

산화성 심근손상에 대한 Captopril의 보호효과

서울대학교 의과대학 약리학교실

서예경 · 정형화 · 김명석

= Abstract =

Cardioprotective Effect of Captopril on Myocardial Oxidative Damage

Yae Kyung Suh, M.D., Hwiyong Hwa Chung, M.D., Myung-suk Kim, M.D.

Department of Pharmacology, Seoul National University, College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Reactive oxygen free radicals have been implicated as an important factor in the development of ischemia-reperfusion injury of heart. Captopril, a SH-containing angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitor has been reported to provide the protective effect in different models of myocardial ischemia and reperfusion injury of animal hearts. It is postulated that the myocardial protective effect may be related to a potential anti-free radical effect independent of ACE inhibition. The present study was designed to elucidate the myocardial protective mechanism of Captopril by investigating the drug effect on the experimentally induced oxygen free radical-mediated myocardial injury in isolated hearts of rats.

Methods : The heart isolated from rat was perfused retrogradly by Langendorff method. Myocardial dysfunction was induced by oxygen free radicals generated by electrolysis of the perfusing solution(Kreb-Henseleit) with 2mA direct current for 45 sec. The cardiac functions(left ventricular pressure, dP/dt, heart rate, coronary flow) and the ventricular content of a lipid peroxidation product, malondialdehyde(MDA) were measured under presence or absence of Captopril and the comparing drugs(enalaprilat, cysteine and dithiothreitol).

Results : Electrolysis of oxygen-saturated Krebs-Henseleit perfusing solution led to the production of superoxide anion increasingly with intensity and duration of the applied electric current. The hearts perfused with the electrolyzed solution demonstrated significant decrease in left ventricular pressure, dp/dt, heart rate, coronary flow and increase in myocardial MDA content. The depression of myocardial function as well as the increase of MDA content and oxygen radical production were reversed by Captopril(0.75~2mM) dose-dependently. Enalaprilat, a non-SH containing ACE inhibitor, however, showed no protective effect at all. Cysteine and dithiothreitol, the SH-containing agents without ACE inhibitory action showed also protective effects on the myocardial depression induced by electrolysis.

Conclusion : It is suggested that Captopril may exert protective effect on oxygen radical-mediated myocardial injury probably by its antioxidative and anti-free radical mechanism related to SH-group.

KEY WORDS : Captopril · Cardioprotection · Oxygen free radical · Electrolysis.

서 론

관상혈류 감소 또는 차단에 의한 허혈성 심근 병변에 있어서 임상적인 처치의 근본원칙은 재관류를 시행함으로써 심근 세포가 비가역적인 괴사로 진행되는 것을 방지하는 것이다. 그러나 허혈성 심근 병변의 세포괴사는 시간 경과에 따라 역동적으로 진행되기 때문에 관상혈관 재관류는 가능한 발병 후 수시간이내의 빠른 시간안에 실시하지 않으면 기대하는 효과를 얻기가 힘들다. 만일 허혈경과가 상당시간 지난후에 재관류를 시도하는 경우에는 임상적으로 유효한 결과를 얻을 수도 없을 뿐더러 오히려 심근세포손상이 가속화되는 역설적인 재관류 손상이 나타날 수 있다. 이러한 허혈성 심근병변의 재관류 손상은 여러가지 복합적 인자들의 상호작용결과 발생할 것으로 여겨지고 있으나 근자에는 산소대사물인 반응성 산소라디칼(superoxide anion, O_2^- ; hydrogen peroxide, H_2O_2 ; hydroxyl radical, $OH\cdot$)이 또한 심근손상을 야기하는 중요한 인자의 하나가 될 것으로 인정되고 있다. 심근조직이 허혈 또는 저산소상태에 빠질 때에는 세포호흡 저하로 각종 환원 물질이 축적되며 만일 이때 산소가 재공급 된다면 반응성 산소라디칼의 생성이 증가하고 조직은 산화성 손상을 쉽게 받을 수 있다고 주장되고 있다¹⁻³⁾.

산소라디칼은 정상조직 세포에서도 소량이나마 끊임없이 생성되며 그에 대한 방어기전이 내인성으로 또한 존재한다⁴⁻⁶⁾. 즉, 정상조직 세포에는 superoxide anion(O_2^-)을 제거하는 superoxide dismutase(SOD)를 비롯하여 H_2O_2 를 제거하는 catalase 및 glutathione peroxidase등 효소계의 산소라디칼 제거물질과 reduced glutathione(GSH), α -tocopherol, ascorbic acid등 비효소계의 항산화 물질들이 존재한다. 이와같은 방어기전들은 정상조직 세포에서 생성되는 소량의 산소라디칼과는 평형상태를 이루기 때문에 정상조직세포는 이들의 산화성 공격으로부터 보호를 받는다. 그러나 산소라디칼이 방어기능을 능가하여 다량으로 생성되거나 또는 방어기전이 정상보다 저하되므로서 평형이 깨지는 비정상적인 조건에서는 조직세포는 산화성 손상을 보다 쉽게 받을 수 밖에 없다. 실험적인 허혈-재관류

또는 저산소-산소재공급 심근에서는 상기한 효소계 및 비효소계의 방어기전들이 저하됨이 보고 되었다⁷⁻⁹⁾. 산화성 세포 손상은 일반적으로 산화반응을 억제하는 항산화 물질들에 의하여 방지될 수 있다. 허혈성 심장의 재관류에 따른 심근세포손상에 있어서도 반응성 산소라디칼 증가 및 방어기전의 저하에 의한 산화성 변화가 관여한다는 것은 산소라디칼 제거물질 뿐 아니라 외인성 항산화물질들도 심근 보호효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 바로서 각종의 천연 및 합성 항산화제들이 in vivo 또는 in vitro 적출심장의 실험적 허혈-재관류 손상에 있어서 기계적 및 생화학적인 심기능 저하를 방지함이 보고되었다^{7,10-12)}.

