

Vitamin B₆와 Pyrazinamide의 약물상호작용(Ⅱ)

Pyrazinoic acid 대사에 미치는 pyridoxal의 영향

허 근 · 이상일 · 박종민 · 김석환*
영남대학교 약학대학 · *동아대학교 식품영양학과
(Received May 25, 1987)

Drug Interaction of Vitamin B₆ and Pyrazinamide(Ⅱ)

Effect of Pyridoxal on the Pyrazinoic Acid Oxidizing Enzyme Activity

Keun Huh, Sang-Il Lee, Jong-Min Park, Suk-Hwan Kim*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan, 632, Korea.

*Department of Food and Nutrition, Dong-A University, Pusan 600-02, Korea

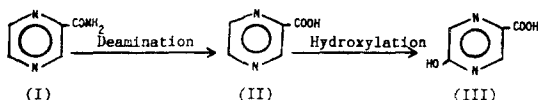
Abstract—When pyrazinamide is used in the treatment of tuberculosis, the measurement of pyrazinoic acid which is an intermediate metabolite of pyrazinamide in body is required in order to prevent its associated side-effects, especially that of hyperuricemia. Effects of vitamin B₆ on pyrazinoic acid metabolism were studied in this experiment. The activity of hepatic pyrazinoic acid oxidizing enzyme in the presence of pyridoxal was powerfully inhibited, and the pattern was competitive inhibition type. Whereas, its enzyme activity was significantly increased by the treatment of pyridoxal, and the characteristics of the increase may include induction of enzyme proteins. As mice received pyrazinoic acid(300mg/kg) after pyridoxal-pretreatment(40mg/kg) once daily for 4 days, the blood level of pyrazinoic acid and uric acid was decreased significantly.

Pyrazinoic acid는 pyrazinamide의 중간대사산물로 pyrazinamide보다 난용성이며 독성도 강한 물질이라고 알려져 있다.¹⁻²⁾

Pyrazinamide복용시 나타나는 독성중에서 간 기능저해작용³⁾과 뇨산저류(urate retention)에 따르는 고뇨산혈증(hyperuricemia) 현상^{4,5)}이 중요한 부작용이라고 한다. Pyrazinamide를 투여할 때 발현되는 고뇨산혈증은 pyrazinamide의 일차 대사물인 pyrazinoic acid가 신세뇨관에서의 뇨산의 수송과정에 영향을 주기 때문이라고 보고되어지고 있다.^{2,5)} Pyrazinoic acid는 간에서 다시 대사되어 5-hydroxy pyrazinoic acid로 산화되어 뇨중으로 배설된다.⁶⁾

본 연구실에서는 pyrazinamide 및 pyrazinoic acid가 유발하는 고뇨산혈증현상이 pyridoxal의 전처치에 의해 개선되어짐을 보고한 바 있다.⁷⁾

이와 같은 pyridoxal의 약리작용을 pyrazinoic acid의 대사속도와 관련지어 검토하는 것은 흥미 있는 연구일 것으로 생각되어 pyridoxal을 전처치한 mouse를 대상으로 하여 간 pyrazinoic acid 대사효소활성의 변화와 pyrazinoic acid의 혈중농도를 비교 관찰하는 한편 pyrazinoic acid가 유발한 독성과도 연관지어 검토하였다. (Scheme I 참조)



Scheme I—Metabolic pathway of pyrazinamide.
(I) Pyrazinamide, (II) Pyrazinoic acid,
(III) 5-Hydroxypyrazinoic acid.

실 험 방 법

시약 및 기기—Pyridoxal hydrochloride(Fluka제), uric acid sodium salt(Nakarai제), perchloric acid(Junsei제), sodium nitroprosside(Junsei제), bovine serum albumin(Sigma제) 등의 모든 시약을 특급제를 사용하였다. 기기로는 ultracentrifuge(Hitachi model 70P-72), pH meter(corning model 120) 등을 사용하였다.

