

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL HAYVAN MODELİNDE TERLİPRESSİN
UYGULAMASININ KONTRAST NEFROPATİSİNİ
ÖNLEMEDEKİ ROLÜ**

**Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Serhan Tuğlular**

**Dr. Elif Arı Bakır
Nefroloji Uzmanlık Tezi**

İSTANBUL, 2009

Marmara Üniversitesi'ndeki asistanlık eğitimim boyunca bilimsel ve kişisel açıdan yetişmemde emekleri olan bütün hocalarıma, çalışma arkadaşlarıma, dostlarıma, eşime ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Elif ARI BAKIR

Ağustos 2009

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kontrast nefropatisi.....	4
2.1.1. Kontrast nefropatisi tanımı.....	4
2.1.2. Kontrast nefropatisi gelişiminde risk faktörleri.....	4
2.1.3. Kontrast nefropatisi gelişiminde kontrast maddenin kimyasal özelliklerinin rolü.....	7
2.1.4. Kontrast nefropatisi patogenezi.....	7
2.1.4.1. Renal vazokonstrüksiyon.....	8
2.1.4.2. Kontrast maddenin yarattığı sitotoksik etki.....	10
2.1.5. Deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi oluşturulması.....	11
2.1.6. Kontrast nefropatisini önlemek amacıyla uygulanan tedaviler.....	12
2.1.6.1. Hidrasyon.....	12
2.1.6.2. Endotelin antagonistleri.....	13
2.1.6.3. Adenozin antagonistleri.....	13
2.1.6.4. Dopamin ve D1 reseptör agonisti fenoldopam.....	14
2.1.6.5. Kalsiyum kanal blokörleri.....	14
2.1.6.6. N-Asetil sistein.....	14
2.1.6.7. Askorbik asit.....	15
2.1.7. Kontrast nefropatisini önlemek amacıyla uygulanabilecek önlemler.....	15
2.2. Akut hipoksik hasarda hipoksi ile indüklenen faktörler ve HIF Sistemi.....	16
2.2.1. HIF-1 ve HIF-2.....	17
2.3. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF).....	20
2.3.1. VEGF gen ekspresyonu regülasyonu.....	21
2.3.2. Böbrekte VEGF ve VEGF reseptörlerinin dağılımı.....	21
2.3.3. Renal fizyolojide VEGF'in rolü.....	22
2.3.4. Akut böbrek yetmezliğinde VEGF.....	22
2.3.5. VEGF'in diğer hastalıklarda rolü.....	23

2.4. Terlipressin.....	24
3. ARAÇ VE YÖNTEM.....	31
4. SONUÇLAR.....	38
5. RESİMLER.....	47
6. TARTIŞMA.....	51
7. ÖZET (TÜRKÇE).....	58
8. ÖZET (İNGİLİZCE).....	61
9. KAYNAKLAR.....	64

1. GİRİŞ VE AMAÇ:

Radyolojik görüntülemeler sırasında kullanılan iyotlu radyokontrast maddelerin bir komplikasyonu olarak gelişen akut böbrek yetmezliği halen önemli bir problemdir (1). Genel toplumda kontrast nefropatisi insidansı %2.1-3.2 olarak bildirilmektedir (2). Hastane kaynaklı akut böbrek yetmezliği nedenleri arasında 3. sıradadır ve hastane kaynaklı akut böbrek yetmezliği hastalarının %10'unu oluşturmaktadır (2). Ayrıca ilaca bağlı akut böbrek yetmezliği nedenleri arasında 7. sırada yer almaktadır (3). Kontrast nefropatisi insidansı, renal fonksiyon bozukluğunun derecesiyle doğru orantılıdır (1). Hafif renal fonksiyon bozukluğu olan hastalarda (GFR 60-90 ml/dak/1.73 m²) kontrast nefropatisi gelişme riski %4-11 iken, evre 5 kronik böbrek hastalığı olan hastalarda (GFR<15 ml/dak/1.73 m²) kontrast nefropatisi gelişme riski %50-70 olarak bildirilmektedir (6). Kontrast nefropatisi patogenezinde renal kan akımındaki azalma ve kontrast maddenin renal tübül epitel hücreleri üzerindeki doğrudan toksik etkisi suçlanmaktadır (1,9) İntravenöz verilen kontrast madde renal parankimal oksijenasyonu azaltır (1,15,24). Renal medullada parsiyel oksijen basıncı çift taraflı oksijen değişimi nedeniyle 10-25 mmhg arasında seyreder ki normoksik koşullarda dahi sınırda oksijen eksikliği görülür (63). Bu nedenle renal medullanın özellikle dış kısımları iskemiden en çok etkilenen bölümdür (15,20). Kontrast nefropatisi gelişimini önlemek amacıyla renal sirkülasyonu arttıran birçok ilaç denenmiş, deneysel modellerde başarılı olan bu ilaçlar, klinik uygulamalarda aynı etkiyi göstermemiştir (9). Profilaksidede bir başka yaklaşım renal tübül hücreleri oksidatif stresten korumaktır (1,9,87). Antioksidan etkileri bilinen N-Asetil sistein ve askorbik asit bu amaçla kullanılmış, önleyici etkileri meta analiz sonuçlarına göre sınırda bulunmuştur (9,46).

Hipoksi ile indüklenen genler ve onların transkripsiyonel ürünü olan faktörler, düşük oksijen kaynağında hücre ve dokuların hipoksiye adaptasyonunu sağlar (65). İntrasellüler enerji üretimi azalır, anaerobik metabolizma artar, eritropoetin salgılanır, anjiyogenez artar ve hücre ölümü/sağkalımı kararları düzenlenir (65). Bu regülasyon mekanizmasının merkezinde hipoksi ile indüklenen faktörler (HIF-1 ve HIF-2) bulunmaktadır (63,64,69). Sistemik hipoksiye yanıt olarak böbrekte HIF-1 ve

HIF-2 transkripsiyonunun arttığı; özellikle HIF-1 α sentezindeki artış ile HIF hedef proteinleri olan heme oksijenaz-1 (HO-1) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) sentezinin arttığı bilinmektedir (63). Muhtemelen HO-1 toksik oksijen radikallerinin yıkımını sağlayarak hipoksik hücre hasarını önlemekte; VEGF revaskülarizasyonu sağlayarak normoksik koşulları tekrar oluşturmayı hedeflemektedir (65). Deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi gelişen böbreklerde iç ve dış medullada HIF birikimi görülmüştür (67). HIF-1 α renal tübül hücrelerinde, HIF-2 α interstisyel ve endotel hücrelerde immünohistokimyasal yöntemlerle saptanmıştır (67).

Benzer şekilde, akut hipoksik koşullarda VEGF ekspresyonu renal tübül hücrelerinde – HIF-1 α ekspresyonunun arttığı lokalizasyonlarda - 4.9 kat artmaktadır (78). Normal fizyolojik koşullarda glomerül podositlerinde en fazla bulunan VEGF, hipoksi yanıtı esnasında HIF-1 α ekspresyonuna eşlik etmekte ve tübül hücrelerinde daha fazla bulunmaktadır (73).

Kronik karaciğer hastalığının ileri dönemlerinde görülen hepatorenal sendrom, endojen vazoaktif sistemin aktive olması ve splanknik vazodilatasyona bağlı renal sirkülasyonun bozulması nedeniyle gelişen bir tablodur (93). Hepatorenal sendrom tedavisinde kullanılan terlipressin, vazopressin-1 (V1) reseptörü üzerindeki etkisiyle splanknik vazokonstriksiyon yapmakta, endojen vazoaktif sistemi baskılayarak renin ve anjiyotensin-2 serum düzeylerini düşürmekte, intravasküler kan hacmini splanknik alandan diğer sistemik dokulara – en fazla miktarda renal sirkülasyona – yönlendirmektedir (49,51). Terlipressinin vazoaktif sistemi baskılayıcı etkisi, kronik karaciğer hastalığı olmayan septik şok hastalarında denenmiştir (59,61). Septik şoklu hastalarda, nörohumoral aktivasyonu baskılayarak, renin aktivitesi ve norepinefrin düzeylerini düşürerek renal vazokonstriksiyonu önlediği; aşırı NO aktivitesini baskılayarak hemodinamik stabiliteyi sağladığı ifade edilmektedir (61).

Terlipressin'in nörohumoral aktivasyonu baskılanması ve intrarenal vazodilatasyon yapması kontrast nefropatisi profilaksisinde kullanılması fikrini akla getirmiştir. Renal vazokonstriksiyona bağlı medüller iskemi ve endojen vazoaktif sistemin aktivasyonu kontrast nefropatisi patogeneğinde 3 mekanizmadan ikisini oluşturmaktadır (9). Bu çalışmada da amaçlanan, renal medüller iskemi sonucu geliştiği bilinen kontrast nefropatisinde VEGF ekspresyonunu göstermek; profilaktik

amaçla kullanılan terlipressin sonrası ise renal fonksiyon parametrelerinin ve dokuda VEGF boyanmasının azalıp azalmadığını tespit etmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kontrast nefropatisi

İyotlu radyografik kontrast maddeler, görüntüleme yöntemlerinin gelişmesiyle sık kullanılmaya başlanmıştır (1). Ancak radyolojik görüntülemelerden sonra akut böbrek yetmezliği tablosu görülmesi – özellikle altta yatan böbrek hastalığı olan hastalarda - majör bir komplikasyondur (1). Kontrast nefropatisi, genel toplumda %2.1-3.2 oranında görülür (2). Hastane kaynaklı akut böbrek yetmezliği nedenleri arasında 3. sıradadır (2). Ayrıca ilaca bağlı akut böbrek yetmezliği nedenleri arasında 7. sırada yer almaktadır (3).

Kontrast nefropatisi görülme sıklığı, kullanılan kontrast maddenin kimyasal özelliklerine ve kullanım hacmine, hastaya bağlı risk faktörlerine ve uygulanan profilaktik tedavilere bağlı olarak %2.1-70 arasında görülebilir (1,5).

2.1.1. Kontrast nefropatisi tanımı:

Kontrast madde enjeksiyonundan 48-72 saat sonra gelişen, genellikle geçici olan renal fonksiyon bozukluğudur. Serum kreatinin değerinde >0.5 mg/dl yükselme veya bazal kreatinin değerinde $>\%25$ artış olarak tanımlanır (4). Nadiren diyaliz gerektiren kronik böbrek yetmezliği tablosu görülebilir (1).

2.1.2. Kontrast nefropatisi gelişiminde risk faktörleri:

Kontrast nefropatisi gelişiminden sorumlu tutulan risk faktörleri tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Kontrast nefropatisi gelişiminde risk faktörleri

1. Altta yatan kronik böbrek hastalığı (GFR<60 ml/dak/1.73 m²)
2. Diyabetik nefropati
3. Konjestif kalp yetmezliği veya renal perfüzyonun azaldığı diğer klinik durumlar
4. Perkütan koroner girişim yapılması
5. Kullanılan kontrast maddenin hacmi (>200ml)
6. Multiple Myelom

Kontrast nefropatisi insidansı, renal fonksiyon bozukluğunun derecesiyle doğru orantılıdır (1). Hafif renal fonksiyon bozukluğu olan hastalarda (GFR 60-90 ml/dak/1.73 m²) kontrast nefropatisi gelişme riski %4-11 olarak bildirilmektedir (6). Evre 4 kronik böbrek hastalığı olan hastalarda (GFR<30 ml/dak/1.73 m²) kontrast nefropatisi gelişme riski %9-38 olarak bildirilmektedir (7). Evre 5 kronik böbrek hastalığı olan hastalarda (GFR<15 ml/dak/1.73 m²) kontrast nefropatisi gelişme riski %50-70 olarak bildirilmektedir (6).

Diyabetik hastalarda mikrovasküler hastalık, ileri glikozillenmiş son ürünlerin yarattığı mikrosirkülasyondaki bozulma ve nitrik oksit metabolizmasında bozulma nedeniyle renal medüller hipoksi gelişir (69). Kronik medüller hipoksi nedeniyle diyabetik hastalar kontrast nefropatisine daha yatkın durumdadır (1,69).

Benzer şekilde konjestif kalp yetmezliği ve renal perfüzyonun azaldığı siroz, nefrotik sendrom, dehidratasyon gibi klinik durumlarda kontrast nefropatisi riski artmaktadır (1).

Ayrıca hipertansiyon, hiperlipidemi, ateroskleroz, yaşlanma, steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçların kullanılması kontrast nefropatisi gelişimine yatkınlık yaratmaktadır (1). Kontrast nefropatisi gelişimine predispozisyon yaratan faktörler tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo2. Kontrast nefropatisine predispozisyon yaratan faktörler

1.Koruyucu mekanizmalarda bozulma

Nitrovazodilatasyonda bozulma: DM, HT,yaşlanma, HL, ateroskleroz

Renal prostoglandin sentezinde bozulma: yaşlanma, NSAID kullanımı

2.Reabsorbtif iş yükünde artma

DM, KBY

3.Sistemik vazokonstrüksiyon

İntravasküler volum azalması, siroz, nefrotik sendrom, kalp yetmezliği

4.Renal mikrovasküler sistemde değişiklik

KBY

5.Oksijen sağlanmasında bozulma

Anemi, intravasküler volum azalması

Kontrast maddenin doza bağlı olarak kontrast nefropatisi riskini arttırdığı saptanmıştır (8). Ne kadar düşük dozda kullanılırsa, o kadar güvenli olduğu söylenebilir (8). Maksimum kontrast madde hacmini hesaplamak için bir formül üretilmiştir :

Maksimum kontrast madde hacmi: $5\text{ml} \times \text{vücut ağırlığı (kg)}$ (maksimum 300 ml)/
serum kreatinin düzeyi (mg/dl) (8).

Bu formül, radyolojik görüntülemeler nedeniyle intravenöz kontrast madde verilen hastaların 10 yıllık takipleri sonucunda oluşturulmuştur (8). Serum kreatinin değeri 1.8 mg/dl olan 115 hasta üzerinde uygulanmış; maksimum doz aşılmayan hastalarda kontrast nefropatisi insidansı %2.3, daha yüksek hacimlerde kontrast madde alan hastalarda kontrast nefropatisi insidansı %20.7 olarak bildirilmiştir (8).

2.1.3. Kontrast nefropatisi gelişiminde kontrast maddenin kimyasal özelliklerinin rolü:

Kontrast nefropatisi gelişiminde kontrast maddenin iyonik veya non-iyonik özellikte olmasının etkisi üzerinde çelişkili sonuçlar bulunmaktadır (9). İyonik bir kontrast madde olan amidotrizoate ile non-iyonik bir madde olan ioheksol kontrast nefropatisi gelişimi açısından 1196 hasta üzerinde karşılaştırılmış; ioheksol kullanan hastalarda daha düşük bir oran saptanmıştır (9,10). Buna karşılık iyonik kontrast madde amidotrizoate ile non-iyonik iopamidol 443 hasta üzerinde araştırılmış; kontrast nefropatisi insidansı arasında fark saptanmamıştır (9,11).

Kontrast nefropatisi gelişiminde, kontrast maddenin iyonik olup olmama özelliği dışında osmolaritesi de önemli bir faktör olarak bildirilmektedir (9). Düşük osmolariteli non-iyonik kontrast maddeler (500-850 mosm/kg), yüksek osmolariteli kontrast maddelere (1400-1800 mosm/kg) göre daha az oranda kontrast nefropatisi oluşturmaktadır (12). İso-osmolar non-iyonik kontrast maddeler (290 mosm/kg) ise düşük osmolariteli kontrast maddelere göre daha az oranda kontrast nefropatisi oluşturmaktadır (13).

2.1.4. Kontrast nefropatisi patogenezi:

Kontrast nefropatisine bağlı akut böbrek yetmezliği tablosu klinik bir tanıdır (1). Genellikle, altta yatan bir böbrek hastalığı olan ve kontrast verilmesi sonrası 48-72

saatte renal fonksiyonları bozulan hastada tanı konur ve hızlı düzelmesi nedeniyle sıklıkla böbrek biyopsisine gerek duyulmaz (1).

Bu nedenle, kontrast nefropatisi patogenezi ile ilgili bilgiler daha çok hayvan modellerinden edinilmiştir (14). Deneysel modellerde renal akut tübüler nekroz saptanmış, ancak mekanizması tam anlaşılamamıştır (14). Patogenezle ilgili 2 majör teori:

1. Renal vazokonstriksiyon sonucu medüller hipoksemi (muhtemel nitrik oksit, endotelin ve/veya adenosin düzeylerinde değişiklikler)
2. Kontrast maddenin doğrudan sitotoksik etkileri

Klinik gözlemlerde, hastalarda diğer nedenlere bağlı akut tübüler nekroz tablosunda klinik tablonun düzelmesi 1-3 hafta sürerken, kontrast nefropatisine bağlı akut tübüler nekroz bulgularının birkaç gün içinde düzelmesi açıklanamamaktadır (1). Bu durum, tübüler hücrelerin morfolojik olarak normal olduğu; renal vazokonstriksiyon nedeniyle post iskemik (veya doğrudan sitotoksik etkiler nedeniyle post toksik) disfonksiyon olduğu öne sürülmektedir (15). Bu fenomen, akut miyokard infarktüsü sonrası gelişen miyokard disfonksiyonuna benzetilmekte, membran transport proteinlerinin bazolateral membrandan luminal membrana redistürbasyonu nedeniyle olduğu düşünülmektedir (16). Öte yandan fraksiyone sodyum atılımının (FENa <1) düşük olması, prerenal etkileri ve/veya intratübüler obstrüksiyonu düşündürmektedir (17).

