

음이온계 약물의 간수송과정에 있어서 대향수송의 약물동력학적 모델링 및 시뮬레이션

송석길 · 이준섭* · 정연복#

충북대학교 약학대학 국가지정연구실, *충북대학교병원 약제부

(Received May 3, 2005; Revised May 25, 2005)

Pharmacokinetic Modelling and Simulation of the Counter-transport in the Hepatic Transport of Organic Anions

Sukgil Song, Jun Seup Lee* and Youn Bok Chung#

National Research Laboratory (NRL) of PK/PD, College of Pharmacy, Chungbuk National University,

*Chungbuk National University Hospital, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Abstract — The purpose of the present study was to kinetically investigate the carrier-mediated uptake in the hepatic transport of organic anions, and to simulate the “*in vivo* counter-transport” phenomena, using kinetic model which was developed in this study. The condition that the mobility of carrier-ligand complex is greater than that of free carrier is not essential for the occurrence of “counter-transport” phenomenon. To examine the inhibitory effects on the initial uptake of organic anions by the liver, it is necessary to judge whether the true counter-transport mechanism (trans-stimulation) is working or not. Effects of bromophenol blue (BPB) or bromosulfophthalein (BSP) on the plasma disappearance curves of a 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) were then kinetically analyzed based on a flow model, in which the ligand is eliminated only from the peripheral compartment (liver compartment). Moreover, “*in vivo* counter-transport” phenomena were simulated based on the perfusion model which incorporated the carrier-mediated transport and the saturable intracellular binding. The “*in vivo* counter-transport” phenomena in the hepatic transport of a organic anions were well demonstrated by incorporating the carrier-mediated process. However, the “*in vivo* counter-transport” phenomena may be also explained by the enhancement of back diffusion due to the displacement of intracellular binding. In conclusion, one should be more cautious in interpreting data obtained from so-called “*in vivo* counter-transport” experiments.

Keywords □ organic anions, hepatic transport, counter-transport, pharmacokinetic modelling, simulation

유기음이온계 약물은 혈중에서 대부분 간장으로만 이행되는 특성¹⁻⁴⁾ 때문에 약물의 간-담즙 수송 연구의 모델물질 및 임상에서의 간기능 진단시약으로 사용되고 있다.⁵⁻⁹⁾ 음이온은 담즙산,¹⁰⁻¹³⁾ 지방산¹⁴⁾ 및 색소류(cholephils)¹⁵⁻¹⁸⁾로 크게 구별된다. 이들은 간내 이행 과정에서 독립된 수송계를 경유하거나 서로 공유한다.^{1,2)} 간기능 검사약으로 사용되고 있는 bromosulfophthalein(BSP) 및 indocyanine green(ICG)은 담즙산과 Na⁺ 비의존성 수송계(multispecific organic anion transporter)를 공유한다.^{15,19,20)} ATP 의존성에 따라 구별하면, BSP 등의 대부분의 색소류는 ATP 비의존성으로 촉진확산에 의한다고 보고되고 있다.²¹⁻²³⁾

일반적으로 유기 음이온계 약물이 간으로 이행되는 과정에 있어서 담체가 관여하는 “대향수송(counter-transport)” 현상이 검토되고 있다. Scharschmidt 등²⁴⁾은 이러한 현상의 검출이 *in vivo*에 있어서도 가능한가에 대해 검토하여 긍정적인 결과를 보고하였다. 즉, 담체의 막내 순환(cycle)을 증명하기 위해 사용되고 있는 대향수송현상이 *in vivo*에 있어서도 일어날 수 있다는 사실을 시사하여, 그 후 이 분야의 많은 종설 및 교과서 등에 인용되어 정착되고 있다. Scharschmidt 등²⁴⁾은 tracer량의 약물 A(예를 들면, 방사성 동위원소를 표지시킨 BSP)를 정맥주사한 수분 후에 약물 B(예를 들면, BSP, ICG 등)을 비교적 과량으로 투여하는 것에 의해, 간장내로 이행되었던 표지체(tracer)가 혈중으로 efflux 되어 일시적으로 표지체의 혈중농도가 높아지는 현상을 보고하였다. 즉, 대측이라고 볼 수 있는 혈액 중에 첨가된 과량의 비표지체에 의해 간장내에 이행되었던 표지체의 efflux가 촉진된 것을 반영한 것으

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-261-2824 (팩스) 043-274-0752
(E-mail) chungyb@chungbuk.ac.kr

로, 적어도 “겉보기 대항수송” 현상을 나타낸 것이라고 할 수 있다.

본래 의미의 “대항수송” 현상은 혈액측에 가해진 약물 B에 의해 막내 비결합형 담체의 분포가 간장측에 풍부하게 된 결과, 같은 담체에 의해 수송되는 약물 A의 efflux가 촉진된다고 생각되고 있다. 본 연구자 등^{4,25,26}은 *in vivo*에 있어서의 대항수송현상이 1-anilino-8-naphthalene sulfonate(ANS)에 있어서도 관찰된 사실을 보고하였다. 또한, 이러한 현상이 막내 담체에 의해서 뿐만 아니라 간세포내 단백질합의 치환에 의해서도 설명될 수 있다는 가능성을 시사하였다. 즉, 혈액측에 가해진 약물 B가 간장내로 이행된 후, 약물 A(ANS)의 단백질합을 치환시킨 결과, 유리형 A의 농도를 증가시켜 efflux를 촉진시킨다고 추정할 수 있었다.

따라서, 본 연구에 있어서는 다음과 같은 목적으로 담체매개 “대항수송” 현상에 관한 속도론적 모델을 구축하고, 실제 *in vivo*에서 일어나는 혈장중 농도 변화 추이를 검토하여 그 기전을 밝히고자 하였다. 첫째, 담체매개 수송의 속도론적 모델을 구축하고자 하였다. 즉, 약물-담체 결합체의 막내 환산정수(P_1, P_3)와 비결합형 담체의 막내 환산정수(P_2)가 서로 같은 경우($P_1=P_3=P_2$) 및 $P_1=P_3>P_2$ 인 경우로 구분하여 검토하였다. 즉, “겉보기 대항수송” 현상을 “대측효과가 없는 경우” 및 “대측촉진” 과정으로 구분하여 설명하고자 하였다. 또한, 상기의 담체매개 수송 모델을 사용하여 *in vivo* 혈장중 농도를 설명할 수 있는 flow 모델을 구축하여 *in vivo* “대항수송” 현상에 대해 검토하였다. 특히, 간세포질내 단백질합 저해 및 담체매개 수송의 저해효과를 구분하여 검토하였다.

