

TARTU ÜLIKOOL  
Arstiteaduskond  
Biokeemia instituut

**Külli Teder**

**Angiotensiini konverteeriva ensüümi inhibeerivate  
raviainete antioksidantsuse-põhine võrdlus**

Magistriväitekiri biomeditsiini erialal

Juhendajad:

*Ph.D.* Mihkel Zilmer

*Ph.D.* Peep Veski

Tartu 2006

## SISUKORD

<b>SISUKORD</b> .....	<b>2</b>
<b>PUBLIKATSIOONIDE LOETELU</b> .....	<b>4</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>5</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>7</b>
<b>KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	<b>9</b>
Reaktiivsed osakesed .....	9
Oksüdatiivne stress .....	10
Antioksidantsus ja antioksidandid.....	11
AKE inhibiitorid .....	13
<b>TÖÖ EESMÄRGID</b> .....	<b>16</b>
<b>MATERJALID JA MEETODID</b> .....	<b>17</b>
Uurimismaterjal .....	17
Kaptopriil .....	17
Ramipriil.....	18
Fosinopriil .....	19
Meetodid .....	21
Totaalne antioksidantne mahtuvus (TAS).....	21
Hüdroksüülradikaalide eliminatsiooni mõõtmine .....	21
LDL oksüresistentsuse (lagfaasi) mõõtmine .....	22
Erütrotsüütide deformeeritavuse hindamine kromatograafilise migratsiooni kaudu ..	24
Andmete statistiline analüüs.....	25
<b>TULEMUSED JA ARUTELU</b> .....	<b>26</b>
Kaptopriil .....	26
TAS ja hüdroksüülradikaali elimineerimisvõime .....	26
Toime LDL oksüresistentsusele .....	26
Toime erütrotsüütide deformatsioonile .....	26
Ramipriilaat.....	27
TAS ja hüdroksüülradikaali elimineerimisvõime .....	27
Toime LDL oksüresistentsusele .....	28
Toime erütrotsüütide deformatsioonile .....	28
Fosinopriilaat.....	29
TAS ja hüdroksüülradikaali elimineerimisvõime .....	29
Toime LDL oksüresistentsusele .....	29
Toime erütrotsüütide deformatsioonile .....	29
Tulemuste analüüs.....	30
<b>JÄRELDUSED</b> .....	<b>35</b>

<b>KOKKUVÕTE.....</b>	<b>36</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>	<b>38</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>42</b>
<b>TÄNUAVALDUSED .....</b>	<b>44</b>
<b>PUBLIKATSIOONID .....</b>	<b>45</b>

## **PUBLIKATSIOONIDE LOETELU**

- I. Teder K, Zilmer K, Kals J, Zilmer M. ACE inhibiitorite toime erütrotsüütide rauast tingitud deformatsiooni muutustele. Eesti Arst, 2004, 83 (8): 515-519.
  
- II. Teder K, Zilmer M, Kals J, Bender L, Kullisaar T, Hein H, Pöder P, Pulges A, Zilmer K. Captopril expresses antioxidativity at therapeutic concentrations on different models (manuscript).

## KASUTATUD LÜHENDID

- ABTS – 2,2'-azino-di-[3-etiülbensotiasoliin-sulfonaat]  
AKE – angiotensiini konverteeriv ensüüm  
CAT – katalaas  
CD – dieenkonjugaadid  
EDTA – etüleendiamiintetraatsetaat  
EKM – erütrotsüütide kromatograafiline migratsioon  
FAD – flaviinadeniindinukleotiid  
GSH – glutatioon (redutseeritud vorm)  
GSHPx – glutatiooni peroksüdaas  
GSSG – glutatiooni disulfiid (oksüdeeritud vorm)  
GSSGRed – glutatiooni reduktaas  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – vesinikperoksiid  
HDL – kõrge tihedusega lipoproteiin  
HNO<sub>2</sub> – lämmastikushape  
HOCl – hüpokloorishape  
LDL – madala tihedusega lipoproteiin  
L• – rasvhappe vaba radikaal  
LOO• – rasvhappe (lipiidi) peroksüülradikaal  
LOOH – rasvhappe hüdroperoksiid  
LP – lipiidide peroksüdatsioon  
N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> – dilämmastiktetraoksiid  
NADP – nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat  
NADPH – nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaadi redutseeritud vorm  
NO• – lämmastikoksiidi radikaal  
NO<sub>2</sub>• – lämmastikdioksiidi radikaal  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – ergastatud hapnik  
O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> – superoksiidi radikaal  
O<sub>3</sub> – osoon  
OH• – hüdroksüülradikaal  
ONOO<sup>-</sup> – peroksünitrit  
oxLDL – oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiin  
OxS – oksüdatiivne stress

PBS – fosfaatpuhver  
PUFA – polüküllastamata rasvhape  
RNS – reaktiivsed lämmastiku osakesed  
ROS – reaktiivsed hapniku osakesed  
SOD – superoksiidi dismutaas  
TAS – totaalne antioksidantne mahtuvus  
THA – tereftaalhape  
VLDL – väga madala tihedusega lipoproteiin  
VR – vaba radikaal

## SISSEJUHATUS

Oksüdatiivne stress (OxS) avaldub biomolekulide normaalsest erineva oksüdatsiooni poolt rakkudele tekitatud kahjustusena, mis on põhjustatud reaktiivsete hapniku osakeste (*reactive oxygen species*, ROS) hulga suurenemisest ning antioksidantse potentsiaali vähenemisest (Zalba *et al.* 2001). Ehk teisisõnu on oksüdatiivne stress pro-oksüdantide ja antioksidantide omavahelise tasakaalu häire pro-oksüdantide kasuks, mis võib viia potentsiaalse biokahjustuseni (Khanna 2000).

Elusorganismis on hapniku vabad radikaalid jt. reaktiivsed osakesed piiratud koguses vajalikud fagotsütoosis, prostaglandiinide ja leukotrieenide biosünteesis, biomembraanide fosfolipiidide uuenemises, signaali ülekande vahendamises, ksenobiootikumide kahjutustamises. Vabade radikaalide jt. reaktiivsete osakeste hulga reguleerimiseks funktsioneerib organismis antioksidantne kaitsesüsteem (võrgustik). Antioksidandid on ained ja ensüümid, mis juba väga väikeses kontsentratsioonis on suutelised vältima, takistama või likvideerima vabade radikaalide jt. reaktiivsete osakeste ülehulka ja seega ka kahjulikku toimet (Zilmer *et al.* 1999).

Nüüdisajal on selge, et sügav kestev OxS (*high grade OxS*) omab olulist rolli südame-veresoonkonna haiguste, sh. hüpertensiooni, patogeneesis (Aruoma 1996; Benzie & Tomlinson 1998; Cai & Harrison 2000; Griendling & FitzGerald 2003). Sellest lähtudes oleks vajalik selgitada, kuidas võiksid käituda OxS aspekte silmas pidades vererõhu langetamiseks sageli kasutatavad angiotensiini konverteeriva ensüümi (AKE) inhibiitorid – kaptopriil, fosinopriil, ramipriil, enalapriil, lisinopriil jt.

Uuringud näitavad, et AKE inhibiitorid omavad mitmeid kasulikke toimeid (kardioprotektiivne ja antiaterogeenne mõju, teist tüüpi diabeedi patogeneesi pärssimine jne.) isegi siis, kui neid kasutada patsientidel, kel pole kõrget vererõhku või vasaku vatsakese düsfunktsiooni, ning seda läbi siiani täpselt teadmata mehhanismide (O'Keefe *et al.* 2001). Seetõttu on oluline uurida, milliste mehhanismide kaudu võiksid need raviained toimida.

AKE inhibiitoreid kasutatakse kõrgvererõhutõve ja südamepuudulikkuse ravis, mis on pikaajaline, tihti elukestev. Seepärast on oluline, et kasutatavad ravimid ei põhjustaks kahjulikku OxS. Positiivseks lisatoimeks ja eeliseks teiste ravimite ees oleks AKE inhibiitorite võime vähendada oksüdatiivset stressi. Sellest tulenevalt on käesoleva töö üheks eesmärgiks mõõta erinevate AKE inhibiitorite võimet püüda potentsiaalselt

kõige tugevamat ja kahjulikumat vaba radikaali (hüdrosüülradikaali) ning iseloomustada nende totaalset antioksüdantset võimsust ning neid omavahel võrrelda.

Ateroskleroosi tekkepõhjusteks loetakse madala tihedusega lipoproteiinide (LDL) retseptorite funktsionaalseid häireid, endoteelkahjustusi, modifitseeritud (oksideeritud) LDL (oxLDL) kontrollimatut teket ja kuhjumist õgirakkudesse (Zilmer *et al.* 1999). LDL oksüdatiivses modifikatsioonis peetakse oluliseks vabade radikaalide osavõtul toimuvat protsessi, mida tuntakse lipiidide peroksüdatsioonina. Sellega kaasneb aterosklerootilise kahjustuse kujunemise initsieerumine. Siit tulenevalt on käesoleva töö teiseks eesmärgiks võrrelda erinevate AKE inhibiitorite kaitsvat toimet LDL oksüdatsiooni vastu.

Kuna AKE inhibiitorite ja mikrotsirkulatsiooni seosed on vererõhu seisukohalt võetuna väga olulised (Haak *et al.* 1998), siis peaks teadma hüpertoonia-ravimite mõju erütrotsüütide ja teiste vererakkude reoloogilistele parameetritele. Selle iseloomustamiseks sobib erütrotsüütide deformeeritavuse uurimine. Deformeeritus tegelikult otsustabki nende võime läbida väga väikese läbimõõduga kapillaare piisava kiirusega. On teada, et raud võib kestva OxS tingimustes oma sidujatest, ka hemoglobiinist ja ferritiinist, vabaneda. Vabad rauaioonid (ülitugevad pro-oksüdandid) põhjustavad erütrotsüütide membraanilipiidide peroksüdatsiooni ning kahjustavad erütrotsüütide membraani, mistõttu häirub erütrotsüütide elastsus ja deformeeritavus ning sellised erütrotsüüdid ei läbi hästi kapillaare ning võivad ka verevoolu surves puruneda (Fernandes *et al.* 1996; Aberkane *et al.* 2002; Comporti *et al.* 2002). Sellest tulenevalt on käesoleva töö kolmandaks eesmärgiks võrrelda erinevate AKE inhibiitorite toimet raudinitsieeritud erütrotsüütide deformatsioonile.



# KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## Reaktiivsed osakesed

Vaba radikaal (VR) on keemiline osake (või fragment), millel on vähemalt üks paardumata elektron (st. on aatomi valentskihil üksinda) ja mis on võimeline mõnda aega iseseisvalt eksisteerima (sekundi murdosast mõne sekundini). Bioloogilistes süsteemides on tuntumad: hüdroksüül- ( $\text{OH}^\bullet$ ), superoksiid- ( $\text{O}_2^\bullet$ ), lämmastikoksiid- ( $\text{NO}^\bullet$ ), lämmastikdioksiidradikaal ( $\text{NO}_2^\bullet$ ). Kõik vabad radikaalid on ülireaktiivsed ning neile on tüüpiline ahelreaktsioon: üks VR tekitab teisi, mis omakorda lülituvad edasistesse reaktsioonidesse. Mingi faktori poolt tekitatud VR ründab molekule, võttes sellelt vesinikuaatomi. Atakeeritud molekulid muutuvad VR-ks, mis ründavad omakorda teisi molekule/ühendeid. Protsessi "algatanud" VR muutub pärast reageerimist vesinikuaatomiga (paardumata elektroni tõttu vaadeldav reaktiivse osakesena) stabiilseks mitteradikaalseks produktiks. Inimorganismis tekib pidevalt VR. Teatud täpselt limiteeritud hulgas on nad vajalikud füsioloogilistes funktsioonides – signaal-, regulaator- ja kaitsesüsteemides. Liiga suures hulgas või sobimatus keskkonnas võivad nad muutuda toksiliseks – kahjustada võivad DNA, lipiidid, valgud, süsivesikud. Reaktiivsete osakeste liigset teket soodustab muutuva oksüdatsiooniastmega metalli-ioonide (raud, vask) juuresolek (Zilmer & Zilmer 1994; Aruoma 1996; Halliwell & Gutteridge 1999; Cai & Harrison 2000; Khanna 2000).

Reaktiivne osake on laiem mõiste, ta hõlmab nii VR kui ka reaktiivseid mitteradikaalilisi osakesi. Eristatakse reaktiivseid hapniku osakesi (*reactive oxygen species*, ROS) ja reaktiivseid lämmastiku osakesi (*reactive nitrogen species*, RNS) (Halliwell & Gutteridge 1999).

ROS alla kuuluvad

- hapnikku sisaldavad vabad radikaalid –  $\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$  jt.
- hapnikku sisaldavad mitteradikaalilised osakesed<sup>1</sup> – vesinikperoksiid  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; hüpokloorishape  $\text{HOCl}$ ; osoon  $\text{O}_3$ ; ergastatud hapnik  $^1\text{O}_2$ ; aldehüüdid jne.

---

<sup>1</sup> need on oksüdeerivad agendid ja/ või konverteeruvad kergesti vabaks radikaaliks

RNS alla kuuluvad

- lämmastikku sisaldavad vabad radikaalid – NO<sup>•</sup>, NO<sub>2</sub><sup>•</sup>.
- lämmastikku sisaldavad mitteradikaalilised osakesed – lämmastikushape HNO<sub>2</sub>, dilämmastiktetraoksiid N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, peroksünitrit ONOO<sup>-</sup> jt.

ROS teke on erinev – O<sub>2</sub><sup>•-</sup> ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> teke võib olla reguleeritud nii ensümaatiliste kui ka mitteensümaatiliste mehhanismide kaudu, kuid kõige reaktiivsema hapniku osakese, OH<sup>•</sup>, formeerumiseks ei vajata ensüüme. Ta võib moodustuda muutuva oksüdatsiooniasemega metalli poolt (just raua) katalüüsitud Fentoni<sup>2</sup> või Haber-Weiss'i<sup>3</sup> reaktsiooni käigus ning tema teke omab võtmerolli koekahjustuse kujunemises (Zilmer & Zilmer 1994; Aruoma 1996; Khanna 2000). Seetõttu oleks kasulik, kui haiguste ravimisel kasutatav raviaine suudaks ülemäärast OH<sup>•</sup> hulka vähendada.

Oksüdatiivsete stressorite (pro-oksüdantide) mõiste on lai, haarates endas ROS, RNS, metallioone, ravimeid, füüsikalisi faktoreid. Oksüdatiivne stressor (pro-oksüdant) on osake/ faktor, mis olles vaba radikaal või tekitades vabu radikaale, soodustab vabaradikaaliliste protsesside teket ja kulgu.

### Oksüdatiivne stress

Oksüdatiivne stress (OxS) kujuneb juhul, kui organismis ületab oksüdatiivsete stressorite (pro-oksüdantide) produktsioon antioksüdantse kaitsevõime, see viib aga potentsiaalsete kahjustuste tekkele. Mida kestvam ja sügavam on OxS, seda suuremad kahjustused avalduvad biomolekulide struktuurides ning seda sügavamalt häirub nende talitus (Halliwell & Gutteridge 1999; Zilmer *et al.* 1999; Cai & Harrison 2000). OxS määramiseks biosüsteemides tuleb mõõta mitmeid markereid, mille hulk OxS tõttu muutub, kas suureneb või väheneb (Khanna 2000). Tundlikud on näiteks LDL partiklite lipiidid, sest hapniku lahustuvus lipiidses keskkonnas on oluliselt suurem kui vesikeskkonnas. Protsessi nimetatakse sel puhul lipiidide peroksüdatsiooniks (LP).

LP on vabaradikaaliline protsess, mille põhisubstraatideks on membraansete fosfolipiidide ja vere lipoproteiinide polüküllastamata rasvhapped (*polyunsaturated fatty acids*, PUFA). Need on molekulis esinevate kaksiksidemete tõttu eriti tundlikud vesinikuaatomi loovutamisele. LP primaarsed produktid on konjugeerunud süsteemid (diienkonjugaadid; viimaste määramine on üks parimaid OxS hindamise meetodeid).

---

<sup>2</sup> Fentoni reaktsioon:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^{-}$

<sup>3</sup> Haber-Weiss'i reaktsioon:  $H_2O_2 + O_2^{\bullet-} + Fe^{2+} \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^{-} + Fe^{3+}$

Nendeks on rasvhappe vaba radikaal ( $L^{\bullet}$ ), rasvhappe peroksüülradikaal ( $LOO^{\bullet}$ ), rasvhappe hüdroperoksiid ( $LOOH$ ). Viimane ei ole küll VR, kuid võib rakkudesse kuhjumisel muuta membraanstruktuuri ja seeläbi pärssida rakufunktsioone. Normaalne LP on vajalik biomembraanide komponentide uuendamiseks, prostaglandiinide ja progesterooni sünteesiks, fagotsütoosiks jne. Organismi regulatsioonivõimet ületav LP on üks olulisemaid faktoreid patoloogiliste protsesside (ateroskleroos, isheemilised kahjustused, reumatoidartriit, vähktõbi, neurodegeneratiivsed haigused jt.) kujunemises, teatud LP produktid on osutunud mutageenseteks, tsütotoksilisteks, samuti võivad mõjutada geeniekspressiooni (Zilmer & Zilmer 1994; Aruoma 1996; Halliwell & Gutteridge 1999; Khanna 2000). Nagu eespool mainitud, on LP rünnakuobjektiks ka vere lipoproteiinides leiduvad PUFA-d, mistõttu suureneb LDL oksüdeeritus. Just liigselt oksüdeeritud LDL (oxLDL) hulk on ateroskleroosi tekkes väga olulisel kohal (Halliwell & Gutteridge 1999; Zilmer *et al.* 1999; Münzel & Keaney 2001; Zhou *et al.* 2005; Birukov 2006). Seega oleks väga vajalik uurida raviainete kaitsvat toimet LDL oksüdatsiooni vastu.

