



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg.  
2024; 38 (3): 234 - 240  
http://www.fusabil.org

Murat HARMAN<sup>1, a</sup>  
Mehmet AKBULUT<sup>1, b</sup>  
Tuncay KULOĞLU<sup>2, c</sup>  
Ebru ÖNALAN<sup>3, d</sup>

<sup>1</sup> Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Kardiyoloji Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>a</sup> ORCID: 0000-0001-8444-4191

<sup>b</sup> ORCID: 0000-0003-0763-2062

<sup>c</sup> ORCID: 0000-0001-9874-3838

<sup>d</sup> ORCID: 0000-0001-9968-8201

Geliş Tarihi : 27.05.2024  
Kabul Tarihi : 29.07.2024

### Yazışma Adresi

Murat HARMAN  
Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Kardiyoloji Anabilim Dalı,  
Elazığ - TÜRKİYE

mharman20@hotmail.com

## Deneysel Olarak Miyokard Enfarktüsü Oluşturulan Sıçanların Kalp Dokusunda Zofenopril ve Nebivolol'ün TRPM2 Katyon Kanalları Ekspresyonuna Etkileri<sup>\*,\*\*</sup>

**Amaç:** Transient reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) katyon kanallarının oksidatif stres tarafından aktive edilebileceği ve miyokard enfarktüsünde bu kanalların, potansiyel terapötik hedef olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmanın temel amacı bir sıçan miyokardiyal iskemi-reperfüzyon modelinde TRPM2 katyon kanallarının ekspresyonunun ve bu kanalların ekspresyonuna Zofenopril ve Nebivolol'ün etkilerini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada, her grupta 6 hayvan olacak şekilde 8 grup oluşturuldu. Miyokard enfarktüsü (ME) grubuna 150 mg/kg Isoproterenol, 24 saat ara ile 2 kez subkutan olarak verildi. Tedavi gruplarına ise ME oluşumunu takiben deney süresince Zofenopril (ME+Z), Nebivolol (ME+N), Zofenopril + Nebivolol (ME+Z+N) oral yola verildi. Sham gruplarına ise ME oluşturmadan deney süresince sadece Zofenopril, Nebivolol ve Zofenopril + Nebivolol oral yola verildi. Deney sonunda, polimeraz zincir reaksiyonu ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak TRPM2 düzeylerine bakıldı.

**Bulgular:** Çalışmalar sonucu; kontrol grubu ile Sham grupları karşılaştırıldığında TRPM2 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ME grubunda TRPM2 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. Sham grupları ile karşılaştırıldığında da ME grubunda TRPM2 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. ME grubu ile karşılaştırıldığında, ME + Nebivolol, ME + Zofenopril ve ME + Zofenopril + Nebivolol gruplarında TRPM2 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.

**Sonuç:** ME'nin patofizyolojik mekanizmasına TRPM2 kanalları katkıda bulunabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Miyokard enfarktüsü, TRPM2, Zofenopril, Nebivolol

### Effects of Zofenopril and Nebivolol on TRPM2 Cation Channels Expression in the Heart Tissue of Rats with Experimental Myocardial Infarction

**Objective:** It has been thought that Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) cation channels can be activated by oxidative stress and these channels may be potential therapeutic targets in myocardial infarction. The main purpose of this study is to investigate the expression of TRPM2 cation channels in a rat myocardial ischemia-reperfusion model and the effects of Zofenopril and Nebivolol on the expression of these channels.

**Materials and Methods:** In the study, 8 groups were created, with 6 animals in each group. To the myocardial infarction (ME) group, 150 mg/kg Isoproterenol was given subcutaneously twice with an interval of 24 hours. Following the occurrence of ME, Zofenopril (ME+Z), Nebivolol (ME+N), Zofenopril + Nebivolol (ME+Z+N) were administered orally to the treatment groups throughout the experiment. To the sham groups, only Zofenopril, Nebivolol and Zofenopril + Nebivolol were given orally throughout the experiment without causing ME. At the end of the experiment, TRPM2 levels were measured using polymerase chain reaction and immunohistochemical methods.

**Results:** As a result of the studies; no statistically significant difference was observed in TRPM2 levels when the control group was compared with the Sham groups. Compared to the control group, TRPM2 level was found to be statistically significantly lower in the ME group. Compared to the sham groups, TRPM2 level was found to be statistically significantly lower in the ME group. Compared with the ME group, no statistically significant difference was observed in TRPM2 levels in the ME + Nebivolol, ME + Zofenopril and ME + Zofenopril + Nebivolol groups.

