

Ratlarda Oluşturulan Renal İskemi Reperfüzyon Hasarında Epibatidin Etkileri

The Effect of Epibatidine on Renal Ischemia Reperfusion Injury in Rats

Ayşe Börklüce¹, Gökçen Emmez², Gözde İnan², Özlem Gülbahar³, Sibel Serin Kilicoglu⁴, Mehmet Serdar Gültekin⁵, Mustafa Bahadır⁶, Tuba Saadet Devenci Bulut³, Hasan Kutluk Pampal²

¹Özel İstanbul Hastanesi Anestezi Kliniği, İstanbul, Türkiye

²Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁴Başkent Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁵Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Ana Bilim Dalı, Erzurum, Türkiye

⁶TÜBİTAK, Savunma Sanayii Araştırma ve Geliştirme Enstitüsü, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Böbrek iskemisi reperfüzyon hasarında, kolinerjik antiinflamatuar yolğun uyarılmasıyla hasarın azaltıldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmanın amacı, sağlıklı ratlarda uygulanan renal iskemi-reperfüzyon (I/R) hasarı modelinde, iskemi öncesinde uygulanan non-selektif nikotinik asetilkolin reseptör agonisti olan epibatidin böhrek üzerine koruyucu etkilerini araştırmaktır.

Yöntem: Etik kurul onayı alındıktan sonra, 24 adet Wistar Albino rat randomize 4 gruba ayrıldı. Grup S: Sham (n=6), Grup I/R: İskemi/reperfüzyon (n=6), Grup I/R-E: İskemi/reperfüzyon-Epibatidin (n=6), Grup E: Epibatidin (n=6). Tüm gruplara anestezi altında laparotomi ve bilateral renal arter ve ven diseksiyonu yapıldı. Grup S'de başka bir işlem yapılmadı. Grup I/R ve Grup I/R-E'de 25 dakika renal iskemi ve sonrasında 24 saat reperfüzyon uygulandı. Grup I/R-E ve Grup E'de laparotomi öncesinde 5 µg kg⁻¹ tek doz epibatidin subkutan olarak uygulandı. Reperfüzyon dönemi bitiminde serum BUN, kreatinin, serum ve idrar nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL) ve sistatin C, serum IL-6 ve TNF-α incelemeleri için kan ve idrar örnekleri alındı.

Bulgular: Grup S ile karşılaştırıldığında Grup I/R'de BUN, kreatinin, NGAL, sistatin C, IL-6 ve TNF-α düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar saptandı (p<0.05). Grup I/R-E'de ise yukarıdaki biyobelirteçlerin düzeyi Grup S ile benzer düzeylerdeydi.

Sonuç: Bu sonuçlar, ratlarda oluşturulan renal I/R hasarında, iskemiden önce verilen epibatidin, böbrek üzerine koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Renal iskemi reperfüzyon hasarı, kolinerjik anti-inflamatuar yolak, n7AChR, epibatidin, NGAL

ABSTRACT

Objective: The attenuation of renal ischemia reperfusion (I/R) injury by stimulating cholinergic anti-inflammatory pathway has been demonstrated in the literature. The purpose of this study is to investigate the protective effects of epibatidine, a non selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, administered before ischemia on renal ischemia-reperfusion injury.

Methods: After Ethics Committee approval, 24 Wistar Albino rats were randomly allocated into 4 groups. Group S: Sham (n=6), Group I/R: Ischemia/reperfusion (n=6), Group I/R-E: Ischemia/reperfusion-Epibatidine (n=6), Group E: Epibatidine (n=6). All groups underwent laparotomy and bilateral renal artery and vein dissection under anesthesia. No further action was taken in Group S. In Group I/R and Group I/R-E, renal ischemia was applied for 25 minutes and then reperfusion for 24 hours. A single dose of 5 µg kg⁻¹ epibatidine was administered subcutaneously before the laparotomy in Group I/R-E and Group E. At the end of the reperfusion period, blood and urine samples were taken for plasma BUN, creatine, plasma and urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and cystatin C, plasma IL-6 and TNF-α assessment.

Results: Plasma BUN, creatine, NGAL, cystatin C, IL-6 and TNF-α levels were significantly higher in Group I/R when compared to Group S (p<0.05). All the levels of the above biomarkers were comparable in Group S and Group I/R-E.

Conclusion: These results indicate that epibatidine administration before ischemia has a protective effect on kidney in renal I/R injury induced rats.

Keywords: Renal ischemia-reperfusion injury, cholinergic anti-inflammatory pathway, n7AChR, epibatidine, NGAL

Geliş tarihi/Received : 04.04.2024
Kabul tarihi/Accepted : 28.04.2024
Yayın tarihi : 30.04.2024

*Yazışma adresi: Hasan Kutluk Pampal • hpampal@gazi.edu.tr

Ayşe Börklüce 0000-0002-3526-7034 / Gökçen Emmez 0000-0002-6604-2719

Gözde İnan 0000-0003-0989-1914 / Özlem Gülbahar 0000-0003-0450-4305

Sibel Serin Kilicoglu 0000-0002-7658-5186 / Mehmet Serdar Gültekin 0000-0003-1283-729X

Mustafa Bahadır 0000-0002-9502-8430 / Tuba Saadet Devenci Bulut 0000-0002-3023-919X

Hasan Kutluk Pampal 0000-0003-4664-391X

Atf: Börklüce A, Emmez G, İnan G, Gülbahar Ö, Kilicoglu SS, Gültekin MS, Bahadır M, Devenci Bulut TS, Pampal HK. Ratlarda oluşturulan renal iskemi reperfüzyon hasarında epibatidin etkileri. JARSS 2024;32(2):103-110.



Bu eser "Creative Commons Atıf-GayriTicari-4.0 Uluslararası Lisansı" ile lisanslanmıştır.

