

Lipid Peroksidasyon Oluşumunun Engellenmesi Üzerine Verapamilin Etkisi

Burhanettin BAYDAŞ¹

Fahri BAYIROĞLU¹

Tahir KAHRAMAN²

Zahid AĞAOĞLU³

Ramazan ÜSTÜN¹

Özet

Bu çalışma, karbontetraklorür (CCl₄) uygulaması ile lipid peroksidasyon oluşumu ve hücre içi kalsiyum artışını bloke eden verapamil'in lipid peroksidasyonu önleme etkisi araştırılmak amacıyla planlandı. Bunun için toplam 24 adet albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar üç gruba ayrıldı. Birinci gruba sadece verapamil (5 mg/kg, i.p.), ikinci gruba sadece CCl₄ (0.4 ml/kg, s.c.) ve üçüncü gruba ise verapamil uygulandıktan bir saat sonra CCl₄ uygulandı. Bu uygulamalar iki gün süre ile tekrarlandı. İki gün sonra ratlardan eter anestezisi altında kan alınarak malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH), seruloplazmin ve vitamin C seviyeleri ölçüldü.

Karbon tetraklorür uygulanan ratlarda, malondialdehit miktarı diğer gruplara oranla yüksek bulundu. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; CCl₄ ile verapamil grupları ve CCl₄ ile CCl₄+verapamil grupları arasında belirgin bir farkın mevcut olduğu ve bunun istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlendi (P<0.05). Ancak, verapamil ile CCl₄+verapamil grupları arasında önemli bir farkın olmadığı gözlemlendi (P>0.05). Canlı organizmada antioksidan sistemin elemanları olarak bilinen GSH, seruloplazmin ve vitamin C değerleri açısından gruplar arasındaki farkların önemli olmadığı gözlemlendi (P>0.05). Malondialdehit miktarları göz önüne alındığında, bir kalsiyum kanal blokörü olan verapamilin, CCl₄ ile oluşturulan lipid peroksidasyon oluşumunu engelleyebileceği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Verapamil, Lipid peroksidasyon, Glutatyon, Seruloplazmin, Vitamin C, CCl₄

Summary

The Effect of Verapamil on Prevention of Lipid Peroxidation Formation

The purpose of this investigation was to find out whether CCl₄ cause lipid peroxidation generation and verapamil, calcium channel blocker, prevents lipid peroxidation generation. Twenty-four Wistar Albino rats were randomly divided into three groups. Following a week adaptation period, the rats in the first group were injected verapamil (i.p. .5 mg/kg), the second group was treated by CCl₄ and the third group were treated by verapamil one hour later following CCl₄ treatment. Treatments in all groups were repeated two consecutive days. The end of the treatment, the bloods with EDTA were collected from the hearts under the ether anesthesia. The analyses of MDA, GSH, seruloplasmin and vitamin C were performed.

MDA amounts were elevated in the rats treated with only CCl₄ in comparison with the other groups. The amount of the MDA were statistically differed between CCl₄ and verapamil groups and between CCl₄ and CCl₄ + verapamil groups. But the difference were not statistically important between verapamil and CCl₄ plus verapamil groups. At the same time, the levels of GSH, seruloplasmin and vitamin C, antioxidant system elements, were not different among the groups.

The results demonstrate that the treatment of verapamil, a Ca²⁺ channel blocker, was effective in normalizing lipid peroxidation induced by CCl₄.

Key words: Verapamil, Lipid peroxidation, Glutathione, Ascorbic acid, Ceruloplasmin, CCl₄

Giriş

Organizma için toksik bir madde olan karbon tetraklorürün (CCl₄), karaciğer hasarı ve lipid peroksidasyon oluşturma etkinliği çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (1,2,3). Karbon tetraklorürün toksik etkisi, organizmada metabolize olması sonucu oluşan ve aynı zamanda bir serbest radikal olan metaboliti triklorometil (CCl₃) yoluyla ortaya çıkmaktadır (4).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan poliansature yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile başlar. Bunun sonucu yağ asidi zinciri bir lipid radikali niteliği kazanır (5).