실험동물 및 처치—일정한 조건으로 사육한 25g 내외의 ICR계 웅성 mouse를 사용하였으며 실험동물은 실험전 24시간 동안 절식시켰다. Pyridoxal의 투여는 Ebadi 등⁸⁾의 방법을 참조하여 용량(10, 20, 30, 40, 50mg/kg)과 투여기간(1, 2, 3, 4, 5day)별로 실험군의 복강내로 주사하였으며 대조군은 동량의 생리식염수를 투여하였다. Pyrazinoic acid의 처치는 Weiner 등⁹⁾의 방법을 약간 변경하여 300mg/kg을 투여하였으며 대조군은 동량의 olive oil을 복강내로 주사하였다.

효소의 조제—실험동물을 ether로 가볍게 마취시키고 복부정중선을 따라 절개한 후 하대정맥에서 혈액을 취하였다. 이 혈액을 600×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 혈청을 아래 실험에 사용하였다. 한편 혈액을 취한후 즉시 0.9% NaCl용액으로 관류시킨 간장을 적출하여 건조적 1g당 0.25M sucrose 4배량을 가하고 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 핵, 미마쇄 부분 및 mitochondria를 제거한 상등액을 취하여 105,000×g에서 1시간동안 초원심분리하여 상등액을 얻고 아래 실험의 조효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 0~4°C에서 행하였다.

Pyrazinoic acid 산화효소의 활성측정—효소의 활성측정은 Weiner 등⁹⁾의 방법을 참조하여 38mM Tris·HCl 완충액(pH 7.5) 중에 기질인 pyrazinoic acid 2.4mM 및 효소액 0.2ml를 가하여 반응액이 3.0ml가 되도록 하였다. 이 반응액을 37°C에서 12시간 동안 반응시킨 후 0.5N-perchloric acid 1.0ml를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 얻은 상등액 일정량에 0.2%

(W/V) sodium nitroprosside용액과 0.5N-NaOH 용액을 가하였다. 실온에서 30분간 방치하였을 때 나타나는 등적색을 파장 460nm에서 흡광도의 변화를 읽어 검량선에 준하여 산정하였으며 효소의 활성도는 시간당 1mg의 단백질이 생성시키는 5-hydroxypyrazinoic acid량을 n moles로서 혹은 대조군을 100%로 하여 백분율로 나타내었다.

Pyrazinoic acid의 정량—Pyrazinoic acid의 정량은 Gurumurthy 등⁹⁾의 방법을 참조하여 혈청 일정량에 0.5N-perchloric acid 1.0ml를 가하여 제단백시킨 다음 위의 효소활성측정법과 동일하게 실험 하였으며 단위는 혈청 100ml당 pyrazinoic acid의 mg으로 나타내었다.

Uric acid의 정량—혈청중 uric acid의 정량은 Henry의 방법¹⁰⁾에 준하여 혈청 일정량에 10% (w/v) sodium tungstate 용액을 가하여 제단백시킨 다음 원심분리하여 얻은 상등액에 10% (w/v) Na₂CO₃ 용액과 phosphotungstic acid 용액을 가한 다음 실온에서 30분간 방치하였을 때 나타나는 청색을 파장 700nm에서 측정하였다. 한편 단백질의 정량은 Lowry방법¹¹⁾에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로하여 측정하였으며 실험결과의 통계처리는 student t-test를 이용하였다.

실 험 결 과

Vitamin B₆군이 시험관내에서 간 pyrazinoic acid산화효소활성에 미치는 영향—In vitro 실험에서 vitamin B₆군(pyridoxal, pyridoxine, pyridoxamine)이 간장중 pyrazinoic acid 산화효소활성에 어떠한 영향을 주는가를 관찰한 성적이 Fig. 1이다. 그림에서 볼 수 있듯이 pyridoxamine과 pyridoxine의 경우에는 시험관내 첨가량을 증가시켜 가면서 효소의 활성변화를 관찰하였을 때 5×10⁻⁵g/ml 농도에서는 약간 활성을 억제시키는 경향을 관찰할 수 있었으나 유의성 있는 활성변화는 관찰되지 않았다. 그러나 pyridoxal의 경우에는 첨가량을 증가시키기에 따라 본 효소의 활성은 현저하게 억제되었으며 시험관내에 5×10⁻⁵g/

ml되게 첨가하였을 때는 대조치에 비해 44% 정도의 유의한 효소활성감소를 관찰할 수 있었다. 그러므로 이 실험에서는 pyrazinoic acid 산화효

