

# 항산화제 Amifostine의 허혈 및 재관류시 흰쥐 적출심장의 심근 보호기능

허 강 배\* · 천 수 봉\*\* · 김 송 명\*\*

=Abstract=

## Cardioprotective Potency of the Antioxidante Amifostine in the Ischemic and Reperfused Isolated Rat Heart

Gang Bae Huh, M.D. \*, Soo Bong Chaun, M.D. \*\*, Song Myung Kim, M.D. \*\*

**Background:** S-2-(3 aminoproflamino) ethylphosphorothioic acid(WR-2721) is one of the radical scavenging thiols. We tested its protective effects in the reperfused heart. **Material and Method.** The experimental setup was the constant pressure Langendorffs perfusion system. We investigated the radical scavenging properties of this compound in isolated rat hearts which were exposed to 20 minutes ischemia and 20 minutes reperfusion. Four experimental groups were used: group I, control, Amifostine 50 mg(1 mL) peritoneal injection 30 minutes before ischemia(group II), Amifostine 10 mg(0.2 mL) injection during ischemia through coronary artery(group III), and Amifostine 50 mg(1 mL) peritoneal injection 2 hrs before ischemia(group IV). The experimental parameters were the levels of lactate, CK-MB, and adenosine deaminase(ADA) in frozen myocardium, the quantity of coronary flow, and left ventricular developed pressure, and its dp/dt. Statistical analysis was performed using repeated measured analysis of variance and student t-test. **Result:** The coronary flow of group II and IV were less than group I and III at equilibrium state but recovery of coronary flow at reperfusion state of group II, III, and IV were more increased compared with group I. The change of systolic left ventricular developing pressure of group II and IV were less than control group at equilibrium state, which seemed to be the influence of the pharmacological hypotensive effect of amifostine. But it was higher compared with group I at reperfusion state. The lactic acid contents of group II were less than control group in frozen myocardium. (Group I was  $0.20 \pm 0.29$  mM/g vs Group II, which was  $0.10 \pm 0.11$  mM/g). The quantity of CK-MB in myocardial tissue was highest in group IV ( $P=0.026$  I:  $120.0 \pm 97.8$  U/L vs IV:  $242.2 \pm 79.15$  U/L). The adenosine deaminase contents in the coronary flow and frozen myocardium were not significantly different among each group.

---

\* 부산 영도병원 흉부외과

Thoracic and Cardiovascular Surgery of Yung Do Hospital, Busan, Korea

\*\* 고신대학교 의과대학교 복음병원 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Gaspel Hospital, College of Medicine, Kosin University, Busan, Korea

† 본 논문은 1997년 10월 30일 제29차 대한흉부외과학회 추계학술대회에서 구연되었음

논문접수일 : 98년 2월 3일 심사통과일 : 98년 5월 27일

책임저자 : 천수봉, (602-702) 부산광역시 서구 암남동 34번지, 고신대학교 의과대학 복음병원 흉부외과. (Tel) 051-240-6466, (Fax) 051-254-5446

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

**Conclusions:** Amifostine seemed to have significant cardioprotective effect during ischemia and reperfusion injuries of myocardium.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 1998;31:845-54)

**Key word :** 1. Free radical scavengers  
2. Reperfusion injury  
3. Myocardial protection

## 서 론

개심술후 조기 사망 원인은 심근 보호에도 불구하고 필연적으로 초래되는 심근 손상에 있으며, 대동맥 차단이후부터 재관류 이후까지의 과정에서 무관류로 인한 허혈 상태의 심근을 잘 보존하는 것이 무엇보다도 중요하다<sup>1)</sup>.

Amifostine(WR-2721)는 미국의 Walter Reed 군 연구소에서 1950년도부터 항방사선 약제 개발계획에 의해서 방사선 보호제의 역할이 추정되는 4,400 개의 약품중에서 제일 안전하고 확실한 성능의 약제로 확인된 바 있는 것으로<sup>2)</sup> 그 화학적인 구조는  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SPO}_3\text{H}_2$ 이며 약제의 상품명은 ethyol<sup>®</sup>로 이미 외국에서는 항암 치료시 항암 약제의 독성을 줄이기 위해 상품화되어 임상에서 사용되고 있는 실정이다<sup>3)</sup> (Fig. 1).

저자는 방사능 조사시와 허혈후 재관류시의 세포내 손상의 기전이 유사하거나 동일하다는데 착안하여 허혈과 재관류 손상에 amifostine의 심근 보호역할이 있을 것으로 생각되어 연구를 시행하였다<sup>4)</sup>.

## 대상 및 방법

### 1. 실험 대상

실험에 사용한 쥐는 Sprague-Dowley(학명:Rattus norvegicus) 계로 암수 구별없이 20마리를 사용하였으며 쥐의 체중은 250gm 미만의 것을 사용하였다.

실험동물들을 네군으로 나누어 실험하였다.

I군은 아무런 전처치없는 대조군 5마리로 II군은 실험 30분전 amifostine 200 mg/Kg을 복강에 투여한 5마리로, III군은 심장의 허혈시 심정지후 심정지액을 투여하기 직전에 amifostine 50 mg/Kg을 관상동맥을 통해 직접 투여한 5마리를, IV군은 실험 2시간전 amifostine 200 mg/Kg을 복강에 투여한 5마리로 실험 하였다(Table 1, Fig. 2).

### 2. 실험방법

#### 1) 실험 모형 (관류장치)

실험에 사용된 흰쥐 적출 심장의 관류장치는 Langendorff 분리 비작업성 정압형으로 하였다. 심장이외의 외부적인 요인을 배제하여 실험하기위해 적출한 심장을 Langendorff장치에 연결하고 관류액은 modified Krebs-Henseleit완충액 (이하 K-H 완충액)을 사용하였다. 관류압은 100 cmH<sub>2</sub>O의 충전액내에 기포관을 삽입하여 carboxan(95%O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) 가스로 기포화하며, 대동맥관에서 채취한 완충액내의 산소분압이 약 500 mmHg 이상,탄산가스 분압이 35~45 mmHg, pH가 7.35~7.45 범위를 유지시켰다.

일정한 온도를 유지하기 위해 열교환기를 사용하고 정온순환기 (constant temperature regulator, VWR scientific 1160, USA)와 물펌프(금성사)를 장치하여 완충용액과 제일하단의 심장보온용 정온조를 37°C로 조정하여 전 실험 과정에서 항상 정온을 유지시켰다(Fig. 3).

#### 2) 관 관류액

Modified K-H완충액은 4차 증류수에 NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.64 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18 mM, Glucose 5.55 mM, NaHCO<sub>3</sub> 24.88 mM, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 2.55 mM의 시료를 달아 혼합 진탕한후 37°C로 가온하여 만들고 이를 다시 여과지 (Whatman membrane filters, pore size 0.4 um,diameter 47 mm,WCN type)에 여과하여 관상동맥의 색전요인을 충분히 제거 하였다.

