



Miyokardiyal İskemi Sonrası Gelişen Akut Böbrek Hasarı Üzerine Nebivolol'ün Etkisi: Preklinik Bir Çalışma

The Effect of Nebivolol on Acute Renal Injury Developed After Myocardial Ischemia: A Preclinical Study

İD Güldem Mercanoğlu, İD Semen Yeşil Önder*, İD Çağlar Macit**, İD Fehmi Mercanoğlu***

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**İstanbul Medipol Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

***İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Öz

Amaç: Akut miyokard iskemisinin reperfüzyonu (IR) sırasında miyokard dokusunun yanı sıra diğer dokularda da hasarın söz konusu olduğu gösterilmiştir. Böbrek hasarı bunlardan birisidir. Altta yatan mekanizmalara yönelik pek çok çalışma yapılmış olsa da, bu etkileşimi başlatan ve sürdüren temel mekanizma kesin olarak bilinmemektedir. Biz bu mekanizmanın hipoperfüzyonun neden olduğu oksidatif/nitrozatif hasar olabileceğini düşünmekteyiz. Nebivolol nitrik oksit (NO) aracı etkileri de olan bir beta blokerdir. Bu çalışmada miyokardiyal IR sonrası gelişen akut böbrek hasarında (ABH) nebivololün NO aracılı etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Erişkin erkek Sprague-Dawley sıçanlar üç gruba ayrıldı: Cerrahi kontrol (sham-kontrol), IR oluşturulmuş kontrol (IR-kontrol), nebivolol uygulanmış grup (IR-nebivolol). Nebivolol (0,1 mg/kg, intravenöz) reperfüzyonun ilk 10 dakikası içerisinde uygulandı. Hayvanlarda IR cerrahi olarak ön inen koroner arter ligasyonu ile oluşturuldu. Nebivololün NO aracılı etkileri hemodinamik, biyolojik ve histolojik olarak incelendi.

Bulgular: Sham-kontrol ile karşılaştırıldığında IR-kontrol grubu hayvanlarda böbrek fonksiyonlarındaki değişiklik istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). IR-kontrol grubunda -sham kontrol grubuna göre- histolojik kesitlerde daha fazla fokal tubüler hasar bulguları izlendi; bunun yanı sıra böbrek nitrojen dioksit (NOx)/peroksinitri (ONOO) düzeylerinde artış ile süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerindeki azalma da istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0,05$). IR-nebivolol grubunda ise fokal tubuler rejenerasyon ile uyumlu azalmış NOx/ONOO ile artmış SOD düzeyleri tespit edildi ($p<0,05$).

Sonuç: Bu çalışmada; nebivololün miyokardiyal IR sonrası gelişen ABH üzerindeki NO aracılı olumlu etkileri gösterilmiştir. Çalışmada NO aracılı mekanizma, hipoksinin neden olduğu nitrozatif hasarın önlenmesi ve NO biyoyararlanımının korunması ile açıklanabilir.

Anahtar Sözcükler: Akut böbrek hasarı, miyokardiyal iskemisi, nebivolol

Abstract

Aim: During reperfusion of myocardial ischemia, damage can also be seen in the kidneys. Although many studies have been conducted on the underlying mechanisms, the basic mechanism of this interaction is still unknown. We think that this is oxidative/nitrosative damage caused by hypoperfusion. Nebivolol is a beta-blocker with nitric oxide (NO)-mediated effects. In this study, we aimed to investigate the NO-mediated effect of nebivolol on acute renal injury (ARI) developed after myocardial ischemia-reperfusion (IR).

Methods: Adult male Sprague-Dawley rats were divided into three groups: sham-control, IR-control, and IR-nebivolol. Nebivolol (0.1 mg/kg, intravenous) was administered within the 10 min of reperfusion. IR was performed by surgically anterior descending artery ligation. NO-mediated effects of nebivolol were assessed by hemodynamic, biologic and histologic studies.

Results: Compared to the sham-control, changes in renal function were not statistically significant in the IR-control ($p>0.05$). Focal tubular damage findings were also observed in histologic sections. Decrease in superoxide dismutase (SOD) levels together with increase in nitrogen dioxide (NOx)/peroxynitrite (ONOO) were also significant ($p<0.05$). On the contrary, consistent with focal tubular regeneration, elevated renal SOD levels together with reduced NOx/ONOO levels were detected in IR-nebivolol ($p<0.05$).

Conclusion: NO-mediated beneficial effects of nebivolol on ARI developing after myocardial IR were shown. The mechanism can be explained by the prevention of nitrosative damage and the protection of NO bioavailability.

Keywords: Acute kidney injury, myocardial ischemia, nebivolol

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Güldem Mercanoğlu
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye
E-posta: habibegulden.mercanoglu@sbu.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0001-7594-7029

Geliş Tarihi/Received: 18 Nisan 2018 **Kabul Tarihi/Accepted:** 06 Ağustos 2018

©Telif Hakkı 2018 Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Haseki Tıp Bülteni, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.

©Copyright 2018 by The Medical Bulletin of University of Health Sciences Haseki Training and Research Hospital
The Medical Bulletin of Haseki published by Galenos Yayınevi.