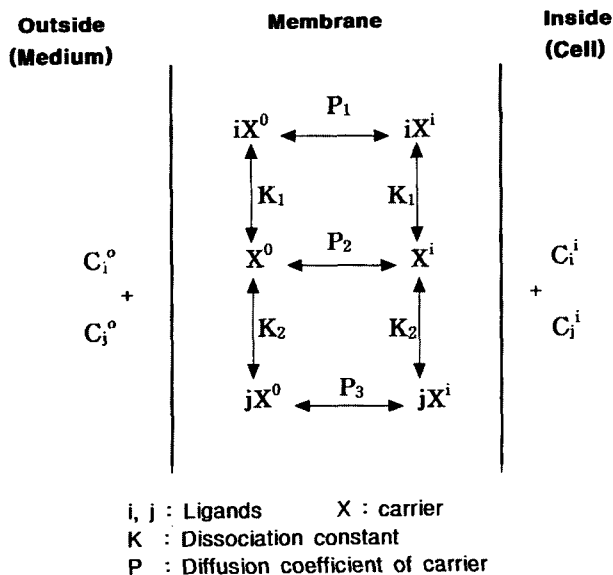


Fig. 1 – A model to explain the counter-transport. Assumptions; (1) ligand i and j share the same carrier, (2) diffusion coefficient of carrier can be changed depending on whether it is bound to ligand or not (usually, $P_1>P_2$ is assumed), (3) assuming facilitated diffusion, the affinities of ligands to the carriers are the same both at outer and inner sides.

실험 방법

대항수송과정의 모델링

담체매개 수송에서 약물 i에 대한 약물 j의 경쟁적 저해모델을 Fig. 1에 나타내었다. 저자 등⁴은 이 모델에서 약물 i 및 j의 influx(J_i^{i0}) 및 efflux(J_i^{j0})를 나타내는 식을 유도하는 방법을 보고한 바 있다. 즉, 약물 i를 소량(tracer)으로, 약물 j를 과량으로 사용하여 각각 외측(medium)에 존재시켰을 경우, 약물 i 및 j의 influx(J_i^{i0}) 및 efflux(J_i^{j0})는 각각 다음과 같이 계산할 수 있다. 즉, 약물 i의 influx(J_i^{i0})는

$$J_i^{i0} = \frac{P_1[Xt]}{\left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_j^0}{K_2 C_i^0} \right] + \frac{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_j^0}{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_j^0} \cdot \frac{C_i^0}{C_i^0} \cdot \left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_j^0}{K_2 C_i^0} \right]} \quad (1)$$

가 되며, 약물 i의 efflux(J_i^{j0})는

$$J_i^{j0} = \frac{P_1[Xt]}{\left[\frac{K_1}{C_i^i} + 1 + \frac{K_1 C_j^i}{K_2 C_i^i} \right] + \frac{C_i^i K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_j^i}{C_i^i K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_j^i} \cdot \frac{C_i^i}{C_i^i} \cdot \left[\frac{K_1}{C_i^i} + 1 + \frac{K_1 C_j^i}{K_2 C_i^i} \right]} \quad (2)$$

로 나타낼 수 있다. 여기서, (2)식은 (1)식에서 $C_i^0 \rightarrow C_i^i, C_i^i \rightarrow C_i^0, C_j^0 \rightarrow C_j^i, C_j^i \rightarrow C_j^0$ 로 치환하여 얻은 결과와 같다.

한편 약물 j의 flux에 관해서는 (1)식 및 (2)식에 있어서 $P_1 \rightarrow P_3, P_3 \rightarrow P_1, C_i^0 \rightarrow C_j^0, C_j^0 \rightarrow C_i^0, C_i^i \rightarrow C_j^i, C_j^i \rightarrow C_i^i, K_1 \rightarrow K_2, K_2 \rightarrow K_1$ 으로 치환하는 것에 의해, 각각 influx(J_j^{i0}) 및 efflux(J_j^{j0})를 나타낼 수 있다. 즉, 약물 j의 influx(J_j^{i0})는

$$J_j^{i0} = \frac{P_3[Xt]}{\left[\frac{K_2}{C_j^0} + 1 + \frac{K_2 C_i^0}{K_1 C_j^0} \right] + \frac{C_j^0 K_1 P_3 + K_1 P_2 K_2 + K_2 P_1 C_i^0}{C_j^0 K_1 P_3 + K_1 P_2 K_2 + K_2 P_1 C_i^0} \cdot \frac{C_j^0}{C_j^0} \cdot \left[\frac{K_2}{C_j^0} + 1 + \frac{K_2 C_i^0}{K_1 C_j^0} \right]} \quad (3)$$

가 되며, 약물 i의 efflux(J_j^{j0})는

$$J_j^{j0} = \frac{P_3[Xt]}{\left[\frac{K_2}{C_j^i} + 1 + \frac{K_2 C_i^i}{C_j^i K_1} \right] + \frac{C_j^i K_1 P_3 + K_2 P_2 K_1 + K_2 P_1 C_i^i}{C_j^i K_1 P_3 + K_2 P_2 K_1 + K_2 P_1 C_i^i} \cdot \frac{C_j^i}{C_j^i} \cdot \left[\frac{K_2}{C_j^i} + 1 + \frac{K_2 C_i^i}{K_2 C_j^i} \right]} \quad (4)$$

로 나타낼 수 있다. 여기서 약물 i의 농도가 약물 j에 비해 매우 낮으면 약물 j에 대한 약물 i의 영향을 무시할 수 있으므로, 약물 j의

flux는 각각 다음과 같이 간단하게 나타낼 수 있다.

$$J_j^{i0} = \frac{P_3[Xt]}{\left[1 + \frac{K_2}{C_j^0}\right] + \frac{P_3 C_j^0 + K_2 P_2}{P_3 C_j^0 + K_2 P_2} \cdot \frac{C_j^i}{C_j^0} \cdot \left[\frac{1 + K_2}{C_j^i}\right]} \quad (5)$$

$$J_j^{0i} = \frac{P_3[Xt]}{\left[1 + \frac{K_2}{C_j^i}\right] + \frac{P_3 C_j^i + K_2 P_2}{P_3 C_j^i + K_2 P_2} \cdot \frac{C_j^0}{C_j^i} \cdot \left[\frac{1 + K_2}{C_j^0}\right]} \quad (6)$$

In vivo 데이터의 시뮬레이션 모델

음이온계 약물의 *in vivo* 혈장중 농도추이의 시뮬레이션을 위해서는 Fig. 2의 모델을 사용하였다. 대부분의 유기음이온계 약물들은 혈중 알부민과 강력히 결합하고, 간장 이외의 조직으로의 분포는 무시할 수 있다. 따라서, 간의 세포외, 세포내 사이에는 Fig. 1에서 구한 influx(J^{0i}) 및 efflux(J^{i0})를 나타내는 식을 쓸 수 있다. 또한 간으로부터 혈액으로의 efflux 및 sequestration 과정에는 간세포내 비결합형 약물 농도에 의존하는 것으로 가정하였다. 각 컴파트먼트내의 mass-balance를 식으로 나타내면 다음과 같다. 즉,

