



**Tıp Fakültesi**

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

**SIÇANLARDA DENEYSEL KONTRAST  
NEFROPATİSİNİN ÖNLENMESİNDE BİR ALFA-7  
NİKOTİNİK RESEPTÖR AGONİSTİ OLAN GTS-21'İN  
OLASI ETKİLERİ**

**Dr. SEÇKİN AKÇAY**

**UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL - 2019**



**Tıp Fakültesi**

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

**SIÇANLARDA DENEYSEL KONTRAST  
NEFROPATİSİNİN ÖNLENMESİNDE BİR ALFA-7  
NİKOTİNİK RESEPTÖR AGONİSTİ OLAN GTS-21'İN  
OLASI ETKİLERİ**

**Dr. SEÇKİN AKÇAY**

**UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN: Prof. Dr. MEHMET KOÇ**

Bu çalışma, MÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-TUP-110618-0303 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

**İSTANBUL - 2019**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Seçkin Akçay

## ÖNSÖZ

Sabrı, nezaketi ve çalışkanlığıyla örnek aldığım, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan, teşvik ve destekleriyle hep yanımda hissettiğim, kıymetli hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Koç'a,

Uzmanlık eğitimim süresince eğitimime katkıda bulunan, bilgi ve tecrübelerinden istifade ettiğim Marmara Üniversitesi İç Hastalıkları A.B.D. Başkanımız Sayın Prof. Dr. Rafi Haner Direskeneli başta olmak üzere tüm değerli öğretim üyesi hocalarıma,

Tez çalışmamın bütün aşamalarında çok değerli katkılarını aldığım Fizyoloji A.B.D.'nden Prof. Dr. Berrak Yeğen'e ve canım ablam Arş. Gör. Dr. Zarife Nigar Özdemir'e, Histoloji A.B.D.'nden Dr. Öğr. Üyesi Özlem Tuğçe Çilingir Kaya ve Ass. Dr. Hilal Nişva Levent'e, Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.'den Prof. Dr. Mustafa Akkiprik ve doktora öğrencisi İrem Peker Eyüboğlu'na, umutsuzluğa düştüğüm her an yanımda olan kıymetli hocam Prof. Dr. Neşe İmeryüz'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca her konuda yol gösterici olan Doç. Dr. Aslı Tufan Çinçin'e, Dr. Öğr. Üyesi Ozan Kocakaya'ya, Uzm. Dr. Derya Kocakaya başta olmak üzere birlikte çalıştığım tüm uzman abi-ablalarımıza; fikirlerini çok önemseydiğim sadece kıdemlim değil aynı zamanda abim ve arkadaşım olan Uzm. Dr. Serdar Eriş ve Uzm. Dr. Ahmet Totama'ya,

Asistanlık hayatımı renklendiren ve güzelleştiren canım Kültür-Sanat ekibim, iyikilerim Dr. Fatma Nur Korkmaz, Dr. Fatma Arıkan, Dr. Gökçen Umurca, Dr. Hale Erbatur, Dr. Pınar Erel, Dr. Tuğba Memiş, Dr. Ahmet Mert Yanık, Dr. Eren İmre'ye; tez ve deney aşamalarında yardımlarından ötürü Dr. Abdallah Shbair, Dr. Seda Kutluğ Ağaçkiran ve Dr. Lamia Şeker'e, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım Dr. Ece Tahtasakal başta olmak üzere sevgili asistan, intörn, hemşire ve personel arkadaşlarımin her birine,

Bugünlere gelmemde sonsuz emeği olan, hayatımın her aşamasında desteğini, sevgisini, anlayışını esirgemeyen, dualarını benden eksik etmeyen, çocukları olmaktan gurur duyduğum babam Salih Akçay, annem Sabiha Akçay ve canımdan çok sevdiğim kardeşim Serkan Akçay'a

Sonsuz Teşekkürler...

Dr. Seçkin Akçay

Şubat 2019, İstanbul

## İÇİNDEKİLER

BEYAN .....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
TABLO LİSTESİ .....	vi
ŞEKİL LİSTESİ .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	viii
ÖZET .....	xii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT) .....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Kontrast Nefropatisi .....	4
2.1.1. Tanım .....	4
2.1.2. İnsidans .....	4
2.1.3. Risk faktörleri .....	5
2.1.4. Patofizyoloji .....	7
2.1.4.1. Hemodinamik değişiklikler .....	8
2.1.4.2. Renal tübüler hasar .....	10
2.1.4.2.1. Apoptoz .....	10
2.1.4.2.2. Reaktif oksijen türevleri (ROT) .....	11
2.1.4.3. Kalsiyum .....	12
2.1.5. Tedavi .....	13
2.1.5.1. İlaç kullanımı .....	13
2.1.5.2. Non-farmakolojik tedaviler .....	13
2.1.5.3. Farmakolojik tedaviler .....	13
2.1.5.3.1. Hidrasyon .....	13
2.1.5.3.2. Sodyum Bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) .....	14
2.1.5.3.3. N-Asetil Sistein(NAC) .....	14
2.1.5.3.4. Diüretikler: Furosemid ve Mannitol .....	15
2.1.5.3.5. Statinler .....	16
2.1.5.3.6. Diğer tedaviler .....	17
2.1.5.4. Kontrast Maddeyi Temizlemede Kullanılan Teknolojiler .....	17
2.1.5.5. Diyaliz .....	17
2.2. Hayvan Deneğinde Kontrast Nefropatisi Modelleri .....	18
2.3. Kontrast Nefropatisi ve İnflamasyon .....	19
2.4. Kolinergik Sistem Aktivasyonunun Anti-İnflamatuvar Etkileri .....	21
2.5. Alfa-7 Nikotinik Asetilkolin Reseptörünün Yapısı ve Fonksiyonları .....	24
2.5.1. $\alpha 7nAChR$ ve immün fonksiyonları .....	26
2.5.2. $\alpha 7nAChR$ ve dalak .....	27
2.5.3. $\alpha 7nAChR$ 'lerin sistemik etkileri .....	27
2.5.4. $\alpha 7nAChR$ aktivasyonunun çeşitli böbrek modellerinde kullanımı .....	29

2.6.	GTS-21 Yapısı ve Fonksiyonları .....	31
2.6.1.	GTS-21 ve immün fonksiyonları .....	33
3.	GEREÇ VE YÖNTEM .....	34
3.1.	Kullanılan Deneş Hayvanları ve Deneş Protokolü .....	34
3.1.1.	İlaçlar ve doz belirlenmesi .....	35
3.1.2.	Kontrast nefropatısı modeli oluşturulması .....	36
3.1.3.	Deneş grupları .....	36
3.2.	Kan ve Böbrek Doku Örneklerinin Alınması .....	37
3.3.	Değerlendirme Parametreleri.....	38
3.3.1.	Böbrek fonksiyonlarının belirlenmesi.....	38
3.3.2.	Böbrek dokusunda MPO aktivitesi ölçümü .....	38
3.3.3.	Böbrek dokusunda GSH ve MDA ölçümü.....	39
3.3.4.	Doku örneklerinde RT- PCR ile sitokin genlerinin tespiti .....	40
3.3.5.	Böbrek histopatolojisi .....	41
3.4.	İstatistiksel Analiz .....	41
4.	BULGULAR .....	42
4.1.	Çalışma Gruplarında Serum Kreatinin Değerleri .....	43
4.2.	Çalışma Gruplarında Serum BUN Değerleri.....	44
4.3.	Çalışma Gruplarında Nötrofil İnfiltrasyonu Belirteçi Olarak MPO Değerleri .....	45
4.4.	Çalışma Gruplarında Oksidatif Stres Belirteçi Olarak MDA ve GSH Değerleri .....	46
4.5.	Çalışma Gruplarında RT-PCR ile Sitokin Gen Ekspresyon Düzeyleri.....	48
4.6.	Çalışma Gruplarında Histolojik Skorum .....	51
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ .....	55
6.	KAYNAKLAR.....	63
7.	EKLER.....	75
	EK-1 Etik Kurul Onay Formu .....	75
	EK-2 Özgeçmiş .....	76

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Mehran ve ark. kontrast nefropatisi risk skalası .....	6
Tablo 2: Kontrast maddelerin özellikleri.....	7
Tablo 3: Kritik hastalıklarda $\alpha 7nAChR$ aktivasyonunun etkileri .....	28
Tablo 4: Gruplara ve günlere göre deneyin uygulanış şeması .....	37



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Tübül hücrelerine doğrudan toksik etki ile oluşan nefropati mekanizması ..	11
Şekil 2: $\alpha 7nAChR$ odaklı anti-inflammatuar etkiler .....	23
Şekil 3: Anti-inflammatuar yanıtta $\alpha 7nAChR$ 'un intraselüler sinyal yolağı.....	24
Şekil 4: Aktive $\alpha 7nAChR$ 'nin sırasıyla makrofaj, nötrofil, dendritik hücre ve T lenfosit üzerine etkileri.....	25
Şekil 5: Nikotin, Anabasein ve onun sentetik türevi olan GTS-21'in (3-(2,4-dimetoksibenziliden anabasein (DMXB-A)) kimyasal yapısı .....	32
Şekil 6: Böbrek doku örneklerinin hazırlanma şeması .....	38
Şekil 7: Çalışma gruplarında sağkalım (sürvi) analizi .....	42
Şekil 8: Çalışma gruplarında deney sonunda serum kreatinin değerleri.....	43
Şekil 9: Çalışma gruplarında deney sonunda serum BUN değerleri.....	44
Şekil 10: Çalışma gruplarında MPO aktivitesi düzeyleri.....	45
Şekil 11: Çalışma gruplarında MDA düzeyleri .....	46
Şekil 12: Çalışma gruplarında GSH düzeyleri .....	47
Şekil 13: Çalışma gruplarının IL-6 ekspresyon düzeyleri .....	48
Şekil 14: Çalışma gruplarının IL-1 $\beta$ ekspresyon düzeyleri .....	49
Şekil 15: Çalışma gruplarının TGF- $\beta$ ekspresyon düzeyleri.....	50
Şekil 16: Çalışma gruplarında histopatolojik skorlama (A) Tübüler epitelyal dejenerasyon (B) Tübüler dilatasyon (C) Ödem/inflamasyon (D) Konjesyon ve (E) Glomeruler dejenerasyon skorları .....	52
Şekil 17: Çalışma gruplarında histolojik toplam hasar skoru .....	53
Şekil 18: Hematoksilen-eozin boyası ile boyanan kesitlerin ışık mikroskopisi değerlendirilmesi.....	54



## SİMGELER VE KISALTMALAR

ABH:	Akut böbrek hasarı
ACE:	Anjiotensin dönüştürücü enzim
ACh:	Asetilkolin
AChR:	Asetilkolin reseptörü
AGE:	İleri glikasyon son ürünleri
ANP:	Atriyal natriüretik peptit
BUN:	Kan üre nitrojen
CCl4:	Karbontetraklorür
ChAT:	Kolinasetiltransferaz
COX:	Siklooksijenaz
Cr:	Kreatinin
CRP:	C-reaktif protein
CTLA:	Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen
CXCR:	C-X-C reseptörü
DC:	Dendritik hücre
dk:	Dakika
dl:	Desilitre
DM:	Diyabetes mellitus
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
DOKM:	Düşük-ozmolar kontrast madde
eNOS:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
ERK:	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
ET:	Endotelin
Foxp3	Forkhead box protein p3

GFR:	Glomerüler filtrasyon hızı
GTS-21:	3-(2,4-dimetoksibenziliden) anabasein (DMXB-A)
H&E:	Hematoksilen&Eozin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen peroksit
Hct:	Hemotokrit
HD:	Hemodiyaliz
HMGB-1:	High mobility group box-1
Hsp:	Isı şok protein
HT:	Hipertansiyon
ICAM :	İntraselüler adezyon molekülü
IL:	İnterlökin
IFN- $\gamma$ :	İnterferon- $\gamma$
IOKM:	İzo-ozmolar kontrast madde
IRAK:	İnterlökin-1 reseptör ilişkili kinaz
i.p:	İntraperitoneal
İRH:	İskemi/reperfüzyon hasarı
i.v:	İntravenöz
JAK:	Janus kinaz
KAH:	Koroner arter hastalığı
KBH:	Kronik böbrek hastalığı
kg:	Kilogram
KKY:	Konjestif kalp yetmezliği
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
L-NAME:	N-Nitro-L-Arjinin Metil Esterleri
LP:	Lipit peroksidasyonu
m <sup>2</sup> :	Metrekare

MAPK:	Mitojen aktive c-Jun protein kinaz
MCP:	Monosit kemotaktik protein
mEq/L:	Milliekivalan/litre
mg:	Miligram
MHC:	Majör doku uygunluk kompleksi
MIP-1 $\alpha$ :	Makrofaj inflamatuvar protein-1 $\alpha$
ml:	Mililitre
mOsm/kg:	Miliosmol/kg
MSS:	Merkezi sinir sistemi
MyD88:	Myeloid farklılaşma faktörü 88
NAC:	N-asetil sistein
NaHCO <sub>3</sub> :	Sodyum bikarbonat
NF:	Nükleer faktör
NO:	Nitrik oksit
NOS:	Nitrik oksit sentaz
NSAİİ:	Non steroidal anti inflammatuar ilaçlar
O <sub>2</sub> :	Oksijen
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> :	Oksijen radikal superoksit
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Oksijen radikali
OH <sup>-</sup> :	Hidroksil radikali
PG:	Prostaglandin
PI3K:	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PMN:	Polimorfonükleer nötrofil
RA:	Romatoid artirit
RAAS:	Renin anjiotensin aldosteron sistemi
RAGE:	İleri glikasyon son ürünleri reseptörü

ROT:	Reaktif oksijen türevleri
RT-PCR:	Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
s.c:	Subkutan
SEM:	Standart hata
SF:	Serum fizyolojik
SOCS:	Sitokin sinyal supresörü
SOD:	Süperoksit dismutaz
STAT:	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon faktörü
Tc:	Sitotoksik T hücreleri
TGF- $\beta$ :	Transforme edici büyüme faktörü-beta
Th:	Yardımcı T hücreleri
TLR:	Toll benzeri reseptör
TNF- $\alpha$ :	Tümör nekroz faktör- $\alpha$
TRAF:	TNF reseptör ilişkili faktör
TRAP:	Tartrat dirençli asit fosfataz
Treg:	Regülatuar T hücreleri
U:	Ünite
US:	Ultrason
VACHT:	Vesiküler asetil kolin transporter
VEGF:	Vasküler endotel büyüme faktör
VNS:	Vagal sinir uyarısı
YOKM:	Yüksek-ozmolar kontrast madde
$\alpha$ 7nAChR :	Alfa-7 nikotinik asetilkolin reseptör
$\mu$ g:	Mikrogram
$\alpha$ -BTx:	Alfa-bungarotoksin
2K1C:	2-böbrek 1-klip

## ÖZET

**Giriş:** Kontrast madde kullanımı ve buna bağlı olarak kontrast nefropatisi sıklığının arttığı günümüz tıbbında, renal hasar gelişimini önlediği kesin olarak ispatlanmış bir farmakolojik tedavi hâlen bulunmamaktadır. Kontrast nefropatisinin fizyopatolojik mekanizmaları arasında; renal medüller hipoksi, endotel hasarı, oksidatif stres ve inflamatuvar etkisiyle kontrast maddenin direkt tübüler toksisitesi yer almaktadır. Çalışmamızda alfa-7 nikotinik reseptör agonisi bir madde olan GTS-21'in kontrast nefropatisi üzerine olan etkilerini göstermeyi amaçladık.

**Yöntem:** Çalışma kapsamında SF-kontrol (n=8), GTS-21-kontrol (n=8), kontrast (n=14) ve GTS-21+ kontrast (n=10) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. GTS-21, 3 gün boyunca 4 mg/kg, günde 2 kez intraperitoneal (i.p) uygulandı. GTS-21'in 25. saatinde kuyruk veninden intravenöz (i.v) olarak indometazin (10 mg/kg), L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME, 10 mg/kg) ve yüksek ozmolar kontrast madde olan diatrizoat (Urografin %76, 6 ml/kg) dozunda verilerek model oluşturuldu. Kontrast verilmesinden sonra 48 saat dolmadan kaybedilen 7 sıçan sağkalım (sürvi) analizine dâhil edildi. Çalışma sonunda serumda böbrek fonksiyon testleri; doku örneklerinde ise oksidatif stres parametreleri, sitokin düzeyleri ve histopatolojik değişiklikler değerlendirildi.

**Bulgular:** Serum kreatinin ve BUN (kan üre nitrojen) düzeyleri, kontrast grubunda kontrollere kıyasla artış göstermiş olup (iki grupta da  $p<0,05$ ), GTS-21'in etkisiyle bu artış azalmıştır. myeloperoksidaz (MPO) değeri, kontrast grubunda SF kontrol grubuna göre artıp GTS-21+Kontrast grubunda azalma gösterse de istatistiksel olarak gruplar benzerdi. Malondialdehit (MDA) kontrast alan gruplarda SF-kontrole göre belirgin artmış iken (iki grupta da  $p<0,001$ ), kontrast ile birlikte GTS-21 alan grupta kısmen azalmıştır. Glutatyon (GSH) değeri, GTS-21+kontrast grubunda SF-kontrole kıyasla artmıştır ( $p<0,05$ ). İnterlökin (IL)-6 ekspresyonunda kontrast alan iki grupta SF-kontrol grubuna göre yaklaşık 6-9 kat arası bir artış gösterilmiş olup (sırasıyla  $p<0,01$  ve  $p<0,05$ ), kontrasta GTS-21 eklenmesiyle IL-6 ekspresyonunun yaklaşık 1,4 kat azaldığı tespit edildi. IL-1 $\beta$  ekspresyonu gruplar arası benzerdi. Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ekspresyonu tek başına kontrast alan gruba kıyasla GTS-21+kontrast grubunda belirgin şekilde artmıştır ( $p<0,01$ ). Kontrast grubunda

SF-kontrol grubuna göre belirgin olarak artan histopatolojik hasarın ( $p<0,001$ ), kontrasta GTS-21 eklenmesiyle anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ( $p<0,001$ ).

**Sonuç:** Kontrast nefropatisi modelinde GTS-21 histolojik parametrelerde belirgin, böbrek fonksiyonlarında ise kısmi düzelme sağlamaktadır. Bu düzelme, anti-oksidan ve anti-inflamatuar mekanizmalar üzerinden sağlanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kontrast nefropatisi, GTS-21, alfa7 nikotinik asetilkolin reseptör agonisti, kolinerjik anti-inflamatuar yolak



## İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

**Background:** The use of contrast agents and the incidence of contrast nephropathy increase in today's medicine, there is still no proven pharmacological therapy to prevent renal damage. Physiopathological 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 alpha-7 nicotinic receptor agonist, GTS-21 on contrast induced nephropathy.

**Methods:** 4 groups were included within the scope of our study: saline-control (n=8), GTS-21-control (n=8), contrast (n=14) and GTS-21+ contrast (n=10). GTS-21 were administrated for 3 days, 4mg/kg twice a day intraperitoneal (i.p). Indomethacin (10 mg/kg), L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-NAME, 10 mg/kg) and high osmolar contrast agent - diatrizoat (Urografin %76, 6 ml/kg) were administered intravenously (i.v) from the tail vein at the 25<sup>th</sup> hour of the experiment and the model was created. 7 rats that died after contrast administration in 48 hours were included in survival analysis. Renal functions in the serums; oxidative stress parameters, cytokine levels and histopathological investigations in the tissue specimens were evaluated at the end of the study.

**Results:** Serum creatinine and BUN (Blood urea nitrogen) levels increased in the contrast group compared to controls ( $p<0.05$  for both groups), which decreased with the effect of GTS-21. Although myeloperoxidase (MPO) value increased in contrast group compared to saline-control group and decreased in GTS-21+contrast group, the groups were statistically similar. While malondialdehyde (MDA) significantly increased in contrast and GTS-21+contrast groups compared to saline-control group ( $p<0.001$  for both groups), it was partially decreased in the GTS-21+contrast. Glutathione (GSH) value increased in GTS-21+contrast group compared to saline-control group ( $p<0.05$ ). Interleukin (IL)-6 expression in the two contrast groups demonstrated a 6 to 9 fold increase compared to the saline-control group ( $p<0.01$  and  $p<0.05$ , respectively), and IL-6 expression was reduced by about 1.4-fold with the addition of GTS-21 to contrast. IL-1 $\beta$  expression was similar between all groups. Transforming growth faktör- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) expression was significantly increased in GTS-21+contrast group compared to the contrast group ( $p<0.01$ ). Histopathological

injury was significantly increased in contrast group compared to saline-control group ( $p<0.001$ ), the injury was significantly decreased with the addition of GTS-21 to the contrast group ( $p<0.001$ ).

**Conclusions:** In contrast nephropathy model, GTS-21 provides significant improvement in histological parameters and partial improvement in renal function. This improvement is achieved through anti-oxidant and anti-inflammatory mechanisms.

**Key Words:** Contrast-induced nephropathy, GTS-21, alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor agonist, cholinergic anti-inflammatory pathway





## 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  $\geq 0,5$  mg/dl veya bazal değerinin  $\geq \%25$ 'i oranında artmasıdır (1).

Kontrast nefropatisi hastane kaynaklı akut böbrek hasarının (ABH) hipotansiyon ve ilaçlardan sonra üçüncü en sık nedenidir. İnsidansı büyük ölçüde kontrast madde alımı öncesindeki bozulmuş böbrek fonksiyonlarına, diyabetes 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 artmasından dolayı; günümüzde kontrast nefropatisi sıklığı da buna paralel olarak artmaktadır. Bu durum hastaların morbidite, mortalitelerinde artışa neden olmakta ve hastane maliyetlerini de olumsuz olarak etkilemektedir (3, 4).

KKY, DM, anemi, ileri yaş, yüksek yada düşük molariteli kontrast madde kullanımı gibi faktörlere bağlı olarak kontrast nefropatisi gelişimi riski  $\%20-50$  arasında seyretmektedir. Buna karşın normal toplumlarda bu risk  $\%1-6$  arasındadır. Hastanede yatmakta olan hastalarda gelişen ABH'nın  $\%10$  kadarı kontrast madde kullanımına bağlı olarak gelişir (5).

Kontrast nefropatisi fizyopatolojisi henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Ancak kabul gören görüşe göre; nefrotoksisite gelişmesinde, renal medüller hipoksi ve direkt hücrel 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 patogeneze de 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 anti-oksidan ve vazodilatör ajanlar başta olmak üzere;

nitrik oksit (NO) sentezini arttıran ajanlar, endotelin (ET) ve adenosin reseptör antagonistleri ile endotel fonksiyonunu düzelten ajanlar denenmiş ancak rutin uygulamaya girecek kadar etkili bulunamamışlardır (7). Üzerinde çalışma yapılan ajanlardan özellikle anti-oksidan 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).

GTS-21 (3-(2,4-dimetoksibenziliden) anabaseine (DMXB-A) bir selektif  $\alpha 7$  nikotinik asetilkolin reseptör ( $\alpha 7nAChR$ ) agonistidir. GTS-21 vagus sinir temelli inflamatuvar reflekslerin özellikle efferent kolunda; makrofajlar, endotelial hücreler ve diğer immünokompetent hücrelerde aktivatör görev almaktadır.

Vagal sinir uyarısının (VNS) romatoid artrit (RA), inflamatuvar bağırsak hastalığı, sepsis gibi inflamatuvar hastalık modellerinde; nörolojik, immünolojik, hematopoetik, renal, gastrointestinal sistemler üzerine koruyucu etkileri gösterildikten sonra  $\alpha 7nAChR$  agonistleri birçok böbrek modelinde kullanılmıştır. Renal iskemi/reperfüzyon hasarı (İRH) modellerinde VNS ile TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-15 gibi sitokinlerin azaldığı, kolinerjik anti-inflamatuvar yolak aktivasyonunun böbrek üzerine koruyucu etkileri olduğu ve dalağın da bu yolağın önemli bir parçası olduğu bilinmektedir. Inoue ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada  $\alpha 7nAChR$ -pozitif makrofajlar ve Ach sentezleyen kolinasetiltransferaz (ChAT)-pozitif T-hücrelerinden oluşan dalağın anti-inflamatuvar yolağı ultrason (US) ve VNS ile aktive edilirken splenektomi yapılmış olan gruplarda ise VNS ile gerçekleşen bu aktivasyonun ortadan kalktığı gösterilmiştir. VNS ile hem afferent hem de efferent aksonlar aktive edilip vazovagal refleksler oluşmuştur. Böylece LPS-induced TNF- $\alpha$  azalmıştır. Wildtipe farelere VNS uygulanmasından bir gün sonra bu farelerden elde edilen splenositlerin  $\alpha 7nAChR$  knockout farelere transferi ile bu farelerin İRH'dan korunduğu gösterilmiştir. Sonuçta kolinerjik sistemin önemli bir koordinasyon merkezi olan dalağın; splenositlerinin immün mekanizmalarla aktive olmasıyla İRH azaldığı gösterilmiştir (10).

$\alpha 7nAChR$  agonistlerinin anti-apoptotik, anti-inflamatuvar ve anti-oksidatif etkileri çeşitli modellerde gösterilmiş olup kontrast nefropatisi patogenezinde bu

mekanizmaların rolü olduğu gösterilmiştir. Bu proje ile deneysel kontrast nefropatisi modelinde  $\alpha 7nAChR$  agonisti olan GTS-21'in kontrast 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  $\geq 0,5$  mg/dl veya bazal değerin  $\geq 25\%$ 'i oranında artmasıdır (1). Hastalar genelde non-oligürik olup kreatinin seviyeleri tipik olarak kontrast kullanımından 24 saat sonra yükselmeye başlar ve genelde en yüksek değerine 3- 5 gün içinde ulaşır ve başlangıç değerlerine de 7 – 10 gün içinde döner. Bununla birlikte hastaların fonksiyonları düzelmeyebilir, diyaliz tedavisine ihtiyaç duyabilirler, hastanede yatış süreleri uzayabilir ve ölüm söz konusu olabilir (5).

Kontrast maddeye bağlı gelişen ABH ise 48 saat içerisinde serum kreatinin değerinde  $\geq 0,3$  mg/dl'lik artış, 7 gün içerisinde bazal serum kreatinin değerinde % 50 artış veya 6 saatten uzun süren oligüri olması ile tanımlanır (11).

