

삼인산 아데노신 방광 내 주입으로 유도된 과민성방광 동물모델에서 방광 내 항무스카린제 주입의 효과

Effects of Intravesical Instillation of Antimuscarinics on Bladder Overactivity Induced by Intravesical Instillation of Adenosine Triphosphate in Rats

Sang Bong Lee, Jae Won Lee, Yong Tae Kim

From the Department of Urology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Adenosine triphosphate (ATP) from the urothelium acts as a sensory neurotransmitter and is augmented in many diseases, such as overactive bladder. We investigated the effects of intravesical instillation of oxybutynin on ATP-induced bladder overactivity to determine whether this effect is mediated by effects on urothelial muscarinic receptors.

Materials and Methods: Cystometry (at rate of 0.04 ml/min) was performed in female Sprague-Dawley rats (body weight 250 g) under urethane anesthesia (1.2 g/kg). After a 2-hour baseline period, protamine sulfate (10 mg/ml) was instilled for 1 hour, and then ATP (60 mM, pH 6.0) or a mixture of oxybutynin (10^{-6} M) and ATP (60 mM, pH 6.0) was instilled intravesically. We performed experiments with 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methobromide (4-DAMP) and methoctramine by the same methods. Cystometric parameters, such as the intercontraction interval (ICI), pressure threshold (PT), and maximal voiding pressure (MVP), were compared.

Results: With intravesical instillation of ATP after protamine sulfate treatment, the ICI was decreased compared with baseline (ICI: baseline, 487.1 ± 64.8 s; protamine, 450.6 ± 56.1 s; ATP, 229.7 ± 35.3 s; $p < 0.05$). Addition of oxybutynin, 4-DAMP, or methoctramine in the ATP solution did not significantly change the ICI compared with ATP solution alone (ICI: oxybutynin, 189.1 ± 32.3 s; 4-DAMP, 161.1 ± 22.8 s; methoctramine, 341.0 ± 113.3 s; $p > 0.05$). Intravesical instillation of ATP decreased MVP and PT significantly compared with baseline, but MVP and PT were not changed significantly with oxybutynin, 4-DAMP, or methoctramine compared with ATP.

Conclusions: Bladder overactivity induced by intravesical instillation of ATP was not suppressed by intravesical instillation of antimuscarinics. Suppression of ATP-induced bladder overactivity by intravenous oxybutynin is not mediated by urothelial muscarinic receptors. (*Korean J Urol* 2009;50:396-400)

Key Words: Adenosine triphosphate, Muscarinic antagonists, Rats

Korean Journal of Urology
Vol. 50 No. 4: 396-400, April 2009

DOI: 10.4111/kju.2009.50.4.396

한양대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이상봉 · 이재원 · 김용태

Received : December 17, 2008

Accepted : March 4, 2009

Correspondence to: Yong Tae Kim
Department of Urology, Hanyang University College of Medicine, 17, Hangdang-dong, Sungdong-gu, Seoul 133-792, Korea
TEL: 02-2290-8595
FAX: 02-2299-2186
E-mail: ytkimuro@hanyang.ac.kr

This article was researched by foundation of Hanyang University investigation department (HY-2006-N).

© The Korean Urological Association, 2009

서론

하부요로증상은 과민성방광 등 많은 비뇨기계 질환의 주요 증상이다. 하부요로증상의 치료에서 항무스카린제가 가

장 흔히 사용되며 비록 증상은 어느 정도 완화되나 그 효과는 제한적이다.¹ 그 이유는 하부요로증상의 병태생리에서 항무스카린제에 의해 조절이 되지 않는 다른 기전이 관여하기 때문인 것으로 추측되고 있다. 하부요로증상의 병태생리는 아직 완전히 밝혀지지 않은 바에 비추어 배뇨근의 미세변

화 등에 의한 배뇨근과활동성과 요로상피의 신경전달물질 분비 증가에 따른 방광의 감각기능의 항진 등이 연관된 것으로 생각되고 있다. 즉 배뇨근과활동성이나 아세틸콜린과 연관된 감각기능의 이상은 항무스카린제에 의해 억제될 수 있으나 다른 기전에 의한 하부요로증상에는 항무스카린제의 효과를 기대하기 힘들다.