약물 i에 대해서

$$V_1 \cdot \frac{dC_1}{dt} = -Q_p C_1 + Q_p \cdot C_2 / f_2 \quad (7)$$

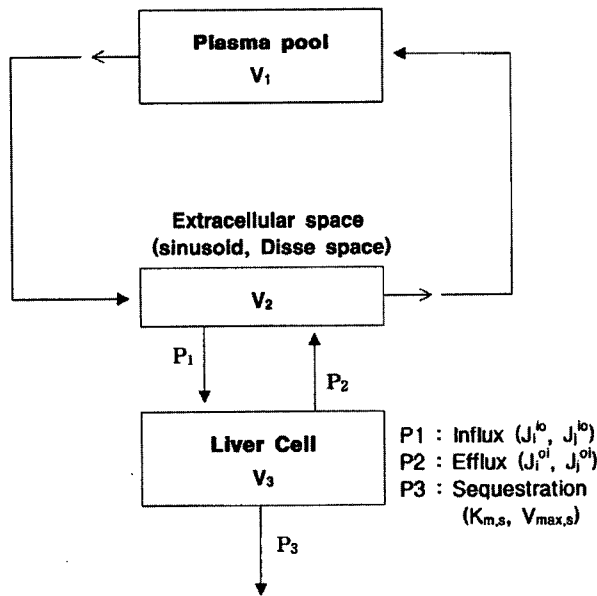


Fig. 2 - A perfusion model for simulation of counter-transport phenomenon *in vivo*. Calculation procedure and assumptions; (1) equations representing the flux of ligands i and j (J^{0i}, J^{i0}) are obtained from a model in Fig. 1, (2) kinetic parameters are determined so that they can explain the *in vivo* plasma disappearance curves of ligands, (3) efflux of ligands depends on the unbound concentrations in the liver cytosol.

$$\frac{V_2}{f_2} \cdot \frac{dC_2}{dt} = Q_p \left(C_1 - \frac{C_2}{f_2}\right) \cdot J_i^{0i} + J_i^{i0} \quad (8)$$

$$V_3 \cdot \frac{dC_3}{dt} = J_i^{0i} \cdot J_i^{i0} - v_{metab,i} \quad (9)$$

단, $v_{metab,i} = \frac{V_{max,s}^i \cdot C_{3,f}}{K_{m,s}^i + C_{3,f}}$ (10)

여기서 f_n 는 각 컴파트먼트내에서의 비결합형분율(free fraction)을 나타낸다. (8)식 및 (9)식에 있어서 J_i^{0i} 및 J_i^{i0} 는 (1)식 및 (2)식을 적용하였다. 단, $C_1^0 = C_2, C_1^i = C_{3,f}, C_j^0 = C_5, C_j^i = C_6$ 를 각각 나타낸다. 약물 j에 대해서

$$V_1 \cdot \frac{dC_4}{dt} = -Q_p C_4 + Q_p \cdot C_5 / f_5 \quad (11)$$

$$\frac{V_2}{f_5} \cdot \frac{dC_5}{dt} = Q_p \left(C_4 - \frac{C_5}{f_5}\right) \cdot J_j^{0i} + J_j^{i0} \quad (12)$$

$$V_3 \cdot \frac{dC_{6,total}}{dt} = J_j^{0i} \cdot J_j^{i0} - v_{metab,j} \quad (13)$$

단, $v_{metab,j} = \frac{V_{max,s}^j \cdot C_6}{K_{m,s}^j + C_6}$ (14)

여기서 (12)식의 좌변을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$V_3 \cdot \frac{dC_{6,total}}{dt} = V_3 \cdot \frac{dC_{6,total}}{dC_6} \cdot \frac{dC_6}{dt} = \left[\frac{R_{1,j} \cdot K_{1,j}}{(K_{1,j} + C_6)^2} + \frac{R_{2,j} \cdot K_{2,j}}{(K_{2,j} + C_6)^2} + 1 \right] \cdot V_3 \cdot \frac{dC_6}{dt} \quad (15)$$

(15)식을 (13)식에 대입하여 정리하면,

$$V_3 \cdot \frac{dC_6}{dt} = \frac{J_j^{0i} \cdot J_j^{i0} - v_{metab,j}}{\left[\frac{R_{1,j} \cdot K_{1,j}}{(K_{1,j} + C_6)^2} + \frac{R_{2,j} \cdot K_{2,j}}{(K_{2,j} + C_6)^2} + 1 \right]} \quad (16)$$

간 세포내 결합단백으로는 모델약물에 따라 ligandin(Y단백질)으로 가정하고 후술하는 *in vivo* 세포레벨의 단백질결합측정법으로 산출한 파라미터를 이용하여 세포내 비결합하여 약물농도를 계산하였다. 본 모델에서 담체매개에 의한 막수송 과정을 시뮬레이션하여 *in vivo*에 있어서 약물의 혈중소실곡선을 예측할 수 있는 검색방법을 확립하고자 하였다. 이를 위해서 상기의 모델에 의한 이론적인 방법과 함께 다음과 같이, 음이온계약물의 속도론적 파라미터를 적용하여 검토하였다.

간 세포내 단백질결합 저해의 파라미터 산출

대부분의 음이온계 약물들은 혈장단백과 강력하게 결합할 뿐만

아니라, 간 세포질내 ligandin(Y단백질) 등의 단백질과도 결합력이 강하다. 따라서, 약물 i(tracer량) 및 약물 j(과량)의 간 세포질내 단백질 결합 부위를 두종류(즉, 고친화성 부위 및 저친화성 부위)로 가정하고, 약물 i 및 j가 서로 경쟁적으로 결합한다면, 약물 i의 단백질 결합에 관한 식은

$$C_{b,i} = \frac{R_{1,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{1,i}(1 + C_{f,j}/Kd_{1,i}) + C_{f,i}} + \frac{R_{2,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{2,i}(1 + C_{f,j}/Kd_{2,i}) + C_{f,i}} \quad (17)$$

로 나타낼 수 있다. 여기서 $R_{1,i}$ 및 $R_{2,i}$ 는 약물 i의 고친화성 및 저친화성 결합부위의 결합용량을 각각 나타낸다. $Kd_{1,i}$ 및 $Kd_{2,i}$ 는 각 결합부위의 해리정수를 나타내고, $Kd_{1,j}$ 및 $Kd_{2,j}$ 는 약물 j에 대한 값을 말한다. 또한 $C_{f,j}$ 는 약물 j에 대한 비결합형 약물농도를 나타낸다.

