

ARI ZEHİRİNİN KARDİYOTOKSİK ETKİSİ: İN VİTRO ÇALIŞMA

Murat Ayaz¹, Hülagu Banşkaner², Hatice Baysal², Yusuf Küçükbağrıaçık¹

¹Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyofizik AD, Konya.
²Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Farmakoloji AD, Konya.

ÖZET

Amaç: İmmunolojik duyarlılık ve ısırılma sayısına bağlı olarak, zehir ile gelişen toksisite ciddiyeti değişmesine rağmen hedef organlar için özellikle kardiovasküler sistem üzerindeki etki mekanizması henüz net değildir. Dolayısı bu çalışmada zehrin tüm kalp langendorff prepatlarında doz bağımlı direk etkileri araştırılmıştır. **Metod:** Bu çalışmada, sıçan kalbinde *Apis Mellifera* zehrinin ($LD_{50}=3333 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) in vitro doza bağımlı kardiyotoksik etkileri elektrofizyolojik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç için 1.16 nM, bunun iki ve üç kat dozları denenmiştir. **Bulgular:** Uyarılma kasılma çiftleniminin kasılma aşamasında (gevşeme kinetikleri) gelişen bozuklukların yanı sıra, tüm uyarılma parametrelerinde de gözlenen değişimler (ventriküler depolarizasyon parametreleri) 2.32 nM dozunda başladığı saptanmıştır. **Sonuç:** Arı zehri nedeni ile gerçekleşen kardiyak elektriksel yeniden modellenmesi altında yatan Na^+ / Ca^{+2} değiş-tokuşucusu ve K^+ akım değişimleri in vitro koşullarda 2.32 nM dozunda başlamaktadır.

Anahtar kelimeler: Arı zehri, kardiyotoksosite, EKG, sıçan
Selçuk Tıp Derg 2009; 1-5

ABSTRACT

CARDIOTOXICITY OF BEE VENOM: IN VITRO INVESTIGATION

Aim: Depending on the immunological sensitivity and number of stings, severity of anaphylaxis or other pathological effects can occur. Therefore, it is interesting to know more about the direct and dose dependent effect of venom on the Langendorf perfused cardiac electrophysiological parameters.

Material and Methods: Current study aims to investigate the invitro dose dependent cardiotoxicity of *Apis mellifera* toxin ($LD_{50}=3333 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.p.) on the rat heart with electrophysiological methods. For this purpose 1.16nM, its twice and triple doses were tested. **Results:** Besides the contraction stage (relaxation kinetics) of the exitation-contraction coupling, all of the measured exitation parameters (ventricular depolarization parameters) were started to be affected at 2.32 nM dose. **Conclusion:** Results have shown that the venom induced cardiac remodeling was started with the malfunctions seen in the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and potassium currents at 2.32 nM dose invitro dose.

Key words: Bee venom, cardiotoxicity, ECG, rat

Haberleşme adresi: **Dr. Murat AYAZ**

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı, 42080, Meram/Konya

e-posta: ayaz72@yahoo.com

Geliş Tarihi: 03.07.2008 Yayına Kabul Tarihi: 21.01.2009

GİRİŞ

Arı zehri aminoasit, protein ve enzimlerden oluşmuş bir karışımdır. Dozuna bağlı olarak, ağrı azaltımı ve inflamasyonu azaltma amaçlı klinikte kullanımının yanı sıra insan organizması için oldukça toksiktir. Zehrin toksin etkisi dört ana başlık altında toplanabilir; nörotoksin (sinir sisteminde paraliziler), hemolitik etkiler (alyuvarlarda bozulma), hemorajik etkiler (damar geçirgenliğinde artış) ve kardiyotoksik etkisi (uyarılabirlikteki değişikliklere bağlı hastalıklar).

