T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA DENEYSEL KONTRAST NEFROPATİSİNİN ÖNLENMESİNDE SFİNGOZİN-1 FOSFAT RESEPTÖR AGONİSTLERİNİN OLASI ETKİLERİ

DR. ABDALLAH T. M. SHBAIR

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL - 2017

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA DENEYSEL KONTRAST NEFROPATİSİNİN ÖNLENMESİNDE SFİNGOZİN-1 FOSFAT RESEPTÖR AGONİSTLERİNİN OLASI ETKİLERİ

DR. ABDALLAH T. M. SHBAIR

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: PROF. DR. MEHMET KOÇ

İSTANBUL - 2017

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitim sürem boyunca iyi bir klinisyen olmam için uğraşan İç Hastalıkları Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine ve asistan arkadaşlarıma,

Uzmanlık eğitim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan gurur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırından dolayı değerli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Koç'a,

Asistanlığımın süresince ve tez çalışmasında yanımda olan arkadaşım Ast. Dr. Seda Kutluğ Ağaçkıran'a, herkoşulda yanımda olan arkadaşım Uzm. Dr.Tuğçe Yakut Aydın'a ve asistanlığım boyunca desteğini benden esirgemeyen Uzm. Dr. Süleyman Halil'e,

Asistanlığa birlikte başladığımız, asistanlık süresince eş kıdemlilerim Ast. Dr. Bülent Demirelli'ye, Ast. Dr. Firuz Memmadov'a, Ast. Dr. Oğuzhan Kesen'e, Ast. Dr. Ensar Aydemir'e ve Ast Dr. Duygu Erbaş Saçar'a,

Tez çalışmamın bütün aşamalarında çok değerli katkılarını aldığım Fizyoloji A.B.D.'ndan Prof. Dr. Berrak Yeğen'e, doktora öğrencileri Zarife Nigar Özdemir'e ve Vet. Hek. Dilek Özbeyli'ye, Histoloji A.B.D.'ndan Prof. Dr. Şule Çetinel'e, Araş. Gör. Dr. Özlem Tuğçe Çilingir Kaya'ya ve Yrd. Doç. Dr. Naziye Özkan'a,

Tüm hayatım boyunca kendilerini bana yardım etmeye adamış anneme, babama, kardeşlerime ve özellikle geçen sene aramızdan ayrılan ablama,

Hayatımın her anını güzelleştiren, her zaman desteğiyle ve sevgisiyle her an yanımda olan, Dr. Sinem Öztaşkın'a en içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Abdallah T. M. Shbair,
Şubat 2017, İstanbul

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ii
SİMGELER VE KISALTMALAR vi
TABLO LİSTESİ ix
ŞEKİL LİSTESİ ix
ÖZET x
ABSTRACT xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Kontrast Nefropatisi 3
2.1.1. Tanım 3
2.1.2. İnsidans 3
2.1.4. Patofizyoloji 6
2.1.4.1. Hemodinamik Değişiklikler 6
2.1.4.2. Renal Tübülar Hasar 8
2.1.4.2.1. Apoptoz 8
2.1.4.2.2. Reaktif Oksijen Türevleri (ROT) 8
2.1.4.3. Kalsiyum 9
2.1.5. Tedavi 9
2.1.5.1. İlaç Kullanımı 9
2.1.5.2. Non-Farmakolojik Tedaviler 10
2.1.5.3. Farmakolojik Tedaviler 10
2.1.5.3.1. Hidrasyon 10
2.1.5.3.2. Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$) 10
2.1.5.3.3. N-Asetil Sistein 11

2.1.5.3.4. Diüretikler: Furosemid ve Mannitol 12
2.1.5.3.5. Statinler 13
2.1.5.3.6. Diğer Tedaviler 13
2.1.5.3.7. Kontrast Maddeyi Temizlemede Kullanılan Teknolojiler 14
2.1.5.3.8. Diyaliz 14
2.2. Hayvan Deneylerinde Kontrast Nefropatisi Modelleri 15
2.3. Sfingozin-1 Fosfat Yapısı, Etki Mekanizması ve Fonksiyonları 16
2.3.1. Sfingozin-1 Fosfat Biyosentezi ve Etki Mekanizması 16
2.3.2. Sfingozin-1 Fosfat ve İmmün Sistem 17
2.3.3. Sfingozin-1 Fosfatın Endotel ve Epitel Bariyeri Üzerindeki Etkisi 18
2.3.4. Sfingozin-1 Fosfat ve Böbrek 18
2.3.5. FTY720 20
2.3.6. SEW2871 21
2.3.7. S1P Hayvan Modellerindeki Etkileri 22
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Protokolü 24
3.1.1. Kontrast Nefropatisi Modeli Oluşturulması 24
3.1.2. İlaçlar 25
3.1.3. Doz Belirlenmesi 26
3.1.4. Deney Grupları 26
3.2. İdrar Örneklerinin Toplanması 27
3.3. Kan ve Böbrek Doku Örneklerinin Alınması 27
3.4. Değerlendirme Parametreleri 28
3.4.1. Böbrek Fonksiyonlarının Belirlenmesi 28
3.4.2. Histolojik İncelemeler 28
3.4.2.1. Böbrek Histopatolojisi 28

3.4.2.2. Böbrek Dokusunda Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Ölçümü 29
3.4.2.3. Glutatyon (GSH) Ölçümü 29
3.4.2.4. Serum ve Doku Örenklerinde Sitokin Tespiti 29
3.5. İstatistiksel Analiz 30
4. BULGULAR 31
4.1. Çalışma Gruplarında Serum Kreatinin, Serum BUN ve 24 Saatlik İdrar Kreatinin Klirensi Değerleri 31
4.2. Nötrofil İnfiltrasyonu, Oksidatif Stres ve Glutatyon Seviyeleri 34
4.3. Çalışma Gruplarında Kan ve Doku Örneklerinde Sitokin Düzeyleri 36
4.4. Çalışma Gruplarında Histolojik Skorlama 38
5. TARTIŞMA 40
ETİK KURUL ONAYI 62

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABY: Akut böbrek yetmezliği

KBY: Kronik böbrek yetmezliği

KKY: Konjestif kalp yetmezliği

BUN: Blood urea nitrogen

VEGF: Vasküler endotel büyüme faktör

IRH: İskemi reperfüzyon hasarı

S1P : Sfingozin-1 fosfat

SPHK: Sfingozin kinaz

SPP: S1P fosfataz

HOCM: Yüksek-ozmolar kontrast madde

IOCM: Izo-ozmolar kontrast madde

LOCM: Düşük-ozmolar kontrast madde

SEW2871: Sfingozin-1 fosfat$_1$ reseptör agonisti

FTY720 : Sfingozin-1 fosfat$_{1,3,4,5}$ reseptör agonisti

VPC44116: Sfingozin-1 fosfat$_{1,3}$ reseptör antagonisti

JTE013: Sfingozin-1 fosfat$_2$ reseptör antagonisti

W146: Sfingozin-1 fosfat$_1$ reseptör antagonisti

CAY10444: Sfingozin-1 fosfat$_3$ reseptör antagonisti

COX: Siklooksijenaz

dk: Dakika

HD: Hemodiyaliz

DM: Diabetes mellitus

DMSO: Dimethyl sulfoxide

GFR: Glomerüler fitrasyon hızı

H_2O_2: Hidrojen peroksit

O_2^-: Oksijen radikali

OH^-: Hidroksil radikali

SOD: Süperoksit dismutaz

SOT: Serbest oksijen türevleri

H&E: Hematoksilen&Eozin

IL-1β: İnterlökin-1 beta

i.v: İntravenöz

i.p: İntraperitoneal

s.c: Subkutan

L-NAME: N-Nitro-L-Arjinin Metil Esterleri

ml: Mililitre

mg: Miligram

kg: Kilogram

dl: Desilitre

mOsm/kg: Miliosmol/kg

μg: Mikrogram

NAC: N-asetilsistein

$NaHCO_3$: Sodyum bikarbonat

INDO: Indometazin

NO: Nitrik oksit

NOS: Nitrik oksit sentaz

eNOS: Endotelyal nitrik oksit sentaz

PG: Prostaglandin

SF: Serum fizyolojik

TNF-α: Tümör nekroz faktör-α

INF-γ: İnterferon-γ

TGF-β: Transforming growth faktör-β

NSAİİ: Non steroidal anti inflammatuar ilaçlar

ACE: Anjiotensin dönüştürcü enzim

ECs: Endotel hücreleri

mEq/L: Milliequivalen/litre

EDG: Endotel diferansiasyon geni

DC: Dendritik hücre

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Mehran ve ark. kontrast nefropatisi için risk skalası.....4

Tablo 2. Kontrast maddelerin özellikleri.....5

Tablo 3. Gruplara ve günlere göre deneyin uygulanış şeması.....27

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Sfingozin-1 fosfatın kimyasal yapısı.....17

Şekil 2. FTY720'nin kimyasal yapısı.....20

Şekil 3. SEW2871'in kimyasal yapısı.....21

Şekil 4. Çalışma gruplarında serum kreatinin seviyeleri.....31

Şekil 5. Çalışma gruplarında serum BUN seviyeleri.....32

Şekil 6. Çalışma gruplarında 24 saatlik idrar kreatinin klirensi seviyeleri.....33

Şekil 7. Çalışma grubunda MPO aktivitesi düzeyleri 34

Şekil 8. Çalışma gruplarında GSH seviyeleri.....35

Şekil 9. Çalışma gruplarında serum TNF-α düzeyleri.....36

Şekil 10. Çalışma gruplarında serum IL-1β düzeyleri.....36

Şekil 11. Çalışma gruplarında doku TNF-α düzeyleri 37

Şekil 12. Çalışma gruplarında doku IL-1β düzeyleri 37

Şekil 13. Çalışma gruplarında histolojik toplam hasar skoru……..38

Şekil 14. Hematoksilen-Eozin boyası ile boyanan kesitlerin ışık mikroskopisi değerlendirilmesi 20X 39

ÖZET

Giriş: Kontrast madde kullanımı ve buna bağlı olarak kontrast nefropatisi sıklığının arttığı günümüz tıbbında, renal hasar gelişimini önlediği kesin olarak ispatlanmış bir farmakolojik uygulama halen bulunmamaktadır. Kontrast nefropatisinin fizyopatolojik mekanizmaları arasında; renal medüller hipoksi, endotel hasarı, oksidatif stres ve inflamatuvar etkisiyle kontrast maddenin direkt tübüler toksisitesi yer almaktadır. Çalışmamızda sfingozin-1 fosfat reseptör agonistlerinin (SEW2871 ve FTY720) kontrast nefropatisi üzerine olan etkilerini göstermeyi amaçladık.

Yöntemler: Çalışma kapsamında kontrol (n=9), kontrast (n=12), SEW2871 (n=7) ve FTY720 (n=8) olmak üzere toplam 4 grup belirlendi. FTY720 (250 μmg/kg i.p) ve SEW2871 (10 mg/kg s.c) olarak 3 gün boyunca verildi. 24. saatte intravenöz indometazin (10 mg/kg i.v), L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME, 10 mg/kg i.v) ve yüksek ozmolar kontrast madde olan diatrizoat (Urografin % 76, 6 ml/kg) dozunda verilerek model oluşturuldu. Çalışma sonunda serum ve doku örneklerinde böbrek fonksiyon testleri, histopatolojik değişiklikleri, oksidatif stres parametreleri ve inflamatuvar belirteçler değerlendirildi.

Bulgular: Serum kreatinin ve serum BUN düzeylerinde kontrast, SEW2871 ve FTY720 gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı yüksekti. Kontrast grubuna kıyasla SEW2871 grubunda serum BUN ve kreatinin değerleri düşük olmakla birlikte istatiksel olarak anlamlı farklılık yoktu. FTY720 grubunun değerleri kontrast grubundan da anlamlı olarak yüksekti. Işık mikroskopisinde SEW2871 ve FTY720 gruplarında kontrast grubuna kıyasla belirgin şekilde daha fazla histopatolojik hasar izlendi. Böbrek doku MPO aktivitesi kontrast grubuna kıyasla SEW2871 grubunda anlamlı olarak düşük bulundu. Böbrek dokusu GSH değerleri ise kontrast ve kontrol grubuna göre SEW2871 grubunda anlamlı olarak yüksekti. Serum ve böbrek dokusunda TNF-α ve IL-1β düzeyleri gruplar arasında benzerdi.

Sonuç: Bu çalışmada SEW2871 uygulmasının sıçanlarda kontrast nefropatisi üzerinde anlamlı olmamakla birlikte bir miktar olumlu etki sağladığı, buna karşın FTY720 uygulamasının ise sıçanlarda kontrast nefropatisi üzerinde kötüleştirici etkisinin olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kontrast nefropatisi, sfingozin-1 fosfat reseptörü, SEW2871, FTY720 ve sıçan.

ABSTRACT

Background: Contrast induced nephropathy in today's medicine increase dramatically, yet there is still no proven pharmacological approach to prevent renal damage. Mechanisms of contrast-induced nephropathy include renal medullar hypoxia, endothelial injury, oxidative stress and direct tubular toxicity of contrast agent due to inflammatory effect. In our study, we aimed to demonstrate the effects of sphingosine-1 phosphate receptor agonists, SEW2871 and FTY720 on contrast nephropathy.

Methods: 4 groups were included within the scope of our study: control (n=9), contrast (n=12), SEW2871 (n=7) and FTY720 (n=8). SEW2871 (10 mg/kg s.c) and FTY720 (250 μmg/kg i.p) were administrated for 3 days. Indomethacin (10 mg/kg i.v), L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME, 10 mg/kg i.v) and high osmolar contrast agent - diatrizoat (Urografin %76, 6 ml/kg, i.v) were administered at 24 hour of the experiment. Renal functions, histopathological investigations, oxidative stress parameters and inflammatory indicators were evaluated in serum and tissue specimens at the end of the study.

Results: Significant increases were observed in the levels of serum creatinine and BUN levels in contrast, SEW2871 and FTY720 groups compared to control group. Although serum creatinine and BUN levels were lower in SEW2871 group compared to contrast group it was statisticaly not significant. These levels were significantly higher in FTY720 group compared to contrat group. By light microscopic examination, significantly more histopathological damage was observed in SEW2871 and FTY720 groups compard to contrast group. Renal MPO activity was significantly lower in SEW2871 group compared to contrast group. Renal GSH levels in SEW2871 group was significanty higher than contrast and control groups. Serum and renal tissue TNF-α and IL-1β levels were compared similar in all groups.

Conclusions: This study suggests that administration of SEW2871 nonsignificat but beneficial effects on contrast induced nephropathy in rats. However, FTY720 administartion further deteriorates contrast-induced nephropathy in rats.

Key Words: Contrast-induced nephropathy, sphingosine-1 phosphate receptor, SEW2871, FTY720 and rat.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kontrast nefropatisi için çeşitli tanımlamalar mevcut olup klinik çalışmalarda en çok kabul gören tanım; farklı bir neden olmaksızın, kontrast madde verilmesinden 48-72 saat sonra serum kreatinin düzeyinin ≥ 0.5 mg/dl veya bazal değerin ≥ %25'i oranında artmasıdır (1).

Kontrast nefropatisi hastane kaynaklı akut böbrek yetmezliğinin üçüncü en sık nedenidir. İnsidansı büyük ölçüde kontrast madde alımı öncesindeki bozulmuş böbrek fonksiyonlarına, diabetes mellitus (DM) ve konjestif kalp yetmezliği (KKY) gibi kontrast nefropatisi gelişimi kolaylaştıran risk faktörlerine bağlı olarak artış göstermektedir (2). Görüntüleme yöntemleri ve girişimsel radyolojik işlemlerin teknolojik gelişmelere bağlı olarak arttığı günümüzde kontrast nefropatisi görülme sıklığı da buna paralel olarak artmakta; bu durum hastaların morbidite, mortalitelerinde artışa neden olmakta ve hastane maliyetlerini de olumsuz olarak etkilemektedir (3, 4).

Kontrast nefropatisi fizyopatolojisi henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Ancak kabul gören görüşe göre; nefrotoksisite gelişmesinde, renal medüller hipoksi ve direkt hücresel toksisite iki önemli mekanizma olarak öne sürülmektedir (4). Kontrast maddenin direkt ve indirekt etkileri, renal perfüzyon azalması ve tübüler hücrelerde toksisitedir (5). Kontrast maddenin apoptoz ve oksidatif stres yoluyla yaptığı direk tübüler toksisite, endotel disfonksiyonu ve renal mikrosirkülasyondaki değişiklikler patogenezde yeri olduğu düşünülen diğer faktörlerdir (5, 6).

Kontrast nefropatisi gelişiminin önceden tahmin edilmesinde risk faktörlerinin iyi tanımlanması gerekmektedir. Kontrast nefropatisi gelişiminden korunmada bugün için bilinen en etkili yöntem iyi hidrasyon sağlanmasıdır. Kontrast nefropatisinden korunmada antioksidan ve vazodilatatör ajanlar başta olmak üzere; nitrik oksit (NO) sentezini arttıran ajanlar, endotelin (ET) ve adenozin reseptör antagonistleri ile endotel fonksiyonunu düzelten ajanlar denenmiş ancak rutin uygulamaya girecek kadar etkili bulunamamışlardır (7). Üzerinde çalışma yapılan ajanlardan özellikle antioksidan etkileri bilinen N-asetil sistein (NAC) ve askorbik asit bu amaçla kullanılmış, ancak yapılan meta-analizlerde etkilerinin sınırlı düzeyde

olduğu belirtilmiştir. Kanıt düzeyi düşük olmakla birlikte NAC koruyucu olarak önerilmektedir (8, 9).

Sfingozin-1 fosfat (S1P) sfingolipitlerin major metabolitidir ve insan vücudunda birçok göreve sahiptir. Hücre büyümesi, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, hücre migrasyonu gibi birçok aşamayı düzenler, ek olarak apoptozu ve lenfositlerin trafiğini inhibe eder (10, 11). S1P reseptörleri böbreğin proksimal tübülünde, endotel hücre ve birçok immün sistem hücresinde eksprese olurlar. S1P'ın böbrek üzerindeki fizyolojisi ve patofizyolojisi aydınlatılamamıştır (12). S1P'ın renal iskemi reperfüzyon hasarında (IRH) rolu olduğu düşünülmektedir. IRH sonrası, endotel hücreleri (ECs) ve dokudaki lökositlerin aktif olmasıyla bölgeye lökosit infiltrasyonu olur (13).

$S1P_{1,3,4,5}$ reseptör agonisti olan FTY720 ve selektif $S1P_1$ reseptör agonisti olan SEW2871'in renal IRH'nda koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu moleküllerin, renal IRH sonrası lenfosit, makrofaj ve nötrofil infiltrasyonunu azaltarak IRH'na karşı böbrek üzerinde koruyucu etkisi gösterilmiştir (14, 15).
S1P reseptör agonistlerinin sahip olduğu bu özelliklerle kontrast nefropatisi patofizyolojisinde etkili olan mekanizmaların önüne geçebilmesi veya en azından hafifletebilmesi mümkün gözükmektedir.

Bu proje ile deneysel kontrast nefropatisi modelinde S1P reseptör agonistlerinin (SEW2871 ve FTY720) nefropatiyi önleyici etkisinin bulunup bulunmadığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kontrast Nefropatisi

2.1.1. Tanım

Kontrast nefropatisi için çeşitli tanımlamalar mevcut olup klinik çalışmalarda en çok kabul gören tanım; farklı bir neden olmaksızın, kontrast madde verilmesinden 48-72 saat sonra serum kreatinin düzeyinin ≥ 0.5 mg/dl veya bazal değerin ≥%25'i oranında artmasıdır (1). Konrast nefropatisi gelişen vakalarda serum kreatinin yüksekliğinin 3-5 gün sonra pik değerine ulaştığı, 14 güne kadar uzayabildiği ve sonrasından yüksek oranda normale döndüğü bilinmektedir, ancak bazı hastalarda ilerleyici bir şekilde akut böbrek hasarı veya hemodiyaliz (HD) ihtiyacı gelişebilir (16, 17).

Kontrast maddeye bağlı gelişen akut böbrek hasarı ise 48 saat içerinde serum kreatinin değerinde ≥ 0.3 mg/dl'lik artış, 7 gün içerinde bazal serum kreatinin değerinde % 50 artış veya 6 saatten uzun süren oligüri olması ile tanımlanır (18). Bu konuda korkulan ise, akut böbrek yetmezliğinde (ABY) mortalite oranlarının %40- %90'lara varmasıdır (19).