Oksüdatiivsete kahjustuste suhtes on väga tundlikud ka punaliblel oma membraanide suure PUFA-sisalduse tõttu. Võimsaks potentsiaalseks oksüdatiivsete protsesside promootoriks on ka nende kõrge rakusisene hapniku ja hemoglobiini kontsentratsioon. Kestva OxS tingimustes võib oma sidujatest (ka hemoglobiinist ja ferritiinist) vabaneda raud – võimsaim pro-oksüdant inimkehas. Vabad rauaioonid põhjustavad erütrotsüütide membraanilipiidide peroksüdatsiooni ning kahjustavad seeläbi nende membraani. Selle tulemusena häirub punaliblele elastsus ja deformeeritavus (mis tegelikult otsustabki nende võime läbida väga väikese läbimõõduga kapillaare, järelikult ka füsioloogilise rolli täitmise võimalikkuse), samuti võib tekkida hemolüüs (Halliwell & Gutteridge 1999; Aberkane *et al.* 2002; Comporti *et al.* 2002). Kuna erütrotsüütide elastsus on oluline ka vererõhu seisukohalt, peaks uurima hüpertensiooni korral kasutatavate raviainete toimet erütrotsüütide parameetritele.

### **Antioksüdantsus ja antioksüdandid**

Nagu eelpool mainitud, esineb organismis antioksüdantne kaitsesüsteem. Antioksüdandid on ühendid ja ensüümid, mis juba väga väikeses kontsentratsioonis on suutelised vältima, takistama või likvideerima vabade radikaalide jt. reaktiivsete osakeste kahjulikke toimeid.

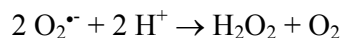
Inimorganismis eristatakse (Halliwell & Gutteridge 1999; Zilmer *et al.* 1999):

- preventatiivseid antioksidante – takistavad uute VR teket, konverteerides juba tekkinud VR vähemkahjulikeks osakesteks või takistades molekulide konversiooni VR-ks
  - tekkinud ROS kõrvaldajad – superoksiidi dismutaas (SOD), katalaas (CAT), glutatiooni peroksüdaas (GSHPx)
  - vabade radikaalide ärakoristajad – E-vitamiin, C-vitamiin, glutatioon (GSH), ubikinoon, karotenoidid
  - rauaioone siduvad agendid (takistavad Fe<sup>2+</sup> kasutamist OH• tekkeks) – apotransferriin, tseruloplasmiin
- ahelreaktsiooni blokeerivaid antioksidante – püüavad VR ja selle kaudu blokeerivad juba kulgeva ahelreaktsiooni – E-vitamiin, C-vitamiin, vere albumiin, kusihape, bilirubiin
- reparatsiooni ensüüme – kõrvaldavad VR jt. reaktiivsete osakeste põhjustatud kahjustused biomolekulides – DNA reparatsiooni ensüümid, metioniini sulfoksiidreduktaas

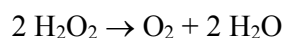
Antioksidantide lokalisatsioon organismis on erinev. Vereplasmas asuvad veeslahustuvad (askorbiinhape, kusihape, albumiin, tseruloplasmiin, apotransferriin, laktoferriin) ja lipiidlahustuvad antioksidandid (E-vitamiin, A-vitamiin, ubikinoon, karotenoidid), mis kaitsevad veres tsirkuleerivaid lipiide, valke, rakke (ka veresoonte endoteelirakke) oksüdatiivse kahjustuse eest. Rakkudes leidub veeslahustuvaid (põhiliselt GSH, aga ka C-vitamiin) ja ensümaatilisi antioksidante (SOD, CAT, GSHPx). Biomembraanides on E-vitamiin, karotenoidid, ubikinoon (Zilmer *et al.* 1999).

Siinkohal on toodud tähtsamate antioksidantide toimemehhanism (Zilmer & Zilmer 1994; Aruoma 1996; Halliwell & Gutteridge 1999):

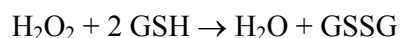
- SOD – esineb mitokondrites (Mn-SOD), tsütoplasmas (Cu,Zn-SOD); muudab superoksiidradikaali vesinikperoksiidiks:



- CAT – esineb maksarakkude ja erütrotsüütide peroksüsoomides, tsütoplasmas; katalüüsib H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lõhustumist veeks ja hapnikuks:



- GSHPx – esineb tsütoplasmas, mitokondrites, rakuvälises maatriksis; on seleen-sõltuv (Se-GSHPx); eemaldab vesinikperoksiidi, rasvhapete peroksiidid oksüdeerides redutseeritud glutatiooni (GSH) oksüdeeritud glutatiooniks (GSSG):



Tekkinud LOH metaboliseerub rakkudes edasi.

- glutatiooni reduktaas (GSSGRed) – sisaldab FAD; muudab oksüdeeritud glutatiooni uuesti redutseeritud glutatiooniks



- E-vitamiin ( $\alpha$ -tokoferool) – lokaliseerub biomembraanides, LDL-s; peamine radikaaliliste ahelprotsesside blokeerija lipiidises keskkonnas; kõrvaldab  $\text{LOO}^{\bullet}$  ja blokeerib sellega LP.  $\alpha$ -tokoferoksuülradikaal redutseeritakse tagasi  $\alpha$ -tokoferooliks GSH, askorbiinhappe ja ubikinooni poolt
- askorbiinhape – esineb hüpofüüsis, neerupealistes, pankreases, maksas, põrnas; kõrvaldab vesikeskkonnas  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ja  $\text{OH}^{\bullet}$ , LOOH; taastab E-vitamiini lähevormi. Oksüdeeritakse dehüdroaskorbaadiks, mis redutseeritakse tagasi askorbaadiks dehüdroaskorbaadi reduktaasi poolt, kasutades selleks GSH
- transferrin, ferritiin, tseruloplasmiin – seovad metallioone (raua- ja vaseioone); takistavad LP.

### **AKE inhibiitorid**

Angiotensiini konverteeriv ensüüm (AKE) on dipeptidüül-karboksüül-metallopeptidaas, mille aktiivtsenter sisaldab tsiingi aatomit. Ensüüm esineb membraan-seotud vormis endoteelirakkude pinnal või lahustunud vormis veres ja teistes kehavedelikes. AKE reguleerib tasakaalu reniin-angiotensiin- ning kallikreiin-kiniin-süsteemi vahel. Tema ülesandeks on lõhustada angiotensiin I vasokonstriktor angiotensiin II-ks ja lammutada vasodilataator bradükiniin inaktiivseteks peptiidideks. AKE inhibiitorid muudavad seda tasakaalu, vähendades angiotensiin II moodustumist ja bradükiniini lammutamist (Brown & Vaughan 1998; Rang *et al.* 2003). Lisaks eelnevale seostatakse AKE toimet ka vaskulaarse oksüdatiivse stressiga. Nimelt sisaldavad kõik peamised veresoonte seinarakutüübid (endoteel, silelihas, fibroblastid) ensüümsüsteeme (nt. NADPH-oksüdaas), mis kasutavad  $\text{O}_2^{\bullet-}$  produktsiooniks substraadina NADPH. Angiotensiin II aktiveerib

need ensüümsüsteemid, st. reniin-angiotensiin-süsteemi aktiveerimisel võib oodata  $O_2^{\bullet}$  produktsiooni suurenemist (tõestatud eksperimentaalsete ja kliiniliste katsetega). AKE inhibiitorid võivad segada vaskulaarse NADPH-oksüdaasi stimuleerimist angiotensiin II poolt ja takistavad seeläbi reniin-angiotensiin-süsteemi aktivatsiooniga seotud superoksiidi tekke suurenemise (Münzel & Keaney 2001). AKE inhibiitorid saab tsingi ligan-diks oleva funktsionaalrühma alusel jagada kolme suurde gruppi (Brown & Vaughan 1998):

- sulfhüdrüülrühma sisaldavad AKE inhibiitorid (kaptopriil, zofenopriil)
- teist (lisa-)karboksüülrühma sisaldavad AKE inhibiitorid (enalapriil, lisinopriil, benasepriil, ramipriil)
- fosfinüülrühma sisaldavad AKE inhibiitorid (fosinopriil).

Enamus AKE inhibiitoritest on profarmakonid, mis jäävad inaktiivseks kuni esterifitseerimiseni maksas ja seda seepärast, et profarmakonid tõstavad suukaudset biosaadavust võrreldes nende aktiivsete vormidega (Brown & Vaughan 1998).

AKE inhibiitoreid kasutatakse nii hüpertensiooni kui südamepuudulikkuse ravis. Kestev arteriaalne hüpertensioon on seotud südame isheemiatõve, aju vaskulaarhaiguste, südamepuudulikkuse ja neerude funktsiooni häirumisega, olles mainitud haiguste ja seisundite oluliseks ja iseseisvaks riskiteguriks. AKE inhibiitorid monoterapiiana langetavad vererõhku enam kui pooltel hüpertooniatõve haigetel, koos tiasiid-diureetikumidega on nad efektiivsed 80%-l haigetel. AKE inhibiitoritel on mitmeid eeliseid võrreldes teiste hüpertensiooniravimitega, sest neil ei ole otsest sümpatolüütilist toimet ning kardiovaskulaarsed refleksid koormuse suurenemisele ja keha asendi muutustele ei häiru. Samuti on hea, et AKE inhibiitorid alandavad hüpertensiooni korral vererõhku sõltumata hüpertoonia tekkemehhanismist. Üldiselt on veresoonte laienemine erinevates veresoontes erineva ulatusega, kuid püsiv ja alati väljendunud neerudes. Lisaks vähendavad AKE inhibiitorid südame vasaku vatsakese lihasmassi ja seinapaksust (Kiivet *et al.* 1995).

Erinevates uuringutes on leitud, et SH-rühma sisaldavad AKE inhibiitorid (kaptopriil, zofenopriil) on potentsiaalsed antioksidandid, nad on võimelised kelaatima ROS tekkes olulisi  $Cu^{2+}$ -ioone, püüdma erinevaid vabu radikaale jne. (Fernandes *et al.* 1996; Bartosz *et al.* 1997; Benzie & Tomlinson 1998; Iciek *et al.* 2000; Tamba & Torreggiani 2000; De Nigris *et al.* 2001; Evangelista & Manzini 2005; Nakagawa *et al.* 2006). Samas on töid, kus seatakse kaptopriili antioksidatiivne aktiivsus ka teatud

kahtluse alla (Lapenna *et al.* 1996). Vastukäivaid andmeid on ka teiste AKE inhibiitorite antioksidantsuse kohta (Mira *et al.* 1993; Fernandes *et al.* 1996; Bartosz *et al.* 1997; Ruiz-Munoz *et al.* 1997; Benzie & Tomlinson 1998; Fernandez *et al.* 1998; Hayek *et al.* 1999; De Nigris *et al.* 2001; Hayek *et al.* 2002).

Kõigest eelnevast tulenevalt seati antud töö eesmärgiks uurida ja võrrelda erinevate AKE inhibiitorite võimalikku toimet OxS vastu, määrates nende antioksidantset potentsiaali, antiaterogeenset toimet (kasutades oxLDL mudelit) ning kaitsvat toimet erütrotsüütide deformatsiooni häiriva võimsa pro-oksüdandi raua vastu. AKE inhibiitoriteks valiti igast rühmast üks esindaja – sulfhüdrüülrühma sisaldav kaptopriil, kahte karboksüülrühma sisaldava ramipriili aktiivne metaboliit ramipriilaat ja fosfinüülrühma sisaldava fosinopriili aktiivne metaboliit fosinopriilaat.

## TÖÖ EESMÄRGID

Käesoleva töö eesmärgid olid järgmised:

1. Võrrelda AKE inhibiitorite antioksidantset potentsiaali erinevate meetodite abil.
2. Võrrelda AKE inhibiitorite toimet LDL oksüdatsiooni-mudeli kasutamisega.
3. Võrrelda AKE inhibiitorite toimet erütrotsüütide deformatsioonile ja võimalikku kaitsetoimet raud-initsieeritud deformatsioonihäirete vastu.



# MATERJALID JA MEETODID

## Uurimismaterjal

Kaptopriil – Ravimiametist

Ramipriilaat – firmast Aventis Pharma (Hoechst AG)

Fosinopriilaat – firmast Bristol-Myers Squibb

Reaktiivikomplekt “Total Antioxidant Status” – Randox Laboratories Ltd (Crumlin, UK)

Tereftaalhape (*Benzene-1,4-dicarboxylic acid*) – Sigma

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Sigma

CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O – Sigma

Dekstraansulfaadi lahus (*Dextran sulfate Na-salt*) – Serva

MgCl<sub>2</sub> – Sigma

PBS (*phosphate-buffered saline: NaCl + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>*) lahus – Sigma

FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – Sigma

0.9% NaCl lahus

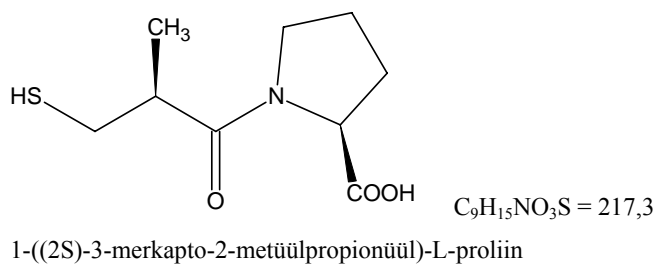
Kromatograafiline paber *Filtrak 388*

Veeniveri – tervetelt vabatahtlikelt doonoritelt vanuses 20-50 aastat

## Kaptopriil

Kaptopriil on sulfhüdrüülühma sisaldav AKE inhibiitor, mis kelaadib AKE molekuli ehitusse kuuluva tsingiaatomi ning seeläbi inhibeerib nimetatud ensüümi (Brown & Vaughan 1998). Kaptopriil oli esimene suukaudselt toimiv AKE inhibiitor, mis võeti kasutusele antihüpertensiivse raviainena (leiutati 1975, patenteeriti 1977).

Kasutatakse arteriaalse hüpertensiooni, kongestiivse ja müokardiinfarkti järgse südamepuudulikkuse ja diabeetilise nefropaatia ravis (Pharmaca Estica 2005).



**Joonis 1. Kaptopriili struktuurvalem ja keemiline nimetus.**

Kaptopriil on valge/peaaegu valge kristalliline pulber. Lahustub kergesti vees, metanoolis, metüleenkloriidis, lahustub nõrgas leelise lahuses (European Pharmacopoeia 2004).

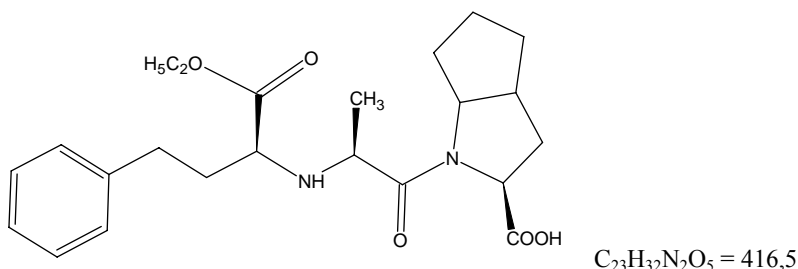
Ravi kaptopriiliga tuleb alustada väikesest annusest, seejärel kohandada individuaalsetele vajadustele. On lühitoimeline, seega tuleb ravimit manustada mitu korda ööpäevas. Hüpertensiooni puhul on algannuseks 12.5 mg 2 korda ööpäevas, tavaline säilitusannus on 25 mg 2 korda ööpäevas, mida võib järk-järgult suurendada kuni maksimaalse ööpäevase annuseni 50 mg 2 korda ööpäevas. Harvadel juhtudel vajalik 50 mg 3 korda päevas. Südamepuudulikkuse korral tuleb ravi kaptopriiliga alustada arstliku järelvalve all algannusest 6.25 mg või 12.5 mg. Säilitusannuseks on 25 mg 2...3 korda ööpäevas. Maksimaalne lubatud ööpäevane annus on 150 mg. Biosaadavus tühja kõhuga võetuna 70%, koos toiduga väheneb 30...40%-ni (Pharmaca Estica 2005).

Kaptopriili suukaudne annus 100 mg ööpäevas annab plasmakontsentratsiooniks 803...1937 ng/ml kaptopriili (Creasey *et al.* 1986; Franklin *et al.* 1998), mis vastab 3.7...8.9 µM. Antud töös on kasutatud 5 µM ja 30 µM kaptopriili lahuseid.

## Ramipriil

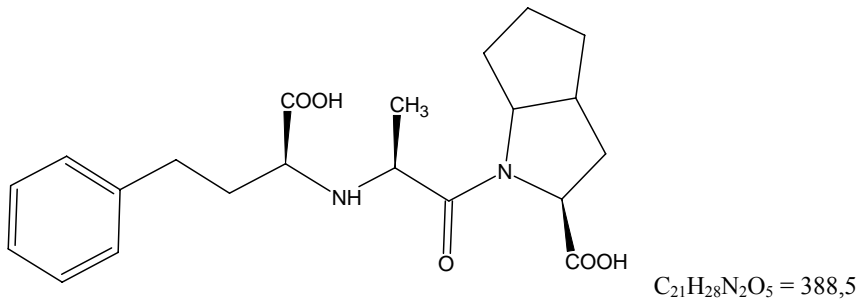
Ramipriil on pikatoimeline kahte karboksüülrühma sisaldav ACE inhibiitor, mis toimib samuti läbi ACE molekuli ehitusse kuuluva tsingiaatomi kelaatimise. Ta on profarmakon, mis teeb maksas läbi de-esterifitseerumise aktiivseks metaboliidiks ramipriiliks (Meisel *et al.* 1994; Brown & Vaughan 1998).

Kasutatakse arteriaalse hüpertensiooni, omandatud (sh. müokardiinfarkti järgse) südamepuudulikkuse ja algava või väljakujunenud glomerulaarse nefropaatia (sh. diabeetilise nefropaatia) ravis (Pharmaca Estica 2005).



(2S,3aS,6aS)-1-[(S)-2-[(S)-1-(etoksükarbonüül)-3-fenüülpropüül]amino]propanoüül]oktahüdrotsüklo-penta[b]pürrool-2-karboksüülhape

**Joonis 2. Ramipriili struktuurvalem ja keemiline nimetus.**



(2S,3aS,6aS)-1-[(S)-2[[S)-1-karboksü-3-fenüülpropüül]amino]propanoüül]oktahüdrotsüklo-penta[b]pürrool-2-karboksüülhape (ramipriil diatsiid)

### Joonis 3. Ramipriilaadi struktuurvalem ja keemiline nimetus

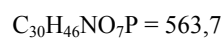
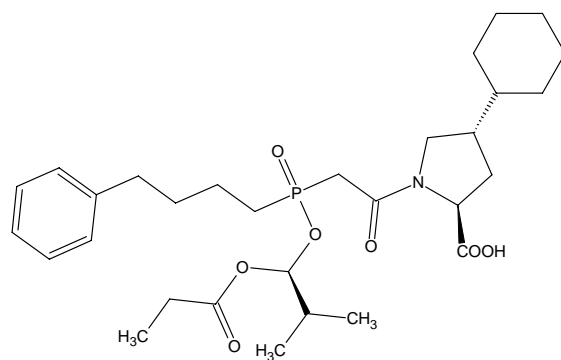
Hüpertensiooni ravis on soovitatavaks algannuseks 2.5 mg ramipriili 1 kord ööpäevas. Sõltuvalt ravivastusest võib annust suurendada, soovitatavalt kahekordistada 2...3 nädalase intervalliga. Säilitusannus 2.5...5 mg ööpäevas; maksimaalne 10 mg ööpäevas. Südamepuudulikkuse ravis on soovitatav algannus 1.25 mg ramipriili 1 kord ööpäevas. Annust kahekordistatakse 1...2 nädala pärast. Maksimaalne lubatud ööpäevane annus on 10 mg. Profarmakoni metabolismi/ aktivatsiooni tulemusel on suukaudselt manustatava ramipriili biosaadavus umbes 20% (Pharmaca Estica 2005).