GİRİŞ

Akut böbrek hasarı (ABH) çeşitli immün ve metabolik yolları tetikleyen, vücutta inflamatuvar/antiinflamatuvar dengeyi bozan ve sonuç olarak uzak organ işlev bozukluklarına yol açan bir durumdur (1). İnsidansı, hastanede yatan hastalarda %1-7, yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda %30-50 arasında değişmekte ve özellikle yoğun bakım hastalarında %50'lere varan yüksek mortalite oranı ile seyretmektedir (2).

Akut böbrek hasarının en sık nedeni sepsis, majör cerrahiler, kalp yetmezliği, hipovolemi ve şok gibi hipoperfüzyonla ilişkili iskemik hasarın yoğun hücre ölümüne yol açmasıdır. Akut böbrek hasarının patofizyolojisi, azalmış renal kan akımı sonucu ortaya çıkan akut tübüler nekrozdur (3). Böbrekte fonksiyon kaybı hızla oluşur ve bu hızlı fonksiyon kaybının saptanma zamanı ile mortalite gelişimi arasında korelasyon olduğu düşünülmektedir. Bu da araştırmacıları iskemik hayvan modellerinde erken tanı ve tedavi için yeni biyobelirteçlerin ve maddelerin araştırıldığı ABH çalışmalarına yönlendirmiştir.

İskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı, iskemik sürecini takip eden, yeniden kanlanma sürecinde ortaya çıkan hücre apoptozisi ve nekrozu ile sonuçlanan, reaktif oksijen türlerinin ortaya çıktığı ve inflamatuvar yolağın aktivasyonu ile karakterize bir durumdur (4,5). İskemi/reperfüzyon hasarı, birçok farklı yolak ve mekanizma içermektedir. Bu yollar içinde yer alan kolinerjik antiinflamatuvar yolak, ilk olarak 2002 yılında tanımlanmış, vücudun çeşitli bölgelerindeki inflamasyonun beyin tarafından, vagus siniri ve periferik hücrelerden salınan mediatörler ile aktive olan nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR'ler) aracılığıyla modüle edildiği düşünülen fizyolojik bir mekanizmadır (6). İnflamatuvar/antiinflamatuvar dengeyi sağlayan bu nöroimmun mekanizm vagal sinirin elektriksel uyarımı veya farmakolojik olarak organ düzeyinde reseptörlerin uyarılması ile aktive edilerek inflamatuvar yanıtı baskılayabilir (7-10).

Kolinerjik antiinflamatuvar yolak ile makrofajlarda bulunan alfa yedi nikotinik asetilkolin reseptör ($\alpha 7nAChR$) aktivasyonu aracılığıyla inflamasyonun düzenlendiği gösterilmiştir (7-10). Ayrıca vagal sinir stimülasyonunun antiinflamatuvar etkisinin, $\alpha 7nAChR$ 'lerden yoksun farelerde saptanmaması bu reseptör alt tipinin kolinerjik antiinflamatuvar yolağın önemli bir komponenti olduğunu düşündürmektedir (8).

Epibatidin, Ekvator kurbağası olarak bilinen, *Epipedobates tricoloris*'in derisinden izole edilen, yerli kabileler tarafından avcılık amacıyla oklarda kullanılan, ekso-2-(6-kloro-3-piridil)-7-azabisiklo-[2.2.1] heptan yapısına sahip toksik bir alkaloiddir. Epibatidin antiinflamatuvar ve analjezik etkileri olan, bu etkilerini $\alpha 7$ reseptörleri aracılığı ile gösteren potent ancak non-selektif bir nAChR agonistidir (11).

Bu çalışmada sağlıklı ratlarda, bilateral renal arter ve ven klemplenerek oluşturulan renal I/R sonrasında oluşan hasar

üzerine, bir kolinerjik reseptör agonisti olan epibatidinin hasarı önlemedeki etkinliğini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 07.09.2021 tarih ve G.Ü.ET-21.067 kod numaralı etik kurul onayı alındıktan sonra, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirildi. Ağırlıkları 220-270 gr arasında değişen 24 adet dişi Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Ratlar 20-21°C, 12 saat gece 12 saat gündüz periyotları sağlanan özel çelik tel kafeslerde saklandı. Beslenme ve su ihtiyaçları çalışma başlangıcına kadar serbest erişim ile sağlandı.

İşlem öncesi ratlar her grupta 6 adet olmak üzere, rastgele 4 gruba ayrıldılar: Grup S: Sham (n=6), Grup I/R: İskemi/reperfüzyon (n=6), Grup I/R-E: İskemi/reperfüzyon-Epibatidin (n=6), Grup E: Epibatidin (n=6).

Deney başlangıcında; intramuskuler enjeksiyonla, 100 mg kg^{-1} dozda ketamine hidroklorid (Ketalar® flakon, Parke-Davis, USA) ve 5-10 mg kg^{-1} ksilazin hidroklorid (Alfazyne %2, Alfasan International Holland) verilerek anestezi sağlandı. Gerektiğinde ratların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin (yarı dozda, 50 mg kg^{-1}) refleksi yanıtlara (pensetle ayağa ağırlı uyarın verilmesi-pedal refleksi, palpebral ve korneal refleksi) bakılarak tekrarlandı. İşlem, bir ısıtma lambası altında ve ısıtıcı operasyon masası üzerinde, ratlar supin pozisyonda iken gerçekleştirildi.

Deney Grupları

Sham grubu (Grup S, n=6): Bu gruptaki ratlarda renal arter ven klemplenmeden, sadece laparotomi ve renal pediküllerin diseksiyonu işlemleri uygulandı. İşlemden 24 saat sonra ketamin+ksilazin anestezisi altında intrakardiyak kan alımı ile ratlar sakrifiye edildi.