**Conclusion:** TRPM2 channels may contribute to the pathophysiological mechanism of ME.

**Key Words:** Myocardial infarction, TRPM2, Zofenopril, Nebivolol

### Giriş

Gelişmiş ülkelerde yıllık ortaya çıkan ölümlerin yarısına yakını kardiyovasküler problemlerden kaynaklanmaktadır (1). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 800000'in üzerinde koroner arter hastalığı kaynaklı ölüm bildirilmiştir. Avrupa'da ve Kuzey Amerika'da mortalitenin önde gelen sebeplerinden biri akut miyokard enfarktüsüdür (2). İskemik kalp hastalığı, dünya çapında önde gelen ölüm ve sakatlık nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (3).

\* Bu çalışma, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi (Proje numarası: TF.14.03) tarafından desteklenmiştir.

\*\* Bu çalışma, Murat HARMAN'nın Tıpta Uzmanlık tezinden özetlenmiştir.

Akut miyokard enfarktüsü (AME), ciddi ve uzun süreli iskemiyin neden olduğu geri dönüşümsüz miyokard hücre hasarı ve nekrozu şeklinde ifade edilir. Koroner arterde yırtılmış bir aterosklerotik plak üzerine oturan trombüs; miyokard enfarktüsünün en sık nedenidir (4).

Post-mortem incelemelerde miyokard nekrozunun makroskopik veya mikroskopik olarak görülebilmesi için birkaç saat gerekir. Riske maruz kalan miyokard hücrelerinin tamamen nekroza uğraması için en az 2-4 saat gereklidir. Bu süre iskemik bölgenin kollateral dolaşımına, miyositlerin iskemiye karşı duyarlılığına, ısrarcı veya geçici koroner arter tıkanıklığına ve oksijen ve besin gereksinimine bağlı olarak daha da uzayabilir (5). AME iyileşmesine kadar devam eden süre genellikle 5-6 hafta sürer. Reperfüzyon, makroskopik ve mikroskopik görüntülerde değişikliklere yol açabilir. Reperfüzyon, iskemi sebebi olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuda kan akımının tekrar oluşmasıdır. İskemiye maruz kalmış bir dokunun yeniden kanlanması dokunun oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçlarını karşılarken aynı zamanda paradoksal olarak dokularda hasar da oluşturur (6).

Hücre membranında bulunan Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2 (TRPM2) katyon kanallarının oksidatif stres tarafından aktive edilebildiği bilinmektedir. Metabolik olaylar (oksidatif stres, iskemi reperfüzyon, vb.) sonucu oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücre içine girmesi sonucu TRPM2 kanalları aktifleşir. Bu kanalların aktivasyonu sonucunda hücre içine Ca<sup>2+</sup> iyon girişinin arttığı düşünülmektedir (7). Hücre içinde kalsiyum iyonu artışı hücrenin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin bozulmasından, hücre hasarı ve ölümüne kadar varabilen çeşitli patofizyolojik bir dizi olayların başlamasına sebep olmaktadır. Miyokartta iskemi-reperfüzyon hasarının oksidatif stres neticesinde akut enflamasyonla karakterize olduğu ve Nötrofil TRPM2 kanallarının miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının şiddetlenmesinde sorumlu olduğu bildirilmektedir (8,9).

Akut Miyokard Enfarktüsü tedavisinde, hastalar hastaneye ulaştığında, özellikle erken tanı sonrası birincil perkütan koroner girişimin (PKG) ya da fibrinolitik ajanların uygulanması yanında medikal tedavide kullanılan antikoagülan, antiplatelet, antiiskemik, antihipertansif, analjezik ve antienflamatuvar ajanlar da vardır. Bu ajanlardan biri olan Nebivolol'ün antihipertansif, antiiskemik etkilerinin yanı sıra serebral iskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili yapılan bir çalışmada Nitrik Oksit (NO) aracılı antioksidan etkilerinin olduğu da gösterilmiştir (10). Benzer şekilde antihipertansif olarak kullanılan Zofenopril kardiyak Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) için yüksek afiniteli, sülfidril içeren lipofilik bir ADE inhibitörüdür. Zofenopril'in NO üretimini ve biyoetkinliğini arttırdığını ve beraberinde endotel hücre oksidatif stresini de azalttığı gösterilmiştir (11).

Bu çalışmada, deneysel olarak miyokard enfarktüsü oluşturulan sıçanların kalp dokusunda TRPM2 katyon kanallarının ekspresyonunun ve bu kanalların ekspresyonuna Zofenopril ve Nebivolol'ün etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

**Araştırma ve Yayın Etiği:** Çalışma öncesinde Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 04/04/2013 tarih, 2013/03 toplantı sayılı ve 54 karar numaralı yazı ile, 05/09/2013 tarih, 2013/07 toplantı sayılı ve 104 karar numaralı yazı ile etik kurul onayı alınmıştır.

Deneysel çalışmalar, 210-280 g ağırlığında Sprague Dowley cinsi 48 adet sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Tüm sıçanlar aynı ortamda gözetim altında tutuldu ve aynı standart sıçan yemi verilerek ad-libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde 8 gruba ayrıldı:

**Kontrol grubu (K):** Bu grupta 6 adet sıçan, deney süresi olan 21 günlük çalışmanın kontrol grubu olarak kullanıldı. Bu gruba deney süresince hiçbir uygulama yapılmadı.

