.: The renal clearance of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. *J. Clin. Invest.*, 24:388, 1945.
- 42) Spencer, A.M., Sack, J. and Hong, S.K.: Relationship between PAH transport and Na-K-ATPase activity in the rabbit kidney. *Am. J. Physiol.*, 236:F136, 1979.
- 43) Steen, P.A., Hartmann, A. and Kiil, F.: Ethacrynic acid inhibits transcellular NaCl reabsorption in dog kidneys in doses of 1 to 10 mg. kg⁻¹ and proximal bicarbonate-dependent reabsorption at higher doses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 219:505, 1981.
- 44) Torretti, I., Hendler, E., Weinstein, E., Longnecker, R.E. and Epstein, F.H.: Functional significance of Na-K-ATPase in the kidney: Effects of ouabain inhibition. *Am. J. Physiol.*, 222:1398, 1972.
- 45) Weiner, I.M. and Mudge, G.H.: Renal tubular mechanisms for excretion of organic acids and bases. *Am. J. Med.*, 36:743, 1964.
- 46) Westenfelder, C., Birch, F.M., Baranowski, R.L., Wheeler, C., Earnest, W.R. and Kutzman, N.A.: Effect of Na-K-ATPase inhibition of hydrogen ion and potassium secretion. *Pflügers Arch.*, 386:161, 1980.