Ramipriili ühekordne suukaudne annus 5 mg annab plasmas ramipriilaadi sisalduseks 4...10 ng/ml (Ruf *et al.* 1994; Verho *et al.* 1995), mis vastab kontsentratsioonile 0.010...0.026  $\mu\text{M}$ . Antud töös on kasutatud 0.02  $\mu\text{M}$ , 0.04  $\mu\text{M}$  ja 0.08  $\mu\text{M}$  ramipriilaadi lahuseid.

### Fosinopriil

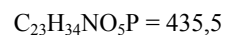
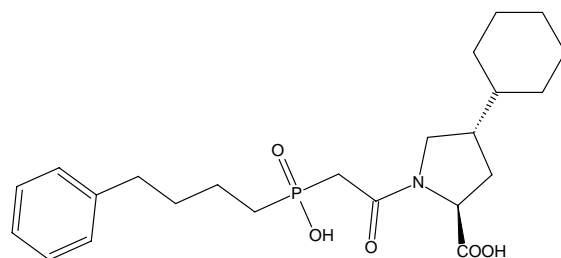
Fosinopriil, fosfiinhappe ester, on inaktiivne profarmakon, mis pärast suukaudset manustamist muudetakse kiire hüdrolyüsi kaudu aktiivseks diatsiidiks, ACE inhibiitor fosinopriiladiks (Murdoch & McTavish 1992). Toimib sarnaselt teistele ACE inhibiitoritele läbi tsiingiaatomi kelaatimise. Fosinopriil on ainuke FDA (Food and Drug Administration) poolt heaks kiidetud fosfinüülrühma sisaldav ACE inhibiitor (Brown & Vaughan 1998).

Kasutatakse arteriaalse hüpertensiooni ja südamepuudulikkuse ravis (Pharmaca Estica 2005).



(4S)-4-tsükloheksüül-1[[(-1-hüdroksü-2-metüülpropoksü)(4-fenüülbutüül)fosfinüül]atsetüül]-L-proliin propionaat

**Joonis 4. Fosinopriili struktuurvalem ja keemiline nimetus.**



(4S)-4-tsükloheksüül-1-[(hüdroksü(4-fenüülbutüül)fosfinüül)atsetüül]-L-proliin (fosinopriil diatsiid)

**Joonis 5. Fosinopriilaadi struktuurvalem ja keemiline nimetus.**

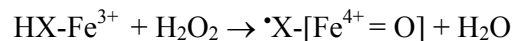
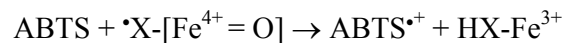
Fosinopriili soovitatavaks algannuseks hüpertensiooni korral on 10 mg 1 kord ööpäevas. Ravi kohaldada vastavalt vererõhu muutustele; tavaline annus 10...40 mg 1 kord ööpäevas. Südamepuudulikkuse puhul on samuti soovitatav algannus 10 mg 1 kord ööpäevas; ravi alustada arstliku järelvalve all. Vastavalt ravitulemustele võib annust suurendada nädalase intervalliga 40 mg-ni 1 kord ööpäevas. Maksimaalne lubatud ööpäevane annus on 40 mg. Suu kaudu manustatud fosinopriilist imendub 30...40%. Fosinopriilaadi farmakokineetilised parameetrid on proportsionaalsed manustatud fosinopriili annusega (Pharmaca Estica 2005).

Fosinopriili ühekordne suukaudne annus on 10 mg, millest moodustub plasmas 113...241 ng/ml fosinopriilaadi tase (Blumethal 1997; Ding *et al.* 1999), mis vastab kontsentratsioonile 0.259...0.556  $\mu$ M. Antud töös on kasutatud 0.29  $\mu$ M ja 0.40  $\mu$ M fosinopriilaadi lahuseid.

## Meetodid

### Totaalne antioksidantne mahtuvus (TAS)

Ainete antioksidantse üldaktiivsuse (potentsiaali) olemasolu ja taseme määramiseks on mitmeid meetodeid. Antud töös on kasutatud AKE inhibeerivate raviainete (kaptopriili, ramipriilaadi ja fosinopriilaadi) antioksidantse potentsiaali hindamiseks standardset reaktiivikomplekti "Total Antioxidant Status" (TAS, RANDOX). Selle tööpõhimõte seisneb antioksidantide võimel takistada ABTS (2,2'-azino-di-[3-etiüülbensotiasoliin-sulfonaat]) üleminekut  $ABTS^+$  katioonradikaaliks. Viimane moodustub ABTS-st kokkupuutel ferrüülmüoglobiinradikaalsete ( $\cdot X-[Fe^{4+} = O]$ ) osakestega, mis saadakse metmüoglobiini ( $HX-Fe^{3+}$ ) aktiveerimisel vesinikperoksiidiga:



ABTS on värvitu, kuid  $ABTS^+$  omab stabiilset sinakasrohelist värvust, mis on mõõdetav 600 nm juures. Antioksidandid pärsivad värvilise katioonradikaali teket ning värvuse tekke pidurdamine on proportsionaalne uuritud materjali antioksidantse aktiivsusega. Tulemused kalibreeritakse E-vitamiini veeslahustuva sünteetilise analoogi, Trolox (6-hüdroksü-2,5,7,8-tetrametüülkromaan-2-karboksüülhape) kaudu ning väljendatakse mmol/l.

Töö käik: erinevatesse katseklaasidesse pipeteeriti vastavalt 20  $\mu$ l destilleeritud vett kontrolliks; 20  $\mu$ l standardit ja 20  $\mu$ l konkreetset uuritavat raviaine lahust. Seejärel lisati kõikidesse katseklaasidesse 1 ml kromogeeni, segati ja mõõdeti 600 nm juures lahuse absorptsioon ( $A_1$ ); lisati kõikidesse 200  $\mu$ l substraati ja mõõdeti täpselt 3 minuti pärast (ajast sõltuv reaktsioon) lahuste absorptsioon ( $A_2$ ) lainepikkusel 600 nm. Saadud tulemustest arvutati TAS (mmol/l):

$$TAS = \text{faktor} \times (\Delta A_{\text{kontroll}} - \Delta A_{\text{proov}})$$

$$\text{faktor} = \text{Trolox konts. standardis} / (\Delta A_{\text{kontroll}} - \Delta A_{\text{standard}})$$

$$\Delta A_{\text{kontroll/standard/proov}} = A_2 - A_1$$

### Hüdroksüülradikaalide eliminatsiooni mõõtmine

Hüdroksüülradikaali ( $OH\cdot$ ) mõõtmise muudab keeruliseks osakese ülilühike eluiga (mikrosekundeid), suur reaktsioonivõime ning sellest tulenevalt reaktsioonisaaduste

mitmekesisus. Siin on lahenduseks nn. keemilised dosimeetrid. Varem leidsid kasutamist bensoaat- ja salitsülaatdosimeetrid, nende miinuseks on vastavalt 3 või 5 fluorestseeruvat reaktsiooniprodukti, mis tuleb eraldi kindlaks teha (Barreto *et al.* 1995). Antud töös on keemilise dosimeetrina kasutatud tereftaalhappe (THA) lahust. THA eeliseks dosimeetrina on sümmeetria – nimelt tekib OH• reageerimisel mittefluorestseeruva tereftaaliga ainult üks intensiivse fluorestsentsiga produkt, monohüdroksütereftalaat (Barreto *et al.* 1995).

Töö käik: 2000 µl 10 mM THA lahust 10mM fosfaatpuhvrts (pH = 7.5) pipeteeriti magnetsegajaga küveti, sellele lisati 100 µl uuritava aine lahust (füsioloogilises lahuses) või 100 µl füsioloogilist lahust (kontrollkatse), 100 µl 10 µM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O lahust ja 100 µl 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lahust (Cu<sup>2+</sup> ja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abil tekitati Fentoni reaktsioonil OH•). THA-st OH• mõjul tekkinud reaktsiooniprodukti mõõdeti fluorimeetriselt 312 nm ekstinktsiooni ja 426 nm emissiooni juures.

Saadud andmed väljendasid THA-hüdroksüülradikaali piigi protsentuaalset inhibitsiooni uuritud raviaine poolt. Raviaine IC<sub>50</sub> väärtused saadi sigmoidaalsel doos-vastus analüüsil programmiga Prism 2.0 (graphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

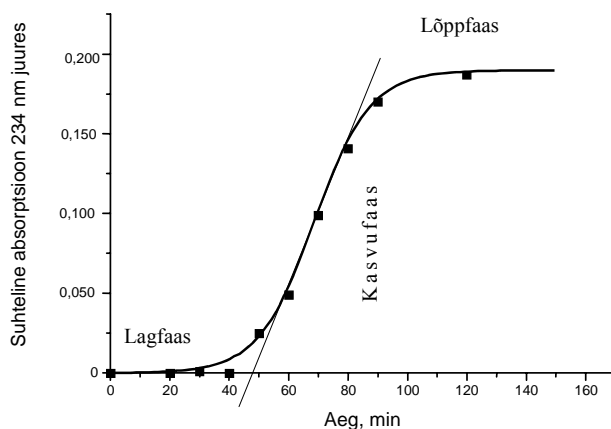
### **LDL oksüresistentsuse (lagfaasi) mõõtmine**

*In vitro* võib LDL oksüdatsiooni algatada kas rakke sisaldavas keskkonnas (inkubeerides makrofaagidega, endoteelirakkudega, silelihasrakkudega, lümfotsüütidega) või rakuvabas keskkonnas (kasutades erinevaid pro-oksüdante). Rakke sisaldavas keskkonnas oksüdeeritud LDL on oma omadustelt praktiliselt identne LDL-le, mis on oksüdeeritud rakuvabas keskkonnas. Seetõttu viiakse enamuseks eksperimente LDL oksüdeerimise uurimisel läbi kasutades pro-oksüdantidena raua- või vase-ioone, sest metalli-ioonide üleminek vabast vormist redoks-aktiveeritud kompleksi on üldiselt sobiv produtseerimaks oxLDL. Kõige sagedamini kasutatakse LDL oksüdatsioonitundlikkuse mõõtmiseks vask-initsieeritud oksüdatsiooni, sest raua-ioonid oksüdeerivad LDL aeglasemalt.

LDL oksüdatsiooni ulatust on võimalik hinnata peroksiidide ja aldehüüdsete lipiidide peroksüdatsiooniproduktide (eeskätt dienkongugaatide) määramisega, tio-barbituurhappe testiga, elektroforeetilise liikuvusega, lipiidide fluorestsentsi mõõtmisega, lipofiilsete antioksüdantide ja rasvhapete vähenemise mõõtmisega, anioon-vahetus kromatograafiaga (Esterbauer *et al.* 1989; Zhang *et al.* 1994; Jialal & Devaraj 1996; Rice-Evans *et al.* 1996).

Inimese LDL oksüdatsiooni on võimalik dünaamiliselt registreerida, mõõtes dieenkonjugaatide (*conjugated dienes*, CD) suhtelist absorptsiooni 234 nm (tekib maksimaalne hulk dieenkonjugaate) juures (Esterbauer *et al.* 1989).

CD moodustumise kineetika, so. absorptsioon *versus* aeg, on iseloomustatav kolme faasiga (joonis 6). Esimese, nn. lagfaasi jooksul CD hulk ei suurene üldse või suureneb väga vähe, st. CD suhteline absorptsioon suureneb aeglaselt ja ainult vähesel määral. Selle faasi kestus on määratud endogeensete antioksidantide (E-vitamiin, karotenoidid, retinüülstearaat) sisaldusega LDL-s. Kui LDL kaotab enamuse oma antioksidantsetest komponentidest, siis algab teine (kasvu-) faas, milles CD hulk suureneb väga kiiresti maksimumväärtuseni, sest PUFA-d konverteeritakse konjugeeritud lipiidide hüdroperoksiidideks. Viimane tingib kiire ja järsu suhtelise absorptsiooni suurenemise 234 nm juures. Kolmas, nn. lõppfaas algab platoo tekkega, st. CD hulk enam ei suurene. Pikaajalisel inkubeerimisel hakkab CD hulk koguni vähenema (seda pole joonisel 6 näidatud), kuna lipiidide hüdroperoksiidid lõhustuvad edasi erinevateks ühenditeks, kaasa arvatud stabiilseteks lõpp-produktideks, nagu aldehüüdid, süsihappegaas, alkoholid (Esterbauer *et al.* 1989).



**Joonis 6. LDL oksüdatsiooni käigus tekkivate dieenkonjugaatide moodustumise kineetika ja lagfaasi määramine.**

Lagfaasi määramine on sobiv ja objektiivne protseduur määramaks LDL tundlikkust erinevate pro- ja antioksidantide suhtes, sest see peegeldab LDL oksüresistentsust – aega, mille jooksul lipoproteiinis olevad PUFA-d sisuliselt veel ei oksüdeeru, sest samas leiduvad antioksidandid neutraliseerivad vabu radikaale. Protsess on temperatuurist

sõltuv, soovitatav temperatuur 37°C (Esterbauer *et al.* 1989; Zhang *et al.* 1994; Rice-Evans *et al.* 1996). Seda meetodit kasutati ka antud töös.

Töö käik: vabatahtlikelt doonoritelt võeti veeniveri EDTA Vacutainer katsutitesse; plasma eraldati tsentrifuugimisel 1500×g /minutis 15 minuti jooksul. Lipoproteiinide fraktsioon (mitte-HDL-fraktsioon, mille totaalse enamiku moodustab LDL ja milles on vähesel määral VLDL; edaspidi LDL-fraktsioon) sadestati 4 ml-st 1:2 lahjendatud plasmast 0.4 ml sadestusreagentiga (2% dekstraansulfaadi ja 2M MgCl<sub>2</sub> lahus 1:1, pH 7.0), segati mikseril 1 minut ja tsentrifuugiti 10 minutit 1500×g juures. Supernatant eemaldati sademelt ning sade lahustati 4 ml 0.9% PBS-s. Järgnevalt lisati lahusele 0.2 ml sadestusreagenti, segati ja tsentrifuugiti, et eemaldada LDL-fraktsioonist EDTA jääke. Supernatant eemaldati ning sadestatud LDL lahustati 4% PBS-s (Zhang *et al.* 1994). Saadud LDL-fraktsioonis määrati valgu sisaldus Lowry meetodil (Lowry *et al.* 1951), kuna edasiseks LDL oksüdatsiooni uurimiseks vajati töölahust, mis sisaldaks valku 2 mg/ml. Vastava valgusisaldusega lahus saadi fraktsiooni lahjendamisel 4% PBS-ga.

LDL-fraktsioon pipeteeriti 100 µl kaupa katseklaasidesse, katseseeriale lisati 50 µl füsioloogilist lahust (kontrollkatse) või 50 µl uuritava raviaine lahust (füsioloogilises lahuses), eelinkubeeriti 37°C juures 10 minutit, lisati kõikidesse katseklaasidesse 50 µl CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O lahust (lõppkontsentratsioon 0.045 mM) ning inkubeeriti 37°C juures 3 tunni jooksul. Iga 10 minuti järel mõõdeti spektrofotomeetriliselt tekkinud dieenkonjugaatide suhteline absorptsioon (Spectronic Genesis 2PC) 234 nm juures.

Saadud ekstinktsioonide alusel konstrueeriti arvutiprogrammi MICROCALC abil vastavad graafikud, mille abil leiti igas katses LDL oksüresistentsust iseloomustav aeg (lagfaasi pikkus). Illustratsiooniks joonis 6 – graafikul tõmmatakse kasvufaasile puutuja, mis lõikub ajateljega; lõikekohalt saadakse lagfaasi pikkus minutites.

### **Erütrotsüütide deformeeritavuse hindamine kromatograafilise migratsiooni kaudu**

Mikrotsirkulatsiooni normaalseks toimimiseks peavad erütrotsüüdid deformeeruma, et läbida kitsaid, endast väiksema diameetriga kapillaare. Deformatsioonivõime sõltub välimistest ja sisemistest jõududest, kuid kõige enam vere punalible plasmamembraani elastsusest. Seega oma füsioloogilise ülesande täitmiseks on erütrotsüütide jaoks oluline säilitada oma ideaalne ruumiline vorm, mis tagabki nende võime vastavalt vajadusele



deformeeruda. Erütrotsüütide kromatograafilise migratsiooni (EKM) test sobib punaliblede plasmamembraani deformeeritavuse/funktsionaalsuse markeriks, sest membraani ründavad oksüdatiivsed stressorid, sh. väga othlik raud, on võimelised seda muutama.

EKM baseerub asjaolul, et normaalsed punalibled jätavad standardtingimustes kromatograafilisele paberile peaaegu identse laigu, kuid membraani ründavad pro-oksüdandid põhjustavad normaalses kromatograafilises migratsioonis muutusi. Antud töös kasutati erütrotsüütide deformeeritavuse hindamiseks EKM määramist, mis põhines varem väljatöötatud meetodil (Vasilyev 1991).