2.1.2. İnsidans

Kontrast nefropatisi hastane kaynaklı akut böbrek yetmezliği nedenleri arasında 3. sıradadır. Retrospektif olarak incelendiğinde azalmış renal perfüzyonun, cerrahi girişimlerin ve nefrotoksik ajanların sık kullanımının konrast nefropatisi gelişmesinde katkısı olduğu görülmüştür (20). 1976-1996 yılları arasında yapılan onbeş prospektif ve retrospektif çalışmada kontrast nefropatisinin insidansı %3.1-%31 olarak saptanmıştır. Kontrast nefropatisi görülme sıklığı; kullanılan kontrast maddenin miktarına, kimyasal özelliklerine, hastanın mevcut risk faktörlerine ve uygulanan profilaktik tedavilere bağlı olarak değişebilmektedir (20).

Risk faktörü olmayan hastalarda, kontrast nefropatisi insidansı %2'den daha azdır. 60 yaş üstü olan hastalarda kontrast nefropatisi insidansı %8- %16 arasında değişmektedir. DM gibi risk faktörü olan hastalarda bu risk %9'a kadar yükselir, DM'sı olup kronik böbrek yetmezliği (KBY) olanlarda risk %90'ın üzerindedir, bu

nedenle risk faktörlerin varlığı kontrast nefropatisinin insidansını etkiler (3). McCullough ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada perkutan koroner revaskülarizasyon uygulanan 1826 hastanın %14.5'inde ABY'nin geliştiği, %0.8'inde hemodiyaliz ihtiyacı meydana geldiği, hemodiyalize alınan hastaların %13'ünde ise kalıcı renal replasman tedavisi gerektiği saptanmıştır; yine aynı çalışma kapsamında ABY gelişmeyen hastalarda %1.1, ABY gelişenlerde %7.1, diyaliz ihtiyacı olanlarda ise %35.7 oranında mortalite tespit edilmiştir (3).

2.1.3. Risk Faktörleri

Kontrast nefropatisi gelişiminden sorumlu bilinen en önemli risk faktörü; hastada bilinen KBY olmasıdır. KBY hastalarında kontrast nefropatisi gelişme olasılığı normal bireylere göre 20 kat daha fazladır, glomerüler filtrasyon hızı (GFR) < 30 ml/dk olan hastalar ise kontrast nefropatisi gelişimi açısından en riskli gruptur (21). Diğer bilinen risk faktörleri ise; " serum kreatinin değerinde ≥1.5 mg/dl olması, metabolik sendrom, DM, kullanılan kontrast maddenin ozmolaritesi ve miktarı, dehidratasyon, hipoalbuminemi, hipotansiyon, akut miyokard infarktüsü, KKY, ileri yaş (>75), hiperürsemi, intra-aortik balon pompası olması ve eş zamanlı olarak nefrotoksik ajanların kullanımı " olarak kabul edilmektedir (21, 22).

Manske ve ark. (23) azotemili ve DM olan hastlarda kontrast nefropatisi gelişme riskini %50 olarak saptamışlardır. Kontrast nefropatisi gelişimi için bir diğer risk faktörü kalp yetmezliğidir. Bu hasta grubunda diüretik tedavisine bağlı damar yatağında sıvı hacmi azalması ve renal arterde görülen vazokonstrüksiyon nefropati gelişimine katkıda bulunabilir (24, 25).

Tablo 1. Mehran ve ark. (26) kontrast nefropatisi için risk skalası

Risk faktörü	Puan
KKY	5
Sistolil kan basıncı < 80	5
İntra-aortik balon pompası olması	5
Yaş >75	4
Anemi (HCT; * Kadın< 36, * Erkek <39)	3
DM	3
Serum kreatinin ≥ 1.5 mg/dl	4
Kontast madde hacımı (her 100 ml için)	1
GFR 40-59 ml/dk	2
GFR 20-39 ml/dk	4
GFR < 20 ml/dk	6

Risk skoru	Kontrast nefropatisi riski (%)	Diyaliz riski (%)
≤5	7.5	0.04
6-10	14	0.12
11-15	26.1	1.09
≥16	57.3	12.6

Kontrast maddeler ozmolalitesine göre üçe ayrılır; yüksek-ozmolar kontrast madde (HOCM): ozmolalite 1500 mOsm/kg üzerinde, düşük-ozmolar kontrast madde (LOCM): ozmolalite 550-850 mOsm/kg arasında ve izo-ozmolar kontrast madde (IOCM): ozmolalite 290 mOsm/kg şeklindedir (27). KBY yokluğunda kontrast nefropatisi gelişimi açısından LOCM'ler, HOCM'lere göre daha düşük riske sahiptir (8). LOCM'ler arasında kontrast nefropatisi gelişme riski en yüksek olan ioxaglate'dir, IOCM'ler arasında ise en yüksek riskli olan Iodixanol'dur (28). Ayrıca yüksek ozmolarite, fazla volüm, konsantrasyon, viskozite ve kullanım sıklığı kontrast nefropatisi ile yakın ilişkilidir (29).

Kontrast madde volümü ile kontrast nefropatisi gelişimi doğru orantılıdır (30). Diyabetik nefropatisi veya önceden var olan böbrek yetmezliği olan hastalarda düşük dozlarda (<100 ml) kontrast madde kullanıldığında bile diyaliz ihtiyacı olabilmekte hatta kalıcı böbrek yetmezliği dahi görülebilmektedir (23). Herhangi bir risk faktörü olmayan hastaya, ek olarak verilen her 100 ml kontrast madde için kontrast nefropatisi olasılığı %30 artmaktadır (23).

Tablo 2. Kontrast maddelerin özellikleri (22)

Tip	İyonik/ non- iyonik	İsim	Ozmolalite mOsm/kg	Vizkosite cPs 37°C'de
HOCM	İyonik	Diatrizoate	1500-2000	1.4-19.5
	İyonik	Metrizoate	2100	2.8-5
LOCM	İyonik	Ioxaglate	600	6-7.5
	Non- iyonik	Iohexol	322-844	1.5-10.4
	Non- iyonik	Metrizamide	300-484	-
	Non- iyonik	Iopromide	328-774	1.5-10
	Non- iyonik	Iopamidol	342-796	1.5-9.4
ICOM	Non- iyonik	Iodixanol	290	6.3-11.8
	Non- iyonik	Iotrolan	270-320	3.9-8.1
	Non- iyonik	Ioseminol	273	6.3

2.1.4. Patofizyoloji

Kontrast nefropatisi fizyopatolojisi henüz yeterince aydınlatılamamıştır (4). Ancak nefrotoksisite gelişiminde, renal medüller hipoksi ve direkt hücresel toksisite iki önemli mekanizma olarak öne sürülmektedir (4). Kontrast madde enjeksiyon sonrası renal arter vazokonstrüksiyonuna bağlı renal perfüzyon azalması sonucu oluşan medüller hipoksi ve tübüler hücrelerde oluşan toksisite kontrast maddenin direkt ve indirekt etkileri ile oluşur (5).

Kontrast nefropatisi oluşumunda muhtemel mekanizmalar (21, 31)

A. Medüller hipoksi sonucunda oluşan renal tübülar nekroz
    1. Reolojik değişim- vizkosite
    2. Ozmotik yük- artmış gereksinim
    3. Vazoaktif maddelerin imbalansı
        - Vazodilatatör maddelerin salınımının azalması
        - Vazokonstrüktör maddelerin salınımının artması
    4. Sistemik hemodinamik instabilite

B. Direkt tübüler sitotoksite
    1. Mitokondriyal yolu ile oluşan apoptoz
    2. Reakif oksijen türevlerinin (ROT) üretimi
    3. Endotel hücrelerden artmış adenozin üretimi
    4. Medüller hipoksi
    5. NO etkisi ile oluşan vazodilatasyonun ROT tarafından blokajı
    6. ROT sonucu oluşan vazokonstrüksyon

2.1.4.1. Hemodinamik Değişiklikler

Kontrast maddeler böbrek kan akımında iki fazlı yanıt oluşturur, kısa süreli vazodilatasyon periyodunu daha uzun süren vazokonstrüksiyon süreci takip eder (32). Renal kan akımının regulasyonu ve tübüler fonksiyonun sağlanması için çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Bu faktörlerin dengeli bir şekilde çalışması gerekmektedir, aksi takdirde renal perfüzyon bozulur (21, 31). Bu mekanizmalarda rol oynayan lokal vazokonstrüktörler; endotelin (ET)-A reseptör, adenozin-A1 reseptör, anjiotensin II, vasopressin, prostaglandin E_2 (PGE2)-EP_1 ve PGE2-EP_3; lokal vazodilatatör ise nitrik oksit (NO), adenozin-A2 reseptör, dopamin, ürodilatin,

ET-B reseptör, PGE2-EP_2 ve PGE2-EP_4 olarak sayılabilir.

Kontrast madde vasküler endotel hücreleri indükleyerek değişik faktörlerin salınımına neden olur, bu faktörler renal medullada vazokonstrüksiyonu arttırabilir ve vazodilatasyonu azaltabilir. Sonuç olarak hipoksiye neden olur.

Endotelin seviyeleri KBY hastalarında artar ve vazokonstrüktif etkileri daha belirgin olur. Ayrıca endotelin seviyeleri kontrast madde maruziyeti sonrası KBY hastalarında belirgin artış gösterir ve 3. günde başlangıç değerlerine geri döner (33). ET-A reseptör antagonisti BQ-123 sıçanlarda kontrast kullanımına bağlı GFR azalmasını kısmen önleyebilmiştir (34). Başka bir çalışmada da indometazin (INDO) kullanılarak yapılan bir kontrast nefropatisi modelinde endotelin reseptör antagonistleri CP170687 ve SB 209670 kullanımı ile kontrast sonrası azalan kan akımı belirgin olarak korunabilmiştir (34).

Adenozin, adenozin-A2 reseptör stimülasyonu ile efferent arteriolde ve medüller kapillerlerde vazodilatasyona neden olur. Ancak böbrek dokusunda afferent arteriolde adenozin-A1 reseptörünün dominant olması nedeniyle adenozin vazokonstrüktif etki gösterir (35).

NO ve PG gibi vazodilatatör komponentlerin bloke olması vazokonstriksiyonu daha da şiddetlendirmektedir (36). Myers ve ark. kontrast madde enjeksiyonu sonrası PGE2 düzeylerinde baskılanma ile paralel olarak kortikal ve medüller kan akımlarında azalma rapor etmişlerdir. Bir prostasiklin analoğu olan iloprost koroner anjio yapılan KBY hastalarında kontrast nefropatisi gelişimini engellemiştir (37). NO potent bir vazodilatör olup bütün tübül segmentleri boyunca sodyum reabzorpsiyonunu azaltır. Böylelikle oksijen kullanımını baskılayarak medüller hipoksi riskini azaltır. L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME) enjeksiyonu ile beraber kontrast madde verilmesi başlangıçta izlenen kısa süreli medüller kan akımını baskılamıştır. Myer ve ark. ise kontrast madde enjeksiyonu ile hem kortikal hem de medüller NO sentaz aktivitesindeki baskılanmaya bağlı olarak endojen NO miktarının baskılandığını göstermişlerdir (38). NO sentezinin L-NAME ve PG sentezinin indometazin (INDO) ile bloke edildiği bir çalışmada kontrast madde sonrası medulla kan akımının %12'sine düştüğü, GFR'de %74 azalma olduğu, henle kulpunda %49 nekroz görüldüğü bildirilmiştir, kontrast madde verilmeksizin INDO veya L-NAME verildiğinde ise bu sonuçlar gözlenmemiştir

(39). Patogenezde yer alan renal vazokonstrüksiyonun etkisi serum kreatinin düzeyinin yükselmesinde tek başına yeterli değildir; esas önemli olan başka faktör ise medüller kan akımının azalmasıdır (40).

Böbrek derin dış renal medulla vaza rekta ile beslenmektedir, vaza rektadaki kan basıncı viskozite ile ters orantılıdır. Kontrast madde glomerülden geçerken renal tübüler viskoziteyi arttırır, bu artış tübüler obstrüksiyona ve böbrek interstisyel basıncının yükselmesine neden olur. Ek olarak yüksek plazma viskozitesi vaza rektadaki kan rezistansını arttırarak medulla hipoksisine ve renal tübüler hasara neden olur. Ayrıca kontrast maddenin yüksek ozmolaritesi nedeniyle eritrosit membranının biçimi ve hacmi azalarak deforme olur bu da vaza rektadan geçişini zorlaştırır (41). Medulla hipoksisi sistemik değişikliklerden de etkilenir, örneğin kardiyak debisi azalması, suboptimal pulmoner perfüzyon-ventilasyon azalması ve hemoglobin oksijen affinite artışı intrarenal hipoksiye neden olur (32, 42-44).

2.1.4.2. Renal Tübülar Hasar

2.1.4.2.1. Apoptoz

Kontrast nefropatisinin ne ölçüde direkt sitotoksiteye neden olduğu bilinmemektedir. Bu konuda tüm bilgiler hayvan çalışmalarından elde edilmiştir. Kontrast maddeler, özellikle iyonik olanlar, böbrek mezenkimal hücreler, tübüler hücreler ve entotel hücreler üzerine toksik etkiye sahiptir (45, 46). Kontrast madde proksimal tübül mitokondriyal aktiviteyi azaltabilir, adenozin ve hipoksantin üretimini arttırabilir ve hücre proliferasyonunu bozabilir (47, 48).

Hücresel görünüme bakıldığında; kontrast madde doz bağımlı olarak vakuolizasyonu arttırabilir (49). LOCM'ler ve IOCM'ler doz ve zaman bağımlı olarak mitokondriyal yollardan renal apoptozu indükleyebilir. Bu yolda kaspaz-3 ve kaspaz-9'u arttırırken kaspaz-8 ve kaspaz-10'u arttırmaz (50).

2.1.4.2.2. Reaktif Oksijen Türevleri (ROT)

Kontrast madde verilme esnasında ROT'un kaynakları endotel hücre adenozini ve renal medulladaki hipoksidir (50). Oksidatif stres sırasında ROT endojen olarak mitokondride üretilir. En çok bilinen ROT, oksijen radikal superoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-). O_2^- ve OH^- daha fazla reaktiftir ve hücre membranından daha fazla geçer. ROT ekstrasellüler sinyal

moleküleridir ve vazokonstrüksiyonda endotelin-1 ,tromboksan A2 , adenozin ,anjiotensin II ve norepinferin gibi rol oynayabilirler (5), örnek olarak radikal superoksit (O_2^-) hızlı bir şekilde nitrik oksiti temizler ve böylece NO bağımlı renal vazodilatasyonu bloke ederek kontrast madde nefopatisine neden olabilir (51). NAC mitokondiyal yoluyla oluşan apoptozu baskılar (52), ek olarak ROT'u temizler, glutatyon sentezini uyarır ve anjiotensin dönüştürücü enzimi (ACE) inhibe edebilir (53).

2.1.4.3. Kalsiyum

Patogenetik sürecin vazokonstrüksiyon fazında adenozin ve endotelin salgılanmasına kalsiyum iyonlarının da eşlik ettiği gösterilmiştir (32). Bu hemodinamik değişiklikler kalsiyum kanal blokerlerinin kullanımı ile geri döndürülebilmiştir (54). Na^+/Ca^+ değiştirici inhibitörü uygulanması ile de intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonu azaltılarak kontrast maddeye bağlı ET üretimi ve vazokonstrüksiyon baskılanmıştır (55). Kontrast madde kullanımı sonrasında gelişen vazokonstrüksiyon düz kas hücrelerine olan direkt etki (56), lokal olarak salgılanan adenozin (48) ve ET üretimine de bağlı olabilir (57).

İntrasellüler Ca^{+2} fizyolojisindeki değişiklikler vazokonstrüksiyon ve tübüler renal hücre apoptozu ile bağlantılıdır (58). Voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarının yanı sıra " reverse mode NCX " inhibisyonu intrasellüler Ca^{+2} yüklenmesini ve ROT üretimini baskılayarak renal tübüler apoptozu önlemiştir (59).

2.1.5. Tedavi

Konrast nefropatisi için hala spesifik bir tedavi yoktur. Öncelikle yapılması gereken yüksek riskli hasta popülasyonunun tespit edilmesi ve koruyucu tedavinin planlanmasıdır. Konrast nefropatisi açısından risk altında olan bireylerde işlemden önce ve işlem sonrası 24.- 96. saatlerde serum kreatinin düzeyleri ölçülmeli, mümkünse GFR hesaplanmalıdır (60).

2.1.5.1. İlaç Kullanımı

Kontrast madde kullanımı öncesi kullanılmakta olan nefrotoksik ajanlar (Non steroid antiinflamatuar ilaçlar, COX2 inhbitörleri, aminoglikozidler, siklosoprin vs) en az 2 gün önceden kesilmelidir. Böbrek hasarı olan diyabetli hastalarda eğer

kullanıyorsa işlemden 48 saat önce metforminin kesilmesi önerilmektedir. Böbrek fonksiyonu bozulmamış olan diyabetli hastalarda metforminin kesilmesine gerek yoktur (61).

2.1.5.2. Non-Farmakolojik Tedaviler

Kontrast maddenin 37°C olması ve en düşük dozda uygulanması önerilir. KBY ve hem KBY hem de diyabeti olan hastalarda IOCM olan iodixanol kullanmak LOCM kullanmaktan daha iyi bir tercihtir. Tüm hastalarda IOCM veya LOCM (ioxhexiol, ioxaglate hariç) kullanılması önerilir (62, 63). Ek olarak 72 saat içerinde doz tekrarından sakınmalıdır.

2.1.5.3. Farmakolojik Tedaviler

2.1.5.3.1. Hidrasyon

Hidrasyon; renin anjiotensin aldosteron sisteminin aktivitesini azaltır, endotelin gibi vazokonstrüktör hormonların seviyesini düşürür, sodyum diürezini artırır, tübüler glomerül feedbacki azaltır, kontrast maddenin tübülde dilüe olmasını sağlayarak geri emilimini azaltır, kontrast maddenin tübüler hücre üzerindeki toksik etkisini azaltır, tübüler obstrüksiyonu engeller ve ROT üretimini baskılar (64).

Kalp yetmezliği olmayan hastalarda kontrast madde verilmeden 12 saat önce diüretik eklenmeden parenteral yolla saatte 1 ml/kg infüzyon hızıyla izotonik normal serum fizyolojik (SF) başlanmalı ve 24 saat devam edilmelidir. Buna ek olarak hastalar bol sıvı içmeleri için teşvik edilmelidir, tek başına oral hidrasyon verilmesi kontrast nefropatisini engellemek için yetersizdir (6). Yapılan çalışmalarda, perkütan koroner girişimden 12 saat önce hospitalize edilmemiş hastalar için kateterizasyondan önceki 10 saat içinde yaklaşık 1000 ml kadar oral sıvı alımı ve 12 saat sonra, 100-150 ml/saat hızında intavenöz (i.v) sıvı verildiği takdirde kontrast nefropatisi gelişiminin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (6).

2.1.5.3.2. Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)

Renal tübüler sıvıyı alkali ederek serbest oksijen radikallerin üretimini azaltmaktadır (65). Tipik olarak hastalara kontrast madde verilmesinden bir saat önce bolus olarak 3 ml/kg/saat infüzyon hızıyla 154 mEq/L NaHCO3 verilmeli ve

işlemden sonra 6 saat boyunca saatte 1 ml/kg olacak şekilde devam edilmelidir (66). Yakın zamanda yapılan büyük meta-analiz çalışmalarında, sodyum bikarbonatın, sodyum kloritten daha yararlı olduğu, ancak ölümü ve renal replasman tedavisini anlamlı derecede azaltmadığı bulunmuştur (67, 68). 119 hasta ile yapılan $NaHCO_3$ ve SF infüzyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada; NaHCO3'ün kontrast nefropatisi gelişimini önlemede SF'ten anlamlı olarak daha üstün bulunmuştur (69). 7977 hastanın incelendiği retrospektif bir kohort çalısmasında sadece $NaHCO_3$ verilen hastalardaki kontrast nefropatisi sıklığı, profilaksi almayan veya sadece NAC ya da NAC+$NaHCO_3$ alanlara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (70). 19 çalışmayı inceleyen başka bir meta-analizde kontrast nefropatisi önlenmesinde $NaHCO_3$ ve SF arasında fark olmadığı saptanmıştır (71).

2.1.5.3.3. N-Asetil Sistein

NAC, ROT'u temizleyen güçlü bir antioksidan olması nedeniyle oksidatif doku hasarını engelleyerek kontrast nefropatisi gelişimini önleyebilmektedir (72). Ayrıca kontrast maddenin olumsuz hemodinamik etkilerini, nitrik oksit sentaz (NOS) yolu ile renal vazodilatasyon yaparak engellemektedir (73).