Lipid peroksidasyonu, doğrudan membran yapısına ve dolaylı olarak reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması nedeniyle reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerde meydana gelir. Membran permeabilitesi ciddi bir şekilde hasara uğrar. Peroksidasyon sonucu oluşan malondialdehit (MDA), membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve

¹ Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı-VAN.

² Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı-VAN.

³ Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı-VAN.

polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşiklerinin özelliklerini değiştirir (5,6).

Son zamanlarda lipid peroksidasyonu ile hücre içi Ca^{2+} seviyesi arasında önemli bir ilişkinin olduğu ve bunun da hücrede sitotoksik etkiyi artırdığı ileri sürülmektedir (7,8,9,10,11,). Yine, lipid peroksidasyona bağlı olarak artan hücre içi kalsiyumun hücre toksisitesini artırma etkinliğinin, kalsiyum kanal blokörlerinin kullanılmasıyla sitotoksik etkinin ve lipid peroksidasyon oluşumunun azaldığı tespit edilmiştir (1,2,8,12,13). Normal ve kalsiyum bakımından fakir yemlerle beslenen farelerde galaktozaminin; kalsiyum bakımından fakir yemlerle beslenenlerde normallere oranla daha az oranda lipid peroksidasyon oluşturduğu tespit edilmiştir(14).

Vitamin C ve redükte glutatyon (GSH) organizmada oluşan serbest radikalleri yakalayıp nötralize ederken, seruloplazmin, radikallerin oluşmasını engelleyen ve oluşan radikallerin yayılmasını engelleyen bir antioksidan sistem içinde yer alır (4).

Bu çalışmada, CCl_4 enjeksiyonuna bağlı olarak lipid peroksidasyon oluşma etkinliği ve verapamilin ne ölçüde lipid peroksidasyon oluşumunu engellediğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu çalışmada, 24 adet albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar, üç gruba ayrıldı. Her üç grupta yer alan ratlar aynı laboratuvar ortamında tutuldu ve üç gruba da standart rat yemi verildi. Laboratuvar ortamı 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık olacak şekilde ayarlandı.

1.Grup. Bu gruba iki gün süre ile sadece verapamil hidroklorür (Knol Alman İlaç ve Ecza. Tic. Ltd. Şti.) intraperitoneal (i.p) olarak 5 mg/kg dozunda enjekte edildi.

2.Grup. Bu gruba da sadece CCl_4 (Merck) iki gün süre ile 0.4 ml/kg dozunda subkutan enjekte edildi.

3.Grup. Bu gruba ise hem verapamil, hem de CCl_4 birlikte uygulandı. Verapamil (5 mg/kg) uygulandıktan 1 saat sonra CCl_4 (0.4 ml/kg) uygulandı.

Deneme süresinin sonunda, eter anestezisi altında kalpten kan alınarak, EDTA'lı tüplere aktarıldı. Glutatyon tüm kanda, vitamin C, malondialdehit ve seruloplazmin kan alımını takiben plazmada çalışıldı. Tüm kandaki glutatyon Beutler metodu ile (15), plazma vitamin C tayini 2,4-Dinitrofenilhidrazin ayırıcı kullanılarak (16), seruloplazmin değiştirilmiş Ravin metoduyla (17), malondialdehit tiobarbitürik asit reaktivitesi metodu (5) kullanılarak Perkin-Elmer Lambda 1A spektrofotometresinde kolorimetrik olarak ölçüldü. İstatistiksel analizler, Minitab paket programı kullanılarak bilgisayarda yapıldı.

Bulgular

Bu çalışmada, verapamil, CCl_4 ve CCl_4 ile birlikte verapamil uygulanan ratlara ait parametreler aşağıda tablo halinde verilmiştir.