İskemi/reperfüzyon grubu (Grup I/R, n=6): Bu gruptaki ratlarda laparotomi sonrasında 25 dakika süre ile bilateral renal arter ve vene kros klemp konularak renal iskemik gerçekleştirildi. Yirmi beş dakikalık iskemiyi takiben damar klemp açıldı ve batın sütüre edilerek kapatıldı. İşlemden 24 saat sonra ketamin+ksilazin anestezisi altında intrakardiyak kan alımı ile ratlar sakrifiye edildi.

İskemi/reperfüzyon-Epibatidin grubu (Grup I/R-E, n=6): Bu gruptaki ratlarda, 5 μg kg^{-1} tek doz epibatidin subkutan olarak uygulandıktan sonra laparotomi yapıp 25 dakika süre ile bilateral renal arter ve vene kros klemp konularak renal iskemik gerçekleştirildi. İskemi sonrası damar klempleri açılarak 24 saat reperfüzyon yapıldı. Ratlar 24 saatin sonunda ketamin+ksilazin anestezisi altında intrakardiyak kan alımı ile sakrifiye edildi.

Epibatidin grubu (Grup E-K, n=6): Bu gruptaki ratlara $5 \mu \text{kg}^{-1}$ tek doz epibatidin subkutan olarak uygulandıktan sonra renal arter ven klemplenmeden, sadece laparotomi ve renal pediküllerin diseksiyonu yapıldı. 24 saat sonra ketamin+ksilazin anestezisi altında intrakardiyak kan alımı ile ratlar sakrifiye edildi.

Alınan kanlar $5000 \text{ devir dk}^{-1}$ ile santrifüj edildi ve serumlar alınarak -80°C 'de saklandı. İlk girişim sonrası ratların idrarları 24 saat boyunca takip edildikleri metabolik kafeslerde biriktirildi. Metabolik kafeslerde biriken 24 saatlik idrarlar da -80°C 'de muhafaza edildi.

Biyokimyasal İnceleme

Serum IL-6, TNF- α , nötrofil jelatinaz ilişkili lipokalin (NGAL-Neutrophil gelatinase associated lipocalin), kreatinin, BUN ve sistatin C (CysC) düzeylerinin ölçümü için kanlar, sarı kapaklı jelli tüplere alındıktan 30 dakika sonra 3000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi. İdrar kreatinin, BUN ve sistatin C düzeyleri için ise steril kaplara alınan idrarlar 3000 devirde 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen serum ve idrarlar yeni eppendorf tüplere konulup analizi yapıncaya kadar -80°C 'de saklandı.

Serum TNF- α düzeyleri, ELISA yöntemi ile ticari bir kit (Diasource Immunoassays S.A.- Rue du Bosquet, 2-B-1348 Louvain-la-Neuve-Belgium) kullanılarak analiz edildi. Kite ait çalışma içi ve çalışmalar arası CV değerleri sırasıyla 6,6% ve 4,5% olarak verildi.

Serum ve idrar NGAL düzeyleri, ELISA yöntemi ile ticari bir kit (Bioassay Technology Laboratory Shanghai Korain Biotech Co.) kullanılarak analiz edildi. Kite ait çalışma içi ve çalışmalar arası CV değerleri sırasıyla $<8\%$ ve $<10\%$ olarak verildi.

Serum ve idrar kreatinin, BUN ve sistatin C düzeyleri, üreticinin tavsiye ettiği talimatlar izlenerek AU 480 (Beckman Coulter Inc., 250 S. Kremer Blvd., Brea, CA 92821 U.S.A.) otoanalizöründe yine Beckman Coulter kitleri kullanılarak analiz edildi. Kitlere ait çalışma içi ve çalışmalar arası CV değerleri sırasıyla sistatin c için 0,82% ve 1,69%; kreatinin için 1,12% ve 1,68%; BUN için 2,28% ve 3,25% olarak verildi.

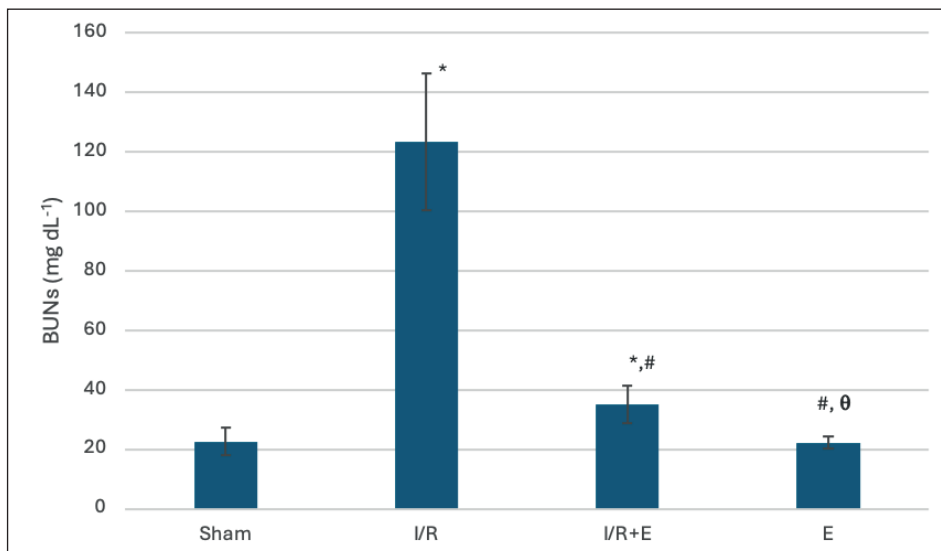
Serum IL-6 düzeyleri, Elektrokemilüminesans immünolojik (ECLIA) yöntemi ile ticari bir kit (Elecys IL6, Roche Diagnostic GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim) kullanılarak Roche Cobas 601 otoanalizöründe çalışıldı. Kite ait çalışma içi ve çalışmalar arası CV değerleri sırasıyla 2,9% ve 3,1% olarak verildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme SPSS 20.0 bilgisayar programında aşağıda sıralanan testler kullanılarak gerçekleştirildi ve $p<0,05$ anlamlı kabul edildi. Bulgular ortalama \pm standart sapma (SD) olarak verildi. Veriler Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Anlamlılık tespit edilen değişkenler, Mann-Whitney U testi ile değerlendirilip Bonferroni düzeltmesi uygulandı.

