

새로운 항암성 백금(II) 착체류의 *in vivo* 독성연구

정광원 · 임종석* · 정세영 · 노영수 · 최병기**

경희대 약대, 원자력병원*, 동덕여대 약대**

General Toxicity of Novel Pt(II) Complexes *in vivo*

Kwang-Won Jeong, Jong-Seok Lim*, Se-Young Choung
Young-Soo Rho and Byung-Ki Choi**

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Korea Cancer Center Hospital*
College of Pharmacy, Dongduk Women's University**

ABSTRACT

The general toxicological study of new platinum(II) compounds, KHPC-002, KHPC-005 and KHPC-006 were investigated in rats.

The effects of these Pt(II) complexes on renal, hematopoietic and hepatic system in rats showed lower toxicity compared with cisplatin. In the consideration of the maximal dose of these Pt(II) complexes using in this experiment is 4-8 times higher than cisplatin, these novel compounds will have the less general toxicity *in vivo*.

서 론

Cisplatin을 비롯한 백금항암제들은 임상실험에서 매우 탁월한 효과가 인정되어 주로 방광암, 고환암, 난소암, 전립선암 및 경부암 등의 치료제로서 지금까지 널리 사용되고 있으나 임상적으로 심한, 신독성, 오심, 구토 및 내이 신경독성 등의 부작용을 나타내는 결점을 갖고 있다.

특히, 신독성은 장기간 투여에 의해 생명을 잃게 되는 주 원인이 되므로 신독성이 적은 백금 항암제 개발을 위해 여러나라에서 경쟁적으로 합성을 하고있다.

새로 합성한 백금 착체 항암제 KHPC-002([Pt(trans-1-dach)(DPPE)]. 2NO₃:A), KHPC-005([Pt(cis-dach)(DPPP)]. 2NO₃:B) 및 KHPC-006([Pt(cis-dach)(DPPE)]. 2NO₃:C)는 *in*

*vitro*에서 배양한 신장 세포에 대해 cisplatin에 비해 매우 낮은 독성을 나타내었으며 *in vivo*에서의 신독성 경감 여부를 보는 것이 신약개발에 매우 중요하다. 또한, 백금 착체들은 간에서 대사되어진 대사체가 더욱 강한 독성을 나타내는 것으로 보고되고 있으므로 *in vivo*에서의 KHPC-002([Pt(trans-1-dach)(DPPE)]. 2NO₃:A), KHPC-005([Pt(cis-dach)(DPPP)]. 2NO₃:B) 및 KHPC-006([Pt(cis-dach)(DPPE)]. 2NO₃:C)의 간독성을 보고자 하였다.

조혈기 독성 시험은 백금 착체화합물의 항암기전으로 DNA와의 결합이 예상되므로 암세포와 같이 증식 속도가 빠른 체내 정상 세포중 골수유래 세포 즉, 혈구세포 생성에 대한 영향을 검토하고자 혈액학적 분석을 실시 하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질 조제

대조군으로 사용한 cisplatin은 1.4mg/ml가 되도록 saline에 녹였으며 용해도가 낮으므로 30°C에서 10분간 가온하여 시험용액을 조제하였다.

A, B 및 C는 비교적 saline에 잘 녹았으므로 간단히 vortex mixer로 용해시켜 시험에 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육환경

실험동물은 국립보건안전연구원에서 분양받은 Sprague-Dawley(SD)계 랫드로서 체중 180~200g의 숫컷을 사용하였다. 시험기간중 온도는 21~25°C, 습도는 40~70%, 12시간 조명 등의 사육환경을 유지하였으며 사료와 음료는 자유로 섭취시켰다.

3. 투여량 설정

건강한 숫컷 20마리를 이용하여 예비실험을 실시하였다.

용량은 LD10을 기준으로 하여 A의 경우 60, 30, 15mg/kg, A는 120, 60, 30mg/kg 용량으로 투여하였다.

A의 경우 15mg/kg 용량군에서는 경미한 체중증가 억제제가 나타났고 최고 용량군인 60mg/kg에서도 이와 비슷한 체중 억제제가 나타났다.