Renin-angiotensin계의 angiotensin 전환효소억제제(angiotensin converting enzyme inhibitor, 이하 ACE 억제제라 칭함)는 말초혈관확장, 심장부하 감소작용을 통하여 본태성 고혈압, 울혈성 심부전증 등에 임상적으로 유효하게 사용되는 약물로서 근자에는 in vivo 및 in vitro의 실험적 허혈-재관류 심근손상에 있어서도 심기능 보호작용이 있음이 알려지고 있다¹³⁻¹⁶⁾. 이러한 ACE 억제제들의 심근 보호작용 기전에 대하여는 심장조직의 국소적인 ACE 억제작용 자체와 관련이 있다는 보고¹⁴⁾가 있는가 하면 ACE 억제와는 관계없이 prostacyclin 생성증가^{16,17)} 및 허혈병변 국소의 norepinephrine 유리감소¹⁵⁾와 관련이 있다는 보고도 있다. 한편 이와 더불어 최근에는 ACE 억제제중 captopril이 ACE 억제작용과는 독립적인 기전으로 산화성 세포손상을 방지하므로서 허혈-재관류시 심근 보호작용을 나타낼 것이라는 주장이 있다¹⁶⁾. Captopril은 다른 ACE 억제제들과는 달리 화학구조상 SH-기를 갖는 약물로서 아마도 SH-기와 관련된 항산화작용이 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 허혈-재관류 심근손상에 있어서 항산화물질로서 captopril의 심근보호작용과 그 기전을 확인하기 위한 연구의 일환으로 산소라디칼에 의하여 유도된 산화성 심기능 저하에 대한 captopril의 효과를 관찰하였다. 아울러 ACE 억제제중 SH-기를 갖지 않은 enalaprilat, 그리고 SH-작용물질이면서 ACE 억제제는 아닌 수종 약물들의 작용을 비교 검토하므로 captopril의 심근보호작용 기전을 규명하고자 하였으며 특히 본연구에서는 관상 관

류액의 전기분해를 통하여 발생시킨 외인성 산소 라디칼에 의한 심근손상 및 기능저하를 허혈-재관류시 산화성 심근손상의 실험적 모델로 이용하여 상기 약물들의 효과 및 기전을 구명하고자 하였다.

연구 재료 및 방법

1. 연구재료

실험 동물은 성 구별없이 체중 200g 내외의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. Captopril, enalaprilat는 보령 제약에서 제공 받았고 catalase, epinephrine HCl, superoxide dismutase(SOD), cysteine, dithiothreitol(DTT)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. Dimethyl sulfoxide(DMSO)은 Merck(Darmstadt, Germany) 제품을 사용하였으며 기타 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

2. 적출심장 관류 및 심기능 측정

흰쥐에게 헤파린(100 I.U.)을 복강주사하고 45분 후 sodium pentobarbital(50 mg/kg, I.P.)로 마취하였다. 인공호흡기로 호흡을 유지시킨 상태에서 흉부를 절개하고 심장관류장치에 연결된 관류액이 흐르는 도관을 대동맥에 삽관한 다음 심장을 적출하여 직접 Langendorff 심장관류 장치에 연결하였다. 관류액은 95% O_2 + 5% CO_2 로 포화시킨 Krebs-Henseleit 완충용액(mM ; NaCl 118, $NaHCO_3$ 27.2, KCl 4.8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2, KH_2PO_4 1.0, $CaCl_2$ 1.25, glucose 11.1, pH 7.4)을 사용하였으며, 관류액 및 심장온도는 37°C로 일정하게 유지하였고 관류압 70mmHg로 정압관류 하였다. 물을 채운 조그만 고무 balloon을 좌심실에 삽입한 후 압력 변환기(Statham, P23XL)에 연결한 다음 좌심실압(LVDP), 최고압력 발생속도(+dp/dt), 심박수(HR)를 physiograph(Grass, Model 70)에 기록하고 관상관류량(CF)를 일정시간 간격으로 측정하였다.

3. 전기분해에 의한 산소라디칼 발생 및 산화성 심근 손상

심장의 산화성 손상은 Jackson 등¹⁸⁾에 의하여 고안된 관류액의 전기분해에 의한 산소라디칼 발생 방법을 이용하여 유도하였다. 백금전극을 양극과 음극의 간격이 3.5cm 되도록 대동맥 cannula에 꽂고

전기분해 효과가 심장근에 직접적으로 미치는 것을 방지하지 위하여 심장과 전극 사이에는 air trap을 설치하였다. 관상관류 및 심박동이 일정해진 후(약 10~15분) 전기영동 전원공급장치(Korea Manhattan)에서 발생시킨 2mA 직류전류(DC)를 45초동안 일정하게 공급하므로써 관류액을 전기분해한후 계속해서 20분동안 정상관류를 지속하였다. 전기분해 관류액에서 산소라디칼 발생을 확인하기 위하여 superoxide anion(O_2^-)을 SOD-억제성인 epinephrine에서 adrenochrome으로의 산화법¹⁹⁾으로 측정하였다. 2ml의 Krebs-Henseleit 용액을 전기분해한 후 즉시 그 용액을 100mM epinephrine 20 μ l와 SOD (100U/ml)가 들어있거나 또는 들어있지 않은 cuvette에 넣고 spectrophotometer(Hewlett Packard, 845 2A)로 파장 480nm에서 흡광도를 측정하여 SOD-억제성 adrenochrome 농도를 계산하였다.