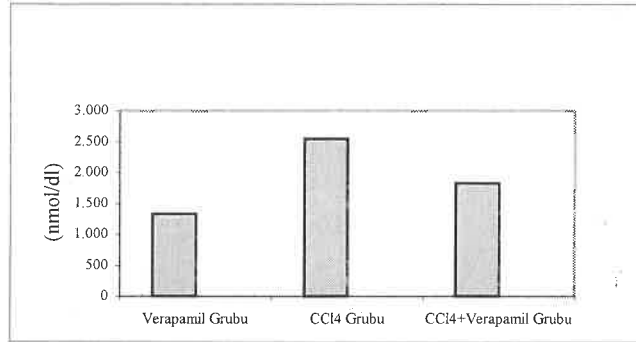
Tablo1. Deney gruplarına ait istatistiksel değerler (Aritmetik ortalama±Standart Hata)

Parametreler	N	Verapamil Grubu	CCl_4 Grubu	Verapamil+ CCl_4 grubu
Malondialdehit (nm/dl)	8	1.330±0.14	2.543±0.20 ^b	1.822±0.23 ^a
Glutatyon (mg/dl)	8	61.04±2.9	69.21±2.5	61.33±1.1
Vitamin C (mg/dl)	8	1.375±0.23	1.240±0.20	1.236±0.18
Seruloplazmin (mg/dl)	8	13.20±0.95	14.47±1.0	13.44±0.90

a: Verapamil grubu ile kıyaslandığında $P>0.05$, CCl_4 grubu ile kıyaslandığında $P<0.05$

b: Verapamil grubu ile kıyaslandığında $P<0.05$

Malondialdehit seviyelerine bakıldığında, gruplar arası farklılık bakımından, verapamil ve CCl₄ grupları arasında anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi (P<0.05). Verapamil grubu ile CCl₄+Verapamil grubu arasında aritmetik ortalama açısından bir miktar fark görülürken, istatistiksel anlamda önemli bir farkın olmadığı belirlendi (P>0.05). CCl₄ grubu ile CCl₄+Verapamil grubu arasında yine anlamlı bir farkın olduğu gözlemlendi (P<0.05).



Şekil 1. Malondialdehit değerlerinin grafiksel yorumu

Diğer taraftan, Vitamin C ve GSH seviyelerinde istatistiksel anlamda gruplar arasında önemli bir farkın olmadığı gözlemlendi (P>0.05). Seruloplazmin miktarlarında da yine gruplar arasında farkın önemli olmadığı saptandı (P>0.05).

Tartışma ve Sonuç

Karbon tetraklorür vücut için toksik bir madde olup, metabolize olması sonucu oluşan CCl₃ serbest radikal olarak etki göstermektedir. Dolayısıyla, organizmada lipid peroksidasyon oluşturma özelliğine sahip bir madde olarak karşımıza çıkmaktadır (1,2,3,4). Bilindiği gibi lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal bir olaydır. Olay otokatalitik olarak başladığında zincirleme olarak yürümektedir (6,18).

Verapamil, yavaş kalsiyum kanallarından kalsiyumun hücre içine girişini engelleyen bir ajandır. Bu özelliğinden faydalanılarak antiaritmik olarak kullanılmaktadır. Özellikle miyokard iskemisi ve reperfüzyon sırasında oluşan ventriküler aritmileri önlemede etkin bir kullanım alanına sahiptir (19). Son zamanlarda, içerisinde verapamilin de yer aldığı kalsiyum blokörlerinin lipid peroksidasyon oluşumunu engellediği görüşü ileri sürülmektedir (8,12,13,14).