2.1.4.1. Renal vazokonstriksiyon:

Renal vazokonstriksiyon, kontrast nefropatisinde temel bir bulgudur, intravenöz verilen kontrast maddeye bağlı endotelin ve adenosin salgılanması ve kontrast maddenin yüksek osmolaritesinden kaynaklanır (18,19,20). Memeli böbreğinde renal medulla fonksiyonlarının gerçekleşebilmesi için ortamda parsiyel oksijen basıncının (PO₂) 30 mmhg'nın üzerinde olması gerekir (15). Prostaglandinler, nitrik oksit (NO) ve adenosin birlikte etki ederek, tübüler reabsorpsiyon mekanizmalarının gereksinim

duyduğu yüksek PO₂ düzeyini sağlamaya çalışır (15). Bölgesel kan akımını arttırarak ve distal tübüler transport mekanizmalarını inhibe ederek yeterli medüller oksijen desteğini sağlar; bu koruyucu mekanizmaların bir veya birkaçında bozukluk varsa akut tübüler nekroz gelişme riski artar (1,15). İntravenöz verilen kontrast madde renal parankimal oksijenasyonu azaltır (1,15,24). Deneysel modellerde kontrast madde verilmesinin kortikal PO₂ düzeylerini 40 mmhg'den 25 mmhg'ye düşürdüğü, renal medulla dış kısmında ise 26 mmhg'den 9 mmhg'ye düşürdüğü gösterilmiştir (27). Kontrast madde verilmesi, renal doku oksijenasyonunu azaltması yanında başka sistemik etkiler de yaratmaktadır (15). Pulmoner ventilasyon-perfüzyon uyumsuzluğu, kardiyak debide azalma ve renal perfüzyon basıncında azalma etkileri görülmüştür (28). Kontrast madde verilmesi sonrası renal kan akımında, glomerüler filtrasyonda ve idrar çıkışında geçici bir artış olmaktadır ki bu etki kontrast maddenin mannitol etkisine benzer şekilde plazma hacmini arttırıcı ve natriüretik peptid salınımını indükleyici ozmotik etkisine bağlanmaktadır (15). Kontrast madde verilmesi sonrası renal kan akımındaki geçici yükselmeyi uzun dönemde %10-25 oranında azalma takip eder (23). Deneysel modellerde gösterilmiştir ki kontrast madde medüller kan akımını azaltmakta ve vaza rektada eritrositlerin yavaşlamasına ve agregasyonuna yol açmaktadır (29). Renal vazokonstriksiyon, serum kreatinin düzeyinin yükselmesinde tek başına yeterli değildir; esas önemli olan faktör medüller kan akımının azalmasıdır (21). Deneysel modellerde kontrast maddenin tek başına verilmesi medüller kan akımını azaltmasına karşılık iskemiye neden olmamakta; endojen protektif vazodilatatör maddelerin (nitrik oksit ve prostoglandinler) bloke edilmesi ile birlikte kontrast madde verilmesi medüller iskemiye ve akut tübüler nekroza neden olmaktadır (22). Klinik çalışmalarda kontrast madde verilmesinden sonra para-aminohippurat (PAH) klirensinde 2. saatte %30 azalma, 4. saatte %45 azalma saptanmıştır (18,19). Ayrıca kontrast maddenin viskozitesi medüller vasküler yatakta (vasa rekta küçük çaplı uzun bir damar sistemidir) kan akımını azaltarak ve tübüler interstisyel basıncı arttırarak medüller iskemiye katkıda bulunmaktadır (23). Renal medulla dış kısımlarında yüksek oksijen kullanımı gerektiren aktif sodyum transport kanalları olması nedeniyle bu bölüm, iskemiden en çok etkilenen bölümdür (15,20). Kontrast nefropatisi risk faktörleri arasında sayılan diyabet mellitus (DM) ve konjestif kalp

yetmezliğinde (KKY) vücutta nitrik oksit metabolizması bozulmuştur (20,23). Nitrik oksit oluşumunun azalması ile, vücutta oksijen kullanımının yüksek olduğu dokularda iskeminin önlenememesi bu hastalıklarda kontrast nefropatisine yatkınlık artışını açıklamaktadır (20,23).

Kontrast madde verilmesi sonrası renal mikrosirkülasyonu değiştiren medyatörler atrial natriüretik peptid (ANP), NO, endotelin, adozin ve anjiotensin 2'dir (15). Kontrast madde verilmesi sonrası renal korteks ve medullanın farklı hemodinamik yanıtlar göstermesi ve renal medullanın daha fazla etkilenmesinin nedeni bu medyatörlerin reseptörlerinin farklı bölgelerde farklı dağılım oranlarına sahip olmasıdır (1,15). Renal hemodinamik yanıtta etki eden diğer yardımcı medyatörler serotonin, bradikinin, lökotrienler, histamin ve katekolaminlerdir (15). Tüm medyatörler – başta ANP, NO ve endotelin olmak üzere – dokularda vazodilatasyon/vazokonstriksiyon yaratan faktörlere karşı hemodinamik stabiliteyi korumaya çalışırlar (15).

2.1.4.2. Kontrast maddenin yarattığı sitotoksik etki:

Kontrast nefropatisi gelişiminde, kontrast maddenin renal tüp epitel hücreleri üzerinde yarattığı doğrudan sitotoksik etki ile birlikte serbest oksijen radikallerinin açığa çıktığı ve tübüler membranda oksidatif hasar yarattığı gösterilmiştir (23,24). Serbest oksijen radikalleri tübüler transport aktivitesini ve oksijen kullanımını arttırır, endotel disfonksiyonu yaratır ve hipoksi adaptasyon yanıt mekanizmalarını inhibe eder (20,23). Kontrast maddenin yarattığı hipoksik stress serbest oksijen radikalleri oluşumuna yol açar; açığa çıkan serbest oksijen radikalleri tübüler transport aktivitesini ve oksijen tüketimini arttırır ve endotel disfonksiyonunu indükleyerek akut tübüler nekroz gelişimine yol açar (15,23). Deneysel modellerde koruyucu antioksidan enzimlerin aktivitesinin azalması ile birlikte hipovoleminin kontrast nefropatisini kolaylaştırdığı gösterilmiştir (25,26). Risk faktörü olmayan hastalarda kontrast nefropatisi insidansı çok düşüktür; çünkü medüller oksijen ihtiyacı protektif vazodilatatör mekanizmalarla medüller hipoksiye engel olacak şekilde düzenlenmektedir (15). Deneysel modellerde kontrast nefropatisi oluşturmak

için prostoglandin ve NO sentezi inhibe edilmekte; takiben kontrast madde verilerek istenen model oluşturulmaktadır (15,27).

Özetle, kontrast nefropatisi patogeneğinde, renal vazokonstrüksiyon (hipoksik etki), doğrudan sitotoksik etki, koruyucu vazodilatatör sitokin yanıtında azalma sonucu renal endotelyal disfonksiyon ve bozulmuş intrarenal mikrosirkülasyon birlikte etki göstermektedir (1,15,23,24).

Bu koşulların varlığında renal tüp epitel hücreleri üzerinde (özellikle medüller kalın çıkan henle kolu ve S3 segmentinde) apoptotik ve nekrotik hasar gelişir (15,27,30,31).

2.1.5. Deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi oluşturulması:

Kontrast maddenin intrarenal hemodinamik değişiklikler yaratması, endotele bağlı vazodilatatör yanıtın bozulduğu diyabet, hipertansiyon, ateroskleroz ve kalp yetmezliği hastalarında kontrast maddeye bağlı akut böbrek yetmezliği tablosunun neden daha sık görüldüğünü açıklamaktadır (1,15,20,23,69).

Endotelden salınan en önemli vazoaktif medyatörlerin nitrik oksit ve prostanoidler olması nedeniyle deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi oluşturmak için kontrast madde verilmesinden önce bu maddelerin farmakolojik inhibisyonu yapılması önerilmektedir (22).

Daha önceleri deneysel modellerde tek taraflı nefrektomi sonrası kontrast madde vermek, 4 hafta düşük sodyumlu diet verilerek deneklerin sıvı alımını azaltmak gibi yöntemler kullanılmışsa da ilk kez 1994 yılında Agmon ve arkadaşlarının nitrik oksit ve vazodilatatör prostanoid olan prostoglandin E₂'nin farmakolojik inhibisyonu sonrası kontrast madde vermesi sonucu kontrast nefropatisi klinik ve biyokimyasal parametreleri oluşturulmuştur (22).

Bu modelde deneklerin femoral veni kateterize edilerek indometazin 10 mg/kg dozunda intravenöz olarak uygulanmış, 15 dakika sonra Nw-nitro-L-arginine metil esteri 10 mg/kg dozunda intravenöz olarak uygulanmış, 15 dakika sonra son aşamaya geçilerek kontrast madde 6 ml/kg dozunda uygulanmıştır (22). Lazer-doppler kullanılarak intrarenal kan akımı ölçülmüş; farmakolojik inhibisyon sonrası kontrast

madde verilmesi ile medüller kan akımının %14 azaldığı saptanmıştır (22). Aynı çalışmada renal fonksiyon parametrelerinde bozulma ile birlikte, böbrekler histopatolojik olarak incelenmiş; medüller kalın çıkan kolonlarda %50 selektif nekroz görüldüğü rapor edilmiştir (22).

Sonraki dönemlerde kontrast nefropatisi deneysel çalışmaları bu model üzerinde yapılmış; profilakside önerilen tedaviler bu model üzerinde denenmiştir (1,15,27,102,103).

2.1.6. Kontrast nefropatisini önlemek amacıyla uygulanan tedaviler:

Kontrast nefropatisini önlemede kanıtlanmış tedavi hidrasyondur (9,15). Kontrast nefropatisi patogenezi düşünülerek, medüller iskemiyi düzeltmeye ve/veya medüller PO₂ düzeyini arttırmaya yönelik birçok ilaç profilakside denenmiştir (32). Furosemid, endotelin antagonistleri, adenozin antagonistleri, atrial natriüretik peptid (ANP), dopamin, fenoldopam (dopamin (D1) reseptör agonisti), kalsiyum kanal blokörleri ve prostoglandin E1 bu amaçla denenmiş, çelişkili sonuçlar saptanmıştır (9,32).

Diğer yandan kontrast maddenin sitotoksik etkisini azaltmaya ve renal dokuyu oksidatif hasardan korumaya yönelik antioksidan ilaçlar da denenmiştir (9). Askorbik asit ve N-asetil sistein bu amaçla denenmiş ilaçlardır (9). Çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda kontrast nefropatisi profilaksisinde araştırılmış bu ilaçlardan en önemli olanları özetlenmiştir.

2.1.6.1. Hidrasyon:

Kontrast nefropatisi insidansını azalttığı kanıtlanmış tek etkili tedavi hidrasyondur (9,15,32). Serum fizyolojik infüzyonu ile %0.45 serum fizyolojik infüzyonu arasında kontrast nefropatisi insidansı açısından fark saptanmamıştır (9). Evre 2 kronik böbrek yetmezliği olan 1620 hastadan oluşan bir çalışmada ise serum fizyolojik ile uygulanan profilaksinin, %0.45 serum fizyolojik uygulanmasına göre kontrast

nefropatisini önlemede daha etkili olduğu saptanmıştır (92). Serbest oksijen radikallerinin oluşturabileceği hasarı önlemek açısından alkalinizasyon önerilmekte, bikarbonatlı solusyonların, serum fizyolojik ve %0.45 serum fizyolojik solusyonlarından daha etkili olduğu ifade edilmektedir (1,90,91). Bikarbonat içeren solusyonların işlemden 1 saat önce başlanması, işlem sırasında ve 6 saat sonrasına kadar verilmesi en etkili hidrasyon profilaksisi olarak kabul edilmektedir (33).

2.1.6.2. Endotelin antagonistleri:

Deneysel modellerde ve klinik çalışmalarda kontrast maddenin intravenöz olarak verilmesi sonrasında plazma ve idrarda endotelin düzeylerinde artış saptandığı gösterilmiştir (34,35). Kontrast nefropatisi profilaksisinde endotelin antagonistleri kullanılmış, ancak profilakside etkili bulunmamıştır (36).

2.1.6.3. Adenozin antagonistleri:

Kontrast madde verilmesi sonrası renal kan akımındaki azalmanın teofilin ile düzeltildiği gösterilmiştir (37). Klinik çalışmalarda kontrast madde verilmesi sonrası idrarla atılan adenozin düzeylerinin yükseldiği ve deneysel modellerde renal tüp epitel hücre kültüründe kontrast madde verilmesi sonrası hücre içinde adenozin düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir (38,39). Adenozin antagonisti olan teofilin profilaksisinin kontrast nefropatisi insidansını azalttığını gösteren çalışmalar yanında, etkili olmadığını düşündüren çalışmalar da mevcuttur (40,41).

2.1.6.4. Dopamin ve D1 reseptör agonisti fenoldopam:

Deneysel modellerde fenoldopam verilmesiyle kontrast madde enjeksiyonuna bağlı renal kan akımındaki ve glomerüler filtrasyon hızındaki azalmanın düzeldiği gösterilmiştir (42). Ancak randomize, plasebo kontrollü ‘CONTRAST çalışması’ sonuçlarına göre kontrast nefropatisini önlemede etkili değildir (43).

2.1.6.5. Kalsiyum kanal blokörleri:

Diltiazem, amlodipin, nitrendipin ve felodipin ile yapılmış çalışmalara bakıldığında kontrast nefropatisi profilaksisinde etkili olduğunu gösteren çalışmaların yanı sıra etkili olmadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (9,44,45).

2.1.6.6. N-Asetil sistein:

Profilakside kullanılan diğer ilaçlara benzer şekilde N-Asetil sistein için de çelişkili sonuçlar mevcuttur (9). Vazodilatatör ve antioksidan etkileri olduğundan kontrast maddeye bağlı oluşan vazokonstrüksiyon ve serbest oksijen radikalleri oluşumunu engellediği ifade edilmektedir (1,9). Birkaç meta analiz bulgularına göre N-Asetil sistein kontrast nefropatisi profilaksisinde %30-50 risk azalmasına sebep olmakta; başka bir meta analiz bulgularına göre ise çok belirgin bir risk azalması yaratmamaktadır (46,87,88,89). İyi tolere edilebilen ve düşük maliyetli bir ilaç olması nedeniyle yüksek riskli hastalara iv hidrasyona ek olarak 2*600 mg veya 2*1200 mg dozunda işlemden 24 saat önce verilmesi önerilmektedir (46).

2.1.6.7. Askorbik asit:

Plasebo kontrollü, randomize bir klinik çalışmanın sonucuna göre askorbik asit, kontrast nefropatisi profilaksisinde etkili bir ilaçtır (47). Güvenli ve düşük maliyetli bir tedavi ajanı olabilecek bu ilacın etkinliği daha geniş çalışmalarla desteklenmelidir (9).

2.1.7. Kontrast nefropatisini önlemek amacıyla uygulanabilecek önlemler:

Kontrast nefropatisini önlemek amacıyla özellikle yüksek riskli hastalara uygulanması önerilen tedavi ve koruyucu öneriler tablo 3'de özetlenmiştir. Kronik böbrek hastalığının derecesiyle orantılı bir risk profili sergileyen hastalarda koruyucu önlemlerin kontrast nefropatisi riskini %3-45 oranında azalttığı ifade edilmektedir (9).

Tablo 3. Kontrast nefropatisini önlemek amacıyla uygulanması önerilen işlemler

1. Yüksek riskli hastalarda görüntüleme yöntemi olarak – mümkünse – kontrastsız tomografi veya ultrason kullanılması
2. Yüksek riskli hastalarda tekrarlayan kontrast madde uygulamalarından kaçınılması ve/veya tekrarlanması planlanan görüntülemeler için en az 48-72 saat beklenmesi
3. Mümkün olan en düşük doz kontrast madde kullanılması
4. Renal vazokonstrüksiyonu tetikleyen dehidratasyon ve steroid yapıda olmayan anti inflamatuvar ilaçlardan kaçınılması
5. İşlem öncesi iv hidrasyon uygulanması (serum fizyolojik veya bikarbonatlı serum fizyolojik solusyonları)
6. Antioksidan N-Asetil sistein 2*600 mg dozunda işlemden 24 saat önce tedaviye eklenmesi
7. İzo-osmolar, non-iyonik kontrast maddelerin kullanılması

2.2. Akut hipoksik hasarda hipoksi ile indüklenen faktörler ve HIF Sistemi:

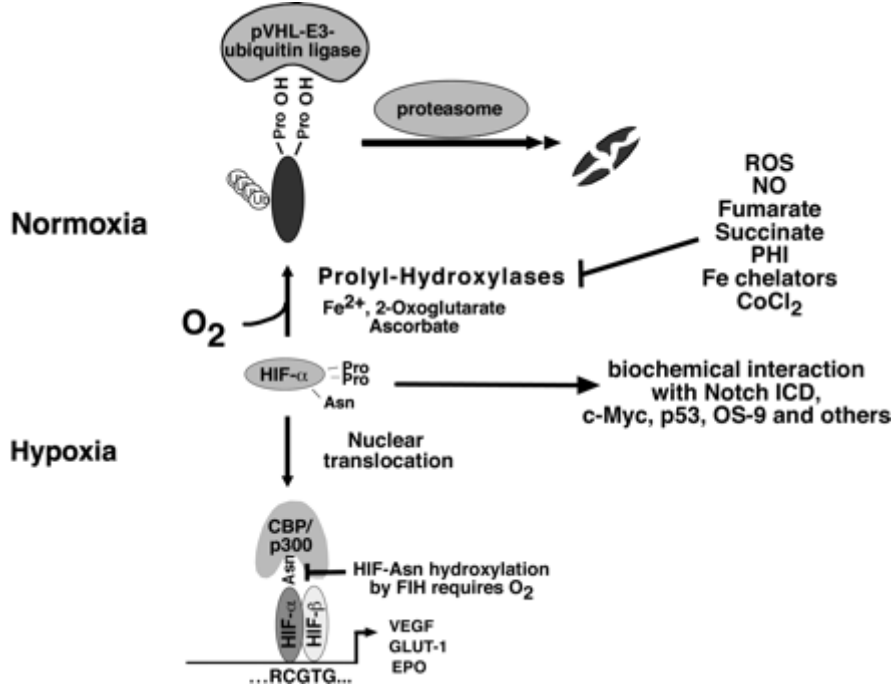
Böbrek kan akımı kardiyak debinin %20 sini oluşturmasına rağmen, intrarenal arteriyel ve venöz sistemlerin çok yakın ve paralel seyretmesi nedeniyle oluşan karşılıklı oksijen difüzyonu renal doku oksijen basınçlarının (po₂) nisbeten düşük seyretmesine yol açar (63). Kan akımının büyük kısmı renal kortekse doğru olmaktadır ve renal korteks po₂ düzeyi 30-50 mmhg seviyesindedir (63). Renal medullada po₂ düzeyleri ise çift taraflı oksijen değişiminin daha yoğun olması nedeniyle 10-25 mmhg arasında seyrederek renal medullada normoksik koşullarda dahi sınırdaki oksijen eksikliği görülür (63). Özellikle renal proksimal tübüllerin S3 segmentleri ve medüller kalın çıkan kolonlar bazolateral Na/K-ATPaz aktiviteleri

nedeniyle yüksek metabolik aktiviteye sahip olduklarından hipoksiye daha duyarlıdır (63,64). Sonuçta böbrek, oksijen değişikliklerine çok duyarlı bir organdır ve hücrel oksijen homeostazını sağlamak için birçok faktör sentezleyerek kendini korumaya çalışır (64).