약물 i의 총농도 $C_{T,i}$ 는

$$C_{T,i} = C_{b,i} + C_{f,i} \quad (18)$$

이므로, (17)식을 (18)식에 대입하면,

$$C_{T,i} = \frac{R_{1,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{1,i}(1 + C_{f,j}/Kd_{1,i}) + C_{f,i}} + \frac{R_{2,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{2,i}(1 + C_{f,j}/Kd_{2,i}) + C_{f,i}} + C_{f,i} \quad (19)$$

가 된다. 여기서 약물의 단백질결합을 나타내는 R_1 , R_2 , Kd_1 및 Kd_2 는 각각 간세포질과의 단백질결합실험에서 산출한 값³⁾을 사용하고, 또한 $C_{T,i}$ 도 실험적으로 계산할 수 있다. 따라서 약물 i의 비결합형 농도 $C_{f,i}$ 를 (19)식을 사용하여 피팅(fitting)함으로써 산출할 수 있다.

한편, 약물 j의 간세포질내 단백질결합에 관한 식은 약물 i와 같은 방법으로 다음과 같이 나타낼 수 있다. 즉, 약물 j의 총농도 $C_{T,j}$ 는

$$C_{T,j} = \frac{R_{1,j} \cdot C_{f,j}}{Kd_{1,j}(1 + C_{f,i}/Kd_{1,i}) + C_{f,j}} + \frac{R_{2,j} \cdot C_{f,j}}{Kd_{2,j}(1 + C_{f,i}/Kd_{2,i}) + C_{f,j}} + C_{f,j} \quad (20)$$

가 된다. 여기서 약물 i를 약물 j에 비해 소량(tracer)만을 사용하는 경우에는 (20)식에서 $C_{f,i}/Kd_{1,i} = 0$ 의 조건이 성립되므로 $C_{T,j}$ 를 나타내는 식은 다음과 같이 간단하게 표현된다.

$$C_{T,j} = \frac{R_{1,j} \cdot C_{f,j}}{Kd_{1,j} + C_{f,j}} + \frac{R_{2,j} \cdot C_{f,j}}{Kd_{2,j} + C_{f,j}} + C_{f,j} \quad (21)$$

실제로, 본 연구에서 약물 i로서 1-anilino-8-naphthalene sulfonate(ANS)를 사용한 경우의 단백질결합 실험결과,³⁾ 하나의 고친

화성 결합부위 및 비특이적 결합부위가 있다는 사실이 밝혀졌다. 따라서, 약물 i의 총농도 $C_{T,i}$ 를 나타내는 (19)식을 다음과 같이 간단히 나타낼 수 있다.

$$C_{T,i} = \frac{R_{1,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{1,i(app)} + C_{f,i}} + \alpha \cdot C_{f,i} + C_{f,i} \quad (22)$$

따라서, 약물 i의 비결합형 농도 $C_{f,i}$ 는

$$C_{f,i} = \frac{B + \sqrt{B^2 + 4Kd_{1,i(app)} \cdot C_{T,i} \cdot (\alpha + 1)}}{2(\alpha + 1)} \quad (23)$$

$$\text{단, } \left[\begin{aligned} B &= C_{T,i} - R_{1,i} - Kd_{1,i(app)} \cdot (\alpha + 1) \\ Kd_{1,i(app)} &= Kd_{1,i}(1 + C_{f,j}/Kd_{1,i}) \end{aligned} \right]$$

가 된다. 본 연구의 시뮬레이션 모델에서 약물 i 및 j의 간세포내 비결합형 약물농도는 (23)식 및 (21)식을 사용하여 각각 산출하였다.

음이온계 약물의 *in vivo* 혈장중 농도 시뮬레이션

*In vivo*에서의 “겔보기 대항수송” 현상의 시뮬레이션을 통하여 담체매개 수송의 저해 또는 간세포질내 단백질결합의 저해 등의 기전을 설명하기 위해서는 시뮬레이션에 사용되는 파라미터의 선택이 중요하다. 본 연구에서는 ANS에 대한 BSP 및 BPB의 경쟁적 저해를 시뮬레이션하였다. 즉, ANS의 일정소량을 정맥내 주입한 10분후 BPB 일정과량을 정맥주사하였을 때 관찰되는 “겔보기 대항수송” 현상을 검토하였다. 또한, 본 연구에서 구축한 속도론적 모델을 사용하여 문헌에 보고된 *in vivo* 혈장중 농도 추이를 재현하고자 하였으며, 담체 매개 수송 및 간세포질내 단백질결합 저해의 두 기전의 기여율을 밝히고자 하였다. 문헌에 보고된 생리학적 파라미터로부터, 흰쥐의 간혈류량(Q_h)은 30 ml/min, 혈장용적(V_1)은 40 ml/kg, extracellular 용적(V_2)은 4 ml/kg, 간의 용적(V_3)은 36 ml/kg의 값을 사용하였다.

In vivo 혈장중 농도 시뮬레이션을 위한 influx 파라미터 산출

ANS 3 $\mu\text{mol/kg}$ 을 정맥내 주입한 후 산출된 클리어런스, 분포 용적 및 각 속도 정수는 문헌^{3,4,16)}으로부터

$$CL_{\text{uptake}} = 6.41 \text{ ml/min/kg}$$

$$V_1 = 41.9 \text{ ml/kg}$$

$$k_{21} = 0.0289 \text{ min}^{-1}$$

$$k_{e1} = 0.0495 \text{ min}^{-1}$$

의 값을 사용하였다. 또한, influx 과정의 클리어런스(P_{influx}) 및 혈장중 ANS의 비결합형 분율(fu)는

$$P_{\text{influx}} = \frac{CL_h \cdot Q_p}{Q_p - CL_h} = \frac{6.4 \times 30}{30 - 6.4} = 8.1 \text{ ml/min/kg}$$

$$fu(\text{in vivo}) = 0.265$$

가 된다. $P_1=P_2=P$ 인 경우에

$$K_1=K_{m(\text{free})}=500 \mu\text{M}$$

$$V_{\max}=\frac{P_{\text{influx}} \cdot K_{m(\text{Free})}}{f_u}=\frac{8.1 \times 500}{0.265}=15280 \text{ nmol/min/kg}$$

가 된다. 여기서 $P=100$ 이라고 놓으면,

$$P[X_i]=2V_{\max}$$

$$[X_i]=306 \mu\text{M}$$

가 된다. 한편 $P_1=nP_2$ 인 경우에는

$$P_2[X_i]=\left(1+\frac{1}{n}\right)V_{\max}$$

$$K_1=\frac{(1+n)}{2} \cdot K_{m(\text{free})}$$

가 성립되므로, $P_1=10P_2$ (즉, $n=10$) 및 $P_2=10(P_1=100)$ 이면,

$$P_2[X_i]=1.1V_{\max}$$

$$K_{11}=\frac{11}{2}K_{m(\text{free})}$$

이므로 $[X_i]=\frac{1.1 \times 15280}{10}=1680 \mu\text{M}$

$$K_1=\frac{11 \times 500}{2}=2750 \mu\text{M}$$

이 된다.