Töö käik: vabatahtlikelt doonoritelt võeti veeniveri hepariiniga Vacutainer katsutitesse; erütrotsüüdid eraldati verest tsentrifuugimisel  $500\times g$  5 minuti jooksul. Isoleeritud erütrotsüüdid pesti neli korda 0.9% NaCl lahusega. Viimase tsentrifuugimise järel resuspendeeriti erütrotsüüdid füsioloogilises lahuses 60% "hematokritini". Saadud erütrotsüütide suspensiooni pipeteeriti 200  $\mu$ l kaupa katseklaasidesse, katseeriale lisati 200  $\mu$ l füsioloogilist lahust, 50  $\mu$ l uuritava raviaine lahust (füsioloogilises lahuses) või 50  $\mu$ l füsioloogilist lahust (kontrollkatse), eelinkubeeriti 37°C juures 10 minutit, seejärel lisati 100  $\mu$ l  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  lahust lõppkontsentratsiooniga 150  $\mu$ M, 300 $\mu$ M, 450  $\mu$ M või 600  $\mu$ M ning inkubeeriti 37°C juures täpselt 60 minutit (ajast sõltuv reaktsioon). Kromatograafilisele paberile horisontaalsel raamil pipeteeriti 200  $\mu$ l füsioloogilist lahust (lahusti) ning 60 sekundi pärast kanti samasse keskpunkti 20  $\mu$ l erütrotsüütide suspensiooni (katse). Mõlema ala (lahusti ja katse) diameetrid (vastavalt dl ja dk) mõõdeti 60 sekundi pärast. EKM (protsentides) arvutati järgmise valemi kohaselt:

$$\text{EKM} = \frac{dk}{dl} \cdot 100\%.$$

### **Andmete statistiline analüüs**

Tulemuste analüüsiks ja statistiliseks töötlemiseks kasutati arvutiprogrammi Microsoft Excel. Katseandmete põhjal leiti aritmeetilised keskmised ning nende põhjal standardhälve ( $\pm$ SED). Statistilise tõenäosuse leidmiseks kasutati Student t-testi. Katsete tulemuste erinevus loeti statistiliselt tõenäoseks  $p < 0.05$  korral.

## TULEMUSED JA ARUTELU

### Kaptopriil

#### TAS ja hüdroksüülradikaali elimineerimisvõime

TAS mõõtmisel ilmnes, et 30  $\mu\text{M}$  kaptopriili lahus omab antioksidantset potentsiaali, kuid 5  $\mu\text{M}$  lahus seda ei näidanud:  $\text{TAS}_{5\mu\text{M}} = 0 \text{ mmol/l}$  ( $n=3$ );

$$\text{TAS}_{30\mu\text{M}} = (2.65 \pm 0.40) \text{ mmol/l} \text{ (n=3)}.$$

Hüdroksüülradikaali elimineerimisvõimet mõõdeti kontsentratsioonidel 5  $\mu\text{M}$  ja 30  $\mu\text{M}$ , kuid vajalikku lineaarsust ei ilmnenu 600 sekundi jooksul. Seejärel teostati katse 50  $\mu\text{M}$  kaptopriili lahusega, tulemus vastas ettenähtud lineaarsuse tingimusele.

Katsetes saadud tulemuste alusel konstrueeriti graafikud ja leiti ekstrapoleerimise kaudu näiv  $\text{IC}_{50}$ . 30  $\mu\text{M}$  kaptopriili lahuse näiv  $\text{IC}_{50} = (0.043 \pm 0.007) \text{ mM}$  ( $n=5$ )

#### Toime LDL oksüresistentsusele

Katsed kaptopriiliga näitasid, et antud raviaine suurendab märkimisväärselt LDL oksüresistentsust (tabel 1), mis viitab kaptopriili antioksidantsele (antiaterogeensele) toimele.

Tabel 1. Kaptopriili mõju LDL oksüresistentsusele ( $n = 4$ ).

Kaptopriili kontsentratsioon	Lagfaasi pikkus (min)		Lagfaasi muutus (min)
	Ilma kaptopriiliga	Kaptopriiliga	
5 $\mu\text{M}$	40 $\pm$ 6	78 $\pm$ 8	38 $\pm$ 10*
30 $\mu\text{M}$	47 $\pm$ 7	89 $\pm$ 12	42 $\pm$ 15*

\* $p < 0.05$ ; keskmine $\pm$ SED;

#### Toime erütrotsüütide deformatsioonile

Alguses teostati katsed uurimaks raviainete mõju EKM-le. Saadud tulemused näitasid, et kaptopriil statistiliselt olulist muutust EKM-s esile ei kutsu (andmed ei ole toodud). Seejärel uuriti raua-ioonide mõju EKM-le, selgus, et raud vähendab erütrotsüütide deformatsiooni sõltuvalt kontsentratsioonist ning statistiliselt oluliselt (tabel 2).

Deformatsiooni vähenemine väljendus erütrotsüütide poolt tekitatud migratsiooniala diameetri vähenemises raua juuresolekul.

**Tabel 2. Raua mõju erütrotsüütide kromatograafilisele migratsioonile ( $p < 0.05$ ).**

Kontroll	150 $\mu\text{M Fe}^{2+}$	300 $\mu\text{M Fe}^{2+}$	450 $\mu\text{M Fe}^{2+}$	600 $\mu\text{M Fe}^{2+}$
100%	96%	85%	77%	73%

Kontrolliks erütrotsüüdid füsioloogilises lahuses. Hajuvuspiirid 5-10% näidu väärtusest.

Tabelis 3 on toodud kaptopriili kaitsetoime raud-tingitud EKM-le protsentides. Mida suurem arv, seda võimsam on raviaine kaitsetoime.

**Tabel 3. Kaptopriili efekt raua pro-oksüdantsele toimele ( $n=12$ ).**

Kaptopriili kontsentratsioon	150 $\mu\text{M Fe}^{2+}$	300 $\mu\text{M Fe}^{2+}$	450 $\mu\text{M Fe}^{2+}$	600 $\mu\text{M Fe}^{2+}$
5 $\mu\text{M}$	4*	6*	7*	2
30 $\mu\text{M}$	8*	5*	8*	7*

\*  $p < 0.05$ , hajuvuspiirid 5-10% näidu väärtusest.

## Ramipriilaat

### TAS ja hüdroksüülradikaali elimineerimisvõime

Ramipriilaadi lahused andsid alljärgnevad tulemused:

$$\text{TAS}_{0.02\mu\text{M}} = 0 \text{ mmol/l (n=3)}$$

$$\text{TAS}_{0.04\mu\text{M}} = (0.01 \pm 0.02) \text{ mmol/l (n=3)}$$

$$\text{TAS}_{0.08\mu\text{M}} = (0.22 \pm 0.02) \text{ mmol/l (n=3)}$$

Saadud tulemused viitavad ramipriilaadi minimaalsele antioksüdantsele potentsiaalile või hoopiski selle puudumisele. Sama näitas ka radikaali elimineerimise katse.

Hüdroksüülradikaali püüdmisvõimet mõõdeti esmalt valitud kontsentratsioonidel 0.02  $\mu\text{M}$ , 0.04  $\mu\text{M}$  ja 0.08  $\mu\text{M}$ . Kuna ükski lahustest ei elimineerinud  $\text{OH}^\bullet$ , teostati katsed 10 ja 20 korda suurema kontsentratsiooniga lahustega. Saadud tulemused ei näidanud samuti  $\text{OH}^\bullet$  püüdmisvõimet.

### Toime LDL oksüresistentsusele

Katsed ramipriiliga näitasid, et antud raviaine statistiliselt olulist mõju LDL oksüdatsiooniprotsessile ei avalda (tabel 4).

**Tabel 4. Ramipriilaadi mõju LDL oksüresistentsusele (n = 5).**

Ramipriilaadi kontsentratsioon	Lagfaasi pikkus (min)		Lagfaasi muutus (min)
	Ilma ramipriiliga	Ramipriiliga	
0.02 µM	50.20±12.34	48.60±10.74	-1.60±2.88
0.04 µM	50.20±12.34	52.20±11.65	2.00±9.00
0.08 µM	50.20±12.34	48.60±15.24	-1.60±9.02

keskmine±SED

### Toime erütrotsüütide deformatsioonile

Eelnevalt teostatud katsed näitasid raviainete mõju kohta EKM-le, et ramipriil ise ei kutsu EKM-s statistiliselt olulist muutust esile (andmed ei ole toodud). Rauda mõju erütrotsüütide deformatsioonile on toodud tabelis 2. Rauda tingitud deformatsiooni-muutusi ramipriil vähendab. Tabelis 5 toodud arvud väljendavad ramipriilaadi kaitse-toimet raud-tingitud EKM-le protsentides.

**Tabel 5. Ramipriilaadi efekt raua pro-oksüdantsel toimele (n=8).**

Ramipriilaadi kontsentratsioon	150µM Fe <sup>2+</sup>	300 µM Fe <sup>2+</sup>	450 µM Fe <sup>2+</sup>	600 µM Fe <sup>2+</sup>
0.02 µM	2	11*	5*	2
0.04 µM	1	7*	8*	0
0.08 µM	4	9*	10*	3*

\* p<0.05, hajuvuspiirid 5-10% näidu väärtusest.

## Fosinopriilaat

### TAS ja hüdroksüülradikaali elimineerimisvõime

Fosinopriilaadi lahustega teostatud TAS katsed viitasid samuti minimaalsele või puuduvale antioksidantsele potentsiaalile:  $TAS_{0.29\mu M} = (0.05 \pm 0.03)$  mmol/l (n=3) ja  $TAS_{0.40\mu M} = (0.09 \pm 0.06)$  mmol/l (n=3).

Samale tulemusele osutas fosinopriilaadi OH• püüdmisvõime puudumine. Vastavad katsed teostati esmalt valitud kontsentratsioonidel – 0.29  $\mu M$  ja 0.40  $\mu M$ . Kuna saadud tulemused ei näidanud OH• elimineerimist, tõsteti uuritavate lahuste kontsentratsioone 10 ja 20 korda, kuid ka need lahused ei näidanud OH• inhibeerimist.

### Toime LDL oksüresistentsusele

Katsed fosinopriilaadiga näitasid, et antud raviaine väiksem kontsentratsioon pikendab veidi LDL lagfaasi (statistiliselt mitteoluline), kuid suurem kontsentratsioon lühendab seda (statistiliselt oluline), st. LDL oksüdatsioonitundlikkus suureneb fosinopriilaadi toimel (tabel 6).

**Tabel 6. Fosinopriilaadi LDL oksüresistentusele (n = 4).**

Fosinopriilaadi kontsentratsioon	Lagfaasi pikkus (min)		Lagfaasi muutus (min)
	Ilma fosinopriilaadita	Fosinopriilaadiga	
0.29 $\mu M$	46.75 $\pm$ 13.05	48.50 $\pm$ 14.80	1.75 $\pm$ 2.63
0.40 $\mu M$	46.75 $\pm$ 13.05	43.00 $\pm$ 10.74	-3.75 $\pm$ 2.50*

\*p<0.05, keskmine $\pm$ SED

### Toime erütrotsüütide deformatsioonile

Eelkatsed raviainete toime kohta EKM-le näitasid, et fosinopriilaat seda statistiliselt oluliselt ei muuda (andmed ei ole toodud). Pro-oksüdant raud põhjustab erütrotsüütide deformatsiooni ja mõjutab seeläbi EKM (tabel 2). Fosinopriilaadi kaitsetoime raudtingitud EKM muutustele on toodud tabelis 7, kus muutus väljendub protsentides.

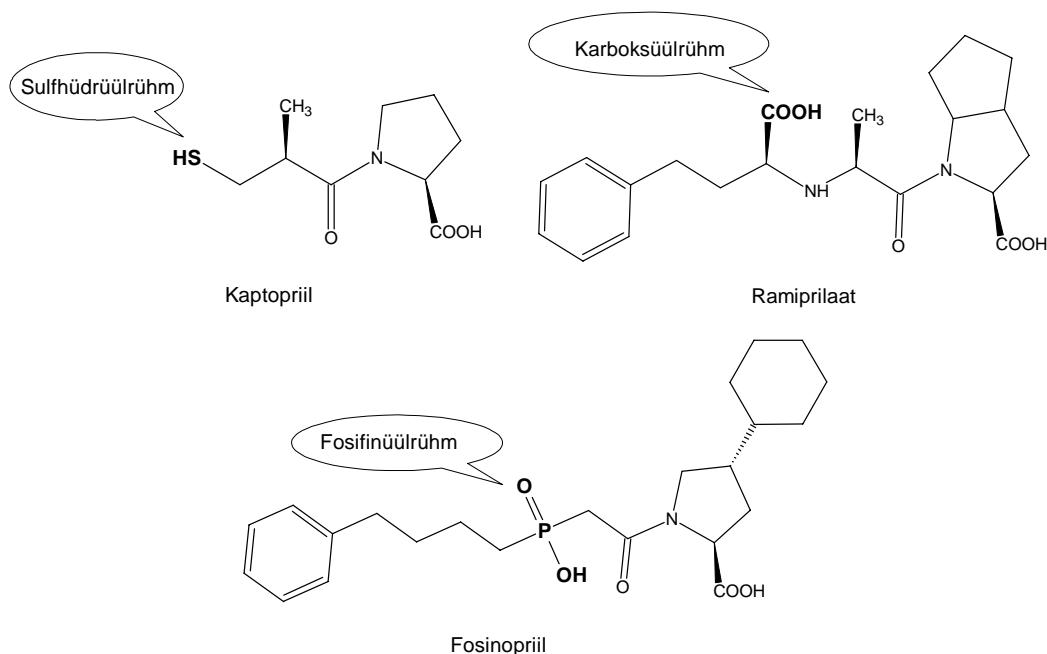
**Tabel 7. Fosinopriilaadi efekt raua pro-oksüdantsele toimele (n=10).**

Fosinopriilaadi kontsentratsioon	150 $\mu\text{M Fe}^{2+}$	300 $\mu\text{M Fe}^{2+}$	450 $\mu\text{M Fe}^{2+}$	600 $\mu\text{M Fe}^{2+}$
0.29 $\mu\text{M}$	1	1	6	8*
0.40 $\mu\text{M}$	0	0	3	8*

\* $p < 0.05$ ; hajuvuspiirid 5-10% näidu väärtusest.

## Tulemuste analüüs

Antud töös leiti, et tiol-rühma sisaldava kaptopriili antioksüdantne potentsiaal oli tugevam kui fosfinüülrühma sisaldaval fosinopriilaadil ja kahte karboksüülrühma omaval ramipriilaadil (vt. struktuurvalemid joonisel 7), sest kaptopriili TAS on oluliselt suurem kui fosinopriilaadil ja ramipriilaadil (tabel 8). Kaptopriili TAS väärtus on lähedane mitmete tugevate antioksüdantide omale. Väga madal TAS väärtus teistel raviainetel viitab nende väga nõrgale või puuduvale antioksüdantsele potentsiaalile. Seda kinnitavad ka hüdroksüülradikaali elimineerimiskatsed, kus selgus, et 30  $\mu\text{M}$  kaptopriili lahus elimineerib  $\text{OH}^\bullet$ , kuid fosinopriilaat ja ramipriilaat tekkinud  $\text{OH}^\bullet$  ei kõrvalda (tabel 8). Seega osutab kaptopriili antioksüdantsusele nii kõrge TAS väärtus kui ka võime muuta ülitoksiline hüdroksüülradikaal kahjutuks. Viimane on väga oluline paljude haiguste seisukohalt, sest tihti on lipiidide peroksüdatsiooni algatajaks just  $\text{OH}^\bullet$ .



**Joonis 7. Kaptopriili, ramipriilaadi ja fosinopriilaadi struktuurvalemid.**

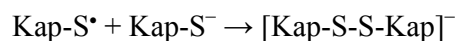
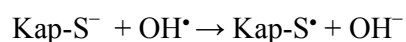
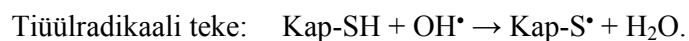
**Tabel 8. Kaptopriili, ramipriilaadi ja fosinopriilaadi antioksidantsete omaduste koondtabel.**

		Kaptopriil		Ramipriilaat			Fosinopriilaat	
kontsentratsioon		5 µM	30 µM	0.02 µM	0.04 µM	0.08 µM	0.29 µM	0.40 µM
TAS (mmol/l)		0 (n=3)	2.65±0.40 (n=3)	0 (n=3)	0.01±0.02 (n=3)	0.22±0.02 (n=3)	0.05±0.03 (n=3)	0.09±0.06 (n=3)
näiv IC <sub>50</sub> (mM)		0.043±0.007 (n=5)		-	-	-	-	-
lagfaasi muutus (min)		38±10* (n=4)	42±15* (n=4)	-1.60±2.88 (n=5)	2.00±9.00 (n=5)	-1.60±9.02 (n=5)	1.75±2.63 (n=4)	-3.75±2.50* (n=4)
kaitse- toime raud- tingi- tud EKM- le (%)	150µM Fe <sup>2+</sup>	4* (n=12)	8* (n=12)	2 (n=8)	1 (n=8)	4 (n=8)	1 (n=10)	0 (n=10)
	300 µM Fe <sup>2+</sup>	6* (n=12)	5* (n=12)	11* (n=8)	7* (n=8)	9* (n=8)	1 (n=10)	0 (n=10)
	450 µM Fe <sup>2+</sup>	7* (n=12)	8* (n=12)	5* (n=8)	8* (n=8)	10* (n=8)	6 (n=10)	3 (n=10)
	600 µM Fe <sup>2+</sup>	2 (n=12)	7* (n=12)	2 (n=8)	0 (n=8)	3* (n=8)	8* (n=10)	8* (n=10)

\*p<0.05; keskmine±SED; n – katsete arv

Raviainete mõju uurimisel LDL oksüdatsioonitundlikkusele (sisuliselt näitab see nende võimalikku antiaterogeenset potentsiaali) saime järgmised tulemused (tabel 8). Kaptopriil pikendab LDL lagfaasi märkimisväärselt (p<0.05), ramipriilaat LDL lagfaasile statistiliselt olulist mõju ei avalda. Fosinopriilaadi väiksem kontsentratsioon statistiliselt olulist muutust LDL lagfaasile ei oma, suurema kontsentratsiooniga (0.40 µM) lahus lühendab LDL lagfaasi keskmiselt 4 minuti võrra (p<0.05). Kaptopriili positiivset mõju LDL oksüresistentsusele, mis on sisuliselt lipiidide peroksüdatsiooni pärssimine, saab seostada tema võimega püüda OH• radikaale, mis tihti algatavad LP.

Saadud tulemused toetavad levinud arusaama raviaine struktuuris oleva tioolrühma olulisusest antioksidantsuse tagamisel. Arvatakse, et vabad radikaalid ja teised oksüdandid reageerivad esmalt kaptopriili (Kap-SH) SH-rühmaga konverteerides selle tiüülradikaaliks (Kap-S•) või oksüdeerides kaptopriili disulfiidiks [Kap-S-S-Kap]<sup>-</sup>.