#### 2.1.2. İnsidans

Kontrast nefropatisi hastane kaynaklı ABH nedenleri arasında 3. sıradadır. Retrospektif olarak incelendiğinde ilk sıralarda hipotansiyon nedeniyle azalmış renal perfüzyonun, cerrahi girişimlerin ve nefrotoksik ajanların sık kullanımının kontrast nefropatisi gelişmesinde katkısı olduğu görülmüştür. 1976-1996 yılları arasında yapılan 15 prospektif ve retrospektif çalışmada kontrast nefropatisi 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 (12).

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'si olup kronik böbrek hastalığı (KBH) olanlarda risk daha da artmaktadır (3). McCullough ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada perkutan koroner revaskülarizasyon uygulanan 1826 hastanın %14.5'inde ABH'nin

geliştiği, %0.8'inde hemodiyaliz (HD) ihtiyaçı meydana geldiği, HD'e alınan hastaların %13'ünde ise kalıcı renal replasman tedavisi gerektiği saptanmıştır; yine aynı çalışmada ABH gelişmeyen hastalarda %1.1, ABH gelişenlerde %7.1, diyaliz ihtiyaçı olanlarda ise %35.7 oranında mortalite tespit edilmiştir (3).

### **2.1.3. Risk faktörleri**

Kontrast nefropatisi gelişiminden sorumlu en önemli risk faktörü; hastada bilinen KBH olmasıdır. KBH hastalarında kontrast nefropatisi gelişme olasılığı normal bireylere göre 20 kat daha fazladır, glomerüler filtrasyon hızı (GFR) < 30 ml/dk olanlar ise kontrast nefropatisi gelişimi açısından en riskli gruptur (13). Diğer bilinen risk faktörleri ise; 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 nefrotoksik ajan kullanımınıdır (13,14).

Manske ve ark. azotemili ve DM olan hastalarda kontrast nefropatisi gelişme riskini %50 olarak saptamışlardır (15). 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 vazokonstriksiyon nefropati gelişimine katkıda bulunmaktadır (16,17).

Kontrast madde sonrası nefropati gelişme olasılığını tahmin etmek için, birbirinden farklı modifiye edilmiş risk skorlama yöntemleri oluşturulmuştur. Mehran ve arkadaşlarının perkütan koroner girişimden sonra ortaya çıkabilecek kontrast nefropatisi riskini skorlama yöntemi Tablo 1'de gösterilmiştir (18).

**Tablo 1: Mehran ve ark. kontrast nefropatisi risk skalası**

Risk faktörü	Puan	Risk skoru	Kontrast nefropatisi riski (%)	Diyaliz riski (%)
KKY	5			
Sistolik kan basıncı < 80 mm/Hg	5			
İntra-aortik balon pompası olması	5			
Yaş >75	4			
Anemi ( Hct: Kadın< 36, Erkek<39 )	3	≤5	7,5	0,04
DM	3	6-10	14	0,12
Serum kreatinin ≥ 1,5 mg/dl	4	11-15	26,1	1,09
Kontrast madde hacmi (her 100 ml için)	1	≥16	57,3	12,6
GFR 40-59 ml/dk	2			
GFR 20-39 ml/dk	4			
GFR < 20 ml/dk	6			

Kullanılan kontrast maddenin kimyasal yapısı, dozu, ozmolalitesi ve iyot miktarı da nefropati gelişiminde rol oynamaktadır. Kontrast maddelerin özellikleri Tablo 2’de gösterilmiştir (14). Kontrast maddeler ozmolalitesine göre üçe ayrılır; yüksek-ozmolar kontrast madde (YOKM): ozmolalite 1500 mOsm/kg üzerinde, düşük-ozmolar kontrast madde (DOKM): ozmolalite 550-850 mOsm/kg arasında ve izo-ozmolar kontrast madde (IOKM): ozmolalite 290 mOsm/kg (19). YOKM’larda kontrast nefropati oluşma riski daha fazladır. DOKM’ler arasında kontrast nefropatisi gelişme riski en yüksek olan ioxaglate’dir, IOKM’ler arasında ise en yüksek riskli olan Iodixanol’dur (20). Yüksek ozmolarite dışında kullanılan maddenin hacmi, konsantrasyonu, viskozitesi ve kullanım sıklığı da kontrast nefropatisi gelişimi ile yakından ilişkilidir (21).

İyonik kontrast maddelerde iyonik olmayanlara göre artmış renal tubuler sitotoksite gözlenmektedir. İyonik kontrast maddeler; idiyosenkratik ve fizyokemotoksik olmak üzere iki ana yan etki sınıfına sahiptir. İdiyosenkratik yan etkiler, anafilaktoid reaksiyonlar olarak da bilinir. Doz bağımlı değildirler; histamin ve serotonin gibi vazoaaktif maddelerin salınmasına neden olan enzim indüksiyonu sonrasında kompleman sisteminin aktivasyonu yoluyla alerjik reaksiyonları taklit ederler. Fizyokemotoksik reaksiyonlar, iyonik kontrast maddelerin, özellikle de dolaşım sistemi olmak üzere vücudun homeostatik mekanizmalarını bozmasından

kaynaklanır. Bu reaksiyonlar, kontrast moleküllerinin fiziksel ve kimyasal etkilerinden dolayıdır ve doz bağımlıdır. Kontrast nefropati fizyokemotoksik bir yan etkidir (22).

**Tablo 2: Kontrast maddelerin özellikleri**

Tip	İyonik/ non- iyonik	İsim	Ozmolalite mOsm/kg	Vizkosite 37°C'de
YOKM	İyonik	Diatrizoate	1500-2000	1,4-19,5
	İyonik	Metrizoate	2100	2,8-5
DOKM	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
IOKM	Non- iyonik	Iopamidol	342-796	1,5-9,4
	Non- iyonik	Iodixanol	290	6,3-11,8
	Non- iyonik	Iotrolan	270-320	3,9-8,1
	Non- iyonik	Ioseminol	273	6,3

Kontrast madde volümü ile kontrast nefropatisi gelişimi doğru orantılıdır (23). 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. Herhangi bir risk faktörü olmayan hastaya, ek olarak verilen her 100 ml kontrast madde için kontrast nefropatisi olasılığı %30 artmaktadır (15).

#### **2.1.4. Patofizyoloji**

Kontrast nefropatisi fizyopatolojisi henüz yeterince aydınlatılamamıştır. Ancak nefrotoksisite gelişiminde, renal medüller hipoksi ve direkt hücresel toksisite iki önemli mekanizma olarak öne sürülmektedir (4). Kontrast madde enjeksiyonu sonrası renal arter vazokonstriksiyonuna 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 (13,24)

A. Medüller hipoksi sonucunda oluşan renal tübüler 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 yol ile oluşan apoptoz
2. Reaktif oksijen türevlerinin (ROT) üretimi
3. Endotel hücrelerden artmış adenzin üretimi
4. Medüller hipoksi
5. NO etkisi ile oluşan vazodilatasyonun ROT tarafından blokajı
6. ROT sonucu oluşan vazokonstrüksiyon

**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 (25). Renal kan akımının regülasyonu ve tübüler fonksiyonun sağlanmasında çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Renal perfüzyonun sağlanması için bu faktörlerin dengeli olması gerekmektedir (24). Bu mekanizmalarda rol oynayan lokal vazokonstrüktörler; ET-A, adenzin-A1, anjiyotensin II, vasopressin, prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)-EP<sub>1</sub> ve PGE<sub>2</sub>-EP<sub>3</sub>; lokal vazodilatatör ise nitrik oksit (NO), adenzin-A<sub>2</sub>, dopamin, ürodilatin, ET-B, PGE<sub>2</sub>-EP<sub>2</sub> ve PGE<sub>2</sub>-EP<sub>4</sub> olarak sayılabilir.



Kontrast madde vasküler endotel hücreleri indükleyerek değişik faktörlerin salınımına neden olur, bu faktörler renal medullada vazokonstrüksiyonu artırır, vazodilatasyonu azaltabilir. Sonuç olarak hipoksiye neden olur. ET seviyeleri KBH tanısı olanlarda artar ve vazokonstrüktif etkiler daha belirgin olur. Ayrıca ET seviyeleri kontrast madde maruziyeti sonrası KBH tanılılarda belirgin artış gösterir ve 3. günde başlangıç değerlerine geri döner (26). ET-A reseptör antagonisti BQ-123 sıçanlarda kontrast kullanımına bağlı GFR azalmasını kısmen önleyebilmiştir (27). Başka bir çalışmada da indometazin kullanılarak yapılan bir kontrast nefropatisi modelinde ET reseptör antagonistleri CP170687 ve SB 209670 kullanımı ile kontrast sonrası azalan kan akımı belirgin olarak korunabilmiştir (28).

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 (36).

NO ve PG gibi vazodilatör komponentlerin bloke olması vazokonstriksiyonu daha da şiddetlendirmektedir (29). Myers ve ark. kontrast madde enjeksiyonu sonrası PGE2 düzeylerinde baskılanma ile paralel olarak kortikal ve medüller kan akımlarında azalma göstermişlerdir. Bir prostosiklin analogu olan iloprost koroner anjio yapılan KBH tanısı olanlarda kontrast nefropatisi gelişimini engellemiştir. NO potent bir vazodilatör olup bütün tübül segmentleri boyunca sodyum reabsorpsiyonunu azaltır. Böylelikle oksijen (O<sub>2</sub>) kullanımını baskılayarak medüller hipoksi riskini azaltır. NO sentaz inhibitörü olan N-Nitro-L-Arjinin Metil Esterleri(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 (30-31). NO sentezinin L-NAME ve PG sentezinin indometazin 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 indometazin veya L-NAME verildiğinde ise bu sonuçlar gözlenmemiştir (32). Patogeneizde yer alan renal vazokonstrüksiyonun etkisi serum kreatinin düzeyinin yükselmesinde tek başına yeterli değildir; esas önemli

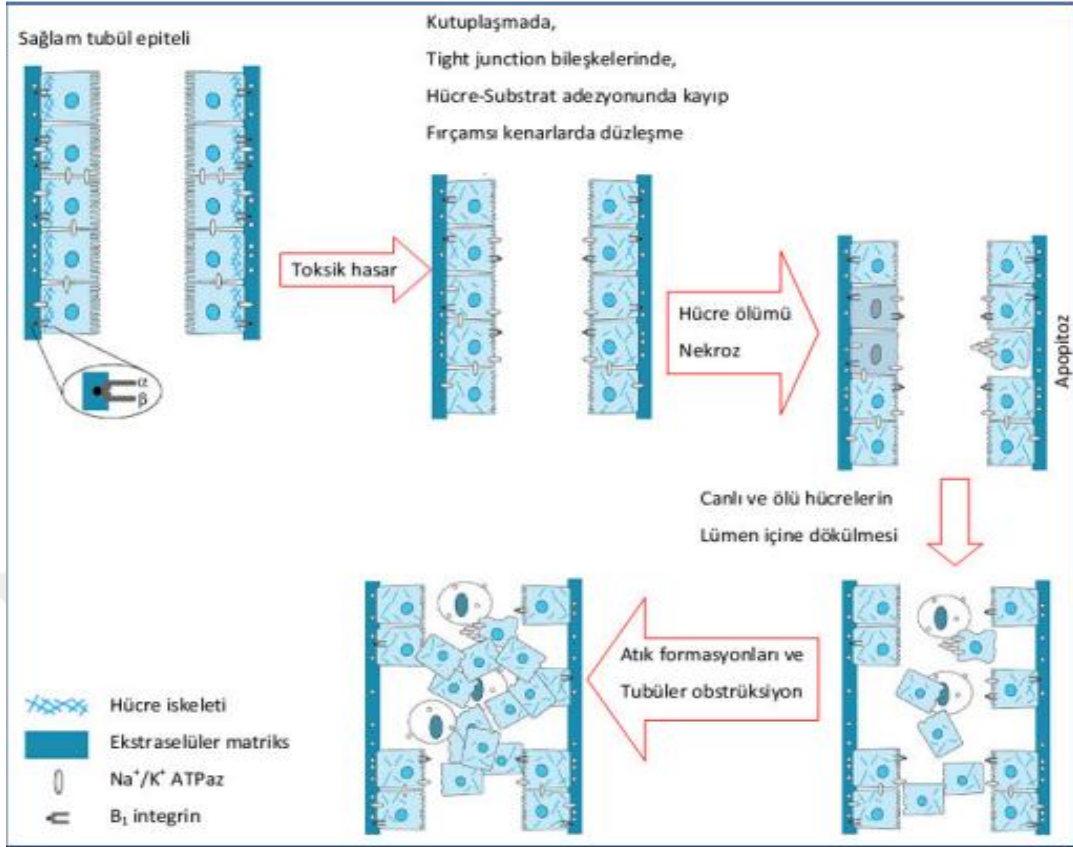
olan bir diğerk faktör ise medüller kan akımının azalmasıdır (33).

Böbrek derin dış renal medulla vaza rekta ile beslenmektedir, vaza rektadaki kan basıncı viskozite ile ters orantılıdır. Kontrast madde glomerülden geçerken renal tübüler viskoziteyi artırır, bu artış tübüler obstrüksiyona ve böbrek interstisyel basıncının yükselmesine neden olur. Ek olarak yüksek plazma viskozitesi vaza rektadaki kan rezistansını artırarak 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 (34). Medulla hipoksisini sistemik değişikliklerden de etkilenir, örneğin kardiyak debi azalması, suboptimal pulmoner perfüzyon-ventilasyon azalması ve hemoglobinin oksijen affinite artışı intrarenal hipoksiye neden olur (25, 35-37).

#### **2.1.4.2. Renal tübüler hasar**

##### **2.1.4.2.1. Apoptoz**

Kontrast nefropatisinin ne ölçüde direkt sitotoksikiteye neden olduğu bilinmemektedir. Bu konuda tüm bilgiler hayvan çalışmalarından elde edilmiştir. Kontrast maddeler, özellikle iyonik olanlar, böbrek mezenkimal hücreler, tübüler hücreler ve endotel hücreler üzerine toksik etkiye sahiptir (38-39). Kutuplaşmada, sıkı bağlantı bileşkelerinde hasar, hücre substrat adezyonunda kayıp ve fırçamsı kenarlarda düzleşme yapıp hücre ölümü ve nekroza neden olur. Apoptoz ile oluşan ölü hücrelerin ve bazı canlı hücrelerin de lümen içine dökülmesiyle tübüler obstrüksiyon oluşur (40) (Şekil 1).



**Şekil 1: Tübül hücrelerine doğrudan toksik etki ile oluşan nefropati mekanizması**

[Acute Renal Failure: Pathophysiology of Nephrotoxic Acute Renal Failure. Atlas of Diseases of the Kidney, Rick G. Schnellmann and Katrina J. Kelly. Chapter 15,1-14. (www.kidneyatlas.org)'dan alınmıştır.]

Kontrast madde proksimal tübül mitokondriyal aktiviteyi azaltabilir, adenozin ve hipoksantin üretimini artırabilir ve hücre proliferasyonunu bozabilir (41-42). Hücresel görünüme bakıldığında; kontrast madde doz bağımlı olarak vakuolizasyonu artırabilir (43). DOKM'ler ve IOKM'ler doz ve zaman bağımlı olarak mitokondriyal yollardan renal apoptozu indükleyebilir. Bu yolda kaspaz-3 ve kaspaz-9'u artırırken, kaspaz-8 ve kaspaz-10'u arttırmaz (44).

#### 2.1.4.2.2. Reaktif oksijen türevleri (ROT)

Kontrast madde verilmesi esnasında ROT'un kaynakları endotel hücre adenoziini ve renal medulladaki hipoksidir (43). Oksidatif stres sırasında ROT

endojen olarak mitokondride üretilir. En çok bilinen ROT, oksijen radikal superoksit ( $O_2^{\bullet}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^{\bullet}$ ).  $O_2^{\bullet}$  ve  $OH^{\bullet}$  daha fazla reaktiftir ve hücre membranından daha fazla geçer. ROT ekstrasellüler sinyal molekülleridir ve vazokonstrüksiyonda ET-1, tromboksan A2, adenozin, anjiotensin II ve norepinefrin gibi rol oynayabilirler (43).  $O_2^{\bullet}$  hızlı bir şekilde NO'yu temizler ve böylece NO bağımlı renal vazodilatasyonu bloke ederek kontrast madde nefropatisine neden olabilir (45). Yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller ve ürünleri, hücresel elemanlara oksidatif stres oluşturarak zarar verirler. Bunu lipid peroksidasyonu, DNA ve protein hasarı oluşturarak yaparlar. Ancak paradoksal olarak oksidasyon ürünlerinin tübüler nekrozun düzelme safhasında da rol aldığı düşünülmektedir (46). Hayvan modellerinde kontrast maddelerin ROT aracılığı ile renal kortekste süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz gibi anti-oksidan enzim aktivitelerinde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Kontrast sonrasında osmotik yük ve viskozite artar, renal medullada hipoksi oluşur, post-iskemik süreçte serbest oksijen radikallerinin üretimi artar (47,48). NAC mitokondiyal yolla oluşan apoptozu baskılar (49). ROT'u temizler, glutasyon sentezini uyarır ve anjiotensin dönüştürücü enzimi (ACE) inhibe edebilir (50).

#### **2.1.4.3. Kalsiyum**

Patogenetik sürecin vazokonstrüksiyon fazında adenozin ve ET salgılanmasına kalsiyum iyonlarının da eşlik ettiği gösterilmiştir (25). Bu hemodinamik değişiklikler kalsiyum kanal blokerlerinin kullanımı ile geri döndürülebilmiştir (51).  $Na^+/Ca^+$  değiştirici inhibitörü uygulanması ile de intrasellüler  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu azaltılarak kontrast maddeye bağlı ET üretimi ve vazokonstrüksiyon baskılanmıştır (52). Kontrast madde kullanımı sonrasında gelişen vazokonstrüksiyon düz kas hücrelerine olan direkt etki (53), lokal olarak salgılanan adenozin (42) ve ET üretimine de bağlı olabilir (54).

Intrasellüler  $Ca^{+2}$  fizyolojisindeki değişiklikler vazokonstrüksiyon ve tübüler renal hücre apoptozu ile bağlantılıdır (55). Voltaj bağımlı  $Ca^{+2}$  kanallarının yanı sıra “reverse mode NCX” inhibisyonu intrasellüler  $Ca^{+2}$  yüklenmesini ve ROT üretimini baskılayarak renal tübüler apoptozu önlemiştir (56).

### **2.1.5. Tedavi**

Konrast nefropatisi için hâla özgül bir tedavi yoktur. Öncelikle yapılması gereken yüksek riskli hasta grubunun 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 (57).

#### **2.1.5.1. İlaç kullanımı**

Kontrast madde kullanımı öncesi kullanılmakta olan non steroid anti-inflamatuar ilaçlar (NSAİİ), siklooksijenaz (COX)-2 inhibitörleri, aminoglikozidler, siklosporin gibi nefrotoksik ajanlar 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 (58).

#### **2.1.5.2. Non-farmakolojik tedaviler**

Kontrast maddenin en düşük dozda uygulanması önerilir. KBH ve DM olan hastalarda IOKM olan iodixanol kullanmak DOKM'dan daha iyi bir tercihtir. Tüm hastalarda IOKM veya DOKM (ioxhexiol, ioxaglate hariç) kullanılması önerilir. Ek olarak 72 saat içerisinde doz tekrarından kaçınılmalıdır (59,60).

#### **2.1.5.3. Farmakolojik tedaviler**

##### **2.1.5.3.1. Hidrasyon**

Hidrasyon; renin anjiotensin aldosteron sisteminin (RAAS) aktivitesini azaltır, ET 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 (61).

Kontrast nefropatide etkili olduğu konusunda birçok otörün birleştiği tek tedavi yöntemi hidrasyondur. İntravenöz (i.v) sıvı replasmanı hastanın klinik durumuna göre değişmekle birlikte %0.9 NaCl 1 ml/kg/saat hızında, tetkik ya da işlemden 12 saat önce başlanıp, kontrast madde uygulamasını takip eden 12-24 saat sonrasına kadar gidecek şekilde yapılabilir. Buna ek olarak oral alım için yetersiz zaman, sıvı kısıtlanmasına gidilen durumlar gibi acil şartlardaki ve artmış aspirasyon riskinden dolayı sedasyon gerektiren durumlardaki hastalar dışında bol sıvı içmeleri için teşvik edilmelidir, tek başına oral hidrasyon verilmesi kontrast nefropatisini engellemek için yetersizdir (62).

#### **2.1.5.3.2. Sodyum Bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>)**

Renal tübüler sıvıyı alkali ederek serbest oksijen radikallerin üretimini azaltmaktadır (63). Tipik olarak hastalara kontrast madde verilmesinden bir saat önce bolus olarak 3 ml/kg/saat infüzyon hızıyla 154 mEq/L NaHCO<sub>3</sub> verilmeli ve işlemden sonra 6 saat boyunca saatte 1 ml/kg olacak şekilde devam edilmelidir (64). Yakın zamanda yapılan büyük meta-analiz çalışmalarda, NaHCO<sub>3</sub> 'ın sodyum kloritten daha yararlı olduğu, ancak ölümü ve renal replasman tedavisi ihtiyacını anlamlı derecede azaltmadığı gösterilmiştir (65-66). 119 hasta ile yapılan NaHCO<sub>3</sub> ve serum fizyolojik (SF) infüzyonunun karşılaştırıldığı bir çalışmada; NaHCO<sub>3</sub> kontrast nefropatisi gelişimini önlemede SF'ten anlamlı olarak daha üstün bulunmuştur (67). 7977 hastanın incelendiği retrospektif bir kohort çalışmada sadece NaHCO<sub>3</sub> verilen hastalardaki kontrast nefropatisi sıklığı, profilaksi almayan veya sadece NAC ya da NAC+NaHCO<sub>3</sub> alanlara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (68). 19 çalışmayı inceleyen başka bir meta-analizde kontrast nefropatisinin önlenmesinde NaHCO<sub>3</sub> ve SF arasında fark olmadığı saptanmıştır (69).

#### **2.1.5.3.3. N-Asetil Sistein (NAC)**

NAC, ROT'u temizleyen güçlü bir anti-oksidan olması nedeniyle oksidatif doku hasarını engelleyerek kontrast nefropatisi gelişimini önleyebilmektedir (70). Ayrıca kontrast maddenin olumsuz hemodinamik etkilerini, nitrik oksit sentaz (NOS) yolu ile renal vazodilatasyon yaparak engellemektedir (71).

Standart doz, işlem gününde ve işlemden bir gün önce oral olarak 2×600 mg verilmesidir (72). Yapılan bazı çalışmalarda NAC 2×600 mg ile 2×1200 mg karşılaştırılmış olup yüksek dozun daha etkili olduğu görülmüştür (72-73). Bu konudaki en iyi veriler %70'i KBH tanısı olan 1677 hasta içeren bir meta-analizden elde edilmiştir. Bu meta-analizde yüksek doz NAC ve kontrol grubu karşılaştırılmıştır. 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 (74).

Birçok çalışmada NAC'in kontrast nefropatisini önlemede çelişkili sonuçlar elde edilmiştir, yüksek riskli hastalarda kombine tedavi (NaHCO<sub>3</sub>, NAC, sıvı replasmanı) tartışılmaktadır (75). 264 hastanın alındığı bir çalışmada, NAC+NaHCO<sub>3</sub>, NAC+SF ve sadece SF hidrasyonu karşılaştırılmış; birinci grupta kontrast nefropati sıklığı anlamlı oranda az görülürken ikinci ve son grup arasında fark olmadığı bildirilmiştir (76). 2308 hastayı kapsayan bir çalışmada anjiyografi işlemi öncesi ve sonrası NAC (2×1200 mg günlük) veya plasebo verilmiş, hastalarda yaş >70, KBH, DM, KKY, şok gibi risk faktörlerinden en az biri olup kontrast nefropatisi gelişme riski açısından iki grup arasında fark saptanmamıştır. İşlemden 48-96 saat sonra serum kreatinin düzeyinde %25'lik bir artış gözlenmiştir, ölüm ve HD açısından ihtiyacı her iki grupta fark saptanmamıştır (77).

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<sub>2</sub> kotransportunu inhibe ederek etki gösterir. Nefronun bu segmenti, düşük O<sub>2</sub> sunumu ve yüksek metabolik ihtiyaç nedeniyle iskemik hasara en duyarlı bölümdür. Burada aktif iyon transportunun inhibe edilmesi ile O<sub>2</sub> kullanımının azalabileceği ve dolayısıyla kontrast maddeye bağlı vazokonstriksiyon oluşturarak nefrotoksisitenin önlenebileceği düşünülmüştür (78).

Solomon ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 78 stabil, ortalama serum kreatinin(Cr) 2,1 mg/dl olan KBH tanılı hastada koroner anjiyografi öncesi 3 gruba ayrılmış; birinci gruba %0,45 NaCl (1mg/kg/saat) işlemden 12 saat önce başlanıp işlemden 12 saat sonrasına kadar devam edilmiştir, ikinci gruba %0,45 NaCl ve 25 gr mannitol infüzyon işlemden önce bir saat süre ile verilmiştir, üçüncü gruba ise %0,45 NaC ve 80 mg furosemid infüzyon işlemden önce 30 dakika (dk) süre ile verilmiş olup SF alan grupta serum Cr düzeyinde artış en düşük düzeyde saptanmıştır. Mannitol fayda sağlamamış, furosemid ise düşük miktarda ABH riskini arttırmıştır (79). Yapılan başka bir çalışmada SF, mannitol, furosemid karşılaştırılmış; ortalama serum Cr 2,8 mg/dl olan 92 KBH'lı hasta incelenmiştir. Plasebo ile kıyaslanınca mannitol ve furosemid alan grupta ABH'ın daha fazla geliştiği görülmüştür (80). Başka bir çalışmada ise koroner anjiyografi öncesi ortalama Serum Cr 2,5 mg/dl ve yarısı DM olan 50 KBH'lı hasta değerlendirilmiş, rastgele hastalara SF, dopamin, mannitol ve atriyal natriüretik peptit (ANP) verilmiştir. 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 görülmemiştir. Ayrıca mannitolun fayda sağlamadığı gibi komplikasyonları arttırdığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (81).

#### **2.1.5.3.5. Statinler**

Koroner arter hastalığı (KAH) olan hastalarda statinler trombüs oluşumu, plak stabilizasyonu ve anti-inflamatuar olumlu etkileri nedeniyle kullanılır. Statinlerin renoprotektif etkiye sahip olduğu düşünülmektedir, literatürdeki veriler çelişkilidir.