In vivo 혈장중 농도 시뮬레이션을 위한 efflux 파라미터 산출

$$P_{\text{efflux}}=k_{21} \cdot V_n=0.0289 \times 36=1.04 \text{ ml/min/kg}$$

$$P_{\text{efflux, free}}=\frac{V_{\max}}{K_{m(\text{free})}}=\frac{15280}{500}=30.6 \text{ ml/min/kg}$$

따라서, 간세포질내 비결합형 분율(f_L)은

$$f_L=\frac{P_{\text{efflux}}}{P_{\text{efflux, free}}}=0.034$$

가 된다. 한편, 문헌^{3,4)}의 *in vivo* 평형투석법에 의해 산출한 간세포질내 단백질결합에 대한 파라미터는

$$R_1=41 \mu\text{M}, Kd_1=2.43 \mu\text{M}, R_2=2890 \mu\text{M}, Kd_2=259 \mu\text{M}$$

이므로, 본 연구의 시뮬레이션에서는 저친화성 부위의 단백질결합을 비특이적 결합으로 볼 수 있으므로, 비특이적 결합정수(α)는

$$\alpha=\frac{R_2}{Kd_2}=11$$

이 된다. 따라서, 간세포질내 비결합형 분율(f_L)은

$$f_L=\frac{1}{1+\frac{R_1}{Kd_1}+\alpha}=0.034$$

의 값이 되며, 상기의 *in vivo* 파라미터로 계산한 값과 일치함을 알 수 있다.

In vivo 혈장중 농도 시뮬레이션을 위한 sequestration 파라미터 산출

$$P_{\text{seq, free}}=\frac{k_{e1}}{k_{21}} \times P_{\text{efflux, free}}$$

의 관계식이 성립하므로,

$$P_{\text{seq, free}}=\frac{0.0495}{0.0289} \times 30.6=52.4 \text{ ml/min/kg}$$

이 된다. 또한, 문헌³⁾의 *in vivo* 데이터의 피팅(fitting)에 의해 산출된

$$K_{m, s}=10 \mu\text{M}$$

$$V_{m, s}=610 \mu\text{M}$$

의 값을 사용하였다.

이상과 같이, ANS의 influx, efflux 및 sequestration에 관한 각 파라미터를 사용하여 시뮬레이션하였으며, BSP 및 BPB에 대해서는 문헌^{3,4,16)}을 참고하여 같은 방법으로 산출하였다. 시뮬레이션의 조건으로는 담체매개 수송의 경쟁적 저해 및 간세포질내 단백질결합 저해과정을 모두 반영한 모델(Model AL), 담체매개 수송의 경쟁적 저해만을 반영한 모델(Model CF) 및 간세포질내 단백질결합 저해만을 반영한 모델(Model BI)로 구분하였으며, 각 과정에 기여율을 밝히고자 하였다.

결과 및 고찰

ANS의 혈장중 농도 추이에 미치는 BSP의 영향

ANS $3 \mu\text{mol/kg}$ 를 정맥내 주입한 후 10분이 경과한 시점에서 BSP($10, 30$ 및 $60 \mu\text{mol/kg}$)를 정맥주사하였을 때, ANS의 혈장중 농도 추이의 시뮬레이션 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 여기서, Fig. 3(A)는 $P_1=P_3=P_2$ 인 경우를, Fig. 3(B-D)는 $P_1=P_3=10P_2$ 인 경우를 나타낸다. 또한, Fig. 3(A, B)는 담체매개 수송의 경쟁적 저해 및 간세포질내 단백질결합을 모두 반영한 모델(Model AL)을, Fig. 3(C)는 간세포질내 단백질결합저해만을 반영한 모델(Model BI)을, Fig. 3(D)는 담체매개 수송의 경쟁적 저해만을 반영한 모델(Model CF)을 각각 나타낸다.

$P_1>P_2$ 인 경우가 $P_1=P_2$ 인 경우보다 저해제(BSP)를 가한 후 ANS의 “겉보기 대항수송” 현상이 약간 크게 나타났으며, $P_1>P_2$ 인 경우의 시뮬레이션 결과(Fig. 3(B))는 문헌⁴⁾의 *in vivo* 혈장중

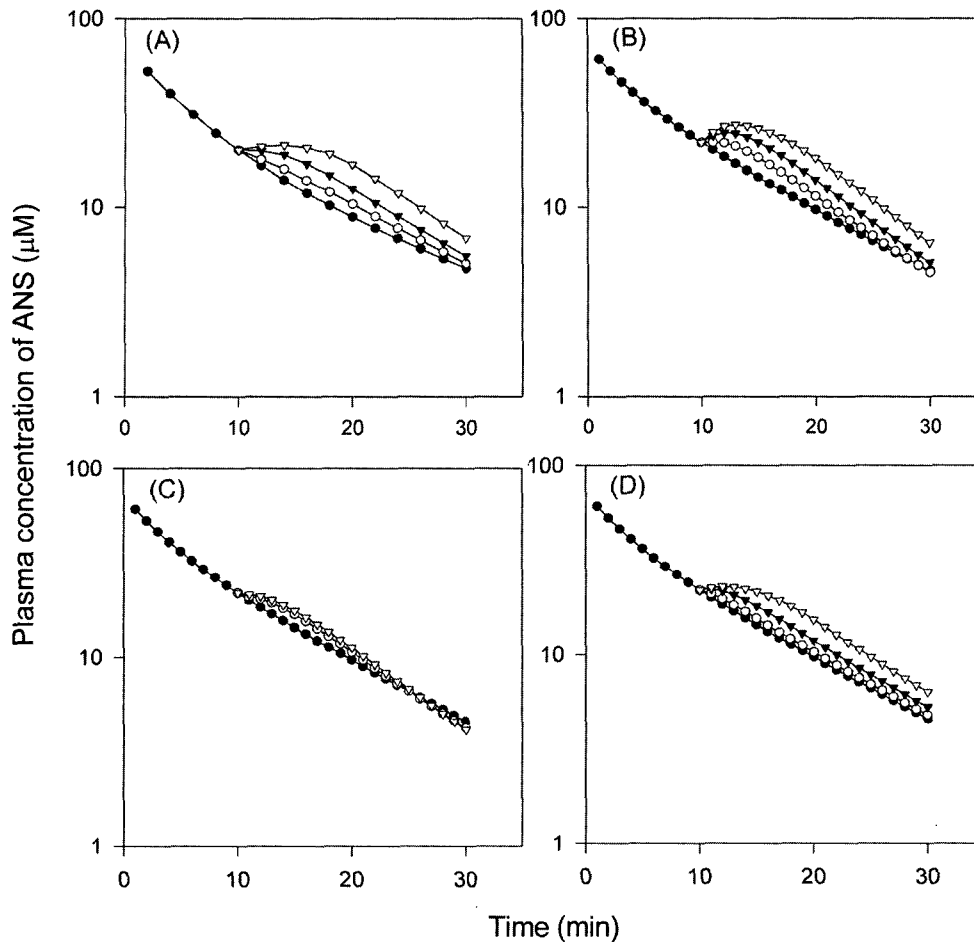


Fig. 3 - Effect of BSP on the plasma disappearance curve of ANS. ANS ($3 \mu\text{mol/kg}$) was injected intravenously, followed 10 min later by a bolus i.v. administration of BSP. (A) Model AL ($P_1=P_3=P_2$), (B) Model AL ($P_1=P_3=10P_2$), (C) Model BI ($P_1=P_3=10P_2$), (D) Model CF ($P_1=P_3=10P_2$). Keys: (-●-) control; (-○-) BSP $10 \mu\text{mol/kg}$; (-▼-) BSP $30 \mu\text{mol/kg}$; (-▽-) BSP $60 \mu\text{mol/kg}$.