Hipoksi ile indüklenen faktörler (HIF-1 ve HIF-2), hücrel oksijen homeostazında anahtar medyatörlerdir ve hem doku oksijenasyonunu kolaylaştırır hem de enerji metabolizmasını düzenleyen genleri aktive ederek dokunun hipoksiye adaptasyonunu sağlar (63,64). Hipoksiye doku adaptasyonunun düzenlenmesi dışında glukoz transportu, anjiogenez, eritropoez, demir metabolizması, PH regülasyonu, apoptozis, hücre proliferasyonu gibi metabolik olaylarda hücreler arası ilişkileri ve hücre-matriks ilişkilerini düzenler (64). HIF sistemi hedef proteinleri, fosfatidilgliserat kinaz-1 (PGK-1), glukoz transporter-1 (GLUT-1), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), heme oksijenaz-1 (HO-1), plazminojen aktivatör inhibitörü-1(PAI-1), doku metalloproteinaz inhibitörü-1 (TIMP-1), konnektif doku büyüme faktörü (CTGF) ve eritropoetin'dir (63,64,65).

2.2.1. HIF-1 ve HIF-2

HIF-1 ve HIF-2 heterodimerik heliks-loop-heliks yapısında transkripsiyon faktörleridir ve oksijene duyarlı α -altbirim ile ona bağlı sentezlenen β -altbirimden oluşur (64). HIF heterodimerleri, hipoksiye duyarlı gen bölgelerinde hipoksiye yanıt veren proteinlere bağlanarak (hipoksi sorumlu element = HRE), doğrudan transkripsiyonel aktiviteyi başlatır (63).

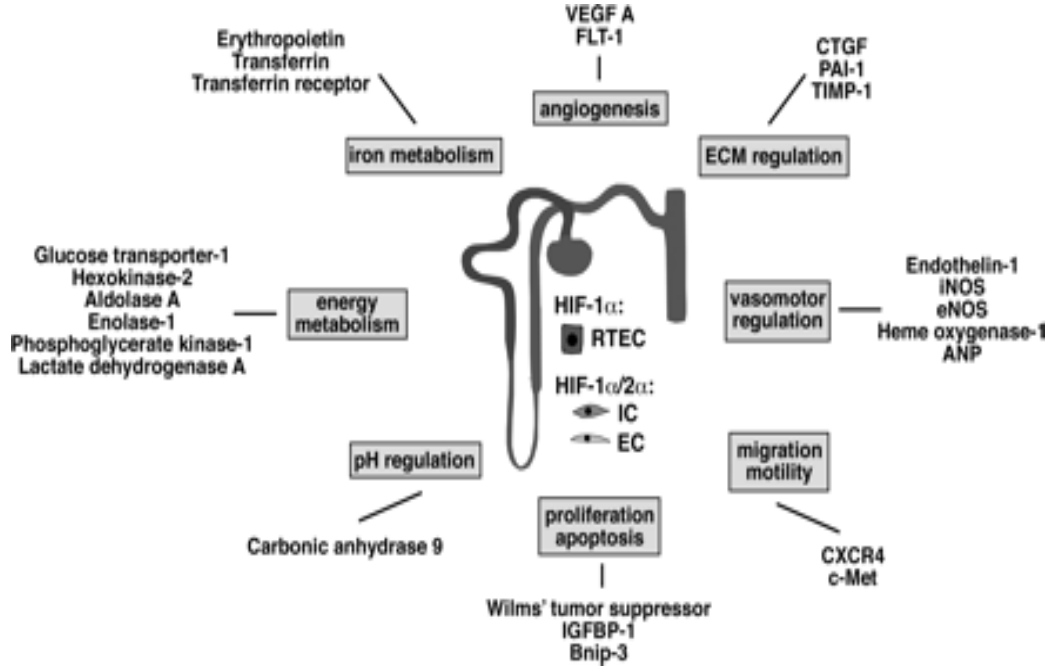


Şekil 1. HIF sisteminin hipoksik sinyal yolağı (64)

Normoksik koşullarda hidroksillenmiş HIF- α formu, E3-ubiquitin ligaz kompleksine bağlı von Hippel-Lindau tümör supresör proteinine (pVHL) bağlanır ve prolil-4-hidroksilaz enzimi ile inaktive edilir. Hipoksizde ise prolil hidroksilaz enzimi inaktive olur, HIF- α yıkımı inhibe edilir (64). Hücre kültürlerinde ortamın oksijen konsantrasyonu %5 azaldığında HIF- α alt biriminin arttığı gösterilmiştir (66). Reoksijenasyon sonrası prolil hidroksilaz enzimi tekrar aktive olarak HIF- α alt birimini inaktive eder (64,66).

Akut renal iskemi sırasında HIF-1 α proteolizisi inhibe olur, renal tübüler epitel hücrelerinde birikir ve HIF-1 β alt birimi ile dimerize olarak transkripsiyonel aktif formu HIF-1'i oluşturur (64). HIF-2 α renal tübüler epitel hücrelerde nadir bulunurken, renal interstisyel fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde eksprese olur ki bunun anlamı, renal tübüler epitel hücrelerinde hipoksik HIF sinyal sisteminin anahtar medyatörü HIF-1 α 'dır (64).

Hipoksiye hücre adaptasyonda global regülatör olarak HIF, akut hipoksik hücrelerde anaerobik glikoliz, protein translasyonu, hücre proliferasyonu ve apoptozis gibi hayati biyolojik olayları düzenler (63,64).



Şekil 2. HIF hedef genlerinin direkt transkripsiyonel aktivitesi (64)

Hipoksik renal hasar sırasında HIF-1, VEGF ve HO-1 gibi sitoprotektif etkileri olan faktörlerin sentezini artırır (64). Normal koşullarda böbrekte HO-1 saptanmazken, akut hipoksi sonrası tübüler ve interstiyel hücrelerde HO-1 artar (65). Benzer şekilde VEGF, medüller ve kortikal henle kulpunda nadiren saptanırken akut hipoksinin 2. gününden itibaren medüller bölgede artar (65). Deneysel hayvan modelinde renal segmental enfarkt sonrası renal tüp epitel hücrelerinde HIF birikimi, HIF hedef genlerinin aktive olması sonucu renal tübül epitel hücrelerinde HO-1 ve VEGF ekspresyonunda artma ve kapiller endotel hücrelerinde, interstiyel ve tübüler hücrelerde proliferasyon görülmüştür (65). Muhtemelen HO-1 toksik oksijen radikallerinin yıkımını sağlayarak hipoksik hücre hasarını önlemekte; VEGF revaskülarizasyonu sağlayarak normoksik koşulları tekrar oluşturmayı hedeflemektedir (65).

Kontrast nefropatisi patogenezinde de hipoksinin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (1,15,23,24,63,64). Deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi gelişen böbreklerde iç ve dış medullada HIF birikimi görülmüştür (67). HIF-1 α renal

tübül hücrelerinde, HIF-2 α interstisyel ve endotel hücrelerde immünohistokimyasal yöntemlerle saptanmıştır (67).

Benzer şekilde deneysel hayvan modellerinde rabdomiyolize bağlı akut böbrek yetmezliği modelinde (68) ve renal arter ligasyonu sonrası gelişen segmental infarkt alanında (65) immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilen HIF birikimi gösterilmiştir.

Kronik böbrek yetmezliği sürecinde kronik hipoksik koşullar varlığında da HIF ekspresyonunun arttığı ifade edilmektedir (63,64,69).

2.3.Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)

VEGF, anjiogenez ve embriyogenez sırasında organ gelişimi ve farklılaşması için gerekli olduğu gibi embriyogenez sonrası dönemde de yara iyileşmesi ve üreme fonksiyonları için gereklidir (70). Fizyolojik olaylar dışında anjiogenez, proliferatif retinopati, yaşlanma ile ilişkili makula dejenerasyonu ve tümör oluşumu gibi birçok hastalığın patogenezinde de rol alır (70,71).

VEGF, endotel hücre farklılaşması ve vaskülogenez, yeni damar oluşumu ve anjiogenez fonksiyonları için elzemdir (70). Ek olarak, hipoksik stres altında apoptozisi önleyerek hücrelerin sağkalımı, endotel hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu, vasküler permeabilite artışı ve endotele bağlı vazodilatasyon fonksiyonlarını yerine getirir (70,74).

Büyüme faktörü ailesinin bir üyesi olan VEGF, VEGF-A, -B, -C, -D, -E ve Plasental büyüme faktörü olmak üzere 6 alt birimden oluşur (74). VEGF-A, fizyolojik ve patolojik anjiogenezde majör regülatördür (70,74).

VEGF'in dokularda en sık bulunan ve biyolojik aktif formu, 2 adet 23-kDa monomerinden oluşan 46-kDa homodimer yapısındaki formudur (74,75).

2.3.1. VEGF gen ekspresyonu regülasyonu:

VEGF gen ekspresyonunda hipoksi anahtar regülatördür (70,71). Hipoksik koşullarda HIF-1, VEGF gen bölgesindeki hipoksi sorumlu element (HRE) bölgesine bağlanır ve VEGF gen transkripsiyonunu başlatır ve eş zamanlı VEGF mRNA stabilizasyonunu sağlar (70,74).

Hipoksi dışında birçok sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri VEGF ekspresyonunu artırır (71). Epidermal büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), keratinosit büyüme faktörü, interlökin 1, interlökin-6, ileri glikozillenmiş son ürünler (AGEs), protein kinaz-c, reaktif oksijen ürünleri, prostoglandin E2, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), tiroid stimule edici hormon (TSH) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH) bunlardan birkaçıdır (71). VEGF ekspresyonu, ayrıca renin ve anjiotensin 2'nin arttığı durumlarda da artar (76). Özellikle anjiotensin 2'nin, VEGF ekspresyonu için güçlü bir uyarıcı olduğu ifade edilmektedir (70,76).

2.3.2. Böbrekte VEGF ve VEGF reseptörlerinin dağılımı:

VEGF, fetal ve erişkin böbreği glomerül hücreleri ve glomerül matriksinde, erişkin böbreğinde özellikle glomerül podositlerinde eksprese edilir (71). Ayrıca distal tübüller, toplayıcı kanallar ve daha az oranda proksimal tübüllerde saptanır (70). VEGF reseptörleri de esas olarak glomerül kapillerlerinde bulunur (77). Daha az oranda diğer kapillerler ve venlerde, kapillerlere komşu endotel hücrelerde, kapillerlere komşu mezangial ve tübül hücrelerinde bulunur (70,75,77).

2.3.3. Renal fizyolojide VEGF'in rolü:

VEGF, normal böbrekte mikrovasküler permeabiliteyi düzenler (71). Glomerüler permeabilitenin düzenlenmesini, filtrasyon bariyerini oluşturan kapiller fenestrasyonları sağlar (70,71,77). VEGF'in renal tübül hücreleri üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir (70). Ancak peritübüler kapiller dolaşımın solutlere yüksek geçirgenliği sağlayan fenestre yapısının regülasyonunda rolü olduğu düşünülmektedir (70,71).

2.3.4. Akut böbrek yetmezliğinde VEGF:

VEGF gen transkripsiyonu ve VEGF mRNA stabilizasyonu için en güçlü uyaran hipoksidir (70,71,72,73). 24 saat hipoksi sonrası glomerül epitel hücrelerinde VEGF mRNA 2.4 kat artmış oranda eksprese edilirken, renal proksimal tübül hücrelerinde 4.9 kat oranında eksprese edildiği gösterilmiştir (73,78).

Hipoksiye en duyarlı bölge dış medulladır (79). Proksimal tübüllerin S3 segmenti ve medüller kalın çıkan kolonlarda yüksek oksijen kullanımı nedeniyle sınırda normoksik koşullarda bulunan bu bölge, hipoksiye HIF-1 α sentezinde artış ile karşılık verirken; HIF- 1 α 'ya bağlı VEGF sentezinde artma ile nitrik oksit salınımı artarak tübüler ve interstisyel hücre hasarı önlenmeye çalışılır (70,79). Ayrıca VEGF sentezindeki artış endotel hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve matriks sentezinde rol alır (70). Endotel hücreler için sağkalım faktörü olarak da ifade edilebilen VEGF, tübüllere komşu vasküler endotel hücre apoptozisini önleyerek peritübüler kan akımının devamını sağlar (72,73).

Bir çalışmada, hipoksik hasar sonrası VEGF sentezinin artmadığı, sadece dağılımının değiştiği ifade edilmektedir (80). Buna göre VEGF, hipoksiye yanıt olarak sitoplazmik bölgeden bazolateral bölgeye göç etmektedir (80). Takiben, bunu destekleyen bir çalışma yayınlanmamıştır.

2.3.5. VEGF'in diğer hastalıklarda rolü

Deneysel hayvan modelinde Tip 1 ve tip 2 DM hastalığında VEGF ekspresyonunun glomerüler podositler ve tübüler hücrelerde arttığı, VEGF inhibisyonunun glomerüler hiperfiltrasyonu, glomerüler hipertrofiyi ve albüminüriyi azalttığı ifade edilmektedir (81).

Deneysel çalışmalarda nefron azaltılması sonrası glomerüler ve tübüler hipertrofi ve endotel hücre proliferasyonu için VEGF varlığı gerektiği saptanmıştır (82). Bu çalışmada VEGF'in ortamda azalması, glomerüloskleroz ve tübülointerstisyel fibrozise yol açmıştır (82).

Renal hücreli kanserde tümör büyüklüğü ile VEGF ekspresyonu doğrudan ilişkilidir (83).

Kronik düşük dereceli hipoksinin önemli rol oynadığı kronik siklosporin toksisitesinde VEGF ve VEGF mRNA ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (84). Kronik hipoksinin ve siklosporinin endotel hasarı yarattığı, bu hasarın düzeltilmesi ve endotel fonksiyonlarının regülasyonu amacıyla VEGF'in ortamda arttığı ifade edilmektedir (84).

Kronik siklosporin toksisitesine histolojik olarak çok benzeyen kronik allograft nefropatisinde de VEGF ekspresyonu artmıştır (85).

Erişkin polikistik böbrek hastalığında da renal kistlerde VEGF ekspresyonunun ve anjiogenezin arttığı saptanmıştır (86).

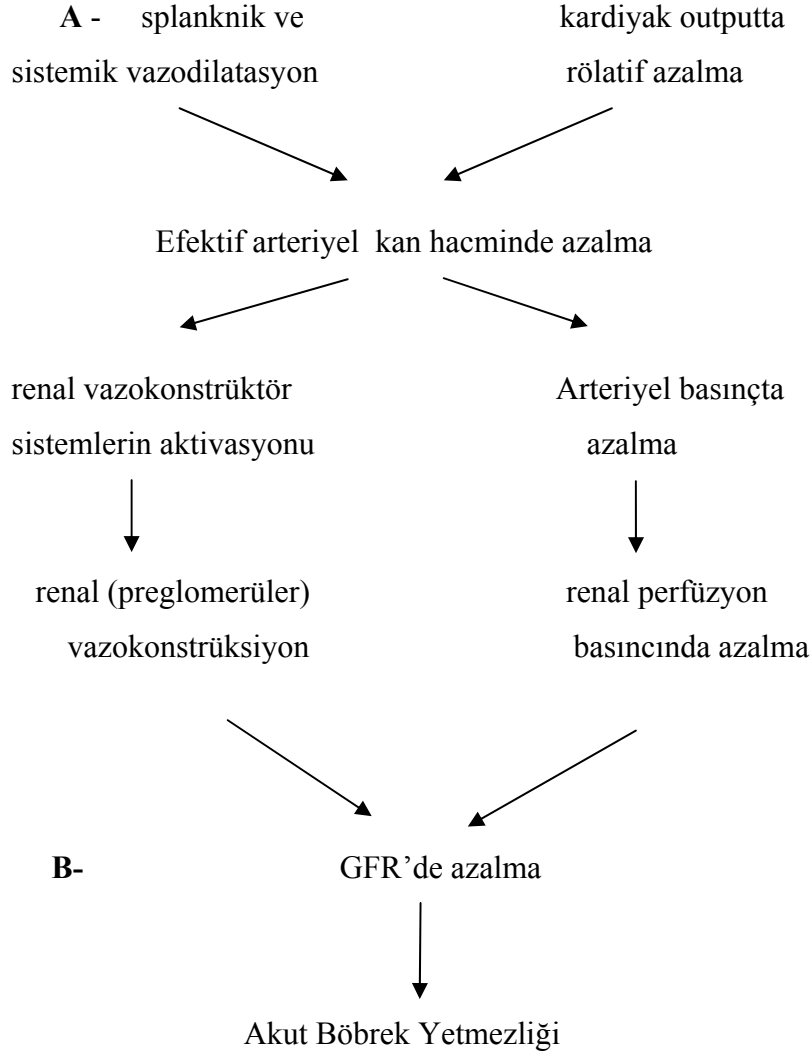
Özetle, akut renal iskemi sırasında sentezi artan HIF-1 α apoptozis ve/veya hücre proliferasyonu gibi hayati olayları regüle ederken, ona bağlı sentezi artan ve anjiogenez ile sitoprotektif etkiler gösteren VEGF hipoksi belirteçleri olarak birçok klinik ve deneysel çalışmada kullanılmıştır. Bu çalışmada da amaçlanan, renal medüller iskemi sonucu geliştiği bilinen kontrast nefropatisinde VEGF ekspresyonunu göstermek; profilaktik amaçla kullanılan terlipressin sonrası ise bu faktörün dokuda azalıp azalmadığını immünohistokimyasal tekniklerle tespit etmektir.