Giriş

Kalp ve böbrek vasküler volüm dengesi ve tonusu, kan basıncı ile periferel doku perfüzyonu ve oksijenizasyonu gibi pek çok fizyolojik olayda beraber hareket etmeleri nedeni ile aralarında karmaşık bir etkileşim vardır. Bu etkileşim, organlardan birinde akut veya kronik fonksiyon bozukluğu gelişmesi durumunda diğer organda da fonksiyon bozukluğu gelişmesine neden olur (1). Nitekim akut miyokard iskemisinin reperfüzyonu (IR) sırasında sadece miyokartta değil, yanı sıra böbreklerde de hasarın söz konusu olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (2). Bu karmaşık etkileşimin önde gelen patofizyolojik mekanizmaları arasında hemodinamik değişiklikler, endotel disfonksiyonu, oksidatif stres, immün aktivasyon/enflamasyon ve renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi ve/veya sempatik sistem aktivasyonu gelmektedir (3). İlgili mekanizmaları inceleyen pek çok çalışma yayınlanmış olsa da, bu etkileşimi başlatan ve sürdüren temel mekanizma hala kesin olarak tespit edilebilmiş değildir (4). Biz hipoperfüzyonun neden olduğu oksidatif/nitrozatif hasarın temel mekanizmalardan biri olabileceğini düşünmekteyiz. Çünkü yeterli oksijenin olmadığı durumlarda mitokondri ve çeşitli oksidazlar ile üretilen süperoksit iyonları (O_2^-) nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek peroksinitrik (ONOO) üretir ki, bu da fizyolojik nitrik oksit-siklik guanozin monofosfat ($NO_x/cGMP$) yolağının patolojik nitrik oksit-peroksinitrit ($NO_x/ONOO^-$) yolağına kaymasına neden olur ve neticesinde NO biyoyararlanımı azalır (5-7). ONOO nitrozatif hasardan sorumlu temel moleküldür. Nitekim L-arginin-NO yolak aktivitesinin önemi kalp ve böbrek yetmezliğinde ayrı ayrı gösterilmiştir (8,9-12).

Nebivolol aynı zamanda NO aracılı etkileri de olan selektif bir beta bloker ajandır. Nebivololün NO-aracılı etkileri farklı kardiyovasküler patolojilerde gösterilmesine rağmen, renal disfonksiyon üzerindeki NO aracılı etkileri tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada miyokardiyal IR sonrası gelişen akut böbrek hasarında nebivololün NO aracılı etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler

Çalışma Dizaynı ve Gruplar

Erişkin 12 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçanlar (250-300 gr) her grupta 18 hayvan olacak şekilde üç gruba ayrıldı: Cerrahi kontrol (sham-kontrol) grubu, IR hasarı oluşturulmuş kontrol (IR-kontrol) grubu ve nebivolol uygulanmış (IR-nebivolol) grup.

Nebivolol dozu daha önce yapılan çalışmalara göre minimum beta blokajı oluşturan dozu olan 0,1 mg/kg olarak seçildi (13) ve IR-nebivolol grubuna reperfüzyonun ilk 10 dakika içerisinde intravenöz (iv) yoldan uygulandı.

Hayvanların barındırılması ve tüm deneysel prosedür Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Ulusal Sağlık Enstitüleri

tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu uyarınca gerçekleştirilmiş ve tüm deney prosedürleri için İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (karar no:29).

İskemi-Reperfüzyon Modeli

IR cerrahi olarak sol ön inen koroner arterin (LAD) 30 dk. ligasyonu ile oluşturuldu (14). Ketamin ve ksilazin kombinasyonu ile anestezi edilen hayvanlar entübe edilerek mekanik olarak ventile edildi. İşlem süresince hayvanlar devamlı elektrokardiyogram (EKG) monitörizasyonu ile takip edildi. Hayvanlara sol torakotomi yapılarak sol ön inen koroner arter LAD arter başlangıç yerinden 2-3 mm aşağı olacak şekilde 6-0 prolene sütür ile bağlandı. Anterior sol ventrikül "left ventricle" (LV) duvarında gözle görülür siyanoz, hipokinezi ile EKG'de ST elevasyonu başarılı ligasyonun göstergesi olarak kabul edildi. Otuz dakikalık ligasyonun ardından prolene sütür kesilerek reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon, risk alanı üzerinde miyokardiyal renk değişimi ile doğrulandı. Reperfüzyon sonrası akciğerleri tamamen şişirmek için pozitif ekspiratuvar sonu basınç "positive end-expiratory pressure" uygulanarak toraks ve göğüs katmanları sırası ile kapatıldı. Cerrahi kontrol grubu hayvanlarda ligasyon harici tüm prosedür tekrarlandı. Tüm cerrahi prosedür aseptik koşullar altında gerçekleştirildi.

Hemodinamik Değerlendirme

Hemodinamik ölçümler Pfeffer ve ark. (15) yaptığı çalışmaya göre gerçekleştirildi. Buna göre hayvan ağırlıkları ölçüldükten sonra sağ karotis arter diseke edilerek heparinize serum fizyolojik ile doldurulmuş polietilen kateter (PE-50) yerleştirildi. Kateter basınç transdüktörüne bağlanarak (MLT 0699, PowerLab, ADI Instruments, UK) basınçlar fizyolojik kaydedici ile kayıt edildi (10T Hardware System, PowerLab, ADI Instruments, UK). Asending aorta basıncı kayıt edilmesinden sonra sistolik ve diyastolik basınçlar kaydedilerek ortalama kan basıncı ("mean blood pressure; MBP") hesaplandı; daha sonra kateter LV'ye ilerletilerek LV sistolik basınç ve diyastol sonu basıncı (LVEDP) ile LV basınçlarının maksimum yükselme ve düşüşü ($\Delta \pm dp/dt$) kayıt edildi.