Standrat doz, işlem gününde ve işlemden bir gün önce oral olarak 2×600 mg verilmesidir (74). Yapılan bazı çalışmalarda NAC 2×600 mg ile 2×1200 mg karşılaştırılmış olup yüksek dozun daha etkili olduğu görülmüştür (72, 75). Bu konudaki en iyi veriler %70'i KBY hastası olan 1677 hasta içeren bir meta-analizden elde edimiştir. Bu meta-analizde yüksek doz NAC ve kontrol grubu karşlaştırılmıştır. Yüksek doz günlük >600 mg veya işlemden önce tek doz NAC >600 mg olarak tanımlanmıştır. Kontrast nefropatisi gelişme riski yüksek doz NAC alanlarda almayanlara göre daha düşük olduğu görülmüştür (76).

Birçok çalışmada NAC'in kontrast nefropatisini önlemede çelişkili sonuçlar elde edilmiştir, yüksek riskli hastalarda kombine tedavi (NaHCO3 ve NAC veya eş zamanlı sıvı replasmanı) tartışılmaktadır (77). 264 hastanın alındığı bir çalışmada, NAC+$NaHCO_3$, NAC+SF ve sadece SF hidrasyonu karşılaştırılmış; birinci grupta kontrast nefropati sıklığı anlamlı oranda az görülürken ikinci ve son grup arasında fark olmadığı bildirilmiştir (78). 2308 hastayı kapsayan bir çalışmada anjiografi işlemi öncesi ve sonrası NAC (2×1200 mg günlük) veya plasebo verilmiş , hastalarda

aşağıdaki risk faktörlerinden en az biri olup (>yaş 70, KBY, DM, KKY, Şok) kontrast nefropatisi gelişme açısından iki grup arasında fark saptanmamıştır, işlemden 48-96 saat sonra serum kreatinin düzeyinde %25'lik bir artış gözlenmiştir, ölüm ve hemodiyaliz açısından ihtiyacı her iki grupta fark saptanmamıştır (79).

Düşük maliyetli, kullanımı kolay ve iyi tolere edilebilen bir ilaç olması nedeniyle yüksek riskli hastalara hidrasyona ek olarak 2×600 mg veya 2×1200 mg dozunda işlemden 24 saat önce NAC başlanması önerilmektedir (8).

2.1.5.3.4. Diüretikler: Furosemid ve Mannitol

Furosemid, henlenin çıkan kalın kolundaki Na-K-Cl_2 kotransportunu inhibe ederek etki gösterir. Nefronun bu segmenti, düşük O_2 sunumu ve yüksek metabolik ihtiyaç nedeniyle iskemik hasara en duyarlı bölümdür. Burada aktif iyon transportunun inhibe edilmesi ile O_2 kullanımının azalabileceği ve dolayısıyla kontrast maddeye bağlı vazokonstrüksiyon oluşturarak nefrotoksisitenin önlenebileceği düşünülmüştü (80).

Değişik küçük çalışmalar diüretiklerin etkinliğini incelemiş olup, bir çalışmada 78 stabil KBY hastası " ortalama serum kreatinin 2.1 mg/dl " koroner anjiografi öncesi 3 grupa ayrılmış; birinci gruba %0.45 salın (1mg/kg/saat) işlemden 12 saat önce ve işlemden 12 saat sonrasına kadar devam edilmiştir, ikinci gruba %0.45 salin ve 25 gr mannitol infüzyon işlemden önce bir saat süre ile verilmiştir, üçüncü gruba ise %0.45 salin ve 80 mg furosemid infüzyon işlemden önce 30 dakika süre ile verildi. SF alan grupta serum kreatinin düzeyinde artış " 0.5 mg/dl " en düşük düzeyde saptanmış. Mannitol fayda sağlamamış, furosemid ise düşük miktarda ABY riskini arttırmıştır (81). Yapılan başka çalışmada SF, mannitol, furosemid karşlaştırılmış; 92 ağır KBY'li " ortalama serum kreatinin 2.8 mg/dl " hasta incelenmiştir, " bu çalışmada ABY serum kreatinin düzeyin %25'lik yükselme olarak tanımlanmıştır " plasebo ile kıyaslanınca mannitol ve furosemid alan grupta ABY daha fazla geliştiği görülmüştür (82). Başka bir çalışmada ise koroner anjiografi öncesi yarısı diyabet hastası olan 50 KBY'li " ortalama Serum kreatinin 2.5 mg/dl " hasta değerlendirilmiştir (83). Rastgele olarak hastalara SF, dopamin, mannitol ve atrial natriüretik peptit (ANP) verilmiştir. " kontrast toksisitesi serum kreatinin düzeyinde %25'lik yükselme olarak tanımlanmıştır " SF grubunda renal

fonksiyon bozulma insidansı %40 olarak saptanmıştır. Dopamin, mannitol ve ANP verilen diyabetik hasta gruplarında renal fonksiyonu bozulma insidansı %75- %83 iken diyabetik olmayanlarda kontrast toksisitesi görülmememiştir (fayda sağlamış olabilir). Ayrıca mannitol fayda sağlamadığı gibi komplikasyonları arttırdığı saptanmıştır.

2.1.5.3.5. Statinler

Koroner arter hastalığı (KAH) olan hastalarda statinler trombüs oluşumu, plak stabilizasyonu ve antiinflamatuar özellikleri üzerine olumlu etkileri olduğu için kullanılır. Statinlerin renoprotekif etkiye sahip olduğu düşünülmektedir.

Perküten koroner anjiografi yapılan KAH hastalarında kontrast nefropatisi değerlendirilmiş, statin alan hastalarda kontrast nefropatisi gelişme insidansı % 4.37 iken statin almayanlarda 5.93% olarak saptanmıştır (84). 4734 hastanın değerlendirildiği bir meta-analiz çalışmasında yapılan hastaların LDL kolsetrolu düşük olmasına rağmen kısa süreli statin verilip, kontrast nefropatisi gelişme insidansına bakılmıştır. Kısa süreli statin verilen 2358 hastanın (kontrast nefropatisi gelişen hasta saysı 79) %3.3'ünde, statin almayan grubun (kontrast nefropatisi gelişen hasta saysı 153) %6.4'ünda kontrast nefropatisi gelişmiştir (85). Başka bir meta-analiz çalışması böbrek fonksiyonları normal insanlarda elektif perküten koroner anjiografi işlemi öncesi rosuvastatin tedavisi anlamlı bir şekilde insidansını azalttığı, ancak KBY'li hastalarda etkili olmadığı görülmüştür (86). Başka değişik çalışmalarda statinlerin kontrast nefropatisini önlemede fayda sağlamadığı gösterilmiştir (87).

2.1.5.3.6. Diğer Tedaviler

Hidrasyonu tolere edemeyen hastalar için başka tedaviler önerilmektedir. Diğer tedaviler [özellikle endotelin antagonisti, adenozin antagonisti (teofilin), ANP, selektif dopamin-A1 agonisti (fenildopam) ve Ca kanal bloker gibi] kontrast madde etkisi ile oluşan vazokontrüksiyonu bloke etme, vazodilatasyonu arttırma ve uyarılan ROT'u azaltma etkileri üzerine odaklanmıştır. Bu maddeler kanıt yetersizliği olması ve faydaları saptanamadığı için günümüzde önerilmemektedir. Ek olarak askorbik asidin kontrast nefropatisi önlemede fayda sağlayamadığı görülmüştür (87).

2.1.5.3.7. Kontrast Maddeyi Temizlemede Kullanılan Teknolojiler

Perküten koroner anjiografi sırasında sağ femoral ven üzerinden koroner sinüse katater takılarak kontrast madde dolaşıma geçmeden temizleyen bir teknik mevcuttur (88, 89). Bu teknik ile prosedür sonrası ortalama temzilenen kontrast madde %49.4 olarak hesaplanmıştır. Bu teknik kontrast nefropatisi riskini azaltma için fayda ve güvenli bir yöntem olabilir ancak yüksek teknolojik ve ortalama başarısızlık oranı %57 olması nedeni ile günümüzde klinikte kullanımını sınırlamıştır (87, 89).

2.1.5.3.8. Diyaliz

Böbrek yetmezliği olan hastalarda kontrast madde atılımı gecikmiştir. Bir seans hemodiyaliz %60- %90 oranında kontrast maddeyi kandan temizler (90).

Kontrast maddeler orta büyüklükte moleküllerdir. Kontrast maddeyi daha hızlı bir şekilde temizlemek için yüksek akım membranı olan hemofiltrasyon veya hemodiyofiltrasyon modelleri kullanılır. Diyaliz inflamatuar reaksiyonları aktif ederek ve vazoaktif maddelerin salınımına neden olarak akut hipotansiyonu uyarır ve sonuç olarak renal fonksiyonları bozulur (87, 88).

Güncel bir meta-analizde diyalizin diğer tedavi yöntemlerine göre kontrast nefropatsini azaltmadığı gibi ağır bir şekilde insidansını arttırdığı görülmüştür (91). Başka analizlerde III. derece KBY olan hastalarda üzerinde kötüleştirici etkisi görülmüştür (87, 91). Hemodiyaliz veya hemofiltrasyon, yüksek riskli IV.- V. derece KBY olan hastalarda kontrast nefropatisine sekonder böbrek fonksiyonları bozulduğunda önerilmektedir (87).

Periton diyalizi alan hastalarda kontrast maddenin rezidual böbrek fonksiyonları üzerindeki etkilerini inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur (92). Kontrast madde etkin bir şekilde periton diyalizle (intermitten periton diyalizi, otomatik periton diyalizi ve sürekli ambulatuar periton diyalizi) temizlenir (90). Periton diyalizi hastalarında kontrast madde kullanımı sonrasında hemen periton diyalizinin başlanması gerekmektedir (22).

2.2. Hayvan Deneylerinde Kontrast Nefropatisi Modelleri

Renal yapıları duyarlı hale getirerek kontrast nefropatisi oluşumunu indüklemek maksadıyla, kontrast madde vermeden önce sıçanları belirli bir süre dehidrate bırakmak, tek taraflı nefrektomi yapmak ve/veya furosemid enjekte etmek gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (93, 94). Bu yöntemlerle ile yapılan çalışmalarda çok sayıda başarılı sonuçlar (93-95) elde edildiği gibi kontrast nefropatisi oluşumu sağlanamayan bildiriler (95, 96) de yayınlanmıştır. Özellikle Sun ve ark. tarafından sıçanlarda etkin kontrast nefropatisi modelini tespit etmek üzere dört farklı teknik uygulanmıştır. Bu uygulamalardan birinci ve dördüncü gruptaki sıçanlar 72 saat, ikinci gruptaki sıçanlar 24 saat, üçüncü gruptaki sıçanlar ise 48 saat dehidrate bırakıldıktan sonra kontrast madde verilmiştir. Birinci grup hariç diğer gruplara kontrast madde verilmeden 20 dakika önce furosemid enjekte edilmiştir. Literatürdeki yaygın sonuçların tersine tüm bu gruplardan sadece dördüncü grupta kontrast nefropatisi modelinin oluşabildiği vurgulanmıştır (96).

İlk kez 1994 yılında Agmon ve ark. tarafından yapılan ve fizyopatolojiye parelel olarak sergilenen çalışmada ise farklı bir model uygulanmıştır. Kontrast nefropatisi patogenezinde önemli bir yeri olan ve endotelden salınan en etkili vazoaktif medyatörlerin NO ve PG olması nedeniyle kontrast nefropatisi deneysel modeli oluşturmak için kontrast madde verilmeden önce bu maddelerin inhibisyonu sağlanmıştır. Bu modeli inceleyecek olursak; deneklerin femoral veni kateterize edilerek 0. dakikada INDO 10 mg/kg dozunda iv olarak uygulanmış, 15. dakikada L-NAME 10 mg/kg dozunda i.v olarak uygulanmış, son olarak 30. dakikada kontrast madde 6 ml/kg dozunda i.v uygulanmıştır (97-99). Lazer-doppler kullanılarak intrarenal kan akımı ölçülerek farmakolojik inhibisyon sonrası kontrast madde verilmesi ile medüller kan akımının %14 azaldığı saptanmıştır. Aynı çalışmada renal fonsiyon parametrelerinde anlamlı oranda bozulma ile birlikte böbrekler histopatolojik olarak incelenmiş, medüller kalın çıkan kolonlarda %50 selektif nekroz görüldüğü rapor edilmiştir (97). Sonraki dönemlerde daha sıklıkla bu teknik üzere kontrast nefropatisi modelleri oluşturulmaya karar kılınmış ve profilakside önerilen tedaviler bu model üzerinden denenmiştir (36, 100-102).

2.3. Sfingozin-1 Fosfat Yapısı, Etki Mekanizması ve Fonksiyonları

2.3.1. Sfingozin-1 Fosfat Biyosentezi ve Etki Mekanizması

S1P sfingolipitlerin major metabolitidir. İntrasellüler S1P seviyesi sentez ve yıkım arasındaki dengeyle sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (103). S1P sfingozin kinaz (SPHK) ile sentezlenirken endoplazmik retikulumda bulunan S1P fosfataz (SPP) veya S1P liyaz ile yıkılır (103). Büyüme faktörleri ve sitokinler SPHK'yi aktif ederek sfingozin fosforilasyonuna neden olur ve S1P üretilir.

SPHK'nın SPHK1 ve SPHK2 olmak üzere iki izoformı tanımlanmıştır (104, 105). SPHK1'in aşırı ekspresyonu aktif kaspazları ve stres ile aktif olmuş protein kinazları inhibe ederek hücrenin apoptozdan kaçmasını sağlar (106, 107). SPHK1 aktivasyonu hücre proliferasyonu (106, 108) ve Ras aktivasyonu ile hücre transformasyonunu regule eder (107). Buna karşılık SPHK2'nin rolü daha az anlaşılmıştır, ancak birçok çalışmada proapoptotik fonksiyonu olduğu gösterilmiştir (109, 110). SPHK2 ayrıca FTY720'yi fosforile ederek aktif eder. Nitekim FTY720'nin fosforile hali $S1P_{1,3,4,5}$ reseptör agonistidir.

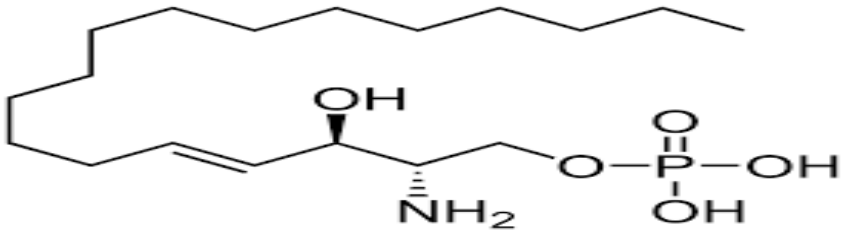
S1P iki yolla yıkılabilir. Geri dönüşümlü olarak SPP ile sfingozine veya geri dönüşümsüz olarak S1P liyaz ile heksadekenala ve fosfoetanolamine yıkılır (111-113).

S1P insan serumunda 0.1-1 μM konsantrasyonda bulunmaktadır. İnsan vücudunda birçok göreve sahiptir. Hücre büyümesi, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve hücre migrasyonu gibi birçok aşamayı düzenler, ek olarak apoptozu ve lenfositlerin trafiğini inhibe eder (10, 11).

S1P'ın önceden bilinen ismi endotel diferansiasyon geni (EDG) olan G proteini bağımlı beş adet reseptörü tanımlanmıştır: EDG1/$S1P_1$, EDG5/$S1P_2$, EDG3/$S1P_3$, EDG6/$S1P_4$ ve EDG8/$S1P_5$ (114, 115). Bu reseptörler böbrek proksimal tübülünde, endotel hücrelerinde ve birçok immün sistem hücresinde eksprese olurlar. $S1P_{1,2,3}$ reseptörleri tüm hücre tiplerinde ekprese olurken, $S1P_4$ ve $S1P_5$ eksepresyonu sırası ile lenfoid doku ve beyin/dalakta yoğunlaşmıştır (116). S1P reseptörlerinin bulunduğu hücre ve dokuya göre etkileri değişkenlik gösterir. S1P reseptörleri özellikle Rho ve Rac olmak üzere Rho ailesinin küçük GTPaz'larını düzenler. Bu düzenlenme hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde ve hücre bariyer bütünlüğünün sürdürülmesinde veya hücre migrasyonunda önemli bir rol

oynar (117, 118).

Kimyasal ismi: 2S-amino-1-(dihydrogen phoshate)-4E-octadecene-1,3R-diol; kimyasal formülü: $C_{18}H_{38}NO_5P$ ve moleküler ağırlığı: 379.47 g/mol olarak bilinmektedir (Şekil 1).



Şekil 1. Sfingozin-1 fosfatın kimyasal yapısı

2.3.2. Sfingozin-1 Fosfat ve İmmün Sistem

S1P, dolaşım ve lenf sisteminde ağırlıklı olarak mononükleer fagositler, aktif mast hücreleri ve trombositler tarafından üretilir (119). Sıçan ve insan CD4 ve CD8 T hücrelerinde $S1P_1$ reseptörü ve $S1P_4$ reseptörü fonksiyonel cevapta rol alan temel S1P reseptörleridir (120). S1P'ın T hücre üzerindeki etkileri konsantrasyon bağımlıdır. S1P düşük konsantrasyonlarda (0.1-100 nM) apoptozu inhibe eder ve kemotaksisi arttırır, yüksek konsantasyonlarda (0.3-3 μM) ise T hücre kemotaksisini inhibe eder. Sözü edilen etkiler $S1P_4$ reseptörü üzerinden değil, $S1P_1$ reseptörü üzerinden gelişir (121). Ayrıca S1P 0.1 nM-1 μM konsantrasyonlarında ise CD4 T hücrelerinin proliferasyonunu ve interferon-γ (INF-γ) ve IL-4 üretimi inhibe edebilir, ancak IL-2 üretimi üzerine etki etmez (122). Bu multipl immün düzenleyici etkiler $S1P_1$ reseptör aktivasyonu ile oluşur (122). $S1P_4$ reseptörü T hücre proliferasyonunu, ve IL-2, INF-γ gibi sitokinlerin üretimini inhibe ederek ayrıca IL-10 sitokin üretimini arttırarak immünsüpresyona neden olabilir (123).

Mast hücrelerinin doğal ve kazanılmış immün sistemde ve allerjik reaksiyonlarda önemli bir role sahip olduğu biliniyor (124, 125). Mast hücreleri ayrıca plazma S1P'ın da önemli bir kaynağıdır. Antijenle uyarılmış IgE agregasyonu mast hücrelerinde SPHK'yi aktif eder ve S1P'ın ekstrasellüler alana salınmasına

neden olur. Bu süreç, mast hücrelerinin inflamasyon bölgesine migrasyonunda ve degranülasyonunda önemlidir (126, 127). $S1P_1$ reseptör aktivasyonu hücre iskeletini yeniden düzenleyerek mast hücre migrasyonuna aracılık eder, buna karşılık $S1P_2$ reseptörün aktivasyonu Rac'ı down-regule eder ve Rho'nun aktifleşmesini inhibe eder. Böylece $S1P_2$ reseptör aktivasyonu mast hücre kemotaksisini inhibe eder (128, 129).

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda S1P'ın lenfosit trafiği üzerindeki etkisi açığa kavuşturulmuştur. Bu çalışmalara göre S1P lenfositlerin sekonder lenfoid organlardan periferik kana çıkışında rol oynamaktadır (130-132). Bir sfingozin analoğu olan FTY720 ile yapılan in vivo çalışmalarda, $S1P_1$ reseptörü downregule olarak, lenfositlerin sekonder lenfoid organlarda ve dalakta sekestere olduğu ve bunun sonucunda periferal lenfopeninin indüklendiği görülmüştür (130-133).

2.3.3. Sfingozin-1 Fosfatın Endotel ve Epitel Bariyeri Üzerindeki Etkisi

Farklı kompartmanlar arasındaki hücre bariyerleri normal fizyolojide önemli bir yere sahiptir. Endotel hücre bariyeri dolaşımdaki vasküler elemanları intertisyumdan ayırır. Endotel hücre bariyerinde bozukluk olursa vasküler geçirgenlik artar ve bunun sonucunda inflamasyon ve organ disfonksiyonu ortaya çıkar. S1P, $S1P_1$ reseptör üzerinden endotel hücreninin bütünlüğünün sürdürülmesini sağlar (134, 135). Diğer yandan $S1P_{1,2,3}$ reseptörleri embriyonik gelişim sürecinde matür ve sağlam vasküler sistemin gelişmesinde ortak fonksiyona sahiptir (136).
$S1P_1$ reseptör deri ve akciğer kapiller bütünlüğün sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. $S1P_1$ reseptör antagonistinin i.v olarak verilmesi $S1P_1$ reseptörün akciğer üzerindeki etkilerini tersine döndürür (137). Yakın zamanda yapılan bir çalışmaya göre $S1P_3$ reseptörü akciğer epitelyal bariyerinin bozulmasında önemli bir role sahiptir (138). Damar içi yerine intratrakeal olarak verilen S1P wild-tip sıçanlarda tight junctionlara zarar vererek akut pulmoner ödeme neden olmuştur. Ancak bu etki $S1P_3$ reseptör null sıçanlarda gözlenmemiştir (139).