2.4. Terlipressin

Terlipressin, peptid yapıda bir hormon olan vazopressin'in sentetik analogudur (48). Doğal hormon olan lizin-vazopressin'den türetilmiş, 12 amino asitten oluşan sentetik yapıda bir maddedir (48). Ön ilaç formunda olan terlipressin, vücutta endotelial peptidaz enzimi tarafından parçalanır ve dolaşımında lizin-vazopressin'e döner (48).

Terlipressin'in vazopressin-1 (V1) reseptörü üzerinde agonist etkileri olduğu, splanknik vazokonstrüksiyon yaparak karaciğer sirozunda dolaşım bozukluğunu düzelttiği ve karaciğer sirozuna bağlı hepatorenal sendrom tablosunu renal fonksiyonları iyileştirerek düzelttiği bilinmektedir (1,48,49,61).

Asitli hastada periferik arteriyel ve splanknik arteriyel vazodilatasyon nedeniyle sistemik arteriyel kan basıncı ve sistemik vasküler direnç azalmıştır (49,61). Portal ve splanknik vazodilatasyona sekonder hiperdinamik dolaşım nedeniyle renin-anjiotensin-aldosteron sistemi ve sempatik sinir sistemi aktive hale gelir (50). Vazoaktif hormonal aktivasyon, renal vazokonstrüksiyona, renal perfüzyon basıncı ve glomerüler filtrasyon basıncında azalmaya yol açar (50). Hepatorenal sendromda glomerüler hipoperfüzyon sonucu fonksiyonel böbrek yetmezliği gelişim basamakları şekil 3'de gösterilmiştir (94).



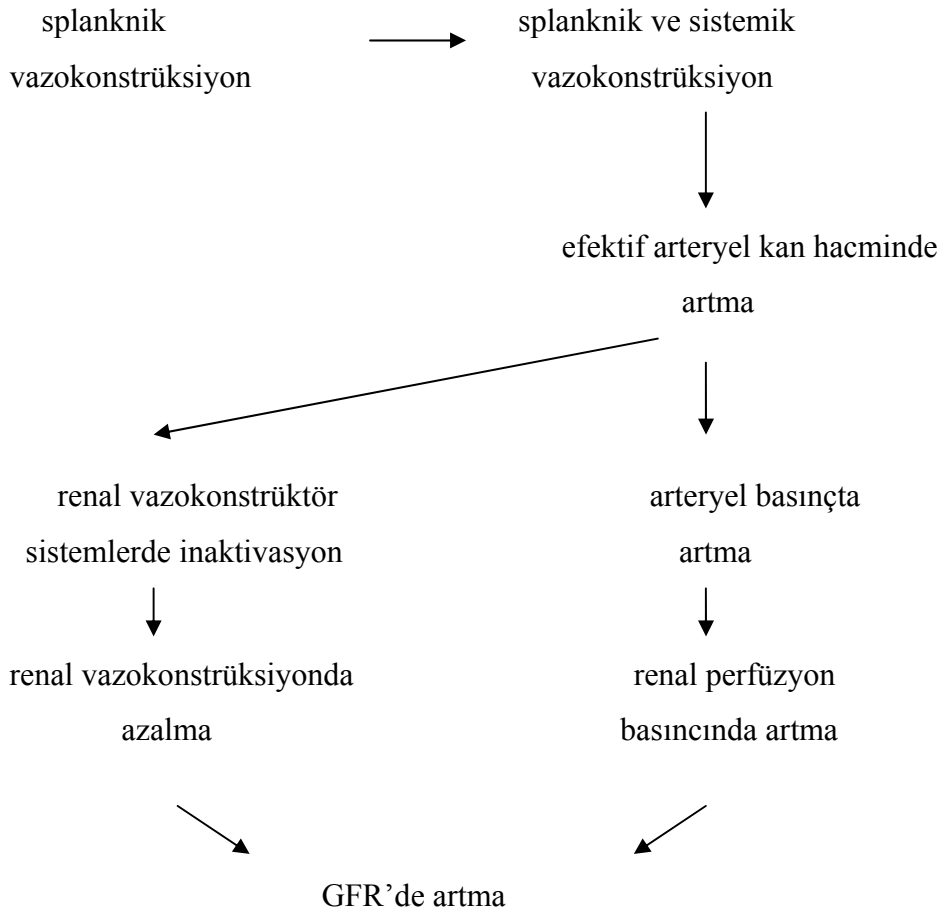
Şekil 3. Sirozlu hastada tip 1 hepatorenal sendrom gelişme mekanizmaları

(A) Renal vazokonstrüktör sistemlerin aktivasyonu (sempatik sinir sistemi aktivasyonu ve renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi aktivasyonu) preglomerüler vazokonstrüksiyon mekanizmalarında anahtar rol oynar (B) hepatorenal sendromlu hastalarda gelişen glomerüler hipoperfüzyon ve GFR'de azalma sonucu fonksiyonel böbrek yetmezliği gelişir (94)

Terlipressin, asitli hastada splanknik ve sistemik vazodilatasyonu düzelterek sistemik kan basıncını artırır, V1 reseptör agonisti etkisiyle renal perfüzyon basıncını artırır ve renal fonksiyonları düzeltir (51). Asitli hastada terlipressin uygulandıktan sonra renal perfüzyon basıncının düzelmesiyle glomerüler filtrasyonun arttığı, sodyum ve kreatinin klirensinin arttığı, renal vazokonstrüksiyondan sorumlu vazoaaktif sistemin baskılandığı gösterilmiştir (51,52) .

Terlipressin verilmesinden dakikalar sonra plazma renin ve norepinefrin düzeylerinin azaldığı, atrial natriüretik peptid (ANP) düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (51,54). Terlipressin sonrası ortalama arteryel basınç artışı, atrial basıncı arttırmakta; atrial gerilme ANP sekresyonuna yol açmaktadır (53).

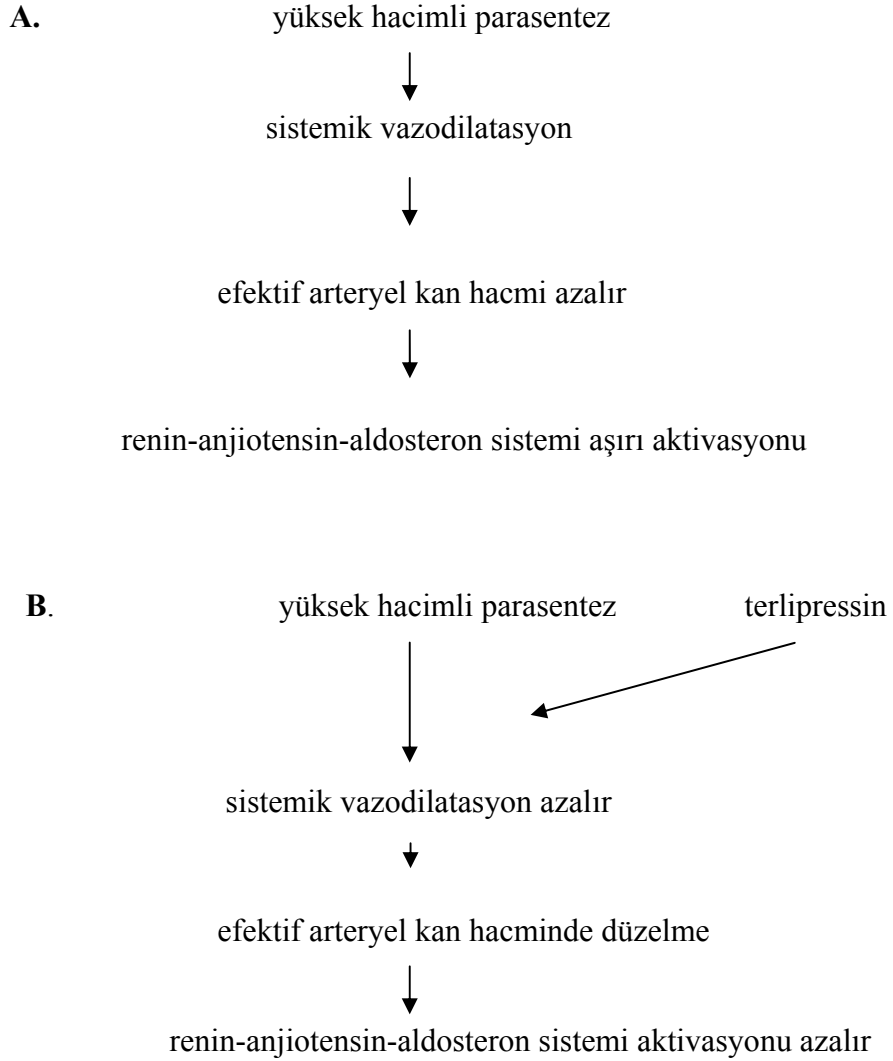
Terlipressinin hepatorenal sendromda renal fonksiyonları düzeltme mekanizması şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 4. Tip 1 hepatorenal sendromda vazopressin analoglarının (terlipressin ve ornipressin) renal fonksiyonları düzeltme mekanizması (94)

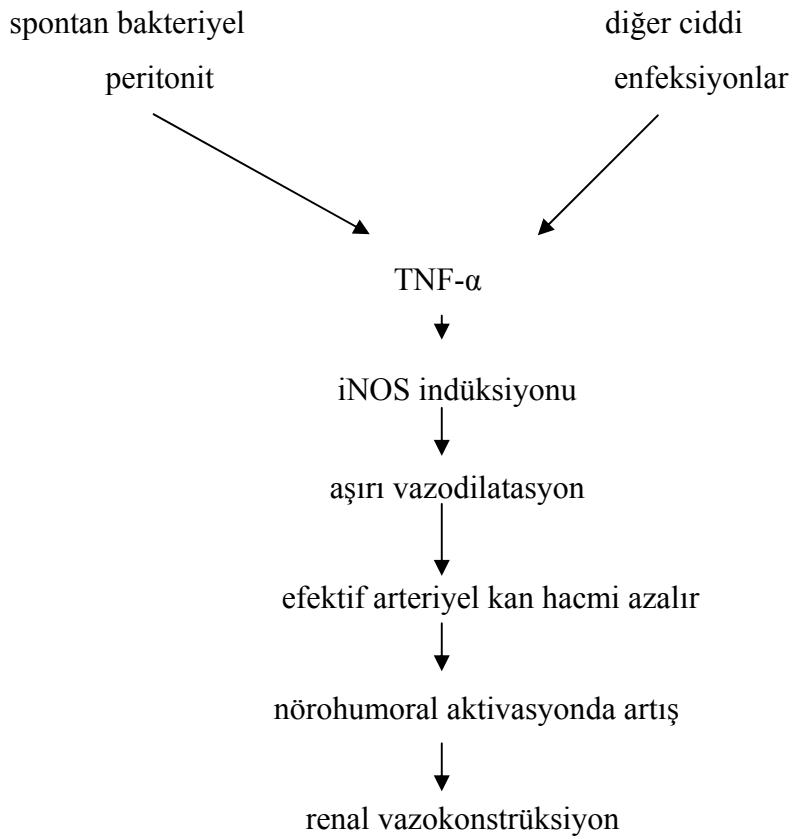
Terlipressin, kronik karaciğer hastalığı olan asitli hastalarda parasentez sonrası gelişen dolaşım bozukluğunu da düzeltmektedir (55). Parasentez sonrası dolaşım bozukluğu, plazma renin aktivitesini artırır ve plazma norepinefrin düzeylerinde yükselmeye yol açar (56). Çünkü parasentezle geniş hacimde sıvı çekilmesi sistemik arteriyel kan hacmini düşürür, arteriyel vazodilatasyon ve nörohumoral aktivasyona yol açar (55,56). Parasentez sonrası terlipressin uygulanması nörohumoral aktivasyonu baskılayarak ve sistemik arteriyel basıncı koruyarak dolaşım bozukluğu gelişmesine engel olur (56).

Parasentez sonrası gelişen dolaşım bozukluğunun terlipressin ile önlenme mekanizması şekil 5’de gösterilmiştir.



Şekil 5. Parasentez sonrası gelişen dolaşım bozukluğunun (A) mekanizması, (B) terlipressin ile önlenmesi (94)

Terlipressin, karaciğer hastalığı olmayan hastalarda septik şok tedavisinde kullanılmış; tıpkı kronik karaciğer hastalarında olduğu gibi bu hastalarda da nörohumoral aktivasyonu baskıladığı, sistemik arteriyel basıncı arttırdığı gösterilmiştir (57). Septik şok patogenezinde endotoksinler, tümör nekroz faktörü (TNF- α) ve diğer sitokinlerin salınımını artırarak arteriyel düz kas hücrelerinde 'indüklenebilir nitrik oksit sentaz (İNOS)' enzimini aktive eder ve aşırı nitrik oksit (NO) senteziyle arteriyel vazodilatasyona ve hipotansiyona yol açar (58) (şekil 6).



Şekil 6. Renal vazokonstrüksiyon gelişiminde TNF- α ve iNOS'un rolü (62)

Vazopressin ve sentetik analogu terlipressin, aşırı NO sentezini önleyerek arteriyel vazodilatasyonu ve hipotansiyonu önler. Non sirotik septik şoklu hastalarda vasküler

düz kas hücrelerinde sitokinle indüklenen NO sentezinin vasopressin ile inhibe edildiği gösterilmiştir (59).

Benzer şekilde sirotik rat aortasında sitokinle indüklenen İNOS aktivitesinin terlipressin ile inhibe edildiği gösterilmiştir (60).

Non sirotik ciddi septik şokta olan hastalarda vazopressin uygulanması ile kreatinin klirensinin arttığı ifade edilmektedir (57).

Terlipressin, nörohumoral aktivasyonu baskılayarak, renin aktivitesi ve norepinefrin düzeylerini düşürerek renal vazokonstrüksiyonu önlemekte; septik şoklu hastalarda aşırı NO aktivitesini baskılayarak hemodinamik stabiliteyi sağlamaktadır.

Renal vazokonstrüksiyonun önlenmesi, kontrast nefropatisi patogenezinde etkili olan medüller iskemiye önleyebilir. Medüller iskemi ve kontrast maddenin yarattığı sitotoksik etki sonrası kontrast nefropatisi görülmektedir ve terlipressin renal vazodilatasyon yapıcı etkisiyle intrarenal mikrosirkülasyonu düzelterek kontrast nefropatisi gelişimini önleyebilir.

Özetle, hepatorenal sendrom patogenezi düşünüldüğünde terlipressinin splanknik vazokonstrüksiyon yapma, endojen vazoaktif sistemi baskılama ve intrarenal vazodilatasyon yaratma yeteneği kontrast nefropatisi profilaksisinde etkili olabileceği düşüncesini akla getirmiştir.

3. ARAÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız deneysel, prospektif, randomize bir çalışma olup, çalışma protokolü ‘Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu’ tarafından onanmıştır.

3.1. Deney Hayvanları:

Tüm hayvanlar için uygulanan prosedürler ‘Laboratuvar Hayvanları Kullanımı ve Bakım Klavuzu’na uygun olarak planlanmıştır. Çalışmamızda ortalama ağırlıkları 200-305 gram, yaşları 3-5 ay arasında değişen 32 adet wistar cinsi dişi sıçan kullanılmıştır. Çalışma süresince sıçanlar sıcaklık ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), nem (%65-70) ve ışık (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) bakımından eşit koşullarda saklanmıştır. Hayvanlar standart sıçan diyeti ile beslenmiştir.

3.2. İlaçlar:

Çalışmada kullanılan intravenöz indometazin Ovation Pharmaceuticals firması tarafından sağlanmıştır. İndometazin serum fizyolojik ile dilue edilerek 1 mg/ml konsantrasyonunda solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon deneklerin kuyruk veninden 10 mg/kg dozunda uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan intravenöz Nw-Nitro-L-arginine metil ester hidroklorid (L-NAME) Sigma Aldrich firması tarafından sağlanmıştır. L-NAME serum fizyolojik ile dilue edilerek 10 mg/ml konsantrasyonunda solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon deneklerin kuyruk veninden 10 mg/kg dozunda uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan intravenöz amidotrizoat Schering firması tarafından sağlanmıştır. Amidotrizoat deneklerin kuyruk veninden 6 ml/kg dozunda uygulanmıştır.

Çalışmada kullanılan terlipressin Ferring firması tarafından sağlanmıştır. Terlipressin serum fizyolojik ile dilue edilerek 1mg/ml konsantrasyonunda solüsyon hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon deneklerin kuyruk veninden 0.017 mg/kg/dak olacak şekilde 3 dakika boyunca yavaş infüzyon şeklinde uygulanmıştır.

3.3. Deney Grupları:

Çalışmanın başlangıcında denekler her grupta 8 denek olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Grupların özellikleri aşağıda belirtilmektedir.