Hayvan ısırıklarına bağlı ölümler ve ciddi belirtilerin gerçekleşmesi için küçük bir kan damarına zehrin direkt olarak temas etmesine bağlıdır. Ciddi reaksiyonların, zehirdeki proteinlere bağlı gelişen aşırı duyarlılık sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Isırılmalarda yaklaşık %2 oranında aşırı duyarlılık gelişmektedir. İlk ısırıkla gelişen ölümler altında tek ısırıkla gelişen veya doğuştan sahip olunan aşırı duyarlılık yatmaktadır.

Alerjisi olan bireylerde (popülasyonun %1) semptomlar genelde ısırıldıktan birkaç dakika sonra başlamakla beraber 24 saat boyunca ortaya çıkmayabilir. Belirtiler boğulma hissi, zorlu solunum, astmatik görünüm, siyone dudak olarak göstermektedir. Şok benzeri semptomlar, kusma, bilinç kaybı hızla birbirini izler. Desensitizasyon yardımcı gibi gözükmele birlikte desensitizasyon tedavileri sonrası alerjik reaksiyonlardan kurtulma süreleri tüm hastalar için aynı değildir.(1)

İmmunolojik duyarlılık ve ısırılma sayısına bağlı olarak, zehir ile gelişen toksisite ciddiyeti değişmesine rağmen hedef organlar için özellikle kardiovasküler sistem üzerindeki etki mekanizması henüz net değildir. Dolayısı bu çalışmada zehrin tüm kalp langendorff prepatlarında doz bağımlı direk etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan tüm kimyasallar Sigma Aldrich (Germany) den temin edilmiştir. Hayvan deneyleri sırasında, National Institute Health

kriterlerine uygun şekilde davranılmıştır. Deneyler için cinsiyete bağlı farklılığı engellemek için 10 adet erkek Sprague Dawley sıçan (270–310 gr) kullanılmıştır. Sıçanlar doğumlarından sonra her kafeste 4 sıçan olacak şekilde sıcaklık ayarlı, 12 saat gündüz/gece olacak şekilde bakılmıştır. Tüm deney grubu hayvanları su ve yem kısıtlaması olmaksızın deneylere kadar bakılmıştır. Deneyler için kalpler sodyum pentobarbital (30 mg/kg dozunda) anestezi altında iken çıkarılmıştır.

Langendorff-perfüze kalp preparatı

Çıkarılan kalpler hızlıca soğuk modifiye Krebs solüsyonunun [(mM); 119 NaCl, 4,8 KCl, 1,8 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 1,2 KH₂PO₄, 20 NaHCO₃ ve 10 glikoz (pH=7,4)] içerisine yerleştirildikten sonra fazla dokularından arındırılmıştır. Aortadan kanüle edilen kalpler yukarıda belirtilen modifiye Krebs solüsyonunda 37 °C de ve %95 O₂-%5 CO₂ ile gazlanan solüsyonla dakikada 7 ml olacak şekilde perfüze edilmiştir.

Sol ventrikül basınçları ve elektrokardiyografik ölçümleri;

Retrograd perfüzyon esnasında, sol atrium çıkarılarak, sol ventrikül balon basınç çevreci ve elektrokardiyografi elektrotları yerleştirilmiştir. Tüm kalp preparatları için başlangıç basıncı balon değeri 40 mmHg olacak şekilde ayarlanmıştır. Kalpler 30 dakika boyunca 7 ml/dk perfüzyon hızı ile dengeye getirilmiştir. Denge periyodu sonrası, doza bağımlı sol ventrikül basınç etkileri ile elektrokardiyografik (EKG) parametrelerin ölçümleri yapılmıştır. Verilerin ileri analizleri için Harvard MP-100 sistemi aracılığı ile bilgisayara kaydedilmiştir. Preparatlar için 1.16 nM'dan başlayıp, bu dozun 3 katına kadar artırılan dozlarda arı zehrinin (Apis Mellifera LD₅₀=3333µg/kg ip) etkileri test edildi. Arı zehrinin her bir dozu 1 dakika perfüze edildikten sonra 30 dakikada yıkanarak (yanıtların geri dönme süresi) uygulamalar gerçekleştirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