약물의 효과를 관찰한 실험에서는 해당 약물들을 대동맥 cannula에 연결한 Harvard infusion pump를 이용하여 전기분해 10분전부터 실험 끝까지 투여하였다. 검토한 약물은 ACE 억제제로 captopril 0.75~2 μ M, enalaprilat 2 μ M, SH-기 작용물질로 cysteine 5 μ M, dithiothreitol(DTT) 5 μ M 그리고 산소라디칼 제거물질로 superoxide dismutase(SOD) 20 U/ml, catalase 70U/ml, dimethylsulfoxide(DMSO) 10mM이었다.

4. Malondialdehyde(MDA) 측정

산화성 심근손상의 생화학적 지표로 지질과산화 산물인 MDA를 Ohkawa등²⁰⁾의 방법으로 측정하였다. 심실만을 떼어내어 물기를 제거하고 무게를 잰후 9배 용량의 1.15% KCl 용액에서 tissue homogenizer(Brinkman, PTA 10)로 균질액을 만들었다. 시료균질액 0.05ml를 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 0.75ml, 8.1% sodium dodecylsulfate 0.1ml, 20% acetic acid 0.75ml, 증류수 0.35ml에 넣고 100°C 열탕에서 1시간동안 반응 시켰다. 실온으로 냉각시킨다음 반응액과 동량의 n-butanol을 넣어 TBA-반응물질을 n-butanol 층으로 이행시킨 후 파장 532 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

5. 통계 분석

모든 결과는 Mean \pm SEM으로 나타냈고 시간에 따른 변화를 살펴보기 위해 repeated measure analy-

sis of variance 통계 기법을 사용하였으며 여기에서 유의한 차이를 보이는 경우 각 시간대에서 95% 신뢰 수준하에서 Tukey's multiple comparison of ANOVA 방법을 사용하였다.

연구결과

1. 전기분해에 의한 산소라디칼 발생 및 산화성 심근손상

산소가 포화된 Krebs-Henseleit 관류액의 전기분해는 적용한 전류의 강도 및 시간에 비례하여 epinephrine에서 adrenochrome으로의 산화를 유의하게 증가시켰다. 이러한 adrenochrome 생성 증가는 SOD(100U/ml)에 의하여 거의 원상으로 감소되므로 superoxide anion 발생을 확인하였다(Fig. 1, Table 1).

2mA DC, 45초동안 전기분해한 경우 측정된 심기능의 모든 변수들(LVDP, $+dp/dt$, HR, $LVDP \times HR$, CF)이 관류시간 경과에 따라 현저하게 저하되었으며 이러한 심기능 저하는 산소라디칼 제거 물질들인 SOD(20U/ml), catalase(70U/ml), DMSO (10mM)에 의하여 유의하게 억제되었다(Fig. 2, Table 2).

산화성 심근손상의 생화학적 지표로 측정된 심실조직의 MDA 함량도 대조군(241 ± 22 nmole/g)에 비하여 전기분해군(385 ± 36 nmole/g)에서 약 1.5배 높았으며 이러한 MDA 증가는 역시 산소라디칼 제거물질들에 의하여 억제되었다(Table 3).

2. Captopril 및 enalaprilat의 심근보호효과

관류액의 전기분해에 의한 심기능 변화에 있어서 captopril($0.75 \sim 2\mu M$)은 모든 측정 변수들의 저하를

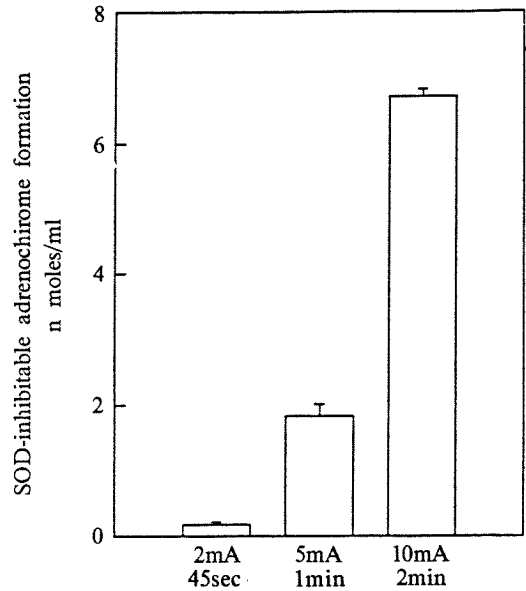


Fig. 1. Effect of electrolysis on SOD-inhibitable adrenochrome formation. Oxygenated Krebs-Henseleit perfusing solution was electrolyzed with direct current at $37^\circ C$. A 2ml aliquot of electrolyzed perfusate was added to 20ml of 100mM epinephrine containing with or without 100U/ml SOD. Absorbance was measured at 480nm with UV-vis spectrophotometer. Mean \pm SEM of 6 experiments.

현저히 억제하였다. 이러한 심기능 보호 효과는 처치한 captopril 용량에 의존적이었고 $0.75\mu M$ 의 소량에서도 유의한 효과를 나타냈을 뿐 아니라 $2\mu M$ 에서는 거의 완전한 보호효과를 나타내었다(Fig. 3, 4).