2.3.4. Sfingozin-1 Fosfat ve Böbrek

S1P'ın bazı dokular ve hüceler üzerine etkileri aydınlatılmıştır. Ancak böbrek üzerindeki etkilerin fizyolojisi ve patofizyolojisi tam olarak henüz aydınlatılamamıştır.

$S1P_1$ reseptörü böbrek proksimal tübülünde eksprese olur ve endotel hücre bütünlüğünün sürdürülmesinde ve lenfosit trafiğinde önemli rol oynar (12, 140). Yakın zamanda sıçan böbreklerinde $S1P_1 > S1P_3 > S1P_2 > S1P_4$ olmak üzere $S1P_{1,2,3,4}$ reseptör ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Ancak $S1P_5$ reseptör mRNA'ına rastlanılmamıştır (15).

Bischoff ve ark. (141) yaptığı öncü çalışmalarda S1P'ın renal vazokonstrüksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Yine aynı araştırmacıların yaptığı diğer çalışmalarda i.v S1P infüzyonu yapıldğında renal kan akımı azalmasına rağmen natriürezis olduğu gösterilmiştir (141-143).

Farmakoloji alanında yapılan yeni keşiflerle S1P'ın fizyolojik mekanizmasına yeni bakış açıları getirilmiştir. Birçok hastalığın tedavisi için (FDA multipl skleroz için FTY720 onaylanmıştır) S1P reseptör modülatuarları üzerinde çalışılmaya başlanmıştır (116, 144). Bu gelişmeler ışığında Zhu ve ark. (145) sıçanlarda böbrek üzerinde S1P rolünü incelemiştir. Bu çalışma sonucunda Zhu ve ark. beş sonuç elde etmiştir. 1) özellikle toplayıcı kanallarda olmak üzere S1P reseptörlerinin $S1P_{1,2,3}$ renal kortekse nazaran renal medullada daha çok bulunur; 2) intramedüller S1P reseptör agonisti medüller kan akımı üzerine minor etki yapmasına rağmen (hafif vazodilatasyon) Na atılımını büyük ölçüde arttırmıştır; 3) S1P reseptör agonitlerinin natrüetrik etkileri $S1P_1$ reseptör selektif antagonisti ile bloke edilmiş ancak $S1P_2$ veya $S1P_3$ reseptör antagonizması ile bloke edilememiştir; 4) $S1P_1$ reseptör antagonizması Na atılımını azaltır; 5) S1P reseptörünün agonistin natriüretik etkileri NaCl ko-transporter (hidroklorotiazid), Na/K/cl ko-transporter (furosemid) ve Na/H kontransporter (metilizobutilamilorid) ile artmış, ancak ENaC inhibisyonu ile (amilorid) artmamıştır.

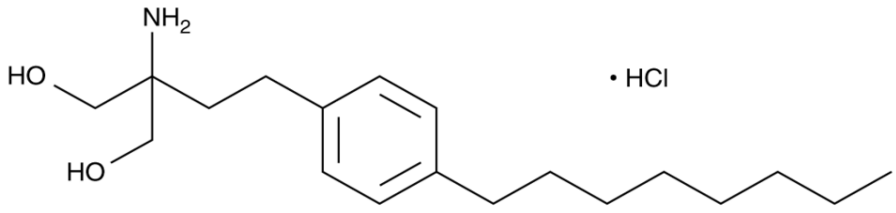
Renal iskemi reperfüzyon hasarında da S1P'ın rolu olduğu düşünülmektedir. IRH oluşum mekanizması karmaşıktır (146). Hem doğal hem adaptif immün mekanizmalar rol almaktadır (13). IRH sonrası endotel hücre ve doku lökositleri aktif olup, lökosit infiltrasyonuna neden olur (13). Kemik iliği kaynaklı hücreler IRH'nda önemli role sahiptir. Böbreğe nötrofil infiltrasyonu olması hasarın kaynağıdır (147-149). Yapılan güncel çalışmalara göre IRH sonrası oluşan antijenden bağımsız inflamatuar yanıtın makrofaj ve T hücre aracılığı ile oluştuğu saptanmıştır (150-152).

Troncoso ve ark. (153) FTY720'nin renal IRH'nda koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. FTY720 renal IRH sonrası lenfosit, makrofaj ve nötrofil infiltrasyonunu azaltarak doku koruyucu etkisini göstermiştir (14). FTY720'nin aktif olmasıyla oluşan koruyucu etkiler VPC44116 ($S1P_{1,3}$ reseptör antagonisti) verildiğinde tersine dönmektedir. FTY720'nin oluşturduğu etkiler ise SEW2871 tarafından oluşan etkilerle aynıdır. SEW2871 renal IRH sonrası gelişen pro-inflamatuar molekülleri (TNF-α, P selektin, intrasellüler adezyon-2) azaltarak ve lenfosit trafiğini inhibe ederek renal dokuyu korur (154). $S1P_1$ reseptörü mRNA ekspresyonunun böbrek lökosit infiltasyon olmadan daha önce artmasının renal dokuyu korumada önemli olabileceği gösterilmiştir (155).

2.3.5. FTY720

$S1P_{1,3,4,5}$ reseptörlerinin agonisti olan FTY720, *Iscaria sinclarii* mantarının metaboliti olan myrocin (ISP-1)'den üretilmiştir (156). SPHK2 ile fosforilasyon reaksiyonu sonucunda FTY720-fosfat sentezlenir (132). İn vivo radyasyon-ilişkili akciğer hasarında (157), akut akciğer hasarında (158), aterogenezde (159), renal IRH'nda (160) ve diyabetik vasküler bozukluklarda (161) oluşan vasküler sızıntının gelişmesini engelleyebildiği gösterilmiştir. Hayvan modellerinde organ allograft surveyini uzattığı gösterilmiştir (162, 163). Bu etkisi de immünmodülatuar özelliği ve periferik lenfosit apoptozunu indüklemesi ile ilişkilidir (160).

Kimyasal ismi: 2-amino-2-[2-(4-n-octylphenyl)ethyl]-1,3propanediol hydrochloride ; kimyasal formülü: $C_{19}H_{33}NO_2 \cdot HCl$ ve moleküler ağırlığı: 343.9 g/mol olarak bilinmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. FTY720'nin kimyasal yapısı

2.3.6. SEW2871

SEW2871 selektif $S1P_1$ reseptör agonistidir. FTY720 gibi hayvan IRH modellerinde iyileştirici rolu olduğu rapor edilmiştir (154). SEW2871 kandaki lenfositlerin azaltığı rapor edilmiştir (164). SEW2871 miyokard veya karaciğer IRH sonrası karaciğer ve kalp üzerinde koruycu etkisi olduğu görülmüştür (165). Birçok çalışmada SEW2871'in diyabette, alzheimer hastalığında, karaciğer fibrozisinde ve antiinflamatuar cevap üzerinde etkisi olduğu raporlanmıştır. Obez olmayan tip 1 diyabetli sıçan modellerinde monosit adezyonunu inhibe eder, monosit/endotel etkileşimini engeller (166).

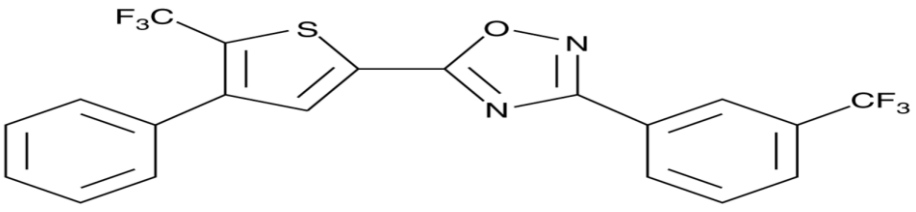
Fare deneylerinde alzheimer hastalığı modelinde kronik SEW2871 tedavisi β amyloid ($A\beta_{1-42}$) ile indüklenmiş hafıza kaybı ve hipokampal nöron kaybını inhibe ettiği gösterilmiştir (167).

SEW2871 insan karaciğer myofibroblastların hasar bölgesine migrasyonunu düzenleyerek karaciğer fibrozisini modüle eder (168).

SEW2817 anti-inflamatuar etkilere sahiptir; dendritik hücre (DC) kemotaksisini ve lenf hücrelerinin migrasyonunu inhibe eder, dolayısıyla proinflamatuar sitokinlerin azalmasına neden olur (169). $S1P_1$ reseptör aktivasyonu dendritik hücre üzerindeki IL-10 ve IL-12 üretimini azaltır (170).

Vasküler endotel hücrelerde $S1P_1$ reseptörün aktivasyonu ile anjiyogenez, hücre proliferasyonu, endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) stimüle eder ve monosit adezyonu azalır (171). Bu etkilerle endotel hücresinin sağlam kalmasını sağlar.

Kimyasal ismi: 5-[4-phenyl-5-(trifluoromethyl)-2-thienyl]-3-[3(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,4-oxadiazole; kimyasal formülü: $C_{20}H_{10}F_6N_2OS$ ve moleküler ağırlığı: 440.36 g/mol olarak bilinmektedir (Şekil 3).



Şekil 3. SEW2871'in kimyasal yapısı

2.3.7. S1P Hayvan Modellerindeki Etkileri

Alaa S. Awad ve ark. (15) sıçanlarda yaptıkları deneyde renal IRH'nda $S1P_1$ reseptör agonistinin rolünü incelemişlerdir. Sıçanlara renal IRH protokolü hazırlandıktan sonra; iskemi'den 24 saat, 20 saat önce ve 30 dakika sonra FTY720 (24, 48, 240, 480 µg/kg) i.p olarak uygulanmıştır. İskemiden 24 saat, 20 saat önce ve 30 dakika sonra SEW2871 (0.1, 1, 10 mg/kg) i.p olarak uygulanmıştır. Ayrıca VPC44116 ($S1P_{1,3}$ reseptör antagonisti) 10 mg/kg dozunda yalnız başına veya FTY720 (48 µg/kg) ile kombine olarak uygulanmıştır. FTY720'nin renal IRH'nı azalttığı gösterilmiştir, serum kreatinin düzeyinde özellikle 240 µg/kg dozda belirgin düzelme saptanmıştır, ancak FTY720 S1P reseptör non-spesifik agonisti olduğu için 480 µg/kg dozda aynı oranda serum kreatinin düzeylerin düşme görülmemesine rağmen böbrek dokusunda lökosit sayısında azalma saptanmıştır. FTY720'nin renal IRH sonrası gelişen vasküler geçirgenlik artışını geri döndürdüğü saptanmıştır. SEW 2871 (10 mg/kg) dozuyla Serum kreatinin düzeyinde belirgin azalma olduğu görülmüştür. Buna göre selektif $S1P_1$ reseptör aktivasyonu IRH sonrası renal doku korunmasına aracılık eder. Bunlara ek olarak, FTY720'nin hangi reseptör üzerinden bu etkileri oluşturduğunu saptamak için; FTY720 (48 µg/kg) ve VPC44116 (10 mg/kg) verilmiştir. Bu çalışmaya göre FTY720 ile sağlanan IRH sonrası nötrofil infiltasyonunda azalma ve renal IRH'na karşı koruyucu etkiler VPC44116 verildiğinde tersine dönmektedir. Işık mikroskop analizinde IRH sonrası tübüler nekroz ve proksimal tübüllerde obstrüksiyon görülmüştür, bu değişikliklerin FTY720 (48 µg/kg) ve SEW 2871 (10mg/kg) ile azaldığı gözlemlenmiştir. Real time PCR kullanılarak böbrek dokusunda S1P'ın 4 adet reseptörü olduğu görülmüştür. Renal IRH sonrası erken dönemde $S1P_1$ mRNA ekspresyonunun indüklendiği görülmüştür, $S1P_1$ mRNA'nın 2-4 saat sonra kontrol grubuna göre 10 kat daha fazla eksprese olduğu görülmüştür, SIP_3 mRNA ekspresyonunun ise 4 saat sonra kontrol grubuna göre 3 kat daha fazla eksprese olduğu görülmüştür. $S1P_2$ mRNA ve $S1P_4$ mRNA ise anlamlı derecede eksprese olmamıştır.

Haifeng Ni ve ark. (172) sıçanlarda yaptıkları deneyde (5/6 nefrektomili) kronik böbrek yetmezliğinde renal mikrovasküler endotel disfonksiyonu ve renal fibrozis üzerinde FTY720'nin etkisini incelemişlerdir. FTY720 (1mg/kg/gün)

verildikten sonra; serum BUN ve serum kreatinin düzeylerinde anlamlı bir düzelme olduğu görülmüştür. 5/6 nefrektomili grupta oluşan ağır glomerüler sklerozu, tübüler dilatasyonu, tübüler atrofiyi, genişlemiş intertisyel aralıktaki bozukluğu, artan TGF-β1, kollajen IV ve fibronektin ekspresyonunu, böbrek dokusunda azalan NO düzeyini düzeltmiştir. Glomerüler membranda, podositte, tübüler epitelde ve dış medullada ise VEGF (vasküler endotel büyüme faktör) mRNA ve proteininin ekspresyonunun azalmasını engellemiştir.

Ahrom Ham ve ark. (173) farelerde yaptıkları deneyde selektif endotel $S1P_1$ reseptör delesyonunun renal IRH'nı alevlendirdiğini göstermişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Protokolü

Çalışma öncesi gerekli onam Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (Tarih: 13.02.2017, protokol kodu: 12.2017.mar).

Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Eğitim Merkezi Laboratuvarında yetiştirilen 20 haftalık, ağırlıkları ise 250-350 gram aralığında olan Sprague-Dawley türü yetişkin erkek sıçanlar çalışmaya dahil edildi. Çalışma süresince sıçanlar; sıcaklık (22±3°C), nem (%55-60) ve ışık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) bakımından eşit koşullarda barındırıldı, çalışma boyunca standart sıçan diyetiyle sınırlama olmadan beslendi. Gruplar oluşturulduktan sonraki ilk 24 saat sıçanların ortamlarına alışma süresi olarak belirlendi, deneyin başında ve sonunda vücut ağırlıkları hesaplandı. Tüm gruplardaki sıçanlar çalışmanın 72. saatinde sakrifiye edildi. Deneye başlanmadan tüm sıçanlardan juguler veninden bazal kan alındı. Sıçanlara sakrifikasyon öncesi eter anestezisi ile intrakardiyak yolla kan alınması ve her iki böbreğinin çıkarılması ile deney sonlandırıldı.

3.1.1. Kontrast Nefropatisi Modeli Oluşturulması

Önceki çalışmamızda literatürdeki kontrast nefropatisi modellerine dayanarak 5/6 nefrektomili sıçanlarda kontrast nefropatisi modeli oluşturmaya karar verdik. Sıçanlara 5/6 nefrektomi operasyonu yapıp, 10 hafta bekledikten sonra dehidratasyonu indüklemek için sıçanlara 10 mg/kg furosemid i.p yapıp hemen ardından 24 saat süre ile sıçanları dehidrate bıraktık, 24. saatin sonunda sıçanlara kuyruk veninden kateter açarak urografin 8 ml/kg i.v uyguladık , 72. saatte deneye son verdik. Deneyin sonunda serum BUN, serum kreatinin ve 24 saatlik idrar kreatinin klirensi değerlerine bakıldığında kontrast grubu ile kontrol grubu arasında fark olmadığını gördük. Bu nedenle kontrast nefropatisi modeli oluşturabilmek için başka bir kontrast nefropatisi modelini yapmaya karar verdik.

Bu modelde kontrast nefropatisi oluşturabilmek için predispozan etkisi olduğu bilinen L-NAME, INDO ve yüksek ozmolariteli meglumine/sodium diatrizoate (urografin 76%) literatür bilgileri ve ön deney çalışmaları ile doz tespiti

yapılarak sırasıyla 10 mg/kg, 10 mg/kg ve 6 ml/kg i.v olarak verilmiştir (97-99). Bu deneyde sıçanların kuyruk veninden katater takılarak 0., 15. ve 30. dakikada sırasıyla INDO 10 mg/kg, L-NAME 10 mg/kg ve urografin 76% 6 ml/kg i.v olarak uygulandı.

3.1.2. İlaçlar

Dimethyl sulfoxide (DMSO): Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiş olup (Katalog no: 67-68-5), >%99 saflıktadır. SEW2871 maddesini çözmek amacıyla kullanıldı. Oda ısısında ve alüminyum folyo içerisinde ışıktan korunarak muhafaza edildi.

SEW2871: Cayman Chemical firmasından edilmiş olup (Katalog no: 256414-75-2), >%98 saflıktadır. Deney öncesi DMSO içerisinde çözülerek -20°C'de karanlık ortamda saklandı ve sıçanlara uygulanacak zamana kadar alüminyum folyo içerisinde muhafaza edilerek ışıktan korundu.

FTY720: Cayman Chemical firmasından edilmiş olup (Katalog no: 162359-56-0), >%98 saflıktadır. Deney öncesi SF içerisinde çözülerek -20°C'de karanlık ortamda saklandı ve sıçanlara uygulanacak zamana kadar alüminyum folyo içerisinde muhafaza edilerek ışıktan korundu.

L-NAME: Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiş olup (Katalog no: N5751-1G), >%98 saflıktadır. Çalışma boyunca -20°C'de saklandı, deney günü ise SF içerisinde çözülerek ratlara uygulandı.

INDO: Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiş olup (Katalog no: I7378-5G), >%99 saflıktadır. Çalışma boyunca +4°C'de saklandı, deney günü ise Na_2CO_3 içerisinde çözülerek sıçanlara uygulandı.

Meglumine/sodium diatrizoate (Urografin 76%): Bayer-Schering firması tarafından sağlanmış olup içeriğinde sodium amidotrizoate 0.1 g/ml, meglumine amidotrizoate 0.66 g/ml ve iyot 370 mg/ml oranlarında bulunmaktadır. 30°C'nin altında ve karanlık ortamda muhafaza edildi. Sıvı halde bulunan yüksek ozmolar kontrast madde direkt olarak sıçanlara uygulandı.

3.1.3. Doz Belirlenmesi

FTY720: Literatür incelemesinde i.p uygulamasında FTY720 için kullanılan dozların çok geniş aralıkta (48 µg -1 mg) değerler aldığı görüldü (15, 172, 174). Alaa S. ve ark. (15) tarafından yapılan bir çalışmada FTY720'nin (240 ve 480 µg/kg) üçer dozun etkin olduğu görülmüştür. Bu çalışmadan yola çıkılarak üç doz 250 µg/kg FTY720 kullanılmasına karar verildi.

SEW2871: Literatür incelemesinde i.p ve subkutan (s.c) uygulamada SEW2871 için kullanılan dozların çok geniş aralıkta (0.1, 1, 10 mg/kg) değerler aldığı görüldü (15, 175). Alaa S. ve ark. (15) tarafından yapılan bir çalışmada SEW2871'in 10 mg/kg üçer dozun etkin olduğu görülmüştür. Bu çalışmadan yola çıkılarak üç doz 10 mg/kg SEW2871 kullanılmasına karar verildi.

3.1.4. Deney Grupları

Tüm sıçanlardan bazal kan alındıktan sonra aşağıdaki gruplara ayrıldı:

1. Kontrol grubu (n=9): 24. saatte sıçanların kuyruk veninden kateter açılarak 0., 15. ve 30. dakikalarda sırasıyla; 1.0 ml/kg, 1.0 ml/kg ve 6.0 ml/kg SF i.v, ek olarak; 0., 24. ve 48. saatlerde 0.1 ml/kg SF i.p olarak uygulandı. Sıçanların bir kısmına i.p olarak uygulanan SF'in yerine DMSO s.c olarak uygulandı. Sıçanların hepsi değerlendirme sırasında bir araya getirilerek istatistiksel analizler yapıldı.

2. Kontrast grubu (n=12): 24. saatte sıçanların kuyruk veninden kateter açılarak 0., 15. ve 30. dakikalarda sırasıyla; INDO 10 mg/kg, L-NAME 10 mg/kg ve urografin %76 6 ml/kg i.v, ek olarak; 0., 24. ve 48. saatlerde 0.1 ml/kg SF i.p olarak uygulandı. Sıçanların bir kısmına i.p olarak uygulanan SF'in yerine DMSO s.c olarak uygulandı. Sıçanların hepsi değerlendirme sırasında bir araya getirilerek istatistiksel analizler yapıldı.

3. SEW2871 grubu (n=7): 24. saatte sıçanların kuyruk veninden kateter açılarak 0., 15. ve 30. dakikalarda sırasıyla; INDO 10 mg/kg, L-NAME 10 mg/kg ve urografin %76 6 ml/kg i.v, ek olarak SEW2871; 0., 24. ve 48. saatlerde 10 mg/kg dozunda, 0.1 ml/kg hacim ile s.c olarak uygulandı.