농도 실험치와 일치하였다. 한편, Fig. 3(B)의 “겉보기 대항수송” 현상은 대부분 담체매개 수송의 저해 효과(Model CF, Fig. 3(D))로 설명할 수 있다. 그러나, Fig. 3(C)의 결과(Model BI)에서 알 수 있는 바와 같이, “겉보기 대항수송” 현상의 요인으로는 담체매개 수송 뿐만 아니라 간세포질내 단백질합 치환도 일부 기여하는 것으로 생각되었다.

ANS의 대항수송 현상에 미치는 BPB의 영향

ANS $3 \mu\text{mol/kg}$ 를 정맥내 주입한 후 10분이 경과한 시점에서 BPB $0\sim 60 \mu\text{mol/kg}$ 를 정맥주사하였을 때, ANS의 혈장중 농도 추이의 시뮬레이션 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 여기서, Fig. 4(A)는 sequestration 과정의 저해를 반영시키지 않은 모델을, Fig. 4(B)는 sequestration 과정의 저해를 반영한 모델의 결과이다. BPB는 BSP에 비해 간세포내에 장시간 저류하며, 담즙배설이 느리다고 보고되고 있다. 따라서, 간세포내에 ANS의 단백질합을 치환시킬 뿐만 아니라, sequestration 과정을 저해한다고 추정할 수 있

다. 본 연구에서도 sequestration 과정을 반영시킨 결과(Fig. 4(B))가 문헌⁴⁾의 결과와 일치되는 “겉보기 대항수송” 현상을 나타내었다. 한편, BPB에 의한 ANS의 “겉보기 대항수송” 현상에 대한 기여율은 담체매개 수송의 저해(Model CF, Model CF, seq)에 비해 간세포질내 단백질합의 저해(Model BI, Model BI, seq)가 큰 것으로 나타났다. 따라서, 음이온계 약물의 *in vivo* “겉보기 대항수송” 현상을 담체매개 수송의 저해만으로는 완전히 설명하지 못함을 알 수 있었다. 즉, 본 연구의 결과로부터 간세포질내 단백질합 저해에 의해서도 *in vivo* “겉보기 대항수송” 현상을 일정 비율 설명할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

ANS와 BPB의 동시투여 효과

ANS($3 \mu\text{mol/kg}$)와 BPB($60 \mu\text{mol/kg}$)를 동시에 정맥주사한 후 ANS의 혈장중 농도 추이의 시뮬레이션 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 여기서, Fig. 5는 담체매개 수송의 경쟁적 저해 및 간세포질내 단백질합저해를 모두 반영시킨 모델(Model AL)의 경우를 나타낸다.

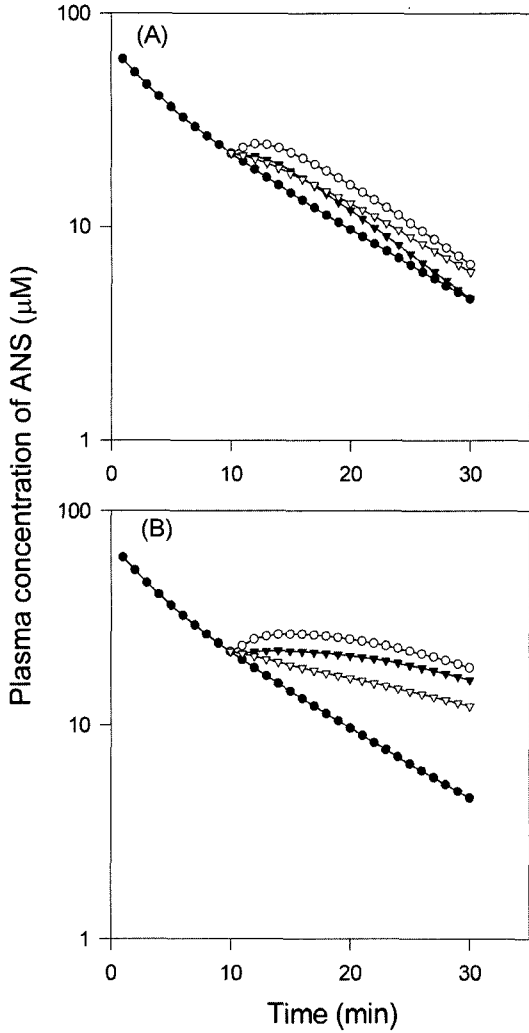


Fig. 4 - Effect of BPB on the plasma disappearance curve of ANS. ANS ($3 \mu\text{mol/kg}$) was injected intravenously, followed 10 min later by a bolus i.v. administration of BPB ($60 \mu\text{mol/kg}$). (A) Model in which sequestration was not incorporated ($P_1=P_3=10P_2$), (B) Model seq in which sequestration was incorporated ($P_1=P_3=10P_2$). Keys: (-●-) control; (-○-) Model AL; (-▼-) Model BI; (-▽-) Model CF.

Fig. 5의 결과처럼, 동시투여의 경우에도 sequestration 과정의 저해를 반영시킨 모델(Model AL, seq)의 결과가 문헌⁴⁾의 결과와 일치되는 결과를 나타내었다. BPB의 동시투여에 의해 ANS의 혈장중 농도 소실이 지연되는 현상은 일반적인 경쟁적 저해로 설명될 수 있다. 즉, 저해를 일으키는 약물(BPB)의 외측 농도(C^0)가 증가함에 따라 길보기 Michaelis constant ($K_{t,app}$)가 증가되며, 저해를 받는 약물(ANS)의 influx(J^{0i})가 감소되었기 때문으로 생각된다.