#### 3) 심장적출

마취는 thiopental sodium을 쥐의 체중 1 kg당 40 mg을 복강내로 주입하여 전신마취를 유도하며, 체중 1g당 heparin 1unit를 복강내 주입하여 관상동맥의 혈전 형성을 방지하였고, 운동과 각종 반사반응이 소실된 것을 확인한 후 수술대에 위치하여 사지를 고정하고 검상돌기 하부의 피부에 소절

Table 1. Experimental Groups

Groups No.	Name of Groups	No. of cases
I	Control	5
	Amifostine 50mg(1ml) injection into peritoneum before 30 min	5
II	Amifostine 10 mg(0.2 ml) injection into coronary artery during ischemia	5
III	Amifostine 50mg(1ml) injection into peritoneum before 2 hours	5
IV	Amifostine 50mg(1ml) injection into peritoneum before 2 hours	5
Total		20

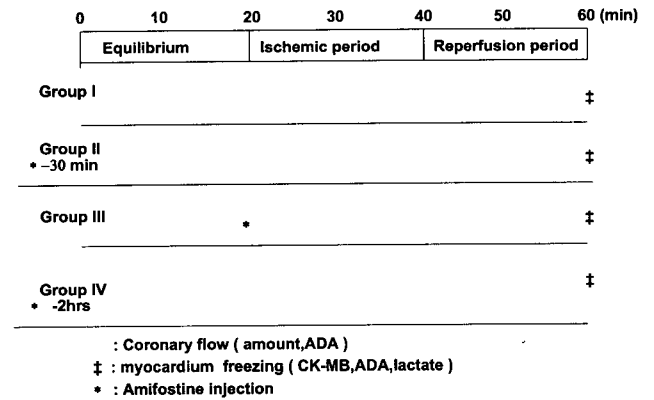


Fig. 2. Experimental protocol

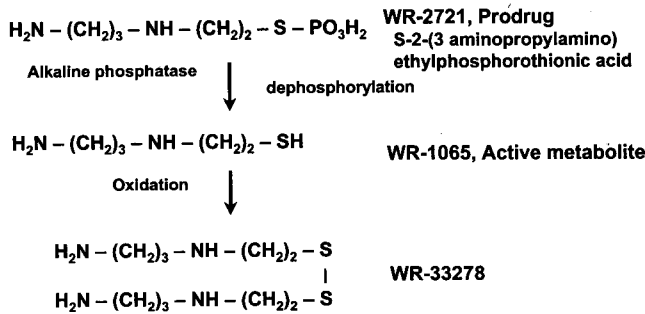


Fig. 1. Chemical structure formulae and activation of WR 2721, Amifostine

개를 가하여 경부까지 역삼각형으로 개흉하였다. 그리고 검상돌기를 거상하여 심장과 흉골 사이의 간격을 넓히고 흉골 연을 따라 늑연골을 양측으로 절단하여 흉골 부분을 두부 쪽으로 뒤집은 후 심장을 거상하여 폐정맥, 대동맥 부위를 절단하였다. 분리된 심장은 4°C의 modified K-H완충액에 넣어 심박동을 정지시키고 심장의 무게를 측정하였다(E-300J, Ohau Inc., USA).

적출한 심장의 상행대동맥을 Langendorff장치의 대동맥관에 삽입하고 견사로 충진액이 새지 않게 결찰한 후 충진액 공급을 조절하는 장치를 완전히 열어 주었다.

심장에 부착된 지방조직이나 불필요한 결체조직을 제거하고 비작업성 순환계로의 실험의 단점을 보완하기 위해서 latex balloon을 좌심방을 통하여 좌심실내로 latex 풍선을 삽입하여(volume 0.2 ml) 이완기 말기 압력이 10 mmHg가 되도록 팽창시킨 뒤, latex balloon에 연결된 카놀라를 압력 변환기 (Pressure transducer P23 XL, Viggo Spectramed Inc.,USA)에 연결하여 Physiograph(WindoGraf®, Gould Inc., USA)를 통해 심박동 수,좌심실 압력과 압력 미분치(dp/dt)를 측정하기 위해 기록하였다. 압력 미분치는 differentiator(Model 13-4615-71, Gould Inc., USA)를 이용하였다.

우심실 전벽에 심박수를 조절하기 위한 2개의 백금전극선

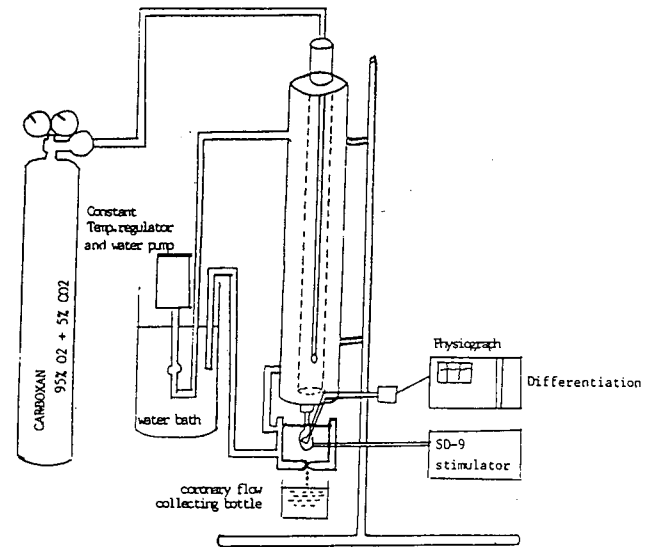


Fig. 3. Experimental Model

(99.95% platinum wire)을 삽입한 후 인공 심박동기(Pulse stimulator, Model SD-9, Grass® Instruments Co.,USA)에 연결하여 박동수가 분당 300회 이하일 경우에 인공적으로 박동이 300 beat/min, 5-milisecond duration, 2-3voltage 되게 하였다.

적출한 심장을 Langendorff 장치에 연결하여 20분간의 평형상태 혹은 허혈전 (Preischemia) 과정을 거친 후에 관류액을 차단하고, 4°C의 심정지액 (Green cardiosol®, 중외제약: 1000 ml당 Nacl 6.43 gm, Kcl 1,193 gm, Cacl<sub>2</sub> 0.176 gm, Mgcl<sub>2</sub> 3,253 gm)을 5 ml씩 대동맥을 통하여 주사기로 양압주입시켜 심정지를 유도하였다. 20분간의 허혈시간이 지난 후 재관류를 20분간하고 심근을 액화질소액내에 냉각시킨 집게로 심실을 냉동하였다.