Perküten koroner anjiyografi yapılan KAH hastalarında kontrast nefropatisi değerlendirilmiş, statin alan hastalarda kontrast nefropatisi gelişme insidansı % 4,37 iken statin almayanlarda %5,93 olarak saptanmıştır (82). 4734 hastanın değerlendirildiği bir meta-analizde hastaların LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterolü düşük olmasına rağmen kısa süreli statin verilip, kontrast nefropatisi gelişme insidansına bakılmıştır. Kısa süreli statin verilen grubun %3,3'ünde, statin almayan grubun ise %6,4'ünde kontrast nefropatisi gelişmiştir (83). Başka bir meta-



analizde, böbrek fonksiyonları normal insanlarda elektif perküten koroner anjiyografi işlemi öncesi rosuvastatinin kontrast nefropatisi insidansını azalttığı, ancak KBH tanılılarda etkili olmadığı görülmüştür (84). Başka değişik çalışmalarda statinlerin kontrast nefropatisini önlemede fayda sağlamadığı gösterilmiştir (85).

#### **2.1.5.3.6. Diğer tedaviler**

Hidrasyonu tolere edemeyen hastalar için başka tedaviler denenmektedir. Diğer tedaviler [özellikle ET antagonisti, adenosin antagonisti (teofilin), ANP, selektif dopamin-A1 agonisti (fenildopam) ve Ca kanal bloker gibi] kontrast madde etkisi ile oluşan vazokontrüksiyonu bloke etme, vazodilatasyonu artırma ve uyarılan ROT'u azaltma etkileri üzerine odaklanmıştır. Bu maddeler kanıt yetersizliği olması ve kesin faydaları saptanamadığı için günümüzde önerilmemektedir. Ek olarak askorbik asidin kontrast nefropatisi önlemede fayda sağlayamadığı görülmüştür (85).

#### **2.1.5.4. Kontrast maddeyi temizlemede kullanılan teknolojiler**

Perküten koroner anjiyografi sırasında sağ femoral ven üzerinden koroner sinüse katater takılarak kontrast madde dolaşıma geçmeden temizleyen bir teknik mevcuttur. Bu teknikle ortalama temizlenen kontrast madde %49,4 olarak hesaplanmıştır. Bu teknik kontrast nefropatisi riskini azaltmak için fayda ve güvenli bir yöntem olabilir ancak ileri teknoloji gerektirmesi ve ortalama başarısızlık oranı %57 olması nedeniyle günümüzde klinikte kullanımı sınırlıdır (86,87).

#### **2.1.5.5. Diyaliz**

Böbrek yetmezliği olan hastalarda kontrast madde atılımı gecikmiştir. Bir seans HD %60- %90 oranında kontrast maddeyi kandan temizler (88).

Kontrast maddeler orta büyüklükte moleküllerdir. Kontrast maddeyi daha hızlı bir şekilde temizlemek için yüksek akım membranı olan hemofiltrasyon veya hemodiyofiltrasyon modelleri kullanılır. Diyaliz inflamatuvar reaksiyonları aktif ederek ve vazoaaktif maddelerin salınımına neden olup hipotansiyonu uyarır ve sonuç

olarak renal fonksiyonları bozular (85,86).

Güncel bir meta-analizde diyalizin diğer tedavi yöntemlerine göre kontrast nefropatisini azaltmadığı gibi insidansını arttırdığı görülmüştür (89). Başka analizlerde de evre 3 KBH olanlarda kötüleştirici etkisi görülmüştür (85,89). Profilaktik HD önerilmemektedir, yüksek riskli KBH olan hastalarda kontrast nefropatisine sekonder böbrek fonksiyonları bozulduğunda önerilmektedir (85).

Periton diyalizi alan hastalarda kontrast maddenin rezidual böbrek fonksiyonları üzerindeki etkilerini inceleyen az sayıda çalışma mevcuttur (90). Kontrast madde etkin bir şekilde periton diyalizle (intermitten periton diyalizi, otomatik periton diyalizi ve sürekli ambulator periton diyalizi) temizlenir (88). Periton diyalizi hastalarında kontrast madde kullanımı sonrasında hemen periton diyalizinin başlanması gerekmektedir (14).

## **2.2. Hayvan Deneylerinde Kontrast Nefropatisi Modelleri**

Renal yapıları duyarlı hale getirerek kontrast nefropatisi oluşumunu indüklemek amacıyla, kontrast madde vermeden önce sıçanları belirli bir süre dehidrate bırakmak, tek taraflı nefrektomi yapmak veya furosemid enjekte etmek gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (91,92). Bu yöntemlerle ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar elde edildiği gibi kontrast nefropatisi oluşumu sağlanamayan bildiriler de yayınlanmıştır (93,94). Özellikle Sun ve ark. tarafından sıçanlarda etkin kontrast nefropatisi modelini tespit etmek üzere dört farklı teknik uygulanmıştır. Bu uygulamalardan 1. ve 4. gruptaki sıçanlar 72 saat, 2. gruptaki sıçanlar 24 saat, 3. gruptaki sıçanlar ise 48 saat dehidrate bırakıldıktan sonra kontrast madde verilmiştir. 1. grup hariç diğer gruplara kontrast madde verilmeden 20 dk önce furosemid enjekte edilmiştir. Literatürdeki yaygın sonuçların tersine bu gruplardan sadece 4.grupta kontrast nefropatisi modelinin oluşabildiği vurgulanmıştır (94).

İlk kez 1994 yılında Agmon ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise farklı bir model uygulanmıştır. Kontrast nefropatisi patogenezinde önemli bir yeri olan ve endotelden salınan en etkili vazoaaktif mediyatörlerin 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. dk'da indometazin 10 mg/kg dozunda i.v, 15. dk'da L-NAME 10 mg/kg dozunda i.v ve son olarak da 30. dk'da kontrast madde 6 ml/kg dozunda i.v uygulanmıştır. Lazer-doppler kullanılarak intrarenal kan akımı ölçülerek farmakolojik inhibisyon sonrası kontrast madde verilmesi ile medüller kan akımının %14 azaldığı saptanmıştır. Aynı çalışmada renal fonksiyon parametrelerinde anlamlı oranda bozulma ile birlikte böbrekler histopatolojik olarak incelenmiş, medüller alanda %50 selektif nekroz görüldüğü rapor edilmiştir (95). Sonraki dönemlerde sıklıkla bu teknikle kontrast nefropatisi modeli oluşturulmaya karar kılınmış ve profilakside önerilen tedaviler bu model üzerinden denenmiştir (96-98). Yine bu model üzere Gong ve ark. tarafından yapılan çalışmada uygulanan indometain, L-NAME ve kontrast madde i.v yerine intraperitoneal (i.p) verilerek de başarılı bir model oluşturulabilmiştir (99).

### **2.3. Kontrast Nefropatisi ve İnflamasyon**

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sepsis gibi inflamatuvar durumlarda kontrast nefropatisi riskinin arttığı gösterilmiştir. İnflamatuvar mediyatörlerin pro-trombotik etkileri ve kontrast madde uygulanması sırasında gelişen vazokonstriksiyon nedeniyle kontrast nefropatisi riskinin artacağı düşünülmektedir (100). Multiple myelom, maligniteler, sepsis gibi pro-trombotik inflamatuvar durumlarda artan IL-6'nın, özellikle C-reaktif protein (CRP) başta olmak üzere akut faz reaktanı üretimini arttırdığı bilinmektedir. CRP, inflamasyonun başlangıcından 6 saat sonra normal sınırların üzerine çıkar, 48. saatte zirve yapar ve inflamasyon durduğunda hızlı düşer. Kwas ve ark. tarafından yapılan bir kohort çalışmada CRP değeri normal grupta kontrast nefropatisi insidansı %6,25 iken, CRP değeri yüksek olan grupta ise %13,5'e çıkmaktadır. Aynı çalışmada, inflamasyonu olan hastalarda kontrast nefropatisi gelişme riskinin iki kat arttığı gösterilmiştir (22).

Bir kontrast madde olan sodyum diatrizoatın insan renal proksimal tübüler hücrelerden IL-8 salgılanmasına neden olduğu ve bu da inflamasyonun kontrast nefropatisi gelişiminde önemli olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, birçok hayvan çalışmasında nükleer faktör (NF) -kB'nın kontrast nefropatisinde böbrek inflamatuvar yanıtı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. NF-kB'in transkripsiyon, DNA onarımı gibi birçok görevi olup; hücre hasarında dokulardaki monosit ve makrofajlardan

salgılanan pro-inflamatuar bir sitokin olan High mobility group box-1 (HMGB-1) kontrast nefropatisinde ve iskemi/reperfüzyon hasarı (İRH), diyabetik nefropati, granümatöz nefrit gibi birçok böbrek hastalığında önemli rol almaktadır. Kontrast madde uygulanması sonrasında renal tübüler epitel hücrelerinden salınan HMGB-1; inflamatuvar reseptörler olan Toll benzeri reseptör (TLR)-2 ve özellikle kemotaksiste görevli C-X-C kemokin reseptörü (CXCR4)'ü aktive edip inflamasyonu tetiklemesi kontrast nefropatisi gelişmesinde önemlidir. Kontrast nefropatide; TLR2 ve CXCR4, HMGB-1 bağımlı yolak ile NF-kB aktivasyonu, IL-6 ve Monosit kemotaktik protein (MCP)-1 salınımı ile inflamasyon tetiklenmektedir (101).

Zhao ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, böbreklerden salınan katekolaminleri azaltan, kan basıncını ve kardiyak fonksiyonları düzenleyen bir monoamin oksidaz olan renalazın ROT, oksidatif stresi, makrofaj infiltrasyonunu, caspase-3 aktivitesini suprese edip renal apoptozisi ve inflamasyonu azaltarak kontrast nefropatisine karşı potansiyel terapötik olabilecek koruyucu etkileri olduğunu gösterilmiştir (102).

ERK (ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz), P38, NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK)'nin de içinde olduğu MAPK (mitojen aktive c-Jun protein kinaz) ailesi hücre farklılaşması, çoğalması ve ölümünde önemli bir serin-tirozin kinaz grubudur. MAPK yolağı ve Hsp27 (ısı şok protein) tümör nekroz faktörü TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilir. Xuyu He ve ark. sıçanlarda atorvastatinin JNK/p38/Hsp27 yolakları üzerinden inflamasyonu ve apoptozu azaltarak kontrast nefropatisini önlemede koruyucu olduğunu göstermişlerdir (103). Benzer şekilde Deng ve ark. diyabetik sıçan modelinde rozuvastatinin inflamasyonu ve apoptozisi baskılayarak, oksidatif stresi ve p38/MAPK yolağını inhibe ederek kontrast nefropatisini azalttığını göstermişlerdir (104).

Kontrast nefropatisi gelişmesinde önemli risk faktörlerinden biri olan hipertansiyonun (HT) patogenezinde inflamasyon tam olarak aydınlatılmayan mekanizmalarla da olsa oldukça önemlidir. HT ile inflamasyon arasındaki ilişki vagus siniri önemli bir rol oynamaktadır. Hipertansif hastalarda vagal tonusun ve fonksiyonların azalmasıyla oluşan sempatovagal dengesizlik inflamasyonun nedeni

olarak görülmektedir (105). 2-böbrek 1-klip (2K1C) modeliyle çalışılan renovasküler HT'lu sıçanlarda; vagal fonksiyonları yansıtan ve kardiyak vagal tonusun klasik bir göstergesi olan 'atropine taşikardik yanıt'ın azaldığı, aort ve böbrekte  $\alpha 7nAChR$  downregulasyonunun olduğu, serum TNF- $\alpha$  arttığı gösterilmiştir. RAAS, anjiyotensin 2 ve renin seviyelerini arttırıp, inflamasyonu uyararak, vasküler remodelling, renal fibrozis ve disfonksiyon gibi son-organ hasarına katkıda bulunmaktadır (106). Spontan hipertansif sıçanların,  $\alpha 7nAChR$  agonisti PNU-282987 ile kronik tedavisinin son-organ hasarını ve pro-inflamatuar sitokinlerin doku düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (107).

#### **2.4. Kolinerjik Sistem Aktivasyonunun Anti-İnflamatuar Etkileri**

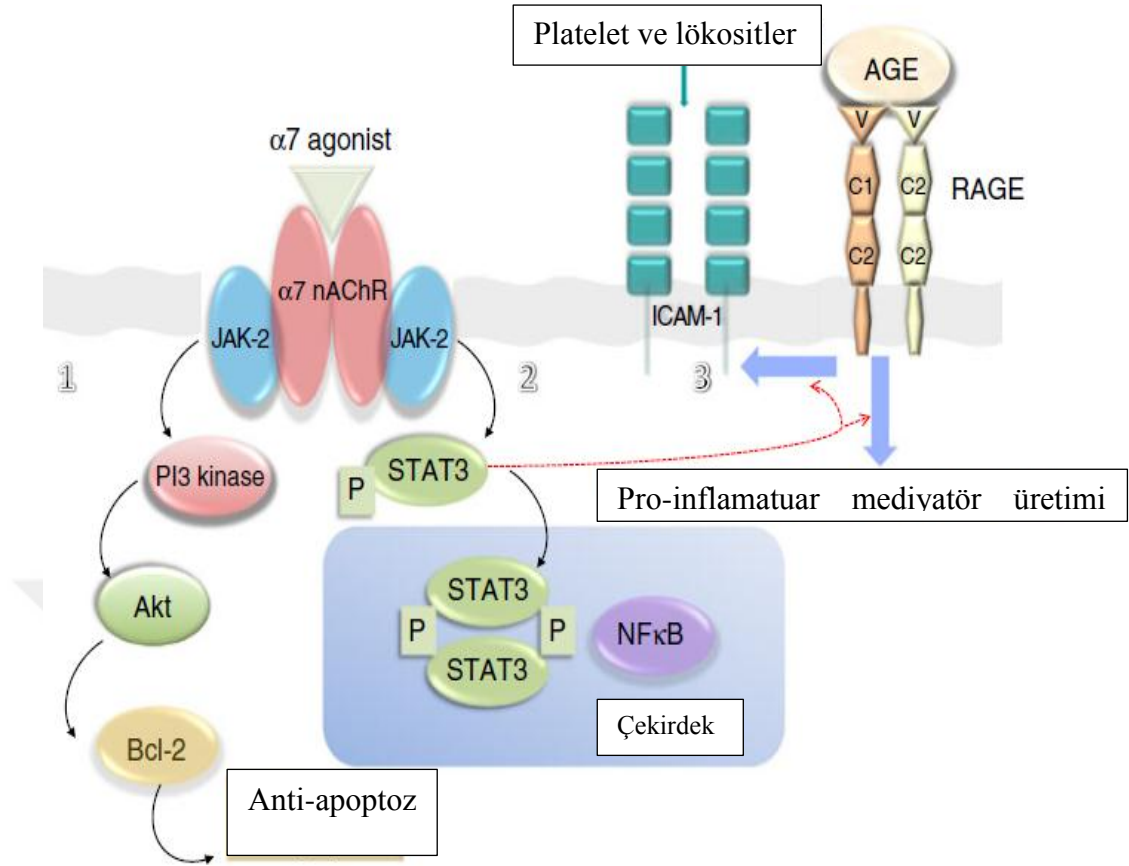
Kolinerjik anti-inflamatuar yolak, vagus siniri ve reseptörleri aracılığıyla pro-inflamatuar sitokin salınımını inhibe eden nöral bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır. Vagus sinirinin ana nörotransmitteri asetilkolin (ACh)'dir. Kolinerjik anti-inflamatuar yolak; vagus sinirinin efferent kolu, ACh ve  $\alpha 7nAChR$ 'den oluşmaktadır. Hasarlı dokudan inflamasyona sekonder olarak üretilen pro-inflamatuar sitokinler merkezi sinir sisteminde (MSS) vagus sinirinin efferent kolunu aktive edip periferel dokularda ACh salınımına neden olmaktadır. Kolinerjik anti-inflamatuar yolun elektriksel olarak vagus sinirinin uyarılmasıyla aktivasyonunun, yanık hasarı oluşturulmuş sıçanlarda karaciğer inflamasyonu, İRH (108), hemorajik şok (109), septik peritonit (110) modellerinde artmış serum TNF- $\alpha$  seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Kolinerjik sinirler ile immün sistem arasındaki iletişim için  $\alpha$  bungaratoksin ( $\alpha$ -BTx) duyarlı kolinerjik nikotidik reseptör olan  $\alpha 7nAChR$ 'lerin gerekli olduğu ve bu reseptörün MSS, otonom sinir sistemi ve vasküler sistemdeki nöronal hücreler dışında; makrofajlar, nötrofiller, endotelial hücreler, dendritik hücreler başta olmak üzere diğer birçok immün hücrede de eksprese edildiği gösterilmiştir (111).  $\alpha 7nAChR$  knockout farelerde, tek başına VNS ile TNF- $\alpha$  düzeyinin azalmadığı gösterilmiş olup kolinerjik anti-inflamatuar yolakta  $\alpha 7nAChR$  mutlaka gerekli olduğu anlaşılmıştır (112).

$\alpha 7nAChR$  agonistlerinin; post-transkripsiyonel bir mekanizmayla endotoksinle uyarılmış insan makrofajlarında TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-18, HMGB-1 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin serbestleşmesini inhibe edip IL-10 ve transforme

edici büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ) gibi anti-inflamatuar sitokinleri ise inhibe etmediği farklı modellerde gösterilmiştir (108-112). Bu nedenle Crohn, psöriazis, astım, sepsis, RA ve DM gibi hastalıkların tedavisinde denenmektedirler (111-113).

Sinyal transdüksiyonu sitokin eksprese eden hücrelerdeki  $\alpha 7nAChR$  aracılığıyla janus kinaz (JAK)-2 fosforilasyonu ile sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon faktörü (STAT)-3'ün aktivasyonu sonucunda NF- $\kappa B$  translokasyonunda azalma ile gerçekleşmektedir. NF- $\kappa B$  immün hücrelerin aktivasyonunda ve pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunda düzenleyici olarak rol oynamaktadır (Şekil 2) (114).

JAK/STAT üyeleri tirozin kinaz enzimleri ve transkripsiyon faktörleridir. Dört JAK enzimi içinde vasküler ve nöronal sistemde nikotin ilişkili etkileri en bilinen JAK-2'dir. Reseptör aktivasyonu sonrasında, ilgili JAK proteini STAT-3 reseptörün sitoplazmik kısmının SH2 bölgesini fosforile eder, böylece JAK proteini tarafından fosforile edilen ve nükleusta transloke olan STAT-3 göreve başlar. PI3K (fosfatidilinositol 3-kinaz) ve AKT'nin (protein kinaz B) aktive edilip hücre yaşam döngüsünde anti-apoptotik olarak JAK-2'nin anahtar rolü bulunmaktadır.  $\alpha 7nAChR$  agonistlerinin nöroprotektif etkileri bu yolak sayesinde. Anti-inflamatuar aktiviteleri için alternatif bir mekanizma da AGE (ileri glikasyon son ürünleri) 2-3 aracılı monosit aktivasyonu ve ICAM (intraselüler adezyon molekülü)-1 aracılıklardır (Şekil 2) (115-116).

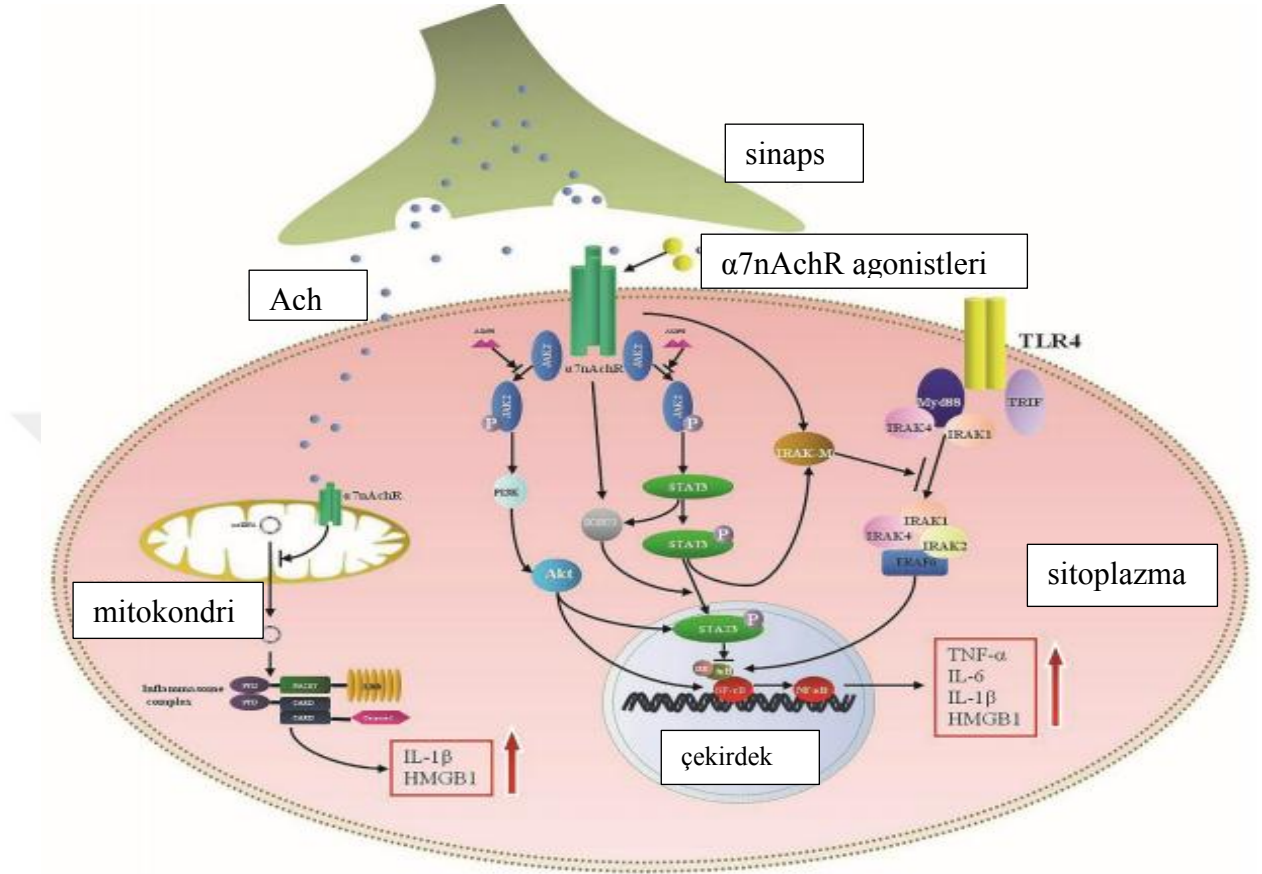


**Şekil 2:  $\alpha 7$ nAChR odaklı anti-inflammatuar etkiler**

$\alpha 7$ nAChR agonistleri JAK-2 aktivasyonuna sebep olurlar. Bu aktivasyon sonucunda 1) PI3K üzerinden Akt aktivasyonu ve anti-apoptotik yolak aktive olur 2) STAT-3 fosforilasyonu ve NF- $\kappa$ B inhibe olur 3) RAGE-ilişkili ICAM-1 upregülasyonu ve TNF/ IFN- $\gamma$  üretimi inhibe olur. Bu yolların aktive olması ile hem inflamasyon hem de apoptozis  $\alpha 7$ nAChR agonistleri ile tedavi edilen hücrelerde inhibe edilebilir (Marrero MB, et al. Application of Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists in Inflammatory Diseases: An Overview. Pharm Res (2011) 28: 413–416'den uyarlanmıştır).

Fosforile STAT-3 NF- $\kappa$ B ve kilit düzenleyicisi olan I $\kappa$ B ile arasındaki ayrışmayı baskılayıp NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe eder. Aktive STAT-3; anti-inflammatuar reaksiyon için gerekli olan Sitokin sinyali supresörü (SOCS)-3 ve interlökin-1 reseptör ilişkili kinaz (IRAK)-M ekspresyonunu artırır. IRAK-M; myeloid farklılaşma faktörü (MyD)'den IRAK 1 ve 4 ayrışmasını engelleyerek TLR aktivitesini düzenler. TNF reseptör ilişkili faktör (TRAF)-6 ile bağlanıp NF- $\kappa$ B

üzerinden pro-inflamatuar sitokinleri baskılar. Mitokondri de  $\alpha 7nAchR$  eksprese etmektedir, mitokondrial inflamasom ve PI3K-AKT yolağı üzerinden de pro-inflamatuar sitokin salınımını azaltmaktadır (Şekil 3) (116).



### Şekil 3: Anti-inflamatuar yanıtta $\alpha 7nAchR$ 'un intraselüler sinyal yolağı

(Ren C et al. The Protective Effect of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation on Critical Illness and Its Mechanism. Int J Biol Sci. 2017 Jan 1;13(1):46-56'dan alınmıştır.)

### 2.5. Alfa-7 Nikotinik Asetilkolin Reseptörünün Yapısı ve Fonksiyonları

Nikotinik asetilkolin reseptörleri (AChR); A ve C  $\gamma$ -aminobütirik asit, glisin ve tip 3 serotonin (5-hidroksitriptamin) reseptörlerini içeren Cys-loop ligand-gated iyon kanalı süper ailesine ait bir reseptör ailesidir (117). En az 17 farklı alt birimin hetero veya homo pentamer kombinasyonlarından oluşur. Her alt birim farklı özellikler gösterir, örneğin  $\beta$  altbirimleri ACh'e  $\alpha$ 'dan daha düşük affinite gösterir.