Samas ei saa väita, et elusorganismis toimub kõik samasuguselt. Antud uuringus läbi viidud LDL oksüdatsioonitundlikkuse katsed *in vitro* näitasid positiivset efekti vaid kaptopriilil, kuid kirjanduse andmetel suurendavad LDL resistentsust vask-indutseeritud oksüdatiivsele stressile apolipoproteiin E defitsiitsetel hiirtel nii kaptopriil – 50 mg/kg/päevas (Hayek *et al.* 1998), fosinopriil – 5 mg/kg/päevas ja 25 mg/kg/päevas (Hayek *et al.* 1999) kui ka ramipriil – 5 mg/kg/päevas (Keidar *et al.* 2000). Inimese tavalised säilitusannused on järgmised: kaptopriil 25 mg 2...3 korda päevas, fosinopriil 10...40 mg päevas ja ramipriil 2.5...5 mg päevas ning maksimaalsed ööpäevased annused: kaptopriil 150 mg, fosinopriil 40 mg ja ramipriil 10 mg päevas (Pharmaca Estica 2005).

Raua ionide poolt põhjustatud erütrotsüütide deformeeritavuse katsetest selgus, et ükski uuritud raviainetest ise EKM-i ei mõjuta, kuid kõik nad omavad juba terapeutilistes kontsentratsioonides kaitsetoimet raua kahjuliku toime vastu ja seda sõltuvalt  $\text{Fe}^{2+}$  kontsentratsioonist (vt. tabel 8). Väikese raua kontsentratsiooni poolt põhjustatud EKM-i muutuste eest kaitseb hästi kaptopriil, keskmiste kontsentratsioonide eest kaitsevad kaptopriil ja ramipriil ning kõige suurema raua kontsentratsiooni puhul on kaitsetoime fosinopriilil.

Punalibledega teostatud katsete tulemused ei toeta SH-rühma teooriat, sest kõik uuritud raviained kaitsevad raua pro-oksüdantse toime eest. Kuna antioksüdantset toimet seletatakse lisaks vabade radikaalide püüdmisele ka metalli kelaatimisega ning raviainete mittespetsiifilise seostumisega makromolekulide nende aladega, mis on olulised vabade radikaalide genereerimises või vabade radikaalide rünnakus (Fernandes *et al.* 1996; Bartosz *et al.* 1997; Fernandez *et al.* 1998; Tamba & Torreggiani 2000), võib uuritud raviainete kaitsetoime olla seotud nende mehhanismidaga.

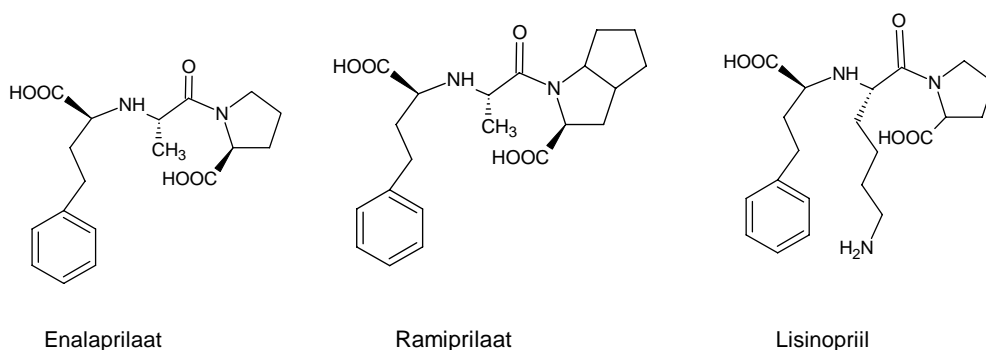
AKE inhibiitorite ravitoime avaldumiseks peavad nad vastava ensüümi pärssima. Kuna AKE aktiivtsenter sisaldab tsingi aatomit, peavad raviained metalliga ligande moodustama (vastutavad funktsionaalrühmad toodud joonisel 7). Järelikult võivad nad seda teha ka teiste metallidega. On näidatud kaptopriili, enalapriilaadi ja lisinopriili vaske ja raua kelaativ toime.  $\text{Cu}^{2+}$  moodustab kaptopriili ja lisinopriiliga metall:ligand komplekse 1:1, enalapriilaadiga 1:2 (enalapriilaadi korral moodustub 1:1 kompleks  $\text{Cu}^{1+}$ -ga);  $\text{Fe}^{2+}$  moodustab enalapriilaadiga kompleksi 1:1, kaptopriiliga 1:2 ja lisinopriil rauaga kompleksi ei moodusta (Fernandez *et al.* 1998).

Raua kontsentratsioon erütrotsüütide katses oli 150  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 450  $\mu\text{M}$  ja 600  $\mu\text{M}$ . Uuritud raviainete kontsentratsioonid olid tunduvalt väiksemad – kaptopriilil



5  $\mu\text{M}$  ja 30  $\mu\text{M}$ ; ramiprilaadil 0.02  $\mu\text{M}$ , 0.04  $\mu\text{M}$  ja 0.08  $\mu\text{M}$ , fosinopriilaadil 0.29  $\mu\text{M}$  ja 0.40  $\mu\text{M}$ .

Enalapriilaat, ramipriilaat ja lisinopriil sisaldavad kahte karboksüülrühma (joonis 8). Enalapriilaadi struktuur on ramipriilaadi omaga sarnasem, seetõttu eeldame, et ramipriilaat moodustab komplekse sarnaselt enalapriilaadiga. Fosinopriilaadi komplekside moodustumise kohta konkreetsed andmed puuduvad, kuid kuna raviaine kontsentratsioon on raua omaga võrreldes väga väike, siis ilmselt olulist kelaatimist ei toimu. Seega ei saa meie töös ilmnenud efekti – uuritud raviained vähendavad raua ionide poolt põhjustatud erütrotsüütide kromatograafilise migratsiooni muutuseid – seletada raviainete võimega moodustada rauaga ligande.



**Joonis 8. Enalapriilaadi, ramipriilaadi ja lisinopriili struktuurvalemid.**

Punaliblede katses näitasid raviained pro-oksüdant raua kontsentratsioonist sõltuvat positiivset efekti. Võimalik, et see on siiski seotud sulfhüdrüül-, karboksüül- ja fosfinüül-rühma ning raua vastastikusest mõjutamisest, kuid samas võib vastutajaks olla ka mingi muu tegur – näiteks molekuli suurus, süsinikahela pikkus, teised funktsionaalrühmad.

Antud töös saadud tulemuste põhjal osutus uuritavatest raviainetest antioksidantsuse seisukohalt kõige paremaks kaptopriil, millel ilmnis positiivne efekt kõikides teostatud uuringutes. Ta omas kõrget totaalset antioksidantset mahtuvust (TAS), püüdis ülitoksilist hüdroksüülradikaali, pikendas LDL oksüresistentsust ja kaitses erütrotsüüte pro-oksüdantse raua kahjuliku toime eest. Teised uuritud raviained (ramipriilaat ja fosinopriilaat) omasid antioksidantset toimet vaid kahevalentse raua kui keskse pro-oksüdandi suhtes. Saadud tulemused toovad esile uuritud AKE inhibiitorite positiivse omadusena antioksidantse toime, sest kaitses erütrotsüütide deformatsiooni vähenemist, vähendatakse oluliselt võimalusi mikrotsirkulatsiooni tõsiseks häirimiseks tugeva

kahjustava membraanilipiidide peroksüdatsiooni tingimustes. Rauda puudutav informatsioon on äärmiselt oluline hemokromatoosete kõrgvererõhktõvega haigete puhul.

## JÄRELDUSED

1. Sulfhüdrüülrühma sisaldava kaptopriili antioksidantsus on suurem kui fosfinüülrühma sisaldaval fosinopriilil ja kahte karboksüülrühma sisaldaval ramipriilil, sest kaptopriili TAS on märkimisväärselt kõrgem kui ülejäänud raviainetel. Fosinopriili ja ramipriili väga väike TAS väärtus viitab nende minimaalsele/ puuduvale antioksidantsusele.  
Kaptopriil on suuteline elimineerima ülitoksilist hüdroksüülradikaali. Ramipriil ja fosinopriil hüdroksüülradikaali ei kõrvalda.
2. Kaptopriil pikendab LDL lagfaasi märkimisväärselt ( $p < 0.05$ ). Ramipriil ja fosinopriil väiksemas kontsentratsioonis statistiliselt olulist muutust LDL lagfaasis esile ei kutsu ( $p > 0.05$ ). Suurema kontsentratsiooniga fosinopriili lahused lühendavad LDL lagfaasi keskmiselt 4 minuti võrra ( $p < 0.05$ ).
3. Uuritud raviained ise erütrotsüütide kromatograafilist migratsiooni (EKM) ei mõjuta ( $p > 0.05$ ), kuid omavad teatud kaitsetoimet raua ionide poolt põhjustatud erütrotsüütide deformeeritavusele ja seda sõltuvalt  $Fe^{2+}$  kontsentratsioonist. Väikese raua kontsentratsiooni ( $150 \mu M$ ) poolt põhjustatud EKM-i muutuste eest kaitseb hästi kaptopriil, keskmiste raua kontsentratsioonide ( $300 \mu M$  ja  $450 \mu M$ ) eest kaitsevad kaptopriil ja ramipriil ning kõige suurema raua kontsentratsiooni ( $600 \mu M$ ) puhul on kaitsetoime fosinopriilil.

## KOKKUVÕTE

Paljude haiguste – sh. ateroskleroos, isheemilised kahjustused, reumatoidartriit, vähktõbi, neurodegeneratiivsed haigused – patogeneesis on olulisel kohal ülemäärane oksüdatiivne stress. Viimane kujuneb organismis juhul, kui oksüdatiivsete stressorite produktsioon ületab antioksidantse kaitsevõime, mis omakorda viibki potentsiaalsete kahjustuste tekkele. Mida kestmam ja sügavam on oksüdatiivne stress, seda suuremad kahjustused avalduvad biomolekulide struktuurides ning seda sügavamalt häirub nende talitus.

On selgunud, et ka ravimid võivad anda oma osa ülemäärase oksüdatiivse stressi tekkes. Sellest tulenevalt oli käesolevas töös eesmärgiks võrrelda AKE inhibiitorite antioksidantset potentsiaali erinevate meetodite abil, võrrelda AKE inhibiitorite toimet LDL oksüdatsiooni-mudeli kasutamise ja võrrelda AKE inhibiitorite enda toimet erütrotsüütide deformatsioonile ja võimalikku kaitsetoimet raud-initsieeritud deformatsioonihäirete vastu.

Totaalse antioksidantse potentsiaali uuringud näitasid, et kaptopriili antioksidantne potentsiaal on fosinopriilaadi ja ramipriilaadi omast suurem, sest kaptopriili lahuse TAS on märkimisväärselt kõrgem kui ülejäänutel. Peale kõrge TAS väärtuse osutab kaptopriili antioksidantsusele ka võime püüda efektiivselt ülitoksilisi hüdroksüülradikaale. Fosinopriilaat ja ramipriilaat OH<sup>\*</sup> ei kõrvaldanud.

Kaptopriilil ilmnes kaitsetoime ka lipiidide peroksüdatsiooni vastu. Nimelt pikendab ta märkimisväärselt LDL lagfaasi ( $p < 0.05$ ), vastupidiselt fosinopriilaadile, mille suurema kontsentratsiooniga lahus isegi lühendab mõnevõrra LDL lagfaasi ( $p < 0.05$ ). Ramipriilaadi ning fosinopriilaadi väiksema kontsentratsiooniga lahused statiliselt olulist muutust LDL lagfaasile ei omanud.

Erütrotsüütide deformatsioonile uuritud raviained ise mõju ei avaldanud, kuid neil ilmnes kaitsetoime pro-oksüdantse raua kahjuliku toime eest. Kaptopriili, ramipriilaadi ja fosinopriilaadi lahuste toimel vähenevad raua ionide poolt põhjustatud muutused erütrotsüütide kromatograafilises migratsioonis. Muutus sõltub raua kontsentratsioonist – väiksema raua kontsentratsiooni poolt põhjustatud EKM-i muutuste eest kaitseb hästi kaptopriil, keskmiste kontsentratsioonide eest kaitsevad kaptopriil ja ramipriilaat ning kõige suurema raua kontsentratsiooni puhul on kaitsetoime fosinopriilaadil.

Käesolevas töös saadud tulemuste põhjal osutus uuritavatest raviainetest antioksidantsuse seisukohalt kõige paremaks kaptopriil. Ta omas kõrget totaalset antioksidantset

mahtuvust (TAS), püüdis ülitoksilist hüdroksüülradikaali, pikendas LDL oksüresis-  
tentsust ja kaitses erütrotsüüte pro-oksüdantse raua kahjuliku toime eest.

## KASUTATUD KIRJANDUS

- Aberkane H, Stoltz JF, Galteau MM, Wellman M. Erythrocytes as targets for gamma-glutamyltranspeptidase initiated pro-oxidant reaction. *Eur J Haematol* 2002; 68: 262-271.
- Aruoma OI. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Rad Biol Med* 1996; 20(5): 675-705.
- Barreto JC, Smith GS, Strobel NHP, McQuillin PA, Miller TA. Terephthalic acid: a dosimeter for the detection of hydroxyl radicals in vitro. *Life Sciences* 1995; 56(4): 89-96.
- Bartosz M, Kedziora J, Bartosz G. Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril. *Free Rad Biol Med* 1997; 23(5): 729-735.
- Benzie IFF, Tomlinson B. Antioxidant power of angiotensin-converting enzyme inhibitors *in vitro*. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 45: 168-169.
- Birukov KG. Oxidized lipids: the two faces of vascular inflammation. *Curr Atheroscler Rep* 2006; 8(3): 223-231.
- Blumenthal M. Treatment of congestive heart failure. Experience with foscinopril. *Am J Hypertens* 1997; 10: 289S-298S.
- Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1411-1420.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844
- Comporti M, Signorini C, Buonocore G, Ciccoli L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Rad Biol Med* 2002; 32(7): 568-576.
- Creasey WA, Funke PT, McKinstry DN, Sugarman AA. Pharmacokinetics of captopril in elderly healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1986; 26(4): 264-268.
- De Nigris F, D'Armiento FP, Somma P, Casini A, Andreini I, Sarlo F, Mansueto G, De Rosa G, Bonaduce D, Condorelli M, Napoli C. Chronic treatment with sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce susceptibility of plasma LDL to *in vitro* oxidation, formation of oxidation-specific epitopes in the arterial wall, and atherogenesis in apolipoprotein E knockout mice. *Int J Cardiol* 2001; 81: 107-115.
- Ding PY, Chu KM, Hu OY, Huang GM, Jeng JJ, Chang A. Foscinopril: pharmacokinetics and pharmacodynamics in Chinese subjects. *J Clin Pharmacol* 1999; 39(2): 155-160.
- Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comms* 1989; 6: 67-75.

- European Pharmacopeia, 5th Edition, 2004.
- Evangelista S, Manzini S. Antioxidant and cardioprotective properties of the sulphhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor zofenopril. *J Int Med Res.* 2005; 33(1): 42-54.
- Fernandes AC, Filipe PM, Freitas JP, Manso CF. Different effects of thiol and nonthiol ACE inhibitors on copper-induced lipid and protein oxidative modification. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(4): 507-514.
- Fernandez MT, Silva MM, Mira L, Florencio MH, Gill A, Jennings KR. Iron and copper complexation by angiotensin-converting enzyme inhibitors. A study by ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry. *J Inorg Biochem* 1998; 71: 93-98.
- Franklin ME, Addisson RS, Baker PV, Hooper WD. Improved analytical procedure for measurement of captopril in human plasma by gas chromatography - mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr Biomed Sci Appl* 1998; 705(1): 47-54.
- Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury: Part II: Animal and Human Studies. *Circulation* 2003; 108: 2034-2040.
- Haak E, Haak T, Kusterer K, Reschke B, Faust H, Usadel KH. Microcirculation in hyperglycemic patients with IDDM without diabetic complications – effect of low-dose angiotensin-converting enzyme inhibition. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998; 106: 45-50
- Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 1999. Third edition. Oxford University Press Inc. New York.
- Hayek T, Attias J, Coleman R, Brodsky S, Smith J, Breslow JL, Keidar S. The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Res* 1999; 44: 579-587.
- Hayek T, Attias J, Smith J, Breslow JL, Keidar S. Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 31: 540-544.
- Hayek T, Kaplan M, Raz A, Keidar S, Coleman R, Aviram M. Ramipril administration to atherosclerotic mice reduces oxidized low-density lipoprotein uptake by their macrophages and blocks the progression of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2002; 161(1): 65-74.
- Iciek M, Polak M, Wlodek L. Effect of thiol drugs on the oxidative hemolysis in human erythrocytes. *Acta Pol Pharm* 2000; 57(6): 449-454.
- Jialal I, Devaraj S. Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clin Chem* 1996; 42(4): 489-506.

- Keidar S, Attias J, Coleman R, Wirth K, Scholkens B, Hayek T. Attenuation of the atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by ramipril is dissociated from its antihypertensive effect and from potentiation of bradykinin. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35(1): 64-72.
- Khanna S. Thiol Antioxidants. Protection Against Oxidative Stress and Redox Regulation of Cellular Responses. 2000. Kuopio University Printing Office. Kuopio.
- Kiivet RA, Harro J, Maimets M, Rägo L. Farmakoteraapia käsiraamat arstile. 1995. AS Trükiekspert. Tartu.
- Lapenna D, De Gioia S, Ciofani G, Daniele F, Cuccurullo F. Captopril has no significant scavenging antioxidant activity in human plasma *in vitro* or *in vivo*. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42: 451-456.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Meisel S, Shamiss A, Rosenthal T. Clinical pharmacokinetics of ramipril. *Clin Pharmacokinet* 1994; 26(1): 7-15.
- Mira ML, Silva MM, Queiroz MJ, Manso CF. Angiotensin converting inhibitors as oxygen free radical scavengers. *Free Rad Res Commun* 1993; 19(3): 173-181.
- Murdoch D, McTavish D. Fosinopril. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in essential hypertension. *Drugs* 1992; 43(1): 123-140.
- Münzel T, Keaney JF. Are ACE Inhibitors a “Magic Bullet” Against Oxidative Stress? *Circulation* 2001; 104: 1571-1574.
- Nakagawa K, Ueno A, Nishikawa Y. Interactions between carnosine and captopril on free radical scavenging activity and angiotensin-converting enzyme activity in vitro. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126(1): 37-42.
- O’Keefe JH, Wetzel M, Moe RR, Brosnahan K, Lawie CJ. Should an angiotensin-converting enzyme inhibitor be standard therapy for patients with atherosclerotic disease? *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1-8.
- Pharmaca Estica 2005.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Pharmacology Fifth Edition. 2003. Churchill Livingstone.
- Rice-Evans C, Leake D, Bruckdorfer R, Diplock AT. Practical Approaches to Low Density Lipoprotein Oxidation: Whys, Wherefores and Pitfalls. *Free Radical Res* 1996; 25(4): 285-311.



