

Trimetazidin'in Eritrosit Lipid Peroksidasyonu ve Glutasyon Düzeyine Etkisi

THE EFFECTS OF TRIMETAZIDINE ON ERYTHROCYTE LIPID PEROXIDATION AND GLUTATHIONE LEVELS

Dildar KONUKOĞLU*, H.Hüsrev HATEMİ**, Tülay AKÇAY***, Ertuğrul TAŞAN****

* Doç.Dr.İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya AD,
** Prof.Dr.İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD,
*** Prof.Dr.İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya AD,
**** Doç.Dr.İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları AD, İSTANBUL

Özet

Trimetazidin'in (TMZ)'in antioksidan etkisinin olup olmadığı esansiyel hipertansiyonu olan 15 hastada araştırıldı. TMZ, hastalara 60 mg/gün olarak (oral) 7 gün verildi. İlaç öncesi ve ilaç kullanımından 7 gün sonra eritrosit lipid peroksidasyonu ve glutasyon düzeylerini tespit etmek için kan örnekleri alındı. Eritrosit malondialdehid (MDA) düzeyi lipid peroksidasyonun göstergesi olarak tloharhiturik asit yöntemi ile, eritrositlerde bulunan en önemli antioksidan (dan glutasyon Beutler yöntemi ile tayin edildi. 7 günlük TMZ uygulamasından sonra, hem eritrosit MDA hem de glutasyon düzeyi ilaç öncesi düzeylerine göre anlamlı derecede farklılık gösterdi. Eritrosit MDA düzeyi önemli derecede düştü ($p < 0.001$) ve glutasyon düzeyleri ise önemli oranda arttı ($p < 0.001$).

Bu sonuçlar TMZ'nin iskemik koşullarda lipid peroksidasyonu azalttığı ve antioksidan kapasiteyi artırdığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Lipid peroksidasyon, Malondialdehit, Glutasyon, Trimetazidin

T Klin Kardiyoloji 1997, 10:73-77

Oksijen metabolizması, serbest oksijen radikalleri olarak tanımlanan oldukça reaktif moleküllerin oluşmasına yol açar. Normal koşullar altında oluşan bu serbest radikaller süperoksit radikali, hidroksil radikali, hidroperoksid radikali olup hücre içi (Glutasyon (GSH), Glutasyon pe-

Geliş Tarihi: 09.05.1997

Yazışma Adresi: Dr.Dildar KONUKOĞLU
İÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Biyokimya AD, İSTANBUL

T Klin J Cardiol 1997, 10

Summary

We studied the antioxidant effect of trimetazidine on erythrocytes from 15 essential hypertensive patients. Trimetazidine was given to patients by per oral at 60 mg/day (20ingx 3) for seven days. Before and after seven days treatment, the blood specimens were obtained for determination of erythrocyte lipid peroxidation and glutathione (GSH) levels. Erythrocyte malondialdehyde was determined as a marker of lipid peroxidation by thioharhituric acid assay. GSH, an important antioxidant in erythrocytes, was assayed by Beutler methods. After seven day TMZ treatment, both erythrocyte MDA and GSH levels were significantly different when compared with pretreatment levels. Erythrocyte MDA levels were significantly decreased ($p < 0.001$) and GSH levels were significantly elevated ($p < 0.001$) after seven day TMZ treatment.

These results suggest that TMZ was decreased erythrocyte lipid peroxidation and elevated antioxidant status in ischaemic conditions.

Key Words: Lipid peroxidation, Malondialdehyde, Glutathione, Trimetazidine

T Klin J Cardiol 1997, 10:73-77

roksidaz, süperoksit dismutaz) ve hücre dışı antioksidan sistemler (E ve C vitamini, serüloplazmin, transferrin vs.) tarafından yok edilir, iskeminin yol açtığı radikal üretimi veya antioksidan sistemlerdeki yetersizlik hücre membranında lipid peroksidasyona yol açarak hücre harabiyetine neden olmaktadır (1). Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun önemi, ilk kez 40 yıl önce atrosklerotik insan aortasında saptanmış (2) ve bunu izleyen çalışmalarla destek kazanmıştır. Atrosklerotik lezyonun şiddeti ile aorta duvarında oluşan lipid

konsantrasyonu arasında güçlü pozitif korelasyon saptanmış, lipid peroksidasyonunun antitrombin III aktivitesini inhibe ederek prokoagulan aktivite gösterdiği ve trombosit agregasyonunda artışa yol açtığı gözlenmiştir (3-5). Lipid peroksidasyonunun potansiyel rolü aterosklerotik diyet alan hayvanlarda serum ve aorta lipid peroksidasyonunda artışın gösterilmesi ile desteklenmiştir (6).