**Miyokard Enfarktüsü grubu (ME):** Bu grupta 6 adet sıçana, 150 mg/kg isoproterenol (Isoproterenol hydrochloride, I5627, Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, USA), 24 saat ara ile 2 kez subkutan olarak verilip, deney süresince başka hiçbir uygulama yapılmadı.

**Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril grubu (ME+Z):** Bu grupta 6 adet sıçana, 150 mg/kg isoproterenol 24 saat ara ile 2 kez subkutan olarak verilip, miyokard enfarktüsü oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca (21 gün) 15mg/kg/gün dozunda Zofenopril oral yolla verildi.

**Miyokard Enfarktüsü + Nebivolol grubu (ME+N):** Bu grupta 6 adet sıçana, 150 mg/kg isoproterenol 24 saat ara ile 2 kez subkutan olarak verilip, miyokard enfarktüsü oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca (21 gün) 6 mg/kg/gün dozunda Nebivolol oral yolla verildi.

**Zofenopril grubu (Z):** Bu grupta 6 adet sıçana, deney süresi boyunca (21 gün) 15mg/kg/gün dozunda Zofenopril oral yolla verilip başka hiçbir uygulama yapılmadı.

**Nebivolol grubu (N):** Bu grupta 6 adet sıçana, deney süresi boyunca (21 gün) 6mg/kg/gün dozunda Nebivolol oral yolla verilip başka hiçbir uygulama yapılmadı.

**Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril + Nebivolol grubu (ME+Z+N):** Bu grupta 6 adet sıçana, 150 mg/kg isoproterenol 24 saat ara ile 2 kez subkutan olarak verilip, miyokard enfarktüsü oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca (21 gün) 15mg/kg/gün dozunda Zofenopril ve 6 mg/kg/gün dozunda Nebivolol oral yolla verildi.

**Zofenopril + Nebivolol grubu (Z+N):** Bu grupta 6 adet sıçana, deney süresi boyunca (21 gün) 15mg/kg/gün dozunda Zofenopril ve 6 mg/kg/gün dozunda Nebivolol oral yolla verilip başka hiçbir uygulama yapılmadı.

Çalışmada deneyin 2. gününde ME oluşturulan gruplara ait deney hayvanlarının kuyruk veninden alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda troponin I düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı ve bu durumun miyokard enfarktüsü ile uyumlu olduğu tespit edildi.

Tüm gruplardaki sıçanlar deney sonunda ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10mg/kg) intraperitoneal uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından sıçanların kalp dokuları hızla çıkarılıp histolojik çalışma için %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışması için çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

**Histokimyasal İnceleme:** Her gruptan alınan kalp dokuları, %10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilip parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5µm'lik kesitlere Masson Trikrom boyası yapıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

**İmmünohistokimyasal İnceleme:** Kalp dokusunda TRPM2 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı.

Hazırlanan preparatlar Olympus BX 50 mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. Sitoplazmik immün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı.

**Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çalışması:** Kalp dokularından RNA izolasyonu için PureLink™ RNA Mini kiti kullanıldı.

**Spektrofotometrik RNA Ölçümü:** Bu çalışmada RNA ölçümü için Qubit® RNA Assay Kit For Use With The Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen/Molecular Probes) kullanıldı. RNA miktarı µg/mL olarak ölçüldü. cDNA sentezi için RNA miktarlarının eşitlenmesi amacıyla okunan en düşük RNA değeri standart alındı. Komplementer DNA sentezi (cDNA) için her bir gruptaki örneklerden RNA havuzu hazırlandı.

**Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu:** Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Real Time-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile amplifiye edildi. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve TRPM2 genlerinin belirlenmesi için Tablo 1'de verilen primerler kullanıldı.

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PZR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada

GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50°C'de 2 dakika, 95°C'de 10 dakika X 40 siklüs, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı.

**İstatistiksel Analiz:** Tüm istatistiksel analizler SPSS version 21 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA testi sonrasında Post-hoc Tukey testi ile yapıлып, grup içi değerlendirmede ise paired t-testi kullanıldı ve p<0.05 olanlar anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

### Histokimyasal Bulgular (Masson Trikrom):

Deney sonunda kalp dokusunda bağ dokusu oluşumunu göstermek için uygulanan Masson Trikrom boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; Kontrol (K) (Şekil 1a), Nebivolol (N) (Şekil 1b), Zofenopril (Z) (Şekil 1c) ve Zofenopril + Nebivolol (Z+N) (Şekil 1d) grupları normal histolojik görünümdeydi. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında ME grubunda bağ dokusundaki (kırmızı yıldız) artış istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (p<0.05). (Şekil 1e). ME grubu ile karşılaştırıldığında Miyokard Enfarktüsü + Nebivolol (M+N) (Şekil 1f), Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril (ME+Z) (Şekil 1g) ve Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril + Nebivolol (ME+Z+N) (Şekil 1h) gruplarında bağ dokusunda (kırmızı yıldız) değişiklik gözlenmedi, ME grubuna benzerdi ve istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 2).