B의 경우 30mg/kg 용량군에서 4일 후 경미한 체중증가 억제제가 나타났으며 최고 용량군인 120mg/kg에 있어서는 투여 2일 후부터 체중증가가 억제되어 4일 째는 확실한 체중증가 억제제가 보였다.

C의 경우 30mg/kg 용량군에 있어서는 경미한 체중증가 억제제가 나타났고 최고용량군인 120mg/kg에서는 투여 1일 후 부터 지속적인 체중증가 억제제가 나타났다.

이와같은 예비실험의 결과를 기초로하여 본실험에서는 예비실험에 사용한 농도를 그대로 사용하여 신장, 간장 및 조혈기 독성을 관찰하였다.

4. 투여방법

투여경로는 예정 임상 경로에 가까운 복강내 투여로 하였다. 투여액량은 10ml/kg 이내로 하였으며 바늘은 26gauge를 사용하였다.

5. 검사항목

1) 폐사 및 일반 증상 관찰

시험기간을 통해 각 동물의 폐사 및 일반 상태는 매일 오전중에 관찰하였다.

2) 체중측정

시험기간중 체중은 매일 측정하였으며 오전중에 실시하였다.

3) 혈액학적 검사

혈액은 ethyl ether로 마취한 동물의 심장에서 채취하였으며 채취한 혈액은 heparin을 항응고제로 사용하여 혈액학적 검사를 실시하였다.

혈액학적 검사에서는 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 혈소판(PLT), 혈색소(HGB), 헤마토크리트치(HCT)에 대해 자동측정기를 이용하여 측정하였다.

또한, 백혈구의 분별세포 백분율을 호중구(Neutrophil:Neut), 림파구(Lymphocyte:Lymp), 단구(Monocyte:Mono), 호산구(Eosinophil:Eos), 호염기구(Basophil:Baso)에 대하여 혈구 자동측정기를 이용하여 측정하였다.

4) 혈청 생화학적 검사

혈청생화학적 검사에는 혈액자동측정기를 이용하여 alanine transaminase(ALT, Transamination-LDH법), aspartate transaminase(AST, Transamination-MDH-LDH법), alkaline phosphatase(ALP, pNpp hydrolysis법), total bilirubin(Evelyn-Malloy법), glucose(Hexokinase법), creatinine(Jaffe 개량법)에 대해 실시하였다.

5) 통계학적 처리

실험결과는 평균±SD로 표시하였으며 각 동물군간의 유의성 검정을 위해 Anova test와 Duncan's multiple range test를 실시하였다. P값이 0.05이하인 경우에만 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

1. 폐사율과 일반 증상

투여기간중 폐사에는 나타나지 않았다.

일반증상으로는 일시적인 활동성 감소가 관찰되나 이는 정상대조군을 포함하여 고르게 나타나 시험물질

투여와 관련된 변화로 볼 수 없었다.

양성 대조군으로 사용한 cisplatin투여군에 있어서 는 활동성 감소 및 사료 섭취량의 감소가 나타났다.

2. 체중변화

시험기간중 체중변화는 Table 1과 같다.

Cisplatin 투여군에 있어서는 투여 1일 후 부터 지속적인 체중감소가 나타났으며 4일 째에는 20%에 가까운 체중감소가 있었다.

A의 경우 saline만을 투여한 군에 비해 체중증가가 억제된 반면 최고 용량군인 60mg/kg에서도 cisplatin보다 높은 체중수치를 보였다.

B의 경우 최고용량군인 120mg/kg에서 투여 2일

후 부터 체중감소가 나타나기 시작하였고 4일 후에는 cisplatin보다는 양호하나 체중증가 억제가 유의성 있게 나타났다.

C의 경우 최고용량군인 120mg/kg에서 투여 1일 후 부터 지속적인 체중감소가 보였고 cisplatin보다는 양호하나 체중증가 억제가 유의성 있게 나타났다.

3. 혈액학적 검사

투여 4일 후 최종 도살동물에서의 혈액학적 검사결과 는 Table 2 및 Table 3과 같다.

Cisplatin투여에 의해 백혈구 및 혈소판의 감소가 현저하게 나타났으며 HGB의 수치가 약간 감소됨을 알 수 있었다.