Gubskii ve ark.(12) ratlarda kloroforus (0,0-dimethyl-(1-oxy-2,2,21-trichloroethylphosphonate), Sakaguchi ve ark. (14), farelerde endotoksin ve galaktozamin kombinasyonu enjeksiyonu ile lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığını ve bu artışın verapamil uygulanan grupta önlendiğini bildirmektedir. Nayler ve ark. (8), iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oluşan serbest radikallerin lipid peroksidasyonu artışına yol açtığını ve proflaktik olarak uygulanan verapamilin bu etkiyi önlediğini bildirmektedir. Rose ve ark. (20), intra peritoneal olarak E. coli verilen ratlarda hücre içi Ca²⁺ ve lipid peroksidasyonunun arttığı, oysa bir kalsiyum kanal blokörü olan diltiazem verilen grupta ise yukarıdaki değerlerin normale yakın seyrettiğini bildirmiştir. Aruoma ve ark.(13), verapamil ve beta-blokörü olan propranololün yeterli derecede, yüksek dozda kullanıldıklarında organizmada bir antioksidan sistem gibi etki gösterdikleri ve membranlarda oluşan lipid peroksidasyonu önledikleri görüşünü ileri sürmüştür.

Bu çalışmada, lipid peroksidasyonu göstergesi olarak kabul edilen MDA seviyesinin gruplar arası dağılımı da, Ca²⁺ ile MDA oluşumu arasında bir ilişkinin olduğu görüşünü desteklemektedir. Zira, CCl₄ verilen ratlarda MDA seviyesinin, CCl₄ ile birlikte verapamil verilen gruba oranla daha yüksek olduğu (2.5430±20, 1.822±023) ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (P<0.05). Malondialdehit lipid peroksidasyonun göstergesi olarak kabul edildiğinden, CCl₄'e bağlı olarak lipid peroksidasyon artışı olduğu ve bunun verapamil verilen grupta normal düzeylerde seyrettiği görülmektedir. Ancak antioksidan maddeler olarak kabul edilen redükte glutatyon, seruloplazmin ve vitamin C

değerlerinde aritmetik ortalama bakımından küçük çapta değişikliklere rastlandı ise de istatistiksel olarak bu değişikliklerin anlamlı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

Hücre içi kalsiyum artışı ile lipid peroksidasyon arasındaki ilişki bir çok araştırmacı tarafından kaleme alınmıştır. Kalp kasında hasar oluşturan doxorubicin (7) ve nefrotoksik bir madde olan okratoksin A'nın (10), uygulanması ile lipid peroksidasyon oluşumu ve hücre içi Ca^{2+} artışının paralellik gösterdiği tespit edilirken, nicorandilin iskemi-reperfüzyona bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonu önlediği bildirilmektedir. Nicorandilin etkisinin hücre içi Ca^{2+} artışını önlemek olduğu bilinmektedir (11).

Sakaguchi ve ark. (14), kalsiyum bakımından fakir ve normal diyetle beslenen farelerde, endotoksin+galaktozamin kombinasyonunun lipid peroksidasyon oluşturma etkinliğini araştırırken, kalsiyum açısından fakir yemlerle beslenen farelerde lipid peroksidasyonun normallere kıyasla daha az bir artış gösterdiğini gözlemlemiştir.

Bütün bunların aksine, birçok fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonların düzenleyicisi olarak kabul edilen Ca^{2+} 'un, lipid peroksidasyonu artırdığı görüşünü abartılı olarak değerlendiren araştırmacılar da vardır (9).

Sonuç olarak, Ca^{2+} ile lipid peroksidasyon oluşumu arasında bir ilişkinin olabileceğini ve özellikle oluşan lipid peroksidasyonun membrandaki Ca^{2+} -ATPaz enzim aktivitesini bozarak hücre içi Ca^{2+} seviyesini artırdığı ve bunun da lipid peroksidasyonu oluşturmuş olabileceği düşünülmektedir. Buna bağlı olarak, kalsiyum kanal blokörü verapamilin hücre içi kalsiyum artışını bloke ederek bu etkiyi önleyebileceği kanaatine varılmıştır.