### TRPM2 İmmünreaktivitesi:

TRPM2 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; TRPM2 immünreaktivitesi (kırmızı ok) Kontrol (Şekil 2a), Nebivolol (Şekil 2b), Zofenopril (Şekil 2c) ve Zofenopril + Nebivolol (Şekil 2d) gruplarında +3 şiddetinde ve yaygınlığında izlendi. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında ME grubunda TRPM2 immünreaktivitesinde belirgin azalma gözlendi (+2 şiddetinde ve yaygınlığında) ve istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (p<0.05) (Şekil 2e). ME grubu ile karşılaştırıldığında Miyokard Enfarktüsü + Nebivolol (Şekil 2f), Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril (Şekil 2g) ve Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril + Nebivolol (Şekil 2h) gruplarında TRPM2 immünreaktivitesi ME grubuna yakın olduğu izlendi (+2 şiddetinde ve yaygınlığında) ve istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi (Tablo 2).

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları:

TRPM2 mRNA düzeyi için yapılan PZR çalışması sonucu; kontrol grubu ile Nebivolol, Zofenopril ve Zofenopril + Nebivolol grupları karşılaştırıldığında TRPM2 mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında ME grubunda TRPM2 mRNA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. ME grubu ile karşılaştırıldığında, ME + Nebivolol, ME + Zofenopril ve ME + Zofenopril + Nebivolol gruplarında TRPM2 mRNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 3).

**Tablo 1.** RT-PZR'da kullanılan primerler**TaqMan Gene Expression Assay Gex: AB Applied Biosystems, ABD, 250 µL**

Test	Katalog Numarası
Gapdh	Rn-01775763-g1
TRPM2	Rn-01429417-m1

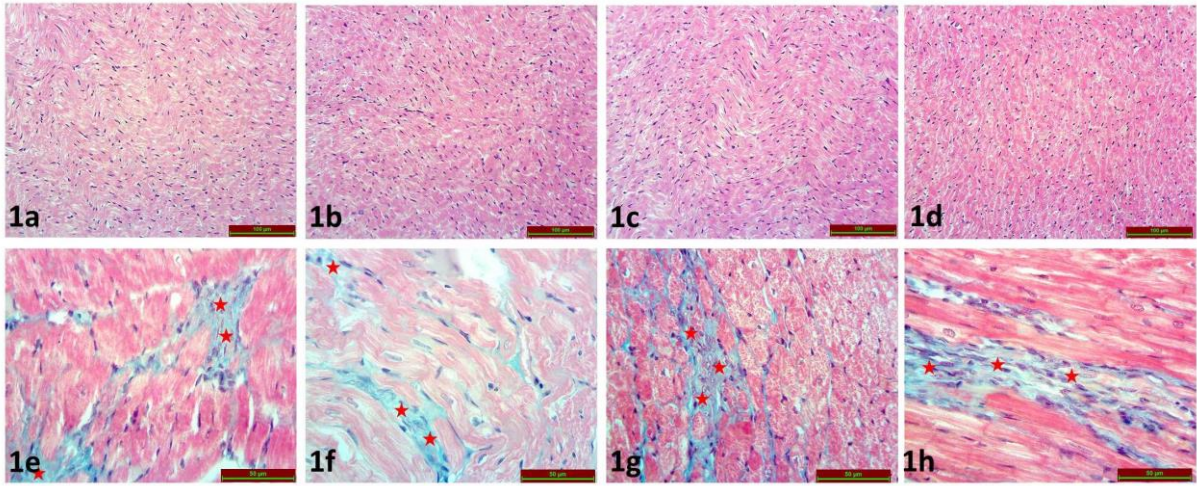
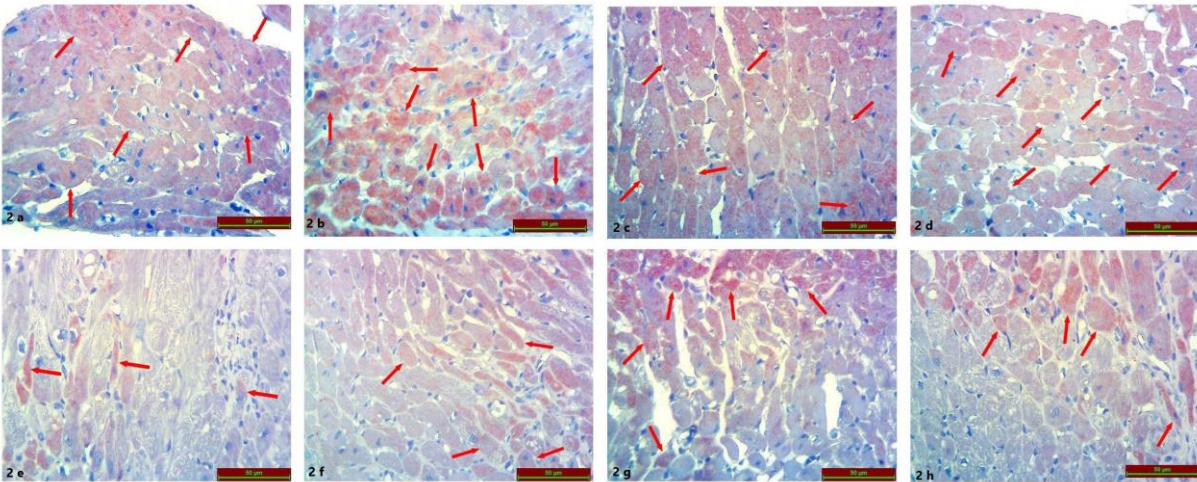
Real Time PZR 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