3.3.1. Grup 1 (terlipressin + amidotrizoat grubu):

Bu gruptaki deneklere hafif eter anestezisi altında kuyruk veninden damar yolu açıldıktan sonra öncelikle 0.017 mg/kg/dak dozunda terlipressin 3 dakika boyunca intravenöz yavaş infüzyon şeklinde uygulanmıştır. Onbeş dakika sonra indometazin 10 mg/kg dozunda intravenöz olarak uygulanmıştır. Takiben onbeş dakika aralıklarla 10 mg/kg dozunda intravenöz L-NAME ve 6 ml/kg dozunda intravenöz amidotrizoat uygulanmıştır.

3.3.2. Grup 2 (terlipressin + serum fizyolojik grubu):

Bu gruptaki deneklere hafif eter anestezisi altında kuyruk veninden damar yolu açıldıktan sonra terlipressin 0.017 mg/kg/dak dozunda 3 dakika boyunca intravenöz yavaş infüzyon halinde uygulanmıştır. Takiben 15 dakika aralarla 3 kez 10 ml/kg serum fizyolojik uygulanmıştır.

3.3.3. Grup 3 (amidotrizoat + serum fizyolojik grubu):

Bu gruptaki deneklere hafif eter anestezisi altında kuyruk veninden damar yolu açıldıktan sonra indometazin 10 mg/kg dozunda intravenöz olarak uygulanmıştır. Takiben 15 dakika aralıklarla 10 mg/kg dozunda intravenöz L-NAME, 6 ml/kg dozunda intravenöz amidotrizoat ve 10 ml/kg serum fizyolojik uygulanmıştır.

3.3.4. Grup 4 (serum fizyolojik + serum fizyolojik grubu):

Bu gruptaki deneklere hafif eter anestezisi altında kuyruk veninden damar yolu açıldıktan sonra 4 kez 15'er dakika aralıklarla 10 ml/kg serum fizyolojik uygulanmıştır.

3.4. Örneklerin toplanması:

Uygulamaların 24. saatinde denekler 24 saatlik idrar toplamak üzere metabolik kafeslere alınmıştır.

İdrar toplanması işlemini takiben - uygulamaların 48. saatinde – sıçanlara intraperitoneal olarak 50 mg/kg dozunda ketamin uygulanmıştır. Ketamin ile sağlanan derin anestezi altında - kuyruk kısırtma yanıtının kaybolduğu görüldükten sonra - deneklerden 22 G iğne uçlu enjektör ile intrakardiyak 7 cc kan örneği kuru tüpe alınmıştır.

Daha sonra orta hat abdominal insizyon açılarak sağ böbrekler künt disseksiyon ile çıkarılmıştır.

Sıçanlardan alınan kan örnekleri 15 dakika süreyle 2800xg'de santrifüj edilerek serum ayrışması sağlanmıştır. Ayrılan serum örnekleri ve 24 saatlik idrar örnekleri çalışma gününe kadar -20°C'de saklanmıştır.

Sıçanlardan alınan sağ böbrekler fosfat tamponlu serum fizyolojik (%10 PBS) ile tamponlanmış formaldehit solusyonunda 24 saat bekletilmiştir. Parafin bloklara alınan doku örnekleri, 3µm boyutlarında kesilerek hemotoksilen-eozin boyası ile boyanmıştır.

Takiben immünohistokimyasal değerlendirme için aşağıda belirtilen işlemler uygulanmıştır.

Son aşamada denekler uygun koşullarda sakrifiye edilmiştir

3.5. Biyokimyasal ölçümler:

Biyokimyasal ölçüm kiti Roche Diagnostics (Almanya) firmasından alınmıştır. Serum ve idrar kreatinin ölçümleri spektrofotometrik olarak (Modular P, Roche Diagnostics, Almanya), serum ve idrar sodyum (Na) ölçümleri ise ISE (İyon Selektif Elektrod) yöntemi kullanılarak (Modular ISE, Roche Diagnostics, Almanya) çalışılmıştır.

Kreatinin klerensi ve fraksiyone sodyum atılımı (FENa %) hesaplanması için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

Kreatinin klirensi: idrar kreatinin (mg/dl) x idrar hacmi (ml/dak/100gr) / serum kreatinin (mg/dl)

FENa %: idrar sodyum x serum kreatinin / serum sodyum x idrar kreatinin x 100

3.6. Histolojik değerlendirme:

Doku örnekleri fosfat tamponlu serum fizyolojik (%10 PBS) ile tamponlanmış formaldehit solusyonunda fiske edilmiş, rutin takip prosedüründen geçirilerek parafine gömülmüştür. Ardından mikrotomda (Leica RM2125RT) 3µm kalınlığında kesitler alınarak hematoxilen-eozin, PAS (periodik asit schiff) ve PAMS (periodik asit metenamin silver) boyaları ile boyanmış, Marmara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında tek bir patoloğ tarafından tübüler nekroz, proteinöz kast ve medüller konjesyon gibi histopatolojik değişiklikler açısından ışık mikroskopisinde incelenmiştir. Tübüler nekroz ve proteinöz kast değerlendirmesi için kullanılan skorlama sistemi Tablo 4'de özetlenmiştir.

Tablo 4. Tübüler nekroz ve proteinöz kast skorlaması (96,97,98)

Histolojik değişiklik	skor
normal	0
hafif (izole hasar odakları)	1
orta (hasar < %25)	2
ciddi (hasar %25-50)	3
çok ciddi (hasar > %50)	4

Medüller konjesyon değerlendirmesi için kullanılan skorlama sistemi Tablo 5’de özetlenmiştir.

Tablo 5. Medüller konjesyon skorlaması (96,97,98)

Histolojik değişiklik	skor
normal	0
hafif (eritrositler ×400 büyütmede görülür)	1
orta (eritrositler ×200 büyütmede görülür)	2
ciddi (eritrositler ×100 büyütmede görülür)	3
çok ciddi (eritrositler ×40 büyütmede görülür)	4

3.7. İmmünohistokimyasal değerlendirme:

İmmünohistokimyasal değerlendirmede kullanılan VEGF antikoru Biogen firması tarafından sağlanmıştır.

Dokularda VEGF ekspresyonunu göstermek amacıyla streptavidin biotin-peroksidaz immünohistokimya boyama yöntemi kullanılmıştır.

Bu yöntemde parafine gömülü dokulardan, pozitif şarjlı lamlara 3µm kalınlığında kesitler alınmış ve 37°C'de 1 gece deparafinize edilmiştir. Kesitler üç ayrı ksilende beşer dakika ve iki ayrı alkolde onar dakika bekletilmiş ve endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için %3'lük hidrojen peroksite alınmıştır. Maskelenen antijenleri açığa çıkarmak amacıyla mikrodalga fırında, 200 W güçte 15 dakika süre ile sitrat (ph:6) tamponu ile muamele edilmiştir. Oda ısısında 20 dakika soğutulan lamlar, PBS (Phosphat Buffer Saline) ile yıkanmış ve dokularda non spesifik boyanmayı engellemek için lamlara protein blokajı uygulanmıştır. Kesitlere anti-VEGF (Ab-1, RB-222-R7; Thermo Fisher Scientific; Fremont, CA) damlatılarak oda ısısında 30 dakika inkübe edilmiştir. İki ayrı PBS ile yıkanan lamlara biotinlenmiş sekonder antikor (UltraVision Detection System; TP-015-HD; Thermo Fisher Scientific; Fremont, CA) damlatılmış ve 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda PBS ile yıkanan kesitlere streptavidin peroksidaz (UltraVision Detection System; TP-015-HD; Thermo Fisher Scientific; Fremont, CA) uygulanmış ve tekrar 10 dakika inkübe edilmiştir. Görüntü elde etmek için lamlara DAB (Diaminobenzidin) kromojeni damlatılmış ve 5 dakika bekletilmiştir. Mayer Hematoksilen ile nükleer zıt boyama yapılmış ve kesitler dehidrate edilerek kapatılmıştır.

Hazırlanan preparatlar Marmara Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında tek bir patolog tarafından semikantitatif değerlendirmeye alınmıştır. VEGF immünoekspresyonu değerlendirmesi için kullanılan skorlama sistemi Tablo 6'da özetlenmiştir.

Tablo 6. VEGF skorlaması (65)

Histolojik değişiklik	skor
immünekspresyon yok	0
%25 glomerülde immünekspresyon	1
%25-50 glomerülde immünekspresyon	2
%50-75 glomerülde immünekspresyon	3
>%75 glomerülde immünekspresyon	4

3.8. Verilerin istatistiksel değerlendirmesi:

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için ‘SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11.5’ programı kullanılmıştır. Gruplarda ölçümle alınan verilerin karşılaştırılması için ‘tek yönlü ANOVA testi’ kullanılmıştır. İkili grup karşılaştırmalarında bağımsız gruplarda ‘Mann Whitney U testi’ kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için ‘Tukey çoklu karşılaştırmalar testi’ kullanılmıştır. Gruplarda sayımla alınan nitel verilerin karşılaştırılması için ‘ki-kare testi’ kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) olarak gösterilmiş, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. SONUÇLAR

Çalışmanın sonunda elde edilen vücut ağırlığı (gr), renal fonksiyon parametreleri (kreatinin, kreatinin klirensi, FENa(%)), histopatolojik değerlendirme ve immünohistokimyasal değerlendirme sonuçları 4 ayrı grup için değerlendirilmiştir.

4.1. Vücut ağırlığı değerlendirmesi:

Çalışmanın başlangıcında tüm gruplardaki deneklerin vücut ağırlıkları ortalaması (gr) Grup 1'de $251,25 \pm 32,70$ gr, Grup 2'de $255,62 \pm 25,83$ gr, Grup 3'de $255,00 \pm 27,25$ gr, Grup 4'de $245,50 \pm 23,38$ gr olarak saptanmıştır (tablo 7). Çalışma grupları arasında başlangıç vücut ağırlığı ölçümünde fark saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 7. Çalışmanın başlangıcında deneklerin vücut ağırlığı ortalaması

Çalışma grubu	Vücut ağırlığı (gr)
Grup 1	$251,25 \pm 32,70$
Grup 2	$255,62 \pm 25,83$
Grup 3	$255,00 \pm 27,25$
Grup 4	$245,50 \pm 23,38$
p değeri (tek yönlü ANOVA)	> 0.05

4.2. Renal fonksiyon parametreleri değerlendirmesi:

Bütün gruplarda çalışma sonunda serum ve idrar kreatinin düzeyleri, serum ve idrar sodyum (Na) düzeyleri ölçülmüş; önceki bölümde ifade edildiği şekilde kreatinin klirensi (krkl) ve FENa (%) değerleri hesaplanmıştır.

Grup 1'de kreatinin düzeyi ortalaması $0,53 \pm 0,16$ mg/dl, grup 2'de $0,42 \pm 0,06$ mg/dl, grup 3'de $1,01 \pm 0,43$ mg/dl ve grup 4'de $0,42 \pm 0,11$ mg/dl olarak saptanmıştır. Grup

3'de kreatinin düzeyi ortalaması diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p<0.05$). İkili grup karşılaştırmalarında grup 3 ve 4'de ($p=0.01$), grup 1 ve 3'de ($p=0.027$), grup 2 ve 3'de ($p=0.022$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olup; grup 1 ve 4'de ($p>0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (şekil 7).

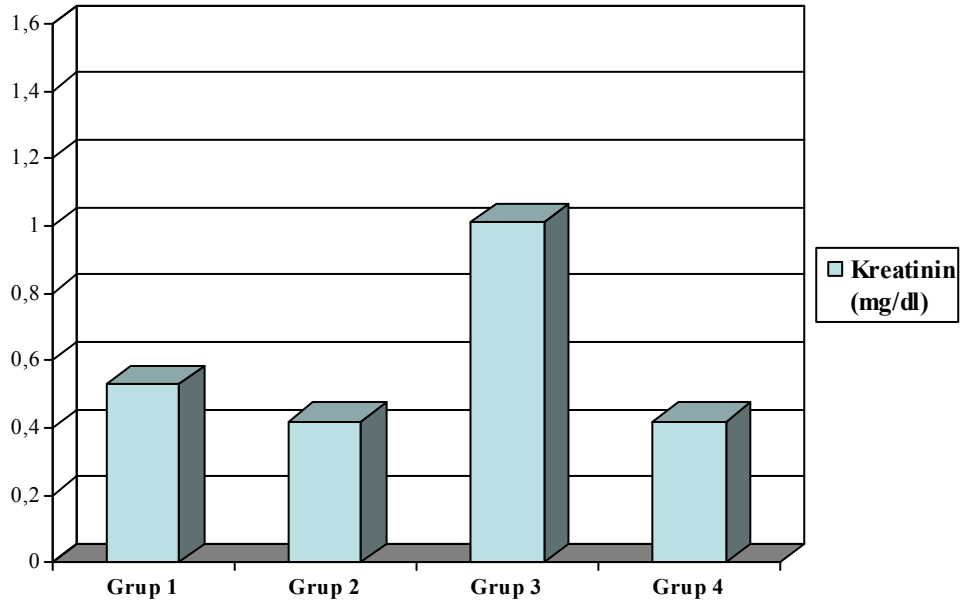
Kreatinin klirensi (krkl) ölçüm ortalamalarında grup 1 için kreatinin klirensi $1,07\pm 0,31$ mg/dl, grup 2 için $1,47\pm 0,55$ mg/dl, grup 3 için $0,57\pm 0,37$ mg/dl ve grup 4 için $1,69\pm 0,78$ olarak tespit edilmiştir. Grup 3'de kreatinin klirensi ortalaması diğer gruplara göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p<0.05$). İkili grup karşılaştırmalarında grup 3 ve 4'de ($p=0,002$), grup 1 ve 3'de ($p=0,021$), grup 2 ve 3'de ($p=0.011$) istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiş olup; grup 1 ve 4'de ($p>0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (şekil 8).

Fraksiyone sodyum atılım yüzdesi (FENa %) ortalamaları grup 1'de $0,23\pm 0,12$, grup 2'de $0,17\pm 0,06$, grup 3'de $1,8\pm 2,38$, grup 4'de $0,20\pm 0,10$ olarak saptanmıştır. Grup 3'de FENa(%) ortalaması diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p<0.05$). İkili grup karşılaştırmalarında grup 3 ve 4'de ($p=0.002$), grup 1 ve 3'de ($p=0,003$), grup 2 ve 3'de ($p=0.009$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olup; grup 1 ve 4'de ($p>0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (şekil 9).

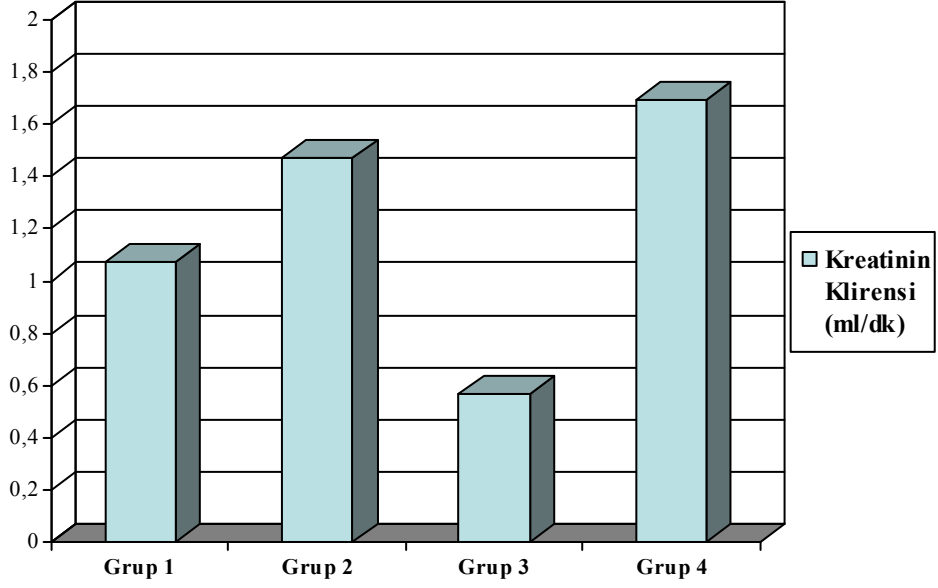
Çalışma gruplarında renal fonksiyon parametreleri tablo 8'de özetlenmiştir.

Tablo 8. Çalışma gruplarında renal fonksiyon parametreleri

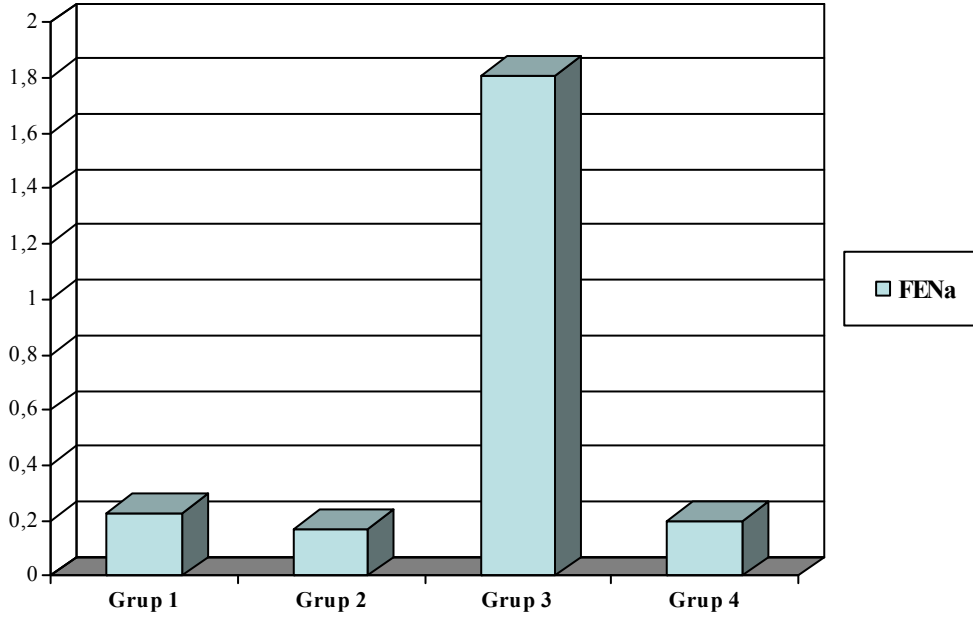
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Kreatinin (mg/dl)	0,53± 0,16	0,42±0,06	1,01±0,43	0,42±0,11
Kreatinin Klirensi (ml/dak)	1,07±0,31	1,47±0,55	0,57±0,37	1,69±0,78
FENa(%)	0,23±0,12	0,17±0,06	1,8±2,38	0,20±0,10



Şekil 7. Çalışma gruplarının kreatinin ölçümleri: Grup 1’de kreatinin düzeyi ortalaması grup 3 dışındaki çalışma grupları ile benzerdir.