4. FTY720 grubu (n=8): 24. saatte sıçanların kuyruk veninden kateter

açılarak 0., 15. ve 30. dakikalarda sırasıyla; INDO 10 mg/kg, L-NAME 10 mg/kg ve urografin %76 6 ml/kg i.v, ek olarak FTY720; 0., 24. ve 48. saatlerde 250 µg/kg dozunda, 0.1 ml/kg hacim ile i.p olarak uygulandı.

Tüm gruplarda ve yapılan uygulamalar tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3. Gruplara ve günlere göre deneyin uygulanış şeması

	Kontrol grubu	Kontrast grubu	SEW2871 grubu	FTY720 grubu
Bazal kan alınması				
0. Saat	SF i.p	SF i.p	SEW2871 s.c	FTY720 i.p
23. saat	SF i.p	SF i.p	SEW2871 s.c	FTY720 i.p
24 saat 0. dk	SF i.v	INDO i.v	INDO i.v	INDO i.v
24 saat 15. dk	SF i.v	L-NAME i.v	L-NAME i.v	L-NAME i.v
24 saat 30. dk	SF i.v	Urografin %76 i.v	Urografin %76 i.v	Urografin %76 i.v
48. Saat	SF i.p	SF i.p	SEW2871 s.c	FTY720 i.p
48. saat	Metabolik kafes			
72. Saat	Sakrifikasyon			

3.2. İdrar Örneklerinin Toplanması

Sıçanlar kontrast madde enjeksiyonunun 48. saatte 24 saatlik idrarları toplanmak üzere metabolik kafeslere konuldu. 24 saat süre ile metabolik kafeste idrarları toplandı. 72. saatte toplanan idrarlar santrifüj edilerek -80 C'de saklandı.

3.3. Kan ve Böbrek Doku Örneklerinin Alınması

Sıçanlar metabolik kafeste 24 saatlik idrarlarının toplanmasının ardından (kontrast uygulanması sonrası 72. saatte) eter anestezisi ile sedatize edildikten intrakardiyak kanları alındı, sağ ve sol böbrekleri çıkartıldı. Böbrekler uygun parçalara bölündükten sonra bir kısmı %10 formol içinde saklanıp, daha sonra parafin blokları içine gömüldü, bir kısmı da direk olarak -80 ºC'de donduralarak

saklandı. Eter anestezi ile sedatize edilen sıçanlardan alınan intrakardiyak kanlardan elde edilen serumlar -80 ºC'de saklandı.

3.4. Değerlendirme Parametreleri

3.4.1. Böbrek Fonksiyonlarının Belirlenmesi

Tüm gruplardan kan örnekleri heparinle yıkanmış enjektör aracılığıyla herhangi bir katkı maddesi içermeyen polipropilen boş tüplere alındı. Soğuk zincir protokolünde nakil ve santrifüj işlemlerinden geçirildikten sonra elde edilen plazmanın bir kısmı serum BUN ve serum kreatinin ölçümleri için kullanıldı.

Serum BUN, serum kreatinin ve idrar kreatinin ölçümleri, MÜTF biyokimya laboratuvarında Beckman Coulter, AU680 marka otoanalizörde rutin hazır kitler kullanılarak yapıldı. Kontrast nefropatisi modeli, kontrol grubuna kıyasla kontrast grubundaki serum kreatinin düzeyinde en az 0.5 mg/dl veya %30'luk artış olarak kabul edildi.

3.4.2. Histolojik İncelemeler

3.4.2.1. Böbrek Histopatolojisi

Sakrifikasyon sonrası sağ böbrek alınarak %10'luk formalinde fikse edildi. Preparatlar MÜTF Histoloji Anabilim Dalı laboratuvarında kör yöntemle iki kişi (Dr. Özlem Tuğçe Çilingir Kaya ve Prof. Dr. Şule Çetinel) tarafından değerlendirildi. Tüm deney gruplarından alınan böbrek dokuları ışık mikroskopik incelemeler için %10 formaldehit solüsyonunda en az 24 saat süreyle immersiyon fiksasyonu ile tespit edildi. Dokulara rutin histolojik doku takibi prosedürü uygulandı. Özetle, artan alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilen dokular daha sonra toluen ile saydamlaştırıldı ve parafine gömülerek bloklandı. Doku bloklarından mikrotom ile (Leica RM2125RT) lam üzerine yaklaşık 5 µm'lik kesitler alındı. Tüm doku kesitlerine histopatolojik incemeler için Hematoksilen-eozin (H&E) boyası uygulandı. Hazırlanan preperatların tümü kamera ataçmanlı ışık mikroskobunda incelenerek fotoğraflandı (Olympus CX-41). Tüm doku kesitlerinde, x200 büyütmede 5 alan tübüler epitelyal hasar, tübüler dilatasyon, glomerüler hasar, interstisyal alanda ödem, konjesyon ve kast oluşumu parametreleri açısından semikantitatif olarak değerlendirildi. Histopatolojik skorlama, her bir parametre için,

0: yok, 1: hafif, 2: orta derecede, 3: yoğun şeklinde yapıldı (102). Toplam hasar skoru; tübüler epitelyal hasar, tübüler dilatasyon, glomerüler hasar, interstisyal alanda ödem, konjesyon ve kast oluşumu parametrelerinin toplamı ile ifade edildi.

3.4.2.2. Böbrek Dokusunda Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi Ölçümü

Dokular ilk önce 20 Mm K_2HPO_4 (pH=7.4) çözeltisi ile sulandırılıp Ultra Turrax T25 doku homojenizatöründe (Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik) homojenize edildikten sonra 12.000 devirde 10 dakika süreyle 4 ^{0}C'de santrifüje (Universal 16R, Hettich Zentrifugen) edildi. Pellet, aynı hacimde %0.5'lik heksadesiltrimetilamonyum hidroksit içeren 50 mM K_2HPO_4 ile yeniden homojenize edildi. MPO aktivitesi, o-dianizidin 2HCl'nin H_2O_2'e bağımlı oksidasyonunun spektrofotometrik (Pharmacia LKB-Ultraspec III) ölçülmesi ile saptandı. Bir ünite enzim aktivitesi, 460 nm'de 3 dakika boyunca absorbansta değişikliğe neden olan MPO miktarı olarak tanımlandı. MPO aktivitesi Ünite/gram olarak ifade edildi. Bir ünite MPO aktivitesi 25 ^{0}C'de dakikada 1 mmol H_2O_2 indirgenmesi olarak tanımlandı (176).

3.4.2.3. Glutatyon (GSH) Ölçümü

Hücre içi önemli bir antioksidan olan glutatyonun düzeyinin ölçümü için lipit peroksidasyonu ölçümünde ayrılan süpernatanlar kullanıldı. Aynı süpernatan örneklerine 0.3 M Na2HPO4 ve Ellman ayıracı (DTNB ve sodyum sitrat tamponu) eklendi. Karanlıkta 10 dakika bekletilen tüpler spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Sonuçlar nmol GSH/gr doku şeklinde ifade edildi (176).

3.4.2.4. Serum ve Doku Örenklerinde Sitokin Tespiti

Serum ve doku homojenatı örneklerinde TNF-α ve IL-1β ölçümleri " COBAS INTEGRA 400/800 " otoanalizörü kullanılarak sırasıyla " Rat TNF-α Platinum ELİSA (katolog no: BMS622, eBioscience, Austria) " ve " Rat IL-1β Platinum ELİSA ELİSA (katolog no: BMS630, eBioscience, Austria) " kitleri kullanılarak yapıldı. Doku homojenatlarında protein konsantrasyonu BCA kiti (katolog no: 23225, Pierce, USA) kullanılarak belirlendi. TNF-α ve IL-1β değerleri pg/ml veya pg/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5. İstatistiksel Analiz

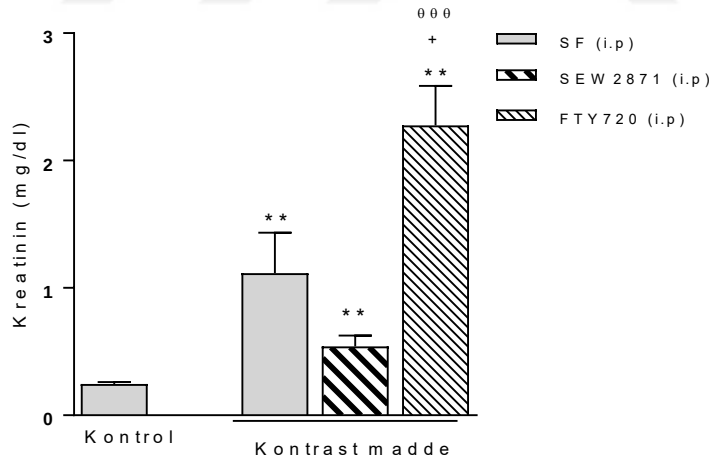
Veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler için GraphPad Software istatistik programı kullanıldı. Verilerin gruplar arasında karşılaştırılmasında sırasında Kruskal-Wallis testi ve Mann-Whitney U testleri kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan sıçanların bazal vücut ağırlıkları gruplar arası benzer olduğu gibi çalışmanın sonunda da yine gruplar arası fark saptanmadı, 72. saatte tüm gruplarda benzer kilo kaybı izlendi.

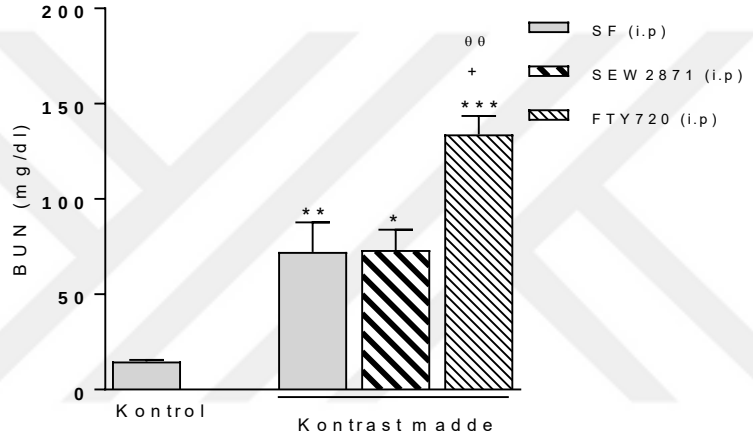
4.1. Çalışma Gruplarında Serum Kreatinin, Serum BUN ve 24 Saatlik İdrar Kreatinin Klirensi Değerleri

Bazal serum kreatinin ölçümlerinde gruplar arasında farklılık bulunmadı. Kontrast madde uygulaması ile kreatinin düzeyleri kontrol grubuna (0.25 ± 0.01 mg/dl) kıyasla kontrast grubunda (1.12 ± 0.34 mg/dl), SEW2871 grubunda (0.54 ± 0.08 mg/dl) ve FTY720 grubunda (2.28 ± 0.31 mg/dl) anlamlı şekilde arttı ($p<0.01$). FTY720 grubunda serum kreatinin değerleri kontrast grubundan anlamlı olarak yüksek olmasının ($p<0.05$) yanı sıra SEW2871 grubundan da anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.001$) (Şekil 4).



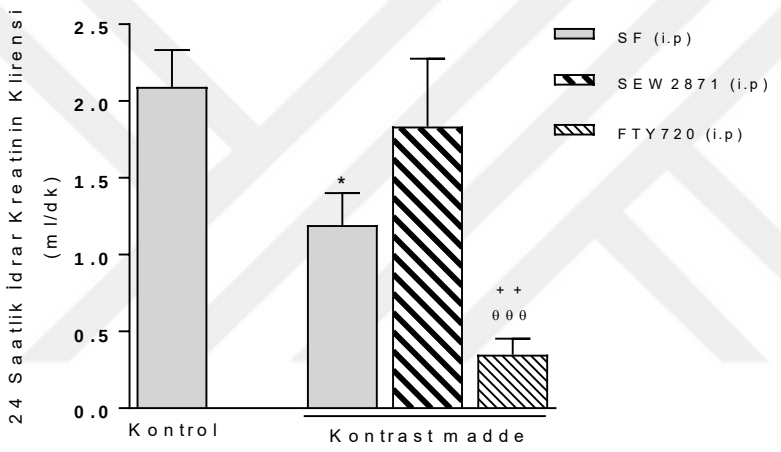
Şekil 4. Çalışma gruplarında deney sonunda serum kreatinin seviyeleri
** $p<0.01$ kontrol grubuna, $^{+}$ $p<0.05$ kontrast grubuna ve $^{\theta\theta}$ $p<0.001$ SEW2871 grubuna göre anlamlılık değerleridir

Bazal serum BUN ölçümlerinde gruplar arasında farklılık bulunmadı. Kontrast madde uygulaması ile serum BUN değerlerinin kontrol grubuna (14.6 ± 0.8 mg/dl) kıyasla kontrast grubunda (72.2 ± 15.6 mg/dl), SEW2871 grubunda (73.3 ± 10.6 mg/dl) ve FTY720 grubunda (134.0 ± 9.6 mg/dl) anlamlı şekilde arttığı gözlendi (sırasıyla; $p<0.01$, $p<0.05$, $p<0.001$). FTY720 grubu serum BUN değerleri kontrast grubundan anlamlı olarak yüksek olmasının ($p<0.05$) yanı sıra SEW2871 grubundan da anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.01$) (Şekil 5).



Şekil 5. Çalışma gruplarında deney sonunda serum BUN seviyeleri
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ kontrol grubuna, $^{+}$ $p<0.05$ kontrast grubuna ve $^{\theta\theta}$ $p<0.01$ SEW2871 grubuna göre anlamlılık değerleridir

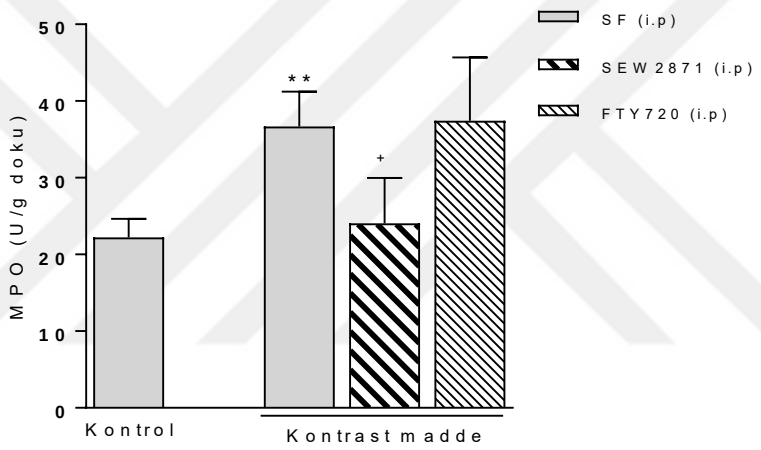
Deneyin sonunda hesaplanan 24 saatlik idrar kreatinin klirensi düzeylerine bakıldığında; kontrol grubuna (2.1 ± 0.2 ml/dk) kıyasla kontrast grubunun (1.2 ± 0.2 ml/dk) değerlerinin anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.01$). 24 saatlik idrar kreatinin klirensi düzeylerinin FTY720 grubunda (0.3 ± 0.1 ml/dk) SEW2871 grubundan (1.8 ± 0.4 ml/dk, $p<0.01$) ve kontrast grubundan (1.2 ± 0.2 ml/dk) anlamlı olarak düşük olduğu gözlendi ($p<0.01$) (Şekil 6).



Şekil 6. Çalışma gruplarında 24 saatlik idrar kreatinin klirensi seviyeleri
* $p<0.01$ kontrol grubuna, $^{++}$ $p<0.01$ kontrast grubuna ve $^{\theta\theta}$ $p<0.01$ SEW2871 grubuna göre anlamlılık değerleridir

4.2. Nötrofil İnfiltrasyonu, Oksidatif Stres ve Glutatyon Seviyeleri

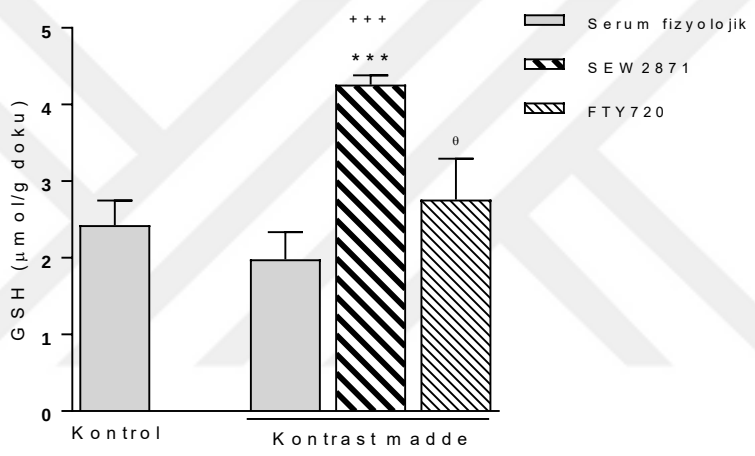
Nötrofil infiltrasyon belirteci olarak doku lizatlarında MPO aktivitesine baktığımızda kontrol grubuna (22.2 ± 2.4 U/g doku) kıyasla kontrast grubunun (36.7 ± 4.5 U/g doku) MPO değerlerinin anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi ($p<0.01$). Kontrast grubuna (36.7 ± 4.5 U/g doku) kıyasla ise SEW2871 grubu (24.1 ± 5.9 U/g doku) MPO değerlerinin anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edildi ($p<0.05$) (Şekil 7).



Şekil 7. Çalışma grubunda MPO aktivitesi düzeyleri

** $p<0.01$ kontrol grubuna ve $^{+}$ $p<0.05$ kontrast grubuna göre anlamlılık değerleridir

Çalışmamızda oksidatif stres belirteci olarak böbrek dokusunda GSH düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuna (2.42 ± 0.32 µmol/g doku) ve kontrast grubuna (1.98 ± 0.35 µmol/g doku) kıyasla SEW2871 grubunun (4.26 ± 0.53 µmol/g doku) GSH değerlerinin anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edildi (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.05$). SEW2871 grubuna (4.26 ± 0.53 µmol/g doku) kıyasla FTY720 grubunun (2.76 ± 0.53 µmol/g doku, $p<0.05$) GSH değerlerinin anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edildi (Şekil 8).

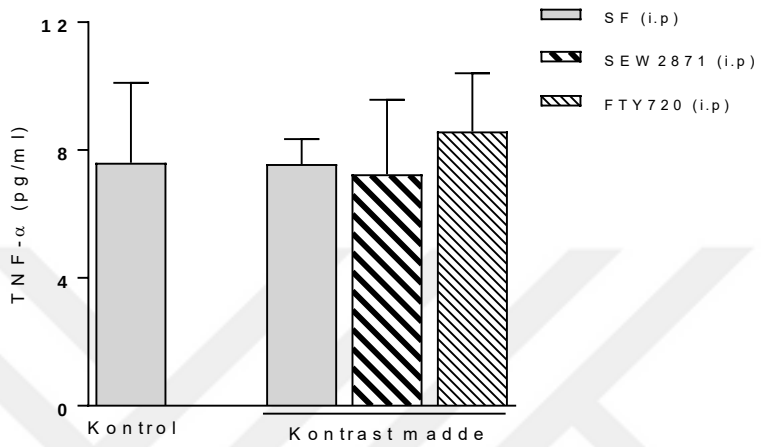


Şekil 8. Çalışma gruplarında GSH seviyeleri

*** $p<0.001$ kontrol grubuna, $^{+++}$ $p<0.05$ kontrast grubuna ve $^{\theta}$ $p<0.05$ SEW2871 grubuna göre anlamlılık değerleridir

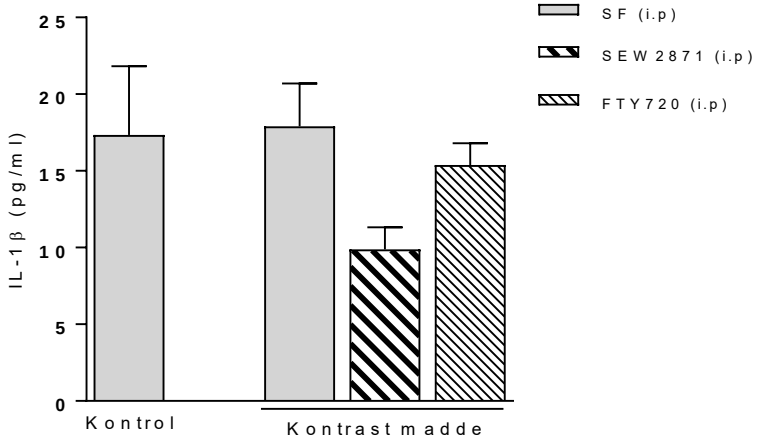
4.3. Çalışma Gruplarında Kan ve Doku Örneklerinde Sitokin Düzeyleri

Serum TNF-α düzeyleri kontrol (7.6 ± 2.5 pg/ml), kontrast (7.6 ± 0.8 pg/ml), SEW2871 (7.3 ± 2.3 pg/ml) ve FTY720 (8.6 ± 1.8 pg/ml) gruplarında benzer bulundu (şekil 9).