4) 혈액학적 검사

허혈전 20분에 심박동수와 개방된 관상정맥동으로 나오는 관류액을 1분간 모아 관상혈류량을 측정하고, 좌심실압(left ventricular developed pressure, LVDP), 최대 압력 미분치(max +dp/dt) 등을 기록 측정을 하였고, 20분간의 비작업 관류로 적출 심장을 안정시킨후 관류 회로를 차단하여 허혈을 20분간 시켰다. 재판류를 20분간시켜 재판류 상태의 20분에 각각 표본 채취 및 기록 측정을 하였다.

압력 미분치는 최대 수축기압 미분치 (max + dp/dt), 최대 이완기압 미분치로 구분하여 분석 하였다.

5) 심근조직내의 CK-MB 효소 및 유산치 정량분석

액체 질소통내에 동결 보관된 심실조직을 조직 마쇄기(Ultra Turrax T25, Janke & Kunel IKA®, Labotechik)를 이용하여 매우 잘게 마쇄 시킨후 원심분리기(Sorvall®)에서 4℃로 1시간 동안 35,000 rpm으로 원심 분리시켜 상층액을 일정량 채취하여 3등분하여 creatinine-kinase MB, 유산과 adenosine deaminase 효소들의 정량검사용으로 사용하였다.

a) Creatine Kinase MB 효소

효소 미세입자 면역 측정법(Enzyme microparticle immune test, EMIT)의 원리를 이용하여 IMX® CK-MB assay(Abbott Lab, USA)를 사용하여 정량 분석하였다.

b) 유산치

유산치의 정량 분석은 유산 검사 체계 TDX/TDX FLX REA(radiative energy attention, Abbott Lab, USA) lactic acid assay system을 이용하여 정량분석하였다.

6) Adenosine deaminase(ADA)

a) 관류액내 ADA 정량분석

허혈전 20분 사이의 관류액과 재판류후 20분 사이의 관류액 각각 1.8cc를 채취하여 액체 질소통에 동결 보관후 일정량을 채취 Galanti 및 Giusti의 calorimetric method에 따라 Spectronic 3000 auto-analyzer(Spectronics Corp., Westbury, USA) 로 정량 분석하였다.

b) 심근조직내 ADA의 정량분석

심근내 효소 및 유산치 검사에서 준비된 나머지 1/3의 상층액을 Galanti 및 Giusti의 calorimetric method에 따라 spectronic 3000 auto-analyzer (Spectronic Corp., Westbury, USA)로 정량 분석하였다.

6) 통계학적 처리

각군에 사용된 자료는 평균과 표준오차로 표시하였고, 통계학적 분석을 위하여 통계분석체계(Statistical analysis system, SAS)를 이용하여 반복 분산 분석법과 student t-test를 적용하였고 대조군과 비교하기 위해 Mann-Whitney test로 분석하였으며, p값이 0.05미만인 경우를 유의성이 있는 것으로 처리하였다.

Table 2. Body and heart weight of experimental animals (mean±SD, gm)

Group	No. of cases	body weight	Heart weight
I	5	209±21.8	1.03±0.06
II	5	224±8.94	1.04±0.09
III	5	224±8.94	1.06±0.03
IV	5	232±10.9	1.01±0.06
Total	20	NS	NS

NS : Not significance by statistical analysis.

Table 3. Change of coronary flow(ml/min)

Group	Equilibrium	Reperfusion	Recovery rate(%)
I	9.6±3.90	8.0±2.33	88*
II	8.3±2.46	8.6±1.93	107
III	9.4±1.47	9.1±1.38	97
IV	7.8±2.63	8.8±2.46	117

\* P=0.047, I vs III

결 과

각군의 심실내의 유산치와 CK-MB, 관류량과 심기능 등을 분석하여 얻은 결과를 비교 분석하였다(Table 1).

1) 쥐의 체중과 심근의 무게

각군의 쥐의 무게는 250 gm 미만으로 각군 사이의 차이가 없었으며 심장 무게는 1 gm 내외로 각군의 차이가 없었다(Table 2).

2) 관류량과 회복률

허혈전 20분과 재판류후 20분에 각각 측정한 관류량을 비교하였다.

허혈전 20분의 관류액은 I군은 9.6±3.90 ml였으며, II군은 8.3±2.46 ml였고 III군은 9.4±1.47 ml였으며, IV군은 7.8±2.63 ml였다.

I군과 III군은 허혈전 아무런 조치 없이 실험한 군으로 두 군간의 차이가 보이지 않으나 II군과 IV군은 각각 실험전 30분과 2시간전에 amifostine 200 mg/Kg body weight을 복강에 투여한 군으로 약제에 의해 저혈압 현상이 있어 평형상태의 관류량이 적었다.

재판류후 20분의 관류액은 대조군은 7.98±2.33 ml로 가장 적었고 허혈전 관류량의 88%였으며, II군은 8.56±1.93 ml로 허혈전 관류량의 107%로 오히려 증가하였으며 III군은 재판류후 9.14±1.38 ml로 관류량이 가장 많았고 허혈전 관류량

**Table 4.** Change of left ventricular developing pressure (Mean  $\pm$  Se, mmHg)

Group	Equilibrium	Reperfusion	Recovery rate(%)
I	90.0 $\pm$ 22.09 †	77.50 $\pm$ 24.04	80*
II	62.5 $\pm$ 15.93 †	92.50 $\pm$ 18.43	152*
III	78.8 $\pm$ 9.48	96.45 $\pm$ 15.97	24*
IV	81.3 $\pm$ 12.50	96.25 $\pm$ 18.00	120*

\* P=0.0057, I vs II, III, IV, †p=0.031, I vs II

의 97%였으며 대조군의 허혈전 관류량의 95%였다. IV군은 8.78 $\pm$ 2.46 ml로 허혈전 관류량의 117%로 오히려 증가하였으며 대조군의 허혈전 관류량의 91%였다. 회복률은 대조군에 비해 III군에서 P= 0.047로 유의하게 높았다(Table 3).

3) 좌심실 압력과 회복률

허혈전 20분과 재관류후 20분에 관관류량 측정시 각군의 좌심실 압력을 측정하였다. 대조군은 허혈전 90.0 $\pm$ 22.09 mmHg였고, 재관류후 77.5 $\pm$ 24.04 mmHg로 허혈전의 80%였다. II군은 허혈전 62.5 $\pm$ 15.93 mmHg로 가장 낮았으나 재관류후 92.5 $\pm$ 18.43 mmHg로 허혈전의 152%로 오히려 증가하였다. III군은 허혈전 78.8 $\pm$ 9.48 mmHg였고, 재관류후 96.45 $\pm$ 15.97 mmHg로 가장 높았고 허혈전의 124%로 오히려 증가하였다. IV군은 허혈전 81.3 $\pm$ 12.50 mmHg였으나, 재관류후 96.25 $\pm$ 18.0 mmHg로 허혈전의 120%였다. 대조군과 비교하여 amifostine으로 처치한 군에서는 모두 허혈전에 비해 재관류후의 좌심실 압력치가 모두 높았다. 허혈전과 재관류시 개체간의 유의성은 없으나 회복률은 P=0.005로 유의성이 있었다. 허혈전 좌심실 압력이 I군과 II군 사이에 P=0.031로 유의성이 있게 I군보다는 II군에서 낮았다(Table 4).