삼인산 아데노신은 방광상피에서 분비되며 방광의 충만으로 분비는 점차 증가하여 점막하층의 감각신경 내 퓨린성 수용체에 작용하여 방광의 감각 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다.² 하부요로증상의 원인인 노화 및 여러 방광 질환에서 방광상피의 삼인산 아데노신의 분비가 증가되는 것으로 보고되었다. 삼인산 아데노신의 분비증가가 하부요로증상의 주요 원인인 경우 항무스카린제는 효과가 없어야 하나 실제 많은 하부요로증상 환자들에서 항무스카린제는 다소의 증상 완화를 보인다. 일부 항무스카린제는 항무스카린 효과 이외에 다른 기전으로 방광의 과활동성을 억제하는 것으로 알려져 있다.^{3,4} 저자들은 oxybutynin이 방광 내 adenosine triphosphate (ATP) 주입으로 유도된 방광 과활동성을 억제한다는 것을 발표하였다. 이에 ATP 주입에 의한 방광 과활동성에 대한 oxybutynin의 억제 효과가 방광의 감각 기전의 억제에 의한 것인지 알아보하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 수술방법

본 연구는 한양대학교 의과대학 실험동물실 위원회의 승인하에 시행되었다. 총 24마리의 250 g 내외의 성인 암쥐 (Orient Bio Inc, 대한민국)가 사용되었으며 각 약제 별로 8마리가 사용되었다. Enflurane (중의제약, 대한민국) 전신마취하에 urethane (1.2 g/kg) 피하주사 후 복부 정중 절개를

통하여 양측 요관을 절찰하고 PE-50 도관 (A-M System, Inc., USA)을 방광 침부에 삽입 후 고정하였다. 방광침부에 삽입된 PE50 도관을 3 way stopcock에 연결하여 한쪽은 infusion pump (KD Scientific, USA)를 이용한 실험 약제의 주입에 이용하였고 다른 한 쪽은 압력변환기 (AD Instrument, Australia)에 연결하여 압력을 기록하였다.

2. 방광내압측정술

방광내압측정술은 urethane (1.2 g/kg) 마취하에 바로 누운 자세에서 시행되었으며 방광 내 주입 약제는 0.04 ml/min의 속도로 주입되었다. 방광도관 설치 후 2시간 이상 생리 식염수를 이용한 방광내압측정술로 배뇨주기가 안정된 후 protamine sulfate (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, Inc., USA), ATP (60 mM, pH 6.0, Sigma-Aldrich, Inc., USA) 그리고 항무스카린제 (1×10^{-6} M)와 ATP의 혼합액을 각각 차례로 30분간 방광 내로 주입하였다.

사용된 항무스카린제는 oxybutynin, 4-DAMP (M3 무스카린 수용체 길항제), methoctramine (M2 무스카린 수용체 길항제)이었으며 모든 용액의 pH는 6.0으로 조정하여 사용하였다. 각각의 약제 주입 동안의 수축간 간격 (intercontraction interval; ICI), 최대배뇨압 (maximal voiding pressure; MVP), 배뇨역치압 (pressure threshold; PT)를 비교 분석하였으며 이들 지표는 안정된 연속적인 3회의 배뇨주기의 평균값을 이용하였다.