BPB의 간장내 preloading이 ANS의 혈장중 농도 추이에 미치는 영향

BPB $60 \mu\text{mol/kg}$ 을 정맥내 주사한 후 30분이 경과한 시점에서

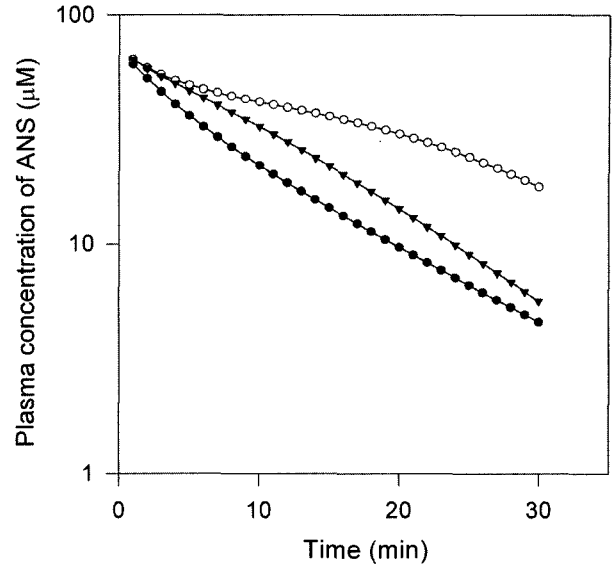


Fig. 5 - Effect of coadministration of BPB ($60 \mu\text{mol/kg}$) on the plasma disappearance curve of ANS ($3 \mu\text{mol/kg}$). Keys: (-●-) control ($P_1=P_3=10P_2$); (-○-) Model AL, seq in which sequestration was incorporated ($P_1=P_3=10P_2$); (-▼-) Model AL in which sequestration was not incorporated ($P_1=P_3=10P_2$).

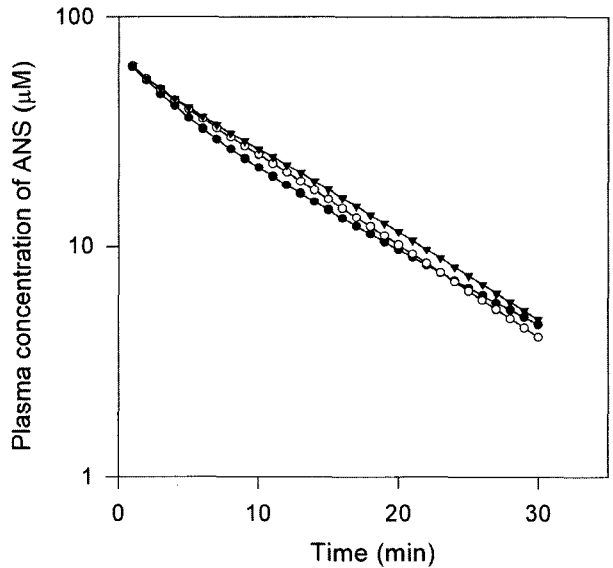


Fig. 6 - Effect of preloading of BPB on the plasma disappearance curve of ANS. BPB ($60 \mu\text{mol/kg}$) was administered intravenously, followed 10 min later by a bolus i.v. administration of ANS ($3 \mu\text{mol/kg}$). Keys: (-●-) control ($P_1=P_3=10P_2$); (-○-) Model AL in which sequestration was not incorporated ($P_1=P_3=10P_2$); (-▼-) Model AL, seq in which sequestration was incorporated ($P_1=P_3=10P_2$).

ANS $3 \mu\text{mol/kg}$ 을 정맥주사 하였을 때, ANS의 혈장중 농도 추이의 시뮬레이션 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 즉, ANS를 투여하기 전에 BPB의 간장내 농도가 고농도가 되도록 preloading함과 동

시에, 혈장중 BPB의 농도는 가능한 한 낮은 조건으로 하였다. 이 경우, 문헌⁴⁾의 실험결과와 동일한 조건으로서, BPB 투여 후 30분 이 경과한 시점에서 간장내 BPB농도는 약 1000 μM 이 되도록 조건을 설정하였다.

Sequestration 과정의 저해를 반영시킨 모델(Model AL, seq)이 반영시키지 않은 모델(Model AL)에 비해, ANS의 혈장중 농도를 약간 상승시키는 결과를 보였으나, 두 경우 모두 대조군과 큰 차이는 없었다. 이론적 시뮬레이션에 나타난 바와 같이, 내측에 저해제를 preloading하면, “대향수송” 현상에 의해 다른 약물은 농도구배에 역행하여 외측으로부터 내측으로 이동하여 세포안으로 농축된다. 즉, 저해제가 세포내에 존재할 경우, 막 내측에서 저해제와 수송되는 약물이 담체와 경쟁적으로 결합하므로, 약물의 efflux(J^0)는 감소되지만 influx(J^0)는 영향을 받지 않는 결과, net flux가 증가된다. 이러한 이론적 원리에 의하면, 본 시뮬레이션에서도 BPB를 간장내에 preloading하면 ANS의 간내 이행이 증가되어 혈장중 소실이 빠르게 나타날 것으로 추정하였으나, 대조군과 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 혈장중에 잔존하는 BPB가 ANS의 간내이행과정의 담체 매개 수송을 저해하여, 상기의 “대향수송” 현상과 상쇄되었기 때문이라고 생각된다.

한편 sequestration 과정의 저해를 반영시킨 모델(Model AL, seq)의 시뮬레이션 결과는 문헌⁴⁾의 실험에 의한 실측치와 일치하는 결과를 나타내었다.

이상의 시뮬레이션 결과를 종합하면, 문헌의 *in vivo* “대향수송”의 실험치인 혈장중 농도를 재현할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 구축한 속도론적 모델은 담체매개 수송, 간세포내 단백질결합 및 소실과정의 각 과정을 고려하여 음이온 약물의 간-담즙 수송을 검색하는 유용한 방법으로 평가되었다.

한편, ANS의 혈장중 농도 추이에 미치는 BSP의 영향에서는, “겉보기 대향수송” 현상의 요인으로 담체매개 수송 뿐만 아니라 간세포내 단백질결합 치환도 일부 기여하는 것으로 나타났다. 한편, ANS의 혈장중 농도추이에 미치는 BPB의 영향에서는, “겉보기 대향수송” 현상에 대한 기여율은 담체매개 수송의 저해에 비해 간세포내 단백질결합의 저해가 큰 것으로 나타났다. 따라서, 음이온계 약물의 *in vivo* “겉보기 대향수송” 현상을 담체매개 수송의 저해만으로 설명하고 있는 종래의 보고들에 대해 간세포내 단백질결합 저해에 의해서도 *in vivo* “겉보기 대향수송” 현상을 일정 비율 설명할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

결 론

ANS의 대향수송에 미치는 BSP의 영향에서 P1>P2인 경우의 시뮬레이션 결과가 문헌의 실제 *in vivo* 혈장중 농도 실험치와 일치하였다. 그러나, “겉보기 대향수송” 현상의 요인으로는 담체매개 수송 뿐만 아니라 간세포내 단백질결합 치환도 일부 기여하는

것으로 나타났다.