4) 압력 미분치와 회복률

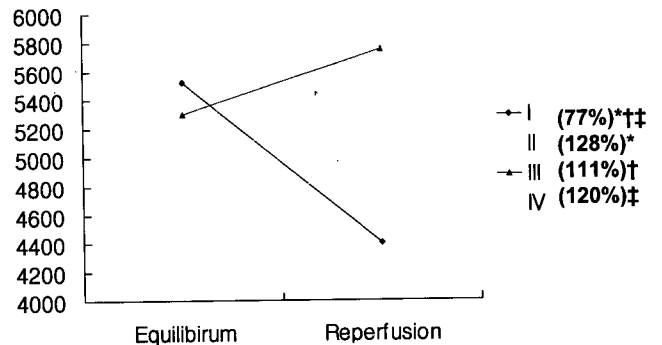
a) 총압 미분치와 회복률

허혈전 20분과 재관류후 20분에 관관류량 측정시 각군의 총압 미분치를 측정하였다. I군은 허혈전 5525 $\pm$ 2042 mmHg/sec였고, 재관류후 4400 $\pm$ 1318 mmHg/sec로 허혈전의 77%였다. II군은 허혈전 4150 $\pm$ 945 mmHg/sec였고, 재관류후 5200 $\pm$ 1109 mmHg/sec로 허혈전의 128%였다. III군은 허혈전 5300 $\pm$ 779mmHg/sec였고, 재관류후 5750 $\pm$ 541 mmHg/sec로 허혈전의 111%였다. IV군은 허혈전 4850 $\pm$ 1207 mmHg/sec였고, 재관류후 5600 $\pm$ 1330 mmHg/sec로 허혈전의 120%였다. 대조군과 비교하여 amifostine으로 전처치한 II, IV군에서는 모두 허혈전에 총압 미분치가 낮았으나 재관류후의 총압 미분치는 대조군에

**Table 5.** Recovery percentage of LV+max dp/dt, -dp/dt (mmHg/sec)

Group	+ max dp/dt			-dp/dt		
	Eq.	Re.	%	Eq.	Re.	%
I	3100 1287	2550 $\pm$ 1052	79* † ‡	2425 $\pm$ 800	1850 $\pm$ 380	73 § ¶ **
II	2300 $\pm$ 570	3000 $\pm$ 612	134*	1850 $\pm$ 379	2200 $\pm$ 779	121 §
III	2950 $\pm$ 542	3400 $\pm$ 487	121 †	2350 $\pm$ 379	2350 $\pm$ 274	102 ¶
IV	2850 $\pm$ 676	3200 $\pm$ 877	123 ‡	2000 $\pm$ 586	2200 $\pm$ 542	115**

\* p=0.009, †p=0.047, ‡p=0.009, §p=0.036, ¶kp=0.021, \*\*p=0.047



\* P=0.009, †P=0.009, ‡P=0.028

Statistical significances were tested by analysis of variance (Mann-Whitney test)

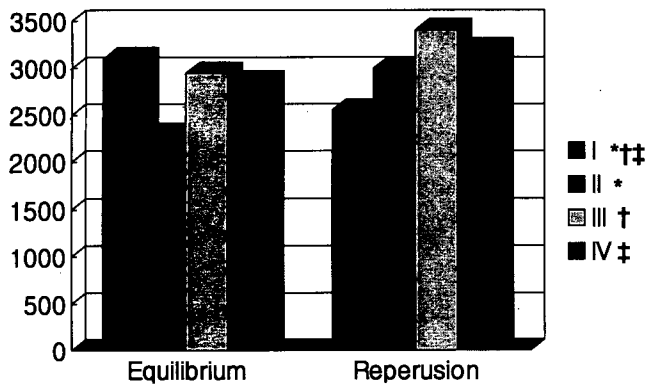
**Fig. 4.** Change of total dp/dt(mmHg/sec)

비해 amifostine으로 처치한 모든군에서 높게 나왔다. 회복률은 대조군과 비교하여 amifostine으로 전처치한 II, III, IV군에서 P=0.009, 0.009, 0.028로 유의있게 높았다(Fig. 4).

b) 최대 수축기압 미분치(+dp/dt)와 최대 이완기압 미분치(-dp/dt)의 회복률

I군의 +dp/dt는 허혈전 3100 $\pm$ 1287 mmHg/sec, 재관류후 2550 $\pm$ 1052 mmHg/sec로 허혈전의 79%였고, II군의 +dp/dt는 허혈전 2300 $\pm$ 570 mmHg/sec, 재관류후 3000 $\pm$ 612 mmHg/sec로 허혈전의 134%였고, III군의 Max +dp/dt는 허혈전 2950 $\pm$ 542 mmHg/sec, 재관류후 3400 $\pm$ 487 mmHg/sec로 허혈전의 121%였으며, 그리고 IV군의 Max +dp/dt는 허혈전 2850 $\pm$ 676 mmHg/sec, 재관류후 3200 $\pm$ 877 mmHg/sec로 허혈전의 123%였다.

I군의 -dp/dt는 허혈전 2450 $\pm$ 800 mmHg/sec, 재관류후 1850 $\pm$ 380mmHg/sec로 허혈전의 73%였으며, II군의-dp/dt는 허혈전 1850 $\pm$ 379mmHg/sec, 재관류후 2200 $\pm$ 779 mmHg/sec로 허혈전의 121%였고, III군의 -dp/dt는 허혈전 2350 $\pm$ 379



\* P=0.009, † P=0.009, ‡ P=0.028  
Statistical significances were tested by analysis of variance (Mann-Whitney test)  
Fig. 5. Recovery of LV+max. dp/dt(mmHg/sec)

Table 6. Change of lactate and CK-MB in myocardial tissue(mean ± SD)

Group	Lactate(mmol/gm)	Ck-MB(U/L)
I	0.20±0.29	120.0±97.80*
II	0.10±0.11	133.8±50.95
III	0.16±0.17	163.8±34.04
IV	0.20±0.12	242.2±79.15*

\* p=0.026

mmHg/sec, 재관류후 2350±274 mmHg/sec로 허혈전의 102%였으며, 그리고 IV군의 -dp/dt는 허혈전 2000±586 mmHg/sec, 재관류후 2200±542 mmHg/sec로 허혈전의 115%였다.

