

# Kronik Hipoksida Enalapril ve Nifedipinin Akciğer ve Miyokard Doku Hasarı Üzerine Etkisi

Y. Doç. Dr. Selim İSBİR, Dr. Koray AK, Dr. Ümit ZEYBEK\*, Y. Doç. Dr. Serdar AKGÜN, Dr. İlhan YAYLIM\*, Y. Doç. Dr. Ali CİVELEK, Dr. Atike TEKELİ, Doç. Dr. Makbule AYDIN\* ve Prof. Dr. Adnan ÇOBANOĞLU\*

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi ABD

\*İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı anjiyotensin konverting enzim inhibitörleri ve kalsiyum kanal blokerlerinin kronik hipoksida akciğer ve miyokarda oluşan doku hasarı üzerine olan etkilerini incelemektir. Bu amaçla doku hasarının göstergeleri olarak dien konjugatları ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ve de koruyucu mekanizma olarak redükte glutatyon (GSH) ve total antioksidan aktivite (TAA) düzeyleri gösterge olarak alınmıştır. Çalışma kapsamında 20 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan her grupta 5 tane olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Grup 1 Sham grubu olarak kullanılmış ve hayvanlar anestezi sonrası sakrifiye edilmiş ve akciğer ve kalp dokuları çıkarılmıştır. Grup 2'de hayvanlar 21 gün süre ile hipoksik ortamda saklanmışlar ve bu sürenin sonunda sakrifiye edilmişlerdir. Grup 3'de hipoksik ortamın yanısıra hayvanlara enalapril 0.2mg/kg gavaj ile verilmiş ve yine 21 gün sonunda sakrifiye edilmişlerdir. Grup 4'de ise hipoksik ortamdaki sıçanlara 0.75 mg/kg nifedipine verilmiştir. Kalp ve akciğer dien konjugatları, MDA ve TAA düzeyleri kontrol grubunda diğer gruplara oranla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde farklı çıkmıştır (akciğer, dien konjugatları grup 2'de  $91.8 \pm 5.35$  nmol/g iken grup 3'de  $57.94 \pm 5.19$  nmol/g ve grup 4'de  $68.7 \pm 3.9$  nmol/g bulunmuştur,  $p < 0.05$ ; TAA, grup 2'de  $4.5 \pm 0.3$  nmol/g iken grup 3'de  $5.1$  (0.1 nmol/g grup 4'de ise  $5.2 \pm 0.14$  nmol/g olarak bulunmuştur  $p < 0.05$ ). Nifedipine ve enalapril kendi aralarında karşılaştırıldıklarında istatistiksel bir fark bulunmamıştır. Sonuç olarak kronik hipoksinin miyokard antioksidan rezerv kapasitesini azalttığını ve akciğerlerde hasara yol açtığını, enalapril ve nifedipinin kronik hipoksiye bağlı olarak gelişen doku hasarında koruyucu etkiye yol açtığını söyleyebiliriz. *Türk Kardiyol Dern Arş 2002; 30: 229-232*

**Anahtar kelimeler:** İskemi-reperfüzyon hasarı, hipoksi, enalapril, nifedipin

Kronik hipoksi klinik olarak siyanotik kalp hastalıkları, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve pulmoner hipertansiyon gibi patolojilerde ortaya çıkan bir bul-

gudur. Lupinetti ve arkadaşları, kronik hipoksinin akut kalp yetersizliğinin gelişiminde önemli bir faktör olduğunu bildirmişlerdir (1). Patofizyolojik olarak değerlendirildiğinde kronik hipoksi; 1. iskemiye karşı olan hücrel direnci azaltır, 2. reperfüzyon sırasında ortaya çıkan hasarı arttırır, 3. pulmoner arter yatağında yeniden yapılanmaya ("remodeling") sebep olarak daralmaya ve pulmoner hipertansiyona yol açar, 4. sağ ventrikül hipertrofisine sebep olur. İskemi / reperfüzyon hasarının mekanizmasına bakıldığında, iskemi ile hücrel ATP yıkılmakta ve açığa çıkan hipoksantin, ortama tekrar oksijen girmesi ile ksantine dönüşmekte ve dışarıya hidrojen peroksit ve hidroksil iyonu gibi toksik maddelerin salınımına sebep olmaktadır (2). Çalışmamızın amacı klinik olarak sıkça kullanılan ve antioksidan özellikleri bilinen enalapril ve nifedipinin kronik hipoksiye bağlı gelişen doku hasarında koruyucu etkilerinin olup olmadığını araştırmaktır.