Şekil 8. Çalışma gruplarının kreatinin klirensi ölçümleri: Grup 1’de kreatinin klirensi düzeyi ortalaması grup 3 dışındaki çalışma grupları ile benzerdir.



Şekil 9. Çalışma gruplarının FENa% ölçümleri: Grup 1’de FENa düzeyi ortalaması grup 3 dışındaki çalışma grupları ile benzerdir.

4.3. Histopatolojik değerlendirme:

Bütün gruplar çalışma sonunda histopatolojik değerlendirmeye alınmıştır. Önceki bölümde ifade edildiği şekilde elde edilen böbrek dokusuna hemotoksilen eozin, PAS ve PAMS boyaları uygulanmış; tübüler nekroz, proteinöz kast ve medüller konjesyon açısından değerlendirilmiştir.

Grup 1’de tübüler nekroz skor ortalaması $1,37\pm 0,51$, grup 2’de $0,12\pm 0,35$, grup 3’de $2,50\pm 0,53$, grup 4’de $0,60\pm 0,89$ olarak saptanmıştır. Grup 3’de tübüler nekroz skor ortalaması diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p<0.005$). İkili grup karşılaştırmalarında grup 3 ve 4’de ($p=0.006$), grup 1 ve 3’de ($p=0.003$), grup 2 ve 3’de ($p<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış olup; grup 1 ve 4’de ($p>0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

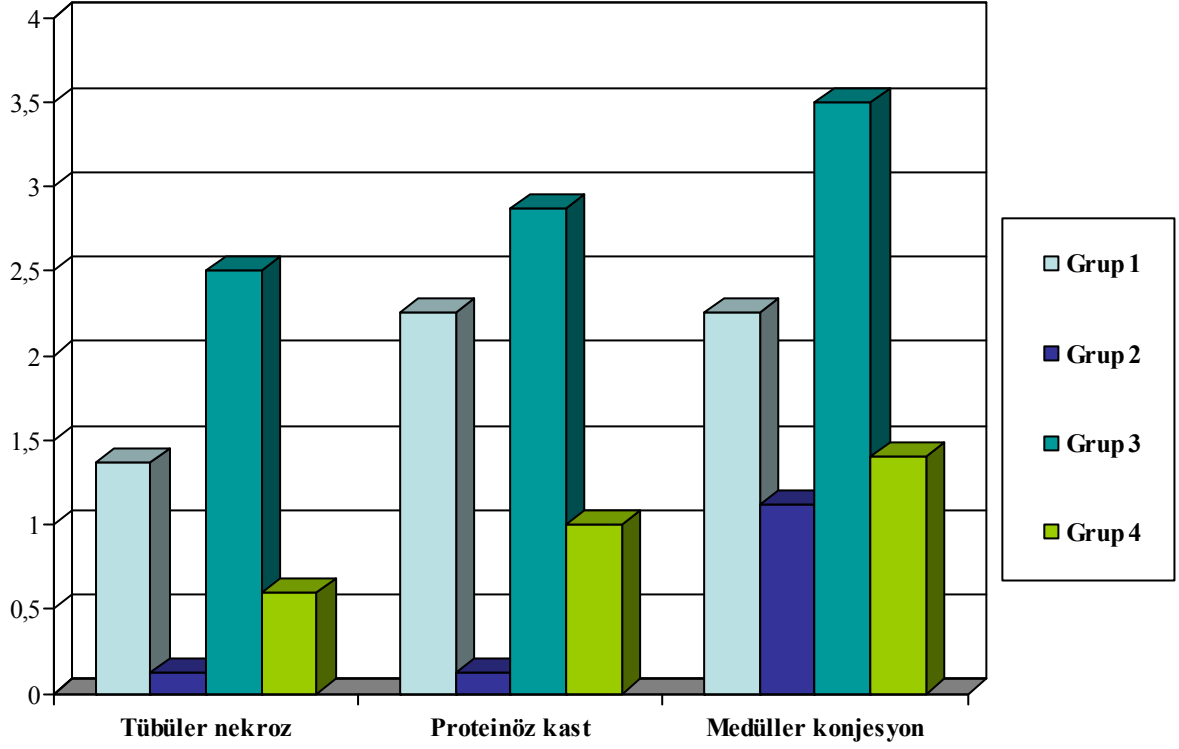
Grup 1’de proteinöz kast skor ortalaması $2,25\pm 1,28$, grup 2’de $0,12\pm 0,35$, grup 3’de $2,87\pm 0,64$, grup 4’de $1,00\pm 1,22$ olarak tespit edilmiştir. Grup 3’de proteinöz kast skor ortalaması grup 4’e göre anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir ($p<0.05$). İkili grup karşılaştırmalarında grup 3 ve 4’de ($p=0.017$), grup 2 ve 3’de ($p<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış; grup 1 ve 3’de ($p>0.05$), grup 1 ve 4’de ($p>0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Grup 1’de medüller konjesyon skor ortalaması $2,25\pm 0,88$, grup 2’de $1,12\pm 0,35$, grup 3’de $3,50\pm 0,53$ ve grup 4’de $1,40\pm 1,34$ olarak tespit edilmiştir. Grup 3’de medüller konjesyon skor ortalaması diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir ($p<0.05$). İkili grup karşılaştırmalarında grup 3 ve 4’de ($p=0.006$), grup 1 ve 3’de ($p=0.008$), grup 2 ve 3’de ($p<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiş olup, grup 1 ve 4’de ($p>0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Çalışma gruplarında histopatolojik bulguların dağılımı tablo 9’da ve şekil 10’da özetlenmiştir.

Tablo 9. Çalışma gruplarında histopatolojik bulgular

	Grup 1 (n=8)	Grup 2 (n=8)	Grup 3 (n=8)	Grup 4 (n=8)
Tübüler nekroz				
0	0	7	0	6
1	5	1	0	2
2	3	0	4	0
3	0	0	4	0
4	0	0	0	0
Skor ortalaması (ort±SD)	1,37±0,51	0,12±0,35	2,50±0,53	0,60±0,89
Proteinöz kast				
0	1	7	0	4
1	1	1	0	4
2	2	0	2	0
3	3	0	5	0
4	1	0	1	0
Skor ortalaması (ort±SD)	2,25±1,28	0,12±0,35	2,87±0,64	1,00±1,22
Medüller konjesyon				
0	0	0	0	4
1	1	7	0	0
2	5	1	0	4
3	1	0	4	0
4	1	0	4	0
Skor ortalaması (ort±SD)	2,25±0,88	1,12±0,35	3,50±0,53	1,40±1,34



Şekil 10. Çalışma gruplarının histopatolojik bulgularının karşılaştırılması: Tübüler nekroz ve medüller konjesyon açısından Grup 1 ve Grup 3 arasında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Grup 1, histopatolojik bulgular açısından Grup 3 dışındaki diğer gruplarla benzerdir.

4.4. İmmünohistokimyasal değerlendirme:

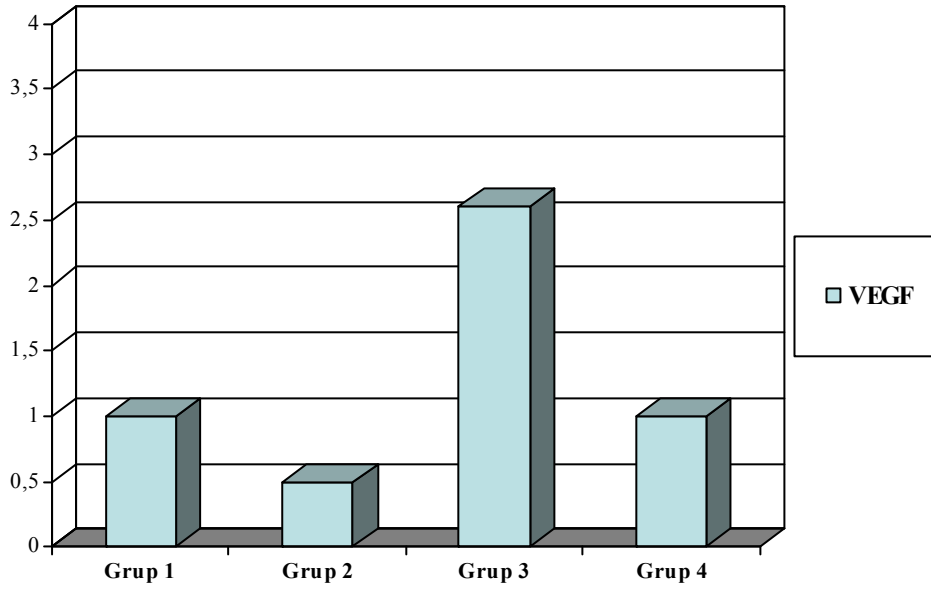
Çalışma sonunda bütün gruplardaki deneklerden elde edilen böbrek dokuları VEGF antikoruna ile immünohistokimyasal yöntemle boyanmıştır.

Grup 1’de VEGF skor ortalaması $1,00\pm 0,53$, grup 2’de $0,50\pm 0,53$, grup 3’de $2,62\pm 0,51$ ve grup 4’de $1,00\pm 1,22$ saptanmıştır. Grup 3’de VEGF skor ortalaması diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p<0.005$). İkili grup karşılaştırmalarında grup 3 ve 4’de ($p=0.001$), grup 1 ve 3’de ($p=0.001$), grup 2 ve 3’de ($p<0.0001$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış; grup 1 ve 4’de ($p>0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Çalışma gruplarında immünohistokimyasal bulguların dağılımı tablo 10'da ve şekil 11'de özetlenmiştir.

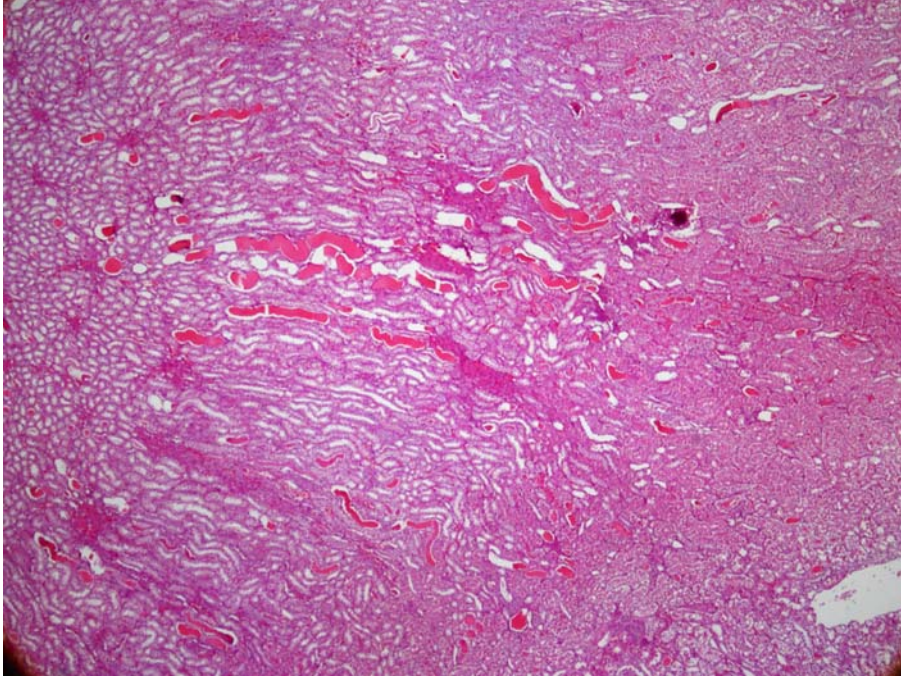
Tablo 10. Çalışma gruplarında immünohistokimyasal bulgular

	Grup 1 (n=8)	Grup 2 (n=8)	Grup 3 (n=8)	Grup 4 (n=8)
VEGF				
0	1	4	0	4
1	6	4	0	4
2	1	0	3	0
3	0	0	5	0
4	0	0	0	0
Skor ortalaması (ort±SD)	1,00±0,53	0,50±0,53	2,62±0,51	1,00±1,22

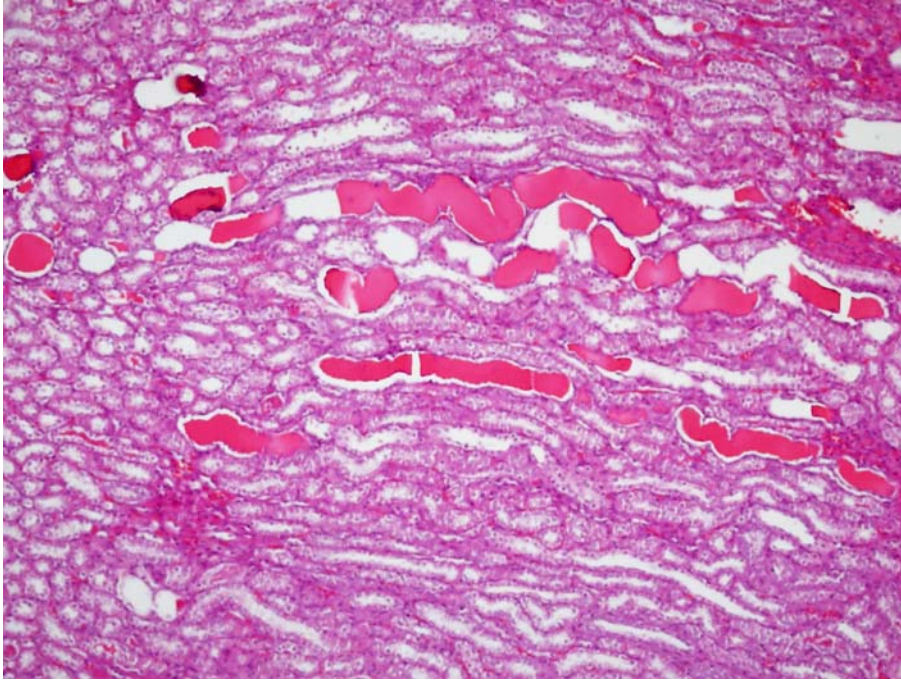


Şekil 11. Çalışma gruplarının immünohistokimyasal bulgularının karşılaştırılması: Grup 1’de VEGF skor ortalaması grup 3 dışındaki çalışma grupları ile benzerdir.