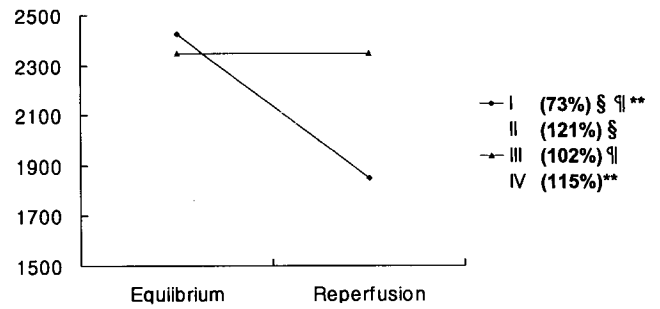
허혈전에는 최대 수축기압 미분치와 최대 이완기압 미분치 모두 대조군에 비해 amifostine 처치군이 낮았으나 재관류 후에는 현저하게 회복되었다.

최대 수축기압 미분치 회복률은 I군과 II군에서는 P=0.009, I군과 III군 사이에는 P=0.047, 그리고 I군과 IV군 사이는 P=0.009로 유의있게 대조군에 비해 amifostine으로 처치한 군에서 높았다(Fig. 5, Table 5).

최대 이완기압 미분치 회복률은 I군과 II군에서는 P=0.036, I군과 III군 사이에는 P=0.021, 그리고 I군과 IV군 사이는 P=0.047로 유의있게 대조군에 비해 amifostine으로 처치한 군에서 높았다 (Fig. 6, Table 5).

#### 5) 심근조직에서의 유산치

재관류후의 동결된 심근조직의 유산치는 I 군에서는 0.20 ± 0.29 mM/g 이었고, II 군에서는 0.10 ± 0.11 mM/g로 4군중에 가장 낮았다. III 군에서는 0.16 ± 0.17 mM/g로 대조군에 비해



\* P=0.009, † P=0.009, ‡ P=0.028  
Statistical significances were tested by analysis of variance (Mann-Whitney test)  
Fig. 6. Recovery of LV+max. dp/dt(mmHg/sec)

서 낮았으며, IV군에서는 0.20 ± 0.12 mM/g로 대조군과 비슷하게 나왔다. Amifostine으로 처치한 군에서 대조군에 비해 낮았으나 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 7, Table 6).

#### 6) 심근조직에서의 CK-MB치

재관류후의 동결된 심근조직의 CK-MB양은 I 군에서는 120 ± 97.8U/L이었고, II군에서는 133.8 ± 50.95U/L이었고, III군에서는 163.8 ± 34.04U/L이었고, IV군에서는 242.2 ± 79.15U/L로 4군중에 가장 높았다. I군과 IV군에서는 P=0.026으로 유의있게 대조군에 비해 IV군에서 높았다(Fig. 8, Table 6).

#### 7) 관류액내의 ADA효소치

20분 평행상태에서의 관류액과 20분의 허혈후 관류액내의 ADA의 효소치는 I 군에서 허혈전 0.64 ± 0.59U/L 재관류후 0.90 ± 0.60U/L로 허혈후나 재관류후 큰 차이로 증가 하였다. II군에서는 허혈전 1.18 ± 0.55U/L, 재관류후 0.70 ± 0.57U/L로 재관류후 오히려 59%정도로 감소되었으며, 대조군에 비해 허혈전에는 높았으나 재관류후 현저히 감소하였다. III군에서는 허혈 전 0.88 ± 0.71U/L, 재관류후 0.40 ± 0.35U/L로 재관류후 오히려 45%정도로 감소되었으며, 대조군에 비해 허혈전에는 높았으나 재관류후 현저히 감소하여 가장 낮았다. IV군에서는 허혈 전 1.06 ± 0.78U/L, 재관류후 1.56 ± 1.07 U/L로 허혈전이나 재관류 모두 현저히 높았다. 그러나 통계적인 유의성은 없었다(Table 7).

#### 8) 심근조직내의 ADA 효소치

동결된 심근조직내의 ADA의 효소치는 I 군에서 128.74 ± 18.23U/L였고, II군에서는 129.08 ± 14.96U/L, III 군에서는 129.94 ± 12.29 U/L, IV군에서는 117.82 ± 22.35 U/L로서 IV군이 네군중에 가장 낮았다. 그러나 통계적인 유의성은 없었다 (Table 8).

Table 7. Change of adenosine deaminase in coronary flow(mean±S.E., U/L)

Group	Equilibrium	Reperfusion	Ratio(%)
I	0.64±0.59	0.90±0.60	141
II	1.18±0.55	0.70±0.57	59
III	0.88±0.71	0.40±0.35	45
IV	1.06±0.78	1.56±1.07	147

Table 8. Change of adenosine deaminase in myocardial tissue(mean±Se.E., U/L)

Group	Myocardium
I	128.74±18.23
II	129.08±14.96
III	129.94±12.29
IV	117.82±22.35

## 고찰

심근 보호액은 현재 사용중인 용액의 조성은 다양하지만 그 기본적인 원리는 심장을 빠르게 정지시키고, 심허혈에 대항하기 위해 저온으로 인한 세포대사와 산소 소비를 방지하고 세포내 산성화를 억제하며, 세포 간질액을 감소시키고, 자유 유리기에 의한 손상을 감소시키며, 또한 세포에너지 대사에 필요한 기질을 제공하는 조성을 가져야 한다<sup>5)</sup>. 현재 임상에서 적용되고 있는 심근 보호법<sup>6)</sup>은 저온법을 기본으로 하여 각종의 기질과 약제가 함유된 심마비액을 관류시키는 방법이며 1, 2차 심마비액 및 가온 심마비액 등이 사용되고 있다.

적출 심장을 획득한후 보관하는 방법으로는 단순 침적법과 관류법등이 있다.

1969년 Collins등에 의해 세포내액 조성형의 장기보존액이 처음으로 소개된 이래 1987년 Wahlberg등<sup>7)</sup>에 의해 소개된 University of Wisconsin 용액의 시대까지 발전하였다. 이러한 발전에도 불구하고 심근 대사 부전이나 보관후의 세포부종, 재관류 손상 등으로 인하여, 장시간 보관후의 이식 생존율을 향상시키는데는 제한이 있는 것이 사실이다.

허혈과 재관류시 형성되는 자유 유리기는 세포와 기질들의 생체막에 있는 지질을 산화시키므로 심근의 치명적인 손상을 초래하며<sup>8)</sup> 이러한 심근 손상을 방지하기 위해 여러 가지 물질들의 투여가 시도되어 왔고<sup>1)</sup> 이물질들을 항산화제라 불러왔는데 그 정의와 분류에 차이가 있다<sup>8,9)</sup>.