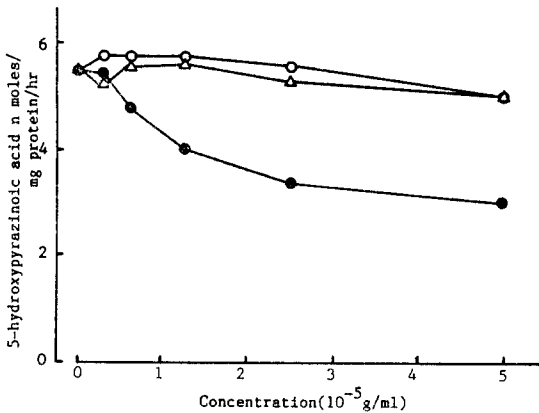


Fig. 1-Effect of pyridoxal, pyridoxamine and pyridoxine on the hepatic pyrazinoic acid oxidizing enzyme activity in vitro. The assay procedure was described in the text. Each point represents the mean of 3 experiments. Pyridoxal, ●—●; Pyridoxamine, ○—○; Pyridoxine, △—△.

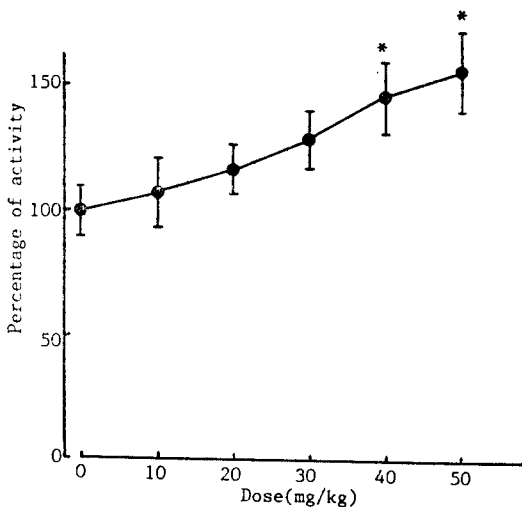


Fig. 2-Dose response of pyridoxal on the hepatic pyrazinoic acid oxidizing enzyme activity in mice.

Mice received pyridoxal(10, 20, 30, 40, 50mg/kg) intraperitoneally daily for 4 days. Mice were decapitated after 24hr the last administration. The assay procedure was described in the test. Values are mean±S.E. of 5 animals in each group. *; p<0.05.

소활성을 현저하게 억제시키는 pyridoxal을 선택하여 실험동물에 투여하였다.

Pyridoxal의 투여용량에 따른 간 pyrazinoic acid 산화효소활성 변화—여러 농도(10, 20, 30, 40, 50mg/kg)의 pyridoxal을 4일간 복강내로 주사한 후 pyrazinoic acid 산화효소활성을 관찰한 성적이 Fig. 2이다. Pyridoxal을 농도별로 투여하면서 효소의 활성을 측정하여 생리식염수만을 처치한 대조군의 활성을 100%로 나타내었을 때 10mg 투여군은 107%, 20mg 투여군은 115%로 다소 증가하는 경향을 보였다. 그러나 40mg을 투여한 실험군에서는 대조군에 비하여 42% 정도의 현저한 증가를 관찰할 수 있었다. 그러므로 이하의 실험에서는 pyridoxal을 kg당 40mg을 처치하여 간 pyrazinoic acid 산화효소의 활성을 유도한 다음 실험을 행하였다.