Hipertansiyon gelişiminden sorumlu faktörlerden biri hücre hasarıdır. Myokard ve endotel hücreleri yanısıra eritrositlerdeki hasarın da önemli olduğu gözlenmiştir (7). Serbest oksijen radikallerindeki artış lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre hasarına yol açmakta, meydana gelen iyon transport sistemlerindeki bozulma, hücre içi kalsiyum artışı ve fibrozis artışı hipertansiyondaki damarsal lezyonlardan sorumlu tutulmaktadır (8). Ayrıca lipid peroksidasyonu prostasiklin üretimini inhibe ederek damar tonusunda artışa da yol açabilmektedir (9).

Trimetazidin (TMZ) sitoprotektif ve anti-iskemik özellikleri ile miyokard iskemisi tedavisinde kullanılan bir ajandır. Asidozu azalttığı iskemik miyokard hücreleri metabolizmasını düzenlediği çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir (10,11). Sitoprotektif etkisinin oksijen serbest radikal hasarını azaltmasından kaynaklandığı ileri sürülen hipotezler arasındadır (12).

Çalışmamızda 7 gün terapötik dozda trimetazidin verilen esansiyel hipertansiyonlu kişilerde trimetazidin eritrosit lipid peroksidasyonuna olan etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla eritrositlerde lipid peroksidasyonu göstergesi olan malondialdehit (MDA) ve hücre içi bir antioksidan olan GSH düzeylerini belirledik.

Materyel ve Metod

Çalışma gruplarımızı; 15 esansiyel hipertansiyonlu hasta (8 kadın, 7 erkek, yaş ortalaması 48±10) ve 15 sağlıklı kontrol (7 kadın, 8 erkek, yaş ortalaması 43±8) oluşturdu. Hasta grubunun ortalamama kan basınçları 165/95 mmHg idi. Hastalar karaciğer ve böbrek bozukluğunu gösteren herhangi bir klinik ve biyokimyasal bulgu taşımıyorlardı ve uygulama sırasında gördükleri antihipertansif tedavide (diüretik+p bloker) herhangi bir değişiklik

yapılmadı. Her iki gruptaki kişiler sigara kullanmıyorlar; herhangi bir lipid düşürücü ilaç veya C ve E vitamini almıyorlardı. Hasta gruplarındaki kişilere 7 gün süresince TMZ 3 x 20 mg/gün dozunda peroral uygulandı.

Hasta grubunda ilaç tedavisinden önce ve tedaviden 7 gün sonra olmak üzere 2 kez, kontrol grubunda ise bir kez gece 12 saat açlıktan sonra EDTA'lı venöz kan alındı. Kan örnekleri 2000 rpm'de santrifüj edilerek plazma ve buff coat ayrıldıktan sonra eritrositler soğuk %0.9'luk NaCl ile 3 kez yıkandı. GSH tayini kan örneklerinin alındığı gün içinde yapıldı. Yıkandığı eritrositler MDA tayinine kadar -70 C dondurularak saklandı.

Eritrosit GSH Tayini: Eritrositlerdeki protein dışı sültürhidril gruplarını oluşturan redükte glutatyon bir disülfid kromojeni olan 2 nitrobenzoik asidi indirger, indirgenmiş kromojenin absorbansının 412 nm'de spektrofotometrik ölçümü, eritrosit GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (13). GSH değerleri $\mu\text{mol/g}$ hemoglobin olarak ifade edilmiştir.

Eritrosit MDA Tayini: Yağ asidi oksidasyonu son ürünlerinden biri olan MDA, tiobarbitürik asit ile reaksiyona girerek 532 nm'de spektrofotometrik olarak absorbans veren renkli bileşikler oluşturmaktadır (14). MDA değerleri, Standard olarak kullanılan 1,1',3,3' tetrametoksipropandan elde edilen molar ekstinksiyon katsayısı ($1.56 \times 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) kullanılarak nmol/g Hb olarak hesaplanmıştır.