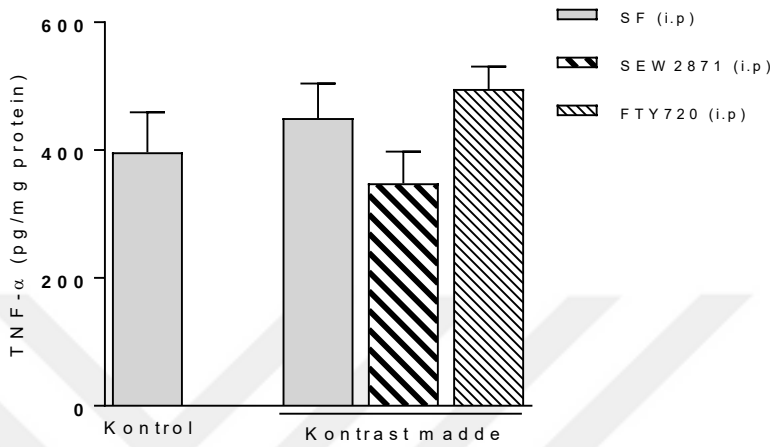
Şekil 9. Çalışma gruplarında serum TNF-α düzeyleri

Serum IL-1β düzeyleri kontrol (17.4 ± 4.5 pg/ml), kontrast (17.9 ± 2.8 pg/ml), SEW2871 (9.9 ± 1.4 pg/ml) ve FTY720 (15.4 ± 1.4 pg/ml) gruplarında birbirine yakın bulundu ve herhangi bir istatiksel fark elde edilmedi (Şekil 10).



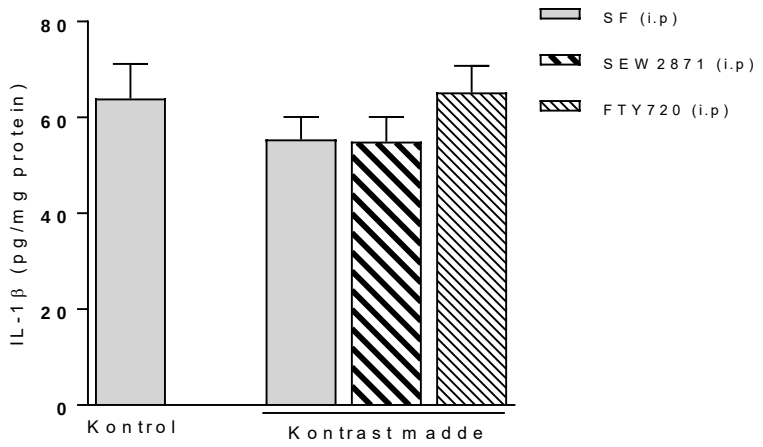
Şekil 10. Çalışma gruplarında serum IL-1β düzeyleri

Doku TNF-α düzeyleri kontrol (396.9 ± 62.4 pg/ml protein), kontrast (450.4 ± 53.7 pg/ml protein), SEW2871 (348.2 ± 49.6 pg/ml protein) ve FTY720 (495.6 ± 34.9 pg/ml protein) gruplarında benzerdi (Şekil 11).



Şekil 11. Çalışma gruplarında doku TNF-α düzeyleri

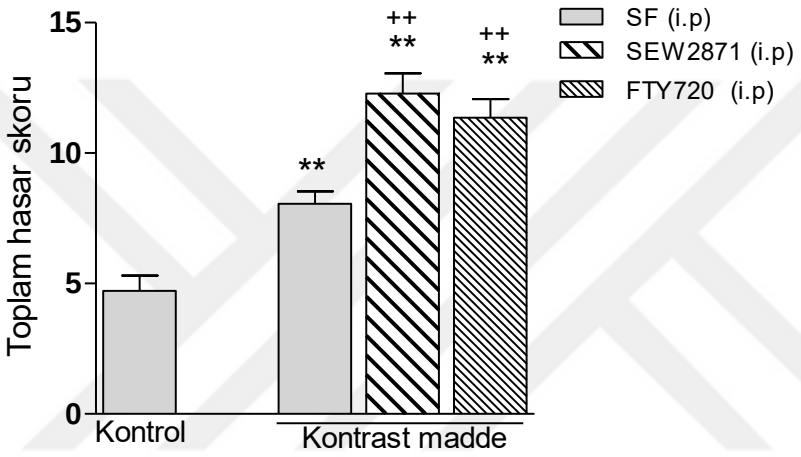
Doku IL-1β düzeyleri de kontrol (63.9 ± 7.2 pg/ml protein), kontrast (55.0 ± 4.6 pg/ml protein), SEW2871 (54.0 ± 5.1 pg/ml protein) ve FTY720 (65.2 ± 5.5 pg/ml protein) gruplarında benzerdi (Şekil 12).



Şekil 12. Çalışma gruplarında doku IL-1β düzeyleri

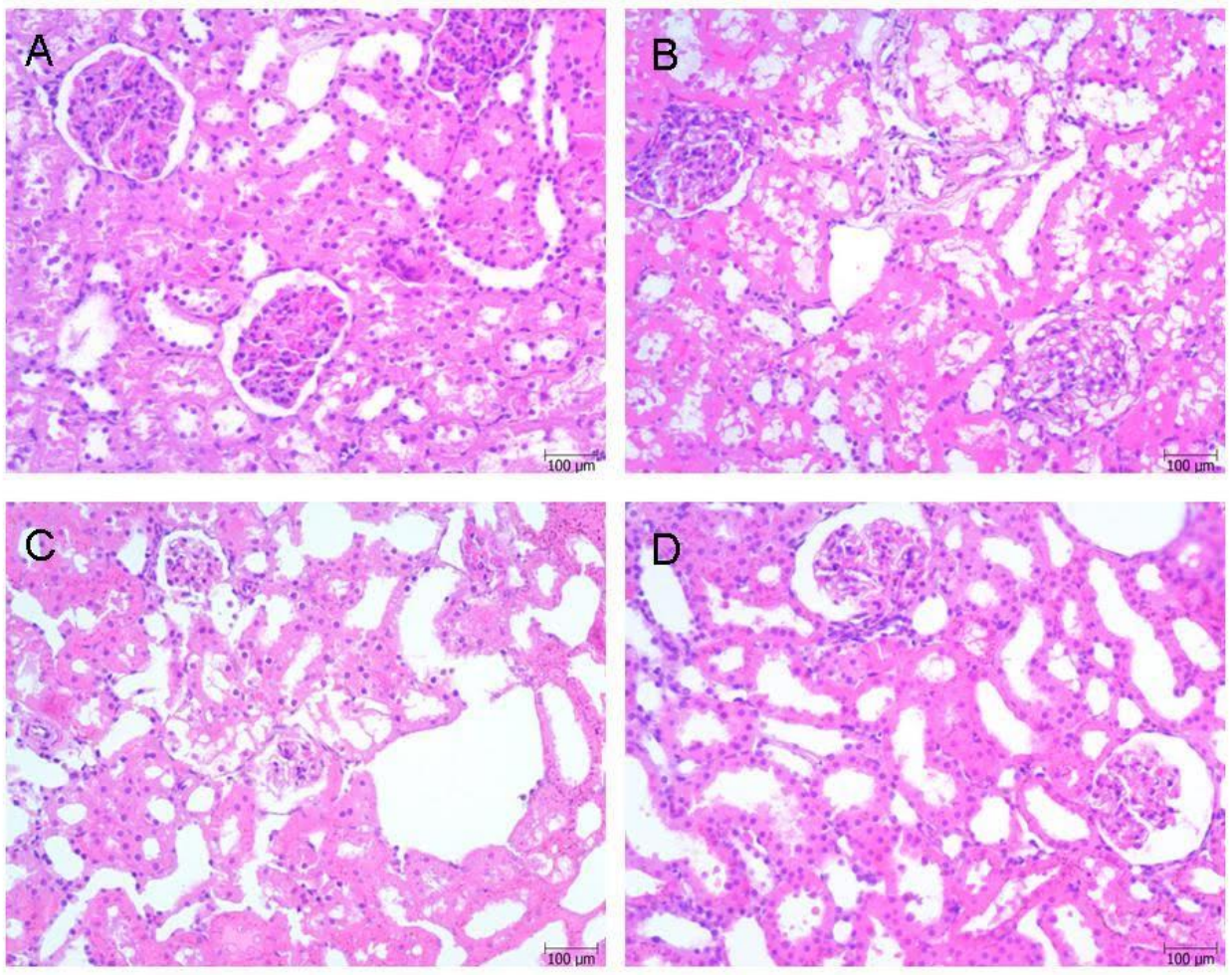
4.4. Çalışma Gruplarında Histolojik Skorlama

Kontrast madde uygulaması ile histolojik toplam hasar skoru kontrol grubuna (4.7 ± 0.6) kıyasla kontrast grubunda (8.1 ± 0.5), SEW2871 grubunda (12.3 ± 0.8) ve FTY720 grubunda (11.4 ± 0.7) anlamlı şekilde arttığı gözlendi (sırasıyla; $p<0.004$, $p<0.002$, $p<0.002$). Kontrast grubun kıyasla histolojik toplam hasar skoru SEW2871 grubunda ve FTY720 grubunda anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.004$) (Şekil 13).



Şekil 13. Çalışma gruplarında histolojik toplam hasar skoru

** $p<0.01$ kontrol grubuna ve $^{++}$ $p<0.01$ kontrast grubuna göre anlamlılık değerleridir



Şekil 14. Hematoksilen-eozin boyası ile boyanan kesitlerin ışık mikroskopisi değerlendirilmesi 20X. **(A)** kontrol grubunda hafif derecede **(B)** kontrast, **(C)** SEW2871 ve **(D)** FTY720 gruplarında ağır derecede tübüler hasar, medüller konjesyon, interstisyel ödem, tübüler protein kastları, tübüler dilatasyon ve glomerüler dejenerasyon izlendi

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada deneysel kontrast nefropatisi modelinde sfingozin-1 fosfat reseptör agonistleri (SEW2871 ve FTY720) kullanımının kontrast nefropatisi gelişimini önlemedeki etkinliği araştırılmıştır. Bilgilerimiz dahilide literatürde bu maddelerin kontrast nefropatisi gelişiminde etkinliğini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Sağlıklı insanlarda olduğu gibi, deneysel modellerde de predispozan bir faktör taşımayan hayvanlarda tek başına kontrast madde vermek nefropatiye yol açmamaktadır (177). Kontrast madde vermeden önce predispozisyon için sıçanları belirli bir süre dehidrate bırakmak ve/veya furosemid enjekte etmek ve/veya tek taraflı nefrektomi yapmakla bile nefropatinin çok zor sağlandığı, hatta bazı çalışmalarda sağlanamadığı görülmüştür (95, 96). 5/6 nefrektomi modeli kullanarak yaptığımız ön deneylerde literatürde belirtilen dozlarda kontrast madde (6 ve 8 ml/kg) ve predispozisyon için de furosemid (10 mg/kg) ve 24 saatlik dehidretasyon yöntemlerine rağmen kontrast nefropatisinin gelişmediği görüldü. Bunun üzerine Agmon ve ark. tarafından tanımlanan akut kontrast modelini kullandık. Bu modelde NSAİİ ve L-NAME ile sırasıyla PG ve NO sentezi baskılanırsa kontrast nefropatisi için bir predispozisyon sağlanmış olur. Agmon ve ark. (97) bu yorumdan hareket ederek oldukça başarılı bir kontrast nefropatisi modeli oluşturmuştur. Bu modelde predispozisyon için INDO (10 mg/kg) ve L-NAME (10 mg/kg) i.v olarak verildiğinde de kontrast nefropatisi geliştiği bir çok kez gösterilmiştir (97-99).

Kontrast nefropatisi dışı çeşitli akut böbrek modellerinde S1P reseptör agonistlerinin uygulanmasının böbrek fonksiyonları üzerine koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir. SEW2871; renal IRH ile indüklenen nefropati modelleri (15, 172, 174, 178) üzerinde etkileri araştırılmış olup biyokimyasal ve histopatolojik olarak böbrekler üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. FTY720 ise; Sisplatin ile indüklenen nefropati (179), KBY'de renal fibrozis (172), renal transplant renal iskemi reperfüzyon hasarı (180), diyabetik nefropati (181) ve renal IRH ile indüklenen nefropati modelleri (15, 172, 174) üzerinde etkileri araştırılmış olup biyokimyasal ve histopatolojik olarak böbrekler üzerinde koruyucu etkilerinin

olduğu gösterilmiştir. Söz konusu etkilerin de SEW2871 ve FTY720 tedavileri $S1P_{1,3}$ reseptör antagonisti olan VPC11446 ile kombine edildiğinde olumlu etkilerin tersine döndüğü görülmüştür.

Çalışmamızda ise deney sonunda bakılan serum BUN ve serum kreatinin düzeylerinin kontrast grubuna nazaran SEW2871 grubunda düşük olmakla birlikte istatistiksel anlama ulaşmadığı görüldü. FTY720 grubunda ise kontrast grubuna kıyasla daha da fazla bozulmalar gözlendi. 24 saatlik idrar kreatinin klirensi seviyelerine baktığımızda kontrast grubuna kıyasla SEW2871 grubunun değerlerinin yüksek olduğu saptandı, ancak bu yükseklik istatiksel olarak anlamlı değildi. FTY720 grubunda ise kontrast grubuna nazaran belirgin olarak daha da düşük olduğu görüldü.

Kontrol grubuna kıyasla SEW2871 grubunda ve FTY720 grubunda tübüler hasar, medüller konjesyon, interstisyel ödem, tübüler dilatasyon, tübüler protein kastları ve glomerüler dejenerasyon skorları anlamlı oranda yüksekti. Tüm bu veriler, SEW2871 10 mg/kg dozunda kontrast nefropatisi için biyokimyasal olarak olası koruyucu etki sağladığı ancak histopatolojik olarak kötüleştirici etki yaptığını düşündürmüştür. FTY720 ise 250 µg/kg dozunda kontrast nefropatisi için biyokimyasal ve histopatolojik olarak kötüleştirici etki yaptığını düşündürmüştür.

Çalışmamızda da literatür bulguları ile uyumlu olarak SEW2871 tedavisi alan gruplarda MPO düzeylerinin kontrol grubuna yakın düzeylerde olduğu görüldü. Literatürdeki renal IRH'nda nötrofil ve makrofajların dokulara infiltrasyonunu gösteren bir parametre olarak MPO aktivitesinin üzerinde SEW2871'in etkisi değerlendirilmiştir. Amandeep ve ark. (178) $S1P_1$ reseptör agonisti aktivasyonu ile renal IRH'nda böbrek proksimal tübülün koruduğu gösteren çalışmalar yapmıştır. Renal IRH sonrası MPO aktivitesinde anlamlı bir yükselme olduğu görülmüştür, koruyucu ajan olarak SEW2871 eklendiğinde ise MPO aktivitesinin anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (178). Aynı çalışmada SEW2871 ve VPC44116 kombine olarak verildiğinde MPO değerlerinin arttığı tespit edilmiştir. Bu sağlanan tüm koruyucu etkiler S1P'ın, $S1P_1$ resepörü üzerinden olduğunu göstermektedir. Başka yapılan benzer bir çalışmada da benzer etkiler elde edilmiştir (15).

Amandeep ve ark. (178) yaptıkları renal IRH'nda böbrek MPO aktivitesinin FTY720 ile anlamlı bir şekilde düzeldiğini saptamıştır. Amandeep ve ark. yaptıkları bir başka çalışmada da sisplatin ile uyarılmış renal tübüler hasarı modelinde FTY720'nin etkilerini araştırmışlardır. FTY720'nin sisplatin toksisitesi nedeniyle dış renal medulladaki nötrofil infiltrasyonunu azalttığını göstermiştir (179). Alaa S. ve ark. sıçanlarda yaptıkları deneyde renal IRH'nda S1P reseptör agonistlerinin rolünü incelemiştir. Renal IRH sonrasında böbrek dokusunda MPO aktivitesinde belirgin artış gözlenmiştir. FTY720 eklendiğinde ise MPO aktivitesinin anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Aynı çalışmada FTY720 ile sağlanan MPO aktivitesindeki azalma, VPC44116 verildiğinde ise tersine dönmektedir. Bu sağlanan tüm koruyucu etkilerin S1P'ın $S1P_1$ reseptörü üzerinden olduğu anlaşılmaktadır. Çeşitli nefropati modellerinde de FTY720'nin MPO aktivitesini azaltığı tespit edilmişken (178, 179) bizim çalışmamızdaki kontrast nefropatisi modelinde, FTY720 için böyle bir etki gözlenmedi.

Çalışmamızda SEW2871 alan gruplarda GSH düzeylerinin kontrol ve kontrast grubuna göre daha yüksek olduğu bulundu. Bu bulgu literatürdeki bulgularla benzerdir. Ancak söz konusu etkiler FTY720 uygulaması ile elde edilemedi. Kontrast maddelerin antioksidan enzim aktivitesini azalttığı, ROT vasıtasıyla direk toksik etki gösterdiği bilinmektedir (9, 182). İlk ve temel antioksidan savunma ise enzimatik yollarla yapılmakta olup en önemli intrasellüler enzimlerin; SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz olduğu bilinmektedir (183). Literatürdeki birçok çalışmada nefrotoksik ajanlarla oksidatif stres arasındaki ilişki ve bu ilişkiye SEW2871 ve FTY72 etkisi, SOD üzerinden değerlendirilmiştir. Amandeep ve ark. tarafından oluşturulan renal IRH modelinde; böbrek dokusunda hipoksi/re-oksijenasyonu ile uyarılan apoptozun arttığı tespit edilmiştir. Koruyucu ajan olarak SEW2871 ve FTY720 verildiğinde ise IRH sonrası oluşan hipoksi/re-oksijenasyonu ile uyarılan apoptozun azaldığı tespit edilmiştir. Ancak VPC44116 verildiğinde ise bu etkiler tersine dönmektedir (178). Hongmei ve ark. sıçanlarda yaptıkları deneyde otizm sıçan modelinde duyma ,hafıza ve nöron kaybı üzerinde FTY720'nin etkilerini incelemişlerdir, deneyin sonunda hippokampusta düşük ölçülen GSH düzeylerinin, FTY720 eklendiğinde ise anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür (184).

TNF-α, inflamasyonun ana sitokini olup dokuların yıkımı ve şekillenmesinde etkilidir (185). TNF-α, hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücre içinde yer alan çok sayıda sinyal ileti mekanizmasını tetikler ve sonuçta apoptoz, nekroz, anjiyogenez, hücre aktivasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonunu uyarır (186) . Yapılan deneysel çalışmalarda FTY720'nin; sisplatine sekonder gelişen akut tübüler hasarı azalttığı bulunmuştur ve bu etkisininde proinflamatuar etkileri bilinen sitokinler (TNF-α ve IL-1β) üzerinden gerçekleştiği ileri sürülmüştür (179). Başka bir çalışmada da renal transplant renal iskemi reperfüzyon hasarı modelinde TNF-α gen ekspresyonunu azaltarak renal reperfüzyon hasarını azalttığı saptanmıştır (180). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ile indüklenen IL-1β ve TNF-α sitokinlerin bir çalışmada FTY720 ile doza bağımlı olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (187).

Alaa S. ve ark. yaptıkları diyabetik nefropatisi modelinde SEW 2871 ve FTY720'nin kronik aktivasyon ile üriner TNF-α gen ekspresyonunu azalttığı göstermiştir (181). Çalışmamızda ise SEW2871 ve FTY720 gruplarındaki doku ve serum TNF-α ve IL-1β düzeylerinde kontrol grubuna göre fark olmadığı gözlendi. Bu durum literatürdeki diğer çalışmalarda gözlenen SEW2871 ve FTY720'nin TNF-α ve IL-1β gen ekspresyonunu inhibe edici etkisiyle parelel yönde değildir. Çalışmamızda doku ve serum sitokin seviyelerinin kontrol grubu ile benzer olması kontrast madde verdiğimiz her üç grupta da PG inhibitörü olan INDO kullanmamızdan kaynaklanmış olabilir.