ANS의 대향수송 현상에 미치는 BPB의 영향에서는 sequestration 과정을 반영시킨 결과가 문헌의 결과와 일치되는 “겉보기 대향수송” 현상을 나타내었다. 한편, BPB에 의한 ANS의 “겉보기 대향수송” 현상에 대한 기여율은 담체매개 수송의 저해에 비해 간세포내 단백질결합의 저해가 큰 것으로 나타났다.

ANS와 BPB의 동시투여 효과에서는 담체매개 수송의 경쟁적 저해 및 간세포내 단백질결합저해를 모두 반영시킨 모델의 경우 sequestration 과정의 저해를 반영시킨 모델의 결과가 문헌의 결과와 일치되는 결과를 나타내었다. BPB의 간장내 preloading이 ANS의 혈장중 농도 추이에 미치는 영향에서는 sequestration 과정의 저해를 반영시킨 모델이 반영시키지 않은 모델에 비해, ANS의 혈장중 농도를 약간 상승시키는 결과를 보였으나, 두 경우 모두 대조군과 큰 차이는 없었다.

시뮬레이션 결과는 담체매개 수송, 간세포내 단백질결합 및 소실과정의 각 과정을 고려하여 음이온 약물의 간-담즙 수송을 검색하는 유용한 방법으로 평가되었다. 한편, 음이온계 약물의 *in vivo* “겉보기 대향수송” 현상을 담체매개 수송의 저해만으로 설명하고 있는 종래의 보고들에 대해 간세포내 단백질결합 저해에 의해서도 *in vivo* “겉보기 대향수송” 현상을 일정 비율 설명할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 지원 국가지정연구실사업(Natioanl Research Lab. Program)의 연구과제(#M1-0302-00-0069)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Yamazaki, M., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. : Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharm. Res.* **13**, 497 (1996).
- 2) Kusuhaara, H., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. : The role of glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs. *J. Pharm. Sci.* **87**, 1025 (1998)
- 3) Chung, Y. B., Miyauchi, S., Sugiyama, Y., Harashima, H., Iga, T. and Hanano, M. : Kinetic analysis of the dose-dependent hepatic handling of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate in rats. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **18**, 313 (1990).
- 4) Chung, Y. B., Miyauchi, S., Sugiyama, Y., Harashima, H., Iga, T. and Hanano, M. : Effect of various organic anions on the plasma disappearance of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS). *J. Hepatology* **11**, 240 (1990).
- 5) Goresky, B. F. : Initial distribution and rate of uptake of

- Sulfobromophthalein in the liver. *Am. J. Physiol.* **207**, 13 (1964).
- 6) Paumgartner, G. and Reichen, J. : Kinetics of hepatic uptake unconjugated bilirubin. *Clin. Sci. Mol. Med.* **51**, 169 (1976).
 - 7) Gartner, U., Stockert, R. J., Levine, W. G. and Wolkoff, A. W. : Effect of nafenopin on the uptake of bilirubin and sulfobromophthalein by isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* **83**, 1163 (1982).
 - 8) Schwenk, M., Burr, R., Schwarz, L. and Pfaff, E. : Uptake of bromosulphophthalein by isolated liver cells. *Eur. J. Biochem.* **64**, 189 (1976).
 - 9) Berk, P. D., Potter, B. J. and Stremmel, W. : Role of plasma membrane ligand bound organic anions. *Hepatology* **7**, 165 (1987).
 - 10) Petzinger, E. and Frimmer, M. : Driving forces in hepatocellular uptake of phalloidin and cholate. *Biochim. Biophys. Acta.* **778**, 539 (1984).
 - 11) Petzinger, E., Muller, N., Folimann, W., Deutscher, J. and Kinne, R. K. H. : Uptake of bumetanide into isolated rat hepatocytes and primary liver cell cultures. *Am. J. Physiol.* **256** (Gastrointest. Liver Physiol. 19), G78 (1989).
 - 12) Ziegler, K., Frimmer, M., Kessler, H., Damm, J., Eiermann, V., Koll, S. and Zarbock, J. : Modified somatostatins as inhibitors of a multispecific transport system for bile acids and phallotoxins in isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **845**, 86 (1985).
 - 13) Zimmerli, B., Valantinas, J. and Meier, P. J. : Multispecificity of Na^+ -dependent taurocholate uptake in basolateral (sinusoidal) rat liver plasma membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**, 301 (1989).
 - 14) Stremmel, W., Strohmeyer, S. and Berk, P. D. : Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3584 (1986).
 - 15) Laperche, Y., Preaux, A. M. and Berthelot, P. : Two systems are involved in the sulfobromophthalein uptake by rat liver cells: one is shared with bile salts. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1333 (1981).
 - 16) Scharschmidt, B. F., Waggoner, J. G. and Berk, P. D. : Hepatic organic anion uptake in the rat. *J. Clin. Invest.* **56**, 1280 (1975).
 - 17) Schwenk, M., Burr, R., Schwarz, L. and Pfaff, E. : Uptake of sulfobromophthalein by isolated rat liver cells. *Eur. J. Biochem.* **64**, 189 (1976).
 - 18) Wolkoff, A. W., Samuelson, A. C., Johansen, K. L., Nakata, R., Withers, D. M. and Sosiak, A. : Influence of Cl^- on organic anion transport in short-term cultured rat hepatocytes and isolated rat liver. *J. Clin. Invest.* **79**, 1259 (1987).
 - 19) Anwer, M. S. and Hegner, D. : Effect of Na^+ on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes; evidence for a heterogenous system. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 181 (1978).
 - 20) Anwer, M. S. and Hegner, D. : Effect of organic anions on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1027 (1978).
 - 21) Blom, A., Keulemans, K. and Meijer, D. K. F. : Transport of dibromosulphophthalein by isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1809 (1981).
 - 22) Lin, J. H., Sugiyama, Y., Awazu, S. and Hanano, M. : Kinetic studies on the deethylation of ethoxybenzamide. A comparative study with isolated hepatocytes and liver microsomes of rat. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 2825 (1980).
 - 23) Yamazaki, M., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Iga, T. and Hanano, M. : Uptake of organic anions by isolated rat hepatocytes: a classification in terms of ATP-dependency. *J. Hepatol.* **14**, 41 (1992).
 - 24) Scharschmidt, B. F., Waggoner, J. G. and Berk, P. D. : Hepatic organic anion uptake in the rat. *J. Clin. Invest.* **56**, 1280 (1975).
 - 25) Chung, Y. B. and Han, K. : Metabolism of an anionic fluorescent dye 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) by rat liver microsomes. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 677 (1998).
 - 26) Bae, W. T., Chung, Y. B. and Han, K. : Kinetic analysis of the hepatic uptake and biliary excretion of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) *in vivo*. *J. Kor. Pharm. Sci.* **31**, 209 (2001).