BULGULAR

Serum BUN düzeyleri Grup S'de $22,6\pm 4,68 \text{ mg dL}^{-1}$, Grup I/R'de $123,33\pm 23,00 \text{ mg dL}^{-1}$, Grup I/R+E'de $35,02\pm 6,42 \text{ mg dL}^{-1}$ ve Grup E'de ise $22,29\pm 2,21 \text{ mg dL}^{-1}$ olarak saptandı. Gruplar, serum BUN düzeyleri açısından karşılaştırıldığında Grup I/R'de ve Grup I/R+E'de Grup S'ye göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (Grup S-Grup I/R $p=0,004$, Grup S-Grup I/R+E $p=0,01$). Grup I/R ile karşılaştırıldığında ise Grup I/R+E ve Grup E'de serum BUN düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş bulundu (Grup I/R-Grup I/R+E $p=0,004$, Grup I/R-Grup E $p=0,04$) (Şekil 1).



Şekil 1: Grupların serum BUN düzeyleri
 *: Grup S ile karşılaştırıldığında,
 #: Grup I/R ile karşılaştırıldığında,
 0: Grup I/R+E ile karşılaştırıldığında.
BUN: Kan Üre Nitrojen, **BUNs:** Serum Kan Üre Nitrojen, **Sham:** Grup sham, **I/R:** Grup iskemi/reperfüzyon, **I/R+E:** Grup iskemi/reperfüzyon+epibatidine, **E:** Grup epibatidin.

Serum kreatinin düzeyleri Grup S'de $0,35 \pm 0,05$ mg dL⁻¹, Grup I/R'de $2,2 \pm 0,97$ mg dL⁻¹, Grup I/R+E'de $0,48 \pm 0,21$ mg dL⁻¹ ve Grup E'de ise $0,3 \pm 0,04$ mg dL⁻¹ olarak saptandı. Serum kreatinin düzeyleri Grup I/R'de Grup S'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p=0,004$). Grup I/R ile kıyaslandığında ise serum kreatinin düzeylerinin Grup I/R+E ve Grup E'de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu saptandı (Grup I/R-Grup I/R+E $p=0,004$, Grup I/R-Grup E $p=0,037$ (Şekil 2)).

Grup S, Grup I/R, Grup I/R+E ve Grup E'de, serum NGAL değerleri sırasıyla $4,63 \pm 1,04$ ng dL⁻¹, $10,48 \pm 4,29$ ng dL⁻¹, $4,29 \pm 1,89$ ng dL⁻¹ ve $5,34 \pm 2,62$ ng dL⁻¹ saptanırken, idrar NGAL değerleri sırasıyla $5,62 \pm 1,41$ ng dL⁻¹, $16,16 \pm 4,09$ ng dL⁻¹, $7,47 \pm 2,30$ ng dL⁻¹ ve $7,78 \pm 1,72$ ng dL⁻¹ olarak saptandı. Hem serum hem de idrar NGAL değerleri Grup S ile karşılaştırıldığında Grup I/R'de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken ($p=0,004$), Grup I/R ile karşılaştırıldığında Grup I/R+E (serum: $p=0,01$, idrar: $p=0,004$) ve Grup E'de (serum: $p=0,016$, idrar: $p=0,004$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüktü (Şekil 3).

Grup S, Grup I/R, Grup I/R+E ve Grup E'de, serum CysC değerleri sırasıyla $0,44 \pm 0,05$ ng dL⁻¹, $1,18 \pm 0,34$ ng dL⁻¹, $0,44 \pm 0,03$ ng dL⁻¹ ve $0,42 \pm 0,01$ ng dL⁻¹ saptanırken, idrar CysC değerleri sırasıyla $0,9 \pm 0,7$ ng dL⁻¹, $2,93 \pm 0,46$ ng dL⁻¹, $1,61 \pm 0,47$ ng dL⁻¹ ve $0,93 \pm 0,62$ ng dL⁻¹ olarak saptandı. Hem serum hem de idrar CysC değerleri Grup S ile karşılaştırıldığında Grup I/R'de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken

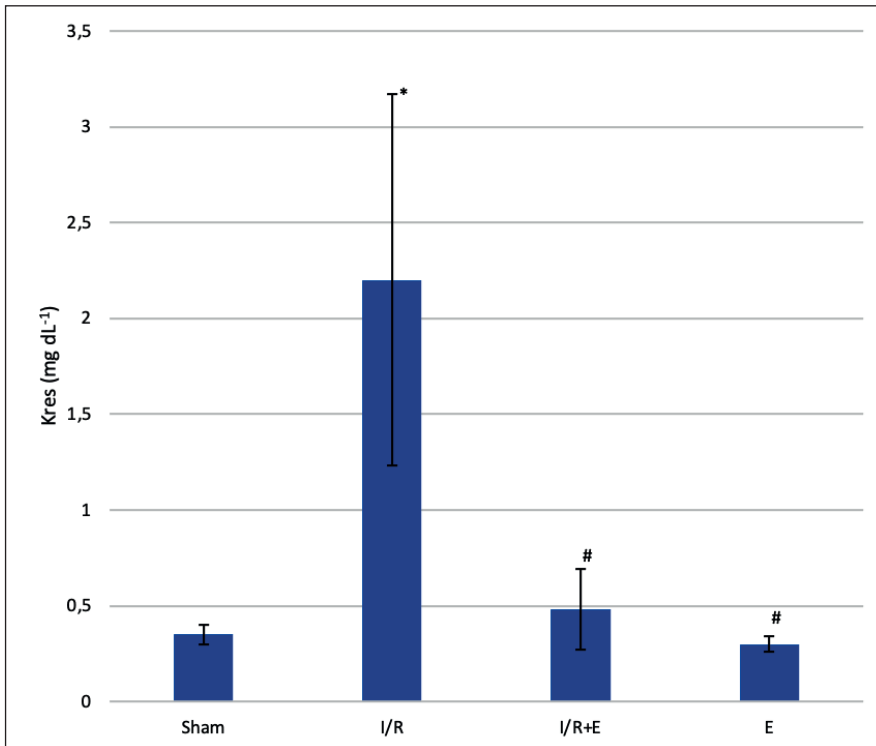
($p=0,004$), Grup I/R ile karşılaştırıldığında Grup I/R+E (serum: $p=0,004$, idrar: $p=0,006$) ve Grup E'de (serum: $p=0,004$, idrar: $p=0,004$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu (Şekil 4).