Pyridoxal의 투여기간에 따른 간 pyrazinoic acid 산화효소의 활성변화—Fig. 3는 pyridoxal (40mg/kg)의 투여기간을 달리하면서 간 pyrazinoic acid 산화효소의 활성에 미치는 영향을 관찰한 실험성적이다. Pyridoxal을 투여하면서 경시적으로 효소의 활성을 측정하여 생리식염수만을 처치한 대조군의 활성을 100%로 나타내었을

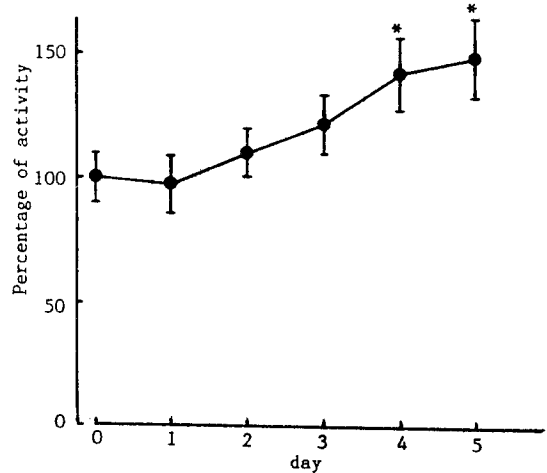


Fig. 3-Changes of hepatic pyrazinoic acid oxidizing enzyme activity in pyridoxal-treated mice. Pyridoxal(40mg/kg) was injected intraperitoneally in various time course before sacrifice. Additional details are described in Fig. 2. *; p<0.05

때 효소활성이 5.5 n moles/mg protein/hr인데 비해 1일 투여군과 2일 투여군에서는 각각 98%와 115%로서 1일 투여군에서는 대조군과 차이점을 관찰할 수 없었으나 2일 투여군에서는 다소 증가하는 경향을 보였다. 한편 4일 투여군에서는 142%로서 생리식염수를 주사한 대조군에 비해 활성이 약 42% 정도의 현저한 효소활성증가를 관찰할 수 있었다. 그러므로 이하의 실험에서는 pyridoxal을 4일간 처치한 다음 실험을 실시하였다.

Pyrazinoic acid oxidizing enzyme의 반응속도에 미치는 pyridoxal의 영향—Pyrazinoic acid oxidizing enzyme과 기질과의 친화력 및 반응속도에 pyridoxal이 어떤 영향을 주는가를 검토한 실험성적이 Fig. 4이다.

Pyridoxal이 들어 있는 반응액에 여러가지 농도의 기질을 첨가하면서 각각의 pyrazinoic acid 산화효소의 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot로 나타내었을 때 기질만을 반응시켰을 때는 Km치가 $2.5 \times 10^{-4}M$ 인데 비해 pyridoxal이 존재하는 조건에서는 Km치가 $4 \times 10^{-4}M$ 로 약 1.6배 증가됨을 관찰할 수 있었다. 한편 V_{max} 치는 두

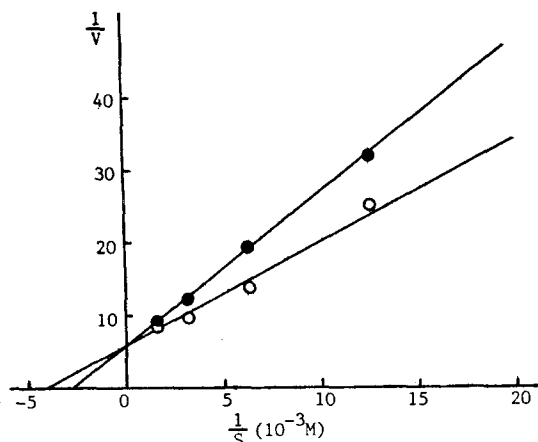


Fig. 4—Lineweaver-Burk plots of the hepatic pyrazinoic acid oxidizing enzyme.

The reaction mixture contained 38mM Tris·HCl buffer (pH 7.5), various concentration of pyrazinoic acid, pyridoxal (25 μ g/ml) and cytosolic enzyme. Points are the mean of 3 separate experiments. Pyrazinoic acid, ○—○; Pyrazinoic acid + pyridoxal, ●—●.