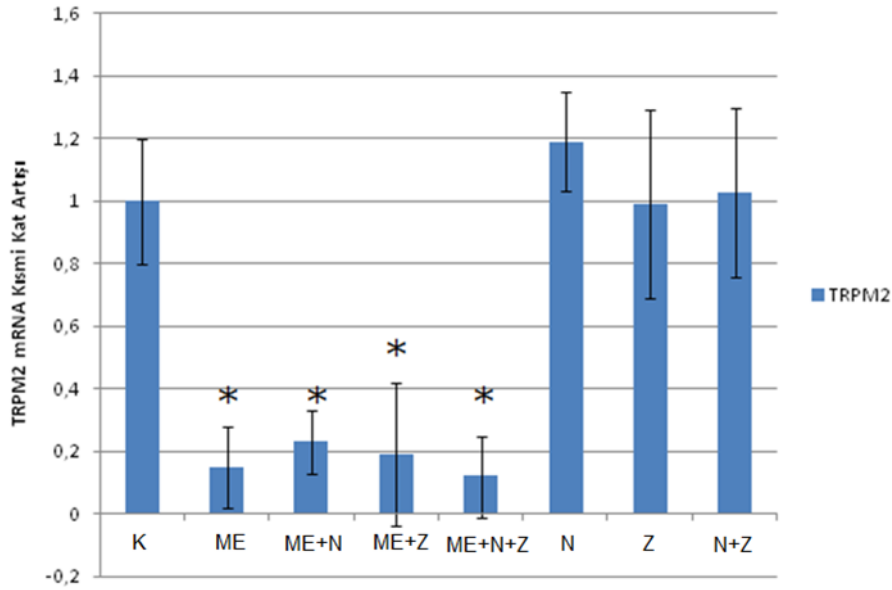
**Tablo 2.** Gruplar arası bağ doku artışı ve TRPM2 immünreaktivite değerleri

	K (n=6)	N (n=6)	Z (n=6)	Z+N (n=6)	ME (n=6)	ME+N (n=6)	ME+Z (n=6)	ME+Z+N (n=6)
Bağ Doku Artışı	0.16±0.40	0.16±0.40	0.16±0.40	0.16±0.40	2.83±0.40 <sup>a</sup>	2.66±0.51 <sup>a</sup>	2.66±0.51 <sup>a</sup>	2.66±0.51 <sup>a</sup>
TRPM2 İmmün Reaktivitesi	2.83±0.40	2.66±0.51	2.83±0.40	2.83±0.40	1.66±0.51 <sup>a</sup>	1.50±0.83 <sup>a</sup>	1.66±0.51 <sup>a</sup>	1.50±0.83 <sup>a</sup>

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre, anlamlı olarak farklı (p<0.05). (K: Kontrol grubu, N: Nebivolol grubu, Z: Zofenopril grubu, Z+N: Zofenopril + Nebivolol grubu, ME: Miyokard Enfarktüsü grubu, ME+N: Miyokard Enfarktüsü + Nebivolol grubu, ME+Z: Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril grubu, ME+Z+N: Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril + Nebivolol grubu)

**Şekil 1.** Normal görünümlü kalp dokusu (a-d, sırasıyla Kontrol, Nebivolol, Zofenopril ve Zofenopril + Nebivolol grupları) ve bağ doku artışı (e-h, sırasıyla ME, ME + Nebivolol, ME + Zofenopril, ME + Zofenopril + Nebivolol grupları), Masson Trikrom.**Şekil 2.** +3 şiddetinde ve yaygınlığında TRPM2 immünreaktivitesi. (a-d, sırasıyla Kontrol, Nebivolol, Zofenopril, Zofenopril + Nebivolol grubu). +2 şiddetinde ve yaygınlığında TRM2 immünreaktivitesi (e-h, sırasıyla ME, ME + Nebivolol, ME + Zofenopril, ME + Zofenopril + Nebivolol grubu). Skala bar: 50µm