Table 1. Body weight changes in male SD rats treated with platinum(II) complexes.

	day 0 (%)	day 1 (%)	day 2 (%)	day 3 (%)	day 4 (%)
CDDP(7mg/kg)	100	95.2±1.4*	90.2±1.8*	86.6±1.6*	83.9±0.5*
A1(60mg/kg)	100	104.2±2.4	104.8±2.9	105.2±4.2	100.3±2.9*
A2(30mg/kg)	100	101.7±1.1	101.3±1.9*	100.7±1.6*	100.1±2.7*
A3(15mg/kg)	100	100.6±0.6	101.1±1.2*	101.8±1.7*	101.5±2.9*
B1(120mg/kg)	100	100.1±0.9	96.8±2.4*	94.1±2.5*	89.9±2.3*
B2(60mg/kg)	100	102.2±0.9	100.2±1.9*	100.7±1.9*	94.4±2.3*
B3(30mg/kg)	100	101.9±1.9	106.1±1.9	105.1±1.8*	98.5±1.8*
C1(120mg/kg)	100	96.0±1.3*	90.0±3.2*	87.8±3.2*	86.7±2.7*
C2(60mg/kg)	100	103.8±1.7	104.6±2.2	103.4±1.9*	103.0±1.9*
C3(30mg/kg)	100	103.7±1.2	103.1±1.8	105.4±1.0*	104.0±1.4*
Control	100	103.1±1.2	107.3±2.0	112.6±2.1	113.3±2.5

Values represent Mean+S.D. for ten rats.

* Significantly different from the control at P<0.05

Table 2. Levels of blood chemistry in male rats given with platinum(II) complexes.

	WBC(x10 ³ /μl)	RBC(x10 ⁵ /μl)	PLT(x10 ³ /μl)	HGB(g/dl)	HCT(%)
CDDP	4.0±0.2	6.5±0.40	168.5±46.5*	13.2±0.7	36.7±2.4
A1	4.6±0.6	7.3±0.30*	683.7±64.1*	14.0±0.5	42.8±1.5*
A2	7.0±1.6	7.9±0.20*	697.3±88.8*	15.2±0.3*	37.8±3.7
A3	5.6±0.9	7.7±0.40*	450.0±115.8*	15.1±0.6*	42.9±1.5*
B1	5.3±1.0	7.2±0.20*	881.4±74.8	14.2±0.3	41.5±0.9*
B2	5.9±0.9	7.6±0.10*	976.7±101.1	16.4±1.4*	42.9±0.7*
B3	4.9±0.9	7.5±0.07*	842.7±83.0	14.7±0.2	42.7±0.5*
C1	9.0±1.3*	7.4±0.12*	1377.0±89.3*	14.6±0.3	42.8±1.6*
C2	6.1±0.1	7.7±0.01*	1227.0±14.7*	15.1±0.2*	44.4±0.3*
C3	10.5±1.5*	7.5±0.04*	1255.8±55.3*	15.1±0.0*	29.0±9.5*
Control	6.8±1.5	6.4±0.24	925.0±63.1	14.3±0.2	37.2±1.7

Values represent Mean+S.D. for ten rats.

* Significantly different from the control at P<0.05

Table 3. Cell subpopulation of WBC present in blood of male rats given with platinumium(II).

	Neut(%)	Lymp(%)	Mono(%)	Eos(%)	Baso(%)
CDDP	28.7±3.5*	56.3±7.9*	9.0±1.7*	0.4±0.30	1.4±0.8*
A1	24.6±4.0*	67.9±3.5*	2.5±0.2	0.9±0.24	0.8±0.2*
A2	28.0±11.0	64.3±11.6	3.5±1.1	0.8±0.20	0.8±0.3*
A3	22.4±4.9	67.5±7.1	6.7±3.9*	1.7±1.00	0.5±0.2*
B1	32.6±5.4*	61.6±5.1	2.7±0.2	0.6±0.10	0.4±0.1*
B2	31.1±4.2*	62.7±3.9*	3.3±0.7	0.9±0.12	0.3±0.1*
B3	32.0±2.9*	61.8±3.3*	2.9±0.3	1.1±0.46	0.3±0.1*
C1	33.2±6.5*	57.5±5.6*	4.3±0.0*	0.5±0.15	0.2±0.1*
C2	24.2±5.4	69.9±4.8	2.5±0.4	0.5±0.01	0.2±0.1*
C3	30.6±6.8	63.9±6.2	2.6±0.1	0.5±0.25	0.2±0.1*
Control	14.8±2.3	81.6±2.8	1.6±1.1	1.0±0.70	0.0±0.0

Values represent Mean+S.D. for ten rats.