Kullanılan tüm kimyasal malzeme Sigma Chem Co.'dan elde edilmiş olup analitik özelliindedir. Çalışmada kullanılan TMZ, Servier Firmasının Vastarel adlı ilacı olup, ticari şekli ile kullanılmıştır.

İstatiksel karşılaştırmalarda paired ve unpaired student t kullanılmış ve $P < 0.05$ değerleri istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Sonuçlar

Kontrol grubunun eritrosit MDA ve GSH düzeyleri sırayla $210 \pm 40 \text{ nmol/gHb}$ ve $13.4 \pm 0.8 \text{ M} \cdot \text{mol/gHb}$ olarak saptandı. Hasta grubunun ilaç öncesi eritrosit MDA düzeyi $440 \pm 52 \text{ nmol/gHb}$ olup, 7 günlük ilaç kullanımından sonra 300 ± 45

Tablo 1. Trimetazidin(TMZ)'in eritrosit malondialdhit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyine etkisi

	MDA (nmol /gHb)	GSH (umol/gHb)
Kontrol grubu(n: 15)	210±40	13.4±1.8
Esansiyel Hipertansiyon grubu (n:15)		
TMZ Öncesi	440±52*	9.7±1.5*
TMZ Sonrası	300±45 ^{a,c}	14.2*0.8 [^]

(a) Kontrol grubu ile karşılaştırma $p<0.001$

(b) Kontrol grubu ile karşılaştırma $p<0.05$

(c) İlaç öncesi değerleri ile karşılaştırma $p<0.001$

nmol/gHb olarak bulundu, ilaç kullanımı sonrasında eritrosit MDA değeri istatistiksel olarak anlamlı bir düşme gösterdi ($p<0.001$). Eritrosit glutatyon düzeyi ilaç öncesi 9.7 ± 1.5 p.mol/gHb olup, ilaç sonrası anlamlı derecede yükselmişti (14.2 ± 0.8 fimol/gHb $p<0.001$). İlaç öncesi değerler kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında; eritrosit MDA düzeyi yüksek ve GSH düzeyi anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.001$ ve $p<0.001$). İlaç kullanımından sonra; eritrosit MDA düzeyi kontrol değerlerinden yüksekti, ($p<0.05$) ancak GSH değerleri kontrol grubundan farklı bulunmadı (Tablo 1).

Tartışma

Serbest oksijen radikallerinin iskemik hasarındaki rolü çeşitli antioksidanların kullanımı ile deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (15,16). Bunun yanısıra çeşitli patolojilerde tedavi maksatlı kullanılan ajanların, antioksidan etkilerinin olup olmadığı araştırılmaktadır (16,17).

Çalışmamızda esansiyel hipertansiyonlu hastalarda eritrosit lipid peroksidasyon düzeyinin arttığını ve antioksidan kapasitenin azaldığını saptadık. Harman D ve ark.(18) serbest radikal reaksiyonlarının ateroskleroza neden olarak hipertansiyon etiolojisinde rol oynadığını saptamış, bir diğer çalışmada gebelik toksemisindeki hipertansiyonun serum lipid peroksidasyon düzeyindeki artışla ilişkili olduğu gösterilmiştir (19). Bu nedenle hipertansiyonun yol açtığı iskemik ortamı serbest oksijen radikallerinde artış meydana getirerek hücredeki oksidatif hasardan sorumlu tutulabilir. İskemik, anaerobik metabolizmada artışa ve aşırı laktat ve H

iyonu oluşumu ile asidoza yol açarak, enzimatik mekanizmaları bozar ve bu da iyon dengelerindeki bozulmayla sonuçlanır. Diğer taraftan, fosfolipaz aktivasyonu membran fosfolipidlerinin hidrolizine yol açmakta ve oluşan aşırı miktarda serbest radikal, çoklu doymamış yağ asidi oksidasyonunda artışa neden olarak hücre membran hasarını arttırmaktadır (20,21).