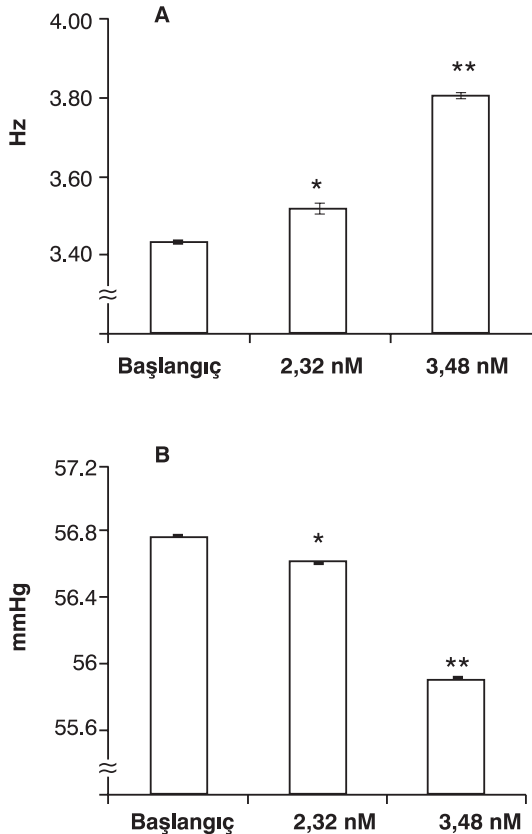
Gruplardan elde edilen veriler, ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. Ortalamalar

arasındaki farkın istatistiksel anlamlılık derecesi Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) testi ile belirlenmiştir. Anlamlı bulunan veriler daha sonra Turkey's HSD testi ile değerlendirilmiştir. P değerinin 0.05'den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Arı zehrinin doz bağımlı kardiyotoksik etkisi, sol ventrikül içi basıncı değişimi (tüm kalp kasılma yanıtı) ve ex-vivo EKG ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Langendorff perfüzyonu yapılan sıçan kalbinde, zehrinin ilk fonksiyonel toksik etkileri 2.32 nM dozunda (6,67 µg/kg i.p.) ortaya çıkmıştır.

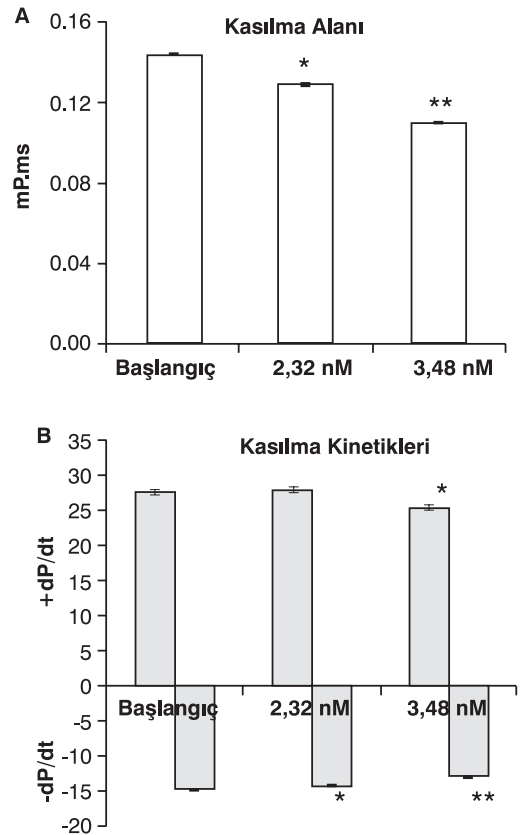
Şekil 1. Perfüze sıçan kalbinin, kalp hızı ve ortalama arteriyel kan basıncında arı zehrinin doza bağımlı etkileri. A; kalp hızını, B; ortalama arteriyel kan basıncını göstermektedir. Veriler 10 hayvandan alınan ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. * p<0,05, ** p<0,01 olmak üzere başlangıç değerine göre anlamlılık derecesini ifade etmektedir.