Histolojik Değerlendirme

Miyokardiyal Hasarın Değerlendirilmesi

LV basınçlarının kaydedilmesinden sonra kateter aortaya geri çekilerek kalp intravenöz potasyum klorür enjeksiyonu (3 mL, %10'luk çözelti) ile sistolde durduruldu. Toraks hızlıca açılarak sağ atriya keski atılıp kanın drenajı sağlandı. Kalp ve böbrekler 7,5 cm H_2O basıncı altında formalin ile (%10 fosfat tamponlanmış) bir saat fikse edildi. Fiksasyondan sonra dokular çıkarılarak hızlıca tartıldı, dehidrate edilerek parafin bloklara gömüldü.

Kalp apekten tabana doğru 1 mm'lik aralıklar ile 10 µm kalınlığında kesitler alınarak depafinize edildi ve kesitler hematoksilon-eosin (HE) ve mason trikrom boyaları (MS) ile boyanarak ışık mikroskobu (Olympus BH-2) altında iskemik hasar histolojik olarak değerlendirildi.

Böbrek Hasarının Değerlendirilmesi

Parafin bloklara gömülü örneklerden 5 mm kalınlığında kesitler alınarak HE ve MS ile boyanmış ve Olympus BH-2 altında tubuler (epitelyal hücre dekolmanı, atrofi, dilatasyon ve intratübüler cast oluşumu) ve glomerüller (Bowman aralığında artış) değişikliklerinin varlığı açısından incelendi (16).

Biyokimyasal Değerlendirme

Anestezi altındaki hayvanların karın orta hat kesilerek açıldı, vena kava inferiordan kan örnekleri alınarak böbrekler diseke edildi, ekstranöz dokudan temizlenerek tartıldı. Kan örnekleri santrifüj edilerek analize kadar -20°C'de saklandı. Böbrekler ise sıvı nitrojen içinde dondurularak biyokimyasal analizler için -70°C'de saklandı. Biyokimyasal parametreler, taze hazırlanmış homojenatlarda ölçüldü.

Böbrek Fonksiyonu

Böbrek 1 fonksiyonun göstergesi olarak serum kreatinin (Cr) ve kan üre nitrojen (BUN) seviyeleri, Olympus AU 2700 Analizörü (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılarak standart teknik ile ölçüldü.

Doku Oksidatif/Nitrozatif Hasar ve Antioksidan Kapasitesi

Antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için doku süperoksit dismutaz (SOD) düzeyi hazır kitler kullanılarak kullanıcı talimatlarına göre ölçüldü.

NO, spektrofotometrik olarak NO'nun kararlı metabolitleri olan nitrit/nitrat (NOx) konsantrasyonu olarak doku süpernatantlarında ölçüldü (Roche, ABD).

NO/ONOO⁻ veya NO/cGMP yolağının aktivasyonu, böbrek ONOO⁻ ve cGMP seviyelerinin ölçülmesi ile değerlendirildi. Peroksinit ve cGMP ELISA (HBT, HyCuit biyoteknoloji, ABD ve Zymed Laboratories Inc., ABD) yöntemi ile belirlendi. Doku protein seviyeleri, Folin-Lowry yöntemi kullanılarak belirlendi (17).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS 24.0 yazılım programı (Chicago, IL, USA) ile gerçekleştirildi. Tüm değişkenler ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Hemodinamik ve biyokimyasal ölçüm verileri ANOVA ve post-hoc Bonferroni testi ile analiz edildi ve p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Her biri 18 Sprague-Dawley sıçandan oluşmuş cerrahi kontrol (sham-kontrol) grubu, IR hasarı oluşturulmuş

kontrol (IR-kontrol) grubu ve nebivolol uygulanmış (IR-nebivolol) grubu olmak üzere toplam 54 adet sıçan çalışmaya dahil edildi. IR oluşturulan gruplarda hayvan ölümü gözlenmemiştir. Gruplar hemodinamik parametreler, histolojik bulgular, oksidatif/nitrozatif hasar ve antioksidan kapasite parametreleri ve böbrek fonksiyonları bakımından birbirleriyle karşılaştırıldı.

Hemodinamik Parametreler

Hemodinamik parametreler Tablo 1'de gösterilmiştir. Sham-kontrol grubuna göre IR-kontrol grubunda ortalama $\Delta\pm dp/dt$ değerlerinde azalma ve LVEDP'de artış mevcuttu. Buna karşılık, IR-kontrol grubunda sham-kontrol grubuna göre MBP'deki artış anlamlılık düzeyinde değildi. Nebivolol uygulanan grupta (IR-nebivolol) hemodinamik bozuklukların anlamlı ölçüde düzeldiği görüldü. IR-nebivolol grubunun ortalama $\Delta\pm dp/dt$ değerleri IR-kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti; diğer yandan IR-nebivolol grubunun ortalama LVEDP değeri de IR-kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. IR-nebivolol grubunda kaydedilen ortalama MBP'deki düşüş anlamlı seviyede bulunmadı (Tablo 1).