3. 통계처리

모든 데이터는 평균±표준편차로 표시하였으며 각 지표 간의 비교는 GraphPad Prism (GraphPad Software, USA)을 이용한 ANOVA 검사로 시행하였으며 각각의 변수의 비교를 위해서는 Tukey's multiple comparison test를 사용하였고 p값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것

Table 1. Cystometric variables with intravesical instillation of saline, protamine, and ATP with or without antimuscarinics

Variables		Saline	Protamine	ATP	Mixture with ATP
ICI (s)	Oxybutynin	382.6±85.7	409.7±79.5	208.3±50.4 ^a	189.1±32.3 ^a
	4-DAMP	380.9±60.5	306.2±34.5	154.8±17.6 ^a	161.1±22.8 ^a
	Methoctramine	733.0±143.0	666.8±121.5	342.0±88.8 ^a	341.0±113.3 ^a
MVP (cmH ₂ O)	Oxybutynin	26.5±1.8	26.3±1.6	24.4±2.4	19.0±1.8 ^a
	4-DAMP	26.0±2.5	24.4±1.6	17.8±1.1 ^a	16.9±1.4 ^a
	Methoctramine	28.5±3.2	23.7±2.4	18.5±1.2 ^a	15.9±2.0 ^a
PT (cmH ₂ O)	Oxybutynin	5.5±0.6	4.8±0.5	2.7±0.5 ^a	2.0±0.4 ^a
	4-DAMP	5.4±1.0	5.2±0.5	2.0±0.5 ^a	1.8±0.6 ^a
	Methoctramine	3.3±0.2	3.2±0.6	1.6±0.4 ^a	1.9±0.4 ^a

Data presented as Mean±SD. ATP: adenosine triphosphate, DAMP: diphenylacetoxymethylpiperidine methobromide, ICI: intercontraction interval, PT: pressure threshold, MVP: maximal voiding pressure. ^a: p<0.05 vs. saline