또한 captopril은 전기분해에 의한 심실조직의 MDA 함량 증가도 용량의 존적으로 억제하였으며 (Table 3), Krebs-Henseleit 용액의 전기분해시 발

Table 1. Drug effects on SOD-inhibitable adrenochrome formation after electrolysis of perfusing solution¹

| Drugs | | SOD-inhibitable adrenochrome formation ² n moles/ml |
|----------------------|-----------|---|
| Control electrolysis | 10mA 2min | 6.7 ± 0.1 |
| + Captopril | 2uM | $2.2 \pm 0.1^*$ |
| + Captopril | 6uM | $1.0 \pm 0.3^*$ |
| + Enalaprilat | 2uM | 5.0 ± 0.2 |
| + Cysteine | 5uM | $3.4 \pm 0.4^*$ |
| + DTT ³ | 5uM | $3.7 \pm 0.2^*$ |

¹Methods of electrolysis and measurement of SOD-inhibitable adrenochrome formation are as same as in Fig. 1. ²Mean \pm SEM of 6 experiments ³DTT : Dithiothreitol * $p < 0.01$ VS control electrolysis

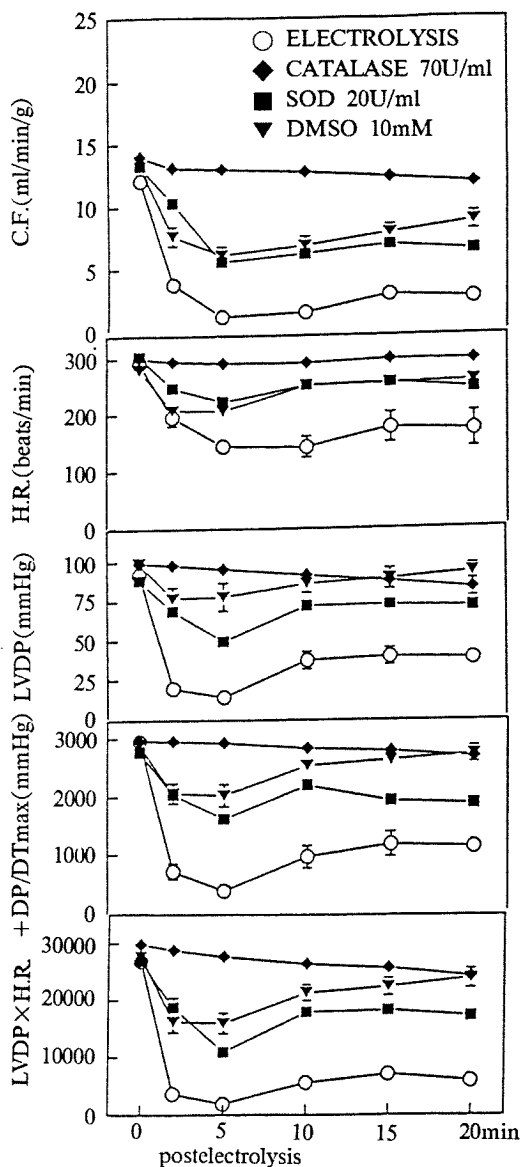


Fig. 2. Effect of oxygen radical scavenger on myocardial dysfunction induced by electrolyzed perfusate in isolated heart of rat. Oxygenated Krebs-Henseleit solution was electrolyzed with 2mA DC for 45 sec. Each point represents Mean \pm SEM of 6 experiments.
C.F. : Coronary flow
H.R. : Heart rate
LVDP : Left ventricular developed pressure
+DP/DTmax : Maximal rate of left ventricular pressure development

생되는 superoxide anion 역시 captopril에 의하여 감소되었다(Table 1).

한편 captopril과는 달리 화학구조상 SH-기를 갖지 않는 ACE 억제제인 enalaprilat(2 μ M)는 관류액의 전기분해에 따른 심기능 저하 및 MDA 함량 증가를 거의 억제하지 못하였다(Fig. 3, 4, Table 3).

3. Cysteine 및 dithiothreitol의 심근보호효과

위에서와 같은 산화성 심근손상에 대한 captopril의 보호효과가 ACE 억제작용과는 관계없이 SH-기에 의한 항산화 작용과 관련이 있는지 여부를 검토하고자 하였다. 본 연구에서는 SH-작용 물질 이면서 ACE 억제제는 아닌 cysteine과 dithiothreitol (DTT)이 전기분해에 의한 산화성 심근손상에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 5에서와 같이 각각 5 μ M의 cysteine 및 DTT는 모든 심기능 변수들의 저하를 현저히 억제하였을 뿐 아니라 MDA함량증가(Table 3) 및 SOD-억제성 adrenochrome 생성(Table 1)도 현저히 억제하였다.

고 안

허혈성 심근병변의 관상혈류 재개에 따른 재관류 심근손상은 반응성 산소라디칼 증가 및 방어기전 저하에 의한 심근세포의 산화성 변성과 밀접한 관계가 있으며^{2,3)} 이러한 재관류 심근손상은 각종의 산소라디칼 제거물질 및 항산화 약물들에 의하여 방지됨이 보고 되었다^{7,10,11)}. 반응성 산소라디칼등에 의한 산화성 심근 손상에 있어서 약물들의 효과를 검토하기 위하여는 인위적인 산소라디칼 발생 조건을 실험모델로 이용하는 경우가 많다. 지금까지의 연구들에서는 xanthine oxidase, glucose oxidase등 효소계나 또는 Fe^{++} -EDTA- H_2O_2 , NaOCl등 기타 화학물질들을 사용한 산소라디칼 발생계^{21,22)}를 이용하는 것이 대부분이다. 그러나 이러한 효소 또는 화학물질을 이용한 산소라디칼 발생계는 그 물질들 자체가 심장의 기계적 기능 및 생화학적 성질에 영향을 미칠 수 있는 단점이 있다. 최근에 Jackson등¹⁸⁾은 이러한 단점이 없이 보다 간편하게 산소라디칼을 발생하므로써 산화성 심근손상을 유도할 수 있는 방법으로 심장관류액의