Çalışmamızda aynı zamanda TMZ'nin iskemik ortamlarda antioksidan etkisinin olup olmadığını araştırdık. Hipertansif hastalara uyguladığımız 7 günlük oral TMZ tedavisi sonrasında eritrosit lipid peroksidasyon düzeyleri tedavi öncesi düzeylerine göre anlamlı derecede azaldı ve antioksidan kapasite arttı. TMZ'nin hipertansiyondaki kullanımına ait literatürde bir veriye rastlamadık. Yapılan çalışmaların çoğunluğu koroner iskemik ve reperfüzyonunda TMZ'nin sitoprotektif etkisinin incelenmesini kapsamaktaydı (22,23). Bu çalışmalarda TMZ'nin hücre içi kalsiyum artışı, tromboksan A₂ üretimini ve nötrofil aktivasyonu azalttığı gözlenmiştir. İskemik-reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikallerinin öneminin anlaşılmasından sonra (20) TMZ'nin bu yöndeki etkilerinin olup olmadığı araştırılmaya başlanmış, ancak farklı bulgular elde edilmiştir. Maridonneau I ve ark. (12) 7 gün TMZ tedavisi görmüş sağlıklı kişilerden alınan örneklerden elde ettikleri eritrositleri süperoksit anyonu oluşturan fenazın metasülfat ve Cu-Zn süperoksit dismutaz inhibitörü olan dietildithiokarbomat ile inkübe etmiş ve hücrelerde MDA konsantrasyonunun düştüğünü göstermişlerdir. Guarnieri C ve ark. (24) ise progressif akciğer damar hasarı yapan bir ajan olan pirolizidin alkaloid monokrotalin'in etkisinin TMZ ile azaldığını

saptamıştır. Ayrıca bu çalışma sonucunda TMZ'nin fizyolojik koşullarda dokular üzerinde görülen hiç bir antioksidan etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Vedrinne JM ve ark.(23) koroner arter bypass graft cerrahisinde TMZ'nin kardiyoprotektif etkisi olmadığını ve plazma MDA düzeyinde değişiklik yapmadığını ileri sürmüşlerdir. Tsımoiyannis EC ve ark.(25) TMZ'nin karaciğer iske mi/reperfüzyon hasarında da etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Fantini E ve ark.(26) TMZ'nin sitoprotektif etkisinin antioksidan aktivite yolu ile olmadığını lipid metabolizmasını düzenlemek yolu ile sağlandığını gözlemişlerdir.

Araştırmamızın sonuçları TMZ'nin antioksidan etkilerinin olduğu yönündedir. Serbest oksijen radikallerinin üretildiği mekanizmalar arasında hücre içi kalsiyum artışının yol açtığı fosfolipaz aktivasyonu ve nötrofil aktivasyonu, ve araşidonik asit metabolizmasındaki artış yer almaktadır (20). TMZ muhtemelen bu mekanizmalar üzerinde etkili olmak suretiyle (22,23) lipid peroksidasyon düzeyinde azalmaya yol açmaktadır. Diğer yandan TMZ'nin hücreden GSH kaybını azaltmak suretiyle GSH düzeyini arttırdığı, ancak antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde etkisinin olmadığı da bildirilmiştir (27). Biz de TMZ tedavisi sonrasında eritrosit GSH düzeylerinin arttığını ve kontrol düzeylerine eriştiğini gözledik. Ancak lipid peroksidasyon düzeyi 7 günlük ilaç kullanımı sonrasında kontrol düzeylerine düşmemiştir. Bu da lipid peroksidasyon artışından sorumlu çok sayıda mekanizmaların tamamen düzeltilmesi için gereken sürenin daha uzun olduğunu veya bazı mekanizmalar üzerinde TMZ'nin yetersiz kalabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak esansiyel hipertansiyonlu hastalarda 7 günlük terapötik dozda TMZ uygulanması eritrositler üzerinde anlamlı bir antioksidan etki göstermektedir. Bulgularımız TMZ'nin lipid peroksidasyonunu azaltarak hücreyi koruduğu yönündeki gözlemleri desteklemektedir.