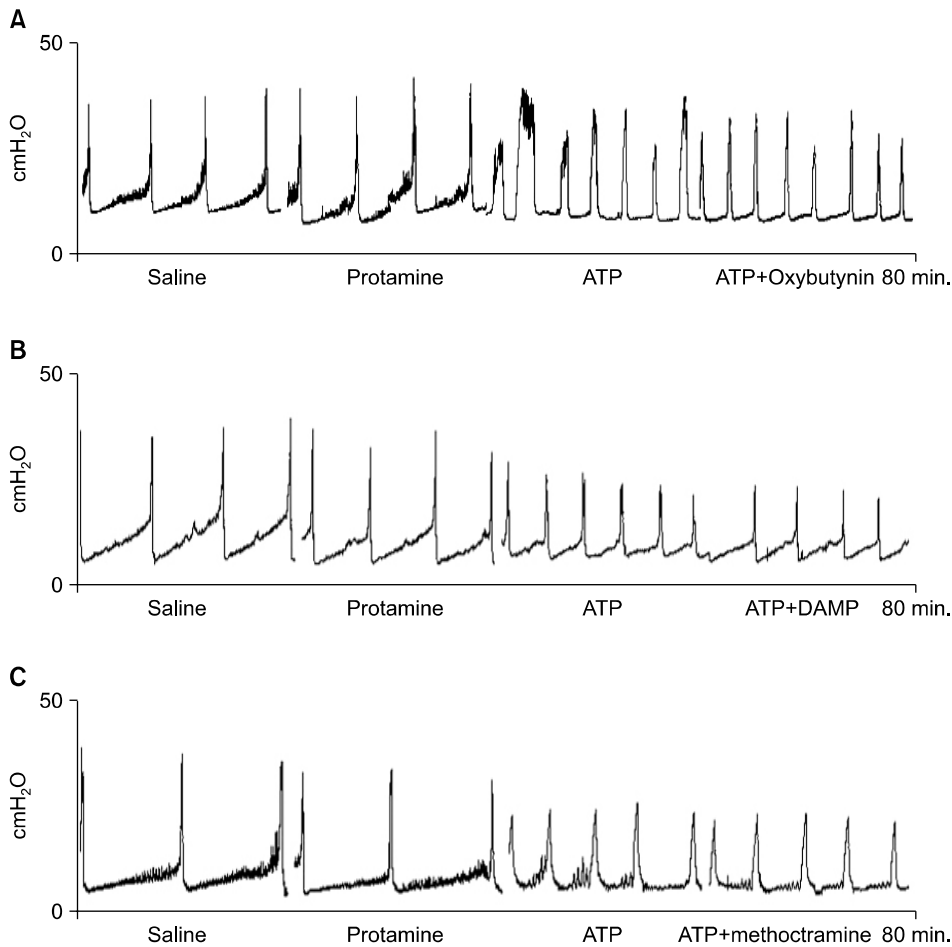


Fig. 1. Typical cystometric findings. ICI decreased with intravesical ATP, but antimuscarinics did not affect the ATP-induced decrease in the ICI. (A) Oxybutynin, (B) 4-DAMP, (C) Methoctramine. ICI: intercontraction interval, ATP: adenosine triphosphate, 4-DAMP: 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methobromide.

으로 간주하였다.

결 과

방광 내 protamine sulfate 전처리 후 adenosine triphosphate (ATP) 주입에 의한 변화는 수축간 간격이 생리식염수 주입 시에 비해 방광 내 protamine sulfate 주입 후 다소 감소하였으나 통계적으로 유의하지는 않았다 ($p > 0.05$) (Table 1, Fig. 1). 최대배뇨압도 생리식염수 주입 시와 방광 내 protamine sulfate 주입 시 차이가 없었다. 배뇨역치압도 생리식염수 주입 시에 비해 protamine sulfate 주입 시 변화가 없었다. Protamine sulfate 전처리 후 adenosine triphosphate (ATP) 주입 시 수축간 간격, 최대배뇨압, 배뇨역치압은 모두 생리식염수 주입 시에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2). 본 실험에서 사용된 모든 항무스카린제 (oxybutynin, 4-DAMP, methoctramine)는 모두 같은 효과를 보였다 (Table 1, Fig. 1). 즉 항무스카린제와 ATP의 혼합액을 방광 내 주입한 경우, 생리식염수를 주입한 경우에 비해 수축간 간격, 최대배뇨압, 배뇨역치압 모두 통계적으로 유의하

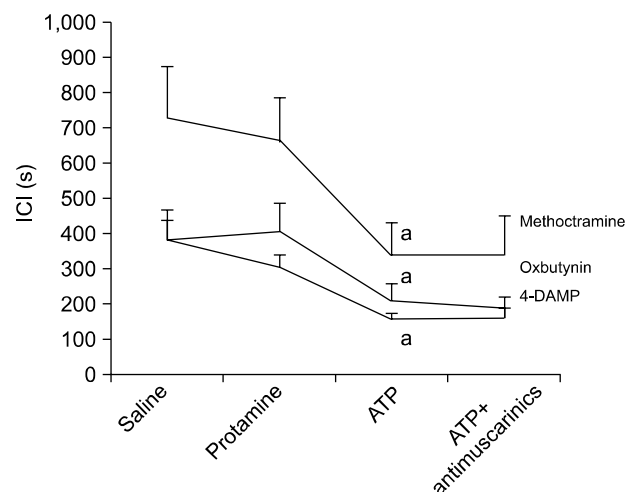


Fig. 2. Changes in the ICI with intravesical instillation of saline, protamine, ATP, and mixtures of ATP and antimuscarinics. The ICI was significantly decreased with intravesical instillation of ATP. Addition of oxybutynin, 4-DAMP, or methoctramine to the ATP solution did not significantly change the ICI compared with ATP solution alone. ICI: intercontraction interval, ATP: adenosine triphosphate, 4-DAMP: 4-diphenylacetoxy-N-methylpiperidine methobromide. ^a: $p < 0.05$ vs. saline.

게 감소하였다 ($p < 0.05$) (Fig. 2). 반면 항무스카린제와 ATP의 혼합액을 방광 내 주입한 경우 ATP 용액을 단독으로 주입한 경우에 비해 수축간 간격, 최대배뇨압, 배뇨역치압 모두 차이가 없었다 ($p > 0.05$).