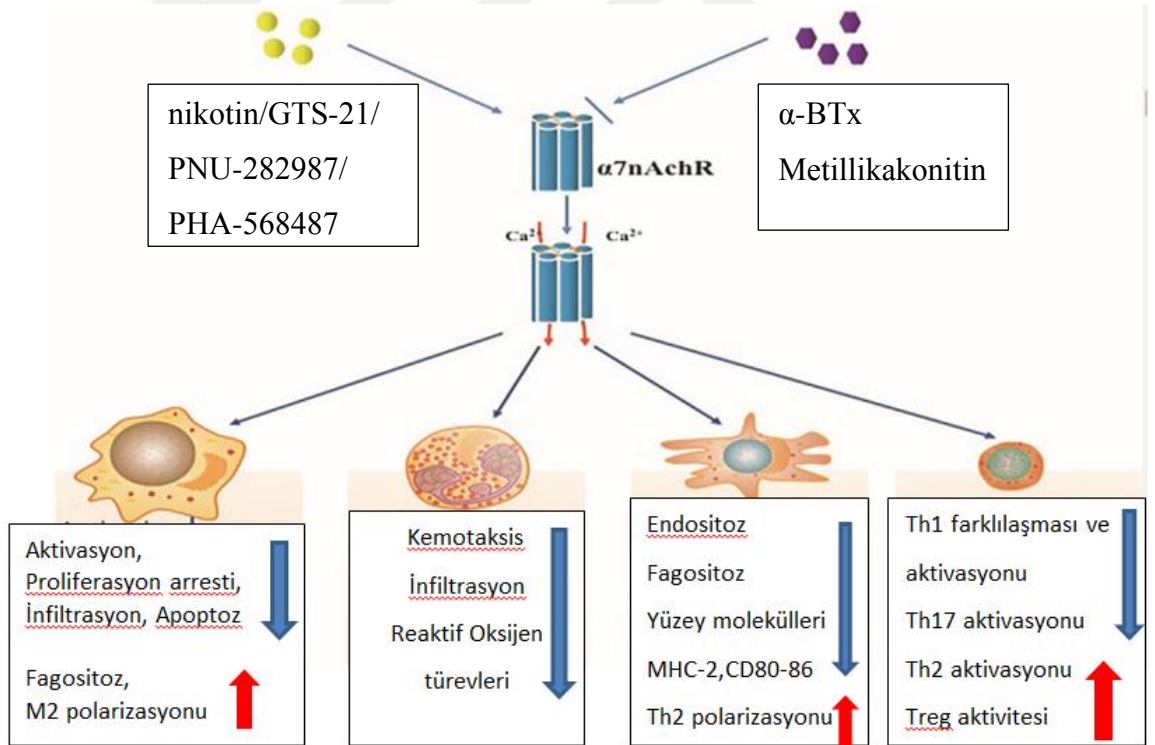
Bunların çeşitli kombinasyonları farklı fonksiyonlar gösterir. Örneğin Ach'e yüksek affinite gösteren  $\alpha 4\beta 2$  reseptörleri nörodejeneratif hastalıklarda çalışılmıştır (116).

MSS'de AChR'leri iki ana alt sınıfa aittir (117).

1- $\alpha$ -BTx'e (kompetatif antagonist) yüksek afinite ile bağlayıp nikotine düşük affinite gösteren reseptörler (örneğin  $\alpha 7$  içeren reseptörler)

2- Nikotini yüksek afinite ile bağlayıp  $\alpha$ -BTx'e düşük affiniteli reseptörler (örneğin  $\alpha 4\beta 2$  içeren reseptörler)

Klasik  $\alpha 7nAChR$ , beş özdeş  $\alpha 7$  alt birimden ve  $Ca^{+2}$  için yüksek geçirgenliğe sahip merkezden oluşan bir homomerik pentamerdir. Nikotin, GTS-21, PNU-282987 ve PHA-568487 geçici  $Ca^{+2}$  akışıyla  $\alpha 7nAChR$ 'i aktive edebilen  $\alpha 7nAChR$  agonistleridir. Dinlenme durumunda, kapı kapalı ve  $Ca^{+2}$  iyon akışı engellenmiştir. Geçici  $Ca^{+2}$  akışı sonrasında reseptör aktive olur. Aktive edilmiş  $\alpha 7nAChR$ ,  $\alpha$ -BTx metillikakonitin gibi  $\alpha 7nAChR$  antagonistleri tarafından engellenip bağışıklık hücrelerinin işlevi etkilenebilir (Şekil 4) (116).



**Şekil 4: Aktive  $\alpha 7nAChR$ 'nin sırasıyla makrofaj, nötrofil, dendritik hücre ve T lenfosit üzerine etkileri**

(Ren Chao, et al. The Protective Effect of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor

Activation on Critical Illness and Its Mechanism. Int J Biol Sci. 2017 Jan 1;13(1):46-

56'dan uyarlanmıştır.)

### **2.5.1. $\alpha 7nAChR$ ve immün fonksiyonları**

Kolinergik anti-inflamatuar yolak, doğal (innate) ve adaptif (kazanılmış-edinsel) immün sistemi ve bu sistemlerin birbiriyle olan ilişkilerini düzenler.

Makrofajlar inflammatuar mediyatörlerin ana kaynağıdır. İnflamasyonun başlangıç evrelerinde makrofajlar aktive olur; mikropları, ilişkili metabolitleri ve apoptotik hücreleri yok etmek için hedef lezyonlara göç ederler. Aktive makrofajlar daha fazla makrofajı aktive etmek için MIP-1 $\alpha$  (makrofaj inflammatuar protein-1 $\alpha$ ) ve IL-8 salgılar. M1 makrofajlar proinflammatuar mediyatörler üretirken, M2 makrofajlar anti-inflamatuar fonksiyonlara sahip olup yara iyileşmesi ve fibrozis ile ilişkilidir. Fagositoz, apoptozis ve polimerizasyonun M2 fazında makrofajların birçok görevi bulunmaktadır.  $\alpha 7nAChR$  uyarılmasıyla makrofaj aktivasyonu ve apoptozis azalırken, fagositoz ve M2 polarizasyonu artmaktadır (Şekil 4) (116).

Nötrofiller doğal immün yanıtın önemli elemanlarıdır ve akut inflamasyonda erken dönemden itibaren nötrofil göçüyle, kemotaksis, apoptozis gibi önemli görevleri vardır.  $\alpha 7nAChR$  uyarılmasıyla bunlar azalarak anti-inflamatuar etkilerine katkıda bulunur (Şekil 4) (116).

Dendritik hücreler (DC) antijen sunan hücrelerdir ve Th hücre polarizasyonunu indükleyerek doğal ve adaptif immün sistemler arasında köprü görevi yapmaktadır. Matür hale geldiklerinde; CD80, CD86 ve CD40 dâhil kostimulatuar molekülleri ve MHC (majör doku uygunluk kompleksi)-I, MHC-II'yi eksprese ederler. Çalışmalar, immatür DC'lerin  $\alpha 7nAChR$  aktivasyonundan sonra endositoz ve fagositozu azalttığı; matür DC'lerin ise MHC-2, CD80, C86 gibi yüzey molekül ekspresyonunu azalttığını göstermektedir (şekil 4) (116).

Adaptif immun sistemin önemli parçaları olan T hücreleri; yardımcı T hücreleri (Th), sitotoksik T hücreleri (Tc) ve regülatuar T hücreleri (Treg) olmak üzere üç tiptir. Th hücreler ise Th1, Th2 ve Th17 alt gruplarından oluşmaktadır. CD4<sup>+</sup> T hücreler ve bu hücrelerin  $\alpha 7nAChR$  ile etkileşimi, kolinergik anti-inflamatuar yolak için oldukça önemlidir.  $\alpha 7nAChR$  agonistlerinin anti-inflamatuar etkisinin nude farelerde TNF- $\alpha$  üretimini baskılamadığı, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> lenfosit

transferiyle bu etkinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (118). Ach, otokrin veya parakrin tarzda T hücreleri tarafından sentezlenip ve salınır, bu da fonksiyonel homeostazın korunmasında T hücrelerinin self-regülatuar etkisini göstermektedir. Çalışmalarda  $\alpha 7nAChR$  aktivasyonunun Th1 farklılaşması ve aktivasyonunu, Th17 aktivasyonunu azalttığı, Th2 farklılaşması ve Treg aktivitesini [CTLA (sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen)-4 ve Foxp3 (forkhead box protein p3) ekspresyonunu arttırıp, IL-2 seviyesini azaltma] arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 4) (116).  $\alpha 7nAChR^{-/-}$  hayvan modellerinde T hücreleri Th1'e farklılaşmaya meyillidirler (119).

### **2.5.2. $\alpha 7nAChR$ ve dalak**

Dalak; karın boşluğunun solunda bulunan en büyük lenfoid organdır. Diğer lenfatik dokulardan farklı olarak doğrudan kan dolaşımına bağlıdır. Dalağın parankimi kırmızı ve beyaz pulpa olmak üzere iki kısma ayrılır. Antijen sunma ve immün cevabı başlatma; B ve T lenfositlerin aktivasyonu, proliferasyonu, antikor üretimi ve makromoleküler antijenlerin kandan ayrılması gibi immün fonksiyonlarını beyaz pulpa üstlenmektedir. Anormal, yaşlı ve hasarlı eritrositler ve plateletlerin yıkımı; Hb'den Fe'in alınması, erken fetal yaşamda eritrositlerin oluşumu ve kanın depolanması gibi hematopoetik fonksiyonları ise kırmızı pulpada olmaktadır.

Dalak,  $\alpha 7nAChR$ -pozitif makrofajları ve Ach üreten ChAT-pozitif T lenfositleri ile kolinerjik anti-inflamatuar yolakta kritik bir organdır ve immün aracılı hastalıklar için potansiyel bir terapötik hedeftir. Splenik sempatik sinirden salınan norepinefrin, yakındaki ChAT eksprese eden splenik hafıza T hücreleri ve B hücreleri üzerinde  $\beta 2$ -adrenerjik reseptörlere bağlanır. Splenik ACh üreten T hücrelerinin bu alt kümesi, splenik makrofajlar üzerindeki  $\alpha 7nAChR$ 'in uyarımıyla makrofajları aktive edip makrofajlardan LPS (lipopolisakkarit) ile indüklenen TNF- $\alpha$  başta olmak üzere pro-inflamatuar sitokin salınımını azaltırlar (10).

### **2.5.3. $\alpha 7nAChR$ 'lerin sistemik etkileri**

Kontrolsüz inflamasyon ve immün hücre disfonksiyonuyla giden birçok kritik hastalıkta  $\alpha 7nAChR$  aktivasyonunun faydaları gösterilmiştir (Tablo3) (116).

**Tablo 3: Kritik hastalıklarda  $\alpha 7nAchR$  aktivasyonunun etkileri**

<b>Kritik Hastalık Tipi</b>	<b><math>\alpha 7nAchR</math> Etkileri</b>
Yanık/Travma	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hücre ölümünden koruma</li><li>• Nötrofil göçünün, lokal ve sistemik inflamasyonun ve sonuçta organ hasarının azaltılması</li><li>• Bağırsak bariyerini koruma</li><li>• Sağkalımı artırma</li></ul>
Sepsis	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bakteriyal klirensin artırılması</li><li>• Nötrofil göçünün, pro-inflamatuar sitokin ekspresyonunun, kemokin üretiminin, sistemik inflamasyonun ve sonuçta organ hasarının azaltılması</li><li>• Sağkalımı artırma</li></ul>
Akut Akciğer Hasarı	<ul style="list-style-type: none"><li>• Akciğer ödemi azaltma</li><li>• Nötrofil birikimini, TNF-<math>\alpha</math> salınımını ve pulmoner apoptozu azaltma</li><li>• Alveoler arterin gradientini düşürme</li><li>• Pulmoner endotelin bütünlüğünü koruma</li></ul>
Renal İRH	<ul style="list-style-type: none"><li>• Serum TNF-<math>\alpha</math> ve HMGB1 düzeyinin azaltılması</li><li>• Renal fonksiyonların iyileştirilmesi</li><li>• Tübüler hücre nekrozunun azaltılması</li><li>• Enfarkt hacminin azaltılması</li><li>• Nötrofil infiltrasyonunu azaltma</li><li>• Süperoksit radikal üretimini baskılama</li><li>• Oksidatif stresi azaltma</li><li>• Sistemik inflamatuvar yanıtı inhibe etme</li></ul>
Akut Pankreatit	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pankreatik nötrofil infiltrasyonunu inhibe etme</li><li>• Plazma TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, amilaz ve lipaz düzeyini azaltma</li><li>• Deneysel pankreatitin şiddetini azaltma</li></ul>

Bernik ve ark. tarafından sıçanlarda aortik okluzyon yapılarak oluşturulan miyokard enfarktüs modelinde VNS ile serum, kalp ve karaciğerdeki TNF- $\alpha$  düzeylerinin ve fatal aritmilerin azaldığı gösterilmiştir (108).  $\alpha 7nAChR$  aktivasyonu sadece inflamasyonu, apoptozu ve oksidatif stresi inhibe etmekle kalmayıp aynı zamanda anjiyogenezini de destekler. Vagal fonksiyonları düzenleyen ve özellikle kardiyovasküler hastalıklarda bozulan en önemli mekanizma arteriyal baroreflektir. Yu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada; arteriyal barorefleks disfonksiyonunun  $\alpha 7nAChR$  aracılığı ile iskemi sonrası anjiogenezi azalttığı gösterilmiş olup miyokard enfarktüsünde barorefleks, vagal aktivite ve  $\alpha 7nAChR$ 'ün önemli rolü olduğu anlaşılmış ve bunlara yönelik tedavi stratejileri araştırılmaktadır (120).

Son yıllarda bazı nikotinik agonistler, kolinerjik sistem aktivasyonu sağlayarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanıma aşamasına gelmiştir. Örneğin  $\alpha 4\beta 2$  agonistlerden ABT-418 Alzheimer, Parkinson, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğunda; ABT-594 analjezik olarak; TC-1734 hafıza ve öğrenme üzerinde; GTS-21 Alzheimer, şizofreni, sigara bağımlılığı, dikkat eksikliği ve hiperaktivite tedavisiyle ilgili çalışmalarda; vareniklin sigara bağımlılığı tedavisinde kullanılmaktadır.

#### **2.5.4. $\alpha 7nAChR$ aktivasyonunun çeşitli böbrek modellerinde kullanımı**

Vagal sinir uyarısının RA, inflamatuvar bağırsak hastalığı, sepsis gibi inflamatuvar hastalık modellerinde; nörolojik, immünojenik, hematopoetik, gastrointestinal sistemler üzerine koruyucu etkileri gösterildikten sonra  $\alpha 7nAChR$  agonistleri birçok böbrek modelinde de kullanılmıştır.

İskemi/reperfüzyon hasarı beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve bağırsak gibi birçok organı etkiler. İskemik hasarlanma ile ROT üretimi artar, bu hücre içi  $Ca^{+2}$  birikimine ve endotel hasarına neden olur. Daha sonraki reperfüzyon aşaması, şiddetli doku hasarı, kontrolsüz sistemik inflamasyon ve çoklu organ yetmezliği ile karakterizedir (116). Renal İRH modellerinde VNS ile serum TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-15 gibi sitokinlerin azaldığı, kolinerjik anti-inflamatuvar yolak aktivasyonunun böbrek üzerine koruyucu etkileri olduğu ve dalağın da bu yolağın önemli bir parçası olduğu bilinmektedir. Inoue ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada  $\alpha 7nAChR$ -pozitif

makrofajlar ve Ach sentezleyen ChAT-pozitif T-hücrelerinden oluşan dalağın anti-inflamatuar yolağı US ve VNS ile aktive edilirken splenektomi yapılmış olan gruplarda ise VNS ile gerçekleşen bu aktivasyonun ortadan kalktığı gösterilmiştir. Wild tip farelere VNS uygulanmasından 1 gün sonra bu farelerden elde edilen splenositlerin  $\alpha 7nAChR$  knockout farelere transferi ile bu farelerin İRH'dan korunduğı anlaşılmıştır. Sonuçta kolinerjik sistemin önemli bir koordinasyon merkezi olan dalağın; splenositlerinin immün mekanizmalarla aktive olmasıyla İRH azaldığı gösterilmiştir (10). Bir başka çalışmada miyokardiyal İRH sırasında  $\alpha 7nAChR$  aktivasyonunun, serum TNF- $\alpha$  ve HMGB-1 seviyesini baskıladığı, nötrofil birikimini ve tübüler nekrozu azaltarak renal İRH'da koruyucu olduğu tespit edilmiştir (121).

Silva ve ark. tarafından yapılan; tek taraflı üreter obstrüksiyon modelinde vagal sinir uyarısıyla Ach salgılayan vesiküler asetil kolin transporter (VAChT) baskılanmış sıçanlarda fibrozisin arttığı, buna karşın VAChT ekspresyonu normale yakın olan sıçanlarda fibrozisin azaldığı gösterilmiştir (122).

Chatterjee ve ark tarafından yapılan bir çalışmada; antineoplastik bir ajan olan sisplatin 20 mg/kg, i.p. verilerek yapılan sisplatin nefrotoksisitesi modelinde GTS-21 (4 mg/kg, günde 2 kez i.p) kullanılmıştır. GTS-21 'in oksidatif stresi, ATP tüketimini, doku hasarını ve apoptozisi, renal inflamasyonu (IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL-1) ve myeloperoksidaz (MPO) ile değerlendirilen renal nötrofil infiltrasyonunu azalttığı ve bunu yaparken de sisplatinin anti-tümör etkisini azaltmadığı gösterilmiştir (123). Birçok solid tümörün tedavisinde kullanılan platin bileşiğı bir kemoterapotik ajan olan sisplatinin en önemli yan etkisi olan nefrotoksisite inflamasyon, ROT, tübüler hücre hasarı ve sonunda hücre ölümüne yol açarak renal proksimal tübüler hücreler üzerindedir. Renal COX-2, inflamasyonu artırarak sisplatin ilişkili ABH'nda rol oynar. COX-2 araşidonik asitten PG oluşumunda rol alan, birçok anti-inflamatuar ilacın hedefi olan bir enzimdir. COX-2 inhibisyonu ile inflamatuvar hücreler azalır ve sisplatin ilişkili ABH'a karşı korur (124). Sisplatin ilişkili ABH'nın İRH ve sepsis ilişkili ABH'dan farkı sisplatin birikimi ve DNA (deoksiribo nükleik asit) hasarı olduğundan irreversibl oluşudur. Amifostine, sisplatin nefrotoksisitesine karşı koruyucu etkileri olan tek FDA onaylı ilaçtır (123).

Sepsis sırasında üretilen pro-inflamatuar mediyatörler, intrarenal

hemodinamik değişiklikler, endotelial disfonksiyon, lökosit infiltrasyonu ve hasarlı doku inflamasyonuyla böbrek yetmezliğine neden olurlar. Gram negatif bakterilerin ana endotoksini olan LPS tarafından indüklenen deneysel endotoksemi, septik ABH için en sık kullanılan modeldir. Chatterjee ve ark tarafından yapılan başka bir çalışmada LPS ile septik ABH modelinde; nikotin (1 mg/kg) ve GTS-21 (4 mg/kg, günde 2 kez i.p) kullanılmıştır. GTS-21'in MPO ile değerlendirilen renal lökosit infiltrasyonunu, serum BUN (kan üre nitrojen), TNF- $\alpha$ , CCL-2 (C-C kemokin ligandı), kemokinlerden CXCL-8, CXCL-10 seviyesini, NF- $\kappa$ B aktivasyonunu ve proteozom aktivitesini azalttığı gösterilmiştir (125).

Sekonder hipertansiyonun en sık nedenlerinden biri olan renovasküler HT sıçanlarda 2K1C modelinde çalışılmaktadır. Bu modelde RAAS'nin uygunsuz aktivasyonu; inflamatuvar yanıtı tetkikleyip hemodinamik, metabolik anormalliklere sonuçta da böbrek, beyin, kalp, damarlar başta olmak üzere son-organ hasarına neden olmaktadır. Chen ve ark tarafından yapılan bir çalışmada; 2K1C ile sekonder HT modeliyle vagus sinir fonksiyonu,  $\alpha$ 7nAChR ekspresyonu ve kolinerjik yolaktaki değişiklikler değerlendirilmiştir. 2K1C cerrahiden sonra vagus sinir fonksiyonunun azaldığı, aort ve böbrekte  $\alpha$ 7nAChR down-regulasyonunun olduğu ve 2K1C hipertansiyon modelinde serum TNF- $\alpha$  arttığı gösterilmiştir (106).

## 2.6. GTS-21 Yapısı ve Fonksiyonları

GTS-21 (3-(2,4-dimetoksibenziliden) anabasein (DMXB-A) selektif bir  $\alpha$ 7nAChR agonistidir. İlk tanımlanan alkaloidlerden biri olan anabasein; özellikle nöromusküler ( $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$  $\delta$  (embriyojenik);  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$  $\epsilon$ ) ve  $\alpha$ -BTx ile inhibe edilen  $\alpha$ 7nAChR'ler olmak üzere çeşitli reseptörleri uyarmaktadır.

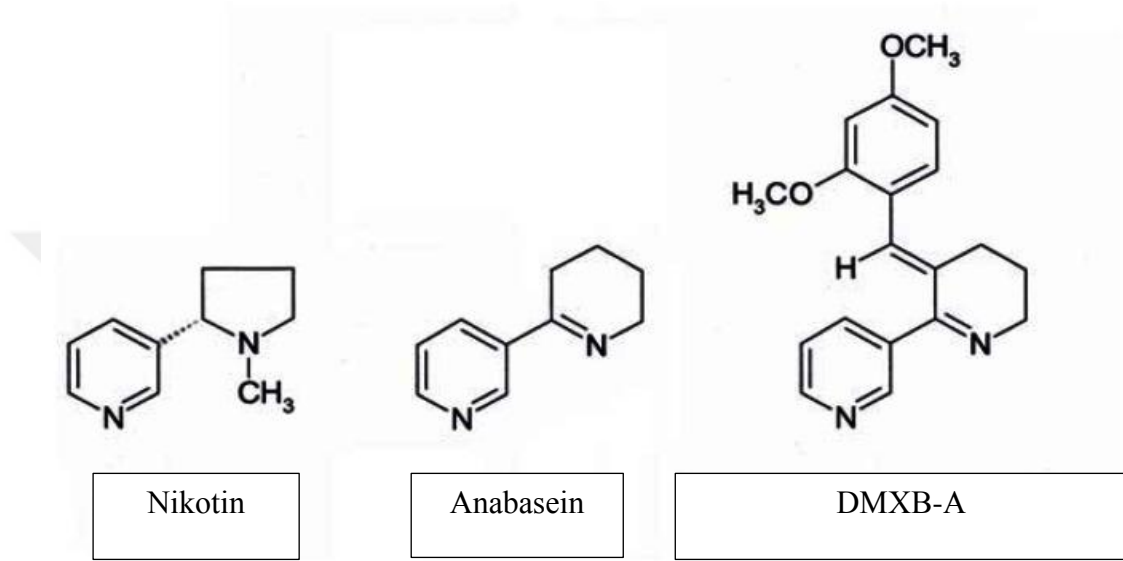
Anabasein geniş bir spektrumlu nikotinik agonist olsa da, son yirmi yılda sentezlenen çok çeşitli (> 200) anabaseinlerin  $\alpha$ 7nAChR üzerinde selektif agonistik etkileri olduğu görülmüştür.

3- (2,4-dimetoksibenziliden) -anabasein'in (DMXB-A) ; farmasötik adı GTS-21; Gainesville (Florida Üniversitesi) and Tokushima (Taiho Pharmaceuticals) (Scientists) bilimadamları tarafından üretilen 21.bileşik olmasından gelmektedir.

Kimyasal ismi: (3E)-3-[(2,4-dimetoksifenil)metilen]-3, 4, 5, 6-tetrahidro-2,3'-bipiridin, dihidroklorid

Kimyasal formülü:  $C_{19}H_{20}N_2O_2 \cdot 2HCl$  (Şekil 5)

Moleküler ağırlığı: 381,3 g/mol



**Şekil 5: Nikotin, Anabasein ve onun sentetik türevi olan GTS-21'in (3-(2,4-dimetoksibenziliden anabasein (DMXB-A)) kimyasal yapısı**

Nikotin,  $\alpha 2\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 4$ ,  $\alpha 2\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 4$ , and  $\alpha 7$  alt-birimlerine bağlanırken, selektif partial bir agonist olan GTS-21,  $\alpha 7$  ve  $\alpha 4\beta 2$  nAChR'leri bağlanır. Bununla birlikte, GTS-21 sadece  $\alpha 7$ nAChR'leri aktive eder. Ayrıca, GTS-21, insan  $\alpha 7$ nAChR'lerine göre kemirgen  $\alpha 7$ nAChR'leri için daha yüksek bir affiniteye sahiptir (124).

$\alpha 7$  reseptörler üzerine anabasein full agonist iken; GTS-21 parsiyel agonist, nikotin ise zayıf parsiyel agonisttir (117).

GTS-21; lipofilik bir bileşik olduğundan gastrointestinal sistem ve kan-beyin bariyeri de dâhil biyolojik membranları kolaylıkla geçebilir ve çok kısa sürede kan ve beyindeki pik konsantrasyonlarına ulaşır.

Şizofreni, Parkinsonizm ve Alzheimer hastalığında olduğu gibi kognisyon problemlerinin olası tedavisi için klinik testlere giren ilk  $\alpha 7$  agonistidir.



### **2.6.1. GTS-21 ve immün fonksiyonları**

GTS-21 vagus sinir temelli inflamatuvar reflekslerin özellikle efferent kolunda; makrofajlar, endotelial hücreler ve diğer immünokompetent hücrelerde aktivatör görev almaktadır. GTS-21'in LPS'nin neden olduğu makrofajların proliferasyon arrestini hafiflettiği bildirilmiştir (126). Ravikumar ve arkadaşları, GTS-21 uygulandıktan sonra artan makrofaj fagositozu ile ilişkili olan hiperoksiden dolayı makrofajlarda bakteriyel eradikasyonun arttığını belirtmişlerdir (127).

GTS-21, polimorfonükleer nötrofillerin (PMN) aktivasyonu ve birikimini düzenler.  $\alpha7nAChR^{-/-}$  fareler, wild tip farelere kıyasla kontrolsüz PMN infiltrasyonu ve aşırı TNF- $\alpha$  ve CXCL-1 üretiminin olduğu gösterilmiştir (128). Nikotin, CXCL-1 ve IL-8 seviyelerini düşürerek nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (129).

GTS-21 Th1 proliferasyonunun kolaylaştırılmasında önemli olan TBX-21 (Th1 spesifik T-box transkripsiyon faktörü) ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmıştır (130). GTS-21 birçok çalışmada gösterildiği üzere anti-apoptotik, anti-inflamatuvar ve anti-oksidatif özellikleri mevcuttur.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Protokolü

Çalışma öncesi gerekli onam Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (Tarih: 05.03.2018, protokol kodu: 24. 2018.mar) (Ek-1).