Kaynaklar

- 1-Erwin JL, Naukam RJ, Rama Saitry BV: Effect of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents, *Biochem. Pharmacol.* 35 (4): 697-705 (1986).
- 2-Itoh S, Shinji G, Shuichi M, Yoshitaka Y: Effect of calcium antagonist diltiazem on liver content and necrosis of hepatocytes in rats following treatment with CCl_4 , *Res. Commun. Chem. Pathol. and Pharmacol.* 60 (1): 133-136 (1988).
- 3-Morini P, Casalino E, Sblano C, Landriscina C: The response of rat liver lipid peroxidation, antioxidant enzyme activities and glutathione concentration to the thyroid hormone, *Int. J. Biochem.* 23 (10): 1025-1030 (1991).
- 4-Özdem SS, Şadan G: Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve klinik açıdan önemi, *Akd. Ü. Tıp Fak. Derg.* 11(1): 63-71 (1994).
- 5-Akkuş I: Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, *Mimozayayımları*, Konya, 1-60, (1995).
- 6-Basago HS: Biochemical aspect of free radicals, *Biochem. Cell. Biol.* 68: 989-998 (1990).
- 7-Fu LX, Sjoren KG, Liang QM, Waagstein F, Hoebeke J, Hjalmanson A: Activity of receptors coupled to guanine nucleotide binding regulatory protein in dexorubicin induced cardiomyopathy, *Cardiovasc. Res.* 25(2): 145-150 (1991).
- 8-Nayler WG: Basic mechanism involved in the protection of the ischaemic myocardium. The role of calcium antagonists, *Drugs.* 42 (2): 21-2 (1991).
- 9-Gupta M, Kale RK: Paradoxical influence of (Ca^{2+}) on lipid peroxidation, *Indian. J. Experiment. Biol.* 34 (11): 1071-1076 (1996).
- 10-Chong X, Rahimtula AD: Alterations in ATP-dependent calcium uptake by rat renal cortex microsomes following ochratoxin A administration in vivo or addition in vitro, *Biochem. Pharmacol.* 44 (7): 1401-9 (1992).
- 11-Zhang YM, Zhao DH, Sheng BH: Protective effects of nicorandil on myocardial mitochondria function during ischaemia and reperfusion. *Yao. Hsueh. Hsueh. Pao.* 26 (2): 144-146. (1991). (Abstrakt).
- 12-Gubskii Iul, Litvinova NV, Primak RG, Kurskaia N.M: Perekisno oksidatsiya lipidov i transport Ca^{2+} v mikrosomakh pecheri krys pri intoksikatsii khlorofosom ideistvii atropina i verapamila. *Ukr. Biokhim. Zh.* 66 (1): 73-78 (1994).
- 13-Aruoma OI, Smith C, Cechini R, Evans PS, Hallivell B: Free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation by beta-blockers and by agents that interfere with calcium metabolism. A physiologically-significant process, *Biochem. Pharmacol.* 42 (4): 735-743 (1991).
- 14-Sakaguchi S, Yokota K: Role of Ca^{2+} on endotoxin-sensitivity by galactosamine challenge lipid peroxide formation and hepatotoxicity in zymosan-primed mice, *Pharmacol. Toxicol.* 77 (2): 81-86 (1995).
- 15-Beutler E, Duran O, Kelly BM: Improved method for determination of blood glutathione, *J. Lab. & Clin. Med.* 61: 882-888 (1963).
- 16-Omaye ST, Turnbull Savberlich HE: Selected methods for determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. *Methods in Enzymology.* Vol:2, p.7-8(1979).
- 17-Yenson, M.: *Klinik Biyokimya*, İstanbul (1986).
- 18-Krinsky NI: Membran antioxidant. *Ann. NY. Acad. Sci.* 551: 17-31 (1988).
- 19-Kayaalp O.: *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. Altıncı Baskı. Cilt:2, Feryal, Matbacılık, Ankara (1992).
- 20-Rose S, Thompson KD, Sayeed MM: Ca^{2+} -related hepatocellular alterations during intra-abdominal sepsis, *Am. J. Physiol.* 263(3 Pt 2): R553-R558 (1992).