고 찰

배뇨 신경 생리에서 주된 신경전달물질은 아세틸콜린이며 따라서 과민성방광 등 하부요로증상을 호소하는 환자에서 항무스카린제가 주로 사용되고 있다. 즉 하부요로증상, 특히 요저장 증상이 배뇨근의 변화로 인한 흥분성의 증가 및 국소적 배뇨근 수축에 의한 것이며 배뇨근 수축은 아세틸콜린이 배뇨근의 무스카린 수용체에 작용하여 발생하므로 이를 억제하기 위해서 항무스카린제가 사용되고 있다.⁵ 비록 항무스카린제는 요절박, 절박성요실금과 같은 하부요로증상을 어느 정도 완화시키지만 요저장증상의 호전은 많은 경우 만족스럽지 못하다.¹⁶ 그 이유는 하부요로증상의 발생 기전이 매우 다양하며 아세틸콜린 및 무스카린 수용체 이외에 다른 기전이 있기 때문인 것으로 추측된다.

하부요로증상의 발생기전에는 과거에는 폐색, 방광의 허혈, 노화 호르몬의 변화에 따른 배뇨근의 변화가 주된 것으로 생각되어 왔다.⁷ 하지만 최근의 연구 결과 방광점막 및 점막하조직 내의 감각신경 기능의 변화가 하부요로증상의 원인으로 대두되었다.⁸ Yoshida 등⁹은 방광점막에서 아세틸콜린과 ATP를 분비되며 분비량은 방광의 충만으로 점차 증가한다고 발표하였다. 저자들은 과민성방광 동물모델을 이용한 연구에서 아세틸콜린이 방광의 감각기능에 관여하며 항무스카린제가 배뇨근의 수축에 영향을 주지 않고 방광의 감각 기능을 억제한다는 것을 발표하였다.^{7,10} 또한 방광의 점막하층에 존재하는 감각신경에는 ATP에 대한 수용체가 존재하며¹¹ 이 수용체가 자극되면 감각신경이 자극된다.¹² 특히 ATP는 하부요로증상의 발생 기전과 깊이 연관되어 있는 것으로 생각되고 있다. 노화, 과민성방광, 척수손상에 의한 신경인성방광의 경우 방광점막으로부터 ATP 분비가 증가되어 있다.^{2,13} 또한 노화가 진행되면 배뇨근의 수축 기전에서도 ATP가 차지하는 비중이 증가한다.⁸ 따라서 하부요로증상의 치료에서 항무스카린제의 효과는 제한적일 수밖에 없을 것이며 퓨린성 수용체 길항제를 사용하는 것이 바람직하나 아직 사용 가능한 약제가 없는 실정이다.¹⁴

현재 사용 중인 항무스카린제 중 일부는 무스카린 수용체에 대한 길항작용 이외에 다른 효과를 보인다. Oxybutynin은 칼슘 길항작용 및 C 신경섬유 기능 억제 작용을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.^{15,16} Propiverine의 대사 산물인 M-1도 칼슘 길항작용에 의한 평활근 이완 효과가 보고되었

다.¹⁷ 저자들은 방광 내 ATP 주입으로 유도된 과민성방광 동물모델에서 정맥으로 투여된 oxybutynin이 농도 의존적으로 방광과활동성을 억제한다고 보고하였다.¹⁸ 그러나 oxybutynin이 ATP에 의한 방광과활동성을 억제하는 기전을 밝히지는 못하였다. 실제 환자에게 사용되는 oxybutynin의 용량은 칼슘 길항작용을 보이기에 매우 적으므로 상기 연구의 결과를 설명하기 힘들다.¹⁵ 이에 저자들은 방광과활동성 억제가 oxybutynin의 C 신경섬유 기능 억제 작용에 의한 것인지 알아보고자 본 연구를 시행하였다. 본 연구의 결과 방광 내로 주입된 oxybutynin은 방광 내 ATP 주입으로 유도된 방광과활동성을 억제하지 못하였다. 방광 내 ATP 주입에 의한 방광과활동성은 배뇨근 내의 퓨린성 수용체가 자극되어 유도되어지는 것으로 생각되어 왔으나 저자들의 연구결과 방광의 감각기전의 자극도 함께 작용하는 것으로 추측된다.¹⁹ 방광 내로 주입된 oxybutynin은 실험이 진행된 짧은 시간 동안에는 방광 점막에는 작용하지만 배뇨근으로 흡수되지 않으므로 배뇨근에 대한 항무스카린 효과나 칼슘 길항작용은 일어나지 않는 것으로 판단하였다.¹⁰ 따라서 방광 내 ATP 주입으로 유도된 방광 과활동성은 방광내로 투여된 oxybutynin의 C 신경섬유에 대한 작용으로 억제 되지 않는 것으로 판단되었다.