Böbrek Fonksiyonu

Sham-kontrol ile karşılaştırıldığında, IR-kontrol grubu ve IR-nebivolol grubundaki BUN ve plazma Cr değerleri istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler göstermedi. (Tablo 2).

Oksidatif/Nitrozatif Hasar ve Antioksidan Kapasite

Sham-kontrol ile karşılaştırıldığında; IR-kontrol grubunda oksidatif kapasiteyi ifade eden ortalama böbrek SOD düzeyi anlamlı derecede azalırken, oksidatif/nitrozatif hasarı gösteren ortalama NOx ve ONOO⁻ düzeylerinde anlamlı artış gözlemlendi; buna karşılık IR-kontrol grubundaki

Tablo 1. Hemodinamik parametreler

Parametre	Sham-kontrol (n=6)	IR-kontrol (n=6)	IR-nebivolol (n=6)
MBP (mmHg)	109,1±7,4	126,5±8,8	90,3±10,0
LVEDP (mmHg)	2,0±0,23	28,3±4,1 [#]	12,5±4,0 ^{#,&}
D+dp/dt (mmHg/dakika)	6716±574	4078±411 [#]	4613±291 ^{#,&}
D-dp/dt (mmHg/dakika)	5308±595	2691±346 [#]	3354±339 ^{*,&}

MBP: Ortalama kan basıncı, LVEDP: Sol ventrikül diyastol sonu basıncı, IR: İskemi-reperfüzyon, D+dp/dt: Sol ventrikül basıncında maksimum yükselme, D-dp/dt: Sol ventrikül basıncında maksimum azalma (p<0,05, [#]sham-kontrol grubuna göre, [&]IR-kontrol grubuna göre)

Tablo 2. Böbrek fonksiyonları

Parametre	Sham-kontrol (n=6)	IR-kontrol (n=6)	IR-nebivolol (n=6)
BUN (mg/dL)	19,28±0,98	24,67±1,18	21,34±2,10
Cr (mg/dL)	0,84±0,08	0,73±0,04	0,70±0,02

BUN: Kan üre azotu, Cr: Kreatinin, IR: İskemi-reperfüzyon

cGMP düzeylerindeki yükselme istatistiksel anlamlılık düzeyinde değildi. Nebivololün uygulandığı IR-nebivolol grubunda oksidatif/nitrozatif hasar ve antioksidan kapasite parametrelerinde (IR-kontrol grubuna göre) anlamlı düzelmeler kaydedildi: IR-nebivolol grubunda IR-kontrol grubuna göre ortalama SOD değerindeki yükselme ve ortalama NOx ve ONOO⁻ değerlerindeki düşme istatistiksel olarak anlamlı seviyede idi (Tablo 3).

Histolojik Değerlendirme

Her üç grubun vücut ağırlıkları (BW) ve postmortem kardiyak ağırlıklar Tablo 4'te gösterilmiştir. BW gruplar arasında farklılık göstermemekte idi. Sham-kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kalp ağırlığı (HW) ve LV ağırlıkları (LVW) ile HW/BW ve LVW/HW oranları IR-kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek iken, bu parametrelerin IR-nebivolol grubunda bazal değerler (sham-kontrol) seviyesinde olduğu görüldü. IR nebivolol grubunda IR-kontrol grubuna göre LVW, HW değerleri ile LVW/HW ve HW/BW oranları anlamlı olarak daha düşük idi.

Sham-kontrol grubunda ışık mikroskobu görüntüleri, düzenli miyosit ve az miktarda interstisyel fibrozis ile karakterize normal miyokardiyal görüntüler idi. IR-kontrol grubu ise hakim histolojik tablo koagülatif nekroz ile karakterize idi; ilaveten tipik enflamatuvar yanıt ve onarım ile ilgili bulgular da IR-kontrol grubunda izlendi. Bu grupta HE boyalı kesitlerde miyositlerdeki dalgalanma koagülatif nekrozun ve nötrofil varlığı da enflamasyonun göstergesi

Parametre	Sham-kontrol (n=6)	IR-kontrol (n=6)	IR-nebivolol (n=6)
SOD (U/mg protein)	5,29±0,4	3,11±0,9 [¶]	4,83±0,3 [§]
cGMP (pmol/g doku)	514,2±46	602±55	604±49 [§]
NOx (nmole/mg protein)	145±7,2	348±22,3 [¶]	251±13,1 ^{¶,§}
ONOO ⁻ (nmol/g doku)	114±3,1	308±18,2 [¶]	184±24,9 ^{¶,§}

NOx: Nitrit/nitrat, ONOO⁻: Peroksinitri, SOD: Süperoksit dismutaz, IR: İskemi-reperfüzyon (p<0,05, [¶]sham-kontrol grubuna göre, [§]IR-kontrol grubuna göre), cGMP: Siklik guanozin monofosfat

Parametre	Sham-kontrol (n=6)	IR-kontrol (n=6)	IR-nebivolol (n=6)
LVW (mg)	718±62	988±68*	722±36 [§]
HW (mg)	909 ± 23	1110±52*	924±23 [§]
BW (g)	323±9	325±10	318±9
LVW/HW	0,79±0,03	0,89±0,05*	0,78±0,04 [§]
HW/BW	2,81±0,09	3,42±0,06*	2,91±0,05 [§]

p<0,05, *sham-kontrol grubuna göre, [§]IR-kontrol grubuna göre, LVW: Sol ventrikül ağırlığı HW: Kalp ağırlığı, BW: Vücut ağırlığı