Table 2. Effect of electrolysis on myocardial mechanical function

| Condition | CF ml/min/g | HR beats/min | LVDP mmHg | +dp/dt mmHg/sec | LVDP×HR ² |
|--------------------------------|----------------|-----------------|--------------|--------------------|----------------------|
| Pre-electrolysis | 12.1±0.5 | 291.8±4.5 | 91.92±4.4 | 2946.7±40.9 | 26769.0±1120.3 |
| Post-electrolysis ¹ | 2.8±0.5* | 170.8±31.8* | 37.0±3.8* | 1120.7±118.4* | 5965.0±1063.2* |

¹Oxygenated Krebs-Henseleit solution was electrolyzed with 2mA DC for 45sec just before being perfused through coronary circulation. Parameters were measured before and at 20 min after electrolysis.

²Mean±SEM of 6 experiments, *p<0.01 vs Pre-electrolysis

Table 3. Effects of various agents on malondialdehyde content in isolated rat heart perfused with electrolyzed solution

| Treatment | ¹ Mandialdehyde n moles/g wet wt |
|--------------------------------|--|
| Control | 241±22 |
| Electrolysis, 2mA DC. 45sec | 385±36* |
| + Catalase, 70U/ml | 315±19** |
| + Superoxide dismutase, 20U/ml | 309±17** |
| + Dimethylsulfoxide, 10mM | 387±31 |
| + Captopril, 2mM | 294±10** |
| + Captopril, 0.75mM | 343±30 |
| + Enalaprilat, 2mM | 364±27 |
| + Cysteine, 5mM | 341±16*** |
| + Dithiothreitol, 5mM | 336±22*** |

¹Myocardial MDA content was measured with thiobarbituric acid method. Mean±SEM of 6 experiments.

*p<0.01 vs Control, **p<0.01 vs Electrolysis, ***p<0.05 vs Electrolysis

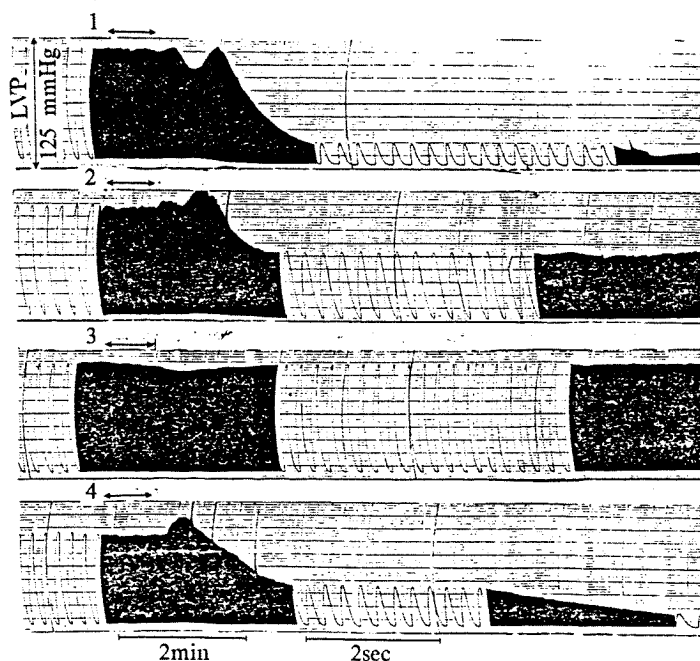


Fig. 3. Effect of captopril and enalaprilat on myocardial dysfunction induced by electrolyzed perfusate in isolated hearts of rats. Electrolysis(2mA, 45sec) was performed between arrows, and left ventricular pressure(LVP) was measured as described in Method.