- Ruf G, Gera S, Luus HG, Trenk D, de la Rey N, Löffler K et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ramipril and pirtanide administered alone and in combination. *Eur J Clin Pharmacol* 1994; 46: 545-550.
- Ruiz-Munoz LM, Vidal-Vanaclocha F, Lampreable I. Enalaprilat inhibits hydrogen peroxide production by murine mesangial cells exposed to high glucose concentrations. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 456-464.
- Tamba M, Torreggiani A. Free radical scavenging and copper chelation: a potentially beneficial action of captopril. *Free Rad Res.* 2000; 32: 199-211.
- Vasilyev AP. Estimation of red cell deformability index. *Laboratornoe Delo* 1991; 9: 44-46.
- Verho M, Luck C, Stelter WJ, Rangoonwala B, Bender N. Pharmacokinetics, metabolism and biliary and urinary excretion of oral ramipril in man. *Curr Med Res Opin* 1995; 13: 264-273.
- Zalba G, San José G, Moreno MU, Fortuño MA, Fortuño A, Beaumont F J, Díez J. Oxidative Stress in Arterial Hypertension. Role of NAD(P)H Oxidase. *Hypertension* 2001; 38: 1395.
- Zhang A, Vertommen J, Van Gaal L, De Leeuw I. A rapid and simple method for measuring the susceptibility of low-density-lipoprotein and very-low-density-lipoprotein to copper catalyzed oxidation. *Clin Chim Acta* 1994; 227: 159-173.
- Zhou X, Robertson AKL, Rudling M, Parini P, Hansson GK. Lesion Development and Response to Immunization Reveal a Complex Role for CD4 in Atherosclerosis. *Circ Res* 2005; 96: 427-434.
- Zilmer M, Karelson E, Vihalemm T. *Meditiiniline biokeemia II*. 1999. Tartu Ülikooli Kirjastus. Tartu.
- Zilmer M, Zilmer K. *Oksüdatiivne stress ja antioksidantravi*. 1994. Tartu.

## SUMMARY

### Antioxidativity-based comparison of ACE inhibitors

Oxidative stress plays crucial role in the pathogenesis of many diseases, including atherosclerosis, hypertension, heart failure, rheumatoid arthritis, cancer, neuro-degenerative diseases. Oxidative stress develops in conditions where excessive production of pro-oxidants overcomes endogenous antioxidant defence mechanisms, which leads to potential damages. Profound oxidative stress leads to substantial injuries in biomolecules, lipoproteins and structures.

It has been shown drugs participate in development of oxidative stress. Due to such reasons the aims of this study were to compare *in vitro*

- 1) antioxidative activity of ACE inhibitors via using different methods (total antioxidative status (TAS) and hydroxyl radical scavenging potency),
- 2) ACE inhibitors' oxy-resistance causing potency (LDL lag-phase),
- 3) the effects of ACE inhibitors on iron-driven alteration of deformability of red blood cells (RBCs).

We used three different ACE inhibitors – sulfhydryl-containing captopril, two-carboxyl groups containing ramipril active metabolite ramiprilat and phosphinyl group containing fosinopril active metabolite fosinoprilat.

The total antioxidative status of ACE inhibitors was determined using a standard kit. The hydroxyl radical scavenging potency of ACE inhibitors was elucidated using terephthalic acid method. The resistance of LDL to oxidation was estimated by permanent monitoring of the formation of diene conjugates. Chromatographic migration of RBCs (a marker of their deformability) was measured with and without ACE inhibitors pre-treatment.

The results of TAS show that antioxidative potential of captopril is higher than of fosinoprilat and ramiprilat as captopril has a remarkable TAS value whereas the other drugs did not have. An antioxidativity of captopril indicates its potency for scavenging of very toxic hydroxyl radicals. Ramiprilat and fosinoprilat did not scavenge hydroxyl radical.

This study revealed that a pre-incubation with captopril remarkably increased the resistance of plasma LDL fraction to oxidation ( $p < 0.05$ ). Fosinoprilat at higher concentrations, on the contrary, shortens the lag-phase of the LDL ( $p < 0.05$ ). Ramiprilat

and fosinoprilat at lower concentrations did not have statistical significant effect to the LDL lag-phase.

Chromatographic migration of RBCs (a marker of their deformability) was measured with and without captopril, ramiprilat and fosinoprilat pre-treatment. Experiments showed that investigated substances suppressed an iron-driven alteration of RBCs deformability already at therapeutic concentrations. The efficiency of the used substances was dependent on iron concentration. Captopril was able to avoid the alterations of chromatographic migration of RBCs caused by low and medium iron concentration. Ramiprilat suppressed chances of chromatographic migration of RBCs at medium iron concentration and fosinoprilat did it at higher iron concentration.

The results of this study indicate that on the basis of antioxidativity captopril was the best of investigated drugs. It has a relative high total antioxidative capacity value, exhibit potency for scavenging of hydroxyl radicals, remarkably increased resistance of plasma non-HDL fraction to oxidation and avoids an iron-potentiated alteration of chromatographic migration of RBCs already at therapeutic concentrations. Ramiprilat and fosinoprilat are also able avoids an iron-driven alteration of chromatographic migration of RBCs already at therapeutic concentrations. Thus, any drug, which is able also to avoid the extremely adverse actions of free iron, has a higher therapeutic impact compared with compounds lacking such effect.

## **TÄNUAVALDUSED**

Täna oma juhendajaid professor Mihkel Zilmerit ja professor Peep Veskit.

Samuti täna Kersti Zilmerit igakülgse abistamiselt töö läbiviimisel, heade soovitude ja nõuannete eest.

Suur tänu kolleegidele Biokeemia Instituudist, kes olid vajadusel alati abiks; Verekeskuse töötajatele, kes abistasid veenivere kogumisel; Ravimiametile ning firmadele Aventis Pharma (Hoechst AG) ja Bristol-Myers Squibb, vajalike ainete eest.

## **PUBLIKATSIOONID**

- I. **Teder K, Zilmer K, Kals J, Zilmer M. AKE inhibiitorite toime erütrotsüütide rauast tingitud deformatsiooni muutustele. Eesti Arst, 2004, 83 (8): 515-519.**

## AKE inhibiitorite toime erütrotsüütide rauast tingitud deformatsiooni muutustele

Küllli Teder, Kersti Zilmer, Jaak Kals, Mihkel Zilmer – TÜ biokeemia instituut

kaptopriil, ramipriil, fosinopriil, raud, erütrotsüüdid

Töös uuriti, kas AKE inhibiitorid kaptopriil, ramipriil ja fosinopriil on võimelised terapeutilistes kontsentratsioonides *in vitro* ära hoidma raud-initsieeritud erütrotsüütide deformatsiooni vähenemist. Kuna ramipriil ja fosinopriil muudetakse organismis aktiivvormideks, uuriti nende puhul aktiivvorme ehk ramipriilaati ja fosinopriilaati. Erütrotsüütide deformeeritavust hinnati kromatograafilise migratsiooni kaudu, määrates seda enne ja pärast ravimiga eeltöötlust. Leiti, et raua poolt põhjustatud erütrotsüütide deformatsiooni vähenemist takistasid kõik uuritavad ained ja seda juba terapeutilistes kontsentratsioonides. Erinevate AKE inhibiitorite toime efektiivsus oli samal ajal sõltuv rauakontsentratsioonist.

Kõrgenenud arteriaalne vererõhk mõjutab paljude kardiovaskulaarsete haiguste kulgu. Sageli kasutatakse vererõhu langetamiseks angiotensiini konverteeriva ensüümi (AKE) inhibiitoreid: kaptopriili, fosinopriili, ramipriili, enalapriili, lisinopriili jt (1). Uuringud, mis tooksid esile uusi aspekte seda tüüpi AKE inhibiitorite kohta ja seda võrdlevalt, on hüpertensiooni ravis väga vajalikud, sest ravi on pikaajaline, tihti elukestev. AKE inhibiitorite ja mikrotsirkulatsiooni seosed on vererõhu seisukohalt võetuna väga olulised (2). Seega peaks teadma hüpertooniaravimite mõju erütrotsüütide ja teiste vererakkude reoloogilistele parameetritele. Eelnevalt lähtudes uurisime erütrotsüütide deformeeritavust, mis tegelikult otsustabki nende võime läbida väga väikese läbimõõduga kapillaare piisava kiirusega. Testisime seda raua juuresolekul, sest kahevalentne raud on üks võimsamatest pro-oksüdantidest, rauda vabastavaid sündmusi esineb inimorganismis tihti ning samas on ka rauapreparaatide kasutamine väga sage. On teada, et raud võib kestva oksüdatiivse stressi tingimustes oma sidujatest, ka hemoglobiinist ja ferritiinist, vabaneeda. Vabad rauaioonid põhjustavad erütrotsüütide membraanlipiidide peroksüdatsiooni ning kahjustavad erütrotsüütide membraani, mistõttu häirub erütrotsüütide elastsus ja deformeeritavus ning nad võivad väikestes veresoontes peetuda, aga ka verevoolu tõttu puruneda (1, 3, 4).

Uurimuse eesmärgiks oli uurida, kas

- AKE inhibiitoritel endil võiks olla terapeutilises kontsentratsioonides erütrotsüütide deformeeritavust häiriv toime;
- raud mõjutab erütrotsüütide deformeeritavust ning kas AKE inhibiitorid võiksid omada kaitsetoimet raua mõju suhtes.

### Uurimismaterjal ja -meetodid

Töös uuriti kolme AKE inhibiitorit: kaptopriili, ramipriili ja fosinopriili. Katsed teostati organismis toimete avaldavate ravimivormidega, st kaptopriili, ramipriilaadi ning fosinopriilaadiga (vastavalt ramipriili ja fosinopriili aktiivsed metaboliidid). Kaptopriil saadi Ravimiametit, ramipriilaat firmast Aventis Pharma (Hoechst AG), fosinopriilaat firmast Bristol-Myers Squibb. Veeniveri võeti vabatahtlikelt tervetelt doonoritelt hepariiniga Vacutainer-katsutitesse. Töös kasutati füsioloogilises lahuses lahustatud ravimeid järgmises lõppkontsentratsioonist: kaptopriil 5  $\mu$ M, ramipriilaat 7,5 ng/ml, 15 ng/ml ja 30 ng/ml ning fosinopriilaat 125 ng/ml ja 175 ng/ml. Need valiti kirjanduse andmetel. Kaptopriili suukaudne annus on 50...100 mg päevas, mis annab plasma sisalduseks 3–8  $\mu$ M (5, 6). Fosinopriili ühekordne suukaudne annus on 10 mg, millest moodustub plasmas 113...242 ng/ml fosinopriilaadi sisalduse (7, 8). Ramipriili ühekordne suukaudne annus 5 mg vastab plasma

4...10 ng/ml ramiprilaadi sisaldusele (9, 10). Pro-oksüdantse koormuse mudelsüsteem tekitati  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  kasutamisega inkubatsioonisegus nii, et raua lõppkontsentratsioon oleks 150  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 450  $\mu\text{M}$  ja 600  $\mu\text{M}$ .

Erütrotsüütide kromatograafilist migratsiooni (EKM) määrati kromatograafilisel paberil *Filterak 388*, kasutades meie väljaarendatud mudelsüsteemi, mis põhineb eelnevalt kirjeldatud meetodil (11). Erütrotsüüdid eraldati verest tsentrifugimisel: 500 pööret minutis 5 minuti jooksul. Isoleeritud erütrotsüüdid pesti neli korda 0,9% NaCl lahusega. Viimase tsentrifugimise järel resuspendeeriti erütrotsüüdid füsioloogilises lahuses 60% "hematokritini". Erütrotsüüte inkubeeriti 60 min 37 °C juures ilma pro-oksüdandita (raud) ning pro-oksüdandi erineva kontsentratsiooni juures ilma ravimita (kontroll). Ravimi mõju uurimiseks eelinkubeeriti erütrotsüütide suspensiooni ravimi lahusega 10 min 37°C juures enne 0,1 ml  $\text{Fe}^{2+}$  lahuse lisamist. Kromatograafilisele paberile horisontaalsel raamil pipeteeriti 0,2 ml füsioloogilist lahust (lahusti) ning 60 sekundi pärast kanti samasse keskpunkti 0,02 ml erütrotsüütide suspensiooni (katse). Mõlema ala (lahusti ja katse) diameetrid (vastavalt dl ja dk) mõõdeti 60 sekundi pärast. EKM (protsentides) arvutati järgmise valemi kohaselt:

$$\text{EKM} = \frac{dk}{dl} \cdot 100\%$$

Andmete statistilisel analüüsil kasutati arvutiprogrammi Microsoft Excel. Erinevust peeti statistiliselt oluliseks  $p < 0,05$  korral.

### Tulemused

Eelkatsetes leiti, et kasutatud ravimite toimel erütrotsüütide kromatograafiline migratsioon ei muutus. Raua toimel erütrotsüütide deformatsioon väheneb ja seda raua kontsentratsioonist sõltuvalt ning statistiliselt tõenäoliselt. Tabelis 1 on toodud EKM erinevate rauakontsentratsioonide juures. Deformatsiooni vähenemine väljendus erütrotsüütide poolt tekitatud migratsiooniala diameetri vähenemises raua juuresolekul. Ravimite toimet raud-tingitud erütrotsüütide kromatograafilise migratsiooni suhtes

näitavad tabelis 2 toodud andmed. Seal on toodud ravimite kaitsetoime protsentides. Mida suurem on see arv, seda võimsam on ravimi kaitsetoime. Lisagem, et töös kasutatud suuremate rauakontsentratsioonide tõttu on igasugune statistiliselt tõenäoline kaitsetoime deformatsiooni vähema häirumise seisukohalt igati positiivne. Nagu näha tabeli 1 ja 2 andmete kõrvutamisel, kaitseb 5  $\mu\text{M}$  kaptopriil erütrotsüütide membraane  $\text{Fe}^{2+}$  peroksüdatiivse toime eest täielikult rauakontsentratsioonil 150  $\mu\text{M}$ , kusjuures see kaitsetoime on statistiliselt tõenäoline nagu ka 300  $\mu\text{M}$  ja 450  $\mu\text{M}$  raua puhul. Ramiprilaadi kontsentratsioonid 7,5 ng/ml, 15 ng/ml ja 30 ng/ml kaitsevad samuti  $\text{Fe}^{2+}$  oksüdatiivse toime eest. Statistiliselt tõenäoline kaitsetoime on kõikidel ravimikontsentratsioonidel 300  $\mu\text{M}$  ja 450  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  juures. Tähelepanu väärib see, et kaitsetoime on 30 ng/ml ramiprilaadi lahusel pisut tugevam kui kaptopriili puhul. Lisaks esineb 30 ng/ml ramiprilaadi lahusel teatud kaitsetoime isegi 600  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  juures. 125 ng/ml ja 175 ng/ml fosinopriilaadi lahustel on statistiliselt tõenäoline kaitsetoime vaid 600  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  juures.

**Tabel 1. Raua mõju erütrotsüütide kromatograafilisele migratsioonile (muutused statistiliselt tõenäolised)**

Kontroll	150 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{2+}$	300 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{2+}$	450 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{2+}$	600 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{2+}$
100%	96%	85%	77%	73%

Kontrolliks erütrotsüüdid füsioloogilises lahuses. Hajuvuspiirid 5–10% näidu väärtusest.

**Tabel 2. Kaptopriili (KAP; n = 12), ramiprilaadi (RAM; n = 8) ja fosinopriilaadi (FOS; n = 10) kaitsetoime (protsentides) vastava rauakontsentratsiooni juures**

	150 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{2+}$	300 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{2+}$	450 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{2+}$	600 $\mu\text{M}$ $\text{Fe}^{2+}$
5 $\mu\text{M}$ KAP	4*	6*	7*	2
7,5 ng/ml RAM	2	11*	5*	2
15 ng/ml RAM	1	7*	8*	0
30 ng/ml RAM	4	9*	10*	3*
125 ng/ml FOS	1	1	6	8*
175 ng/ml FOS	0	0	3	8*

\*  $p < 0,05$

Hajuvuspiirid 5–10% näidu väärtusest.



### Arutelu

On selge, et ravimid, mis on suutelised ära hoidma vaba raua väga võimsat pro-oksüdantset kahjulikku toimet, omavad ka teatud antioksidantset toimet ja on seega suurema terapeutilise potentsiaaliga kui ravimid, mille selline efekt puudub või mis hoopis võimendavad raua kahjustavat toimet. Rauaprobleemid on üha enam päevakorral ka seetõttu, et raua kuhjumine organismis on viimasel ajal tõusnud mitme haiguse oluliste patogeneesifaktorite hulka.

Mikrotsirkulatsiooni normaalseks toimimiseks peavad erütrotsüüdid deformeeruma, et läbida kitsaid, endast väiksema diameetriga kapillaare. Erütrotsüüdid on oksüdatiivse kahjustuse suhtes eriti tundlikud tänu suurele polüküllastamata rasvhapete hulga membraanides, suurele rakusisesel hapniku ning hemoglobiini hulga, mis on kahjustava oksüdatiivse stressi võimalikuks soodustajaks (3). Suhkruhaigetel, hemodialüüsi patsientidel, kroonilistel alkohoolikutel, kardiovaskulaarsete haiguste korral on erütrotsüütide membraanlipiidide tundlikkus peroksidatsiooni suhtes suurenenud (3). Lisaks on kõrge vererõhu, suhkruhaiguse korral ja müokardiinfarkti järel suurenenud plasma gamma-glutamüültranspeptidaasi (GGT) aktiivsus, kõrge GGT aktiivsusega inimestel on suurenenud erütrotsüütide oksüdatsiooni-tundlikkus ja vähenenud nende deformeeritavus (3). Süvenenud oksüdatiivse stressi korral (see on aga hüpertensioonile väga omane) võib raud oma sidujatest (sh ka hemoglobiinist) vabaneda ning põhjustada erütrotsüütide membraanlipiidide peroksidatsiooni, mis vähendab erütrotsüütide deformeeritavust (1, 3, 4). AKE inhibeerimine ramipriiliga soodustab hemodünaamika paranemist, suurendab endoteelilist sõltuvat vasodilatatsiooni (12) ning parandab perifeerse oblitereruva ateroskleroosiga patsientide elulemust (13). Veel vähendab ramipriil südamepuudulikkuse tekke kiirust kardiovaskulaarsete tüsistuste suhtes suure riskiga patsientide grupis (14). I tüüpi diabeediga hüperglükeemilistel patsientidel võib ravi väikse ramipriiliannusega parandada mikrotsirkulatsiooni ka enne mikrovaskulaarsete komplikatsioonide ilmnemist (2).