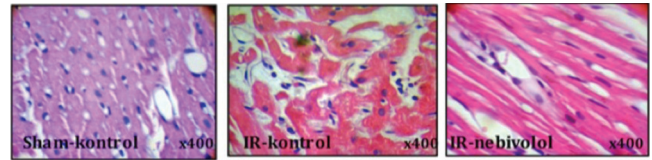
idi. Bu grupta HE bulgularına ilave olarak MS boyalı kesitlerde kolajen akümüasyonu da gözlemlendi (Şekil 1).

Böbrek dokularının histopatolojik incelemesinde ise; sham-kontrol grubunda renal doku patolojik değişiklik göstermeyen normal yapıya sahip idi. IR-kontrol grubunda ise, proksimal tubuluslarda fırçamsı kenar kaybı, (<%50), tubul epitelyal hücrelerinde dökülme, intratubuler cast oluşumu, çekirdek kaybı ve deskuamasyon ile özetlenebilen fokal tubuler hasar bulguları izlendi. IR-nebivolol grubunda ise tubul çevresinde belirgin ödem gözlenmekle beraber, tubuler hasarın en önemli göstergesi olan fırçamsı kenar kaybının ve intratubuler cast oluşumunun önlenmesi ile karakterize rejenerasyon bulguları izlendi (Şekil 2).

Tartışma

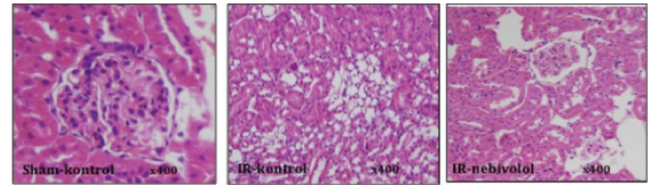
Çalışma sonuçları bütün olarak değerlendirildiğinde; IR hasarının oluşturulduğu gruplarda beklenildiği gibi olumsuz hemodinamik, histolojik ve makroskopik değişikliklerin meydana geldiği; nebivolol uygulanan grupta gerek kardiyak gerekse renal seviyede söz konusu olumsuz değişikliklerin anlamlı seviyelerde düzeldiği görüldü.

Sham-kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IR hasarının oluşturulduğu gruplarda belirgin hemodinamik değişiklikler (LVEDP'de belirgin artış ve dp/dt değerlerinde azalma) mevcuttur. IR-nebivolol grubunda söz konusu olumsuz



Şekil 1. Histolojik kesitlerde miyokardiyal iskemik hasar bulguları sham-kontrol grubu düzenli miyosit ile karakterize normal miyokardiyal görüntüde idi. IR-kontrol grubu kısalmış ve dalgalanmış kas lifleri ile bu lifler arasında ödem ve nötrofil infiltrasyonu ile karakterize idi. IR-nebivolol grubunda miyosit liflerindeki bozulma daha az idi

IR: İskemi-reperfüzyon



Şekil 2. Histolojik kesitlerde renal hasar bulguları sham-kontrol grubunda renal doku patolojik değişiklik göstermeyen normal yapıya sahip idi. IR-kontrol grubunda proksimal tubuluslarda fokal fırçamsı kenar kaybı, fokal çekirdek kaybı ve fokal deskuamasyon ile karakterize fokal tubuler hasar izlenirken; IR-nebivolol grubunda tubuler çevresinde belirgin ödem gözlenmekle beraber fırçamsı kenarların korunması ile özetlenebilecek rejenerasyon bulguları izlendi

IR: İskemi-reperfüzyon

değişikliklerde anlamlı derecede düzelmeler gözlenmiştir. Diğer yandan, histolojik bulgular hemodinamik değişiklikleri destekler niteliktedir. Kalp ve LVW ile ilgili oranlar (LVW/HW ve HW/BW) sham-kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IR-kontrol grubunda daha yüksek iken; IR-nebivolol grubunda ilgili parametreler sham-kontrol grubu ile benzer seviyelerde bulunmuştur.

Çalışma sonuçları böbrek yapı ve fonksiyonu açısından değerlendirildiğinde ise; miyokardiyal iskeminin subklinik akut böbrek hasarına (ABH) neden olduğu gösterilmiştir. Sham-kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IR-kontrol grubu hayvanlarda normal BUN ve Cr düzeyleri ile histolojik kesitlerde tespit edilen fokal böbrek hasarı bulguları bu sonuçları destekler niteliktedir. IR-kontrol grubunda tespit edilen artmış ONOO⁻ ve azalmış SOD düzeyleri ile karakterize artmış nitrozatif hasar ve azalmış antioksidan kapasitenin hasardan sorumlu muhtemel moleküler mekanizma olduğuna işaret etmektedir. IR-kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; nebivolol verilen hayvanlarda sham-kontrol grubuna benzer biyokimyasal ve histolojik değerlendirme sonuçları nebivololün böbrek hasarını önlediğini göstermektedir. Nebivololün hemodinamik parametrelere etkisi anlamlı derecede olmasına rağmen, olumlu etki sınırlı seviyededir ve nebivololle sağlanan hemodinamik parametrelerin bazal değerlerle (sham-kontrol) karşılaştırıldığında hala patolojik seviyelerde olduğu görülmektedir. Buna karşılık, nebivololün nitrozatif hasar ve antioksidan kapasiteye olumlu etkisi daha belirgindir. Dolayısıyla, nebivololün IR nefropatisine olan olumlu etkilerinin önemli ölçüde beta reseptör blokajı ve hemodinamik parametrelerin düzeltilmesinden bağımsız olarak gerçekleştiği, başlıca koruyucu mekanizmanın NO aracılığıyla meydana gelmesinin daha muhtemel bir mekanizma olduğu ifade edilebilir.