Grup S, Grup I/R, Grup I/R+E ve Grup E'de, serum IL-6 değerleri sırasıyla $30,52 \pm 9,86$ pg mL⁻¹, $63,08 \pm 5,46$ pg mL⁻¹, $42,59 \pm 4,96$ pg mL⁻¹ ve $30,17 \pm 7,22$ pg mL⁻¹ saptandı. Serum IL-6 değerleri Grup S ile karşılaştırıldığında Grup I/R'de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken ($p=0,004$), Grup I/R ile karşılaştırıldığında Grup I/R+E ($p=0,004$) ve Grup E'de ($p=0,004$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu (Şekil 5).

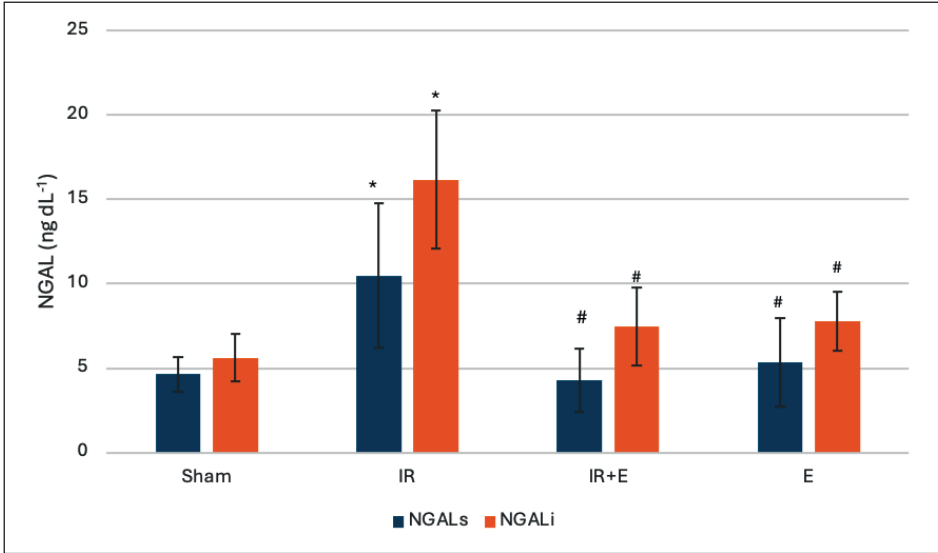
Grup S, Grup I/R, Grup I/R+E ve Grup E'de, serum TNF- α değerleri sırasıyla $20,28 \pm 3,64$ pg mL⁻¹, $74,32 \pm 21,40$ pg mL⁻¹, $29,75 \pm 7,64$ pg mL⁻¹ ve $22,36 \pm 4,90$ pg mL⁻¹ saptandı. Serum TNF- α değerleri Grup S ile karşılaştırıldığında Grup I/R'de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulunurken ($p=0,004$), Grup I/R ile karşılaştırıldığında Grup I/R+E ($p=0,004$) ve Grup E'de ($p=0,004$) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulundu (Şekil 6).

TARTIŞMA

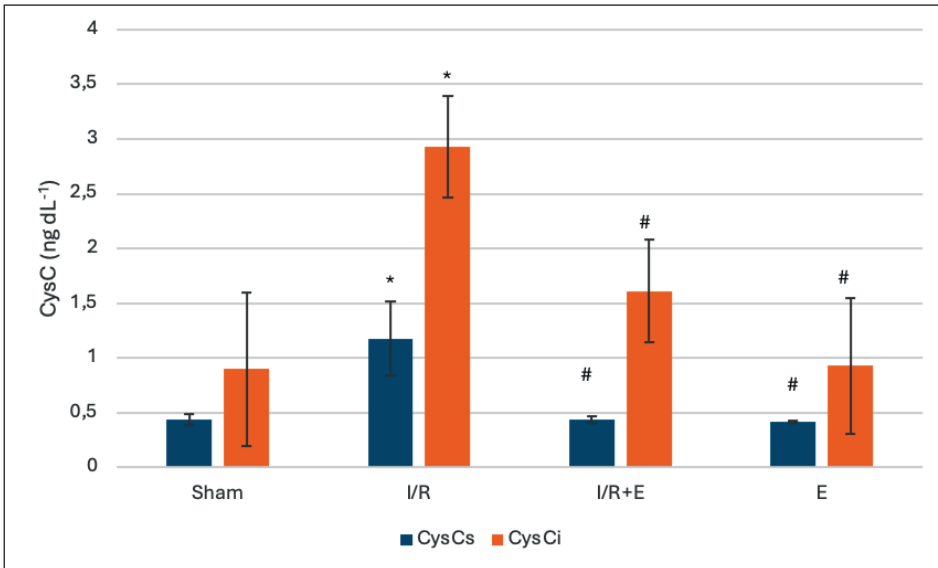
Akut böbrek hasarında, patofizyolojisinin ve tedavisinde kullanılacak potansiyel ajanların araştırılması için hayvan modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bilateral renal pedikülün klemplenmesiyle oluşturulan deneysel bilateral I/R hasarı