On teada, et normaalne seerumi rauasisaldus on meestel 11–28  $\mu\text{M}$  ja naistel 6,6–26  $\mu\text{M}$  (15). Selles töös valisime suuremad rauakontsentratsioonid kui tavaliselt sissevõetavad preparaadid veres tekitada võiksid, kuid sellised rauakontsentratsioonid võivad organismis lokaalselt tekkida ja seda kindlasti mitmete patoloogiliste sündmuste puhul. On selge, et kui ravim suudab elimineerida suuremast rauakontsentratsioonist tekitatud kahju, siis väiksematel rauakontsentratsioonidel sellega probleeme ei teki. Raua profülaktiline annus on tavaliselt 30 mg, ravidoosina kasutatakse ka 100 mg. Mitteheemsest rauast imendub umbes 5%; seega vastavalt 1,5 mg ja 5 mg, mis annab 5 l veres kontsentratsiooni kasvaks 0,3 mg/l (5,4  $\mu\text{M}$ ) ja 1 mg/l (17,9  $\mu\text{M}$ ). Kuid veres on ikkagi tegu transferriniga seotud rauaga, mitte vaba kahevalentse rauaga. Seega ei saa situatsiooni seerumis otseselt oksüdatiivse stressi mudelsüsteemis tekitatud kontsentratsioonidele üle kanda.

Meie tööst selgub, et kaptopriil, ramipriil ja fosinopriil on võimelised juba terapeutilistes kontsentratsioonides vältima rauaioonide poolt põhjustatud erütrotsüütide deformeeritavuse olulist vähenemist. Uuritud ravimite kaitsev toime sõltub  $\text{Fe}^{2+}$  kontsentratsioonist: väikse rauakontsentratsiooni (150  $\mu\text{M}$ ) põhjustatud erütrotsüütide kromatograafilise migratsiooni muutuste eest kaitseb hästi kaptopriil. Keskmiste rauakontsentratsioonide (300  $\mu\text{M}$  ja 450  $\mu\text{M}$ ) eest kaitseb ramipriil ning kõige suurema rauakontsentratsiooni (600  $\mu\text{M}$ ) puhul oli teatud kaitsetoime fosinopriilil.

AKE inhibiitorite lipiidide peroksidatsiooni vastast kaitsetoimet saab seletada metalli kelaatimisega (1, 16, 17), vabade radikaalide püüdmisega (1, 16, 17), nende mittespetsiifilise seostumisega makromolekulide nende aladega, mis on olulised vabade radikaalide genereerimises või vabade radikaalide rünnakus (1). Reaktiivsete hapnikuosakeste (ROS) genereerimine on katalüüsitud muutuva oksüdatsiooniastmega metallide ioonide (eeskätt rauaioonide) poolt, aga kui metall kelaatida, siis ei saa ta käituda pro-oksüdandina. On näidatud kaptopriili, enalapriil ja lisinopriili

vaske ja rauda kelaativat toimet ning järelstatud, et SH-grupi olemasolu struktuuris ei pruugi olla seega ROS püüdmise võime aluseks (1, 17). Siiski seostatakse seda tihti just kaptopriili koostises oleva tiolrühmaga: vabad radikaalid ja teised oksüdandid reageerivad esmalt sellega konverteerides SH-rühma tüülradikaaliks või oksüdeerides kaptopriili disulfiidiks (1, 16). Vask moodustab kaptopriili, enalapriilaadi ja lisinopriiliga komplekse suhtes 1 : 1 (metall : ligand), raud on komplekside metall : ligand tekkes vasest väiksema efektiivsusega (17). Seega ei saa meie töös ilmnunud efekti seletada raua kelaatimisega. AKE inhibiitoritel on kaitseime raua pro-oksüdantse toime suhtes, kuid ise nad erütrotsüütide kromatograafilist migratsiooni statistiliselt ei mõjuta. Kuna raud on keskne pro-oksüdant, võib nende AKE inhibiitorite toimet pidada antioksüdantseks toimeks. Saadud tulemused viitavad AKE inhibiitorite positiivsele mõjule, sest nad takistavad erütrotsüütide deformeerumise langust, mis vähendab oluliselt võimalusi mikrotsirkulatsiooni

tõsiseks häirimiseks tugeva kahjustava membraanilipiidide peroksüdatsiooni tingimustes.

#### Kokkuvõte

AKE inhibiitorid kaptopriil, ramipriil ja fosinopriil (vastavalt ramipriili ja fosinopriili aktiivsed metaboliidid) erütrotsüütide deformatsioonile mõju ei avalda, kuid nad kaitsevad erütrotsüütide membraani pro-oksüdantse raua kahjuliku toime eest. Erinevate AKE inhibiitorite toimet maksimum on raua erinevate kontsentratsioonide juures. See töö annab ühe lisaargumendi AKE inhibiitorite kasutamiseks hüpertensiooni ravis olukorras, kui on tegu oksüdatiivse stressiga.

#### Tänuavaldused

Täname vereskuse töötajaid, kes lahkelt olid nõus abistama veenivere kogumisel, Ravimiametit ning firmasid Aventis Pharma (Hoechst AG) ja Bristol-Myers Squibb, kust saime vajalikud ained. Tööd on toetanud Eesti Teadusfond (grant nr 5327).

#### Kirjandus

1. Fernandes AC, Filipe PM, Freitas JP, Manso CF. Different effects of thiol and nonthiol ACE inhibitors on copper-induced lipid and protein oxidative modification. *Free Radic Biol Med* 1996;4:507-14.
2. Haak E, Haak T, Kusterer K, Reschke B, Faust H, Usadel KH. Microcirculation in hyperglycemic patients with IDDM without diabetic complications-effect of low-dose angiotensin-converting enzyme inhibition. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998;106:45-50.
3. Aberkane H, Stoltz JF, Galteau MM, Wellman M. Erythrocytes as targets for gamma-glutamyltranspeptidase initiated pro-oxidant reaction. *Eur J Haematol* 2002;68:262-71.
4. Companti M, Signorini C, Buonocore G, Ciccoli L. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic Biol Med* 2002;32:568-76.
5. Franklin ME, Addison RS, Baker PV, Hooper WD. Improved analytical procedure for measurement of captopril in human plasma by gas chromatography - mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies. *J Chromatogr Biomed Sci Appl* 1998;705:47-54.
6. Creasey WA, Funke PT, McKinstry DN, Sugerman AA. Pharmacokinetics of captopril in elderly healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1986;26:264-8.
7. Ding PY, Chu KM, Hu OY, Huang GM, Jeng JJ, Chang A. Fosinopril: pharmacokinetics and pharmacodynamics in Chinese subjects. *J Clin Pharmacol* 1999;39:155-60.
8. Blumenthal M. Treatment of congestive heart failure. Experience with fosinopril. *Am J Hypertens* 1997;10(Suppl.):289-98.
9. Verho M, Luck C, Stelter WJ, Rangonwala B, Bender N. Pharmacokinetics, metabolism and biliary and urinary excretion of oral ramipril in man. *Curr Med Res Opin* 1995;13:264-73.
10. Ruf G, Gera S, Luus HG, Trenk D, de la Rey N, Löffler K, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ramipril and piritanide administered alone and in combination. *Eur J Clin Pharmacol* 1994;46:545-50.
11. Vasilyev AP. Estimation of red cell deformability index. *Laboratornoe Delo* 1991;9:44-6.
12. Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Pinna A, Gaspa L, Spano A, Madeddu P. Ramipril improves hemodynamic recovery but not microvascular response to ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2002;15:410-5.

13. Östergren J, Sleight P, Dagenais G, Danisa K, Bosch J, Qilong Y, et al. Impact of ramipril in patients with evidence of clinical or subclinical peripheral arterial disease. *Eur Heart J* 2004;25:17-24.
14. Arnold JM, Yusuf S, Young J, Mathew J, Johnstone D, Avezum A, et al. Prevention of heart failure in patients in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation* 2003;107:1284-90.
15. Siigur U, Ora E. Ühendlabori käsiraamat 2002. Tartu: Tartu Ülikooli Kliinikum; 2002.
16. Bartosz M, Kedziora J, Bartosz G. Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril. *Tree Rad Biol Med* 1997;23:729-35.
17. Fernandez MT, Silva MM, Mira L, Florencio Mh, Gill A, Jennings KR. Iron and copper complexation by angiotensin-converting enzyme inhibitors. A study by ultraviolet spectroscopy and electrospray mass spectrometry. *J Inorg Biochem* 1998;71:93-8.

### Summary

#### The effect of ACE inhibitors on iron-induced deformability of RBCs

We studied *in vitro* the effects of three ACE inhibitors at therapeutic concentrations on iron-caused alteration of deformability of red blood cells (RBCs). Ramipril and fosinopril act as pro-drugs; their active metabolites are ramiprilat and fosinoprilat. In our study, we used captopril, ramiprilat and fosinoprilat. Chromatographic migration of RBCs (a marker of their deformability) was

measured with and without pre-treatment with captopril, ramiprilat and fosinoprilat. The experiments showed that they all suppressed iron caused alteration of RBCs deformability already at therapeutic concentrations. The efficiency of the substances used was dependent on iron concentration.

kyllivi@ut.ee

**II. Teder K, Zilmer M, Kals J, Bender L, Kullisaar T, Hein H,  
Põder P, Pulges A, Zilmer K. Captopril expresses  
antioxidativity at therapeutic concentrations on different  
models (manuscript)**

## **Captopril expresses antioxidativity at therapeutic concentrations on different models**

Küllli Teder<sup>1</sup>, Mihkel Zilmer<sup>1</sup> PhD, Jaak Kals<sup>1,2</sup> MD, Lauri Bender<sup>1</sup>, Tiiu Kullisaar<sup>1</sup> PhD, Helina Hein<sup>1</sup>, Priit Põder<sup>2</sup> MD, Andres Pulges<sup>2</sup> PhD, Kersti Zilmer<sup>1</sup> PhD

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Tartu, 19 Ravila Street, Tartu 50411, Estonia

<sup>2</sup>Department of Cardiovascular and Thoracic Surgery, Faculty of Medicine, University of Tartu, 8 Puusepa Street, Tartu 51014, Estonia

Author for correspondence: Külli Teder, Department of Biochemistry, 19 Ravila Street, Tartu 50411, Estonia; Phone: +37 27 374 310, Fax: +37 27 374 312; E-mail: [kyllivi@ut.ee](mailto:kyllivi@ut.ee)

### **ABSTRACT**

**Background:** Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors have been available in clinical practice for treatment of several cardiovascular pathologies, but their all-possible molecular actions remains to be elucidated. As high-grade oxidative stress (OxS) is one of the key factors for several cardiovascular pathologies studies about different preventing influences of drugs on OxS-driven damages are urgently needed.

**Objective:** We studied the effects of captopril at therapeutic concentrations on oxy-resistance of non high-density lipoprotein (HDL) fraction (LPF) and iron-caused alteration of deformability of red blood cells (RBC), and measured its antioxidant activity and hydroxyl radical scavenging potency.

**Methods:** The resistance of LPF to oxidation was estimated by permanent monitoring of the formation of diene conjugates. Chromatographic migration of RBC, a marker their deformability, was measured with and without captopril pretreatment. The antioxidant activity of captopril was determined using a standard kit, and the hydroxyl radical scavenging potency of captopril was elucidated using terephthalic acid method.

**Results:** Captopril elongates the lag-phase of LPF ( $p < 0.05$ ) and avoids an iron-caused alteration of chromatographic migration of RBCs already at therapeutic concentrations ( $p < 0.05$ ). Captopril has relative high antioxidant activity and exhibit potency for scavenging of hydroxyl radicals.

**Conclusions:** According to this study we consider that, captopril acts as quite effective high-grade OxS-suppressing compound in several *in vitro* models. These findings facilitate to explain more clearly beneficial clinical effects of captopril.

**Key words:** captopril, cardiovascular diseases, iron, oxidative stress, plasma lipoproteins

## INTRODUCTION

Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors have been available in clinical practice for treatment of arterial hypertension, congestive heart failure and after acute myocardial infarction.<sup>1,34,35</sup> Recent evidence indicates their additional favorable clinical effects via hitherto not exactly known ways, even when used in patients without high blood pressure or left ventricular dysfunction.<sup>1</sup>

Besides general well-known cardiovascular risk factors morbidity and mortality of these diseases depends also on the severe prolonged oxidative stress (OxS) characterized as disturbed balance between pro-oxidants and antioxidative defense. The OxS plays crucial role in the pathogenesis and disease progression of cardiovascular diseases via several mechanisms including OxS-driven transformation of plasma lipoproteins. Excessive modification of plasma non high-density lipoprotein (HDL) fraction (LPF) is detectable specific change in atherogenesis.<sup>2-8</sup>

Any manipulation, which prevents plasma lipoproteins to excessive oxidation, decreases their atherogenicity, which is important aspect tested for several drugs. Studies have demonstrated that ACE inhibitor captopril, a derivative of proline, has antioxidative properties,<sup>13,14, 16-18</sup> which is advantages over other drugs without this effect<sup>8-10</sup> It has been shown that captopril inhibits oxidation of LDL *in vitro*.<sup>20,21</sup> In patients with diabetes mellitus type 1, using of ACE inhibitors is more recommended as well as compositions of LDL in these subjects are more susceptible to oxidation, which is additional factor that predisposes diabetics to cardiovascular disease.<sup>1,11,12</sup> Captopril therapy reduced fatal cardiovascular events by about one-half in diabetic patients with hypertension.<sup>22</sup>

Thus, it is necessary to continue investigations elucidating different possible ways of expression of antioxidativity of captopril. However, data about effects of captopril at therapeutic levels on oxidation of LPF (LDL+VLDL), as well as on deformability of RBC, are absent. In the present study we evaluated: a) the effects of captopril on oxidation of LPF at therapeutic concentrations; b) the preventing action of

captopril at therapeutic concentrations on the iron-caused alteration of deformability of RBC; c) antioxidant activity of solution of captopril compared with Trolox (a water-soluble analogue of vitamin E) standard and d) the hydroxyl radical scavenging potency of captopril (including its IC<sub>50</sub> value) concerning the therapeutic concentrations of captopril.

## **PATIENTS AND METHODS**

### **Subjects**

The Ethics Committee of the University of Tartu approved the study protocol. Blood samples from healthy volunteers aged 20 to 50 years were collected after an overnight fast and plasma was obtained by centrifugation at 1500 g for 15 min.

### **Reagents**

Captopril (1-[2(S)-3-mercapto-2-methylpropionyl]-L-proline), CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, terephthalic acid (1,4-benzenedicarboxylic acid), dextran sulphate Na-salt and all the other reagents, with an analytical grade, were purchased from Sigma (USA). All the used procedures met the criteria and principles described in basic literature.<sup>8</sup>

### **Isolation and Oxidation of LPF**

The LPF was precipitated from 2 ml twice diluted plasma by adding 0.2 ml precipitation reagent (dextran sulphate/magnesium chloride solution 1:1 of 2% of dextran sulphate and 2M MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0), vortexing for 1 min and centrifuging at 1500g for 10 min.<sup>23</sup> In order to remove EDTA, the pellet of LPF was suspended in 2 ml 0.9% phosphate-buffered saline and reprecipitated by adding 0.1 ml precipitation reagent, vortexing and centrifuging. The pellet of LPF was dissolved in 4% phosphate-buffered saline, its content of protein was assayed<sup>24</sup> and adjusted to 2 mg protein/ml for the study of oxidation of the LPF.

The resistance of LPF to copper-catalyzed oxidation (the lag phase of LPF) was assayed according to the method described earlier.<sup>8,23,25</sup> Briefly, peroxidation was initiated by the addition of a freshly prepared solution of CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O (0.045mM) to the LPF (2 mg protein/ml) and the oxidizability of the LPF was evaluated by continuous monitoring (time-dependent monitoring) of the formation of diene conjugates spectrophotometrically at an absorbance maximum of 234 nm at different intervals of incubation at 37°C. To determine the effect of captopril on oxidation of the

LPF the latter was pre-incubated with the drug (0.003, 0.005 or 0.03mM) for 10 min. The kinetics of diene formation (increase in absorbance versus time) can be divided into three phases: the lag phase (insignificant increase in diene absorption), the propagation phase (rapid increase in diene absorption) and the decomposition phase. The resistance to oxidation was defined as the length of the lag phase. <sup>[25]</sup> The lag phase/time was calculated from the interval between the intercept of the tangent of the slope of the curve with the time-scale axis.

### **Chromatographic Migration of RBC**

The maintenance of an ideal spatial form (ability for deformation) is crucial for RBC to guarantee an ideal passage through the capillaries and therefore assure adequate microcirculation. Chromatographic migration of RBC serves as a marker of the deformability as well as functionality of the plasma membrane of RBC and membrane-attacking very potent oxidative stressors (e.g. iron) is able to alter chromatographic migration of RBC. The procedure was based on the fact that normal RBC migrate and form almost identical spot on chromatographic paper under standard conditions, whereas the membrane-attacking pro-oxidants cause alteration of normal chromatographic migration. Determination procedure was based on the method described previously <sup>[26]</sup> and modified by us via the introduction of an additional iron-caused lipid peroxidation treatment of RBC. The latter allows assessing the resistance of RBC to membrane lipid peroxidation.

For the experiments the fasting venous blood was collected and RBCs were washed three times in 0.9% NaCl (centrifuged for 3 min at 500g after each wash). The washed and packed RBCs were diluted to 60% “hematocrit” in 0.9% NaCl. The suspension of RBCs (0.2 ml) was incubated for 60 min at 37°C with 0.3 ml 0.9% NaCl or with FeSO<sub>4</sub> at different concentrations. To determine the effect of captopril on the iron- caused alteration of chromatographic migration of RBC the latter were pre-incubated with the drug (0.005mM) for 10 min. Chromatographic paper filters (Filtrak-388 paper) were laid on the frames, 0.2 ml of 0.9% NaCl (an isotonic solution) was pipette onto the application point (center) of the filters and 0.02 ml of suspension of RBC (without or with iron) was pipette onto the same application point after 60 seconds. The diameters of both solvent and the sample spots were measured after 1 min and chromatographic migration of RBC values were calculated from ratio: diameter of the



sample spot/diameter of the solvent spot and expressed as arbitrary units. All assays were performed in triplicate.