\*, Kontrol(K) göre anlamlı fark vardır (one-way ANOVA). (K: Kontrol grubu, N: Nebivolol grubu, Z: Zofenopril grubu, Z + N: Zofenopril + Nebivolol grubu, ME: Miyokard Enfarktüsü grubu, ME + N: Miyokard Enfarktüsü + Nebivolol grubu, ME + Z: Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril grubu, ME + Z+ N: Miyokard Enfarktüsü + Zofenopril + Nebivolol grubu)

**Şekil 3.** Gruplara göre TRPM2 mRNA kısmi kat artışı

## Tartışma

Akut Miyokard Enfarktüsü patolojisinde uzamış iskeminin sebep olduğu miyokard hücre ölümü yer almaktadır. Reperfüzyon, iske mi sebebi olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuda kan akımının tekrar oluşmasıdır. İskemiye maruz kalmış bir dokunun yeniden kanlanması dokunun oksijen ve diğer metabolik ihtiyaçlarını karşılarken aynı zamanda paradoksal olarak dokularda hasar da oluşturur (6).

Isoproterenol (ISO), ratlarda deneysel olarak miyokard enfarktüsü oluşturmak için yaygın olarak kullanılan sentetik bir katekolamin türevidir (12, 13). Bu çalışmada da ISO kullanılarak deneysel miyokard enfarktüsü oluşturuldu. Bir çalışmada Nirmala ve Puvanakrishnan (14), miyokard hasar göstergesi olan biyokimyasal belirteçlerden CK, CK-MB ve LDH'ın, sıçanlarda ISO'nun yol açtığı miyokard enfarktüsü sonrası önemli oranda yükseldiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada ise deneyin 2. gününde ME oluşturulan gruplara ait deney hayvanlarının kuyruk veninden alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda troponin I düzeylerinin kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı ve bu durumun miyokard enfarktüsü ile uyumlu olduğu tespit edildi.

ISO'nun neden olduğu miyokardiyal nekrozun patogenezinde birden fazla mekanizma olmakla birlikte, oksidatif stresin en önemli rolü üstlendiği oldukça belirgindir (15, 16).

Kalp kasında varlığı gösterilen katyon kanalı, TRPM2'nin aktive olup açılmasında üç hücre dışı etken (aktivatör) bilinmektedir. Bunlar; oksidatif stres, ADPR/NAD<sup>+</sup> metabolizması ve Tümör Nekroz Faktörü

Alfa' dır (17). Metabolik olaylar sonucu oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin hücre içine girmesi sonucu TRPM2 kanalları aktiveleşir. Bu kanalların aktivasyonu sonucunda hücre içine Ca<sup>2+</sup> iyon girişinin arttığı düşünülmektedir (7). Hücre içinde kalsiyum iyonu artışı hücrenin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin bozulmasından, hücre hasarı ve ölümüne kadar varabilen çeşitli patofizyolojik bir dizi olayların başlamasına sebep olmaktadır. Hiroi ve ark. (8) Nötrofil TRPM2 katyon kanallarının miyokardiyal iske mi-reperfüzyon hasarının şiddetlenmesinden sorumlu olduğunu tespit etmişlerdir.

Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) inhibitörleri birçok kardiyovasküler hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar. Zofenopril kardiyak ADE için yüksek afiniteli, sülfidril içeren lipofilik bir ADE inhibitörüdür. Zofenopril'in Nitrik Oksit (NO) üretimini ve biyoetkinliğini arttırdığını ve beraberinde endotel hücre oksidatif stresini de azalttığı gösterilmiştir (11). Nebivolol'ün başlıca etkileri beta-adrenerjik reseptör blokajı ve NO salınımını arttırmasıdır. Nebivolol'ün hayvan deneylerinde ve insanlarda vazodilatasyon oluşturduğu ve bu vazodilatasyonun başlıca sebebinin de endotelial NO artışının olduğu görülmüştür (18, 19). Uzar ve ark. (10) serebral iske mi-reperfüzyon hasarı ile ilgili ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada Nebivolol'ün NO aracılı antioksidan etkilerinin de olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada, ISO ile miyokard enfarktüsü oluşturulmuş sıçan kalp dokusunun histopatolojik olarak değerlendirilmesi sonucu, miyokard enfarktüsü ile uyumlu olarak, 3. haftada miyokard dokusu içerisinde belirgin bağ doku artışı ve neticesinde fibrozis gözlemlendi. Tedavide verilen ve antioksidan etkileri olduğu bilinen Zofenopril ve Nebivolol'ün 3. haftadaki bu