## MATERYEL ve METOD

Çalışmada 20 adet Sprague Dawley cinsi 320-370 gr ağırlığında sağlıklı erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar randomize olarak 4 gruba ayrılmıştır (n=5, her grupta). Birinci grupta, hayvanlar hipoksiye maruz kalmadan anestezi sonrası sakrifiye edilerek akciğer ve kalpleri çıkarılmıştır. İkinci grupta hayvanlar 3 hafta süre ile normobarik hipoksik bir kamarada saklanmışlar ve bu sürenin sonunda sakrifiye edilerek kalp ve akciğerleri çıkarılmıştır. Üçüncü grupta hayvanlar normobarik ve hipoksik ortamda kaldıkları 3 haftalık süre içerisinde her gün 0.2 mg /kg enalapril'i gastrik gavaj yolu ile almışlardır. Dördüncü grupta ise hayvanlar aynı süre ve şartlarda nifedipin 0.75mg/kg almışlardır. Deney sonunda çıkarılan kalp ve akciğerlerde doku hasarının ve antioksidan rezerv kapasitesinin göstergesi olarak dien konjugatlar, malondialdehit (MDA), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve total antioksidan aktivite (TAA) düzeyleri ölçülmüştür. Hipoksik ortam %10 oksijen içeren bir tüp vasıtasıyla sağlanmıştır. Ortamdaki CO<sub>2</sub> soda içeren bir kap aracılığıyla uzaklaştırılmıştır (şekil 1).

Hayvanlar 3 haftalık süre içerisinde sadece fanusun temizliği ve su kaplarının değiştirilmesi sırasında kamardan çıkartılmıştır.

Doku MDA ölçümü, Uchiyama ve Mihara'nın yöntemi ile thiobarbitürik asit reaganı kullanılarak yapılmıştır (3). Konjuge dienler 230-235nm dalga boyunda ultraviyole ışık kaynağı kullanılarak Dormandy ve ark. tarif ettiği yöntemle göre yapılmıştır (4). Total antioksidan ölçümü, spektrofotometrik olarak Miller ve ark. tarif ettiği yöntemle yapılmıştır (5). Glutasyon değerleri Fairbanks ve ark. tarif ettiği yöntemle ölçülmüştür (6).

İstatistiksel analiz Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapılmıştır. Sonuçlar ortalama değer  $\pm$  standard sapma olarak ifade edilmiş ve  $p < 0.05$  ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Grupların birbirleri ile karşılaştırılmasında ANOVA testi kullanılmıştır.

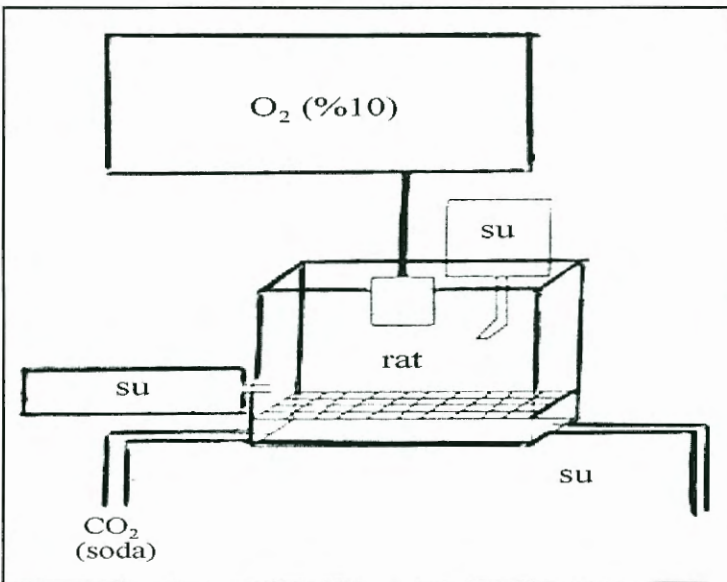
## BULGULAR

Konjuge dien ortalama değerleri kalb için grup 1'de  $17.8 \pm 0.41$ , grup 2'de  $22.52 \pm 0.29$ , enalapril grubunda  $18.6 \pm 0.20$  ve nifedipin grubunda  $18.58 \pm 0.38$  nmol/g bulunmuştur. Buna göre enalapril ve nifedipin gruplarında, konjuge dien düzeyleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşükken diğer gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenmemiştir (Tablo 1). Akciğer konjuge dien değerleri grup 1'de  $50.72 \pm 1.78$ , grup 2'de  $91.48 \pm 5.3$ , enalapril grubunda  $57.94 \pm 5.2$  ve nifedipin grubunda  $68.7 \pm 3.9$  nmol/g olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre kontrol grubu ile sham, enalapril ve nifedipin grupları arasında anlamlı fark bulun-