### **Antioxidant Activity**

Antioxidant Activity serves as an indicator of the real antioxidant potency of a compound investigated. This parameter was determined for captopril using the commercial Total Antioxidant Status kit (Randox Laboratories, Ltd. Crumlin, UK). In this test, ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) was incubated with peroxidase (metmyoglobin) and  $H_2O_2$  to produce radical cation  $ABTS^+$ . The latter has a blue-green color, which was measured at 600 nm. The investigated compound causes suppression of production of this color to a degree, which is proportional to its total antioxidant capacity. The assay was calibrated via Trolox units and the antioxidant activity value was expressed as mmol/l.

### **Hydroxyl Radical Scavenging Potency**

Hydroxyl radicals are the most toxic free radicals, which cause damage to biomolecules and cells. Using a solution of terephthalic acid as a chemical dosimeter for hydroxyl radicals<sup>27</sup> the assay of hydroxyl radicals scavenging potency of captopril was performed. The terephthalic acid dosimeter solution contained 10mM terephthalic acid in 10mM sodium phosphate buffer at pH 7.5. Hydroxyl radicals were generated via the Fenton reaction by adding 0.01mM  $CuSO_4 \times 5H_2O$  and 1mM  $H_2O_2$  to the terephthalic acid dosimeter solution (10mM terephthalic acid in 10mM sodium phosphate buffer at pH 7.5). Captopril was dissolved in 0.9% NaCl and the latter was used as a control. The reaction product of terephthalic acid with hydroxyl radicals was measured fluorometrically at 312 nm excitation and 426 nm emission. The data were expressed as an inhibition of the peaks of terephthalic acid hydroxyl radicals by captopril in percentage. The  $IC_{50}$  value for captopril was calculated by sigmoidal dose-response (variable slope) analysis.

### **Statistical Analysis**

The results were expressed as the mean  $\pm$  SD. The One-Way ANOVA was used to compare the differences between captopril and control, and the  $IC_{50}$  value for captopril

was calculated by sigmoidal dose-response analysis (Prism 2.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ .

## RESULTS

As shown in Table 1 captopril significantly ( $p < 0.05$ ) elongates the lag-phase of the LPF at therapeutic concentrations ( $62 \pm 8$  and  $78 \pm 8$  min, respectively for 0.003 and 0.005 mM of captopril) compared with control ( $40 \pm 6$  min). At non-clinical level of captopril (0.03mM) such effect was not significantly higher.

Effects of captopril at therapeutic concentrations on the iron-caused alteration of chromatographic migration of RBCs are presented on the Figure. At therapeutic level captopril was able to avoid the iron-caused alterations of chromatographic migration of RBCs up to high (up to 0.4mM) concentration of iron.

Table 2 shows that captopril has remarkable antioxidant activity in comparison with Trolox, characterized by  $2.65 \pm 0.40$  mmol/l (Trolox standard has value 1.65 mmol/l).

On the basis of the enhancing effects on resistance of LPF and remarkable antioxidative activity of captopril we attempted to elucidate the hydroxyl radical scavenging potency of captopril. The data presented in Table 2 indicate that captopril scavenges hydroxyl radicals induced in the Fenton reaction. Based on the dose-dependent experiments we calculated its  $IC_{50}$  (a concentration of captopril required to reduce hydroxyl radicals formation to 50%), which was  $0.043 \pm 0.007$  mM.

## DISCUSSION

Our findings of this study were that captopril elongates the lag-phase of LPF and avoids an iron-caused alteration of chromatographic migration of RBC already at therapeutic concentrations as well as has relative high antioxidant activity and exhibit potency for scavenging of hydroxyl radicals.

Recent studies indicate that ACE inhibitors may provide multiple favorable effects even when used in patients without hypertension and heart failure.<sup>1</sup> There has been demonstrated the antioxidativity of captopril,<sup>13,14,16,17</sup> but absent definite evidence about mechanisms underlie such effects. Concerning the latter property it should be noted that the investigated concentrations of captopril were in most studies higher than used in actual clinical practice. The oral administration of captopril range is 50 - 100

mg per day results in plasma level 0.003 - 0.008 mM.<sup>28,29</sup> However, the effects of captopril at clinical levels on oxidation of LPF, as well as on deformability of RBC are unexplored.

This study revealed that pre-incubation with captopril at its therapeutic concentrations remarkably increased resistance of plasma LPF to oxidation (Table 1). Considering the recent evidence that modification of plasma LPF caused by severe OxS,<sup>2-8</sup> that plays the crucial in the pathogenesis of atherosclerosis, our data refer to possibility that one of the favorable effects of captopril may be its antiatherogenic action.

We also investigated the antioxidative effects of captopril *in vivo* (data not shown). In five hypertensive humans we measure different biomarkers related on OxS and atherogeneity before and after eight weeks treatment of captopril (100 mg per day). Although, the number of patients is too small for statistical analysis, captopril has distinct trend to reduce level of homocysteine (known both as pro-oxidant and an independent atherogenic factor) of the and diene conjugates and increase the lag-phase of oxidative LDL. These data also support evidence that captopril has several antioxidative and antiatherogenetic effects *in vivo*.

ACE inhibitors, including captopril, are reported to have some anti-inflammatory activity and are widely used in the treatment of congestive heart failure, chronic renal failure and diabetic nephropathy. Captopril has been found to be capable of providing protection against arrhythmias caused by ischemia - reperfusion. These and several other unhealthy conditions are accompanied by substantial release of iron. Free iron is an extremely potent pro-oxidant, which initiates the burst of highly toxic hydroxyl radicals.<sup>8</sup> Thus, any drug, which is able also to avoid the extremely adverse actions of iron, has a higher therapeutic impact compared with compounds lacking such effect. It has been shown that captopril is able at high concentrations (at non-clinical levels) to protect RBC from hemolysis caused by high concentrations of non-physiological pro-oxidants.<sup>30,31</sup> However, we demonstrated for the first time that already at therapeutic concentrations captopril was able to avoid the iron-caused alterations of deformability of RBC (Figure). This is quite interesting information regarding the following aspects: a) the maintenance of an ideal spatial form (ability for easy deformation) is crucial for RBC to guarantee an ideal passage through the capillaries and to sustain a needed microcirculation during any treatment, and b) established protective effect of captopril against free iron may be valid also concerning other blood cells. We agree with the conception that the protective effect of captopril is based not

only on its iron-binding properties,<sup>32</sup> as protective effect of captopril was expressed also at concentrations of iron which are higher than the level of iron-saturation of captopril (data not shown). Thus, captopril may diminish OxS-driven damages both via metal chelation and free radical scavenging.<sup>18</sup>

The antioxidativity of captopril should be rarely questioned, despite that has been demonstrated that captopril at therapeutic concentrations fails to enhance antioxidative properties as well as protect endogenous biomolecules against oxidative damage in human plasma.<sup>15,33</sup> It is obvious that short-time administration of therapeutic doses of captopril cannot to change the total antioxidant capacity of human plasma, because easy alteration of such basic homeostatic parameter of human plasma is avoided by special potent systems in human body. Our findings, that captopril has antioxidant activity and exhibit potency for scavenging of hydroxyl radicals (Table 2) support the knowledge about beneficial clinical effects, *via* reduction of high-grade OxS-driven events, of captopril in several clinical conditions. In addition, considering the information that the target-dose of captopril can be increased over 100 mg per day the value of IC<sub>50</sub> for hydroxyl radical scavenging potency of captopril holds also the attention.<sup>18</sup>

## **CONCLUSIONS**

We consider that, therapeutic concentrations of captopril enhance resistance of plasma LPF to oxidation as well as avoid an iron - caused alteration of chromatographic migration of RBC. Antioxidant activity and potency for scavenging of hydroxyl radicals of captopril (also supported by human pilot data, including decrease of homocysteine level) facilitate to explain more clearly beneficial clinical effects of captopril.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was supported by grants of the Estonian Scientific Foundation (5327) and authors also thank The Blood Centre of University Clinics of Tartu.

## REFERENCES

1. J.H. O'Keefe, M. Wetzel, R.R. Moe, K. Brosnahan and C.J. Lawie (2001) Should an angiotensin-converting enzyme inhibitor be standard therapy for patients with atherosclerotic disease? *Journal of the American College of Cardiology*, **37**, 1-8.
2. M.T. Quinn, S. Parthasarathy, L.G. Fong and D. Steinberg (1987) Oxidatively modified low-density lipoproteins a potential role in recruitment and retention of monocyte/ macrophages during atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **84**, 2995-2998.
3. H. Esterbauer, J. Gbicki, H. Puhl and G. Jürgens (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in the oxidative modification of LDL. *Free Radical Biology and Medicine*, **13**, 341-390.
4. D.A. Cox and M.L. Cohen (1996) Effects of low-density lipoprotein on vascular contraction and relaxation: clinical and pharmacological implications in atherosclerosis. *Pharmacological Reviews*, **48**, 1-19.
5. I. Jialal and S. Devaraj (1996) Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants and atherosclerosis: a clinical biochemistry perspective. *Clinical Chemistry*, **42**, 489-506.
6. G.H.R. Rao and S. Parthasarathy (1996) Antioxidants, atherosclerosis and thrombosis. *Prostaglandin, Leucotrienes and Essential Fatty Acids*, **54**, 155-166.
7. F. Calara, P. Dimayuga, A. Niemann, J. Thyberg, U. Diczfalusy, W.P. Witztum, P.K. Shah, B. Cercek, J. Nilsson and J. Rengström (1998) An animal model to study local oxidation of LDL and its biological effects in the arterial wall. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, **18**, 884-893.
8. B. Halliwell and J.M.C. Gutteridge (1999) Free radicals, other reactive species and disease. In *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition. Oxford University Press, New York.
9. O.I. Aruoma (1996) Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, 675-705.
10. W. Westlin and K. Mullane (1988) Does captopril attenuate reperfusion-induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals? *Circulation Supplement I*, **77**, 1-39.
11. A. Liguori, P. Abete, J.M. Hayden, F. Cacciatore, F. Rengo, G. Ambrosio, D. Bonaduce, M. Condorelli, P.D. Reaven, and C. Napoli (2001) Effect of glycaemic control and age on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in diabetes mellitus type 1. *European Heart Journal*, **22**, 2075-2084.
12. J. Valabhji and R.S. Elkeles (2001) Type 1 diabetes and ageing: does LDL oxidation mediate their associations with coronary heart disease? *European Heart Journal*, **22**, 2045-2047.
13. D. Bagchi, R. Prasad and D.K. Das (1989) Direct scavenging of free radicals by captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor. *Biochemical Biophysical Research Communications*, **158**, 52-57.
14. M. Chopra, N. Scott and J. McMurray (1989) Captopril: a free radical scavenger. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **27**, 396-399.
15. O.I. Aruoma, D. Akanumu, R. Cecchini and B. Halliwell (1991) Evaluation of the ability of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril to

- scavenging reactive oxygen species. *Chemical Biological Interactions*, **77**, 303-314.
16. Benzie, I.F.F., Tomlinson, B. & Critchley, A.H., 1997. Free radical scavenging activity of captopril in human plasma (letter). *Journal of Clinical Pharmacology*, **44**, 209-210.
  17. T. Hayek, J. Attias, J. Smith, J.L. Breslow and S. Keidar (1998) Antiatherosclerotic and antioxidative effects of captopril in apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, **31**, 540-544.
  18. M. Tamba and A. Torregani (2000) Free radical scavenging and copper chelation: a potentially beneficial action of captopril. *Free Radical Research*, **32**, 199-211.
  19. S. Keidar, J. Oikine, A. Leiba, C. Shapira, M. Leiba and M. Aviram (1994) LDL isolated from patients with essential hypertension exhibit increased propensity for oxidation and enhanced uptake by macrophage: a possible role for angiotensin II. *Atherosclerosis*, **107**, 71-84.
  20. E.G. Godfrey, J. Stewart, H.J. Dargie, J.L. Reid, M. Dominiczak, C.A. Hamilton and J. McMurray (1994) Effects of ACE inhibitors on oxidation of human low density lipoprotein. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **37**, 63-66.
  21. B. Zieden, D.M. Wuttge, B.E. Karlberg and A.G. Olsson (1995) Effects of in vitro addition of captopril on copper-induced low density lipoprotein oxidation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **39**, 201-203.
  22. L. Niskanen, T. Hedner, L. Hansson, J. Lanke and A. Niklason (2001) Reduced cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive diabetic patients on first-line therapy with an ACE inhibitor compared with a diuretic/beta-blocker-based treatment regimen: a subanalysis of the captopril prevention project. *Diabetes Care*, **24**, 2091-2096.
  23. A. Zhang, J. Vertommen, L. Van Gaal and I. De Leeuw (1994) A rapid and simple method for measuring the susceptibility of low-density-lipoprotein and very-low-density-lipoprotein to copper catalyzed oxidation. *Clinica Chimica Acta*, **227**, 159-173.
  24. O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
  25. H. Esterbauer, G. Striegl, H. Puhl and M. Rotheneder (1989) Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Research Communications*, **6**, 67-75.
  26. A.P. Vasilyev (1991) Estimation of red cell deformability index. *Laboratornoe Delo*, **9**, 44-46.
  27. J.C. Barreto, G.S. Smith, N.H.P. Strobel, P.A. McQuillin and T.A. Miller (1995) Terephthalic acid: a dosimeter for the detection of hydroxyl radicals in vitro. *Life Sciences*, **56**, 89-96.
  28. W.A. Creasey, P.T. Funke, D.N. McKinstry and A.A. Sugerman (1986) Pharmacokinetics of captopril in elderly healthy male volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology*, **26**, 264-268.
  29. M.E. Franklin, R.S. Addisson, P.V. Baker and W.D. Hooper (1998) Improved analytical procedure for measurement of captopril in human plasma by gas chromatography – mass spectrometry and its application to pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl.*, **705**, 47-54.

30. A.C. Fernandes, P.M. Filipe, J.P. Freitas and C.F. Manso (1996) Different effects of thiol and nonthiol ACE inhibitors on copper-induced lipid and protein oxidative modification. *Free Radical Biology and Medicine*, **20**, 507-514.
31. M. Bartosz, J. Kedziora and G. Bartosz (1997) Antioxidant and prooxidant properties of captopril and enalapril. *Free Radical Biology and Medicine*, **23**, 729-735.
32. J.P. Schaefer, Y. Tam, B.B. Hasinoff, S. Tawfik, Y. Peng, L. Reimche and N.R.C. Campbell (1998) Ferrous sulphate interacts with captopril. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **46**, 377-381.
33. D. Lapenna, S. De Gioia, G. Ciofani, F. Daniele and F. Cuccurullo (1996) Captopril has no significant scavenging antioxidant activity in human plasma in vitro or in vivo. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **42**, 451-456.
34. Dickstein K, Kjekshus J. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. *The Lancet* 2002; 360: 752-60.
35. ACE Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. Indications for ACE inhibitors in the early treatment of acute myocardial infarction: systematic overview of individual data from 100 000 patients in randomised trials. *Circulation* 1998; 97: 2202-12.

**Table 1.** The effects of captopril on lag-phase of plasma LPF.

Captopril concentration (mM)	Lag-phase of LPF (min)		Lag-phase increase by captopril (min)
	Control	Captopril	
0.003 (n= 4)	40 ± 6	62 ± 8	22 ± 12 (p < 0.05)
0.005 (n = 4)	40 ± 6	78 ± 8	38 ± 10 (p < 0.05)
0.03 (n = 4)	47 ± 7	89 ± 12	42 ± 15 (p ≤ 0.05)

All values are given as mean ± SD. LPF = non high-density lipoprotein fraction.

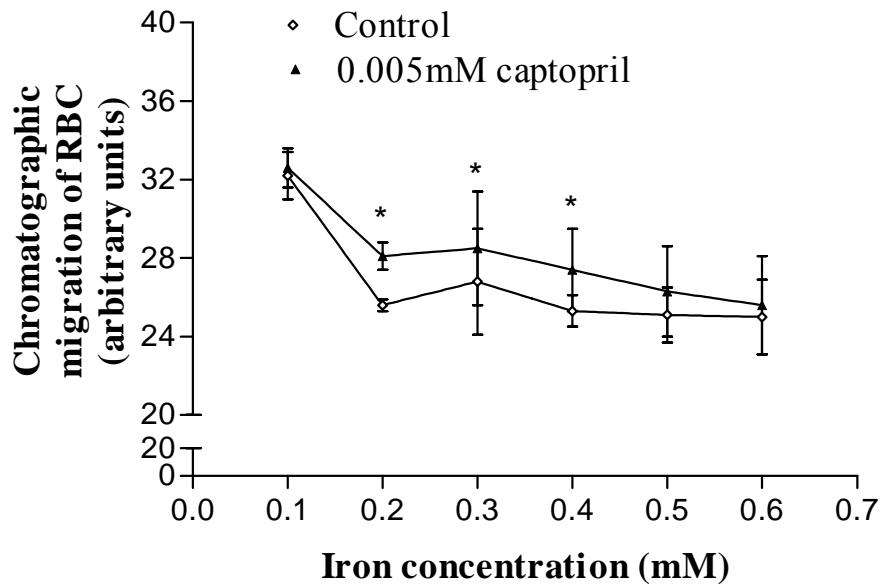


**Table 2.** Total antioxidative capacity and hydroxyl radicals scavenging potency of captopril.

Captopril concentration (mM)	Total antioxidant capacity (mmol/l)	IC <sub>50</sub> (mM)
0.03	2.65 ± 0.4 (n = 3)	0.043 ± 0.007 (n = 5)

All values are given as mean ± SD

IC<sub>50</sub> is the concentration of captopril that reduces formation of the hydroxyl radicals to 50% of its normal value (it is calculated based on a dose-dependent data from the hydroxyl radical scavenging experiments).



**Figure.** The protective effect of captopril on the iron-caused alteration of deformability of the red blood cells (RBC). Each point represents the mean  $\pm$  SD of six experiments. The arbitrary value of normal chromatographic migration of RBC was 32.2 and captopril does not change this value. At therapeutic concentrations (0.005 mM) captopril was able to prevent the influence of iron ( $p < 0.05$ ) up to 0.4 mM concentration of the latter. \*  $p < 0.05$  compared with control.