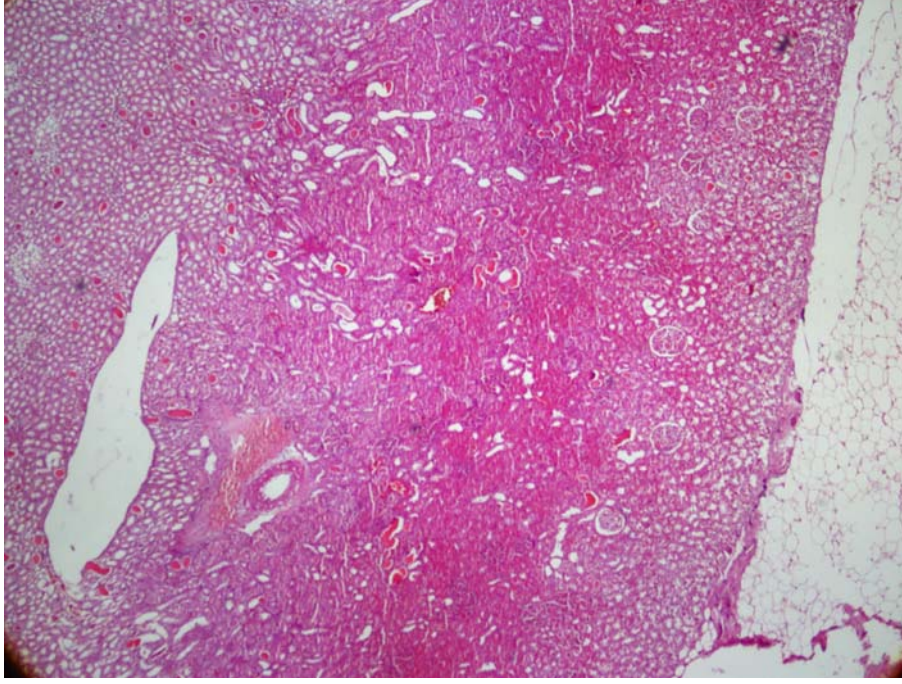
5. RESİMLER



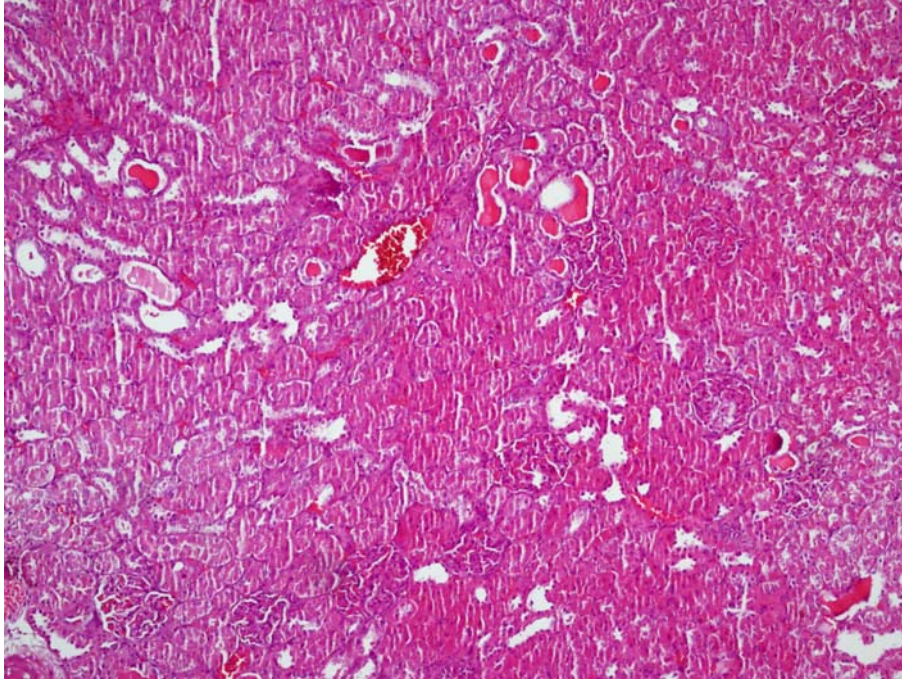
Resim 1. Kontrast nefropatisi modelinde (Grup 3) hematoksilen-eozin ile boyanmış böbrek dokusu. Proteinöz kastlar belirgin şekilde görülmektedir (H&E X 40)



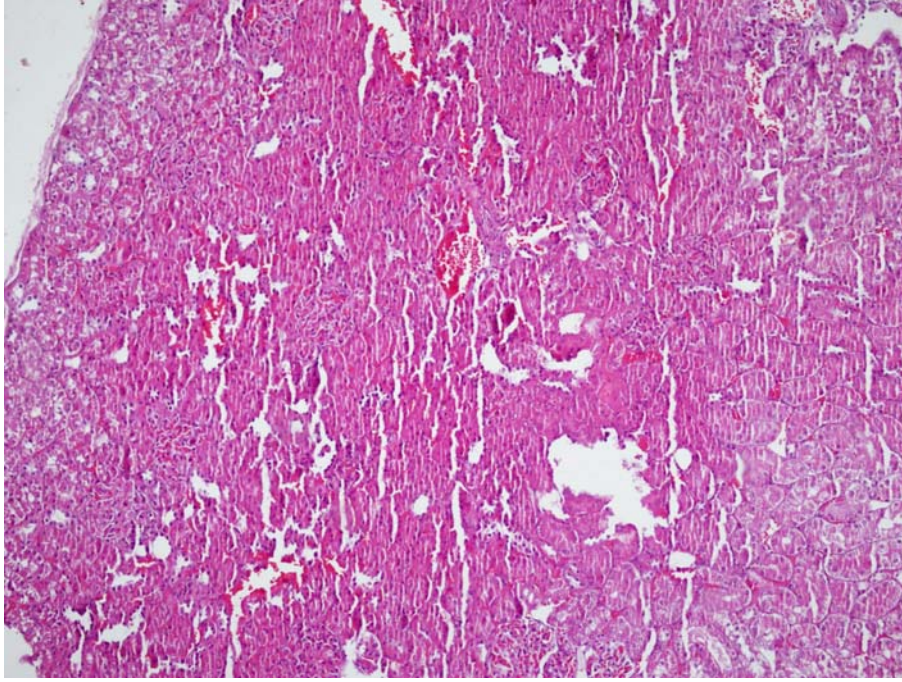
Resim 2. Kontrast nefropatisi modelinde (Grup 3) hematoksilen-eozin ile boyanmış böbrek dokusu. Proteinöz kastlar görülmektedir (H&E X 100)



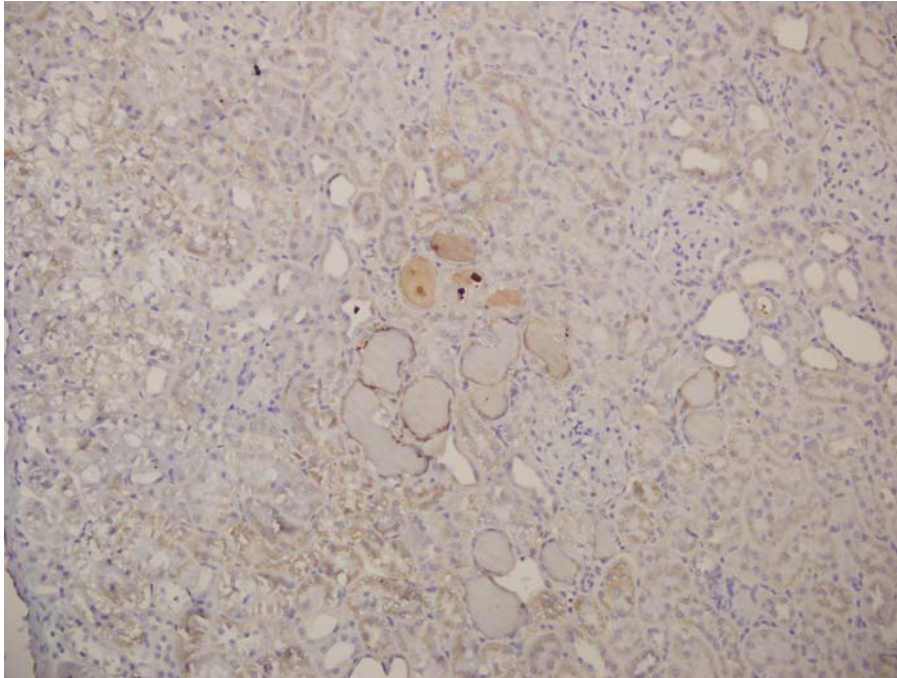
Resim 3. Terlipressin profilaksisi verilen çalışma grubunda (Grup 1) hematoksilin-eozin ile boyanmış böbrek dokusu. Tübüler nekroz ve medüller konjesyon görülmemektedir. Proteinöz kastlar bazı bölgelerde saptanmıştır (H&E X40)



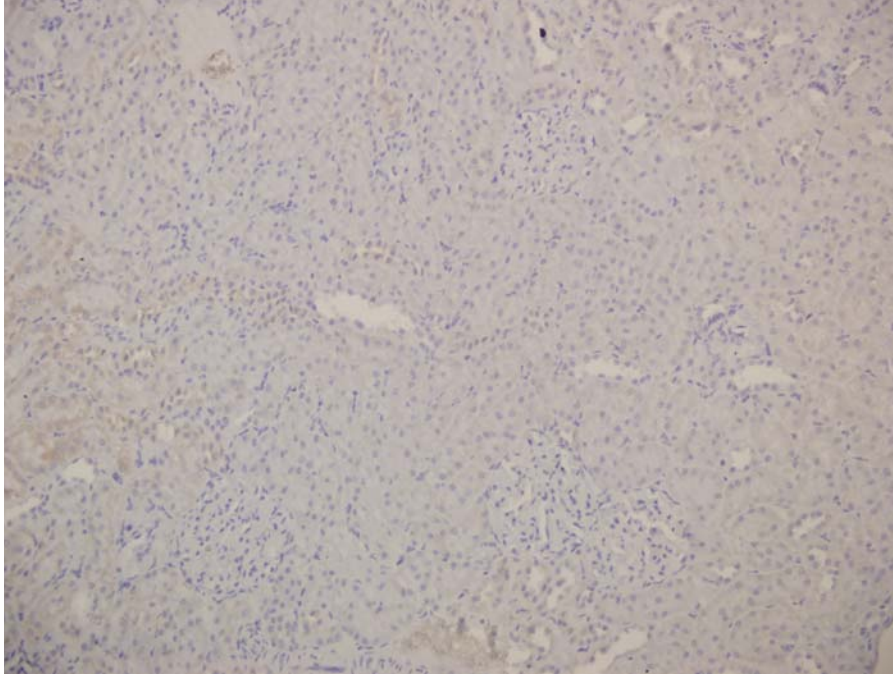
Resim 4. Terlipressin verilen çalışma grubunda (Grup 1) hematoksilin-eozin ile boyanmış böbrek dokusu. Bazı alanlarda proteinöz kastlar görülmektedir. Bir alanda sınırlı medüller konjesyon saptanmıştır (H&E X100)



Resim 5. Kontrol grubunda (Grup 4) hematoksilin-eozin ile boyanmış böbrek dokusu. Tübüler nekroz, proteinöz kast, medüller konjesyon saptanmamıştır (H&E X 100)



Resim 6. Kontrast nefropatisi modelinde (Grup 3) VEGF immünohistokimyasal boyaması yapılmış böbrek dokusu. VEGF immünoekspresyonu izlenmektedir (X200)



Resim 7. Terlipressin profilaksisi verilen çalışma grubunda (Grup 1) VEGF immünohistokimyasal boyaması yapılmış böbrek dokusu. VEGF immünoekspresyonu minimal izlenmektedir (X200)

6. TARTIŞMA

Çalışmamız, deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi profilaksisinde terlipressinin etkinliğini araştıran, biyokimyasal ve histopatolojik bulgular doğrultusunda terlipressin kullanımının kontrast maddeye bağlı akut böbrek yetmezliği tablosunu önleyebileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Bu çalışma planlanırken 2 amaç belirlenmiştir:

1. Deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi oluşturmak ve hepatorenal sendrom tedavisinde renal fonksiyonları iyileştirerek akut böbrek yetmezliği tablosunu düzelteren terlipressinin kontrast nefropatisi profilaksisinde etkili olup olmadığını test etmek
2. Terlipressinin kontrast nefropatisi profilaksisinde etki mekanizmasını, böbrek dokusu üzerinde saptanan etkileriyle tahmin etmek

Kontrast nefropatisi, hastane kaynaklı akut böbrek yetmezliği nedenleri arasında 3. sıradadır (2). Tanısal radyografik işlemler ve tedavi amaçlı yapılan girişimsel işlemlerde akut böbrek yetmezliği gelişme riski altta yatan böbrek hastalığı olmayan hastalarda %2-3 iken, altta yatan DM, KBY, KKY gibi hastalıkları olan hastalarda renal fonksiyon bozukluğunun derecesiyle orantılı bir şekilde %70'lere ulaşmaktadır (6). Kronik böbrek hastalığı olan ve radyografik işlem sonrası diyaliz gerektiren akut böbrek yetmezliği gelişen hastaların %10'u diyalize bağımlı hale gelmektedir ve bu hastaların hastane yatışı sırasında mortalitesi %36 olarak bildirilmektedir (14). Kontrastlı radyografik işlemlerin, işleme bağlı yüksek morbidite ve mortalite oranlarına rağmen halen en etkili tanı ve girişimsel tedavi yöntemleri olması nedeniyle yaygın kullanımı devam etmektedir (14). Daha az toksik kontrast maddeler üretilirken (non-iyonik izo-osmolar kontrast maddeler en güvenli olanlarıdır), kontrast maddenin yarattığı akut böbrek yetmezliği patofizyolojisi anlaşılmaya çalışılmakta ve önlemeye yönelik profilaktik tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kontrast nefropatisi patogeneziyle ilgili bilgiler homojen olmayan ve sağlıklı karşılaştırma yapılamayan az sayıda insan çalışmaları ve klinik gözlemlerle, çok sayıda deneysel ve in vitro çalışmalardan elde edilmiştir (14). İnsan çalışmalarının az sayıda ve non-homojen olmasının nedeni hastalara çok sayıda biyopsi ve invazif tetkikler yapılmasının etik olarak uygun görülmemesi ve kontrast nefropatisine yatkınlık yaratan durumların çalışmalarda homojenize edilmesindeki zorluklardır

(14). Deneysel modellerden ve in vitro çalışmalardan elde edilen bilgilere göre kontrast nefropatisi patogeneğinde hipoksik ve toksik renal tübül hasarı, renal endotel disfonksiyonu ve intrarenal mikrosirkülasyonda bozulma sorumlu tutulmaktadır (14,15). İntrarenal mikrosirkülasyonun bozulması sonucu GFR azalır, serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasıyla doğrudan tübüler toksisite gelişir (99,100). İn vivo çalışmalarda kontrast madde verilmesiyle proksimal tübül hücrelerinde vokuoler değişiklikler görüldüğü, mikrovillus kaybı ile giden tübül hücrelerinde düzleşme saptandığı bildirilmiştir (101).

Memeli böbreğinde renal medulla fonksiyonlarının ve tübüler reabsorbsiyon işleminin yerine getirilebilmesi için PO₂ >30 mmhg olmalıdır (15). Medüller tübüler transport aktivitesini yerine getirmek için gerekli oksijen desteğini sağlama görevi renal sitokinlerindir. Prostaglandinler, NO ve adenozin bölgesel kan akımını arttırarak medüller oksijen desteğini sağlar (14,15). Deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi oluşturulurken 3 aşamalı sitokin inhibisyonu bu nedenle yapılır.

Literatürde önerilen – ve bizim de çalışmamızda yaptığımız işlemlerde – öncelikle nonsteroid anti-inflamatuar ilaçlarla prostoglandin sentezi inhibe edilir, 2. aşamada L-NAME ile NO sentezi baskılanır, 3. ve son aşamada kontrast madde uygulanarak renal vazokonstrüksiyon ve doğrudan sitotoksik etki oluşturulmaya çalışılır (22). Koruyucu mekanizmaların inhibe edilmesiyle oluşturulan modelde böbrek dokusunda tübüler nekroz, proteinöz kastlar ve medüller konjesyon histopatolojik bulguları gelişmelidir (97,101,104).

Çalışmamızda 3 aşamada uygulanan kontrast nefropatisi modeli oluşturulmuş; renal fonksiyon parametrelerinin beklenen oranlarda bozulduğu, böbrek dokusunda kontrast nefropatisine özgü histopatolojik değişikliklerin geliştiği görülmüştür.

Kontrast maddenin tübüler hücreler üzerinde yarattığı sitotoksik etki sonucunda plazma membranı ve mitokondri membranı bütünlüğü bozulmaktadır (100). Tübüler hücreler kontrast madde ile temas ettiğinde, sodyum-potasyum ATPaz pompası ve kaveolin gibi hücre membran proteinleri, sitokrom c gibi mitokondriyal proteinlerin yapısı bozulmaktadır (14,100). Histopatolojik olarak tübüler nekroz olarak isimlendirilen bu tabloda tübüler hücreler üzerindeki mikrovillusların kaybı ve tübüler hücrelerin düzleşmesi görülür (101). Çalışmamızda kontrast madde verilen grupta tübüler nekroz oranı oldukça yüksek saptanmıştır.

Kontrast maddenin tübüler hücreler üzerinde yarattığı sitotoksik etki sonucu tübüler transepitelyal direnç azalmaktadır (14). İnülin ve polarize membran proteinleri geçirgenliği artmakta; tübül hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bozulması sonucu intrasitoplazmik membran proteinleri dağılımı değişmektedir (14,16). Kontrast maddenin yarattığı bu hasar sonucunda tübüler potasyum, ADP ve ATP konsantrasyonları azalmakta; sonuçta fokal veya diffüz tübüler sitoplazmik vakuolizasyon, lizozomal değişiklikler ve kontrast nefropatisine özgü proteinöz kistler oluşmaktadır (14,16). Bu etkiden kontrast maddenin hiperosmolaritesinin sorumlu olduğu düşünülmüş, fakat mannitol veya diğer hipertonic solusyonlarla aynı etki yaratılamamıştır (14).

Deneysel çalışmalarda kontrast madde verilmesi sonrası renal medullada kapiller kan akımının yavaşladığı, eritrositlerin hareketlerinin ve oksijen basıncının azaldığı, eritrosit agregasyonunun arttığı gösterilmiştir (14,15,23,105,106). Kontrast maddenin yüksek osmolaritesi, hipertonic etki göstererek eritrosit membran bütünlüğünü bozmakta, kan viskozitesini arttırmakta ve parsiyel oksijen basıncının çok önemli olduğu (normal koşullarda dahi sınırdan hipoksik seyreden) renal medullada hemokonsantrasyona yol açmaktadır (14,15,16,23,105,106). Histopatolojik olarak medüller konjesyon olarak nitelenen bu tablo kontrast nefropatisinin doku düzeyindeki bulgularından birisidir (23,105) ve çalışmamızda kontrast madde verilen grupta belirgin şekilde yüksek saptanmıştır.

Tıpkı sağlıklı insanlarda olduğu gibi, deneysel modellerde de tek başına kontrast madde vermek nefropatiye yol açmamaktadır (15). Kontrast maddeye bağlı gelişen medüller hipoksi, adaptif hücresel hipoksik stres yanıtını tetikler. Posttranskripsiyonel medüller HIF birikimi, renal medulla fonksiyonlarını korumak için bir yandan VEGF ekspresyonunu artırırken, bir yandan eritropoetin ve diğer vazodilatatör sitokinlerin sentezini uyarır (2,14,15). Hipoksi sonrası hücre içinde biriken HIF ve hedef proteinleri VEGF, eritropoetin, HO-1 hücre metabolizması, vasküler tonus korunması, eritropoez, anjiogenez, hücre siklusu, serbest oksijen radikallerinin yıkımı, inflamasyon ve immün cevap oluşturma fonksiyonlarını yönetir (15). Deneysel modellerde HIF hedef proteinlerinin, renal hasarda koruyucu olduğu düşünülmüştür (14,15). Ancak orta dereceli hipoksizde HIF sistemi ve hedef proteinleri hipoksiye adaptasyon sağlarken, kritik düzeyin altındaki hipoksi koşullarında hücreleri p53 ilişkili apoptozise yönlendirir (15,107,108).