muştur ( $p < 0.05$ ). Kalb için olan değerlerden farklı olarak, nifedipin grubunda, enalapril grubuna göre daha yüksek çıkmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Tablo 1).

Malondialdehit ortalama değerleri kalb için grup 1'de  $0.22 \pm 0.01$ , grup 2'de  $0.32 \pm 0.03$ , enalapril grubunda  $0.29 \pm 0.03$  ve nifedipin grubunda  $0.30 \pm 0.02$  nmol/g bulunmuştur. Bu değerlere göre enalapril ve nifedipin gruplarında MDA değerleri kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuş, enalapril ve nifedipin grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ise istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Tablo 1). Akciğer MDA değerleri grup 1'de  $0.62 \pm 0.01$ , grup 2'de  $0.68 \pm 0.02$ , enalapril grubunda  $0.40 \pm 0.15$  nifedipin grubunda  $0.38 \pm 0.12$  nmol/gr olarak bulunmuştur. Benzer şekilde kontrol grubu ile enalapril ve nifedipin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir fark ortaya çıkmış, fakat enalapril ve nifedipin grupları arasında bir fark oluşmamıştır (Tablo 1).

Total antioksidan aktivitesi ortalama değerleri kalb için, grup 1'de  $5.7 \pm 0.4$ , grup 2'de  $4.68 \pm 0.35$ , enalapril grubunda  $6.28 \pm 0.08$  ve nifedipin grubunda  $6.52 \pm 0.13$  nmol/g olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre TAA, enalapril ve nifedipin gruplarında kontrol grubuna oranla anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Değerler nifedipin grubunda, enalapril grubuna göre daha yüksek çıkmasına rağmen bu yükseklik, istatistiksel bir anlam oluşturmamıştır ( $p > 0.05$ ). Akciğer TAA, grup 1'de  $6.0 \pm 0.29$ , grup 2'de  $4.5 \pm 0.31$ , enalapril grubunda  $5.1 \pm 0.1$  ve nifedipin grubunda  $5.2 \pm 0.14$  nmol/g bulunmuştur. Değerler benzer şekilde, enalapril ve nifedipin gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek çıkmış, fakat enalapril ve nifedipin grupları arasında istatistiksel bir fark oluşmamıştır ( $p > 0.05$ ).



Şekil 1. Deney sırasında kullanılan hipoksik kamara

Tablo 1. Kalp ve Akciğer Konjuge Dien, MDA, TAA ve GSH düzeyleri. Değerler nmol/g cinsinden verilmiştir.

	Grup 1 Sham	Grup 2 Kontrol	Grup 3 Enalapril	Grup 4 Nifedipin	P<0.05
<u>Konjuge Dien</u>					
Kalp	17.8±0.41	22.52±0.29	18.6±0.20	18.58±0.38	G2 ile G3 ve G4
Akciğer	50.72±1.78	91.48±5.3	57.94±5.2	68.7±3.9	G2 ile G3 ve G4, G3 ile G4
<u>MDA</u>					
Kalp	0.22±0.01	0.32±0.03	0.29±0.03	0.30±0.02	G2 ile G3 ve G4
Akciğer	0.62±0.01	0.68±0.02	0.40±0.15	0.38±0.12	G2 ile G3 ve G4
<u>TAA</u>					
Kalp	5.7±0.4	4.68±0.35	6.28±0.08	6.52±0.13	G2 ile G3 ve G4
Akciğer	6.0±0.29	4.5±0.31	5.1±0.1	5.2±0.14	G2 ile G3 ve G4
<u>GSH</u>					
Kalp	7.31±0.68	6.2±0.45	6.5±0.56	6.73±0.46	G1 ile G2, G3, G4
Akciğer	7.28±0.78	6.1±0.32	6.5±0.46	6.89±0.67	G1 ile G2, G3, G4

MDA: malondialdehit, TAA: Total antioksidan aktivitesi, GSH: Redükte glutatyon

tır. Akciğer GSH değerleri, grup 1'de 7.28±0.78, grup 2'de 6.1±0.32, enalapril grubunda 6.5±0.46 ve nifedipin grubunda 6.89±0.67 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre GSH değerleri sham grubunda en yüksek bulunmuş, diğer gruplar arasında istatistiksel bir fark oluşmamıştır (Tablo 1).