Günümüzde, iskemik kalp hastalığı ve onun başlıca klinik görüntülerinden biri olan akut miyokard enfarktüsü (AMİ), dünya çapında başlıca ölüm sebeplerinin başında yer alamaya devam etmektedir. AMİ tedavisinde ciddi ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, hastane içi ve uzun dönem mortalite hala yüksek seviyelerdedir. Bu sebeple, AMİ'nin daha etkili teşhis ve tedavisi için ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır (17). AMİ ile hastaneye yatan hastaların yaklaşık %20'sinde ABH gelişmekte olup, AMİ sonrası gelişen ABH'nin hastaların prognozunu kötüleştirdiği bilinmektedir (18). Dolayısı ile AMİ tedavisinin düzenlenmesinde kalp dışı stratejilerin de göz önünde bulundurulması önemlidir. Subklinik ABH, biyo-belirteçlerin rolünün daha iyi anlaşılması ile önemli bir kavram olarak ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda, sadece glomerüler filtrasyon hızı/idrar çıkışı değil, aynı zamanda tubuler hasar belirteçlerini de kullanan yeni ABH tanı kriterleri önerilmektedir (19). Günümüzde subklinik ABH hastaların klinik ABH'ye progresyon riskinin daha fazla bilinmektedir (19).

AMİ sonrası gelişen böbrek hasarı mekanizmasının belirlenmesine ilişkin pek çok çalışma mevcut olup, bu mekanizmalar arasında hemodinamik değişiklikler, patolojik kompensatuvar nörohormonal aktivasyon, oksidatif stres, immün aktivasyon/enflamasyon sayılabilir (20). Konu ile ilgili yapılan ilk çalışmalar hemodinamik değişiklikler üzerinde yoğunlaşmış olsada; gerek *in vitro* izole doku modellerinde (21) gerekse son yıllarda gerçekleştirilen *in vivo* kapsamlı moleküler çalışmalarda temel mekanizmanın AMİ ile indüklenen hemodinamik değişiklikler olmadığı gösterilmiştir (22). Nitekim çalışmamızda minimum beta blokajı yapan dozda nebivolol uygulanan hayvanlarda sınırlı seviyelerdeki hemodinamik düzelmelere karşılık histolojik bulgularda belirgin düzelmelerin meydana gelmiş olması, bu sonuçları destekler niteliktedir. Mevcut çalışmalar oksidatif stresin patogeneizde önemli rol oynadığını göstermektedir. Normal bir hücre fonksiyon için reaktif oksijen türlerinin (ROS) fizyolojik seviyeleri gerekli olsada (23,24), oksidan ve antioksidan moleküller arasındaki dengesizliğin sonucu olarak gelişen oksidatif stres, hücre fonksiyon, doku hasarı ve organ yetmezliğinde yaygın rol oynayan yolaktır (25). Oksidatif stress ROS üretiminin bu ürünlerin metabolizasyon hızını aştığı durumda veya antioksidan savunma mekanizmaları tükendiğinde ortaya çıkar. ROS'ler; oksijen radikalleri (süperoksit, hidroksil, peroksil, alkoksil vb.) veya hidrojen peroksit gibi radikal olmayan oksijen kaynaklı küçük moleküllerdir (26). En önemli ROS kaynağı mitokondriilerdir; ayrıca NADH/NADPH oksidaz, sitokin ve büyüme faktörlerine cevap olarak üretilenler diğer önemli hücre düzeyindeki ROS kaynaklarıdır (27). Yüksek miktarlardaki oksijen radikalleri mitokondriyal enzimleri inaktive eder, DNA hasarına yol açar ve sonuç olarak hücre hasarı ve apoptoza neden olur (28). Buna ilave olarak, artmış ROS üretimi mitokondri fonksiyon bozukluğuna yol açıp mitokondriyal gözeneklerin geçirgenliğini artırır; bu süreç daha fazla ROS salınımının aktive ettiği bir kısır döngü olan "ROS kaynaklı ROS üretimi" ile sonuçlanır (29). Yine ROS'nin hücre proliferasyonu, enflamatuvar sitokinler ve adezyon molekülleri ile büyüme faktörlerini ve antiapoptotik molekülleri aktive ettiği bilinmektedir (30). Enzimatik detoksifikasyon mekanizmalarından bir tanesi olan antioksidan enzimler (SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz vb.) radikal kaynaklı hasarlara karşı en önemli savunma mekanizması olup, oksidatif stresi azaltarak serbest radikalleri stabilize eder (31). Çalışmamızda IR oluşturulmuş hayvanlarda artmış ONOO⁻ düzeyleri ile azalmış SOD düzeyleri bu grupta hem ROS hem de reaktif azot türleri redoks dengesizliğinde önemli bir artış olduğunu göstermektedir. Böbreklerden endojen olarak salınan NO'nun başta vasküler tonüs ve tubuler fonksiyon olmak üzere pek çok renal fonksiyonda önemli rol oynadığı iyi bilinmektedir (9,32-34). Oksidatif stres durumunda,