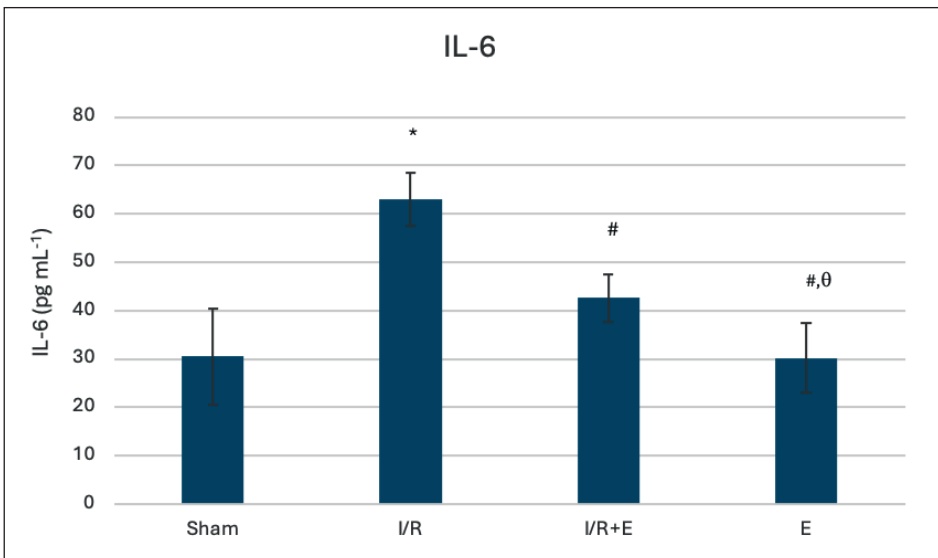
Şekil 2: Grupların serum Kre düzeyleri
*: Grup S ile karşılaştırıldığında, #: Grup I/R ile karşılaştırıldığında. **Kre:** Kreatinin, **Kres:** Serum kreatinin, **Sham:** Grup sham, **I/R:** Grup iskemi/reperfüzyon, **I/R+E:** Grup iskemi/reperfüzyon+epibatidine, **E:** Grup epibatidin.



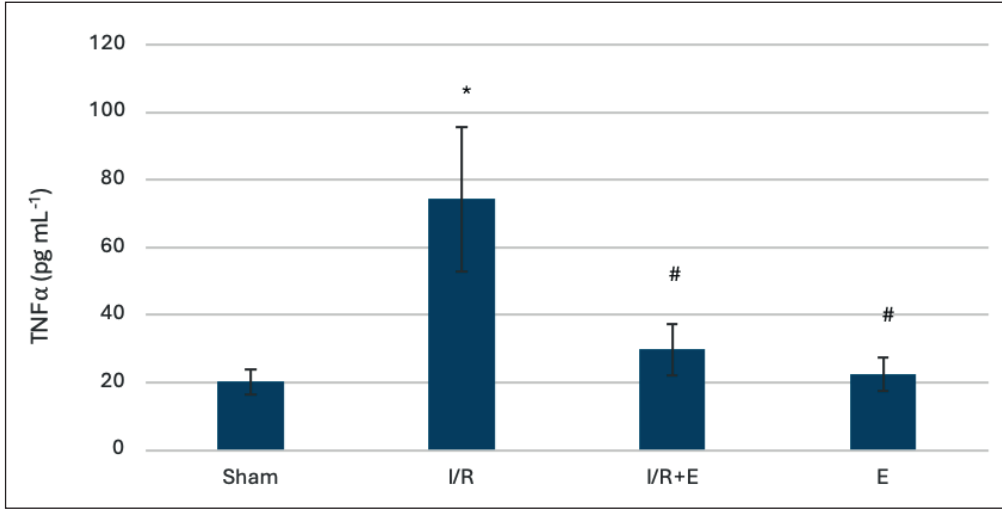
Şekil 3: Grupların Serum ve İdrar NGAL değerleri. *: Grup S ile karşılaştırıldığında, #: Grup I/R ile karşılaştırıldığında. **NGAL:** Nötrofil jelatinaz ilişkili lipocalin, **NGALs:** Serum NGAL, **NGALi:** idrar NGAL, **Sham:** Grup sham, **I/R:** Grup iskemi/reperfüzyon, **I/R+E:** Grup iskemi/reperfüzyon+epibatidine, **E:** Grup epibatidin.



Şekil 4: Grupların Serum ve İdrar CysC düzeyleri. *: Grup S ile karşılaştırıldığında, #: Grup I/R ile karşılaştırıldığında. **CysC:** Sistatin C, **CysCs:** Serum CysC, **CysCi:** İdrar CysC, **Sham:** Grup sham, **I/R:** Grup iskemi/reperfüzyon, **I/R+E:** Grup iskemi/reperfüzyon+epibatidine, **E:** Grup epibatidin.



Şekil 5: Grupların serum IL-6 düzeyleri. *: Grup S ile karşılaştırıldığında, #: Grup I/R ile karşılaştırıldığında, θ: Grup I/R+E ile karşılaştırıldığında. **IL-6:** İnterlökin 6, **Sham:** Grup sham, **I/R:** Grup iskemi/reperfüzyon, **I/R+E:** Grup iskemi/reperfüzyon+epibatidine, **E:** Grup epibatidin.



Şekil 6: Grupların serum TNFα düzeyleri. *: Grup S ile karşılaştırıldığında, #: Grup I/R ile karşılaştırıldığında. TNFα: Tümör nekrozis faktör α, Sham: Grup sham, I/R: Grup iskemi/reperfüzyon, I/R+E: Grup iskemi/reperfüzyon+epibatidine, E: Grup epibatidin.

modeli, tüm böbrek dokusunu etkilemesi ve böbrek hasarını gösteren biyobelirteçlerde anlamlı değişikliklere neden olması sebebiyle ABH araştırmaları için kabul gören, değerli bir yöntemdir (12). Bu çalışmada Wistar Albino ratlarda, 25 dakika süreyle bilateral renal pedikülün klemplenmesi uygulanarak, I/R hasarı oluşturulmuş ve işlem öncesinde uygulanan epibatidinin, hasar üzerine etkinliği araştırılmıştır.