1. Electrolysis(E) only 2. E+ Captopril 0.75mM 3. E+ Captopril 2mM 4. E+ Enalaprilat 2mM

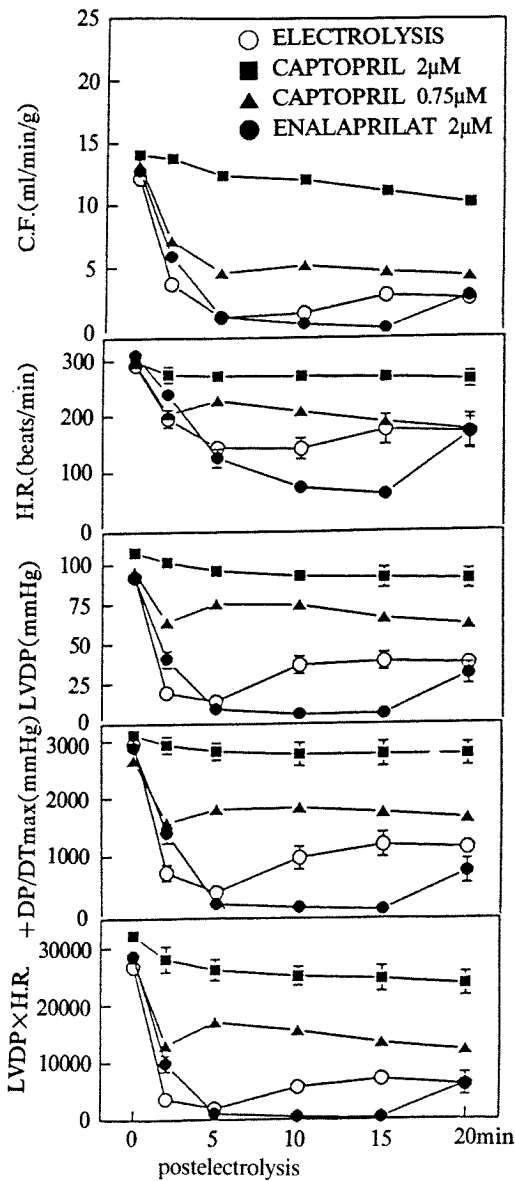


Fig. 4. Effect of coptopril and enalaprilat on myocardial dysfunction induced by electrolyzed perfusate in isolated hearts of rat. Method of electrolysis is as same as in Fig. 2 Each point represents Mean \pm SEM of 6 experiments.

전기분해법을 기술한 바 있다. 이들은 가토 적출 심장의 관류액을 20mA DC, 2min로 전기 분해시 산소라디칼에 의한 산화성 심근손상이 발생한다고 보고 하였다. 본 연구에서는 이들의 방법을 변형하여 산소가 포화된 Krebs-Henseleit 관류액을 2mA

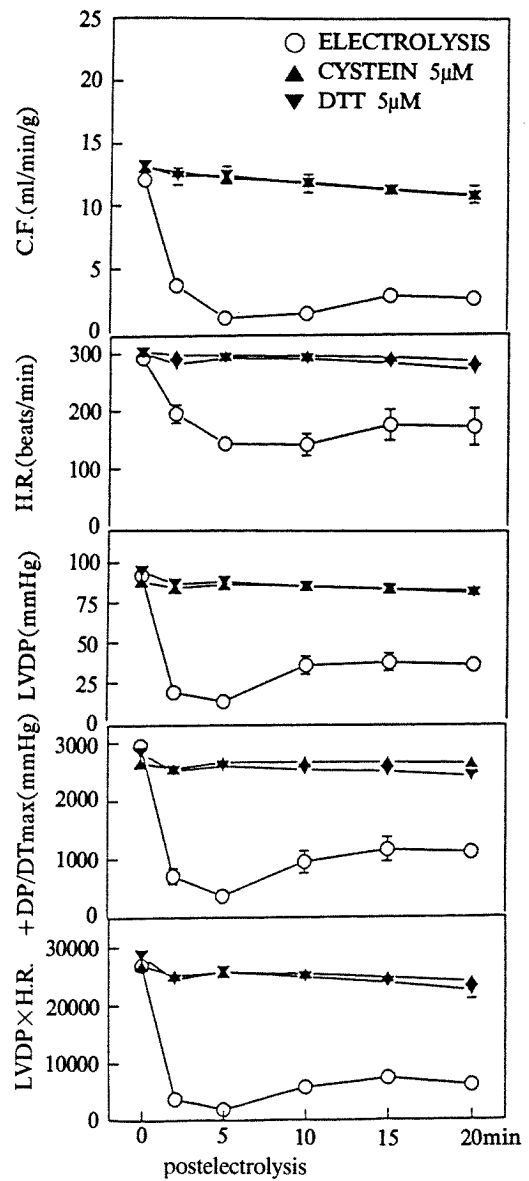


Fig. 5. Effect of cysteine and dithiothreitol on myocardial dysfunction induced by electrolyzed perfusate in isolated hearts of rat. Method of electrolysis is as same as in Fig. 2 Each point represents Mean \pm SEM of 6 experiments.

DC로 45초동안 전기분해 한 경우 superoxide anion 생성증가와 더불어 흰쥐 적출심장 기능의 각종 변수들이 현저히 저하될 뿐 아니라 산화성 조직 손상의 생화학적 지표인 지질과산화산물, MDA의 생성도 증가 하였으며, 이러한 심기능저하 및 MDA

증가는 각종의 산소라디칼제거 물질들에 의하여 억제되었다. 이와같은 결과는 본 연구조건의 전기분해에 의한 환취 적출심장의 심기능 저하도 산소라디칼에 의한 산화성 심근손상 모델로서 적합할 것임을 시사하는 바를 여겨졌다.