실험군 사이에 별다른 차이점을 관찰할 수 없었다.

Pyridoxal 투여가 pyrazinoic acid oxidizing enzyme의 반응속도에 미치는 영향—Pyridoxal 투여에 의해서 pyrazinoic acid 산화효소와 기질과의 반응속도가 어떠한 영향을 받는가를 검토한 성적이 Fig. 5이다.

Pyridoxal을 투여한 실험군과 생리식염수를 처치한 대조군에 pyrazinoic acid의 첨가농도를 달리 하면서 pyrazinoic acid 산화효소의 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot로 나타내었을 때 pyridoxal 투여군의 V_{max} 치는 0.23인데 비해 대조군의 V_{max} 치는 0.11로서 약 2배정도 증가됨을 관찰할 수 있었으나 Km value는 $2.5 \times 10^{-4}M$ 에서 실험군과 대조군이 일치함을 알 수 있었다.

Pyridoxal 투여가 혈중 pyrazinoic acid와 uric acid의 농도에 미치는 영향—생리식염수와 pyridoxal을 4일간 전 처치한 대조군과 실험군에 pyrazinoic acid (300mg/kg)을 복강내로 1회 주사한 후 pyrazinoic acid는 90분 후에 uric acid는

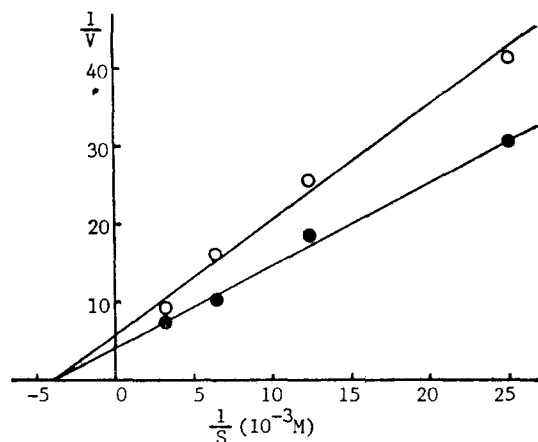


Fig. 5—Lineweaver-Burk plots of the hepatic pyrazinoic acid oxidizing enzyme in pyridoxal-treated mice.

Mice received pyridoxal (40mg/kg) i.p. daily for 4 days. The reaction mixture contained 38mM Tris·HCl buffer (pH 7.5), various concentration of pyrazinoic acid, control enzyme or pyridoxal-treated enzyme solution. Points are the mean of 3 experiments. Control, ○—○; Pyridoxal (40mg/kg), ●—●.

Table I—Effect of pyridoxal on the serum pyrazinoic acid and uric acid level in pyrazinoic acid-treated mice.

| Group | Concentration (mg/100ml serum) | |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------|
| | Pyrazinoic acid | Uric acid |
| Control | ND | 4.0±0.3 |
| Pyrazinoic acid | 16.3±1.1 | 6.0±0.3** |
| Pyridoxal | ND | 4.2±0.5 |
| Pyridoxal+Pyrazinoic acid | 12.2±1.3* | 3.7±0.6 |

Pyrazinoic acid(300mg/kg) was injected i.p. to mouse for 1 day after pyridoxal(40mg/kg) treatment daily for 4 days. Additional details are described in Fig. 2. ND; not determined. *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$.

180분 후에 혈중농도를 관찰한 성적이 표 I 이다.

Pyrazinoic acid만을 투여한 대조군의 pyrazinoic acid 혈중농도가 16.5mg/100ml인데 비해 pyridoxal(40mg/kg)을 4일간 전처치한 다음 pyrazinoic acid를 투여한 실험군에서의 혈중농도는 12.3mg/100ml이므로 대조군에 비해 약 25% 정도 유의성있는 감소를 관찰할 수 있었다.

한편 uric acid의 경우는 pyrazinoic acid를 투여한 실험군이 6.0mg/100ml로서 생리식염수를 투여한 대조군(4.0mg/100ml)에 비해 약 50% 이상의 유의적인 증가를 관찰할 수 있었으나 pyridoxal을 전처치한 다음 pyrazinoic acid를 투여한 실험군에서는 3.6mg/100ml로 대조군에 가깝게 감소됨을 관찰할 수 있었다.