Bu çalışmada konvansiyonel böbrek hasarı biyobelirteçleri olan serum BUN ve kreatinin düzeylerinin I/R oluşturulan grupta, kontrol grubuna kıyasla yüksek, epibatidin tedavisi alan grupta ise I/R oluşturulan gruba kıyasla düşük olduğu saptandı. Bilateral I/R grubunda tespit edilen serum BUN ve kreatinin düzeylerinin yüksekliği, deneysel modelin böbrekte hedeflenen hasarlanmayı oluşturduğu konusunda araştırmacılara net bir bilgi sağlasa da klinik uygulamalarda bu konvansiyonel biyobelirteçler böbrek yetmezliğinin erken tanınması veya prognozun ön görülmesi konularında yetersiz kalmaktadırlar (13). Bu durum, araştırmacıları böbrek hasarının erken tanısında kullanılabilecek farklı biyobelirteçlerin belirlenmesi konusunda arayışlara yönlendirmiştir. Yoğun bakım hastalarında, acil servislere takip edilen hastalarda, kardiyak cerrahi geçiren hastalarda ortaya çıkan ABH tablosunda veya kontrast ajan kullanılması sonrası gelişen ABH'de, NGAL ve CysC değerlerinin serum kreatinin değerinde yükselme gözlenmeden yaklaşık 48 saat kadar önce yükseldiği ve böylelikle erken tanı imkânı sağladığı gösterilmiştir (14). Biz de bu çalışmada hem serum hem de idrar NGAL ve CysC düzeylerini değerlendirdiğimizde, I/R oluşturulan grupta bu biyobelirteçlerin hem serumda hem idrarda yükseldiğini, tedavi edilen grupta ise her ikisinin de düştüğünü gözlemledik. Bu sonuçlar epibatidinin, bilateral I/R oluşturulan ratlarda I/R hasarını engellemede etkili olduğunu düşündürdü.

Her ne kadar NGAL düzeyleri ABH sırasında erken dönemde yükselbilse de, serum NGAL düzeylerini arttıracak birçok

neden mevcuttur. Serum NGAL düzeyleri, ABH'nin yanı sıra bakteriyel enfeksiyonlara bağlı olarak, bakteriyel olmayan inflamatuvar süreçlerde, kronik hastalıklarda ve hipertansiyonda yükselbilir (13). Han ve ark. ile Mori ve ark. yaptıkları çalışmalarda sepsise bağlı ABH sırasında renal NGAL ekspresyonunun arttığını, idrarda saptanan NGAL kaynağının bu renal dokuda üretilen NGAL olduğunu ve idrar NGAL düzeyinin belirlenmesiyle renal hasarın daha net bir şekilde gösterilebileceğini bildirmişlerdir (13,15). Biz de bu çalışmada hem idrar hem de serum NGAL düzeylerinin renal I/R sonrasında arttığını ve her iki parametredeki bu artışın renal I/R hasarına bağlı olduğunu gözlemledik. Ayrıca tedavi ajanı uygulaması sonrası bu parametrelerde düşüşün görülmesi de ajanın etkili olduğunu göstermekteydi. Benzer şekilde idrar ve serum CysC düzeylerinde saptanan değişimler de, epibatidin uygulamasının bilateral renal I/R oluşturulmasına bağlı olarak ortaya çıkan hasarı azalttığı yönündeki verileri desteklemektedir.

Deneysel bilateral I/R hasarı modeli, reperfüzyon sürecinde ortaya çıkan inflamasyona bağlı TNF-α ve IL-6 seviyelerinde de artışın gösterildiği bir modeldir (16). Bu çalışmada biz de I/R grubunda pro-inflamatuvar sitokinlerden TNF-α ve IL-6 düzeylerinin yükselmiş olduğunu ve epibatidin uygulamasıyla bu sitokinlerin düzeylerinin gerilediğini gözlemledik.

Renal I/R hasarında, kolinerjik antiinflamatuvar yolağın fizyolojik rolü gösterilmiş olmakla beraber bu yolağa aracılık eden mekanizmalar veya bu yolda etkin ajanlar halen araştırılmaktadır. Bu konuyla ilgili her yeni çalışma renal hasar mekanizmalarını daha da iyi anlamamızı sağlamaktadır. Her ne kadar elde edilen sonuçların henüz yeterli klinik yansıması mevcut değilse de, böbrek hasarında bu yolak ve bu yolak üzerinde etki eden ajanlar araştırmacılar tarafından araştırmaya değer olarak kabul edilmektedir (17).

Epibatidinin antiinflamatuvar ve analjezik etkileri olan potent ancak non-selektif ($\alpha 4\beta 2$ Ki = 40 pM; $\alpha 7$ Ki = 20 nM) bir nAChR agonistidir. Son yıllarda, nAChR'lerin, özellikle kolinerjik antiinflamatuvar yolağın düzenleyen makrofajlarda $\alpha 7$ nAChR aktivasyonu yoluyla inflamasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada epibatidinin, böbrek hasarını gösteren hemen hemen tüm biyobelirteçler üzerindeki düzeltici etkisinin inflamatuvar süreçteki inhibitör etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (18). İbrahim ve ark., BALB/c farelerde zymosan kullanarak oluşturdukları ABH modelinde, kompetitif asetilkolin esteraz inhibitörü olan gallantamin uygulamasının böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiğini göstermişlerdir (19). Yeboah ve ark., renal I/R oluşturdukları sağlıklı ratlarda Western blot analizi ile renal $\alpha 7$ nAChR miktarında artış olduğunu ve bu artışın da kortikal peritübüler kapillerlerin endotelinde belirgin olduğunu immünohistokimyasal olarak bildirmişlerdir. Yeboah ve ark. çalışmalarında I/R öncesi nikotin ile tedavi edilen ratlarda, I/R sonrası $\alpha 7$ nAChR protein ekspresyonunda azalma saptamış ve bu durumun kolinerjik stimülasyon ile renal korumaya yol açtığını bildirmişlerdir (20). Biz de benzer şekilde, çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla $\alpha 7$ nAChR üzerine etkili non-selektif agonist olan epibatidinin, renal I/R hasarını önleyebileceğini gösterdik.