NO'nun ROS ile reaksiyonu, hidroksil radikaline benzer reaktiviteye sahip güçlü bir oksidan oluşturmak üzere ayrışabilen ONOO⁻ anyonunu üretebilir (35). ONOO⁻ sülfhidril oksidasyonunu (36) ve lipid peroksidasyonunu (37) indükleyerek sitotoksik etki meydana getirir. Literatürde hem renal IR hem de hipoksi-reoksijenasyon hasarının patofizyolojisinde ONOO⁻'nin rolü (38) ile ONOO⁻ oluşumunun önlenmesinin yararlı etkilerinin gösterildiği çalışmalar mevcuttur (39,40). Çalışmamızda IR-kontrol grubunda tespit edilen artmış NOx ve ONOO⁻ düzeyleri ile azalmış SOD düzeyleri ve sham-kontrol grubuna benzer cGMP düzeyleri ilgili çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Nebivolol aynı zamanda NO aracılı etkileri de olan selektif bir beta bloker ajandır. Beta-bloker aktivitesine ek olarak, nebivololün NO aracılı etkilerine dair çalışmalar mevcuttur (41). Biz de önceki çalışmalarımızda nebivolol tedavisinin sıçan MI modelinde remodeling üzerine yararlı etkilere sahip olduğunu NO aracılı mekanizmalar üzerinden göstermiştik (13,42) Bu çalışmada ise nebivololün miyokardiyal IR sonrası gelişen ABH'sini önemli ölçüde önleyebileceğini gösterdik. Çalışma sonuçlarına göre söz konusu yararlı etkide NO aracılı muhtemel mekanizmalar şu şekilde özetlenebilir:

1. Hipoksik hasarın önlenmesi: IR-kontrol grubu ile karşılaştırıldığında IR-nebivolol grubunda azalmış NOx ve ONOO⁻ düzeyleri bu sonucu destekler niteliktedir.

2. NO biyoyararlanımının korunması: IR-nebivolol grubunda NOx düzeylerinin yükselmeksizin SOD ve cGMP düzeylerinin korunması söz konusu mekanizmayı desteklemektedir. Bu sonuçların, benzer miyokardiyal IR modelinde NO sentaz (NOS) izoformlarının (eNOS, iNOS ve nNOS) belirleneceği kapsamlı çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Bu çalışmada nebivololün miyokardiyal IR sonrası gelişen ABH üzerindeki NO aracılı olumlu etkileri gösterilmiş olup, bu olumlu etkide temel mekanizma, hipoksinin neden olduğu nitrozatif hasarın önlenmesi ve NO biyoyararlanımının korunması olarak açıklanmıştır. Ancak çalışmada kullanılan histopatolojik yöntem gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapılması için yeterli olmayıp, bulguların desteklenmesi için NOS izoformlarının gösterildiği ilave histopatolojik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç

Bu çalışmada; sıçan miyokardiyal IR modelinde, nebivololün miyokardiyal IR sonrası gelişen ABH'yi önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir. Bu olumlu etkinin temel mekanizması ise beta reseptör blokajı neticesinde hemodinamik parametrelerdeki düzelmenin ötesinde böbrekte antioksidan kapasitenin artması ve oksidatif/nitrozatif hasarın önlenmesi olarak tespit edilmiştir.

Nebivololün bu etkisine aracılık eden NOS izoformlarının belirlendiği ileri çalışmalar ile bu mekanizma daha aydınlatılabilecektir.

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: G.M., Ç.M. Konsept: G.M., F.M. Dizayn: G.M., Ç.M., F.M. Veri Toplama veya İşleme: G.M., Ç.M., S.Y.Ö. Analiz veya Yorumlama: G.M., S.Y.Ö., F.M. Literatür Arama: G.M., F.M., Ç.M. Yazan: G.M., F.M.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Ronco C, Cruz DN, Ronco F. Cardiorenal syndromes. *Curr Opin Crit Care* 2009;15:384-91.
2. Frederix I, Dendale P, Schmid JP. Who needs secondary prevention? *Eur J Prev Cardiol* 2017;24:8-13.
3. Bongartz LG, Braam B, Verhaar MC, et al. Transient nitric oxide reduction induces permanent cardiac systolic dysfunction and worsens kidney damage in rats with chronic kidney disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;298:815-23.
4. Fischer D, Rossa S, Landmesser U, et al. Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death. *Eur Heart J* 2004;26:65-9.
5. Ortiz PA, Garvin JL. Interaction of O(2)(-) and NO in the thick ascending limb. *Hypertension* 2002;39:591-96.
6. Wu L, Mayeux PR. Effects of the inducible nitric-oxide synthase inhibitor L-N(6)-(1-iminoethyl)-lysine on microcirculation and reactive nitrogen species generation in the kidney following lipopolysaccharide administration in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;320:1061-7.
7. Wu L, Tiwari MM, Messer KJ, et al. Peritubular capillary dysfunction and renal tubular epithelial cell stress following lipopolysaccharide administration in mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:261-8.
8. Rajapakse NW, Nanayakkara S, Kaye DM. Pathogenesis and treatment of the cardiorenal syndrome: Implications of L-arginine-nitric oxide pathway impairment. *Pharmacol Ther* 2015;154:1-12.
9. Majid DS, Navar LG. Nitric oxide in the control of renal hemodynamics and excretory function. *Am J Hypertens* 2001;14:74-82.
10. Lee J, Bae EH, Ma SK, Kim SW. Altered nitric oxide system in cardiovascular and renal diseases. *Chonnam Med J* 2016;52:81-90.
11. Virzi GM, Clementi A, de Cal M, et al. Oxidative stress: dual pathway induction in cardiorenal syndrome type 1 pathogenesis. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015:391790.
12. Singh RR, Easton LK, Booth LC, et al. Renal nitric oxide deficiency and chronic kidney disease in young sheep born