## TARTIŞMA

Kronik hipoksi birçok kalp ve akciğer patolojileri sonucu ortaya çıkan bir klinik bulgudur. Özellikle kalp cerrahisi açısından bakıldığında kronik hipoksi, siyanotik kalp hastalıklarının cerrahi tedavisi açısından önem taşımaktadır. Bu tip patolojilerin cerrahi tedavisi sonucunda gelişen morbidite ve mortalitenin en önemli sebebinin post-operatuar kardiyak disfonksiyon olduğu görülür. Kardiyopulmoner baypas sırasında yüksek oksijen konsantrasyonu (FiO<sub>2</sub>) beklenmedik bir reoksijenizasyon hasarına yol açar. Yapılan çalışmalar siyanotik kalplerde normoksik kalplere göre endojen antioksidanların azaldığını ve buna bağlı olarak sistolik fonksiyonların bozulduğunu ortaya koymuştur. Bir çalışmada Dhaliwal ve arkadaşları kronik hipoksi ve iskemi / reperfüzyon hasarı sonrası ortaya çıkan miyokard doku hasarının derecesinin miyokard antioksidan madde ve enzim konsantrasyonları ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (7). Allen ve arkadaşları tarafından yapılan klinik bir çalışmada ise kardiyopulmoner baypas'a giren siyanotik infantlarda serbest oksijen radikallerin-

de (SOR) artış tespit etmişler ve FiO<sub>2</sub>'nin %21'e düşürülmesi ile SOR seviyesinin de azaldığını bildirmişlerdir (8). Hipoksinin miyokard hücreleri üzerinde yarattığı etkiyi değerlendirmede kullanılan en önemli kriterlerden biri miyokard rezerv kapasitesinin değerlendirilmesidir. Miyokard rezerv kapasitesi; koroner vazodilatör rezerv kapasitesi ve miyokard fonksiyonel rezerv kapasitesi olmak üzere iki ana başlıkta incelenebilir. Miyokard rezerv kapasitesini değerlendirmede en anlamlı kriterin miyokard antioksidan rezerv kapasitesi olduğu bilinmektedir. Antioksidan rezerv kapasitesi, in vitro olarak miyokardın oksidan strese maruz kalması sonucu endojen antioksidanlarda azalma ve lipid peroksidasyonunda meydana gelen artış olarak tanımlanır. Klinik olarak bu durum miyokardiyal kasılma bozukluğu ("miyokardial stunning") olarak karşımıza çıkar. Normal kalplerde oksidan stresin yarattığı minimal değişiklik hipoksik kalplerde antioksidan seviyenin azalmasına bağlı olarak ciddi derecede miyokardiyal "stunning" olarak gözlenmektedir. Klinik çalışmalar, hipoksik kalplerde normoksik kalplere göre daha fazla oksidan stres geliştiğini göstermiş ve bu durumu endojen antioksidanlardaki azalmaya bağlamışlardır. Nakanashi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hipoksik ortama maruz kalan sıçanlarda miyokardiyal GSH seviyesi ile glutatyon redüktaz aktivitesinde azalma ve sol ventrikül sistolik fonksiyonlarında bozulma tespit edilmiştir (9). İhken ve arkadaşları hipoksi sonrası reoksijenasyonun sebep

olduğu miyokardiyal disfonksiyonun antioksidan ihtiva eden solüsyonlarla azaltılabileceğini bildirmişlerdir (10). Langleben ve ark. bu amaçla kronik hipoksik ortamdaki sıçanlara dimetilüre vererek artmış olan serbest radikal düzeylerini azaltmışlardır (11). Bandali ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hiperoksinin kardiyopulmoner baypas modelinde hiperglisemik etki yarattığı ve yenidoğan miyokard korunmasında oksijen değerlerinin çok dikkatli ayarlanması gerektiği vurgulanmıştır (12).