Sonuç olarak; günlük pratikte sıkça kullanılan kontrast maddelerin nefrotoksik etkilerinin önlenmesi güncel araştırma konularından birini teşkil etmektedir. Yaptığımız bu deneysel çalışmayla anti-inflamatuar, anti-oksidan özelliklere sahip olduğu bilinen S1P reseptör (SEW2871 ve FTY720) agonistlerinin kontrast nefropatisi gelişimini önleyip önlemeyeceği biyokimyasal ve histopatolojik veriler eşliğinde ilk kez araştırılmıştır. SEW2871'in kontrast nefropatisini bir miktar da olsa azaltıcı etkisi biyokimyasal veriler eşliğinde ilk kez gösterilmiştir. Ancak FTY720 ile benzer etki gözlenmemiştir. SEW2871 kontrast madde profilaksisindeki etkinliğinin ve uygun doz aralığının belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. American Journal of Kidney Diseases. 2002;39(5):930-6.
2. Abularrage-CJ PV, Conrad M, Cambria R, Kwolek C, AbuRahma-AF CJ, Mousa A, et al. Index to Volume 54. artery. 2011;54:1151-3.
3. McCullough PA, Wolyn R, Rocher LL, Levin RN, O'Neill WW. Acute renal failure after coronary intervention: incidence, risk factors, and relationship to mortality. The American journal of medicine. 1997;103(5):368-75.
4. Barrett BJ, Parfrey PS. Preventing nephropathy induced by contrast medium. New England Journal of Medicine. 2006;354(4):379-86.
5. Persson P, Tepel M. Contrast medium-induced nephropathy: the pathophysiology. Kidney international. 2006;69:S8-S10.
6. Taylor AJ, Hotchkiss D, Morse RW, McCabe J. PREPARED: Preparation for Angiography in Renal Dysfunction: a randomized trial of inpatient vs outpatient hydration protocols for cardiac catheterization in mild-to-moderate renal dysfunction. Chest. 1998;114(6):1570-4.
7. Detrenis S, Meschi M, Musini S, Savazzi G. Lights and shadows on the pathogenesis of contrast-induced nephropathy: state of the art. Nephrology Dialysis Transplantation. 2005;20(8):1542-50.
8. Pannu N, Manns B, Lee H, Tonelli M. Systematic review of the impact of N-acetylcysteine on contrast nephropathy. Kidney international. 2004;65(4):1366-74.
9. Itoh Y, Yano T, Sendo T, Oishi R. Clinical and experimental evidence for prevention of acute renal failure induced by radiographic contrast media. Journal of pharmacological sciences. 2005;97(4):473-88.
10. Wang F, Van Brocklyn JR, Hobson JP, Movafagh S, Zukowska-Grojec Z, Milstien S, et al. Sphingosine 1-Phosphate Stimulates Cell Migration through a Gi-coupled Cell Surface Receptor POTENTIAL INVOLVEMENT IN ANGIOGENESIS. Journal of Biological Chemistry. 1999;274(50):35343-50.
11. von Otte S, Paletta JR, Becker S, König S, Fobker M, Greb RR, et al. Follicular fluid high density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate is a

novel mediator of ovarian angiogenesis. Journal of Biological Chemistry. 2006;281(9):5398-405.

12. Kluk MJ, Hla T. Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2002;1582(1):72-80.

13. Li L, Okusa MD. Blocking the immune response in ischemic acute kidney injury: the role of adenosine 2A agonists. Nature Clinical Practice Nephrology. 2006;2(8):432-44.

14. Lai L-W, Yong K-C, Igarashi S, Lien Y-H. A sphingosine-1-phosphate type 1 receptor agonist inhibits the early T-cell transient following renal ischemia–reperfusion injury. Kidney international. 2007;71(12):1223-31.

15. Awad AS, Ye H, Huang L, Li L, Foss FW, Macdonald TL, et al. Selective sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in mouse kidney. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 2006;290(6):F1516-F24.

16. Waybill MM, Waybill PN. Contrast media-induced nephrotoxicity: identification of patients at risk and algorithms for prevention. Journal of Vascular and Interventional Radiology. 2001;12(1):3-9.

17. Benko A, Fraser-Hill M, Magner P, Capusten B. Canadian Association of Radiologists: consensus guidelines for the prevention of contrast-induced nephropathy. Canadian Association of Radiologists Journal. 2007;58(2):79.

18. Pannu N, Wiebe N, Tonelli M, Network AKD. Prophylaxis strategies for contrast-induced nephropathy. Jama. 2006;295(23):2765-79.

19. Dirkes S. Acute kidney injury: not just acute renal failure anymore? Critical care nurse. 2011;31(1):37-50.

20. Meyrier A, editor Nephrotoxicity of iodine contrast media. Annales de radiologie; 1993.

21. Wong PCY, Li Z, Guo J, Zhang A. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. International journal of cardiology. 2012;158(2):186-92.

22. Chang C-F, Lin C-C. Current concepts of contrast-induced nephropathy: a brief review. Journal of the Chinese Medical Association. 2013;76(12):673-81.

23. Manske CL, Sprafka JM, Strony JT, Wang Y. Contrast nephropathy in

azotemic diabetic patients undergoing coronary angiography. The American journal of medicine. 1990;89(5):615-20.

24. Parfrey PS, Griffiths SM, Barrett BJ, Paul MD, Genge M, Withers J, et al. Contrast material-induced renal failure in patients with diabetes mellitus, renal insufficiency, or both. New England Journal of Medicine. 1989;320(3):143-9.

25. Rich MW, Crecelius CA. Incidence, risk factors, and clinical course of acute renal insufficiency after cardiac catheterization in patients 70 years of age or older: a prospective study. Archives of Internal Medicine. 1990;150(6):1237-42.

26. Mehran R, Aymong ED, Nikolsky E, Lasic Z, Iakovou I, Fahy M, et al. A simple risk score for prediction of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention: development and initial validation. Journal of the American College of Cardiology. 2004;44(7):1393-9.

27. Parfrey P. The clinical epidemiology of contrast-induced nephropathy. Cardiovascular and interventional radiology. 2005;28(2):S3-S11.

28. Reed M, Meier P, Tamhane UU, Welch KB, Moscucci M, Gurm HS. The relative renal safety of iodixanol compared with low-osmolar contrast media: a meta-analysis of randomized controlled trials. JACC: Cardiovascular Interventions. 2009;2(7):645-54.

29. McClennan B. Low-osmolality contrast media: premises and promises. Radiology. 1987;162(1):1-8.

30. Solomon RJ, Mehran R, Natarajan MK, Doucet S, Katholi RE, Staniloae CS, et al. Contrast-induced nephropathy and long-term adverse events: cause and effect? Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2009;4(7):1162-9.

31. Tao SM, Wichmann JL, Schoepf UJ, Fuller SR, Lu GM, Zhang LJ. Contrast-induced nephropathy in CT: incidence, risk factors and strategies for prevention. European radiology. 2016;26(9):3310-8.

32. Heyman SN, Reichman J, Brezis M. Pathophysiology of radiocontrast nephropathy: a role for medullary hypoxia. Investigative radiology. 1999;34(11):685.

33. Fujisaki K, Kubo M, Masuda K, Tokumoto M, Hirakawa M, Ikeda H, et al. Infusion of radiocontrast agents induces exaggerated release of urinary endothelin in patients with impaired renal function. Clinical and experimental nephrology. 2003;7(4):279-83.

34. Cantley LG, Spokes K, Clark B, McMahon EG, Carter J, Epstein FH. Role of endothelin and prostaglandins in radiocontrast-induced renal artery constriction. Kidney international. 1993;44(6):1217-23.

35. Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP, Schnermann J. Vasomotor effects of purinergic agonists in isolated rabbit afferent arterioles. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 1992;263(6):F1026-F33.

36. Heyman S, Rosen S, Brezis M. Radiocontrast nephropathy: a paradigm for the synergism between toxic and hypoxic insults in the kidney. Experimental nephrology. 1994;2(3):153.

37. Spargias K, Adreanides E, Demerouti E, Gkouziouta A, Manginas A, Pavlides G, et al. Iloprost prevents contrast-induced nephropathy in patients with renal dysfunction undergoing coronary angiography or intervention. Circulation. 2009;120(18):1793-9.

38. Myers SI, Wang L, Liu F, Bartula LL. Iodinated contrast induced renal vasoconstriction is due in part to the downregulation of renal cortical and medullary nitric oxide synthesis. Journal of vascular surgery. 2006;44(2):383-91.

39. Cronin RE. Contrast-induced nephropathy: pathogenesis and prevention. Pediatric Nephrology. 2010;25(2):191-204.

40. Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S. Regional alterations in renal haemodynamics and oxygenation: a role in contrast medium-induced nephropathy. Nephrology Dialysis Transplantation. 2005;20(suppl 1):i6-i11.

41. Schiantarelli P, Peroni F, Tirone P, Rosati G. Effects of Iodinated Contrast Media on Erythrocytes: I. Effects of Canine Erythrocytes on Morphology. Investigative radiology. 1973;8(4):199-204.

42. Dawson P. Cardiovascular effects of contrast agents. The American journal of cardiology. 1989;64(9):E2-E9.

43. Neagley SR, Vought MB, Weidner WA, Zwillich CW. Transient oxygen desaturation following radiographic contrast medium administration. Archives of internal medicine. 1986;146(6):1094-7.

44. Kim S-j, Salem M, Joseph N, Madayag M, Cavallino R, Crystal G. Contrast Media Adversely Affect Oxyhemoglobin Dissociation. Survey of Anesthesiology. 1991;35(1):52.

45. Schick CS, Haller C. Comparative cytotoxicity of ionic and non-ionic radiocontrast agents on MDCK cell monolayers in vitro. Nephrology Dialysis Transplantation. 1999;14(2):342-7.
46. Duan S, Zhou X, Liu F, Peng Y, Chen Y, Pei Y, et al. Comparative cytotoxicity of high-osmolar and low-osmolar contrast media on HKCs in vitro. Journal of nephrology. 2006;19(6):717.
47. Hardiek K, Katholi RE, Ramkumar V, Deitrick C. Proximal tubule cell response to radiographic contrast media. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 2001;280(1):F61-F70.
48. Pflueger A, Larson TS, Nath KA, King BF, Gross JM, Knox FG, editors. Role of Adenosine in Contrast Media—Induced Acute Renal Failure in Diabetes Mellitus. Mayo Clinic Proceedings; 2000: Elsevier.
49. Andersen K-J, Christensen EI, Vik H. Effects of iodinated x-ray contrast media on renal epithelial cells in culture. Investigative radiology. 1994;29(11):955-62.
50. Romano G, Briguori C, Quintavalle C, Zanca C, Rivera NV, Colombo A, et al. Contrast agents and renal cell apoptosis. European heart journal. 2008.
51. Bakris GL, Lass N, Gaber AO, Jones JD, Burnett JC. Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 1990;258(1):F115-F20.
52. Pflueger A, Abramowitz D, Calvin AD. Role of oxidative stress in contrast-induced acute kidney injury in diabetes mellitus. Medical Science Monitor. 2009;15(6):RA125-RA36.
53. Birck R, Krzossok S, Markowetz F, Schnülle P, van der Woude FJ, Braun C. Acetylcysteine for prevention of contrast nephropathy: meta-analysis. The Lancet. 2003;362(9384):598-603.
54. Neumayer H-H, Junge W, Küfner A, Wenning A. Prevention of radiocontrast-media-induced nephrotoxicity by the calcium channel blocker nitrendipine: a prospective randomised clinical trial. Nephrology Dialysis Transplantation. 1989;4(12):1030-6.
55. Yang D, Yang D, Jia R, Tan J. Na+/Ca2+ exchange inhibitor, KB-R7943, attenuates contrast-induced acute kidney injury. Journal of nephrology.

2013;26(5):877-85.

56. Karstoft J, Bååth L, Jansen I, Edvinsson L. Vasoconstriction of isolated arteries induced by angiographic contrast media: A comparison of ionic and non-ionic contrast media iso-osmolar with plasma. Acta Radiologica. 1995;36(3):312-6.

57. Bagnis C, Idee JM, Dubois M. Role of Endothelium-derived Nitric Oxide-endothelin Balance in Contrast Medium-induced Acute Renal Vasoconstriction in Dogs. Journal of Vascular & Interventional Radiology. 1998;9(3):529.

58. Wilson DR, Arnold PE, Burke TJ, Schrier RW. Mitochondrial calcium accumulation and respiration in ischemic acute renal failure in the rat. Kidney international. 1984;25(3):519-26.

59. Yang D, Yang D, Jia R, Lin S. Effects of selective inhibition of reverse mode of Na (+)/Ca (2+) exchanger on rats with contrast-induced acute kidney injury. Zhonghua yi xue za zhi. 2013;93(22):1750-4.

60. Lameire NH. Contrast-induced nephropathy—prevention and risk reduction. Nephrology Dialysis Transplantation. 2006;21(suppl 1):i11-i23.

61. Nawaz S, Cleveland T, Gaines P, Chan P. Clinical risk associated with contrast angiography in metformin treated patients: a clinical review. Clinical radiology. 1998;53(5):342-4.

62. McCullough PA, Bertrand ME, Brinker JA, Stacul F. A meta-analysis of the renal safety of isosmolar iodixanol compared with low-osmolar contrast media. Journal of the American College of Cardiology. 2006;48(4):692-9.

63. McCullough PA, Brown JR. Effects of intra-arterial and intravenous iso-osmolar contrast medium (iodixanol) on the risk of contrast-induced acute kidney injury: a meta-analysis. Cardiorenal medicine. 2011;1(4):220-34.

64. Erley C. Does hydration prevent radiocontrast-induced acute renal failure? Nephrology Dialysis Transplantation. 1999;14(5):1064-6.

65. Weisbord SD, Palevsky PM. Prevention of contrast-induced nephropathy with volume expansion. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2008;3(1):273-80.

66. Zoungas S, Ninomiya T, Huxley R, Cass A, Jardine M, Gallagher M, et al. Systematic review: sodium bicarbonate treatment regimens for the prevention of contrast-induced nephropathy. Annals of internal medicine. 2009;151(9):631-8.

67. Trivedi H, Nadella R, Szabo A. Hydration with sodium bicarbonate for the prevention of contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of randomized controlled trials. 2010.
68. Kanbay M, Covic A, Coca SG, Turgut F, Akcay A, Parikh CR. Sodium bicarbonate for the prevention of contrast-induced nephropathy: a meta-analysis of 17 randomized trials. International urology and nephrology. 2009;41(3):617-27.
69. Kunadian V, Zaman A, Spyridopoulos I, Qiu W. Sodium bicarbonate for the prevention of contrast induced nephropathy: a meta-analysis of published clinical trials. European journal of radiology. 2011;79(1):48-55.
70. From AM, Bartholmai BJ, Williams AW, Cha SS, Pflueger A, McDonald FS. Sodium bicarbonate is associated with an increased incidence of contrast nephropathy: a retrospective cohort study of 7977 patients at mayo clinic. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2008;3(1):10-8.
71. Subramaniam RM, Suarez-Cuervo C, Wilson RF, Turban S, Zhang A, Sherrod C, et al. Effectiveness of Prevention Strategies for Contrast-Induced NephropathyA Systematic Review and Meta-analysisEffectiveness of Prevention Strategies for CIN. Annals of internal medicine. 2016;164(6):406-16.
72. Briguori C, Colombo A, Violante A, Balestrieri P, Manganelli F, Elia PP, et al. Standard vs double dose of N-acetylcysteine to prevent contrast agent associated nephrotoxicity. European Heart Journal. 2004;25(3):206-11.
73. Safirstein R, Andrade L, Vieira JM. Acetylcysteine and nephrotoxic effects of radiographic contrast agents—a new use for an old drug. Mass Medical Soc; 2000.
74. Tepel M, Van Der Giet M, Schwarzfeld C, Laufer U, Liermann D, Zidek W. Prevention of radiographic-contrast-agent–induced reductions in renal function by acetylcysteine. New England Journal of Medicine. 2000;343(3):180-4.
75. Marenzi G, Assanelli E, Marana I, Lauri G, Campodonico J, Grazi M, et al. N-acetylcysteine and contrast-induced nephropathy in primary angioplasty. New England Journal of Medicine. 2006;354(26):2773-82.
76. Trivedi H, Daram S, Szabo A, Bartorelli AL, Marenzi G. High-dose N-acetylcysteine for the prevention of contrast-induced nephropathy. The American journal of medicine. 2009;122(9):874. e9-. e15.
77. Briguori C, Visconti G, Focaccio A, Airoldi F, Valgimigli M, Sangiorgi GM,

et al. Renal insufficiency after contrast media administration trial II (REMEDIAL II). Circulation. 2011:CIRCULATIONAHA. 111.030759.

78. Ozcan EE, Guneri S, Akdeniz B, Akyıldız İZ, Senaslan O, Baris N, et al. Sodium bicarbonate, N-acetylcysteine, and saline for prevention of radiocontrast-induced nephropathy. A comparison of 3 regimens for protecting contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary procedures. A single-center prospective controlled trial. American heart journal. 2007;154(3):539-44.

79. Investigators A. Acetylcysteine for prevention of renal outcomes in patients undergoing coronary and peripheral vascular angiography main results from the randomized Acetylcysteine for Contrast-Induced Nephropathy Trial (ACT). Circulation. 2011;124(11):1250-9.

80. Briguori C, Marenzi G. Contrast-induced nephropathy: pharmacological prophylaxis. Kidney International. 2006;69:S30-S8.

81. Solomon R, Werner C, Mann D, D'elia J, Silva P. Effects of saline, mannitol, and furosemide on acute decreases in renal function induced by radiocontrast agents. New England Journal of Medicine. 1994;331(21):1416-20.

82. Majumdar SR, Kjellstrand CM, Tymchak WJ, Hervas-Malo M, Taylor DA, Teo KK. Forced euvolemic diuresis with mannitol and furosemide for prevention of contrast-induced nephropathy in patients with CKD undergoing coronary angiography: a randomized controlled trial. American Journal of Kidney Diseases. 2009;54(4):602-9.

83. Weisberg LS, Kurnik PB, Kurnik BR. Risk of radiocontrast nephropathy in patients with and without diabetes mellitus. Kidney international. 1994;45(1):259-65.

84. Pappy R, Stavrakis S, Hennebry TA, Abu-Fadel MS. Effect of statin therapy on contrast-induced nephropathy after coronary angiography: a meta-analysis. International journal of cardiology. 2011;151(3):348-53.

85. Barbieri L, Verdoia M, Schaffer A, Nardin M, Marino P, De Luca G. The role of statins in the prevention of contrast induced nephropathy: a meta-analysis of 8 randomized trials. Journal of thrombosis and thrombolysis. 2014;38(4):493-502.

86. Lee JM, Park J, Jeon K-H, Jung J-h, Lee SE, Han J-K, et al. Efficacy of short-term high-dose statin pretreatment in prevention of contrast-induced acute kidney injury: updated study-level meta-analysis of 13 randomized controlled trials. PloS

one. 2014;9(11):e111397.

87. Li J-H, He N-S. Prevention of iodinated contrast-induced nephropathy. Chinese medical journal. 2011;124(23):4079-82.

88. Michishita I, Fujii Z. A novel contrast removal system from the coronary sinus using an adsorbing column during coronary angiography in a porcine model. Journal of the American College of Cardiology. 2006;47(9):1866-70.

89. Danenberg HD, Lotan C, Varshitski B, Rosenheck S, Weiss AT. Removal of contrast medium from the coronary sinus during coronary angiography: feasibility of a simple and available technique for the prevention of nephropathy. Cardiovascular Revascularization Medicine. 2008;9(1):9-13.

90. Deray G. Dialysis and iodinated contrast media. Kidney international. 2006;69:S25-S9.

91. Cruz DN, Perazella MA, Bellomo R, Corradi V, de Cal M, Kuang D, et al. Extracorporeal blood purification therapies for prevention of radiocontrast-induced nephropathy: a systematic review. American journal of kidney diseases. 2006;48(3):361-71.

92. Kim IY, Lee SB, Lee DW, Song SH, Seong EY, Kwak IS. Long-term effect of radiocontrast-enhanced computed tomography on the renal function of chronic kidney disease patients. Clinical and experimental nephrology. 2012;16(5):755-9.

93. Yenicerioglu Y, Yilmaz O, Sarioglu S, Ormen M, Akan P, Celik A, et al. Effects of N-acetylcysteine on radiocontrast nephropathy in rats. Scandinavian journal of urology and nephrology. 2006;40(1):63-9.

94. Ozkan G, Ulusoy S, Orem A, Ersoz S, Alkanat M, Yucesan FB, et al. Protective effect of the grape seed proanthocyanidin extract in a rat model of contrast-induced nephropathy. Kidney and Blood Pressure Research. 2012;35(6):445-53.

95. Parvez Z, Rahman MA, Moncada R. Contrast media-induced lipid peroxidation in the rat kidney. Investigative radiology. 1989;24(9):697-702.

96. Sun S, Zhang T, Nie P, Hu L, Yu Y, Cui M, et al. A novel rat model of contrast-induced acute kidney injury. International journal of cardiology. 2014;172(1):e48-e50.

97. Agmon Y, Peleg H, Greenfeld Z, Rosen S, Brezis M. Nitric oxide and

prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. Journal of Clinical Investigation. 1994;94(3):1069.

98. Ari E, Yilmaz Y, Kedrah AE, Alahdab Y, Cakalagaoglu F, Arikan H, et al. Protective effect of the vasopressin agonist terlipressin in a rat model of contrast-induced nephropathy. American journal of nephrology. 2011;33(3):269-76.