하지만 실제 임상에서는 oxybutynin을 비롯한 항무스카린제들이 다른 경로를 경유하여 퓨린성 감각신경계에 작용할 수 있는 것으로 추측된다. Kullmann 등²⁰은 쥐의 방광점막세포를 이용한 실험에서 무스카린 수용체를 자극하면 ATP 분비가 증가하고 nitric oxide의 분비가 감소하여 방광의 C 신경섬유의 기능을 조절한다고 보고하였다. 또한 이 작용들은 세포 내 칼슘 유입에 의한 것으로 여겨진다.²¹ 따라서 항무스카린제는 방광점막의 ATP 분비를 감소시키고 nitric oxide의 분비를 증가시켜 하부요로증상을 호전시킬 수 있다.

본 실험에서 저자들은 방광 내 ATP 주입으로 과민성방광을 유도하기 위해서 protamine 전처치를 시행하였다. ATP 용액은 강한 산성으로 방광 내 주입 시 방광점막을 손상시킬 수 있으며 vanilloid 수용체를 자극할 수 있다. 또한 산도를 보정한 ATP 용액은 방광점막을 잘 통과하지 않으며 ecto-ATPase에 의해 쉽게 파괴되어 방광과활동성을 유도하기 힘들다.²¹ 이에 저자들은 protamine으로 방광점막의 투과도를 높인 후 산도를 보정한 ATP 용액을 사용하였다.²² 방광내 protamine 전처치는 수축간 간격, 최대배뇨압, 배뇨역치압 등 배뇨기능에 영향이 없었다. 그러나 상기 방법으로 유도된 방광과활동성에서 최대배뇨압, 배뇨역치압이 감소하였는데 이는 방광 용적이 감소하여 배뇨량이 적어진 이유 때문인 것으로 추측된다.

본 연구에서 최대배뇨압이 방광 내 ATP 주입 후 감소하였으나 다른 보고들에서는 변화가 없거나 오히려 증가하는 것으로 발표되었다.²² 본 연구의 결과가 다른 보고들과 다른 이유는 방광과활동성의 정도의 차이에서 기인한 것으로 추측된다. 즉 본 연구에서 방광 내 ATP 주입 후 수축간 간격의 감소가 다른 보고에 비하여 심하며 이로 인해 배뇨량이 감소하여 최대배뇨압이 감소한 것으로 생각한다.

결론

방광 내 ATP 주입으로 유도된 방광 과활동성은 방광 내로 주입된 oxybutynin에 의해서는 억제되지 않았다. 따라서 방광 내 ATP 주입으로 유도된 방광과활동성에 대한 oxybutynin의 억제 효과는 C 신경섬유 기능 억제 작용에 의한 것이 아닌 것으로 판단된다.