Marmara Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Eğitim Merkezi Laboratuvarı'nda yetiştirilen 17-20 haftalık, ağırlıkları ise 280-420 gram aralığında olan Sprague-Dawley türü yetişkin erkek sıçanlar çalışmaya dâhil edildi. Çalışma süresince sıçanlar; sıcaklık ( $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), 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. Deneylere başlamadan kuyruk veninden bazal BUN, Cr değerleri için kan alınıp deneyin 0, 1 ve 2. günlerinde; 2 gruba GTS-21 4 mg/kg, günde 2 kez i.p; diğer iki gruba ise SF 1 ml/kg, günde 2 kez i.p olarak uygulandı. Deneyin 1. gününde, kuyruk lateral veninden i.v katater takılıp kontrast nefropatisi modeli oluşturuldu. Kontrast verilmesinden sonra 48 saat dolmadan kaybedilen 7 sıçan sağkalım (sürvi) analizine dâhil edildi. Geriye kalan tüm gruplardaki 33 sıçan i.v kontrast veya SF verilmesinin 48. saatinde sakrifiye edildi (Tablo 4). Sakrifikasyon öncesi eter anestezisi ile intrakardiyak yolla kan alınması ve her iki böbreğinin çıkarılması ile deney sonlandırıldı. Deney sonunda serum örneklerinde böbrek fonksiyon testleri (BUN, Cr); böbrek dokularında biyokimyasal olarak oksidatif stres parametreleri [myeloperoksidaz aktivitesi (MPO), malondialdehit (MDA) ile değerlendirilen lipit peroksidasyonu (LP) ve glutasyon (GSH) düzeyi], dokuda RT-PCR (Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile sitokin gen ekspresyon düzeyleri (IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ ) ve doku örneklerindeki histopatolojik değişiklikler değerlendirildi.

### **3.1.1. İlaçlar ve doz belirlenmesi**

GTS-21: Cayman Chemical firmasından edilmiş olup (Katalog no: 21570), >%98 saflıktadır. Deneyden bir gün önce SF içerisinde çözülerek -20°C'de karanlık ortamda saklandı. Literatür ile uyumlu dozda 4 mg/kg, günde 2 kez i.p (123,125) olarak kontrast-öncesi, kontrast günü ve kontrast sonrası olmak üzere toplam 3 gün uygulandı.

L-NAME: Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiş olup (Katalog no: N5751-5G), >%98 saflıktadır. Çalışma boyunca -20°C'de saklandı, deney günü ise SF içerisinde çözülerek sıçanlara 10 mg/kg, i.v uygulandı.

Indometazin: Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiş olup (Katalog no: I7378-5G), >%99 saflıktadır. Çalışma boyunca +4°C'de saklandı, deney günü ise NaHCO<sub>3</sub> içerisinde çözülerek sıçanlara 10 mg/kg, i.v 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 6 ml/kg, i.v uygulandı.

### **3.1.2. Kontrast nefropatisi modeli oluşturulması**

Kontrast nefropatisi oluşturabilmek için predispozan etkisi olduğu bilinen L-NAME, indometazin 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 (95-98). Bu deneyde sıçanlara i.p anestezi (Ketamin (100 mg/kg), klorpromazin (3-5 mg/kg) uygulanması sonrasında kuyruk lateral veninden katater takılarak 0, 15 ve 30. dk'da sırasıyla indometazin 10 mg/kg, L-NAME 10 mg/kg ve urografin %76 6 ml/kg i.v olarak uygulandı.

### **3.1.3. Deneş grupları**

**SF-Kontrol Grubu (n=8):** Deneşin 0,1 ve 2. günlerinde 1 ml/kg, 12 saatte bir olmak üzere günde 2 kez SF i.p olarak uygulandı. Deneşin 1. gününde sıçanların kuyruk lateral veninden i.v kateter takılıp 0, 15 ve 30. dk'larda sırasıyla; 10 ml/kg, 10 ml/kg ve 6 ml/kg SF i.v olarak verildi.

**GTS-21-Kontrol Grubu (n=8):** Deneşin 0, 1 ve 2. günlerinde 4 mg/kg, 12 saatte bir olmak üzere günde 2 kez GTS-21 i.p olarak uygulandı. Deneşin 1. gününde sıçanların kuyruk lateral veninden i.v kateter takılıp 0, 15 ve 30. dk'larda sırasıyla; 10 ml/kg, 10 ml/kg ve 6 ml/kg SF i.v olarak verildi.

**Kontrast Grubu (n=14):** Deneşin 0, 1 ve 2. günlerinde 1 ml/kg 12 saatte bir olmak üzere günde 2 kez SF i.p olarak uygulandı. Deneşin 1. gününde sıçanların kuyruk lateral veninden i.v kateter takılıp 0, 15 ve 30. dk'larda sırasıyla; indometazin 10 mg/kg, L-NAME 10 mg/kg ve Urografin %76 6 ml/kg i.v olarak verildi.

**GTS-21+Kontrast Grubu (n=10):** Deneşin 0, 1 ve 2.günlerinde 4 mg/kg, 12 saatte bir olmak üzere günde 2 kez GTS-21 i.p olarak uygulandı. Deneşin 1. gününde sıçanların kuyruk lateral veninden i.v kateter takılıp 0, 15 ve 30. dk'larda sırasıyla; indometazin 10 mg/kg, L-NAME 10 mg/kg ve Urografin %76 6 ml/kg i.v olarak verildi.

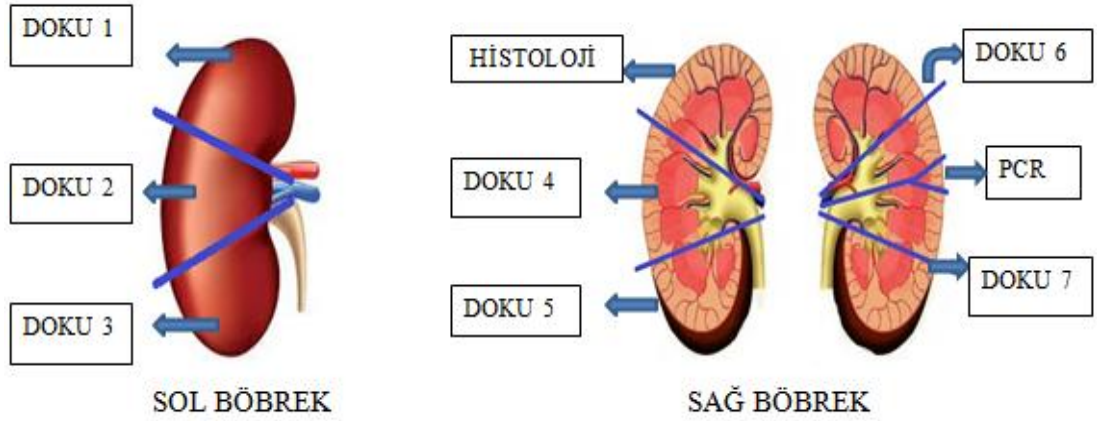
Tüm gruplar ve yapılan uygulamalar Tablo 4'te özetlenmiştir.

**Tablo 4: Gruplara ve günlere göre deneyin uygulanış şeması**

	SF-Kontrol grubu (n=8)	GTS-21-Kontrol grubu (n=8)	Kontrast grubu (n=14)	GTS21+Kontrast grubu(n=10)
0.gün	Bazal kan alınması			
0.sa	SF i.p	GTS-21 i.p	SF i.p	GTS-21 i.p
12.sa	SF i.p	GTS-21 i.p	SF i.p	GTS-21 i.p
1.gün 24.sa	SF i.p	GTS-21 i.p	SF i.p	GTS-21 i.p
25.sa	i.p anestezi i.v katater takılması			
0.dk	SF i.v	SF i.v	İndometazin i.v	İndometazin i.v
15.dk	SF i.v	SF i.v	L-NAME i.v	L-NAME i.v
30.dk	SF i.v	SF i.v	Urografin i.v	Urografin i.v
36.sa	SF i.p	GTS-21 i.p	SF i.p	GTS-21 i.p
			1 EX	1 EX
2.gün 48.sa	SF i.p	GTS-21 i.p	SF i.p	GTS-21 i.p
60.sa	SF i.p	GTS-21 i.p	SF i.p	GTS-21 i.p
			4 EX	1 EX
3.gün (KM'nin 48. Sa)	n=8	n=8	n=9	n=8
	Sakrifikasyon			

### 3.2. Kan ve Böbrek Doku Örneklerinin Alınması

Eter anestezisi ile sedatize edilen sıçanların, intrakardiyak kanları alındı. Santrifüj edilip BUN ve Cr bakıldıktan sonra kalan serum örnekleri -80 °C'de saklandı. Sıçanların sağ ve sol böbrekleri çıkartıldı. Böbrekler Şekil 6'da şematize edilen parçalara ayrıldı. Doku 1, %10 formol içinde saklanıp, daha sonra parafin bloklar içine gömüldü. Diğer dokular ise oksidatif belirteçler ve RT-PCR çalışılmak üzere, -80 °C'de dondurularak saklandı.



**Şekil 6: Böbrek doku örneklerinin hazırlanma şeması**

### 3.3. Değerlendirme Parametreleri

#### 3.3.1. 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 4000 devirde 10 dk santrifüj işlemlerinden geçirildikten sonra elde edilen plazmanın bir kısmı serum BUN ve Cr ölçümleri için kullanıldı.

Serum BUN ve Cr ölçümleri MÜTF biyokimya laboratuvarında Beckman Coulter, AU680 marka otoanalizörde rutin hazır kitler kullanılarak yapıldı. Kontrast nefropatisi modeli, kontrol grubuna kıyasla kontrast grubundaki serum Cr düzeyinde en az 0,5 mg/dl veya %25'lik artış olarak kabul edildi.

#### 3.3.2. Böbrek dokusunda MPO aktivitesi ölçümü

Çalışmanın objektif olması için gruplara neler uygulandığı belirtilmeksizin, daha önce kodlanmış olan böbrek dokuları, 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 12000 devirde 10 dk süreyle 4 °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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e bağımlı oksidasyonunun spektrofotometrik (Pharmacia LKB-Ultraspec III ) ölçülmesi ile saptandı. Bir ünite enzim aktivitesi, 460 nm'de 3 dk boyunca absorbansta değişikliğe neden olan MPO miktarı olarak tanımlandı. MPO aktivitesi Ünite/gram olarak ifade edildi (131).

### **3.3.3. Böbrek dokusunda GSH ve MDA ölçümü**

Hücre içi önemli bir anti-oksidan olan GSH düzeyinin ölçümü için doku ağırlıklarının 9 katına denk gelen miktarda %10'luk triklor asetik asit (TCA) solüsyonu ile Ultra Turrax T25 doku homojenizatöründe (Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik) homojenizasyonu takiben 3000 devir ve 4 °C' de 15 dk süreyle santrifüje edildi. Süpernatantlar ayrılıp 10000 devirde 5 dk daha santrifüje edilip süpernatant örnekleri elde edildi. Süpernatant örneklerine 0,3 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve Ellman ayıracı (40 mg DTNB ve 100ml %1 sodyum sitrat tamponu, alüminyum folyo ile kaplanıp ışıktan korundu) eklendi. Oda ısısında karanlıkta 10 dk bekletilen tüpler spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda köre (blank) karşı okundu. Blankte süpernatant örneği yerine %10'luk trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu konuldu. Sonuçlar nmol GSH/gr doku şeklinde ifade edildi (131).

Oksidan hasarın bir göstergesi olan dokudaki LP miktarı ölçümü için doku ağırlıklarının 9 katına denk gelen miktarda %10'luk triklor asetik asit (TCA) solüsyonu ile Ultra Turrax T25 doku homojenizatöründe (Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik) homojenizasyonu takiben 3000 devir ve 4°C' de 15 dk süreyle santrifüje edildi. Süpernatantlar ayrılıp 10000 devirde 5 dk daha santrifüje edildi. İşlem öncesi taze hazırlanmış olan %0,67'lik thiobarbitürik asit(TBA) eklenip cam tüplerde 100 °C'de 15 dk kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 3-4 dk santrifüj edilip 535 nm dalga boyunda köre(blank) karşı okundu. Blankte süpernatant örneği yerine TCA solüsyonu konuldu. MDA absorban katsayısı ( $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Her gram protein başına nmol olarak ifade edildi (nmol MDA/g protein) (131).

### 3.3.4. Doku örneklerinde RT- PCR ile sitokin genlerinin tespiti

IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  ve beta aktin genleri için kantitatif RT-PCR Taqman Universal Master Mix II kit kullanılarak gerçekleştirildi. 10  $\mu$ L reaksiyon hacmi içerisinde 2,5  $\mu$ L cDNA kullanıldı. Tüm reaksiyonlar duplike çalışılırken beta aktin housekeeping gen olarak kullanıldı. Kantitasyon ve analiz LightCycler 480 software kullanılarak yapıldı. Relatif kantitasyon delta delta Ct yöntemi ile IL-6, IL-1 $\beta$  ve TGF- $\beta$  ekspresyonu beta aktine göre normalize edildi.

1- 96 kuyulu RT-PCR plate'inin her bir kuyusuna 2  $\mu$ L su, 5  $\mu$ L Universal Master Mix II, 0.5  $\mu$ L TaqMan™Gene Expression Assay 20X (IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  ve beta aktin için ayrı ayrı) ve 2,5  $\mu$ L cDNA eklenir, 1500 x g 'de 2 dk santrifüj edildi.

2- Kantitasyon işlemi cihaz talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi ve Ct değerleri ölçüldü.

Primer ve problardan alınan ışımanın sınır değeri aştığı noktaya Ct ya da Cp değeri adı verilmektedir. Eş zamanlı kantitatif PCR reaksiyonu ile kantitasyon yapılmasına yönelik çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan sıklıkla kullanılan göreceli kantitasyon yöntemidir. Yöntem kabaca, belirli şartlar altında ekspresyonu değişmeyen, her doku ya da hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden eksprese edilen bir "housekeeping" gen ekspresyonunun hedef gen ekspresyonu ile kıyaslanmasına dayanır. Bu yöntem delta delta Ct adı verilmektedir. Bu yöntem, hedef DNA molekülü ve standart olarak kullanılan DNA molekülün aynı verimlilik ile amplifiye olduğunu kâbul ederek aşağıdaki formülasyona dayalı kantitasyon yapar.

$$\text{Oran} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta CP_{\text{hedef}}(\text{kontrol-örnek})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{kontrol-örnek})}}$$

Formülde geçen oran; hedef gen ekspresyonunun kontrol oranı, E: verimlilik,  $\Delta$  Cp ise Ct değerleri farkını ifade etmektedir. Hedef gen ve kontrol geninin PCR verimlilikleri birbirine ve 2'ye eşit kâbul edildiğinde yeni formülasyon aşağıdaki gibi olacaktır. Kantitasyonda  $\Delta\Delta$  CP metodu kullanılmıştır.

$$\text{Oran} = 2^{-\Delta\Delta CP}$$



### **3.3.5. Böbrek histopatolojisi**

Sakrifikasyon sonrası sağ böbreğin üst polü alınarak %10'luk formalinde fikse edildi. Preparatlar MÜTF Histoloji Anabilim Dalı laboratuvarında kör yöntemle Dr. Özlem Tuğçe Çilingir Kaya 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 tolüen ile saydamlaştırıldı ve parafine gömülerek bloklandı. Doku bloklarından mikrotom ile (Leica RM2125RT) lam üzerine yaklaşık 5 µm'lik kesitler alındı. Tüm doku kesitlerine histopatolojik incelemeler için Hematoksilen-eozin (H&E) boyası uygulandı. Hazırlanan preparatların tümü kamera ataçmanlı ışık mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı (Olympus CX-41). Tüm doku kesitlerinde, x200 büyütmede 5 alan tübüler epitelyal hasar, tübüler dilatasyon, interstisyal alanda ödem/inflamasyon, konjesyon ve glomerüler hasar parametreleri açısından semikantitatif olarak değerlendirildi. Histopatolojik skorlama, her bir parametre için, 0: yok, 1: hafif, 2: orta derecede, 3: yoğun şeklinde yapıldı (98). Toplam hasar skoru; tübüler epitelyal hasar, tübüler dilatasyon, interstisyal alanda ödem/inflamasyon, konjesyon ve glomerüler hasar parametrelerinin toplamı ile ifade edildi.

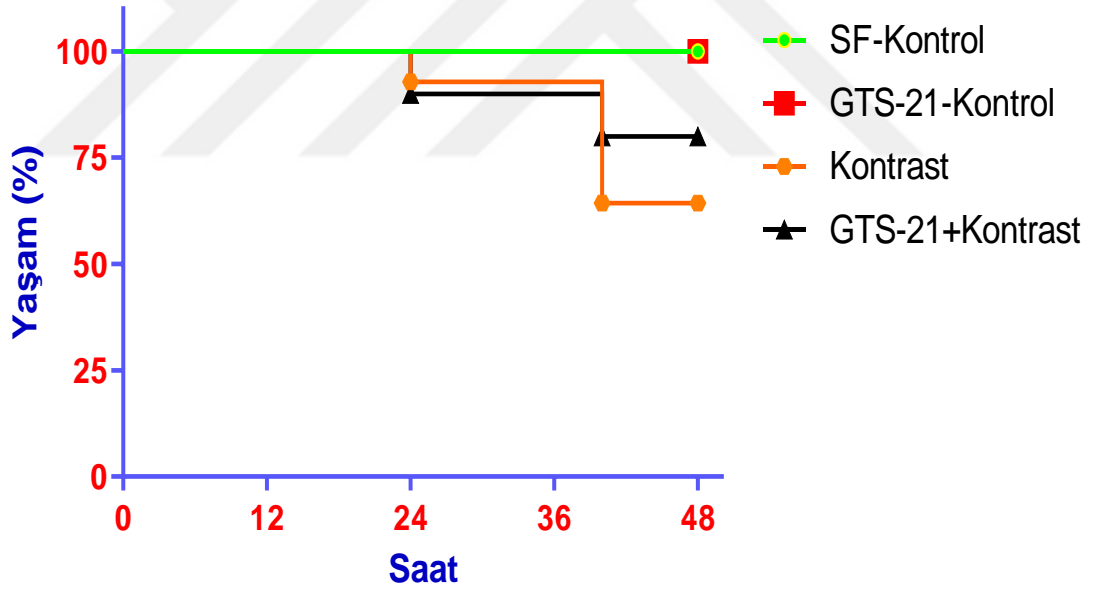
### **3.4. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler için GraphPad Software istatistik programı kullanıldı. Gruplardaki sıçan sayısı ve bağımsız değişkenlerin karşılaştırılması nedeniyle Kruskal-Wallis testi ile grupların verileri arasında farklılık araştırılıp, grupların verileri Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Sağkalım (sürvi) analizi yapıldı.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) değeri olarak gösterilmiştir.

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya alınan sıçanların bazal vücut ağırlıkları gruplar arasında benzer saptandı ( $p=0,39$ ).

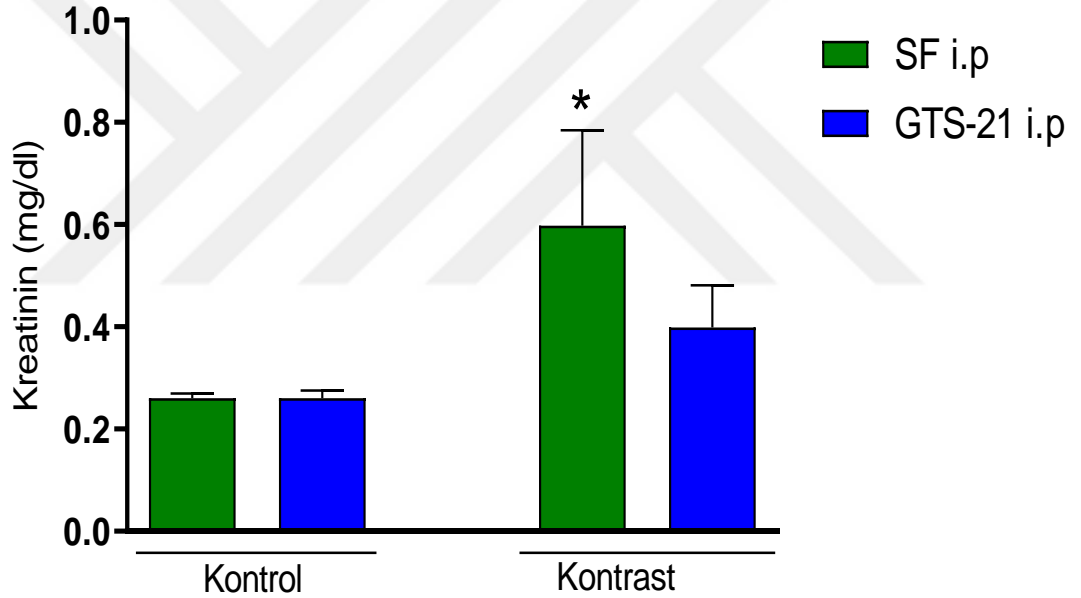
Kontrast grubunda 5 sıçan, GTS-21+Kontrast grubunda ise 2 sıçan i.v kontrast tedavisinden 24 – 40 saat sonra, deney sonlanmadan kaybedilmiştir. Deney sonlandığında kontrast grubunda sağkalım oranı %64,3 iken GTS-21+Kontrast grubunda ise %80'dir. Her iki grubun sürvisinde farklılık saptanmamıştır ( $p=0,46$ ) (ki-kare=0,5350) (Şekil 7). Değerlendirmeler SF-Kontrol grubu 8, GTS-21-Kontrol grubu 8, kontrast grubu 9 ve GTS-21+Kontrast grubu 8 sıçan olarak yapılmıştır.



Şekil 7: Çalışma gruplarında sağkalım (sürvi) analizi

#### 4.1. Çalışma Gruplarında Serum Kreatinin Değerleri

Deney başlangıcında serum kreatinin ölçümleri gruplar arasında benzer saptandı. Deney sonrası SF-Kontrol ( $0,26 \pm 0,01$  mg/dl) ve GTS-21-Kontrol ( $0,26 \pm 0,02$  mg/dl) gruplarının kreatinin değerleri benzerdi. Kontrast madde uygulamasıyla kreatinin düzeyleri kontrast grubunda ( $0,60 \pm 0,19$  mg/dl); kontrol gruplarına kıyasla anlamlı artış göstermiştir ( $p < 0,05$ ). GTS-21+Kontrast grubunda, tedavi sonrası kreatinin değeri ( $0,40 \pm 0,08$  mg/dl) kontrast grubundan daha düşük olmakla birlikte istatistiksel farklılık saptanmadı ( $p = 0,75$ ). Buna karşın, GTS-21+Kontrast grubunun kreatinin değerleri kontrol gruplarıyla benzerdi (Şekil 8).

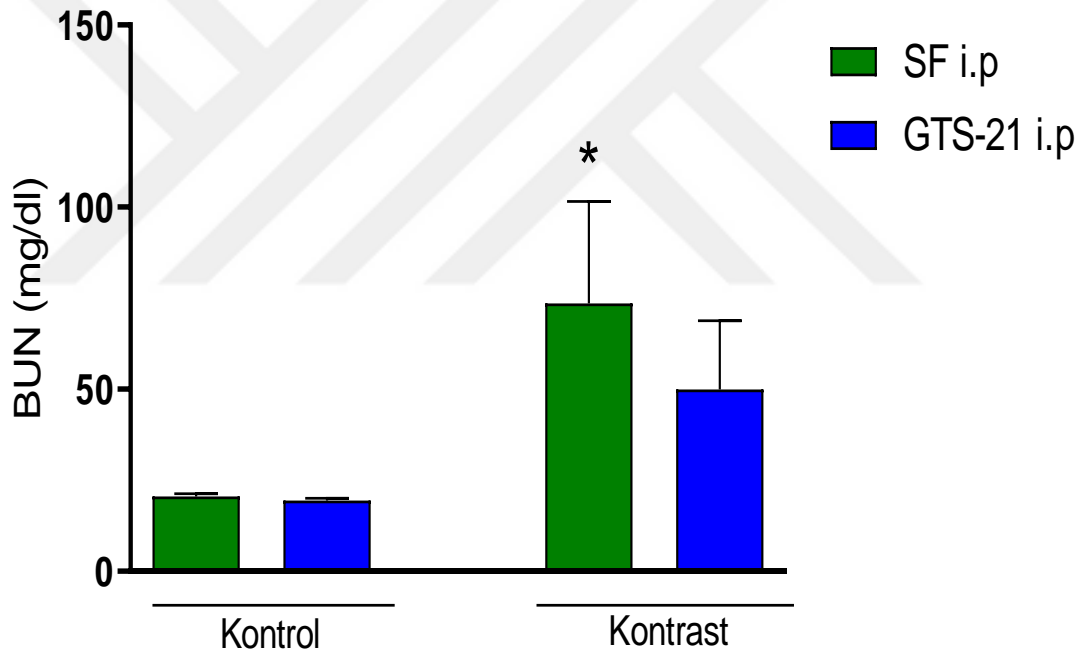


Şekil 8: Çalışma gruplarında deney sonunda serum kreatinin değerleri

\*  $p < 0,05$  SF-Kontrol grubuna göre anlamlılık değeridir.

#### 4.2. Çalışma Gruplarında Serum BUN Değerleri

Deney başlangıcında serum BUN değerleri gruplar arasında benzerdi. Deney sonunda SF-Kontrol ( $20,5 \pm 0,9$  mg/dl) ve GTS-21-Kontrol ( $19,4 \pm 0,7$  mg/dl) gruplarında BUN düzeyleri benzer bulundu. Serum BUN değerlerinin; kontrol gruplarına kıyasla kontrast grubunda ( $73,6 \pm 28,0$  mg/dl) anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi ( $p < 0,05$ ). GTS-21+Kontrast grubunda ( $49,9 \pm 18,9$  mg/dl) BUN değerleri, kontrast grubuna göre düşük olsa da aralarında anlamlı derecede farklılık saptanmadı ( $p = 0,52$ ). Buna karşın GTS-21+Kontrast grubunun BUN değerleri kontrol gruplarıyla benzerdi (Şekil 9).