Jurmann<sup>1)</sup>은 항산화제를 자유 유리기의 형성을 방지하는 allopurinol과 생성된 자유 유리기를 제거하는 비타민 C와 비

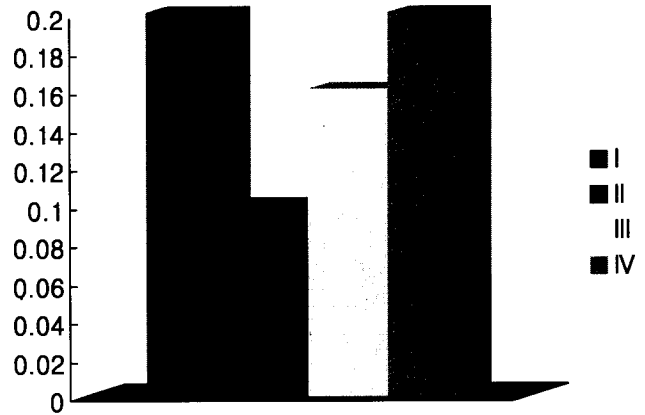


Fig. 7. Change of lactate in myocardial tissue(mean SD., (mmol/gm)

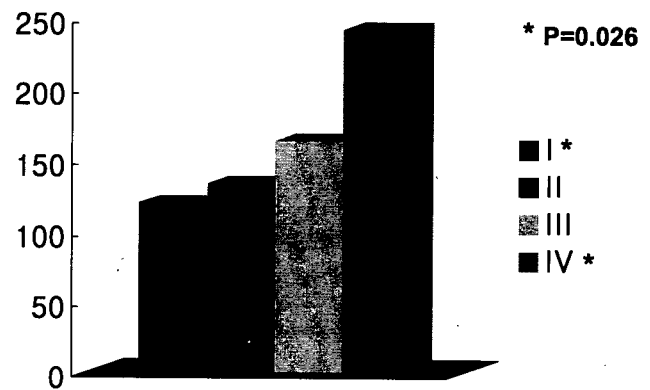


Fig. 8. Change of CK-MB in myocardial tissue(Mean SD, U/L)

Statistical significances were tested by anlysis of variance (Mann-Whitney test)

티민 E로 분류하였다. Ames<sup>10)</sup>는 항산화제를 인체내에서 생성 가능한 것과 경구투여 가능한 것으로 분류하였다. 인체내에서 생성되는 항산화제는 catalase, bilirubin과 urate등이 있으며 이들은 간단한 방법에 의해 조절될 수 없으나 외부에서 공급이 가능한 비타민 C, 비타민 E, beta-carotene등은 경구투여로 쉽게 증가가 가능하다. Sies<sup>11)</sup> 등은 산소 산화물들의 반감기에 따라 방어수단이 예방, 차단 그리고 개선으로 분류될 수 있다고 지적하였다. 반감기가 가장 짧은 OH-기는 예방이나 개선으로만 방어되는데 이는 catalase나 glutathione peroxidase등의 효소의 기전에 의해 자유 유리기 제거를 통해 개선이 있는 반면, 비타민 C나 비타민 E와 같은 기능을 차단하여 방어하는 물질들은 너무 높은 농도가 있어야 하기 때문에 삼투압으로 인해 생물학적으로 도저히 견딜수가 없게 된다. 광의의 항산화제라 함은 산화될수 있는 기질의 농

도보다 더 낮은 농도하에서 그 기질의 산화를 의미있게 지연시키거나 억제할수 있는 물질이어야만 된다<sup>12)</sup>.

본 연구에서 사용한 amifostine은 방사선 보호 화합물인 것으로 최근 연구에 의해서 이미 밝혀져 있다<sup>3,13)</sup>. Amifostine은 약리학적으로 세포 보호제이다. Organic thiophosphate로서 항암 약물인 cyclophosphamide와 같은 전형적인 alkylating 제제와 DNA 결합 항암제인 mitomycin 이나 platinum 제제들에 대해서도 정상 세포를 보호하는 작용이 있다. 이 보호작용은 세포내 alkaline phosphatase의 양에 의해 일차적으로 결정되는 것으로 설명하고 있다<sup>13,14)</sup>. 즉 정상세포에는 정상적인 양의 alkaline phosphatase 효소치를 함유하고 있으나 암세포에는 정상세포의 200분의 1로 효소의 양이 무시할 만큼 적게 존재하여 그 작용 또한 무시할 정도이기 때문이다<sup>14,15)</sup>. Amifostine은 체내에 투여 되었을 경우 WR 2721형으로는 기능을 하지 못하고 세포막에 결합되어 있는 효소(plasma membrane bound alkaline phosphatase)에 의해 탈인산화 되면서 흡수되어 활성형인 WR 1065가 되므로 비로서 작용을 나타내기 때문이며 이어서 산화되어 WR 32278 형으로 변화되어 대사가 이루어 진다<sup>13,14)</sup>.

Amifostine의 세포 보호작용으로는 산소자유기의 제거작용, 용해된 산소의 이용감소, H<sup>+</sup>이온의 제공, 활성화된 자유유리기들의 비활성화 작용, DNA 손상을 억제하며 회복을 촉진시키는 등의 작용에 의한다. 그러나 암조직 자체에 대한 항암 효과는 전무 하다고 밝혀져 있다<sup>3,15,16)</sup>. 이 중에서는 산소자유기의 제거작용이 가장 강력하므로 항암치료시의 항암제의 신독성, 간독성 및 골수 억제를 막아주며 방사선 항암치료시 정상적인 세포의 파괴를 막고 치료효과를 높이는 약제로 사용되고 있다<sup>3,16)</sup>.

심장의 허혈이나 재관류시 심근손상의 주된 기전은 자유유리기의 발생이며 이 자유유리기의 제거를 위해 현재까지 개발된 약제인 dismutase<sup>17)</sup>보다는 제한 있어 보다 더 강력한 산소유리기 제거 약제가 필요하다고 생각된다. Washburn등은<sup>18)</sup> amifostine의 조직내 농도를 조사해 본 결과 심근조직의 농도가 주위 관류액에 비하여 4배 까지 증가 되어 있다는 사실과, 방사선 조사를 한 mice실험에서 타 약제보다 사망률이 1.5~2배 감소되었다는 보고가 있었다<sup>19)</sup>. 이에 저자는 amifostine이 산소유리기를 제거 함으로써 허혈후의 심근에 도움이 될 것으로 확신하여 amifostine을 실험에 선정한 주동기가 되었다.