bağ doku artışına belirgin olarak etki etmedikleri tespit edildi. Her ne kadar yapılan bazı başka çalışmalarda Zofenopril ve Nebivolol'un antioksidan etkileri olduğu bilirse de ME'nin geç döneminde yani bağ doku oluşumunun gözlemlendiği evrede, yapılan bu çalışmadan elde edilen bu bulgular ışığında, miyokard dokusunda oluşan hasar yüzeyi ve neticesindeki fibrozis üzerine azaltıcı belirgin etkilerinin olmadığı gözlemlendi. Bu bulgular Uzar ve ark. (10) yapmış olduğu serebral iskemi-reperfüzyon çalışmasıyla kısmen tezat oluşturmaktaysa da asıl bu tezatin ME'nin erken (akut) ve geç dönemlerinde oksidatif hasarın farklı şiddet ve yaygınlıkta ortaya çıkabileceğiyle ilişkili olduğu düşünüldü. Ancak sonuç itibarıyla yapılan bu çalışmada verilen tedavilerle ilişkili olarak hasar boyutunda belirgin bir azaltıcı etki gözlenmediği tespit edildi.

Bu çalışmada, oksidatif hasarla aktive olan TRPM2 kanalları için yapılan TRPM2 immünreaktivitesi, immünohistokimyasal boyama ve PZR bulguları incelendiğinde, histolojik bulgularla paralel sonuçlar elde edildi. Öyle ki; kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında ME grubunda TRPM2 immünreaktivitesinde belirgin azalma ve PZR çalışması sonucu TRPM2 mRNA düzeyinde de istatistiksel olarak anlamlı düşme olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte ME grubu ile karşılaştırıldığında ME + Nebivolol, ME + Zofenopril ve ME + Zofenopril + Nebivolol gruplarında TRPM2 immünreaktivitesinin ME grubuna yakın olduğu izlendi. Yine PZR çalışması sonucu TRPM2 mRNA düzeylerinde ME grubu ile karşılaştırıldığında, ME + Nebivolol, ME + Zofenopril ve ME + Zofenopril + Nebivolol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediği tespit edildi. Bu bulgular incelendiğinde ME oluşturulan sıçanların kalp dokusunda 3. hafta sonunda TRPM2 düzeylerinin düşük bulunduğu, beraberinde tedavi için verilen Zofenopril ve Nebivolol'un de TRPM2 düzeylerine belirgin bir etki etmedikleri görüldü. Başka bir çalışmada Miller ve ark. (20) kalp üzerinde 2 saat hipoksi sonrası yarım saat reoksijenizasyonun ardından serbest oksijen radikallerinin ortamda yüksek seviyelere çıktığını tespit etmişlerdir. Yine bu çalışmanın sonunda TRPM2 kanallarının kalbi iskemi-reperfüzyon hasarından koruduğunu göstermişlerdir. Miller ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile yapılan bu çalışmadaki bulgular birlikte değerlendirildiğinde; TRPM2 düzeyinin, ME oluşturulan sıçanlarda geç dönemde düşük olmasının sebebi olarak, ME'nin erken döneminde oksidatif hasarın fazla olabileceği ve bunun neticesinde TRPM2 kanallarının düzeyinin artan oksidatif hasara paralel olarak erken dönemde artmış olabileceği; daha sonraki

iyileşme yani geç dönemde ise tüketilmişliğin ve kullanımının sonucu olarak düzeyinin düşmüş olabileceği düşünüldü. Bununla beraber; Hiroi ve ark. (8) yaptıkları bir çalışmada sıçanların sol ana koroner arterini bağlayıp ardından reperfüze etmişler ve AME oluşturmuşlar. Bu çalışmanın sonucunda miyokartta iskemi-reperfüzyon hasarının oksidatif stres neticesinde akut enflamasyonla karakterize olduğu ve Nötrofil TRPM2 kanallarının miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarının şiddetlenmesinde sorumlu olduğunu tespit etmişlerdir.

ME'nin patofizyolojisinde oksidatif mekanizmaların rolü birçok çalışmayla ortaya konulmuştur. Oksidatif stresin ME patofizyolojisindeki yerinin belirlenmesi ve bu patofizyolojik mekanizmalara TRPM2 kanallarının katılabileceği düşüncesi, hastalığın oluşumunda hücresele düzeyde yeni tedavi hedefleri ortaya çıkmasına ve ayrıca bu tedavilerin gelecekte klinik uygulamalarda yer bulmasına sebep olabilir.