Deney grubu sıçanlarına ait ortalama arteriyel kan basıncı ve kalp atım hızına ilişkin doz bağımlı değerler şekil 1A ve 1B'de özetlenmiştir. 2.32 nM değerinin altındaki dozlar için ölçülen ortalama parametrelerde istatistiksel bir anlamlılık bulunamamıştır (p>0.05). 2.32 nM dozundan daha büyük dozlar için, aritmogenik etki doğru orantılı, arteriyel basınç ise ters orantılı bir şekilde değişmiştir. Test edilen dozlar için gözlemlenen etkiler yıkama periyodu ile başlangıç değerlerine geri dönmektedir.

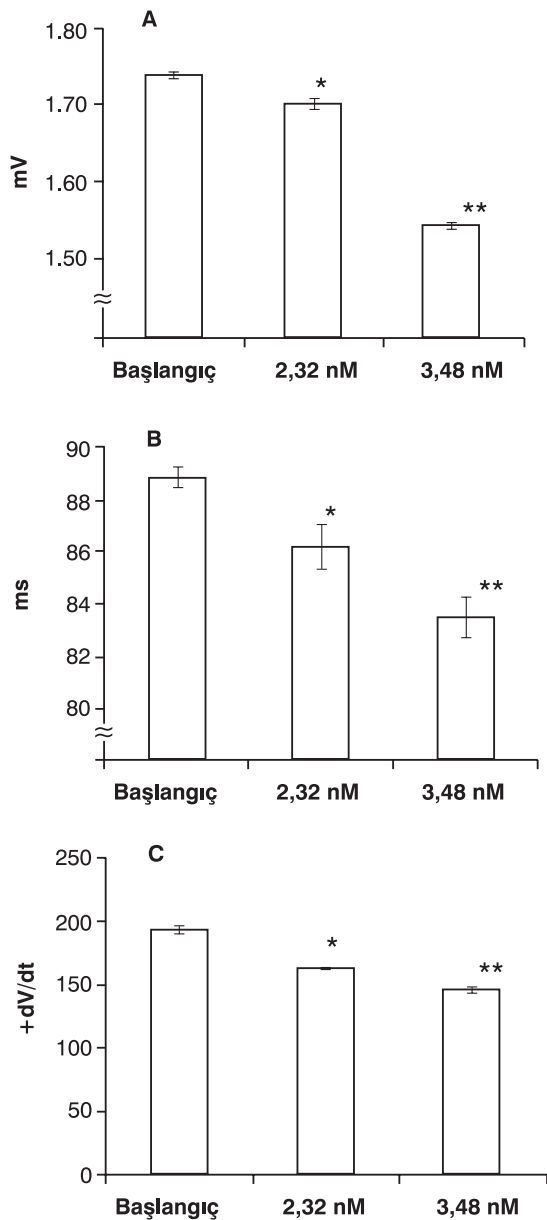
Tüm kalp kasılmasına atfedilen sol ventrikül içi basınç değişimlerinin doz bağımlı etkisi şekil 2'de özetlenmiştir. Ortalama arteriyel basınç ve kalp

Şekil 2. Perfüze sıçan kalbinin sol ventrikül içi basınç değişimi sonuçlarında arı zehrinin doza bağımlı etkisi. A; tüm kalp kasılma değerlerinin altındaki alan. B; kasılma eğrilerindeki kasılma (+dP/dt) ve gevşeme (-dP/dt) kinetiklerini göstermektedir. Veriler 10 hayvandan alınan ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. * p<0,05, ** p<0,01 olmak üzere başlangıç değerine göre anlamlılık derecesini ifade etmektedir.