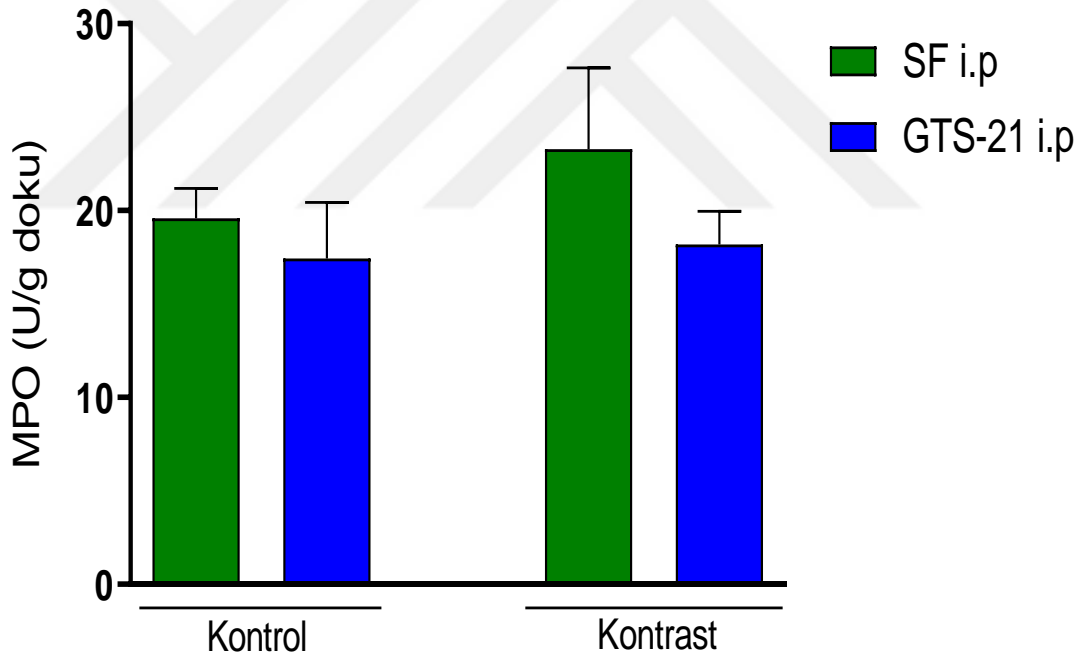


Şekil 9: Çalışma gruplarında deney sonunda serum BUN değerleri

\*  $p < 0,05$  SF-Kontrol grubuna göre anlamlılık değeridir.

### 4.3. Çalışma Gruplarında Nötrofil İnfiltrasyonu Belirteci Olarak MPO Değerleri

Nötrofil infiltrasyon belirteci olarak doku lizatlarında doku MPO aktivitesi SF-Kontrol ( $19,6 \pm 1,6$  U/g doku) ve GTS-21-Kontrol ( $17,4 \pm 3,0$  U/g doku) gruplarında benzer bulundu. Kontrol gruplarına kıyasla MPO değerleri kontrast ( $23,3 \pm 4,4$  U/g doku) grubunda daha yüksek saptansa da istatistiki anlamlılığa ulaşamadı ( $p= 0,90$ ). GTS-21+Kontrast grubunun ( $18,2 \pm 1,8$  U/g doku) MPO değerleri kontrast grubuna göre düşük olsa da aralarında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p= 0,75$ ) (Şekil 10).

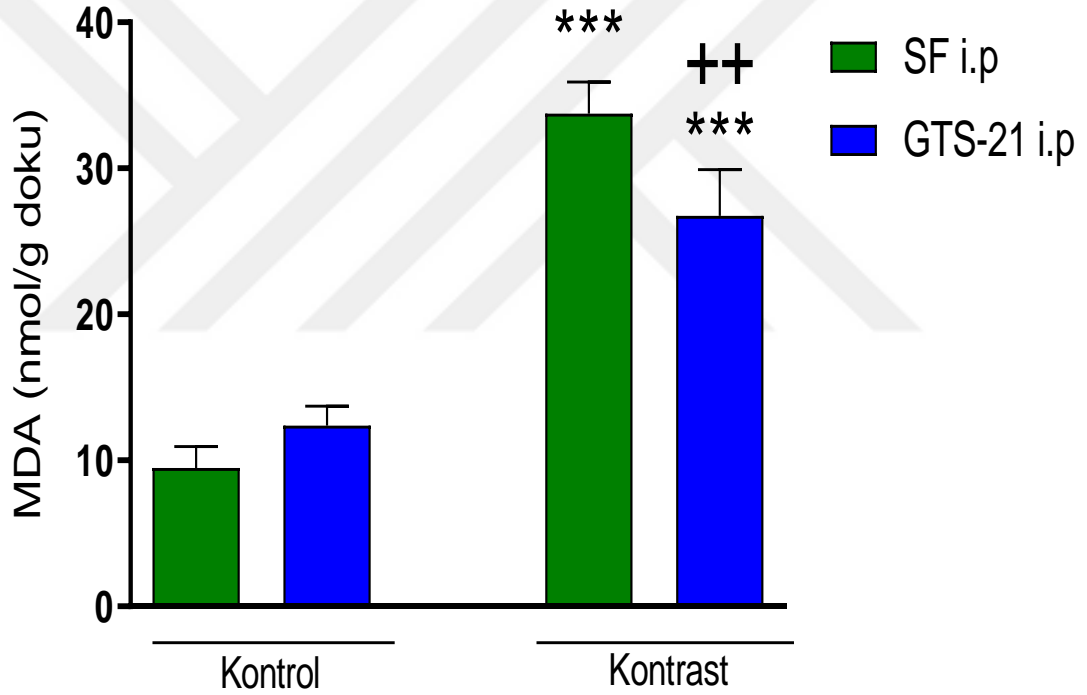


Şekil 10: Çalışma gruplarında MPO aktivitesi düzeyleri

#### 4.4. Çalışma Gruplarında Oksidatif Stres Belirteci Olarak MDA ve GSH Değerleri

Oksidan hasarın bir göstergesi olan dokudaki lipit peroksidasyonunun son ürünü MDA düzeyleri, SF-Kontrol ( $9,5 \pm 1,5$  nmol/g) ve GTS-21-Kontrol ( $12,4 \pm 1,4$  nmol/g) gruplarında benzer bulundu. MDA değerleri kontrast grubunda ( $33,8 \pm 2,2$  nmol/g) kontrol gruplarından yüksek saptanmıştır ( $p < 0,001$ ).

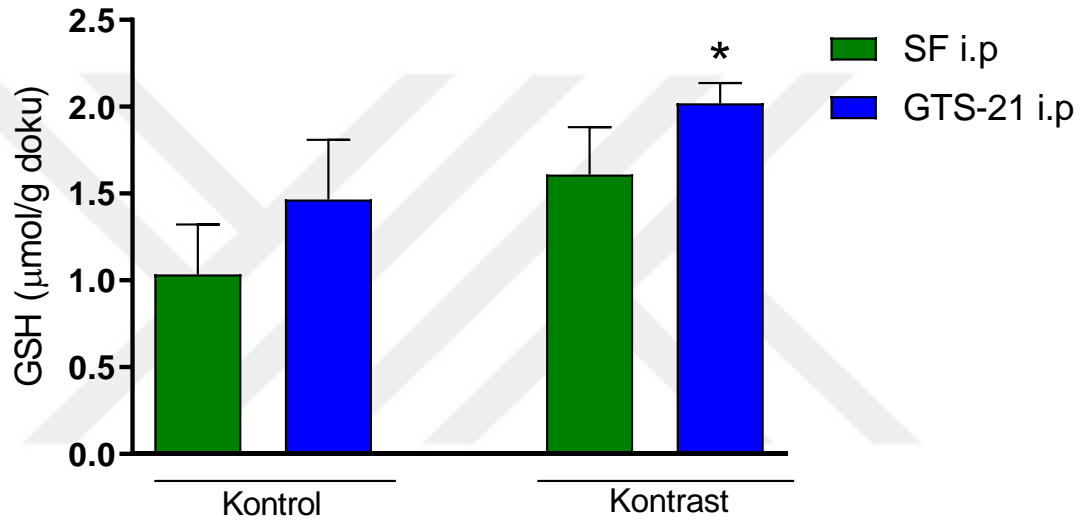
GTS-21+Kontrast grubunun ( $26,7 \pm 3,2$  nmol/g) MDA değerleri, kontrast grubuna göre düşük olsa da aralarında anlamlı farklılık saptanmadı ( $p = 0,11$ ); kontrol gruplarından ise belirgin olarak yüksekti (sırasıyla  $p < 0,001$  ve  $p < 0,01$ ) (Şekil 11).



Şekil 11: Çalışma gruplarında MDA düzeyleri

\*\*\*  $p < 0,001$  SF-Kontrol grubuna göre, \*\*  $p < 0,01$  GTS-21-Kontrol grubuna göre anlamlılık değerleridir.

Çalışmamızda oksidatif stres belirteci olarak böbrek dokusunda GSH düzeyleri incelendiğinde; kontrast grubuna ( $1,6 \pm 0,3 \mu\text{mol/g}$  doku) kıyasla GTS-21+Kontrast grubunun ( $2,0 \pm 0,1 \mu\text{mol/g}$  doku) GSH değerleri daha yüksek olsa da aralarında anlamlı derecede farklılık saptanmadı ( $p=0,13$ ). GTS-21+kontrast grubunun GSH değeri SF-Kontrol grubundan ( $1,0 \pm 0,8 \mu\text{mol/g}$  doku) belirgin şekilde yüksekti ( $p<0,05$ ). Kontrast ve kontrol gruplarının GSH düzeyleri benzer saptanmıştır (Şekil 12).

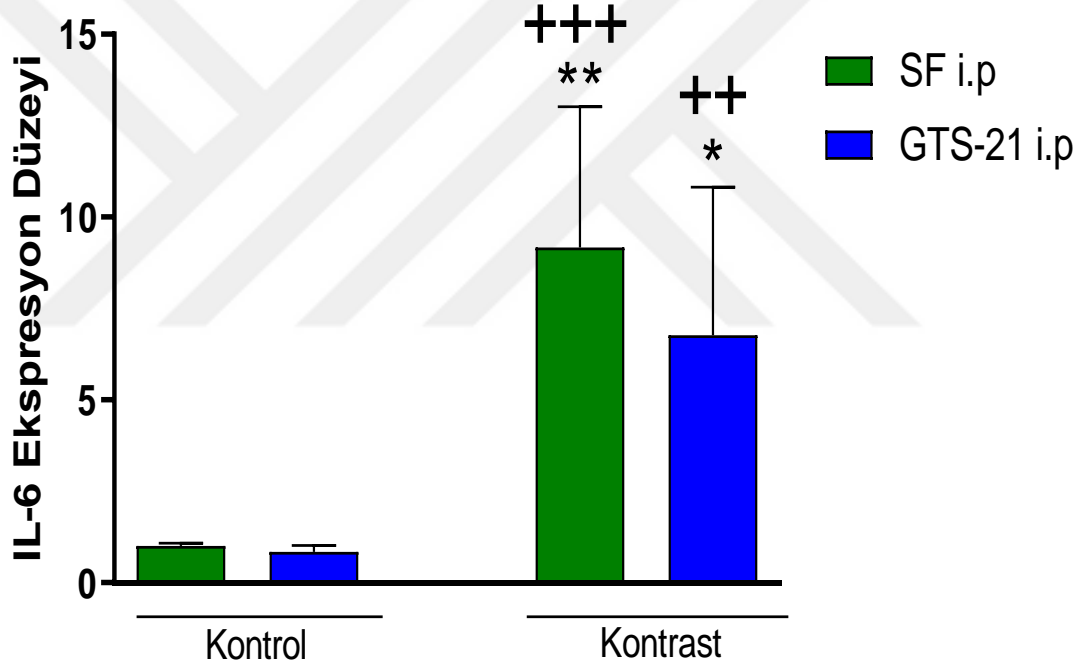


**Şekil 12: Çalışma gruplarında GSH düzeyleri**

\*  $p<0,05$  SF-Kontrol grubuna göre anlamlılık değeridir.

#### 4.5. Çalışma Gruplarında RT-PCR ile Sitokin Gen Ekspresyon Düzeyleri

Kontrol gruplarının IL-6 gen ekspresyonları benzerdi. IL-6 gen ekspresyonunun kontrast grubunda ( $9,2 \pm 3,9$ ), SF-Kontrol grubuna ( $1,0 \pm 0,06$ ) göre yaklaşık 9,1 kat, GTS-21-Kontrol grubuna ( $0,8 \pm 0,2$ ) göre ise yaklaşık 10,8 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur (sırasıyla  $p < 0,01$  ve  $p < 0,001$ ). GTS-21+Kontrast grubunda ( $6,8 \pm 4,0$ ), SF-Kontrol grubundan yaklaşık 6,7 kat, GTS-21-Kontrol grubundan ise yaklaşık 8 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır (sırasıyla  $p < 0,05$  ve  $p < 0,01$ ). Kontrasta GTS-21 eklenmesiyle IL-6 ekspresyon düzeyinde yaklaşık 1,4 kat düşme olmasına rağmen istatistiki farklılık tespit edilmemiştir (Şekil 13).

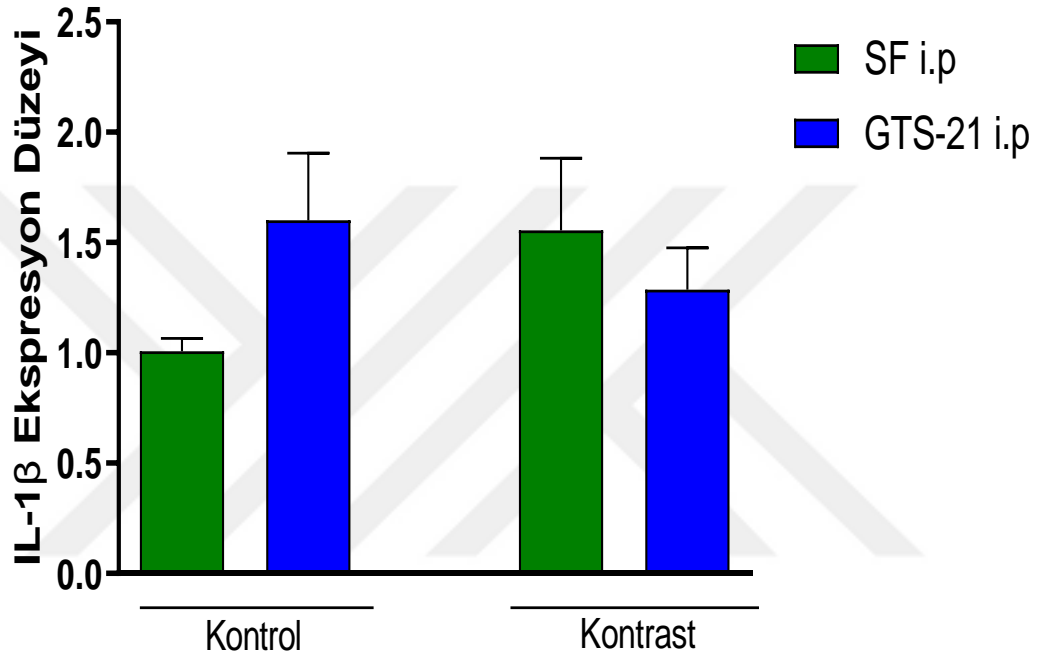


Şekil 13: Çalışma gruplarının IL-6 ekspresyon düzeyleri

\*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  SF-Kontrol grubuna; ++  $p < 0,01$  +++  $p < 0,001$  GTS-21-Kontrol grubuna göre anlamlılık değerleridir. İstatistiki anlamlılık  $\Delta Ct$  değerleri ile değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon düzeyi grafiği,  $2^{-\Delta\Delta CP}$  formülündeki sonuçlarla oluşturulmuştur.



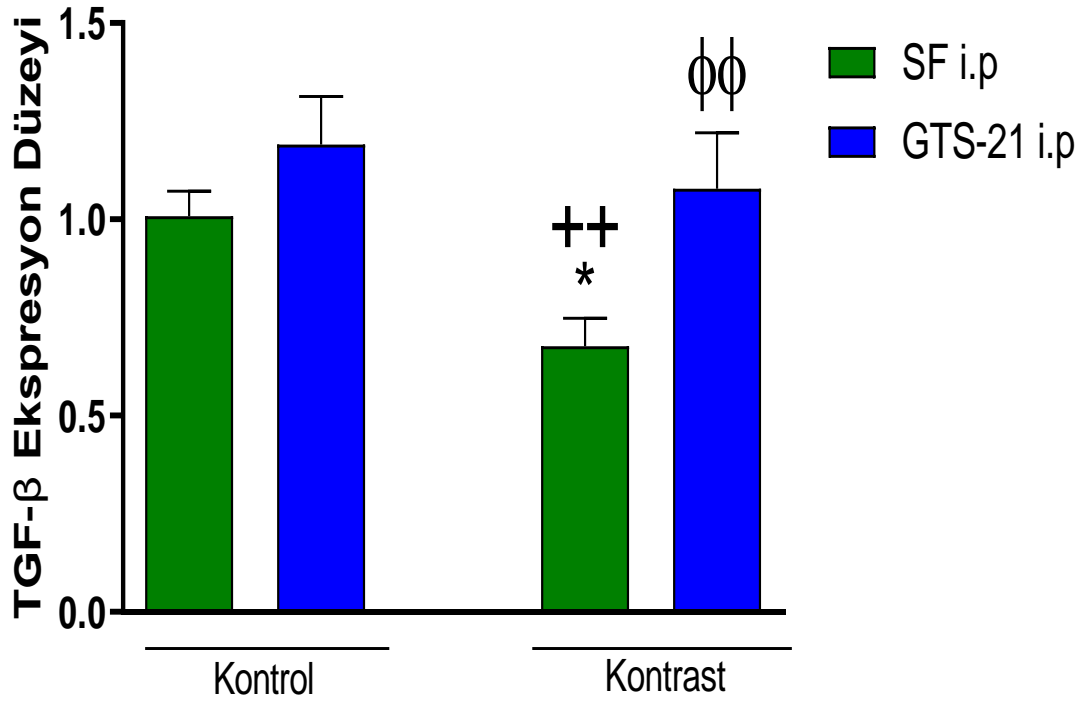
IL-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeyi kontrast grubunda ( $1,6 \pm 0,3$ ) SF-Kontrol grubundan ( $1,0 \pm 0,1$ ) yaklaşık 1,5 kat artmış olup aralarında farklılık saptanmamıştır ( $p=0,49$ ). GTS-21+ Kontrast ( $1,3 \pm 0,2$ ) grubunda ise GTS-21-Kontrol ( $1,6 \pm 0,3$ ) ve kontrast gruplarına göre hafif azalsa da istatistiki bir ilişki saptanmamıştır. GTS-21+Kontrast grubu SF-kontrol grubuyla benzerdi (Şekil 14).



Şekil 14: Çalışma gruplarının IL-1 $\beta$  ekspresyon düzeyleri

İstatistiki anlamlılık  $\Delta C_t$  değerleri ile değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon düzeyi grafiği,  $2^{-\Delta\Delta C_P}$  formülündeki sonuçlarla oluşturulmuştur.

TGF- $\beta$  gen ekspresyonu kontrol gruplarında birbirine benzerdi. TGF- $\beta$  gen ekspresyonu kontrast grubunda ( $0,7 \pm 0,1$ ), SF-Kontrolle kıyasla ( $1,0 \pm 0,1$ ) yaklaşık 1,5 kat, GTS-21-Kontrolle kıyasla ( $1,2 \pm 0,1$ ) ise yaklaşık 1,8 kat azalma saptanmıştır (sırasıyla  $p < 0,05$  ve  $p < 0,01$ ). Kontrasta GTS-21 eklenmesiyle ( $1,1 \pm 0,1$ ) TGF- $\beta$  gen ekspresyonunda yaklaşık 1,6 kat artış saptanmıştır ( $p < 0,01$ ). GTS-21+Kontrast grubu kontrol gruplarına benzerdir (Şekil 15).



**Şekil 15: Çalışma gruplarının TGF- $\beta$  ekspresyon düzeyleri**

\*  $p < 0,05$  SF-Kontrol grubuna; ++  $p < 0,01$  GTS-21-Kontrol grubuna ve  $\phi\phi$   $p < 0,01$  kontrast grubuna göre anlamlılık değerleridir. İstatistiksel anlamlılık  $\Delta C_t$  değerleri ile değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon düzeyi grafiği,  $2^{-\Delta\Delta C_P}$  formülündeki sonuçlarla oluşturulmuştur.

#### 4.6. Çalışma Gruplarında Histolojik Skorlama

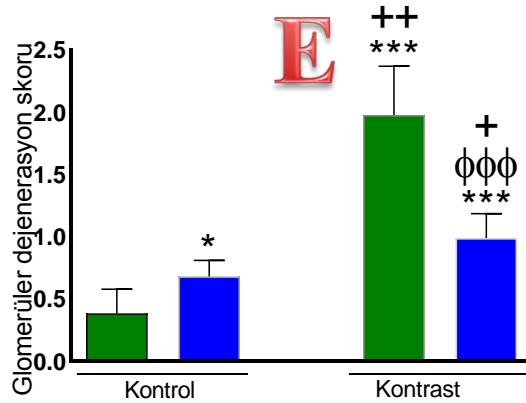
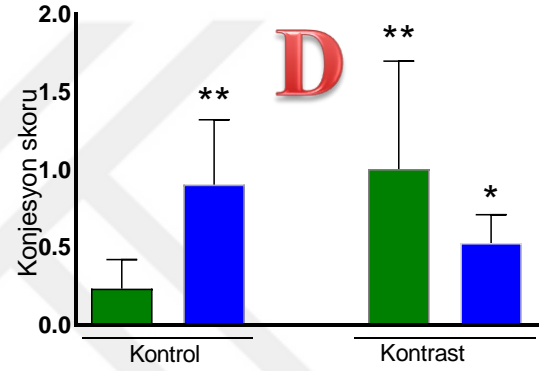
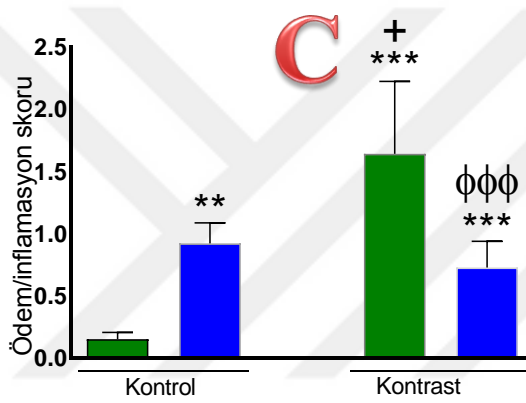
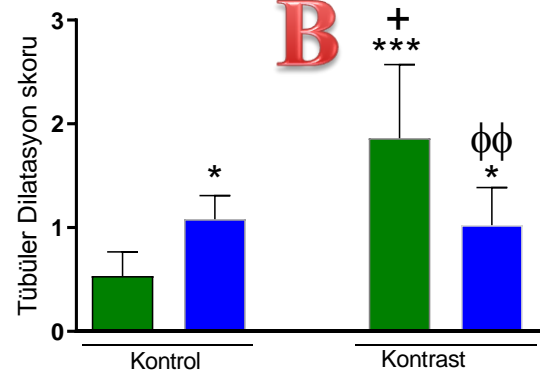
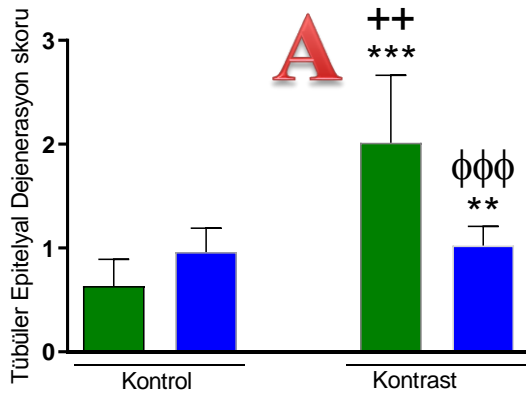
Tübüler epitelyal dejenerasyon skoru; SF-Kontrol ( $0,6 \pm 0,1$ ) ve GTS-21-Kontrol ( $1,0 \pm 0,1$ ) gruplarında benzerdi. Bu skor, kontrast grubunda ( $2,0 \pm 0,2$ ); kontrol gruplarına kıyasla anlamlı artış göstermiştir (sırasıyla  $p<0,001$  ve  $p<0,01$ ). GTS-21+Kontrast ( $1,0 \pm 0,1$ ) grubunda ise tek başına kontrast alan gruba göre anlamlı şekilde daha düşük olup ( $p<0,001$ ), GTS-21-Kontrol grubuyla benzer saptanmıştır (Şekil 16A).

Tübüler dilatasyon skoru, GTS-21-Kontrol grubunda ( $1,0 \pm 0,1$ ), SF-Kontrol ( $0,5 \pm 0,1$ ) grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Kontrast grubunda ( $1,9 \pm 0,3$ ); kontrol gruplarına kıyasla belirgin artış izlenmiştir (sırasıyla  $p<0,001$  ve  $p<0,05$ ). GTS-21+Kontrast ( $1,0 \pm 0,1$ ) grubunda ise kontrast grubunda izlenen yükselme baskılanmıştır ( $p<0,01$ ). GTS-21 verilen kontrol ve kontrast grupları benzer saptanmıştır (Şekil 16B).

Ödem/inflamasyon skoru, GTS-21-Kontrol grubunda ( $1,0 \pm 0,1$ ), SF-Kontrol ( $0,2 \pm 0,02$ ) grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır ( $p<0,01$ ). Kontrast grubunda ( $1,6 \pm 0,2$ ); kontrol gruplarına kıyasla anlamlı artış gösterilmiştir (sırasıyla  $p<0,001$  ve  $p<0,05$ ). GTS-21+Kontrast ( $0,7 \pm 0,07$ ) grubunda tek başına kontrast alan gruba göre anlamlı şekilde daha düşük iken ( $p<0,001$ ), SF-Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksektir ( $p<0,001$ ) (Şekil 16C).

Konjesyon skoru ise GTS-21-Kontrol grubunda ( $1,0 \pm 0,2$ ), SF-Kontrol ( $0,2 \pm 0,07$ ) grubuna kıyasla belirgin biçimde yüksektir ( $p<0,01$ ). Kontrast ve GTS-21-Kontrast gruplarında ( $1,0 \pm 0,2$ ), SF-kontrol grubuna kıyasla anlamlı yükseklik mevcuttur (sırasıyla  $p<0,01$  ve  $p<0,05$ ) (Şekil 16D).