고 찰

Pyrazinamide의 대사는 주로 간에서 deamidation 과정을 거친 후 hydroxylation되는 두 단계로 이루어진다.¹²⁻¹³⁾ 첫단계대사는 microsome 분획에 있는 deamidase에 의하여 이루어지며 이때 생성되는 중간대사산물인 pyrazinoic acid는 약리학적 활성이 강한 물질로 알려지고 있다.²⁾ 이 물질은 다시 cytosol분획중의 xanthine oxidase에 의하여 최종대사산물인 5-hydroxypyrazinoic acid로 산화되어 뇨중으로 배설되어짐이 보고되었다.⁶⁾

Vitamin B₆의 한성분인 pyridoxal을 전처치하고 pyrazinoic acid의 대사효소활성변화를 관찰하였을 때 pyridoxal(40mg/kg)을 하루 한번씩 1일, 2일 및 4일간 전처치한 실험군에서 효소활성이 대조군을 100%로 하였을 때 각각 98%, 114% 및 142%로 증가되어짐이 관찰되었다. Pyridoxal을 1일 및 2일간 전처치한 실험군에서의 효소활성변화는 대조군에 비해 각각 98%와 114%로서 유의성 있는 증가는 보이지 않았으나 4일간 투여한 실험군에서는 유의성있는 효소활성증가를 관찰할 수 있었다. 이와 같은 효소활성증가현상이 pyridoxal을 적어도 4일간은 투여해야 나타나는 점과 in vitro실험에서 pyrazinoic acid 대사효소활성측정 반응액중에 pyridoxal을 첨가할 때에는 효소활성을 현저하게 억제하였으며 그 현상이 경쟁적인 억제작용의 양상을 나타내는 점 그리고 pyridoxal을 4일간 전처치하고 동력학적(kinetics)으로 관찰한 실험성적 등을 종합하여 볼 때 pyridoxal을 투여할 때 나타나는 pyrazinoic acid 대사효소활성증가는 간에서의 효소활성의 유도작용에 의한 것으로 추측되어지며 이것은 기질유도(substrate induction)작용에 기인된 것으로 생각되어진다. Pyridoxal을 4일간 40mg/kg씩 투여하고 pyrazinoic acid 300mg/kg을 투여한 다음 이 약물의 혈중농도를 측정하였을 때 대사효소활성증가에 반비례하여 pyrazinoic acid의 혈중농도가 감소되어짐을 관찰할 수 있었다.

이와 같이 pyridoxal을 전처치한 실험군에서 pyrazinoic acid의 생체내변화(biotransformation)와 대사효소활성증가가 서로 상관성이 있었으므로 두 약물의 상호작용은 고려되어야 할 것으로 생각된다. 이와 같은 pyridoxal의 약리작용과 pyrazinamide 및 pyrazinoic acid가 일으키는 고 뇨산혈증현상을 pyridoxal이 예방 내지는 개선할 것이라는 보고⁷⁾, 그리고 pyrazinoic acid의 급성독성에도 pyridoxal의 방어효과 등을 종합하여 검토할 때 일맥상통하는 실험성적으로서 매우 흥미있는 약물상호작용의 관찰이라고 사료된다.

Pyrazinoic acid를 5-hydroxypyrazinoic acid로 산화시키는 반응에 xanthine oxidase가 관여하고

있음을 고려할 때 pyridoxal을 포함한 vitamin B₆는 xanthine oxidase의 활성을 증가시키므로 xanthine oxidase에 의해서 대사되는 purine 및 pyrimidine 유도체들과의 상호작용도 나타날 것으로 예상되어진다. Vitamin B₆가 decarboxylases와 transaminases의 보조소로 작용할 뿐만 아니라 핵산염기대사에 관여하는 xanthine oxidase 활성에도 영향을 주고 있음이 이 실험을 통하여 밝혀졌다고 본다.