KAYNAKLAR

- Olson TA, Kabayashi S. Antioxidants in healthy and disease PSEBM 1992; 2000:245-7.
- Glavind J, Hartmans S, Clemmensen J. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II the presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. Acta Pathologica et microbiologica Scandinavica 1952; 30:1-6.
- Harland WA, Gilbert ID, Stell G. Lipids of human atheroma. The occurrence of a new group of polar steno! esters in various stages of human atherosclerosis. Atherosclerosis 1971; 13:239-46.
- Gray E, Borowcliff TW. Inhibitor of antithrombin III by lipid peroxides. Thromb Res, 1985; 37:241-50.
- Borowcliff TW, Gutteridge JM, Gray E. Oxygen radicals, lipid peroxidation and the coagulation system. Agent Actions 1988; 22:347-8.
- Heinle H, Liebich H. The influence diet induced hypercholesterolemia on the degree of oxidation of glutathione in rabbit aorta. Atherosclerosis 1980; 37:637-40.
- Canestrari F. Erythrocyte Na K ATP ase properties and adenylate energy change in normotensives and in essential hypertensives. Clin Chim Acta 1994 ; 31:167-79.
- Mc Innes GT. Hypertension; investigation, assessment and diagnosis. Br Med Bull 1994; 50(2):443-59.
- Tribble DL, Aw TK, Jones DP. The pathophysiological significance of lipid peroxidation in oxidative cell injury. Hepatology 1988; 7:377-81.
- Lavanchy N. Anti-Ischemic effects of trimetazidine: ³¹P NMR Spectroscopy in the isolated rat heart. Arch Int Pharmacodyn Ther 1987; 286:97-110.
- Timour Q. Is the antianginal action of trimetazidine independent of hemodynamic changes? Cardiovasc Drugs Ther 1991; 5:1043-44.
- Maridonneau PI, Harpey C. Trimetazidine protects the human red blood cell against oxygen free radical damage. Cardiovasc Drugs and Ther 1990; 4:81-89.
- Beutler E, Duran O, Kelly BM. Improved method for determination of blood glutathione. J Lab Clin Med 1963; 61:888-92.
- Buege J, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 1978; 52:302-10.
- Jeroudi MO, Hartley CJ, Bolh R. Myocardial Reperfusion injury role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. Am J Cardiol 1994; 173 (10):2-7.
- Halliwell B. Drug antioxidant effects. Drugs 1991; 42 (4):569-605.
- Konukoğlu D, Çelik Ç, Akçay T, Hatemi H. Gliklazid uygulanan STZ Diyabetik sıçanların Karaciğer, Böbrek ve Abdominal Aorta dokularının glutatyon ve malondialdehid düzeyleri. Klinik Gelişim 1995; 8:3566-69.
- Harman D. Nutritional implications of the free-radical theory of aging. J Am Coll Nutr 1982; 1:27-37.
- Winken D, Wilkins MH, Lunec J, Ball G, Dormandy TL. Free radical oxidation products in plasma in normal and abnormal pregnancy. Ann Clin Biochem 1981; 18:158-62.
- Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. British Med Bulletin 1993; 49(3):700-18.
- Diaz-Velez CR, Sivto G-C, Mendoza Ramoz E, Hernandez LE. Increased malondialdehyde in peripheral blood of patients with congestive heart failure. Am Heart J 1996; 131:146-52.

- 22, Renaud JF. Internal pFI, Na⁺ and Ca⁺⁺ regulation by trimetazidine during cardiac cell asidosis. *Cardiovasc Drags Ther* 1988; 1:677-86,
- 23, Vedrinne JM, Vcdrinne C, Bompard D, Lehot JJ, Boissell JP, Champsau G. Myocardial production during coronary by pass graft surgery:a randomized, double blind, placebo controlled study with Trimetazidine. *Anest Analg* 1996; 82(4):712-8.
- 24, Guarnieri C, Muscari C. Benefical effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac muscle.*Cardiovasc Drags Ther* 1990; 4:814 -5.
25. Tsimoyiannis EC, Moutesidovi KJ, Moschos CM, Karayianni M, Karkabounos S, Kotoulas OB. Trimetazidine for prevention of hepatic injury induced by ischemia and reperfusion in rats. *Eur J Surg* 1993; 159(2):89-93.
26. Fantini E, Demaison L, Sentev E, Grynberg A, Athias P. Some biochemical aspects of the protective effects of trimetazidine on rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26(81):949-58.
27. Charlon V. de Leiris J. Effect of a 5 days trimetazidine pre-treatment in a model of ischemic and reperfused isoled rat heart.In Emerit I, ed. *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*. Plenum, New York, 1990.