* Significantly different from the control at P<0.05

A의 경우 고용량 투여군인 60mg/kg에서 백혈구의 감소가 현저하게 나타났으며 혈소판의 감소도 보였다. 그러나 cisplatin에 비해서는 매우 양호한 편이며 cisplatin 투여 용량이 7mg/kg이라는 것을 생각한다면 조혈기 독성은 cisplatin에 비해 매우 낮다고 할 수 있다.

B의 경우 최고용량 투여군인 120mg/kg투여군에 있어 백혈구수의 감소가 나타났으나 혈소판수에 있어서는 유의성 있는 감소는 보이지 않았다.

C의 경우 고용량 투여군인 120mg/kg투여군에 있어 오히려 백혈구수 및 혈소판수의 증가를 보였으며 이는 C의 투여로 인해 염증이 일어났을 가능성을 보여주는 결과라 하겠다.

4. 혈청 생화학적 검사

백금착체 항암제의 임상적용시 가장문제가 되는 신장독성 정도를 검토하기 위해 혈청 parameter인 BUN과 creatinine을 측정하였으며 그 결과는 Table 4와 같다.

Cisplatin 7mg/kg 투여에 의해 BUN은 정상치의 3배, creatinine도 정상치의 3배로 증가됨을 알 수 있었다.

A의 경우 고용량 투여군인 60mg/kg에서 BUN은 정상치였으며 creatinine은 정상치보다 약간 높은 수치를 보였다.

B의 경우 고용량 투여군인 120mg/kg에서 BUN은 정상치였으며 creatinine은 정상치보다 약간 높은 수치를 보였다.

C의 경우 고용량 투여군인 60mg/kg에서 BUN,

Table 4. Levels of serum biochemical indices in male rats given with platinumium(II). (Nephrotoxic parameters)

Group	Creatinine(mg/dl)	BUN(mg/dL)
CDDP	1.75±0.35*	70.0±19.0*
A1	0.81±0.01	18.3±0.5*
A2	0.83±0.02	19.4±1.7
A3	0.87±0.02	18.7±0.9*
B1	0.93±0.03*	20.3±1.3
B2	0.76±0.13	24.3±2.7
B3	0.93±0.02*	21.4±2.3
C1	1.06±0.14*	36.0±10.0
C2	0.76±0.11	16.7±3.0*
C3	0.89±0.03*	18.0±0.8*
Control	0.63±0.11	24.5±2.5

Values represent Mean+S.D. for ten rats.

* Significantly different from the control at P<0.05

creatinine 모두 정상치의 1.5배로 증가되어 신독성이 나타나고 있음을 알 수 있었다. 그러나, 60 및 30mg/kg에서는 두 수치가 모두 정상치를 보였다.

따라서 시험물질로 사용한 A, B 및 C 모두 신장독성은 고용량에도 유도되지 않는 것으로 생각되며 백금항암제의 가장 큰 문제점인 신장독성을 해결 할 수 있다는 점에서 신약 개발 가능성이 크다는 것을 알 수 있었다.

백금착체 항암제의 간장독성을 측정한 결과는 Table 5와 같다.

Cisplatin투여에 의해 ALT는 약간 증가하였으며 glucose도 약간 증가하였으나 AST, total bilirubin

Table 5. Levels of serum biochemical indices in male rats given with platinum(II). (Hepatotoxic parameters)