99. Toprak O, Cirit M, Tanrisev M, Yazici C, Canoz O, Sipahioglu M, et al. Preventive effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats. Nephrology Dialysis Transplantation. 2008;23(3):853-9.

100. Goldfarb M, Rosenberger C, Shina A, Rosen S, Heyman SN. A role for erythropoietin in the attenuation of radiocontrast-induced acute renal failure in rats. Renal failure. 2006;28(4):345-50.

101. Pollock DM, Polakowski JS, Wegner CD, Opgenorth TJ. Beneficial effect of ETA receptor blockade in a rat model of radiocontrast-induced nephropathy. Renal failure. 1997;19(6):753-61.

102. Kedrah AE, Ari E, Alahdab Y, Gul CB, Macunluoglu B, Atakan A, et al. Effect of the direct renin inhibitor aliskiren in the prevention of experimental contrast-induced nephropathy in the rat. Kidney and Blood Pressure Research. 2012;35(6):425-30.

103. Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. Nature reviews Molecular cell biology. 2003;4(5):397-407.

104. Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. Journal of Biological Chemistry. 1998;273(37):23722-8.

105. Liu H, Sugiura M, Nava VE, Edsall LC, Kono K, Poulton S, et al. Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform. Journal of Biological Chemistry. 2000;275(26):19513-20.

106. Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, et al. Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival. The Journal of cell biology. 1999;147(3):545-58.

107. Edsall LC, Cuvillier O, Twitty S, Spiegel S, Milstien S. Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells. Journal of neurochemistry. 2001;76(5):1573-84.

108. Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PA, Wattenberg BW, et al. An oncogenic role of sphingosine kinase. Current Biology. 2000;10(23):1527-30.
109. Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, et al. SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism. Journal of Biological Chemistry. 2005;280(44):37118-29.
110. Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, Nava VE, Sankala H, et al. Sphingosine kinase type 2 is a putative BH3-only protein that induces apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(41):40330-6.
111. Mandala SM, Thornton R, Galve-Roperh I, Poulton S, Peterson C, Olivera A, et al. Molecular cloning and characterization of a lipid phosphohydrolase that degrades sphingosine-1-phosphate and induces cell death. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000;97(14):7859-64.
112. Ogawa C, Kihara A, Gokoh M, Igarashi Y. Identification and characterization of a novel human sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase, hSPP2. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(2):1268-72.
113. Saba JD, Nara F, Bielawska A, Garrett S, Hannun YA. The BST1 Gene of Saccharomyces cerevisiaeIs the Sphingosine-1-phosphate Lyase. Journal of Biological Chemistry. 1997;272(42):26087-90.
114. Spiegel S, Milstien S. Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2000;1484(2):107-16.
115. Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, et al. International union of pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. Pharmacological reviews. 2002;54(2):265-9.
116. Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH. International union of basic and clinical pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. Pharmacological reviews. 2010;62(4):579-87.
117. Lee M-J, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, et al. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. Cell. 1999;99(3):301-12.
118. Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, et al. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell

migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. Molecular and Cellular Biology. 2000;20(24):9247-61.

119. Yatomi Y, Ruan F, Ohta H, Welch RJ. Quantitative measurement of sphingosine 1-phosphate in biological samples by acylation with radioactive acetic anhydride. Analytical biochemistry. 1995;230(2):315-20.

120. Graeler M, GOETZL EJ. Activation-regulated expression and chemotactic function of sphingosine 1-phosphate receptors in mouse splenic T cells. The FASEB journal. 2002;16(14):1874-8.

121. Graeler M, Shankar G, Goetzl EJ. Cutting edge: suppression of T cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate. The Journal of Immunology. 2002;169(8):4084-7.

122. Dorsam G, Graeler MH, Seroogy C, Kong Y, Voice JK, Goetzl EJ. Transduction of multiple effects of sphingosine 1-phosphate (S1P) on T cell functions by the S1P1 G protein-coupled receptor. The Journal of Immunology. 2003;171(7):3500-7.

123. Wang W, Graeler MH, Goetzl EJ. Type 4 sphingosine 1-phosphate G protein-coupled receptor (S1P4) transduces S1P effects on T cell proliferation and cytokine secretion without signaling migration. The FASEB journal. 2005;19(12):1731-3.

124. Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. Current opinion in immunology. 2000;12(6):624-31.

125. Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. Trends in immunology. 2004;25(5):266-73.

126. Melendez AJ, Khaw AK. Dichotomy of Ca2+ signals triggered by different phospholipid pathways in antigen stimulation of human mast cells. Journal of Biological Chemistry. 2002;277(19):17255-62.

127. Delon C, Manifava M, Wood E, Thompson D, Krugmann S, Pyne S, et al. Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(43):44763-74.

128. Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. Journal of cellular biochemistry. 2004;92(5):913-22.

129. Olivera A, Rivera J. Sphingolipids and the balancing of immune cell function: lessons from the mast cell. The journal of immunology. 2005;174(3):1153-8.

130. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, et al. Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. Science. 2002;296(5566):346-9.
131. Yanagawa Y, Masubuchi Y, Chiba K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats, III. Increase in frequency of CD62L-positive T cells in Peyer's patches by FTY720-induced lymphocyte homing. Immunology. 1998;95(4):591.
132. Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B, Brinkmann V, Hengartner H, Zinkernagel RM. FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. The Journal of Immunology. 2000;164(11):5761-70.
133. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature. 2004;427(6972):355-60.
134. Singleton PA, Dudek SM, Chiang ET, Garcia JG. Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and α-actinin. The FASEB Journal. 2005;19(12):1646-56.
135. Feistritzer C, Riewald M. Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1–phosphate receptor-1 crossactivation. Blood. 2005;105(8):3178-84.
136. Kono M, Mi Y, Liu Y, Sasaki T, Allende ML, Wu Y-P, et al. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(28):29367-73.
137. Sanna MG, Wang S-K, Gonzalez-Cabrera PJ, Don A, Marsolais D, Matheu MP, et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. Nature chemical biology. 2006;2(8):434-41.
138. Gon Y, Wood MR, Kiosses WB, Jo E, Sanna MG, Chun J, et al. S1P3 receptor-induced reorganization of epithelial tight junctions compromises lung barrier integrity and is potentiated by TNF. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102(26):9270-5.

139. Jo S-K, Bajwa A, Awad A, Lynch K, Okusa M. Sphingosine-1-phosphate receptors: biology and therapeutic potential in kidney disease. Kidney international. 2008;73(11):1220-30.

140. Krump-Konvalinkova V, Yasuda S, Rubic T, Makarova N, Mages J, Erl W, et al. Stable knock-down of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P1 influences multiple functions of human endothelial cells. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005;25(3):546-52.

141. Bischoff A, Czyborra P, Fetscher C, Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH, Michel MC. Sphingosine-1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine constrict renal and mesenteric microvessels in vitro. British journal of pharmacology. 2000;130(8):1871-7.

142. Bischoff A, Czyborra P, Meyer zu Heringdorf D, Jakobs KH, Michel MC. Sphingosine-1-phosphate reduces rat renal and mesenteric blood flow in vivo in a pertussis toxin-sensitive manner. British journal of pharmacology. 2000;130(8):1878-83.

143. Bischoff A, Heringdorf DMz, Jakobs KH, Michel MC. Lysosphingolipid receptor-mediated diuresis and natriuresis in anaesthetized rats. British journal of pharmacology. 2001;132(8):1925-33.

144. Hla T, Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate (S1P) Physiology and the effects of S1P receptor modulation. Neurology. 2011;76(8 Supplement 3):S3-S8.

145. Zhu Q, Xia M, Wang Z, Li P-L, Li N. A novel lipid natriuretic factor in the renal medulla: sphingosine-1-phosphate. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 2011;301(1):F35-F41.

146. Schrier RW, Wang W, Poole B, Mitra A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. The Journal of clinical investigation. 2004;114(1):5-14.

147. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. Journal of the American Society of Nephrology. 2003;14(8):2199-210.

148. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. Journal of the American Society of Nephrology. 2006;17(6):1503-20.

149. Koo DD, Welsh KI, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Ischemia/reperfusion

injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion. The American journal of pathology. 1998;153(2):557-66.

150. Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. Kidney international. 2004;66(2):486-91.

151. Burne MJ, Daniels F, El Ghandour A, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, et al. Identification of the CD4+ T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. The Journal of clinical investigation. 2001;108(9):1283-90.

152. Day Y-J, Huang L, Ye H, Linden J, Okusa MD. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 2005;288(4):F722-F31.

153. Troncoso P, Ortíz M, Martínez L, Kahan B, editors. FTY 720 prevents ischemic reperfusion damage in rat kidneys. Transplantation proceedings; 2001: Elsevier.

154. Lien Y-H, Yong K-C, Cho C, Igarashi S, Lai L-W. S1P 1-selective agonist, SEW2871, ameliorates ischemic acute renal failure. Kidney international. 2006;69(9):1601-8.

155. Müller H, Hofer S, Kaneider N, Neuwirt H, Mosheimer B, Mayer G, et al. The immunomodulator FTY720 interferes with effector functions of human monocyte-derived dendritic cells. European journal of immunology. 2005;35(2):533-45.

156. Kiuchi M, Adachi K, Kohara T, Minoguchi M, Hanano T, Aoki Y, et al. Synthesis and Immunosuppressive Activity of 2-Substituted 2-Aminopropane-1, 3-diols and 2-Aminoethanols 1, 2. Journal of medicinal chemistry. 2000;43(15):2946-61.

157. Mathew B, Jacobson JR, Berdyshev E, Huang Y, Sun X, Zhao Y, et al. Role of sphingolipids in murine radiation-induced lung injury: protection by sphingosine 1-phosphate analogs. The FASEB Journal. 2011;25(10):3388-400.

158. Dudek S, Camp S, Chiang E, Singleton P, Usatyuk P, Zhao Y, et al. Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by FTY720 does not require the S1P 1 receptor. Cellular signalling. 2007;19(8):1754-64.

159. Okajima F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic

mediator? Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2002;1582(1):132-7.

160. Egom EEA, Mohamed TM, Mamas MA, Shi Y, Liu W, Chirico D, et al. Activation of Pak1/Akt/eNOS signaling following sphingosine-1-phosphate release as part of a mechanism protecting cardiomyocytes against ischemic cell injury. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2011;301(4):H1487-H95.

161. Sarai K, Shikata K, Shikata Y, Omori K, Watanabe N, Sasaki M, et al. Endothelial barrier protection by FTY720 under hyperglycemic condition: involvement of focal adhesion kinase, small GTPases, and adherens junction proteins. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2009;297(4):C945-C54.

162. Hwang M-W, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, et al. FTY720, a new immunosuppressant, promotes long-term graft survival and inhibits the progression of graft coronary artery disease in a murine model of cardiac transplantation. Circulation. 1999;100(12):1322-9.

163. Kimura T, Hasegawa T, Nakai H, Azuma T, Usui N, Sasaki T, et al. FTY720 reduces T-cell recruitment into murine intestinal allograft and prevents activation of graft-infiltrating cells. Transplantation. 2003;75(9):1469-74.

164. Wei SH, Rosen H, Matheu MP, Sanna MG, Wang S-K, Jo E, et al. Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses. Nature immunology. 2005;6(12):1228-35.

165. Hofmann U, Burkard N, Vogt C, Thoma A, Frantz S, Ertl G, et al. Protective effects of sphingosine-1-phosphate receptor agonist treatment after myocardial ischaemia–reperfusion. Cardiovascular research. 2009;83(2):285-93.

166. Whetzel AM, Bolick DT, Srinivasan S, Macdonald TL, Morris MA, Ley K, et al. Sphingosine-1 phosphate prevents monocyte/endothelial interactions in type 1 diabetic NOD mice through activation of the S1P1 receptor. Circulation research. 2006;99(7):731-9.

167. Asle-Rousta M, Oryan S, Ahmadiani A, Rahnema M. Activation of sphingosine 1-phosphate receptor-1 by SEW2871 improves cognitive function in Alzheimer's disease model rats. EXCLI journal. 2013;12:449.

168. Li C, Zheng S, You H, Liu X, Lin M, Yang L, et al. Sphingosine 1-phosphate

(S1P)/S1P receptors are involved in human liver fibrosis by action on hepatic myofibroblasts motility. Journal of hepatology. 2011;54(6):1205-13.

169. Gollmann G, Neuwirt H, Tripp CH, Mueller H, Konwalinka G, Heufler C, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor type-1 agonism impairs blood dendritic cell chemotaxis and skin dendritic cell migration to lymph nodes under inflammatory conditions. International immunology. 2008;20(7):911-23.

170. Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. Nature immunology. 2003;4(12):1230-7.

171. Bolick DT, Srinivasan S, Kim KW, Hatley ME, Clemens JJ, Whetzel A, et al. Sphingosine-1-phosphate prevents tumor necrosis factor-α–mediated monocyte adhesion to aortic endothelium in mice. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 2005;25(5):976-81.

172. Ni H, Chen J, Pan M, Zhang M, Zhang J, Chen P, et al. FTY720 prevents progression of renal fibrosis by inhibiting renal microvasculature endothelial dysfunction in a rat model of chronic kidney disease. Journal of molecular histology. 2013;44(6):693-703.

173. Ham A, Kim M, Kim JY, Brown KM, Fruttiger M, D'Agati VD, et al. Selective deletion of the endothelial sphingosine-1-phosphate 1 receptor exacerbates kidney ischemia–reperfusion injury. Kidney international. 2014;85(4):807-23.

174. Davis MD, Clemens JJ, Macdonald TL, Lynch KR. Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. Journal of Biological Chemistry. 2005;280(11):9833-41.

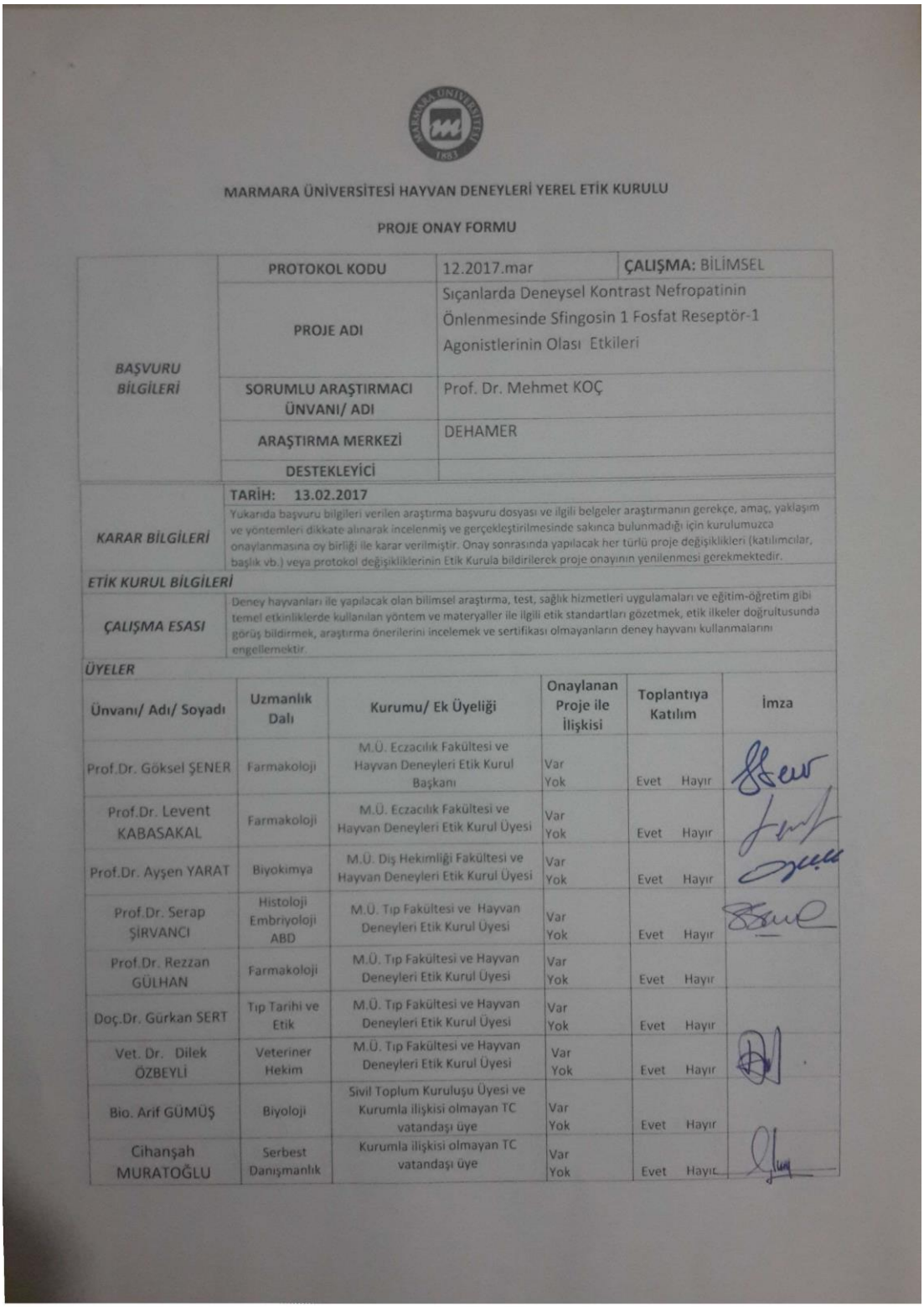
175. Ichijo M, Ishibashi S, Li F, Yui D, Miki K, Mizusawa H, et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-1 selective agonist enhances collateral growth and protects against subsequent stroke. PloS one. 2015;10(9):e0138029.

176. Tuğtepe H, Şener G, Bıyıklı NK, Yüksel M, Çetinel Ş, Gedik N, et al. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. Regulatory peptides. 2007;140(3):101-8.

177. Heyman SN, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2008;3(1):288-96.

178. Bajwa A, Jo S-K, Ye H, Huang L, Dondeti KR, Rosin DL, et al. Activation of sphingosine-1-phosphate 1 receptor in the proximal tubule protects against ischemia-reperfusion injury. Journal of the American Society of Nephrology. 2010;21(6):955-65.
179. Bajwa A, Rosin DL, Chroscicki P, Lee S, Dondeti K, Ye H, et al. Sphingosine 1-phosphate receptor-1 enhances mitochondrial function and reduces cisplatin-induced tubule injury. Journal of the American Society of Nephrology. 2015;26(4):908-25.
180. Fuller TF, Hoff U, Kong L, Naether M, Wagner P, Nieminen-Kelhä M, et al. Cytoprotective actions of FTY720 modulate severe preservation reperfusion injury in ratrenal transplants. Transplantation. 2010;89(4):402-8.
181. Awad AS, Rouse MD, Khutsishvili K, Huang L, Bolton WK, Lynch KR, et al. Chronic sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation attenuates early-stage diabetic nephropathy independent of lymphocytes. Kidney international. 2011;79(10):1090-8.
182. Persson PB, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium–induced nephropathy. Kidney international. 2005;68(1):14-22.
183. Diplock A, Charuleux J-L, Crozier-Willi G, Kok F, Rice-Evans C, Roberfroid M, et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. British Journal of Nutrition. 1998;80(S1):S77-S112.
184. Wu H, Wang X, Gao J, Liang S, Hao Y, Sun C, et al. Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. Life Sciences. 2017.
185. Fairbanks VF, Klee GG. Biochemical aspects of hematology. Tietz textbook of clinical chemistry. 1999;3:1642-710.
186. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. Cell Death & Differentiation. 2003;10(1):45-65.
187. Yu H, Herbert BA, Valerio M, Yarborough L, Hsu L-C, Argraves KM. FTY720 inhibited proinflammatory cytokine release and osteoclastogenesis induced by Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Lipids in health and disease. 2015;14(1):66.

ETİK KURUL ONAYI



MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

PROJE ONAY FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	12.2017.mar	ÇALIŞMA: BİLİMSEL
	PROJE ADI	Sıçanlarda Deneysel Kontrast Nefropatinin Önlenmesinde Sfingosin 1 Fosfat Reseptör-1 Agonistlerinin Olası Etkileri	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI	Prof. Dr. Mehmet KOÇ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	DEHAMER	
	DESTEKLEYİCİ		
KARAR BİLGİLERİ	TARİH: 13.02.2017 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Deney hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deney hayvanı kullanmalarını engellemektir.		

ÜYELER

Ünvanı/ Adı/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu/ Ek Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya Katılım	İmza
Prof.Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Levent KABASAKAL	Farmakoloji	M.Ü. Eczacılık Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Rezzan GÜLHAN	Farmakoloji	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Vet. Dr. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü. Tıp Fakültesi ve Hayvan Deneyleri Etik Kurul Üyesi	Var Yok	Evet Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi ve Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	
Cihanşah MURATOĞLU	Serbest Danışmanlık	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var Yok	Evet Hayır	