Amifostine 투여 경로로 II, IV 군은 Peter의<sup>13)</sup>실험 모형과 동일하게 200 mg/kg의 양을 실험전 30분과 2시간전에 각각 복강내로 투여 하였다. 물론 직접 정맥에 투여할 수는 있으나 복강 투여가 기술적으로 쉬우며 자극을 적게 주면서 흡수에 문제가 없는 것으로 추정된다.

심근 허혈을 방지하고 치료하는 원칙으로는 자유유리기의 생산을 방지하거나 이미 생성된 자유유리기를 제거하는 것으로 크게 대별할 수 있겠으며 amifostine의 작용은 재관류 심근의 산소자유기의 농도를 78% 정도로 낮추었다는 실험 결과로 보아<sup>4)</sup> 자유유리기를 제거할 수 있는 약제라 생각된다.

심기능을 평가하는 방법에는 혈액학적 측정치와 관관류량을 비롯한 심근내의 각종 효소량들을 정량분석하는 방법과 심근조직의 미세구조를 조사하는 방법들이 있다. 저자는 관관류량과 혈액학적 측정은 좌심실 이완기압을 10 mmHg에 고정하여 좌심실의 수축기 압력을 기록하고 differentiation을 통하여 총압 미분치를 먼저 측정하고 최대 수축기압 미분치와 최대 이완기압 미분치를 분리하여 비교 분석하였으며 분리된 쥐심장을 정압형의 Langendorff 장치를 채택하여 실험의 오차를 최소한으로 줄일려고 노력하였다.

심기능중 좌심실압과 대동맥압의 회복률은 실험에서 중요한 지표가 되는데, 여러 보고에 따르면 Yeh등<sup>20)</sup>은 71%, Kohno등<sup>1)</sup>은 88.5%이었으며, 이들은 94.6%의 회복율을 보고하였다. 관관류량의 회복률은 Konho등<sup>1)</sup>은 68.9%, 이들은 82.3%, Ledingham등은 87.5%의 성적을 보고 하였으며, 정등은 관동맥 확장제를 사용치 않았을 때는 90%와 사용하였을 경우 94%의 성적을 보고 하였다. 저자의 실험에서 관관류량과 좌심실압의 회복율은 100% 이상이였으며 그 효과면에서 획기적이라고 판단된다.

실험상 허혈성 수축 시간(ischemic contraction time, ICT)을 측정 비교 하려고 하였으나 심 마비액을 투여하므로 ICT가 연장 되어 그 의의가 상실된 결과로 각군간의 비교가 불가능 하게 되었다.

Amifostine의 부작용으로는 구토와 저혈압 및 저체온등이 있다<sup>3,4,13)</sup>. 저혈압은 일시적이고 수액이나 체위조절로서 호전될 수 있는 가역적인 현상이며 수축기와 확장기 모두 영향을 미친다. 약제를 투여후 대개 13분경부터 평균5분간 지속되다고 하였고 Capizzi<sup>3)</sup>의 보고에 의하면 약제를 투여한 1240명의 환자에서 단지 1.2%만이 저혈압이 조절되지 않아 약제 투여를 중단하였다고 한다 또한 구토는 57.6%에서 있었으나 1.5%의 환자만이 조절되지 않아 약제의 투여를 중단하였다. 쥐의 복강내 amifostine을 525mg/Kg 투여후 30분에 직장온도가 37℃에서 32℃로 투여 2.5시간후에는 27℃로 떨어졌으며 200 mg/Kg 투여후에도 3~4℃가 떨어지는 것을 확인할 수 있었다<sup>13)</sup>. 환자에 있어서는 저체온은 관찰되지 않았고 다만 쥐의 종에 대한 특이성으로 설명하고 있다. 저자의 실험에서도 저혈압과 저체온의 영향을 받았다고 판단하였다. 평형상태에서 대조군에 비해 amifostine을 투여한 군들에서 뚜렷한 저혈압을 관찰할 수 있었다. 또한 amifostine을



투여전 측정된 직장체온은 37.5~38.6°C 이었으나 약제 투여 후 30분에 측정된 직장온도가 34.3~35.5°C로 저명한 저체온이 있었다. 그 약리 기전에 대해서는 정확히 알 수 없으나 종의 특이성과 혈압의 저하, 혈관저항의 변화나 체온조절 중추의 작용등이 추측된다.

항산화제의 투여 방법과 시기에 따라 실험 성적에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 저자의 실험에서는 심적출 이전과 이후로 구분하여 투여하였고 심적출 이전에도 시간적 차이가 있었다.

CK-MB와 ADA는 세포내의 대사와 관계되는 구조적 효소로서 허혈과 재관류시 작용기전에 대해서 명확히 알려진 바가 없는 상태이나 양측 모두 대사적인 측면을 반영하는 것으로 amifostine의 투여로 인한 자유 유리기 제거 기능과는 상당한 거리가 있다고 생각된다. 심근의 CK-MB효소치는 심근세포내에 가장 많은 양이 있으며 심근 이외의 조직세포들에도 포함되어 있으며 세포외액과 혈관내에도 소량이 있으므로 이들 모두가 합친 정량이다. 본실험의 성적에서는 I<II<III<IV 군의 순서로 CK-MB효소치가 많았다. 관관류량의 성격과 같이 CK-MB 효소치도 IV군에서 보존이 잘 된 것으로 판단되었다.

심근내의 유산치는 혐기 해당과정의 최종 대사 산물로서의 의미가 있으며 세포막 투과성이 높은 유산이 축적되면 세포내의 ATP 생산이 억제되고 호기상태에서는 가역적으로 반응을 하게 된다.

그러므로 저자의 실험에 보완해야할 점은 항산화제 투여 전후의 자유기의 량을 직접 측정하는 것이 가장 좋은 지표가 될 것으로 생각되며 amifostine에 대한 다방면의 추가적인 연구가 필요하다는 사실을 알수 있었다.

## 결 론

흰쥐 20마리를 대조군(제 1군 : 5마리), 허혈 및 재관류군을 3군으로 나누어 amifostine(ethyol®) 200 mg/kg을 실험 30분전 복강내 투여한 실험 II군(제II군 : 5마리), 허혈직후 심정지액과 함께 amifostine 50 mg/kg을 직접 관상동맥으로 주입한 실험 III군(제III군 : 5마리), 실험 2시간전에 복강내에 amifostine 200 mg/kg을 투여한 실험 IV군(제 IV 군: 5마리)로 나누어 실험에 임하여 혈액학적인 좌심실압, 관관류량, 압력 미분치를 측정하였으며 관관류액내의 adenosine deminase치와 심근 조직내에서의 유산치와 CK-MB효소치, 및 ADA 효소치를 정량검사 등을 통하여본 바 이상의 결과로 Aminofostine의 심근보호효과는 자명하다는 사실이 확인되었으나 다만, 약제에 의한 저체온과 저혈압 현상등의 문제점으로 임상적용에는 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