Çalışmamızda kronik hipoksiye maruz kalan sıçanların kalplerinde antioksidan kapasitede azalma ve lipid peroksidasyonunda artış tespit edilmiştir. Enalapril ve nifedipin tedavisi uygulanan sıçanlarda miyokardiyal antioksidan seviyesinde artış ve lipid peroksidasyonunda azalmanın gerçekleşmesi, bu ilaçların kronik hipoksiye bağlı gelişen miyokard hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Enalapril ve nifedipin, kendi aralarında karşılaştırıldıklarında sadece akciğerler dokusunda, dien konjugat seviyeleri enalapril verilen grupta nifedipin verilen gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu durum ilk basamakta bize nifedipinin akciğerlerde daha az hasar oluşturduğunu düşündürmekle birlikte, doku hasarının diğer göstergesi olan MDA değerleri her iki ilaçta da benzer sonuç vermiştir. Ayrıca koruyucu mekanizmalar olan TAA ve GSH değerleri her iki ilaç için benzer sonuçlar vermiştir. Çalışmamızda nifedipin ve enalaprilin, miyokard fonksiyonel rezerv kapasitesi üzerindeki etkileri bir başka deyişle hemodinamik etkilerine bakılmamıştır. Bu durum, çalışma modelinden kaynaklanmış olup, bu sonuçların ışığında çalışan kalp modelinde benzer bir çalışma ile hemodinamik etkileri saptamak mümkündür.

Bu çalışmanın sonucunda, uyguladığımız kronik hipoksi modelinin akciğer ve kalpte doku hasarı oluşturduğunu ve antioksidan tedavinin bu doku hasarını önlemede etkili olduğunu görmekteyiz. Ayrıca nifedipin ve enalaprilin bu anlamda birbirlerine kayda değer bir üstünlükleri olmadığını söyleyebiliriz. Açık kalp ameliyatlarında, siyanotik kalplerin korunmasında yeni prensiplerin ortaya konulması ve

nifedipin ve enalaprilin faydalı ajanlar olduklarını düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

1. **Lupinetti FM, Wareing TH, Huddleston CB, et al:** Pathophysiology of chronic cyanosis in a canine model. Functional and metabolic response to global ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1985; 90: 291-6
2. **McCord JM:** Oxygen - derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl J Med* 1985; 312:159-63
3. **Uchiyama M, Mihara M:** Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 1977; 86: 271-8
4. **Dormandy TL, Wickens DG:** The experimental and clinical pathology of diene conjugation. *Chem Phys Lipids* 1987; 45:353-64
5. **Müller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A:** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 1993 ; 84: 407-12
6. **Fairbanks VF, Klee GG:** Biochemical aspects of Hematology. In: *Textbook of Clinical Chemistry*, 2<sup>nd</sup> edn, ed. Tietz WB. Saunders, Philadelphia, 1991, pp.1640-5
7. **Dhaliwal H, Kirshenbaum LA, Randhawa AK, Singal PK:** Correlation between antioxidant changes during hypoxia and recovery on reoxygenation. *Am J Physiol* 1991; 261: H632-8
8. **Allen BS, Rahman S, Ilbawi MN, et al:** Detrimental effects of cardiopulmonary bypass in cyanotic infants: preventing the reoxygenation injury. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 1381-7
9. **Nakanishi K, Inoue M, Sugawara E, Sano S:** Ischemic and reperfusion injury of cyanotic myocardium in chronic hypoxic rat model: changes in cyanotic myocardial antioxidant system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114: 1088-96
10. **Ihnken K, Morita K, Buckberg GD, Sherman MP, Ignarro LJ, Young HH:** Studies of hypoxemic/reoxygenation injury: with aortic clamping. XIII. Interaction between oxygen tension and cardioplegic composition in limiting nitric oxide production and oxidant damage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 110: 1274-86
11. **Langleben D, Fox RB, Jones RC, Reid LM:** Effects of Dimethylthiourea on chronic hypoxia induced pulmonary artery remodelling and ventricular hypertrophy in rats. *Clin Invest Med* 1989; 12: 235-40
12. **Bandali KS, Belanger MP, Wittnich C:** Is hyperglycemia seen in children during cardiopulmonary bypass a result of hyperoxia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:753-8