REFERENCES

- Herbison P, Hay-Smith J, Ellis G, Moore K. Effectiveness of anticholinergic drugs compared with placebo in the treatment of overactive bladder: systematic review. *BMJ* 2003;326:841-4
- Ford AP, Geever JR, Nunn PA, Zhong Y, Cefalu JS, Dillon MP, et al. Purinoceptors as therapeutic targets for lower urinary tract dysfunction. *Br J Pharmacology* 2006;147(Suppl 2):S132-43
- Andersson KE, Chapple CR. Oxybutynin and the overactive bladder. *World J Urol* 2001;19:319-23
- Uchida S, Kurosawa S, Fujino Oki T, Kato Y, Nanri M, Yoshida K, et al. Binding activities by propiverine and its N-oxide metabolites of L-type calcium channel antagonist receptors in the rat bladder and brain. *Life sci* 2007;80:2454-60
- Yoshimura N. Lower urinary tract symptoms (LUTS) and bladder afferent activity. *Neurourol Urodyn* 2007;26(Suppl 6):908-13
- Yoo JS, Kim JC, Hwang TK. Predictors of antimuscarinic treatment response for female patients with overactive bladder. *Korean J Urol* 2007;48:66-71
- Chapple CR, Roehrborn CG. A shifted paradigm for the further understanding, evaluation, and treatment of lower urinary tract symptoms in men: focus on the bladder. *Eur Urol* 2006;49:651-8
- de Groat WC. The urothelium in overactive bladder: passive bystander or active participant? *Urology* 2004;64(6 Suppl 1):7-11
- Yoshida M, Miyamae K, Iwashita H, Otani M, Inadome A. Management of detrusor dysfunction in the elderly: changes in acetylcholine and adenosine triphosphate release during aging. *Urology* 2004;63(3 Suppl 1):17-23
- Kim Y, Yoshimura N, Masuda H, de Miguel F, Chancellor MB. Antimuscarinic agents exhibit local inhibitory effects on muscarinic receptors in bladder-afferent pathways. *Urology* 2005;65:238-42
- Andersson KE. Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology* 2002;59(5 Suppl 1):43-50
- Namasivayam S, Eardley I, Morrison JF. Purinergic sensory neurotransmission in the urinary bladder: an in vitro study in the rat. *BJU Int* 1999;84:854-60
- Khera M, Somogyi GT, Kiss S, Boone TB, Smith CP. Botulinum toxin A inhibits ATP release from bladder urothelium after chronic spinal cord injury. *Neurochem Int* 2004;45:987-93
- Andersson KE. Treatment-resistant detrusor overactivity-underlying pharmacology and potential mechanisms. *Int J Clin Pract* 2006;151(Suppl):8-16
- Kachur JF, Peterson JS, Carter JP, Rzeszutarski WJ, Hanson RC, Noronha-Blob L. R and S enantiomers of oxybutynin: pharmacological effects in guinea pig bladder and intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;247:867-72
- De Wachter S, Wyndaele JJ. Intravesical oxybutynin: a local anesthetic effect on bladder C afferents. *J Urol* 2003;169:1892-5
- Sugiyama Y, Yoshida M, Masunaga K, Satoji Y, Maeda Y, Nagata T, et al. Pharmacological effects of propiverine and its active metabolite, M-1, on isolated human urinary bladder smooth muscle, and on bladder contraction in rats. *Int J Urol* 2008;15:76-81
- Kim YT, Kim SJ, Lee JW, Kim DK, Kim HK, Son YW, et al. Effects of intravenous oxybutynin on bladder overactivity induced by intravesical instillation of adenosine triphosphate in rats. *J Urol* 2008;180(Suppl):153, abstract 1287
- Kim SJ, Mon HS, Choi HY, Kim YT. Characteristics of detrusor overactivity induced by intravesical instillation of adenosine 5'-triphosphate. *Korean J Urol* 2008;49:424-31
- Kullmann FA, Artim DE, Birder LA, de Groat WC. Activation of muscarinic receptors in rat bladder sensory pathways alters reflex bladder activity. *J Neurosci* 2008;28:1977-87
- Kullmann FA, Artim D, Beckel J, Barrick S, de Groat WC, Birder LA. Heterogeneity of muscarinic receptor-mediated Ca²⁺ responses in cultured urothelial cells from rat. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;294:F971-81
- Nishiguchi J, Hayashi Y, Chancellor MB, de Miguel F, de Groat WC, Kumon H, et al. Detrusor overactivity induced by intravesical application of adenosine 5'-triphosphate under different delivery conditions in rats. *Urology* 2005;66:1332-7