Glomerüler dejenerasyon skoru, GTS-21-Kontrol grubunda ( $0,7 \pm 0,1$ ), SF-Kontrol ( $0,4 \pm 0,1$ ) grubundan belirgin şekilde yüksek saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Kontrast grubunda ( $2,0 \pm 0,4$ ); kontrol gruplarına kıyasla anlamlı artış tespit edilmiştir (sırasıyla  $p<0,001$  ve  $p<0,01$ ). Glomerüler hasar, GTS-21+Kontrast ( $1,0 \pm 0,1$ ) grubunda tek başına kontrast alan gruba göre daha düşük olup ( $p<0,001$ ); kontrol gruplarından ise belirgin şekilde yüksektir (sırasıyla  $p<0,001$  ve  $p<0,05$ ) (Şekil 16E).



■ SF i.p  
■ GTS-21 i.p

\* p<0,05 \*\* p<0,01 \*\*\* p<0,001

vs.SF-Kontrol

+ p<0,05 ++ p<0,01

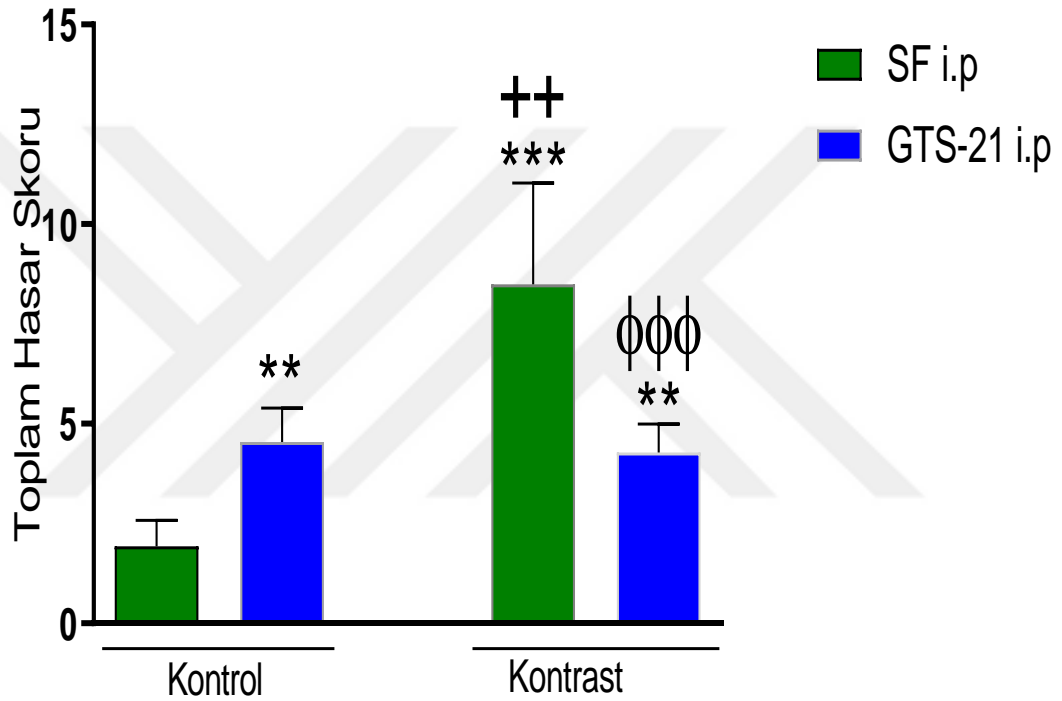
vs. GTS-21-Kontrol

φφ p<0,01 φφφ p<0,001

vs. Kontrast

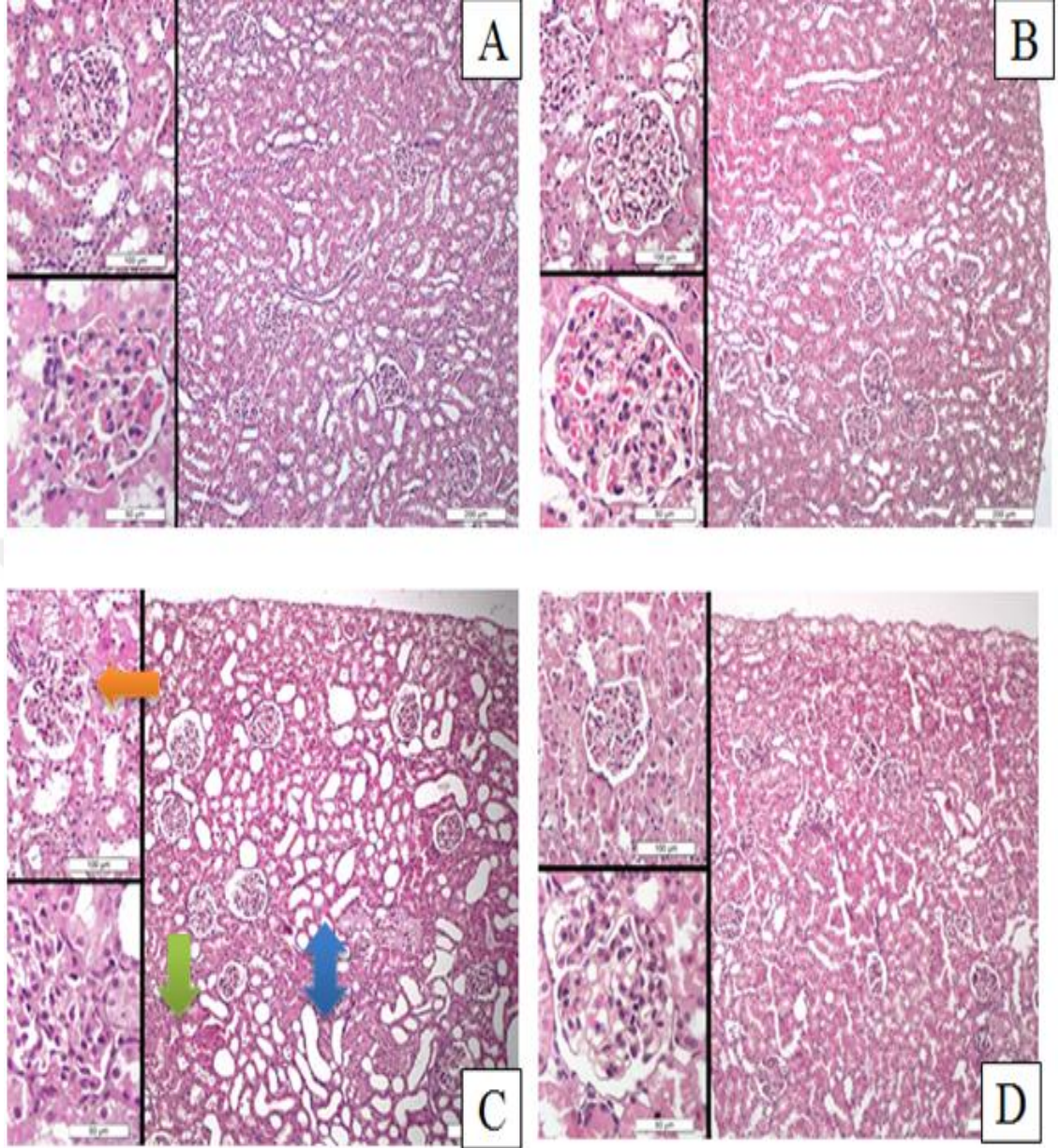
**Şekil 16: Çalışma gruplarında histopatolojik skorlama (A) Tübüler epitelyal dejenerasyon (B) Tübüler dilatasyon (C) Ödem/inflamasyon (D) Konjesyon ve (E) Glomerüler dejenerasyon skorları**

Beş parametrenin puanlarının toplamıyla ifade edilen toplam hasar skoru, GTS-21-Kontrol grubunda ( $4,5 \pm 0,4$ ), SF-Kontrol ( $2,0 \pm 0,3$ ) grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır ( $p<0,01$ ). Kontrast grubunda ( $8,5 \pm 0,9$ ); kontrol gruplarına göre belirgin hasar gösterilmiştir (sırasıyla  $p<0,001$  ve  $p<0,01$ ). Kontrasta GTS-21 eklenmesiyle ( $4,3 \pm 0,3$ ) toplam hasarın anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ( $p<0,001$ ), bu grupta hasar SF-Kontrol grubundan belirgin olarak yüksekti (Şekil17).



**Şekil 17: Çalışma gruplarında histolojik toplam hasar skoru**

\*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  SF-Kontrol grubuna , ++  $p<0,01$  GTS-21-Kontrol grubuna ve  $\phi\phi\phi$   $p<0,001$  kontrast grubuna göre anlamlılık değerleridir.



**Şekil 18: Hematoksilen-eozin boyası ile boyanan kesitlerin ışık mikroskopisi değerlendirilmesi**

(A) SF-Kontrol grubu-normal histoloji (B) GTS-21-Kontrol grubunda hafif derecede tübüler epitelyal hasar, tübüler dilatasyon, interstisyel alanda ödem/inflamasyon, konjesyon, glomerüler hasar (C) Kontrast grubunda ağır derecede tübüler epitelyal hasar, tübüler dilatasyon, interstisyel alanda ödem/inflamasyon, konjesyon, glomerüler hasar (D) GTS-21+Kontrast grubunda hafif derecede tübüler epitelyal hasar, tübüler dilatasyon, interstisyel alanda ödem/inflamasyon, konjesyon, glomerüler hasar (mavi ok>tübüler dilatasyon ve konjesyon, turuncu ok>glomerüler hasar, yeşil ok>interstisyel inflamasyon)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada deneysel kontrast nefropatisi modelinde selektif bir  $\alpha 7nAChR$  agonisti olan GTS-21'in kontrast nefropatisi gelişimini önlemedeki etkinliği araştırılmıştır. GTS-21'in anti-inflamatuar, anti-oksidatif ve anti-apoptotik etkileri göz önünde bulundurulduğunda kontrast nefropatisini önleyebileceği düşünülmüştür. Bilgilerimiz dâhilinde literatürde GTS-21'in kontrast nefropatisinde etkinliğini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, deney sonunda bakılan serum BUN ve kreatinin düzeylerinin kontrast grubunda, kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde arttığı görülmüştür. Bu durum kontrast nefropatisi modelinin çalışmamızda başarı ile geliştirildiğini göstermektedir. Kontrasta GTS-21 eklenmesiyle, tek başına kontrast alan gruba göre BUN ve kreatinin düzeylerinde düşüş olmakla birlikte istatistiksel farklılık saptanmamıştır. Kontrast grubunda 5 sıçan, GTS-21+Kontrast grubunda ise 2 sıçan deney sonlanmadan kaybedilmiştir. Deney sonlandığında sağkalım, kontrast grubunda %64,3 iken GTS-21+Kontrast grubunda ise %80'dir. Kaybedilen sıçanların BUN ve kreatinin düzeyleri değerlendirilememiştir, ancak kontrast nefropatisi geliştirip ABH nedeniyle kaybedildikleri düşünülmektedir. Kontrast madde sonrası görülen histolojik bozulmalarda da GTS-21 verilmesi ile belirgin iyileşme sağlandı. Histolojik iyileşme, kısmî fonksiyonel iyileşme olarak izlendi.

Çalışmamızda MPO aktivitesi düzeyleri nötrofil infiltrasyonunun bir belirteci olarak kullanılmıştır. Kontrast madde verilen sıçanlarda MPO aktivitesinde artış tespit ettik. Kontrast madde ile birlikte GTS-21 verilenlerde ise MPO aktivitesinin bir miktar düşüş gösterdiğini saptadık. Travma, aortik bypass cerrahisi, hemorajik şok ve renal transplantasyon gibi klinik durumlarda karşılaşılan bir durum olan renal İRH'nı temel alan deneysel bir modelde 45 dk iskemi ve sonrasında 1 saat reperfüzyon yapılan grupta MPO aktivitesinde İRH sonrasında anlamlı bir yükselme olduğu, koruyucu ajan olarak GTS-21 ve nikotin eklendiğinde ise MPO aktivitesinin belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir (134). Bir başka çalışmada miyokardiyal İRH sırasında  $\alpha 7nAChR$  aktivasyonunun, MPO düzeyini azalttığı gösterilmiştir (121). LPS ilişkili septik ABH modelinde; GTS-21 ve nikotinin MPO değerlerini azalttığı gösterilmiştir (125). TNF- $\alpha$  bağımsız mekanizmalarla LPS ile indüklenen

inflatuar yanıtları değerlendiren bir çalışmada peritoneal lavaj sıvısında hemositometre ile yapılan nötrofil sayımında LPS grubuna kıyasla, GTS-21 verilen grupta nötrofil sayısında anlamlı şekilde azalma olduğu tespit edilmiştir (135). Sisplatin nefrotoksisitesi modelinde ise GTS-21'in MPO aktivitesini azalttığı bunu yaparken de sisplatinin anti-tümör etkisini azaltmadığı gösterilmiştir (123). Anti-inflatuar özelliği bilinen GTS-21'in, MPO ile değerlendirilen nötrofil infiltrasyonunu azaltıcı etkisi, çalışmamızda literatürle benzer seyir izlemesine rağmen, birçok çalışmada gösterilen istatistiki anlamlılığa ulaşamamıştır.

MDA, oksidatif hasarın göstergesi olan dokudaki lipit peroksidasyonunun son ürünüdür. Araştırmamızda, yalnızca kontrast madde verdiğimiz sıçanların böbrek dokusunda; MDA düzeylerinin, kontrol gruplarına göre belirgin bir artış gösterdiğini tespit ettik. MDA düzeyindeki bu artış kontrast maddelerin nefrotoksik etkilerini açıklamada, oksidatif stresin de rol aldığı bir göstergesidir. Kontrast madde verilmesiyle oluşan reaktif oksijen radikallerinin çeşitli reaksiyonlar sonrası hücre zarı fosfolipitlerinin poliansature yağ asitlerinde lipit peroksidasyonuna neden olup, membran geçirgenliğini ve enzim aktivitesini olumsuz etkileyerek sitotoksik hasarı tetiklediği gösterilmiştir (136). Vankomisin (137), sisplatin (138), doksorubisin (139) ve gentamisin (140) gibi birçok ajanın nefrotoksik etkisi ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi göstermede MDA düzeylerini değerlendiren çok sayıda literatür mevcuttur. Bu çalışmaların hepsinde nefrotoksik ajan grubunda MDA düzeyleri yüksek bulunurken, anti-oksidan etkili koruyucu ajan verilen grupların bazılarında MDA düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir (137-140). Çalışmamızda ise GTS-21+Kontrast grubunda MDA değerleri, kontrast grubuna göre düşük olsa da aralarında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu durum GTS-21'in oksidatif hasarı azaltıcı özelliği olduğunu düşündürmektedir.

Oksidatif stres, hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonu ile sonuçlanan serbest radikal üretimi ve vücudun anti-oksidan mekanizmalar ile kendini savunması arasındaki orantısızlık olup; en önemli anti-oksidan enzimler SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalazdır. Nonenzimatik, tripeptit yapıda bir anti-oksidan olan GSH, tüm memeli canlı hücrelerinde bulunup hücreleri serbest radikal ve toksik metabolitlerine karşı koruyan bir tiol bileşiktir. Hayvan modellerinde kontrast maddelerin serbest oksijen radikalleri aracılığıyla oksidatif stres oluşturarak



renal kortekste anti-oksidan enzim aktivitelerinde azalmaya ve ortamdaki glutasyonun tükenmesine neden olduğu gösterilmiştir (46-48). Yine kontrast etkisiyle medullada hipoksi oluşur, post-iskemik süreçte serbest oksijen radikallerinin üretimi artar ve paradoksal olarak oksidasyon ürünlerinin tübüler nekrozun düzleşme safhasında da rol aldığı düşünülmektedir (46). Çalışmamızda kontrast gruplarında, literatürde bildirilen anti-oksidan kapasitede azalma gözlenmeyip, kontrast ve kontrol gruplarında GSH düzeyleri benzer saptanmıştır. Literatürde oksidatif stresin önemli rolü olan DM’te anti-oksidan enzim aktivitelerinin arttığı, azaldığı veya değişmediği çelişkili sonuçlar bildirilmiştir. Bu farklılıklar; diyabetin süresinden, enzim aktivitesinde zamana bağlı geçici değişikliklerden, çalışılan enzim ve dokudan kaynaklanmaktadır (141). Oksidatif stres varlığında adaptif bir mekanizmayla anti-oksidan savunma enzimlerinin aktivitelerinin arttığı bilinmektedir. Diğer yandan; bu enzimlerin serbest oksijen radikalleri ile inaktivasyonu sonucu aktivitelerinin azaldığı da bildirilmiştir (142-144). Streptozosin ile yapılan, tüm DM gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan GFR düşüşünün saptandığı deneysel diyabetik nefropatide irbesartan ve anti-oksidan (lipoik asit, karnitin) tedavilerin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada, renal dokuda SOD ve GSH değerleri arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (145). İlginç olarak bir başka çalışmada da, Wistar cinsi sıçanlarda karbontetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile yapılan bir böbrek hasarı modelinde, kontrole kıyasla GSH düzeyinin arttığı, koruyucu ajan verildiğinde ise bu artışın azaldığı gösterilmiştir (146). CCl<sub>4</sub>’ün karaciğer toksisitesinin belirlenmesi amacıyla yapılan diğer bir çalışmada, CCl<sub>4</sub> grubunda GSH düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı saptanmıştır. GSH düzeyindeki artışa uzun süre (8 hafta, haftada iki kez, oral) CCl<sub>4</sub> uygulamasının sebep olabileceği belirtilmiştir (147). Çalışmamızda, GTS-21+Kontrast grubu, SF-Kontrol grubuyla kıyaslandığında belirgin GSH yüksekliği tespit edilmesine karşın; kontrast grubundan kısmen yüksek olup aralarında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Kontrast grubunda GSH seviyesindeki artmanın nedeni, hasarla oluşan adaptif mekanizmayla antioksidan enzimlerin artmasına rağmen, enzim aktivitelerinin ROT ile bloke olmasından dolayı GSH tüketiminin azalmasıyla ilişkili olabilir. GTS-21 ile hem kontrol hem de kontrast grubunda artış saptanması GTS-21’in GSH sentezini uyarmasından olabilir. GTS-21’in anti-oksidan etkisinin yeterli olup olmadığının, kontrast nefropatisi modelinde 24-48-72. saat gibi farklı

zamanlarda GSH bakılması durumunda düzeylerinin ne şekilde değişeceğinin ve kullanılan GTS-21 dozunun artırılmasıyla anti-oksidan etkilerin artıp artmayacağını belirlemek için doz-zaman değişkenli çalışmalar gereklidir.

IL-1 $\beta$  ateş gelişimi, endotel adezyon molekülü sentezi ve geçirgenliğinin artırılması, IL-6 ve 8 sentezi, T lenfosit aktivasyonu, immün regülasyonu; IL-6 ise B lenfosit erginleşmesi ve farklılaşması, akut faz protein sentezi gibi önemli biyolojik olaylara katılan iki önemli pro-inflamatuar sitokindir. TGF- $\beta$  ise inflamasyonun durdurulması, kollajen sentezinin ve iyileşme sürecinin başlatılmasında önemli bir anti-inflamatuar sitokindir. Kontrast nefropatisi önemli bir inflamatuvar süreç olduğundan GTS-21'in anti-inflamatuar etkilerinin kontrast nefropatisinde koruyucu rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bu etkilerin değerlendirilebilmesi için deneyimiz sırasında böbrek dokusundan RT-PCR ile IL-6, IL-1 $\beta$  ve TGF- $\beta$  mRNA düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmamızda IL-6 gen ekspresyonuna baktığımızda; kontrast alan iki grupta da kontrol gruplarına kıyasla yaklaşık 6-10 kat arası belirgin bir artış olduğunu görmekteyiz. Bu durum kontrast hasarı gelişiminde IL-6'nın önemli bir pro-inflamatuar bir sitokin olduğunu düşündürmektedir. Kontrasta GTS-21 eklenmesiyle IL-6 ekspresyon düzeyinde yaklaşık 1,4 kat düşme olmasına rağmen istatistiksel farklılık tespit edilmemiştir. Bu durum, GTS-21'in anti-inflamatuar etkisini desteklemekle birlikte kontrast nefropatisindeki etkilerinin daha kesin değerlerle açıklanması için geniş çaplı çalışmalara gereksinim vardır. Çalışmamızda IL-1 $\beta$  ekspresyonunun kontrast grubunda SF-Kontrol'e göre artma seyri gösterip, kontrasta GTS-21 eklenmesiyle hafif azaldığı tespit edilse de istatistiksel olarak gruplar benzer saptanmıştır. Çalışmamızdaki IL-1 $\beta$  bu benzerlik, kontrast nefropatisi modelinin indüklenebilmesi için kullandığımız L-NAME'in ve indometazinin prostoglandin sentezi ve e-NOS aktivasyonu engelleyici etkisine bağlı olabilir (148).

Cisplatin nefrotoksitesitesi modelinde ise cisplatin uygulanması sonrası artan lokal inflamatuvar belirteçler olan IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL-1'i ve Ptg2 (COX-2) mRNA ekspresyonunu GTS-21 tarafından azaltıldığı gösterilmiştir (123). Faubel ve ark. tarafından yapılan cisplatin nefrotoksitesitesi modelinde cisplatin alan grupta IL-6, IL-1 $\beta$  ve IL-18 ekspresyonunun arttığı, tek başına IL-1 $\beta$  antagonisti verilmesi ile yada IL-6<sup>-/-</sup> farelerde cisplatinin nefrotoksitesite gelişimini önlemediği gösterilmiştir (149). LPS ile indüklenen sepsis modelinde, plasma IL-6 düzeyinde LPS grubuna kıyasla

GTS-21 verilen grupta anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (135). Benzer şekilde, Yeboah ve ark. tarafından yapılan renal İRH modeli bir hayvan çalışmasında bizim çalışmamızda değerlendirmedığımız önemli bir diğer pro-inflamatuar sitokin olan TNF- $\alpha$  böbrek dokusunda RT-PCR ile ölçülüp, İRH sonrasında TNF- $\alpha$  düzeyinde anlamlı bir yükselme olduğu, koruyucu ajan olarak GTS-21 ve nikotin eklendiğinde ise TNF- $\alpha$  düzeyinin anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (134). GTS-21, radyasyon ilişkili akciğer hasarı modelinde çalışılmış olup akciğere inflammatuar infiltrasyonu, RT-PCR analizinde IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  seviyelerini ve TLR 4, HMGB-1, MyD88' i azalttığı gösterilmiştir (150). Bir diğer çalışmada yanık hasarı modelinde çalışılmış olup, yanık hasarını, yanık hasarı oluşturulan sıçanlarda kas kitlesini kaybını ve tibialis anterior kasında kantitatif RT-PCR ile bakılan IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL-2, fosforile STAT 3, NF- $\kappa$ B düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (151).  $\alpha$ 7nAChR agonistlerinin; post-transkripsiyonel bir mekanizmayla endotoksinle uyarılmış insan makrofajlarında IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-18, HMGB-1 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin serbestleşmesini inhibe edip IL-10 ve TGF- $\beta$  gibi anti-inflamatuar sitokinleri ise inhibe etmediği İRH, hemorajik şok ve septik peritonit gibi farklı modellerde gösterilmiştir (108-112). İRH modellerinde artan inflammatuar belirteçlerin; US ile VNS sonrasında IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-15 gibi sitokinler başta olmak üzere azaldığı, kolinerjik anti-inflamatuar yolak aktivasyonunun böbrek üzerine koruyucu etkileri olduğu ve dalağın da bu yolağın önemli bir parçası olduğu bilinmektedir. Inoue ve ark. tarafından yapılan İRH modelinde, splenektomi yapılmış gruplarda VNS ile gerçekleşen kolinerjik anti-inflamatuar yolak aktivasyonun ortadan kalktığı gösterilmiştir. Wildtype farelere VNS uygulanmasından 1 gün sonra bu farelerden elde edilen splenositlerin  $\alpha$ 7nAChR knockout farelere transferi ile bu farelerin İRH'dan korunduğu, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-15 düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (10). Çalışmamızı kontrast nefropatisi modelinde GTS-21'in etkisine, hem kolinerjik anti-inflamatuar yolak hem de innate ve adaptif immün sistem için önemli bir organ olan dalak üzerinden genişletmeyi düşünmekteyiz. Kontrast nefropatisi modelinde splenektomi ve sham cerrahisi yaparak özellikle doğal (innate) immün sistemi bloke edip GTS-21 olası etkilerini değerlendirmeyi planlamaktayız.

TGF- $\beta$  mezangiyal ve epiteliyal hücrelerde ekstrasellüler matriks sentezini uyaran başta fibrozis olmak üzere hücre proliferasyonu, farklılaşması, adezyonu,

yara iyileşmesi ve apoptoz gibi hücrel süreçleri düzenleme yeteneğine sahip önemli bir anti-inflamatuar sitokindir (152). Çalışmamızda, TGF- $\beta$  gen ekspresyonunda kontrast grubunda kontrol gruplarına kıyasla yaklaşık 1,5 kat azalma saptanıp, kontrasta GTS-21 eklenmesiyle bu azalmanın anlamlı bir şekilde ortadan kalmıştır. Bu durum, GTS-21'in anti-inflamatuar özelliği olmasıyla ilişkili olabilir. TGF- $\beta$  pleiotropik bir sitokindir. Böbrek üzerine etkilerine baktığımızda renal fibrozisi arttırıp KBH, diyabetik nefropati, glomerüloskleroz gibi durumlara yol açabildiği gibi inflamasyonu azaltıp otofajiyi indükleyerek renal koruyucu özellikler de gösterebilmektedir (153). TGF- $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2, and TGF-  $\beta$ 3 olan 3 izoformu da böbrekte bulunmaktadır,  $\beta$ 2 ve  $\beta$ 3 glomerülde,  $\beta$ 1 ise tübülde bulunmaktadır (153). TGF- $\beta$ 1'in tek taraflı üreter obstrüksiyonu (154,155), diyabetik nefropati (156) ve hipertansif nefropati (157) modellerinde TGF- $\beta$  reseptörü için önemli sinyal transdüser protein olan SMAD-2 ve SMAD-7'nin negatif feedback etkisiyle profibrotik süreçleri tersine çevirip renal koruyucu olduğu gösterilmiştir. Anti-inflamatuar etkisini ise farelerde yapılan kresentik glomerülonefrit (158) ve tek taraflı üreter obstrüksiyonu modellerinde (159) NF- $\kappa$ B aktivasyonunu suprese edip SMAD-7 üzerinden etkisiyle görmekteyiz.