Chatterjee ve ark., septik farelerde nAChR agonistlerinin böbrek hasarını inflamasyonu baskılayarak azalttığını, özellikle nikotin ve GST-21 uygulanan gruplarda bu etkiyi TNF- α ekspresyonunda azaltarak gerçekleştirdiğini saptamışlardır (18). Yeboah ve ark.'nın çalışmaları da, Chatterjee ve ark.'larının çalışmalarına benzer şekilde kolinerjik agonist ajanların uygulaması ile I/R hasarı sonucu artan TNF- α düzeylerinin normale döndüğünü göstermiştir (18,20). Biz de bu çalışmada, I/R hasarı sonrası ABH gelişen ratlarda epibatidin uygulaması ile sağlanan düzelmelerin epibatidinin $\alpha 7$ nAChR üzerine agonist etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

SONUÇ

Bu veriler ışığında değerlendirildiğinde epibatidinin renal I/R hasarında koruyucu etkilerinin olduğu ve bu tabloda potansiyel terapötik bir ajan olarak kullanılabilmesi öne sürülebilir. Analjezik, antiinflamatuvar, antioksidan, anti-apoptotik etkileri de göz önüne alındığında epibatidinin, gerek yüksek sitokin seviyeleri ile seyreden patolojilere sahip yoğun bakım hastalarında gerekse anestezi uygulanacak renal yetmezlik açısından risk altında olan olgularda tedavide umut vadeden bir ajan olabileceğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak, etki mekanizmasının anlaşılması, yan etkilerinin belirlenmesi ve güvenlik profilinin anlaşılması için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

YAZAR KATKILARI

Çalışmanın fikri veya tasarımı: AB, HKP

Veri toplama: AB, HKP, GE, Gİ

Veri analizi ve yorumlama: ÖG, SSK, TSDB, AB, HKP

Makale taslağının hazırlanması: AB, HKP

Makalenin kritik revizyonu: AB, HKP, GE, Gİ

Diğer (çalışma denetimi, fonlar, materyal, vb...): MSG, MB

Tüm yazarlar (AB, GE, Gİ, ÖG, SSK, MSG, MB, TSDB, HKP)

sonuçları gözden geçirmiş ve makalenin son hâlini onaylamıştır.

KAYNAKLAR

1. Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, Mulay SR, Gaikwad AB. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. *Life Sciences* 2020;256:117860.
2. Beker BM, Corleto MG, Fieiras C, Musso CG. Novel acute kidney injury biomarkers: Their characteristics, utility and concerns. *Int Urol Nephrol* 2018;50(4):705-13.
3. Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gómez H, Kellum JA. Acute kidney injury from sepsis: Current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int* 2019;96(5):1083-99.
4. Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2011;16(3-4):233-8.
5. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, et al. Cell death: Apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol* 2002;21(1):165-70.
6. Yeboah M, Xue X, Duan B, et al. Cholinergic agonists attenuate renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Kidney Int* 2008;74(1):62-9.
7. Gigliotti JC, Huang L, Ye H, et al. Ultrasound prevents renal ischemia-reperfusion injury by stimulating the splenic cholinergic anti-inflammatory pathway. *J Am Soc Nephrol* 2013;24(9):1451-60.
8. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405(6785):458-62.
9. Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003;421(6921):384-8.
10. Pavlov VA, Tracey KJ. Neural regulation of immunity: Molecular mechanisms and clinical translation. *Nat Neurosci* 2017;20(2):156-66.
11. Salehi B, Sestito S, Rapposelli S, et al. Epibatidine: A promising natural alkaloid in health. *Biomolecules* 2019;9(1):6.
12. Lambert E, Schlaich M. The role of renal sympathetic nerves in ischemia reperfusion injury. *Auton Neurosci* 2017;204:105-11.
13. Han M, Li Y, Liu M, Li Y, Cong B. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat. *BMC Nephrol* 2012;13(1):1-10.

14. Aydođdu M, Gürsel G, Sancak B, et al. The use of plasma and urine neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and Cystatin C in early diagnosis of septic acute kidney injury in critically ill patients. *Dis Markers* 2013;34(4):237-46.
15. Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 2005;115(3):610-21.
16. Le Clef N, Verhulst A, D'Haese PC, Vervaeck BA. Unilateral renal ischemia-reperfusion as a robust model for acute to chronic kidney injury in mice. *PLoS One* 2016;11(3):e0152153.
17. D'hoedt D, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: An overview on drug discovery. *Expert Opin Ther Targets* 2009;13(4):395-411.
18. Chatterjee PK, Yeboah MM, Dowling O, et al. Nicotinic acetylcholine receptor agonists attenuate septic acute kidney injury in mice by suppressing inflammation and proteasome activity. *PLoS One* 2012;7(5):e35361.
19. Ibrahim SM, Al-Shorbagy MY, Abdallah DM, El-Abhar HS. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor ameliorates zymosan-induced acute kidney injury in BALB/c mice. *Sci Rep* 2018;8(1):1-10.
20. Yeboah MM, Xue X, Javdan M, Susin M, Metz CN. Nicotinic acetylcholine receptor expression and regulation in the rat kidney after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295(3):654-61.