Sonuç olarak; ISO ile deneysel olarak miyokard enfarktüsü oluşturulmuş ratlarda TRPM2 kanallarına Zofenopril ve Nebivolol'un etkisini incelemek amacıyla Sprague Dowley ırkı erkek ratlarla yapılan bu çalışmada 3.hafta sonunda; deneysel ME oluşturmak için ISO'nun uygun farmakolojik bir ajan olduğu; ME grubunda bağ dokusu ve fibrozis oluşumu kontrol grubuna göre belirgin olarak arttığı, tedavi amacıyla verilen Zofenopril ve Nebivolol'un bu bağ doku ve fibrozis artışını belirgin olarak etkilemediği ve ME grubuyla benzer olduğu; ME grubunda TRPM2 immünreaktivitesinde belirgin azalma olduğu, ME grubu ile karşılaştırıldığında ME + Nebivolol, ME + Zofenopril ve ME + Zofenopril + Nebivolol gruplarında TRPM2 immünreaktivitesinin ME grubuna yakın olduğu; ME grubunda PZR çalışması sonucu TRPM2 mRNA düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı düşme olduğu, ME grubu ile karşılaştırıldığında, ME + Nebivolol, ME + Zofenopril ve ME + Zofenopril + Nebivolol gruplarında TRPM2 mRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediği tespit edildi.

Bu çalışmadaki sonuçlara göre, Zofenopril ve Nebivolol'un ISO ile oluşturulmuş deneysel miyokard enfarktüsünde oksidatif hasara karşı belirgin düzeltici veya tedavi edici etkilerinin olmadığı; ME'nin geç döneminde TRPM2 düzeylerinin düştüğü ve tedavi için verilen Zofenopril ve Nebivolol'un TRPM2 düzeylerine belirgin bir etkilerinin olmadığı, ME patofizyolojisine TRPM2 kanallarının katkıda bulunabileceği ve tedavi yaklaşımlarında gelecekte yapılacak çalışmalara da ışık tutabileceği öngörülmüştür.

## Kaynaklar

1. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: A novel protective agent against oxidative injury of the ischemic-reperfused heart. *Cardiovascular Res* 2003; 58: 10-19.
2. Rosamond W, Flegal K, Friday G, et al. Heart disease and stroke statistics-2007 update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007; 115: 69-171.
3. Bradley C, Berry C. Definition and epidemiology of coronary microvascular disease. *J Nucl Cardiol* 2022; 29: 1763-1775.
4. DeWood MA, Stifter WF, Simpson CS. Coronary arteriographic findings soon after non-Q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 1986; 315: 417-423.
5. Thygesen K, Alpert JS, White HD, Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of

- Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007; 28: 2525-2538.
6. Zimmerman BJ, Granger N. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
  7. Hardie RC, Minke B. The *trp* gene is essential for a light-activated  $Ca^{2+}$  channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron* 1992; 8: 643-651.
  8. Hiroi T, Wajima T, Negero T, et al. Neutrophil TRPM2 channels are implicated in the exacerbation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2013; 97: 271-281.
  9. Mirbod SM, Khanahmad H, Amerizadeh A, et al. Viewpoints on the role of transient receptor potential melastatin channels in cardiovascular system and disease: A systematic review. *Curr Probl Cardiol* 2023; 48: 101012.
  10. Uzar E, Acar A, Evliyaođlu O, et al. The anti-oksidant and antiapoptotic effects of nebivolol and zofenopril in a model of cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 36: 22-28.
  11. Scribner AW, Forde P, Dial R. Prevention of hypertension and renal dysfunction in Dahl rats by alpha-tocopherol. *Eur J Pharmacol* 2003; 42: 82-88.
  12. Sree Priya M, Saravanan N, Devaki T, et al. Protective effects of larginine on experimental myocardial injury induced by-adrenergic stimulation in rats. *J Clin Biochem Nutr* 1999; 27: 19-26.
  13. Benjamin IJ, Jalil JE, Tan LB, et al. Isoproterenol induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circ Res* 1989; 65: 657-670.
  14. Nirmala C, Puvanakrishnan R. Isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: Functional and biochemical alterations. *Med Sci Res* 1994; 22: 575-577.
  15. Bors W, Michel C, Saran M, et al. The involvement of oxygen radicals during the autoxidation of adrenalin. *Biochim Biophys Acta* 1978; 540: 162-172.
  16. Dhalla NS, Yates JC, Lee SL, et al. Functional and subcellular changes in the isolated rat heart perfused with oxidized isoproterenol. *J Mol Cell Cardiol* 1978; 10: 31-41.
  17. Hara Y, Wakamori M, Ishii M, et al. LTRPC2  $Ca^{2+}$ -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 2002; 9: 163-173.
  18. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, et al. Nebivolol vasodilates human forearm vasculature: Evidence for an L-arginine/NO-dependent mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 1067-1071.
  19. Bowman AJ, Chen CP, Ford GA. Nitric oxide mediated venodilator effects of nebivolol. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38: 199-204.
  20. Miller BA, Wang J, Hirschler-Laszkiewicz I, et al. The second member of transient receptor potential-melastatin channel family protects hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013; 304: 1010-1022.