atım hızı sonuçları ile paralel bir şekilde ölçüm yapılan bu değerlerde de toksisite kasılma kinetiği parametresi haricinde gene 2.32 nM dozunda başlamıştır. Şekil 2A'da doza bağımlı ortalama kasılma alanları verilmiştir. Şekil

Şekil 3. Perfüze sıçan kalbindeki, uyarılma parametrelerinin arı zehri dozuna bağımlı etkisi QRS için A; tepeden tepeye genlik (mV), B; zaman (ms), C; depolarizasyon kinetikleri. Veriler 10 hayvandan alınan ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ olmak üzere başlangıç değerine göre anlamlılık derecesini ifade etmektedir.



2B'de ise kasılma için tepe değerinin %50'sinde çıkış (kasılma) ve iniş (gevşeme) noktalarında hesaplanan türev değerleri verilmiştir. 2.32 nM dozunda hesaplanan kasılma kinetikleri (+dP/dt) istatistiksel olarak anlamlı değil iken ($p > 0,05$) gevşeme kinetikleri (-dP/dt) aynı doz için istatistiksel anlamlılık arz etmiştir ($p < 0,05$). Başka bir deyişle, kasılmanın gevşeme fazı kasılma fazı düşünüldüğünde doz artırımına karşı daha hassas olarak bulunmuştur.

Şekil 3 de toksisitenin ventriküler depolarizasyon (QRS) aşamasındaki inhibitor etkileri özetlenmiştir. Çalışmanın bu kısmında da zehrin etkisi 2.32 nM dozunda ortaya çıkmıştır.

Ölçüm yapılan tüm ventriküler depolarizasyon parametreleri için; tepeden tepeye genlik (Şekil 3A), QRS süresi (Şekil 3B) ve depolarizasyon kinetikleri (Şekil 3C) anlamlı derecede inhibe olmuştur ($p < 0,05$).

TARTIŞMA

Hayvanların zehirleri, izole edilen diğer toksinler gibi yeni ilaçların geliştirilebilmesi için yapılan biyokimyasal, fizyolojik ve patolojik çalışmalar için önem arz etmektedir. Hayvan zehirleri, büyük yapısal farklılıklarına rağmen kompleks protein ve peptid karışımları içermeleri açısından ortak özellikler taşıyor.

Biyo-dağılım analizi yapılan diğer zehirler içerisinde arı zehrinin büyük bir miktarının böbreklerde ve daha sonra sırasıyla karaciğer, kalp ve akciğer dokularında biriktiği gösterilmiştir (2). Tüm kalp kası preparatı elektrofizyolojisi üzerine arı zehrinin direk toksik etkisini araştırmayı hedefleyen çalışmamızda, literatürde daha önceki bulgular gibi toksik etkiler gözlemlenmiştir (3, 4).

Kalp kası hücrelerinde, ikincil bir haberci olması nedeni ile sitoplazmik serbest Ca^{+2} konsantrasyonu ($[Ca^{+2}]_i$) sıkı kontrol altında tutulmaktadır. Sitoplazmik $[Ca^{+2}]_i$ değerindeki ani bir artış hızlı kasılma mekanizmalarını tetikleyip, memelilerin kalp ve iskelet kas liflerinde karakteristik, ciddi yapısal zararlara yol açabilir (5). Yapılan çalışmada arı zehrin diğer içerikleri arasında mellitinin kasılma ve yapısal zararlara