1. Jurmann MJ, Schaefer HJ, Dammerhayn L, Haverich A. Oxygen-derived free radical scavengers for amelioration of reperfusion damage in heart transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988;95:368-77.
2. Schuchter LM, Luginbuhl WE, Meropol NJ. The current status of toxicity protectants in cancer therapy. *Semin Oncol* 1992;19:742-51.
3. Capizzi RL, Oster W. Protection of Normal Tissue from the Cytotoxic Effects of Chemotherapy and Radiation by Amifostine : Clinical Experiences. *Eur J Cancer* 1985;31A, S8-S13.
4. Pissarek M, Janichen F, Blasig IE. Cardioprotective potency of the radical scavenger S-2-(3 aminopropylamino) ethylphosphorothioic acid in the post-ischaemic rat heart. *Mol Cell Biochem* 1995;145:121-9.
5. Hearse DJ, Stewart DA, Braimbrige MV. Cellular protection during myocardial ischemia. The development and characterization of a procedure for the induction of reversible ischemic arrest. *Circulation* 1976;54:193-202.
6. Kohno H, Shiki K, Ueno Y, Tokunaga K. Cold storage of the rat heart for transplantation, two types of solution required for optimal preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987;93:86-94.
7. Wahlberg JA, Love RA, Landegard L, Southard JH, Belzer FO. Successful 72-hours preservation of canine pancreas. *Transplantation* 1987;93:43:5-8.
8. Sisto T, Paajanen H, Metsa-Ketela T, Harmoinen A, Nordback I, Tarkka M. Pretreatment with antioxidant and allopurinol diminishes cardiac onset events in coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1995;59:1519-23.
9. Cavarocchi NC, England MD, O'Brien JF, et al. Super-oxide generation during cardiopulmonary bypass : is there a role for vitamin E ? *J Surg Res* 1986;40:519-27.
10. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 1983; 221:1256-64.
11. Sies H, Stahl W, Sundquist AR. Antioxidant function of vitamins. vitamin E and C, Beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 1992;669:7-20.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd ed. Oxford, Clarendon press 1989.
13. Peter GJ, Vijgh WJF. Protection of normal tissues from the cytotoxic effects of chemotherapy and radiation by Amifostine(WR-2721):Preclinical aspects. *Eur J Cancer* 1995;31A:S1-S7.
14. Capizzi RL, Scheffler BJ, Schein PS. Amifostine -mediated protection of normal bone marrow from cytotoxic chemotherapy. *Cancer*. Suppl 1993;72-11:3495- 3501.
15. McColloch W, Scheffler BJ, Schein PS. New protective agents for bone marrow in cancer therapy. *Cancer Invest* 1991;9:279-287.
16. Yuhans JM. Active versus passive absorption kinetics as the basis for selective protection of normal tissue by

- S-2(3-amino) ethylphosphorothioic acid. Cancer Res 1980; 40:1519-24.
17. Nejima J, Knight DR, Fallon JT, et al. Superoxide dismutase reduces reperfusion arrhythmias but fails to salvage regional function or myocardium at risk in conscious dogs. Circulation 1989;79:143-53.
18. Washburn LC, Rafter JJ, Mayes RL. Prediction of the effective radioprotective dose of WR-2721 in human through an interspecies distribution study. Radiat Res 1976;66:100-5.
19. Maisin JR, Albert C, Henry A. Reduction of short-term radiation lethality by biological response modifiers given alone or in association with other chemical protectors. Radiat Res 1993;133:332-7.
20. Yeh T Jr, Hanan SA, Johnson DE, et al. Superior myocardial preservation with modified UW solution after prolonged ischemia in the rat heart. Ann Thorac Surg 1990;49:932-9.

=국문초록=

**배경:** Amifostine(ethiol<sup>®</sup>)은 유리 산소기를 제거할 수 있는 항산화제로서의 효과가 확인되었기에 심근 보호 효과도 있을 것으로 사료되어 다음의 연구를 하였다. **실험 방법:** 흰쥐 20마리를 사용하여 평형상태, 허혈 및 재관류를 각각 20분씩 가지며 대조군(제 I군 : 5마리), amifostine(ethiol<sup>®</sup>) 200mg/kg을 실험 30분전 복강내 투여한 실험 II군(제II군 : 5마리), 허혈직후 심정지액과 함께 amifostine 50mg/kg을 직접 관상동맥으로 주입한 실험 III군(제III군 : 5마리), 실험 2시간 전에 복강 내에 amifostine 200mg/kg을 투여한 실험 IV군(제 IV 군: 5마리)으로 나누어 실험에 임하여 평형상태 20분과 재관류 20분경에 각각 혈액학적인 좌심실압, 관관류량, 압력 미분치를 측정하였으며 관관류액내의 adenosine deaminase(ADA)치와 심근 조직내에서의 유산치와 CK-MB효소치, 및 ADA 효소치를 정량검사 하였다. **결과:** 실험전 amifostine을 투여치 않은 I,III군의 평형 상태의 관관류량이 약제를 투여한 II,IV군에 비해 많았으나 재관류상태의 관관류량 회복율은 amifostine을 투여한 II,III,IV군에서 저명한 증가가 있었고 특히 III군은 P=0.047로 유의있게 많았다. 평형 상태의 좌심실압은 대조군에 비해 II,IV군에서 amifostine으로 인한 저혈압 현상이 나타났으며 재관류후에는 대조군은 감소했으나 amifostine을 투여한 II,III,IV군들은 오히려 평형 상태보다 증가하였다. 좌심실 압력 미분치의 변화는 좌심실압 변화와 동일한 추세를 나타내었다. 심근 조직에서의 유산치는 대조군에서는  $0.20 \pm 0.29$  mM/g, II군에서는  $0.10 \pm 0.11$  mM/g로 가장 낮았다. III 군에서는  $0.16 \pm 0.17$  mM/g, IV군에서는  $0.20 \pm 0.12$  mM/g로 대조군과 비슷하였다. 심근 조직의 CK-MB치는 I군에서는  $120.0 \pm 97.8$  U/L이었고, IV군에서는  $242.2 \pm 79.15$  U/L로 4군중 가장 높았다. I군과 IV군에서는 P=0.026으로 유의성있게 IV군에서 높았다. 심근조직내나 관류액의 ADA 효소 활성화도에는 각군과의 차이가 없었다. **결론:** 이상의 결과로 Amifostine의 심근 보호 효과는 대조군에 비해 우수한 성적이라고 할 수 있었으나 다만 약제에 의한 저체온과 저혈압 현상 등의 문제점으로 임상 적용에는 추가적인 연구가 있어야 할 것으로 사료된다.

- 중심단어: 1. 예후인자  
2. Amifostine  
3. 재관류 손상  
4. 심근보호