	ALT(μ /L)	AST(μ /L)	Glu(mg/dl)	Bili(mg/dl)	ALP(μ /L)
CDDP	58.0 \pm 15.0*	190.0 \pm 14.0	166.5 \pm 20.5*	0.55 \pm 0.05	262.0 \pm 114.0
A1	46.7 \pm 7.4*	125.1 \pm 10.7	117.6 \pm 16.3	0.30 \pm 0.068	230.9 \pm 73.9
A2	50.0 \pm 7.9*	124.3 \pm 7.8*	127.1 \pm 9.3	0.34 \pm 0.06	247.1 \pm 58.9
A3	43.7 \pm 5.8*	105.9 \pm 5.5*	126.4 \pm 11.1	0.34 \pm 0.05	249.5 \pm 30.3
B1	37.8 \pm 1.1*	130.6 \pm 3.8	117.2 \pm 10.3	0.37 \pm 0.03	135.9 \pm 12.1
B2	36.3 \pm 2.6*	124.1 \pm 9.6	113.3 \pm 11.0	0.39 \pm 0.04	123.9 \pm 14.7
B3	38.9 \pm 3.3*	112.0 \pm 6.3*	126.9 \pm 9.5	0.39 \pm 0.03	146.7 \pm 14.5
C1	36.6 \pm 4.0*	126.5 \pm 10.9*	104.2 \pm 10.2	0.42 \pm 0.02	99.0 \pm 2.6*
C2	48.4 \pm 5.2*	123.7 \pm 7.6*	111.9 \pm 9.4	0.41 \pm 0.03	110.4 \pm 11.3*
C3	44.7 \pm 2.9*	118.3 \pm 9.4*	134.9 \pm 15.5	0.37 \pm 0.05	165.4 \pm 26.1
Control	25.7 \pm 2.4	164.4 \pm 20.0	107.5 \pm 14.6	0.59 \pm 0.14	239.0 \pm 97.4

Values represent Mean+S.D. for ten rats.

* Significantly different from the control at P<0.05

bun, ALP는 정상치를 보여 간독성은 거의 없음을 알 수 있었다.

A, B 및 C의 경우 고용량 투여군에 있어 ALT, AST, glucose, total bilirubin 모두 정상치 였으며 B 및 C의 경우 고용량 투여군에 있어 ALP의 활성이 약간 감소됨을 알 수 있었다.

따라서, A, B 및 C 모두는 시험에 사용한 용량에서는 간독성을 유발하지 않음을 알 수 있었다.

결 론

새로 합성한 백금착체 항암제 A, B 및 C의 신장, 조혈기 및 간장에 대한 독성을 시험한 결과 A, B 및 C 모두 최고용량군에서 cisplatin에 비해 매우 낮은 신장독성, 간장독성 및 조혈기독성을 나타내었으며, 이때 사용한 투여량이 cisplatin에 비해 4~8배 높은 용량이라는 점을 고려한다면 신약개발 후보 물질로서의 충분한 가능성을 제시한다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Bosanqnet, A.G : Br. J. Cancer 47, 781, 1983
2. Brian, K., and Brian, C. : Oxidative Stress 171-194, 1991
3. Chiuten, D., *et al* : Cancer 53, 211, 1983
4. C vitkovic, E., *et al* : Cancer 39, 1357, 1977

5. Dobyhan, D.C *et al* : J. Pharmacol. Exp. Ther. 213, 551, 1980
6. Estman, A. Biochemistry, 24, 5027-5032, 1985
7. Groth, S., *et al* : Cancer chemother. Pharmacol., 17, 191, 1986
8. Hall, K.S., *et al* : Cancer chemother. Pharmacol., 18, 74, 1986
9. Jones, B.R. *et al* : Clin. Pharmacol. Ther. 27, 557, 1980
10. Jones, J.C. *et al* : the 12th International Congress of Pharmacol. Montreal, Canada, July, 27th, 1994
11. Kagan, V.E. *et al* : Aech. Biochem. Biophys., 280, (1), 33-39, 1990
12. Levi, J. *et al* : J. Pharmacol. Exp. Ther. 213, 545, 1980
13. Reed, E. *et al* : J. Clin. invest. 77, 545-550, 1986
14. Rosenberg, B : Nature 222, 385-386, 1969
15. Rozenzweig, M : Ann. Intern. Med. 86, 803-812, 1977
16. Schaeppi, U. *et al* : Toxicol. Applied Pharmacol., 25, 230, 1973
17. Schwatzer, V.G. *et al* : Laryngoscope 96, 948, 1986
18. Taylor, N.S. : Am. J. Pathol., 46, 1, 1965
19. Von Hoff, D.D. : J. Clin. Oncol., 5, 169-170, 1987