Angiotensin 전환 효소억제제인 captopril이 허혈-재관류 심근 손상 및 산소라디칼에 의한 산화성 손상에 대하여 보호효과를 나타낸다고 보고되었다. van Gilst등¹⁵⁾은 환취의 허혈성 적출심장에서 captopril이 재관류 부정맥의 발생을 방지하며 이러한 작용은 허혈 국소의 norepinephrine 유리감소와 관련이 있다고 하였다. 이와 더불어 cyclooxygenase 억제약물인 indomethacin을 처리한 심장에서는 captopril의 보호작용이 나타나지 않는다는 점에서 captopril은 prostaglandin 특히 PGI₂ 생성을 증가시키므로서 또한 심근 보호작용을 나타낼 것으로 주장하였다. 한편 Pi & Chen¹⁶⁾은 환취 적출심장의 전기분해에 의한 기능 저하에 있어서 captopril이 보호작용을 나타냄을 관찰하고 이는 주로 prostacyclin 생성증가에 기인한 것이며 일부 captopril의 SH-기와 관련된 항산화 기전도 작용할 것이라고 보고하였다. 본 연구에서도 captopril은 산소라디칼에 의한 산화성 심근손상에 대하여 보호효과를 나타내었다. 환취 적출심장에서 관류액의 전기분해에 의한 LVDP, +dp/dt, 심박수 및 관상관류량 등 모든 심기능 변수들의 저하와 MDA 생성증가를 captopril이 산소라디칼 제거물질들과 동등한 정도로 억제하였으며 또한 전기분해 관류액에서 superoxide anion 발생도 역시 용량의존적으로 억제하였다. 이러한 사실은 captopril에 의한 심근 보호 작용이 아마도 항 산소라디칼작용에 의한 것임을 시사하는 바로 이는 Bagchi 등²¹⁾이 in vitro의 각종 산소라디칼 발생계에서 captopril이 superoxide anion 및 hydroxyl radical을 직접적으로 제거한다는 보고를 볼 때에도 가능한 일로 여겨졌다. 그러나 이와는 달리 Pi & Chen¹⁶⁾은 Krebs-Henseleit 용액의 10mA DC, 1분동안 전기분해 조건에서 captopril이 직접적인 산소라디칼 제거작용을 나타내지 않는다고 보고하였다. 이와같이 상이한 결과는 아마도 본 연구에 비하여 높은 강도의 전기분해를 시행하므로서 산소라디칼이 captopril의 제거능력을 초과할 정도로

훨씬 많이 발생되기 때문일 수 있으며 또 이들은 captopril을 Krebs-Henseleit용액에 첨가한 상태로 전기분해를 실시 하였기 때문에 captopril 또한 분해되므로서 작용을 나타내지 못했을 가능성도 있다.

SH-기를 함유하지 않는 ACE-억제제인 enalaprilat는 SH-기를 갖고 있는 captopril과는 달리 같은 조건의 전기분해에 의한 심기능저하 및 MDA 생성증가를 전혀 억제하지 못하였다. 이러한 결과는 환취의 허혈성 적출심장에서 재관류 부정맥 발생이 captopril에 의하여는 방지되나 enalapril에 의하여는 방지되지 않는다는 보고¹⁵⁾와도 유사하다. 이와같이 ACE 억제제이면서도 SH-기 유무에 따라 심근보호 작용이 나타나거나 나타나지 않는다는 것은 ACE 억제작용과는 별개로 SH-기와 관련된 기전이 산화성 심근손상의 보호작용에 중요한 역할을 할 것임을 시사하는 바를 여겨진다. SH-기작용물질로서 ACE 억제작용은 없는 cysteine, dithiothreitol이 전기분해에 의한 심기능 저하를 방지할 뿐 아니라 MDA 생성 및 superoxide anion 생성도 억제한 것은 그러한 추측을 가능케하는 결과라 여겨지며 환원형 glutathione, N-acetylcysteine, N-2-mercaptopropionyl glycine²³⁾ 및 D-penicillamine²⁴⁾등 다른 SH-기 함유 물질들이 항산소라디칼 작용을 갖고 있다는 보고들도 또한 이러한 추측을 뒷받침하는 바를 여겨진다. 일반적으로 SH-기는 산화물질들과 쉽게 반응하여 disulfide로 산화되기 때문에 산소라디칼 생성이 증가하는 조건에서는 captopril의 SH-기가 효소 및 각종 단백질의 기능적 SH-기 대신 산화되므로서 세포기능을 보호할 가능성이 있다. Ondetti²⁵⁾는 SH-기 함유 ACE 억제제들은 glutathione의 SH-기에 수소는 donor로 작용하므로서 내인성 glutathione이 환원상태를 유지토록 한다고 하였다. 환원형 glutathione은 세포내에서 H₂O₂ 및 유기과산화물을 제거하는 내인성 glutathione peroxidase/reductase 항산화 방어기전의 일부로서 SH-기가 이들 방어기전의 활성을 유지하는데 절대적으로 필요한 요소임을 감안할 때 SH-기 함유 captopril도 산소라디칼 증가에 따른 조직세포의 산화성 변성에 대하여 항산화 또는 항산소 라디칼 작용을 나타낼 수 있을 것으로 여겨진다.

연구배경 :

Captopril은 SH-기를 함유하는 angiotensin 전환 효소(ACE) 억제제로 항고혈압 작용이외에 허혈-재관류 심근손상에 대하여도 보호작용을 나타냄이 알려져 있다. Captopril의 심근보호작용은 ACE 억제작용과는 상관없이 항산소라디칼 작용에 의한 것으로 보고되었으나 그 자세한 기전은 명확히 밝혀져 있지 않다. 본 연구는 허혈-재관류 심장에 있어서 항산화 물질로서 Captopril의 심근보호작용 및 그 기전을 규명하기 위하여 실험적으로 산소라디칼에 의한 유도된 산화성 심근손상에 대한 Captopril의 효과를 검토하였다.

방 법 :

흰쥐의 적출심장을 95% O₂-5% CO₂ 포화시킨 Krebs-Henseleit 용액으로 관류(Langendorff법)하고, 관류액의 전기분해(2mA 직류, 45초)에 의한 산소라디칼 발생법을 이용하여 산화성 심장손상을 유도하였다. 심기능 지표로 좌심실압 및 발생속도(dp/dt), 심박수, 관상관류량을 측정하고, 산화성 심근손상 지표로 심실근에서 지질과산화 산물인 malondialdehyde(MDA)를 측정하였다.