Çalışmamızda, biyokimyasal analizlerin yanı sıra böbrek dokusundaki histopatolojik değişiklikleri ve buna karşı GTS-21'in koruyucu rolünü de araştırdık. Kontrast grubunda; tübüler epitelyal hasar, tübüler dilatasyon, interstisyal alanda ödem/inflamasyon, konjesyon ve glomerüler hasar parametrelerinin her biri ve toplam hasar skoru anlamlı şekilde artmış olup; kontrast ile birlikte verilen GTS-21'in etkisiyle konjesyon skoru haricindeki tüm parametrelerde anlamlı azalma saptanmıştır. GTS-21 ile GTS-21+Kontrast grubu glomeruler hasar dışındaki tüm skorlarda benzer saptanmıştır. Bu durum, GTS-21'in kontrast nefropatisini önlemede, biyokimyasal ve inflamatuvar belirteçlere erken dönemde tam olarak yansımaya da histolojik olarak faydalı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda GTS-21 uygulanması ile TGF- $\beta$  gen ekspresyonundaki artış histolojik düzelmelere katkıda bulunmuş olabilir. Öte yandan şaşırtıcı şekilde GTS-21-Kontrol grubunda tübüler epitelyal dejenerasyon dışındaki histolojik parametrelerin ve toplam hasar skorunun SF-Kontrolle göre belirgin şekilde kötüleştiğini görmekteyiz. Bu durum SF-Kontrol ile kıyaslandığında GTS-21-Kontrol grubunda istatistiksel açıdan anlamlı olmayan

MDA ve IL-1 $\beta$  artışından kaynaklanmış olabilir.

Renal disfonksiyon ve inflamasyonla karakterize bilateral İRH modelinde, tüm histolojik parametrelerin ve toplam tübüler nekroz skorunun arttığı; GTS-21 verilen grupta bu değişikliklerin anlamlı oranda baskılandığı dikkati çekmiştir (134). Sisplatinin böbrek tutulumunun erken safhalarında histolojik olarak özellikle distal ve toplayıcı tübülleri etkileyen, tübüllerde dilatasyon ve kast oluşumu ile giden fokal akut tübüler nekroz oluşur. Proksimal tübüllerde ise özellikle S3 segmentinde doza bağımlı nefrotoksisite görülür (160). Farelerde sisplatin nefrotoksisitesi modelinde GTS-21'in tübüler hasarı azalttığı gösterilmiştir (123). Radyasyon ilişkili akciğer hasarı modelinde, radyasyona maruz kalmayan grupta tek başına GTS-21'in 1, 3, 7, 14 ve 21. günlerde verilmesiyle akciğerde minimal histolojik değişiklikler olduğu ve 6. ayda hidroksprolin ile gösterilen fibrozis skorunda istatistiki anlamı olmayan hafif artış olduğu saptanmıştır. Radyasyona maruz bırakılan grupta ise GTS-21 ile histolojik olarak 21. gün inflamatuvar hücre infiltrasyonunda ve 6.ayda fibrozis skorunda azalma olduğu gösterilmiştir (150). Bir başka çalışmada, GTS-21'in Masson trikrom boyası ve hidroksprolin seviyesiyle şiddeti gösterilen bleomisin ilişkili akciğer fibrozunu azalttığı gösterilmiştir (161). Kolajen kaynaklı artirit modelinde de GTS-21'in histolojik skoru ve eklem kıkırdağının yıkımını gösteren TRAP (tartrat dirençli asit fosfataz) pozitif boyalı hücreleri azalttığı tespit edilmiştir (162). Çalışmamızda fibrozisi değerlendirmedik, TGF- $\beta$ 'nın anti-fibrotik etkilerinin histolojik düzelmeye katkısını araştırmak için çalışmamız genişletip GTS-21'in böbrek üzerindeki olası anti-fibrotik etkileri SMAD2 ve SMAD7 üzerinden değerlendirilebilir.

Kontrast madde uygulamalarının, dokuda apoptozu uyurarak hasara sebep olduğu bilinmektedir. Romano ve arkadaşları kontrast madde verilmesinin ardından, hücre viabilitesinde azalma ve kaspaz 3, 8, 9, 10 aktivitelerinde artış saptayıp ve bu etkinin daha çok distal tübüler hücrelerde görüldüğünü gözlemlemişlerdir (163). Literatürde GTS-21' in anti-apoptotik etkileri sisplatin nefrotoksisitesi modeli (123), bleomisin-ilişkili apoptoz gibi hücre kültürü çalışmaları (164), sepsis ilişkili miyokardiyal (165) ve renal (166) hasar modellerinde gösterilmiştir. Çalışmamızda, GTS-21'in kontrast nefropatisinde anti-apoptotik etkilerinin histolojik düzelmeye

katkısını araştırmak için çalışmamızı genişletip özellikle kaspazlar üzerinden anti-apoptotik etkilerini değerlendirmeyi planlamaktayız.

Sonuç olarak; kontrast nefropatisi modelinde GTS-21 histolojik parametrelerde belirgin, böbrek fonksiyonlarında ise kısmi düzelme sağlamaktadır. Bu düzelmenin, anti-oksidan ve anti-inflamatuar mekanizmalar üzerinden sağlandığını düşünmekteyiz. GTS-21'in kontrast nefropatisi profilaksisindeki etkinliğinin ve koruyucu mekanizmalarının belirlenebilmesi için ilave çalışmalar yapılabilir.



## 6. 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. Liss P, Nygren A, Olsson U, Ulfendahl HR, Erikson U., Effects of contrast media and mannitol on renal medullary blood flow and red cell aggregation in the rat kidney. *Kidney Int* 1996;49(5):1268-75.
6. Persson P, Tepel M. Contrast medium-induced nephropathy: the pathophysiology. *Kidney international* 2006;69:S8-S10.
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. Inoue T, Abe C, Sung SS, Moscalu S, Jankowski J, Huang L, Ye H, Rosin DL, Guyenet PG, Okusa MD. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through  $\alpha 7nAChR+$  splenocytes. *J Clin Invest* 2016;126:1939-1952.
11. Pannu N, Wiebe N, Tonelli M, Network AKD. Prophylaxis strategies for contrast-induced nephropathy. *Jama* 2006;295(23):2765-79.
12. Meyrier A, editor *Nephrotoxicity of iodine contrast media. Annales de radiologie* 1993.
13. Wong PCY, Li Z, Guo J, Zhang A. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *International journal of cardiology* 2012;158(2):186-92.
14. 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.
15. 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.
16. 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.

17. 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.
18. 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.
19. Parfrey P. The clinical epidemiology of contrast-induced nephropathy. *Cardiovascular and interventional radiology* 2005;28(2):S3-S11.
20. 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.
21. McClennan B. Low-osmolality contrast media: premises and promises. *Radiology* 1987;162(1):1-8.
22. Kwasa EA, Vinayak S, Armstrong R. The role of inflammation in contrast induced nephropathy. *Br J Radiol* 2014;87 (1041): 20130738.
23. 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.
24. 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.
25. Heyman SN, Reichman J, Brezis M. Pathophysiology of radiocontrast nephropathy: a role for medullary hypoxia. *Investigative radiology* 1999;34(11):685.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.



31. 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.
32. Cronin RE. Contrast-induced nephropathy: pathogenesis and prevention. *Pediatric Nephrology* 2010;25(2):191-204.
33. 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.
34. 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.
35. Dawson P. Cardiovascular effects of contrast agents. *The American journal of cardiology* 1989;64(9):E2-E9.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Schnellmann RG, Kelly KJ. Acute Renal Failure: Pathophysiology of Nephrotoxic Acute Renal Failure. *Atlas of Diseases of the Kidney, Chapter 15*, 1-14.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Romano G, Briguori C, Quintavalle C, Zanca C, Rivera NV, Colombo A, et al. Contrast agents and renal cell apoptosis. *European heart journal* 2008.
45. 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.
46. Idée JM, Lancelot E, Pines E, Corot C. Prophylaxis of Iodinated Contrast Media-Induced Nephropathy. *Investigative Radiology* 2004; 39 (3); 155-169.

47. Schröder R. Contrast Material-Induced Renal Failure: An Overview. *Journal of interventional Cardiology* 2005; 18(6); 417-423.
48. Yoshioka T, Fogo A, Beckman JK. Reduced activity of antioxidant enzymes underlies contrast media-induced renal injury in volume depletion. *Kidney Int* 1992; 41(4); 1008-15.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Yang D, Yang D, Jia R, Tan J. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor, KB-R7943, attenuates contrast-induced acute kidney injury. *Journal of nephrology* 2013;26(5):877-85.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Yang D, Yang D, Jia R, Lin S. Effects of selective inhibition of reverse mode of Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger on rats with contrast-induced acute kidney injury. *Zhonghua yi xue za zhi* 2013;93(22):1750-4.
57. Lameire NH. Contrast-induced nephropathy—prevention and risk reduction. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006;21(suppl 1):i11-i23.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. Erley C. Does hydration prevent radiocontrast-induced acute renal failure? *Nephrology Dialysis Transplantation* 1999;14(5):1064-6.
62. Bettmann M.A. Frequently Asked Questions: Iodinated contrast Agents RG. 2004; 24; 3-9.
63. 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.

64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. Subramaniam RM, Suarez-Cuervo C, Wilson RF, Turban S, Zhang A, Sherrod C, et al. Effectiveness of Prevention Strategies for Contrast-Induced Nephropathy A Systematic Review and Meta-analysis Effectiveness of Prevention Strategies for CIN. *Annals of internal medicine* 2016;164(6):406-16.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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:.
76. 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.
77. 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.
78. Briguori C, Marenzi G. Contrast-induced nephropathy: pharmacological prophylaxis. *Kidney International* 2006;69:S30-S8.
79. 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.
80. 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.
81. Weisberg LS, Kurnik PB, Kurnik BR. Risk of radiocontrast nephropathy in patients with and without diabetes mellitus. *Kidney international* 1994;45(1):259-65.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. Li J-H, He N-S. Prevention of iodinated contrast-induced nephropathy. *Chinese medical journal* 2011;124(23):4079-82.
86. 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.
87. 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.
88. Deray G. Dialysis and iodinated contrast media. *Kidney international* 2006;69:S25-S9.
89. 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.

90. 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.
91. Yenicieroglu 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.
92. 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.
93. Parvez Z, Rahman MA, Moncada R. Contrast media-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Investigative radiology* 1989;24(9):697-702.
94. 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.
95. 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.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. Gong X, Wang Q, Tang X, Wang Y, Fu D, et al. Tetramethylpyrazine prevents contrast-induced nephropathy by inhibiting p38 MAPK and FoxO1 signaling pathways. *Am J Nephrol* 2013; 37(3):199-207.
100. Stouthard JM, Levi M, Hack CE, Veenhof CH, Romijn HA, Sauerwein HP, et al. Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb Haemost* 1996;76:738-42.
101. Guan XF, Chen QJ, Zuo XC et al. Contrast Media-Induced Renal Inflammation Is Mediated Through HMGB1 and Its Receptors in Human Tubular Cells. *DNA and Cell Biology* vol 6 Number 1 2016; 1-10.
102. Zhao B, Zhao Q; Li J, Xing T, Wang F, Wang N. Renalase protects against contrast-induced nephropathy in Sprague-Dawley rats. *Plos One* 2015; 30;10(1).
103. He X, Li L, Tan H, Chen J, Zhou Y. Atorvastatin attenuates contrast-induced nephropathy by modulating inflammatory responses through the regulation of JNK/p38/Hsp27 expression. *J Pharmacol Sci.* 2016 May;131(1):18-27.
104. Deng J, Wu G, Yang C, Li Y, Jing Q, Han Y. Rosuvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of nitric oxide, inflammatory responses, oxidative stress and apoptosis in diabetic male rats. *Journal of Translational Medicine* 2015:13-53.

105. Langewitz W, Ruddle H, Schachinger H: Reduced parasympathetic cardiac control in patients with hypertension at rest and under mental stress. *Am Heart J* 1994, 127:122–128.
106. Chen JK, Zhao T et al. Downregulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in two-kidney one-clip hypertensive rats. *Cardiovascular Disorders* 2012;12:38.
107. Li DJ, Evans RG, Yang ZW, Song SW, Wang P, Ma XJ, Liu C, Xi T, Su DF, Shen FM: Dysfunction of the cholinergic anti-inflammatory pathway mediates organ damage in hypertension. *Hypertension* 2011;57:298–307.
108. Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, DiRaimo R, Susarla S, Czura CJ, Tracey KJ. Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion. *J Vasc Surg* 2002;36(6):1231-1236.
109. Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, Giuliani D, Bigiani A, Marini H, Squadrito G, Minutoli L, Bertolini A, Marini R, Adamo EB, Venuti FS, Squadrito F. Efferent vagal fiber stimulation blunts nuclear factor-kappa B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation* 2003;107:1189-1194.
110. van Westerloo DJ, Giebelen IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, Tracey KJ, van der Poll T. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis* 2005;191(12):2138-2148.
111. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003;42:384-388.
112. Bencherif M, Lippiello PM, Lucas R, Marrero MB. Alpha7 nicotinic receptors as novel therapeutic targets for inflammation-based diseases. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(6):931-949.
113. Marrero MB, Lucas R, Salet C, Hauser TA, Mazurov A, Lippiello PM, et al. An alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-selective agonist reduces weight gain and metabolic changes in a mouse model of diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;332:173–80.
114. de Jonge WJ, van der Zanden EP, The FO, Bijlsma MF, van Westerloo DJ, Bennink RJ, Berthoud HR, Uematsu S, Akira S, van den Wijngaard RM, Boeckxstaens GE. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2005;6:844-851.45.
115. Marrero MB, et al. Application of Alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists in Inflammatory Diseases: An Overview. *Pharm Res* 2011;28:413–416.
116. Ren Chao, et al. The Protective Effect of Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Activation on Critical Illness and Its Mechanism. *IJBS* 2017;vol.13:46-56.
117. Kem William, Soti Ferenc et al. The Nemertine Toxin Anabaseine and Its Derivative DMXBA(GTS-21): Chemical and Pharmacological Properties. *Mar. Drugs* 2006;255-273.
118. Pena G, Cai B, Ramos L, Vida G, Deitch EA, Ulloa L. Cholinergic regulatory lymphocytes re-establish neuromodulation of innate immune responses in sepsis. *J Immunol* 2011;187:718-25.
119. Van Maanen MA, Stoof SP, Larosa GJ, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Role of the cholinergic nervous system in rheumatoid arthritis: aggravation of arthritis in nicotinic acetylcholine receptor

- alpha7 subunit gene knockout mice. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1717-23.
120. Yu JG, Song SW, Shu H, Fan SJ, Liu AJ, Liu C, Guo W, Guo JM, Miao CY, Su DF. Baroreflex deficiency hampers angiogenesis after myocardial infarction via acetylcholine- $\alpha$ 7-nicotinic ACh receptor in rats. *Eur Heart J* 2011.
121. Xiong J, Yuan YJ, Xue FS, Wang Q, Cheng Y, Li RP, et al. Postconditioning with alpha7nAChR agonist attenuates systemic inflammatory response to myocardial ischemia--reperfusion injury in rats. *Inflammation* 2012; 35: 1357-64.
122. Silva RC, Terra FF, Guise YF, Prado MA, Prado VF, Hiyane MI, Costa Malheiros DM, Prado CM, Camara NO, Braga TT. Reduced expression of VACHT increases renal fibrosis. *Pathophysiology* 2016;23:229-236.
123. Chatterjee PK, Yeboah MM, Solanki MH, Kumar G, Xue X, Pavlov VA, Al-Abed Y, Metz CN. Activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway by GTS-21 attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice. *Plos One* 2017;12(11).
124. Honma S, Takahashi N, Shinohara M, Nakamura K, Mitazaki S, Abe S, et al. Amelioration of cisplatin-induced mouse renal lesions by a cyclooxygenase(COX)-2 selective inhibitor. *Eur Pharmacol* 2013;715(1-3):181-8.
125. Chatterjee PK, Yeboah MM, Dowling O, Xue X, Powell SR, Al-Abed Y, Metz CN. Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists Attenuate Septic Acute Kidney Injury in Mice by Suppressing Inflammation and Proteasome Activity. *Plos One* 2012;vol 7,issue 5.
126. Khan MA, Farkhondeh M, Crombie J, Jacobson L, Kaneki M, Martyn JA. Lipopolysaccharide upregulates alpha7 acetylcholine receptors: stimulation with GTS-21 mitigates growth arrest of macrophages and improves survival in burned mice. *Shock* 2012; 38: 213-9.
127. Sitapara RA, Antoine DJ, Sharma L, Patel VS, Ashby CR, Jr., Gorasiya S, et al. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves bacterial clearance in mice by restoring hyperoxia-compromised macrophage function. *Mol Med* 2014; 20: 238-47.
128. Vukelic M, Qing X, Redecha P, Koo G, Salmon JE. Cholinergic receptors modulate immune complex-induced inflammation in vitro and in vivo. *J Immunol* 2013; 191: 1800-7.
129. Sadis C, Teske G, Stokman G, Kubjak C, Claessen N, Moore F, et al. Nicotine protects kidney from renal ischemia/reperfusion injury through the cholinergic anti-inflammatory pathway. *PLoS One* 2007; 2: e469.
130. Wu S, Zhao H, Luo H, Xiao X, Zhang H, Li T, et al. GTS-21, an alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist, modulates Th1 differentiation in CD4 T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Exp Ther Med* 2014; 8: 557-562.
131. 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.
132. 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.

133. 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 : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2008;23(3):853-9.
134. Yeboah MM, Xue X, Duan B, Ochani M, Tracey KJ, Susin M, and Metz CN. Cholinergic agonists attenuate renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Kidney Int* 2008 July;74(1): 62-69.
135. Giebelen IAJ, Westerloo DJV, LaRosa G, Vos AF, Poll T. Stimulation of  $\alpha 7$  cholinergic receptors inhibits lipopolysaccharide-induced neutrophil recruitment by a tumor necrosis factor  $\alpha$ -independent mechanism. *Shock* 2007;27(4):443-447.
136. Ari E, Kedrah AE, Alahdab Y, Bulut G, Eren Z, Baytekin O, et al. Antioxidant and renoprotective effects of paricalcitol on experimental contrast-induced nephropathy model. *The British journal of radiology* 2012;85(1016):1038-43.
137. Öktem F, Arslan M.K, Ozguner F, Candir Ö, Yilmaz H.R, Ciris M, Uz E. In vivo evidences suggesting the role of oxidative stress in pathogenesis of vancomycin-induced nephrotoxicity: Protection by erdosteine. *Toxicology* 2005: 215; 227-233.
138. Özen S, Akyol Ö, Iraz M et al. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, against Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Rats. *J. Appl. Toxicol* 2004;24;27-35.
139. Yagmurca M, Erdoğan H, Iraz M et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. *Clinica Chimica Acta* 2004;348;27-34.
140. Vardi N, Parlakpınar H, Ozturk F, Acet A. Gentamicin-induced nephrotoxicity and protective effect of caffeic acid phenethyl ester in rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 2005;19;173-177.
141. Giugliano D, Ceriello A. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care* 1996;19:257-267.
142. Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 1988; 44: 223-231.
143. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingom S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and complications. *Clin Sci* 1996; 9:255-260.
144. Wohaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes* 1987; 36: 1014-17.
145. Dönmez S, Şen S. Deneysel Diyabetik Nefropatide İrbesartan ve Anti-oksidan Tedavilerin Karşılaştırılması. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi, Edirne, 2008.*
146. Ramarajan L., Somasundaram ST., Subramanian S. and Pandian V. Nephroprotective effects of *Colpomenia sinuosa* (Derbes & Solier) against carbon tetrachloride induced kidney injury in Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2012;435-441.
147. Yalçın A, Erilaçın S, Yüce G ve ark. CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda karaciğer GSH, GST ve selenyum düzeyleri. *Ege Tıp Derg* 1997;36 (1-2), 13-15.



148. Ağaçıran SK, Koç M. Deneysel Kontrast Nefropatisinin Önlenmesinde Apelin ve Ala-apelin Moleküllerinin Olası Etkileri. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Uzmanlık Tezi, İstanbul.2017.
149. Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, Ljubanovic D, Hoke TS, Somerset H et al. Cisplatin-Induced Acute Renal Failure Is Associated with an Increase in the Cytokines Interleukin (IL)-1, IL-18, IL-6, and Neutrophil Infiltration in the Kidney. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2007;322(1):8-15.
150. Mei Z, Tian X, Chen J, Wang Y, Yao Y, Li X, Yang C, Zhang S, Xie C.  $\alpha 7$ -nAChR agonist GTS-21 reduces radiation-induced lung injury. *Oncology Reports* 2018, 40: 2287-2297.
151. Kashiwagi S, Khan MA, Yasuhara S, Goto T, Kem WR, Tompkins RG, Kaneki M, Martyn JA. Prevention of Burn-Induced Inflammatory Responses and Muscle Wasting by GTS-21, a Specific Agonist for  $\alpha 7$  Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Shock*. 2017 Jan;47(1):61-69.
152. Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 807-21.
153. Sureshbabu A, Muhsin S.A., Choi M.E.. TGF- $\beta$  signaling in the kidney: profibrotic and protective effects. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016.310:F596–F606.
154. Meng XM, Huang XR, Chung AC, Qin W, Shao X, Igarashi P, Ju W, Bottinger EP, Lan HY. Smad2 protects against TGF-beta/Smad3- mediated renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21: 1477–1487.
155. Chung AC, Huang XR, Zhou L, Heuchel R, Lai KN, Lan HY. Disruption of the Smad7 gene promotes renal fibrosis and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2009,24:1443–1454.
156. Chen HY, Huang XR, Wang W, Li JH, Heuchel RL, Chung AC, Lan HY. The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: mechanism and therapeutic potential. *Diabetes* 2011,60:590 – 601.
157. Liu GX, Li YQ, Huang XR, Wei L, Chen HY, Shi YJ, Heuchel RL, Lan HY. Disruption of Smad7 promotes ANG II-mediated renal inflammation and fibrosis via Sp1-TGF-beta/Smad3-NFkappaB-dependent mechanisms in mice. *PLoS One* 8 2013,e53573.
158. Huang XR, Chung AC, Zhou L, Wang XJ, Lan HY. Latent TGF-beta1 protects against crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 19 2008, 233–242.
159. Wang W, Huang XR, Li AG, Liu F, Li JH, Truong LD, Wang XJ, Lan HY. Signaling mechanism of TGF-beta1 in prevention of renal inflammation: role of Smad7. *J Am Soc Nephrol* 2005;(16):1371–1383.
160. Dentino M, Luft FC, Moo N Y, et al. Long term effect of cis-diamminedichloride platinum (CDDP) on renal function and structure in man. *Cancer* 1978; 41: 1247-1251.
161. Sun P, Li L, Zhao C, Pan M, Qian Z, Su X. Deficiency of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor attenuates bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Mol Med*. 2017 Apr;23:34-39.
162. Hu Y, Liu R, Li J, Yue Y, Cheng W, Zhang P. Attenuation of Collagen-Induced Arthritis in rat by nicotinic alpha7 receptor partial agonist GTS-21. *Biomed Res Int*. 2014;2014:325875.

163. Romano G, Briguori C, Quintavalle C, Zanca C, Rivera NV, Colombo A, et al. Contrast agents and renal cell apoptosis. *European heart journal* 2008;29(20):2569-76.
164. Gimonet D, Grailhe R, Coninx P, Antonicelli F, Haye B, Liautaud-Roger F. Functional role of nicotinic acetylcholine receptors in apoptosis in HL-60 cell line. *Eur J Pharmacol* 2003;482(1-3):25-9.
165. Kong W, Kang K, Gao Y, Liu H, Meng X, Cao Y, Yang S, Liu W, Zhang J, Yu K, Zhao M. GTS-21 Protected Against LPS-Induced Sepsis Myocardial Injury in Mice Through  $\alpha 7$ nAChR. *Inflammation* 2018 Jun;41(3):1073-1083.
166. Gao Y, Kang K, Liu H, Kong W, Han Q, Zhang X, Huang R, Qu J, Wang H, Wang S, Liu R, Liu Y, Yu K. GTS-21 attenuates LPS-induced renal injury via the cholinergic anti-inflammatory pathway in mice. *Am J Transl Res* 2017 Oct 15;9(10):4673-4681.



## 7. EKLER

### EK-1 Etik Kurul Onay Formu



#### MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

#### PROJE ONAY FORMU

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	<b>PROTOKOL KODU</b>	24.2018.mar	<b>ÇALIŞMA: TEZ</b>		
	<b>PROJE ADI</b>	Sıçanlarda Deneysel Kontrast Nefropatinin Önlenmesinde GTS-21'in Olası Etkileri			
	<b>SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ ADI</b>	Prof. Dr. Mehmet KOÇ			
	<b>ARAŞTIRMA MERKEZİ</b>	DEHAMER			
	<b>DESTEKLEYİCİ</b>				
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	<b>TARİH: 05.03.2018</b>				
	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.				
<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>					
<b>ÇALIŞMA ESASI</b>	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.				
<b>ÜYELER</b>					
<b>Ünvanı/ Adı/ Soyadı</b>	<b>Uzmanlık Dalı</b>	<b>Kurumu/ Ek Üyelığı</b>	<b>Onaylanan Proje ile İlişkisi</b>	<b>Toplantıya Katılım</b>	<b>İmza</b>
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. Dış 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	

## EK-2 Özgeçmiş

1. Adı Soyadı: Seçkin Akçay
2. Doğum Tarihi: 27.05.1989
3. Doğum Yeri: İstanbul
4. Unvanı: Araştırma Görevlisi Doktor
5. E-posta: ceckin\_akcay@hotmail.com
6. Telefon: 0554 850 73 69
7. Öğrenim Durumu:

Derece	Alan	Kurum	Yıl
İlköğretim		1-Mustafa Necati İlköğretim Okulu (İstanbul)	1996-2001
		2-II. Hasan Varol İlköğretim Okulu (Malatya)	2001-2003
Lise		Malatya Fen Lisesi	2003-2007
Ön Lisans	Sağlık Kurumları İşletmeciliği	Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi	2007-2009
Lisans	Tıp Fakültesi	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi	2007-2014
Tıpta Uzmanlık	İç Hastalıkları	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi	2014-

8. Araştırmacılar İçin Deney Hayvanları Kullanımına Ait Eğitim Sertifikası- Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 12-23 Ekim 2015 tarihleri arasında düzenlenen 40 saat teorik ve 40 saat pratik uygulamaları içeren kursa katılarak alınmıştır.