yol açabilen tek bileşen olduğu yönündedir (6). Ek olarak saf zehrin kardiyotoksitesinin antimellitin-antikor ön tedavisiyle tamamen yok edildiğini göstermektedir (6). Zehrin tamamen veya sadece mellitin uygulaması sonrasında kardiyomyositlerde $[Ca^{+2}]_i$ anlamlı bir artışa neden olduğu ve bu artışın sarkolemma üzerinde yer alan Na^+/Ca^{+2} değiş-tokuşçusu üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir (7). Bizim sonuçlarımız zehrin 2.32 nM dozunun direkt uygulanması ardından öncelikle kasılmanın gevşeme kinetiğinde olmak üzere tüm diğer parametreleri doz artışına bağlı olarak negatif yönde etkilediği tespit edilmiştir. Bu sonuç çerçevesinde zehrin etkisini uyarılma-kasılma çiftleniminde ilk olarak Ca^{+2} hücre dışına atılış basamağında olabileceği sonucuna ulaştırmaktadır. Na^+/Ca^{+2} değiş-tokuş sistemi, Ca^{+2} 'un iç ve dış konsantrasyonuna ve zar potansiyeline bağımlı olarak taşınım yönü değişen bir mekanizmasıdır. Normal modunda Ca^{+2} 'un hücre dışına atılması yönünde çalışan değiş-tokuş sistemi, hücre içi serbest Ca^{+2} 'un düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızın uyarılmaya ilişkin sonuçları

zehrin etkisi göstermeye başladığı dozda Na^+ kanal akımlarının depresyona uğramış olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak QRS'lerin tepeden tepeye genliklerinin azalmış olması, sadece depresyona uğrayan akımın Na^+ akımları olmadığını da düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar izole edilen papiller kas preparatlarında yapılan deneylerde zehrin içinde bulunan mellitin ölçüm yapılan aksiyon potansiyellerinin repolarizasyon fazlarında gözlenen uzamasının altında inhibe olmuş K^+ kanal akımlarının olduğunu göstermiştir (5).

Özetle, *Apis Mellifera* zehrinin 2.32 nM dozunun direk Langerdorff kalp preparatı üzerine uygulaması Na^+ kanal akımlarının inhibisyonu yanı sıra hücre dışına Na^+/Ca^{+2} değiş-tokuş sistemi üzerinden Ca^{+2} un atımını engellemiş olabileceği kanısını uyandırmaktadır. Bu yolla artmış $[Ca^{+2}]_i$ (Ca^{+2} overload) zehir etkisinde gözlenen hücre ölümünün en temel sebebi olabileceğini düşündürmekle birlikte konu üzerinde daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Simics M. First Aid for Bee and Wasp Stings., Calgary, AB., Canada: Apitronic Publishing 1995: 1-80.
2. Yonamine CM, Costa H, Silva JAA, Muramoto E, Rogero JR., Troncone LR., et al. Biodistribution Studies of Bee Venom and Spider Toxin Using Radiotracers. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis 2005;11: 39-50.
3. Guimarães JV, Costa RS, Machado BH, dos Reis MA. Cardiovascular profile after intravenous injection of Africanized bee venom in awake rats. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004 Jan-Feb;46(1):55-8. Epub 2004 Mar 29
4. Nabil ZI, Hussein AA, Zalat SM, Rakha MKh. Mechanism of action of honey bee (*Apis mellifera* L.) venom on different types of muscles. Hum Exp Toxicol. 1998 Mar;17(3):185-90.
5. Mattiello-Sverzuta AC, Cruz-Höfling MA, Toxin 2 (PhTx2), a neurotoxic fraction from Phoneutria nigricenter spider venom, causes acute morphological changes in mouse skeletal muscle Toxicon 2000; 38(6):793-812.
6. Okamoto T, Isoda H, Kubota N, Takahata K, Takahashi T, Kishi T, et al. Melittin cardiotoxicity in cultured mouse cardiac myocytes and its correlation with calcium overload. Toxicol Appl Pharmacol 1995;133(1):150-63.
7. Zhang YL, Yang S, Shi NC, Jiang MH. Effects of melittin on isolated papillary muscles of guinea pig. Acta Pharmacol Sin 2001; 22(8):697-700.