결 과 :

산소가 포화된 Krebs-Henseleit 관류액의 전기분해시 superoxide anion 생성이 증가하였고, 좌심실압 및 dp/dt, 심박수, 관상관류량이 현저히 저하되었으며 지질과산화 산물인 MDA 함량이 증가하였다. 이러한 superoxide anion 생성 및 심기능 저하와 MDA 증가는 Captopril(0.75~2μM)에 의하여 용량의존적으로 억제되었다. 한편 ACE 억제제중 Captopril과는 달리 SH-기를 갖지 않는 enalaprilat는 같은 조건의 관류액 전기분해시 심기능 보호효과를 나타내지 않았다. 그러나 SH-작용물질이지만 ACE 억제작용이 없는 cysteine, dithiothreitol은 심기능 저하, MDA 증가 및 superoxide anion 생성을 억제하였다.

결 론 :

Captopril은 ACE억제 작용과는 별개로 SH-기와 관련된 항산화 및 항산소라디칼 작용에 의하여 산화성 심근손상에 보호작용을 나타낼 것으로 여

겨진다.

References

- 1) Ferrari R, Ceconi C, Curello S : *Oxygen mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion : Role of the cellular defences against oxygen toxicity*. *J Mol Cell Cardiol* 17 : 937-945, 1985
- 2) Freeman BA, Crapo JD : *Free radicals and tissue injury*. *Lab Invest* 47 : 412-426, 1982
- 3) Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov YD, Belkina LM, Arkhipenko YV : *The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart*. *Basic Res Cardiol* 77 : 465-485, 1982
- 4) Boveris A, Chance B : *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide*. *Biochem J* 134 : 707-716, 1973.
- 5) Leyck S, Parnham MJ : *The cellular origin of oxygen free radical species. Documentation of International Conference on Oxygen Free Radicals In Health and Disease, London 1988*
- 6) Turrens JF, Freeman BA, Crapo JD : *Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes*. *Arch Biochem Biophys* 217 : 411-421, 1982
- 7) Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera CM : *Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart*. *J Mol Cell Cardiol* 12 : 797-808, 1980
- 8) Majewska MD, Strosznajder J, Lazarewicz J : *Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondria phospholipid*. *Brain Res* 158 : 423-434, 1978
- 9) Schlafer M, Myers CL, Adkins S : *Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia*. *J Mol Cell Cardiol* 19 : 1195-1206, 1987
- 10) Kim MS, Akera T : *O₂ free radicals : cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺-K⁺-ATPase*. *Am J Physiol* 252 : H252-H257, 1987
- 11) Myers CL, Weiss SJ, Kirsh MM, Schlafer M : *Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the oxygen paradox : Reduction of creatin kinase release by catalase, allopurinol or deferoxamine, but*

- not by superoxide dismutase. *J Mol Cell Cardiol* 17 : 675-684, 1985
- 12) Yoon HK, Lim JK, Kim MS : *Protective effects of antioxidants on the reoxygenation injury in hypoxic myocardium of rat. Korean J Pharmacol* 24 : 53-61, 1988
 - 13) Hock CE, Ribiero LGT, Lefer AM : *Preservation of ischemic myocardium by a new converting enzyme inhibitor(CEI), enalaprilic acid, in acute myocardial infarction. Am Heart J* 109 : 222-228, 1985
 - 14) Linz W, Schölkens BA, Han YF : *Beneficial effects of the converting enzyme inhibitor, ramipril, in ischemic rat hearts. J Cardiovasc Pharmacol* 8(Suppl. 10) : S91-S99, 1986
 - 15) Van Gilst WH, de Graeff PA, Wesseling H, de Langen CDJ : *Reduction of reperfusion arrhythmias in the ischemic isolated rat heart by angiotensin converting enzyme inhibitors : a comparison of captopril, enalapril and Hoe 498. J Cardiovasc Pharmacol* 8 : 722-728, 1986
 - 16) Pi XJ, Chen X : *Captopril and ramiprilat protect against free radical injury in isoated working rat heart. J Mol Cell Cardiol.* 21 : 1261-1271, 1989
 - 17) Li K, Chen X : *Protective effects of captopril and enalapril on myocardial ischemia and reperfusion damae of rat. J Mol Cell Cardiol* 19 : 909-915, 1987
 - 18) Jackson CV, Michelson JK, Stringer K, Rao PS, Lucchesi BR : *Electrolysis-induced myocardial disfunction. A novel method for the study of free radical mediated tissue injury. J Pharmacol Methods* 15 : 305-320, 1986
 - 19) Misra HP, Fridovich I : *The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem* 247 : 3170, 1972
 - 20) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K : *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem* 95 : 351-358, 1979
 - 21) Bagchi D, Prasad R, Das DK : *Direct scavenging of free radicals by captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor. Bioch Biophys Res Comm* 158 : 52-57, 1989
 - 22) Burton K, McCord JM, Ghai G : *Myocardial alterations due to free radical generation. Am J Physiol* 246 : H776-783, 1984
 - 23) Ortolani O, Conti A, Imperatore R, Sommella P, Circolo R : *Photooxidation of epinephrine sensitized by methylene blue as assay for the evaluation of alpha-mercaptopropionylglycine as a free radical scavenger. Boll Soc Ital Biol Sper* 58 : 444-449, 1982
 - 24) Betts WH, Cleland LG, Gee DJ, Whitehouse MW : *Effects of D-penicillamine on a model of oxygen-derived free radical mediated tissue damage. Actions* 14 : 283-290, 1984
 - 25) Ondetti MA : *Structure relationships of angiotensin converting enzyme inhibitors to pharmacologic activity. Circulation* 77(Suppl. I) : 174-178, 1988