- with a solitary functioning kidney. *Sci Rep* 2016;26:26777.
13. Mercanoğlu GO, Pamukçu B, Safran N, et al. Nebivolol prevents remodeling in a rat myocardial infarction model: an echocardiographic study. *Anadolu Kardiyol Derg* 2010;10:18-27.
 14. Fraccarollo D, Hu K, Galuppo P, Gaudron P, Ertl G. Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarction: possible involvement of myocardial endothelin system in ventricular remodeling. *Circulation* 1997;96:3963-73.
 15. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985;57:84-95.
 16. Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Brown PA, et al. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces oxidant stress-mediated renal dysfunction and injury in the rat. *Kidney Int* 2000;58:658-73.
 17. Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics—2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117:e25-146.
 18. Ohno K, Kuno A, Murase H, et al. Diabetes increases the susceptibility to acute kidney injury after myocardial infarction through augmented activation of renal Toll-like receptors in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2017;313:1130-42.
 19. Haase M, Kellum JA, Ronco C. Subclinical AKI—an emerging syndrome with important consequences. *Nat Rev Nephrol* 2012;8:735-9.
 20. Rosner MH, Ronco C, Okusa MD. The role of inflammation in the cardio-renal syndrome: a focus on cytokines and inflammatory mediators. *Semin Nephrol* 2012;32:70-8.
 21. Yu L, Gengaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schrier RW. Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1691-5.
 22. Cho E, Kim M, Ko YS, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of cardiorenal syndrome in a rat myocardial infarction model. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:2766-78.
 23. Cruz DN. Cardiorenal syndrome in critical care: the acute cardiorenal and renocardiac syndromes. *Adv Chronic Kidney Dis* 2013;20:56-66.
 24. Ronco C, Cicoira M, McCullough PA. Cardiorenal syndrome type 1: pathophysiological crosstalk leading to combined heart and kidney dysfunction in the setting of acutely decompensated heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1031-42.
 25. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997;82:291-5.
 26. Rubattu S, Mennuni S, Testa M. Pathogenesis of chronic cardiorenal syndrome: is there a role for oxidative stress? *Int J Mol Sci* 2013;14:23011-32.
 27. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 2011;21:103-15.
 28. Nazıroğlu M, Yoldaş N, Uzguç EN, Kayan M. Role of contrast media on oxidative stress, Ca(2+) signaling and apoptosis in kidney. *J Membr Biol* 2013;246:91-100.
 29. Maack C, Böhm M. Targeting mitochondrial oxidative stress in heart failure throttling the afterburner. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:83-6.
 30. Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14:45-55.
 31. Sung CC, Hsu YC, Chen CC, Lin YF, Wu CC. Oxidative stress and nucleic acid oxidation in patients with chronic kidney disease. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:301982.
 32. Gabbai FB, Blantz RC. Role of nitric oxide in renal hemodynamics. *Semin Nephrol* 1999;19:242-50.
 33. Fischer E, Schnermann J, Briggs JP, et al. Ontogeny of NO synthase and renin in juxtaglomerular apparatus of rat kidneys. *Am J Physiol* 1995;268:1164-76.
 34. De Nicola L, Blantz RC, Gabbai FB. Nitric oxide and angiotensin II. Glomerular and tubular interaction in the rat. *J Clin Invest* 1992;89:1248-56.
 35. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:1620-24.
 36. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991;266:4244-50.
 37. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:481-7.
 38. Walker LM, Walker PD, Imam SZ, Ali SF, Mayeux PR. Evidence for peroxynitrite formation in renal ischemia-reperfusion injury: studies with the inducible nitric oxide synthase inhibitor L-N(6)-(1-Iminoethyl)lysine. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:417-22.
 39. Chatterjee PK, Patel NS, Kvale EO, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2002;61:862-71.
 40. Noiri E, Nakao A, Uchida K, et al. Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001;281:948-57.
 41. Pasini AF, Garbin U, Stranieri C, et al. Nebivolol treatment reduces serum levels of asymmetric dimethylarginine and improves endothelial dysfunction in essential hypertensive patients. *Am J Hypertens* 2008;21:1251-7.
 42. Mercanoğlu G, Safran N, Gungor M, et al. The effects of nebivolol on apoptosis in a rat infarct model. *Circ J* 2008;72:660-70.