결핵치료를 약물요법으로 수행하는 과정에서 vitamin B₆를 결핵치료제와 병용할때 isoniazid의 독성이 예방되는 것은 물론 pyrazinamide의 독성으로부터 생체를 보호할 것이라는 실험적인 기초자료를 제시하였다.

결 론

Vitamin B₆와 pyrazinoic acid의 약물상호작용을 검토하는 일환으로 pyridoxal이 pyrazinoic acid의 대사에 어떤 영향을 주는가를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 시험관내 실험에서 vitamin B₆의 성분중 pyridoxal이 pyrazinoic acid 대사효소의 활성을 가장 강력하게 저해시켰으며 그 양상은 경쟁적 억제작용이었다.

2) Pyridoxal(40mg/kg)을 4일간 주사하였을 때 pyrazinoic acid 대사효소의 활성은 약 40% 정도 현저히 증가되었으며 이 작용은 효소의 유도작용에 의한 것으로 생각된다.

3) Pyridoxal의 전처치에 의해서 혈중 pyrazinoic acid와 uric acid의 농도가 현저히 감소되었다.

이상의 실험성적을 종합하여 볼때 pyridoxal의 투여는 pyrazinoic acid 대사효소의 활성을 증가시키므로 pyrazinoic acid로부터 5-hydroxypyrazinoic acid로의 전환속도를 빠르게 하여 배설을 용이하게 할 것이므로 pyrazinoic acid가 유발하는 고노산혈증도 개선될 것으로 생각된다.

문 헌

- 1) Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R.F., and Otterbein, E.S.: The Merck Index 10th ed., Merck and Co Publ. Inc., Rahway, N.J., 1148 (1983).
- 2) Weiner, I.M., and Tinker, J.P.: Pharmacology of pyrazinamide: Metabolic and renal function studies related to the mechanism of drug-induced urate retention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **180**, 411 (1972).
- 3) McDermott, W., Ormond, L., Muschenheim, C., Deuschle, K., McCune, R.M., and Tompsett, R.: Pyrazinamide-isoniazid in tuberculosis. *Am. Rev. Tubercle* **69**, 319 (1954).
- 4) Gutman, A.B., Yü, T.F., and Berger, L.: Estimation of tubular secretion and reabsorption of uric acid by use of pyrazinamide(pyrazinoic acid). *Am. J. Med.* **47**, 575 (1969).
- 5) Yü, T.F., Berger, L., Stone, D.J., Wolf, J., and Gutman, A.B.: Effect of pyrazinamide and pyrazinoic acid on urate clearance and other discrete renal functions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **96**, 265 (1957).
- 6) Yamamoto, T., Moriwaki, Y., Takahashi, S., Hada, T., and Higashino, K.: Rapid and simultaneous determination of pyrazinamide and its major metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **413**, 342 (1987).
- 7) Huh, K., Park, J.M., Shin, U.S., and Kim, S.H.: Drug interaction of vitamin B₆ and pyrazinamide (I). Effect of pyridoxal on pyrazinoic acid induced hyperuricemia. Yakhak Hoeji. in press.
- 8) Ebadi, M.S.: *Advances in Biochemical Psychopharmacology*. **4**, Reven Press, Inc., New York, 141 (1972).
- 9) Gurumurthy, P., Nair, N.G.K., and Sarma, G.R.: Methods for the estimation of pyrazinamide and pyrazinoic acid in body fluids. *Indian J. Med. Rec.* **129**, 71 (1980).
- 10) Henry, R.J., Sobel, C., and Kim, J.: Modified carbonate-phospho tungstate method for the deter-

- mination of uric acid and comparison with the spectrophotometric uricase method. *Am. Clin. Pathol.* **28**, 152 (1957).
- 11) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 12) Ellard, G.A.: Absorption, metabolism and excretion of pyrazinamide in man. *Tubercle* **50**, 144 (1969).
- 13) Weiner, I.M., and Fanelli, G.M.: *J. Clin. Invest.* **52**, 1946 (1973).