HIF hedef proteinlerinden biri olan VEGF, hipoksik ortamda anjiogenezden sorumludur (15,72). Dokuda VEGF ekspresyonunun artması, hipoksinin daha yoğun olduğu bölgelerde görülür (70,72).

Deneysel modellerde kontrast verilmesi sonrası renal medullada tübüler hücrelerde HIF birikimi olduğu gösterilmiştir (30). Ancak daha önce kontrast nefropatisi modelinde VEGF ekspresyonu araştırılmamıştır. Deneysel hayvan modelinde renal arter dalı ligasyonu yapılmış, 72 saat sonra infarkt alanı çevresinde – özellikle medüller bölgede – VEGF ekspresyonunun arttığı saptanmıştır (65). Aynı çalışmada VEGF ekspresyonunun HIF-1 α ekspresyonu ile benzer bölgelerde arttığı gözlenmiştir (65). Bu çalışmanın yorumunda bölgesel hipoksinin HIF sistemini aktive ettiği, ona bağlı olarak HIF hedef proteini olan VEGF ekspresyonunun arttığı yorumu yapılmıştır (65). Başka bir deneysel çalışmada rabdomiyoliz sonrası gelişen akut böbrek yetmezliği modelinde akut hipoksi yanıtı olarak HIF-1 α ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (68). Bu çalışmada hipoksiye adaptasyonda HIF sisteminin önemi vurgulanmış, HIF hedef proteinlerinin bunu takip ettiği yorumu yapılmıştır (68).

Çalışmamızda, kontrast nefropatisi modelinde hipoksi ile birlikte VEGF ekspresyonunun artıp artmadığı, diğer histopatolojik bulgularla ilişkisi ve terlipressin sonrası VEGF ekspresyonundaki değişiklikler araştırılmıştır.

VEGF ekspresyonu, kontrast madde verilen grupta yüksek saptanmıştır. Terlipressin profilaksisi ile birlikte kontrast madde verilen grupta ise diğer kontrol grupları ile benzer şekilde çok düşük oranda VEGF ekspresyonu gözlenmiştir.

Literatürde, kontrast maddenin osmotik etkisine bağlı olarak idrar hacminde artma olduğu ifade edilmektedir ki (103); bizim çalışmamızda da kontrast nefropatisi oluşturulan grupta deneklerin idrar hacmi, kontrol grubuna göre yüksektir (gösterilmemiş bulgu).

Hepatorenal sendrom hastalarında splanknik vazodilatasyon, sistemik vasküler dirençte azalma, efektif arteriyel kan hacminde azalma görülmektedir (62). Efektif arteriyel kan hacminde azalmaya bağlı endojen vazokonstrüktör nörohumoral sistemler aktive olur (49,50,62). Sempatik sinir sisteminin ve renin-anjiotensin-aldosteron sisteminin aktive olması, açığa çıkan medyatörlerden norepinefrin ve anjiotensin-2'nin güçlü renal vazokonstrüksiyon yapıcı etkileri sonucunda renal hipoperfüzyon ve GFR'de azalma saptanır (50,62).

Terlipressinin splanknik vazokonstrüksiyon sonucu renal vazodilatasyon yaptığı, renal kan akımını arttırarak GFR'yi arttırdığı, plazma renin ve norepinefrin düzeylerini düşürdüğü ve ANP sekresyonunu uyardığı bilinmektedir (51,51,62,109).

Çalışmamızda kontrast nefropatisi profilaksi ajanı olarak seçmemizin nedeni;

1. Renal kan akımını arttırarak GFR'yi arttırmaktadır (51,52,62)
2. Renin-anjiotensin-aldosteron sistemini baskılayarak anjiotensin-2 düzeylerini azaltmaktadır (109)
3. ANP sekresyonunu uyarmaktadır (51,54)

Kontrast nefropatisi patofizyolojisi düşünüldüğünde terlipressinin profilakside etkili olacağı düşünülmüştür.

Denek hayvanlarında dehidratasyon sonrası kontrast madde verildiğinde renal kan akımındaki azalma sürecinin (=vazokonstrüktör faz) uzadığı, intrarenal renin-anjiotensin-aldosteron sisteminin bloke edilmesi ile vazokonstrüktör fazın kısaldığı saptanmıştır (110).

Kontrast madde enjeksiyonu sonrası geçici süre ANP sekresyonunun arttığı, hidrostatik basıncı arttırarak GFR'yi arttırdığı, renal medüller akımı arttırdığı, endotelin ilişkili vazokonstrüksiyonu engelleyerek renal iskemiye önlediği saptanmıştır (111). Ancak ANP sekresyonu düşük oranda ve geçici süre olduğundan kontrast nefropatisi gelişimine güçlü bir engel oluşturamamaktadır (113).

Ancak terlipressin verilmesi ile anjiotensin düzeyinin azalması ve ANP düzeyinin artması nefropati gelişimine engel olabilir.

Sonuçlara bakıldığında terlipressin profilaksisi ile birlikte kontrast madde verilen grupta (Grup 1), serum kreatinin ve kreatinin klirensi ortalaması ve fraksiyone sodyum atılım yüzdesi kontrol grupları ile benzer saptanmıştır. Bu bulgu, terlipressinin böbreği kontrast maddenin yarattığı vazokonstrüktör ve belki de sitotoksik etkiden koruduğu sonucuna ulaştırmaktadır.

Fraksiyone sodyum atılımının artması ve natriürez, tübül hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bozulması sonucu olmaktadır ve kontrast maddenin doğrudan sitotoksik etkisinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (14). Daha önce belirtildiği gibi Grup 3'de $FENa > 1$ iken Grup 1'de $FENa < 1$ saptanmıştır. Bu sonuç, Grup 1'de tübül toksisite gelişmediği, tübül hücre fonksiyonlarının korunduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Benzer şekilde histopatolojik olarak tübüler nekroz skoru da Grup 1’de kontrol gruplarına benzer şekilde düşüktür. Grup 3’de mikrovillus kaybı ile birlikte tübüler hücrelerde düzleşme yaygın olarak görülmüş; buna karşılık Grup 1’de tübüler hücreler yapısını korumuş olarak saptanmıştır.

Histopatolojik bulgulardan proteinöz kast oluşumu daha önce de ifade edildiği gibi kontrast maddenin doğrudan sitotoksik etkisi sonucu tübüler vokuolizasyon gelişmesi, lizozomal aktivite artışı ile birlikte proteinöz bir madde salınımı ile gelişir (14,16). Çalışmamızda, Grup 1’de böbrek dokusunda proteinöz kast oranı kontrol gruplarından bir miktar yüksek saptanmıştır. Bu bulgu, terlipressinin kontrast maddenin yarattığı doğrudan sitotoksik etkileri tamamen engellemediği, ancak azaltabildiği yorumunu yapmamıza yol açmıştır.

Çalışmamızda terlipressinin doğrudan sitotoksik etkileri azaltıcı mekanizması ile ilgili tetkikler planlanmamıştır. Oksidatif stresi azaltarak, serbest oksijen radikalleri oluşumunu baskılayarak ve/veya endotel disfonksiyonunu önleyerek bu etkiyi yaratıyor olabilir. Bunu test etmek için toksik oksijen radikalleri (hidrojen peroksit, hidroksillenmiş radikaller, süperoksit anyonlar) ve nitrik oksit düzeyi ölçümünü içeren başka deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Histopatolojik bulgulardan medüller konjesyon oranları kontrol grupları ile benzer saptanmıştır. Bu bulgu, terlipressinin vazodilatatör etkileri ile renal medullada kapiller kan akımını arttırdığı, kapiller bölgede hemokonsantrasyonu ve eritrositlerin agrerasyonunu engellediği yorumunu yapmamıza neden olmuştur.

Benzer şekilde hipoksik koşullarda ekspresyonu artan VEGF, terlipressin profilaksisi verilen grupta kontrol grupları ile benzer oranda eksprese edilmiştir. Bu sonuç, terlipressinin intrarenal mikrosirkülasyonu, kontrast maddenin yarattığı olumsuz etkilerden koruduğu şeklinde yorumlamamıza neden olmuştur.

Sonuçta terlipresin;

1. Vazopressin-1 reseptör agonisti etkisiyle renal medüller kapiller akımını arttırmaktadır
2. Kapiller bölge kanlanmasını koruyarak medüller iskemiyi önlemektedir
3. İntrarenal mikrosirkülasyonu kontrast maddenin yarattığı hipoksik etkiden koruyarak renal parankimal oksijenasyonu sağlamakta, bunun sonucu olarak dokuda VEGF ekspresyonunu azaltmaktadır

4. Kontrast maddenin tübül hücreleri üzerinde yarattığı doğrudan sitotoksik etkileri azalttığına dair indirekt sonuçlar alınmıştır

Çalışmamız, kontrast nefropatisi modelinde VEGF ekspresyonunun arttığını gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca hepatorenal sendrom tedavisinde kullanılan terlipressinin kontrast nefropatisi bulgularını renal fonksiyon parametreleri, böbrek dokusunda histopatolojik bulgular ve immünohistokimyasal yöntemle saptanan VEGF ekspresyonu ile azalttığını tespit eden; terlipressinin kontrast madde enjeksiyonu öncesi profilaksiste kullanılabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Terlipressinin kontrast nefropatisini önlemedeki etki mekanizmasını daha net ifade edebilmek için plazmada renin, anjiyotensin-2, norepinefrin ve atrial natriüretik peptid düzeyleri bakılabilir. Kontrast madde enjeksiyonu sonrası gelişen medüller hipoksiyi göstermek için desatüre hemoglobin düzeyini ölçen oksijen düzeyi bağımlı MR görüntüleme yöntemleri kullanılmıştır (28,112). Terlipressinin medüller iskemiyi önlediğini ve renal parankimal oksijenasyonu sağladığını göstermenin daha net yolu olarak bu MR yöntemi kullanılabilir. Benzer şekilde kontrast madde enjeksiyonunun lokal mikrosirkülasyon üzerindeki etkilerini saptamak amacıyla lazer doppler video mikroskop görüntüleme yöntemi kullanılmıştır (29,105,106). Lazer doppler video mikroskop ile, kontrast maddenin medüller kan akımını azalttığı, papiller vaza rektada eritrosit agregasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (29,105,106). Terlipressin etkisini bu yöntemle test etmek daha net bilgi edinmemizi sağlayabilir.

Kontrast nefropatisi profilaksisinde patofizyolojiye yönelik birçok ilaç denenmiş, deneysel modellerde başarılı bulunan tedaviler klinik çalışmalarda aynı etkiyi gösterememiştir (9). Bu nedendir ki halen tek etkili tedavi olarak kontrast madde enjeksiyonu öncesi hidrasyon önerilmektedir (9). Sonuçta, deneysel modelde terlipressinin kontrast nefropatisini önlemedeki başarısı klinik çalışmalarla desteklenmelidir.

Özetle; bu çalışma hepatorenal sendrom tedavisinde kullanılan terlipressinin biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle kanıtlanmış şekilde kontrast nefropatisi bulgularını engellediğini; terlipressinin kontrast madde enjeksiyonu öncesi profilaksiste kullanılabileceğini gösteren ilk deneysel çalışmadır.

7. ÖZET (TÜRKÇE)

Radyolojik işlemler sonrası gelişen akut böbrek yetmezliği, hastane kaynaklı akut böbrek yetmezliği nedenleri arasında 3. sıradadır (2). Kontrast nefropatisi olarak isimlendirilen bu tablo, hastaların hastanede yatışlarının uzamasına yol açmakta, uzun dönem morbidite ve mortaliteyi arttırmakta ve sağlık harcamalarının artmasına yol açmaktadır (2).

Kontrast nefropatisi patofizyolojisinde renal kan akımında azalma sonucu medüller iskemi ve kontrast maddenin renal tübül epitel hücreleri üzerinde yarattığı doğrudan sitotoksik etkiler sorumlu tutulmaktadır (9).

Kontrast nefropatisi gelişimini önlemek amacıyla birçok tedavi yaklaşımları denenmiştir (1,2,9,87). Renal kan akımını arttırmaya yönelik kalsiyum kanal blokörleri, teofilin, endotelin reseptör antagonistleri, dopamin, dopamin reseptör agonistleri denenmiş; deneysel modellerde başarılı olan bu tedaviler klinik uygulamalarda aynı etkiyi gösterememiştir (1,2,9). Renal tübül epitel hücreleri üzerinde kontrast maddenin yarattığı toksik hasarı önlemeye yönelik N-Asetil sistein ve askorbik asit gibi antioksidan ilaçların da etkileri sınırlıdır (9). Kontrast nefropatisini önlemeye yönelik tek etkili tedavi hidrasyondur (1).

Hipoksi ile indüklenen genler ve onların transkripsiyonel ürünü olan faktörler, hipoksik koşullarda hücre ve dokuların hipoksik ortama adaptasyonunu sağlar (65). Bu adaptasyon mekanizmasının merkezinde hipoksi ile indüklenen faktörler (HIF-1 ve HIF-2) bulunmaktadır (63,64,69). İntrarenal iskemiye yanıt olarak böbrekte HIF-1 ve HIF-2 transkripsiyonu artmakta; takiben benzer lokalizasyonda VEGF ekspresyonu artmaktadır (63,64,65). Deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi gelişen böbreklerde iç ve dış medullada HIF birikimi immünohistokimyasal yöntemlerle saptanmıştır (67). Daha önce deneysel modellerde kontrast nefropatisi gelişen böbrekte VEGF ekspresyonu çalışılmamış, ancak diğer iskemik koşullarda HIF ekspresyonuna eşlik ettiği saptanmıştır.

Hepatorenal sendrom, kronik karaciğer hastalığının ileri dönemlerinde görülen, endojen vazoaaktif sistemin aktive olması ve splanknik vazodilatasyona bağlı renal dolaşımın bozulması sonucu gelişen akut böbrek yetmezliği tablosudur (93). Hepatorenal sendrom tedavisinde kullanılan terlipressin, V1 reseptörü üzerindeki

agonistik etkiyle splanknik vazokonstrüksiyon yapmakta, endojen vazoaktif sistemi baskılayarak renin ve anjiotensin-2 serum düzeylerini düşürmekte, intravasküler kan hacmini splanknik alandan diğer sistemik dokulara – en fazla miktarda renal sirkülasyona – yönlendirmektedir (49,51).

Terlipressin'in nörohumoral aktivasyonu baskılaması ve intrarenal vazodilatasyon yapması kontrast nefropatisi profilaksisinde kullanılması fikrini akla getirmiştir.

Çalışmamızda, deneysel hayvan modelinde kontrast nefropatisi oluşturulmuş ve terlipressin profilaksisinin etkilerini anlamak amacıyla deneklerin renal fonksiyon parametreleri, böbrek dokusunda kontrast nefropatisi histopatolojik kanıtları ve hipoksi belirteci olarak böbrek dokusunda immünohistokimyasal yöntemle boyanan VEGF ekspresyonu incelenmiştir.

Denekler 4 gruba ayrılmış, Grup 1'de intravenöz terlipressin ve kontrast madde uygulanmış, Grup 2'de intravenöz terlipressin uygulanmış, Grup 3'de intravenöz kontrast madde uygulanmış ve Grup 4 kontrol grubu olarak alınmıştır. Uygulamaların 48. saatinde deneklerin kan ve idrar örnekleri ve böbrek dokuları alınmış, biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır.

Renal fonksiyon parametreleri değerlendirilmesinde, Grup 3'ün kreatinin düzeyi ortalaması, diğer gruplardan anlamlı olarak yüksektir. Grup 1'de, kontrol grupları ile benzer sonuçlar alınmıştır. Benzer şekilde Grup 3'ün kreatinin klirensi ortalaması - idrar miktarında belirgin bir azalma görülmemesine rağmen - diğer gruplardan anlamlı olarak düşüktür. Grup 1'de kontrol grupları ile benzer şekilde kreatinin klirensi korunmuştur. Fraksiyone sodyum atılımı, Grup 3'de akut tübüler nekrozu düşündürür şekilde yüksek ($FENa > 1$), Grup 1'de ise tübül epitel hücrelerinin fonksiyonlarını koruduğunu düşündürür şekilde kontrol grupları ile benzerdir ($FENa < 1$).

Histopatolojik değerlendirmede, Grup 3'ün tübüler nekroz, proteinöz kast ve medüller konjesyon skor ortalaması diğer gruplardan anlamlı olarak yüksektir. Grup 1, tübüler nekroz ve medüller konjesyon açısından kontrol grupları ile benzer saptanmıştır. Proteinöz kast açısından Grup 3'den istatistiksel anlamlılık yaratmayacak şekilde düşük saptanmış olup; terlipressinin kontrast maddenin

yarattığı hasarı tamamen engellemediği, ancak çok hafiflettiği yorumunu yapmamıza neden olmuştur.

İmmünohistokimyasal değerlendirmede, Grup 3'de VEGF ekspresyonu diğer gruplardan anlamlı olarak yüksektir. Grup 1'de kontrol grupları ile benzer saptanmıştır. Hipoksi belirteci olarak kullanılan VEGF ekspresyonu, kontrast nefropatisinin etki bölgesi olan böbreğin iç ve dış medulla kısmında daha yoğun saptanmıştır.

Sonuçta terlipressin, V1 reseptör agonisti etkisiyle renal medüller kapiller kan akımını arttırmakta, intrarenal mikrosirkülasyonu kontrast maddenin yarattığı hipoksik etkiden koruyarak renal parankim oksijenasyonunu korumaktadır. Bunun sonucu olarak terlipressin profilaksisi ile birlikte kontrast madde verilen deneklerde kontrast maddenin yarattığı histopatolojik bulgular gelişmemekte ve VEGF ekspresyonu artmamaktadır.

Çalışmamız, hepatorenal sendrom tedavisinde kullanılan terlipressinin kontrast nefropatisi profilaksisinde kullanılabileceğini gösteren ilk çalışmadır. Ayrıca kontrast nefropatisi modelinde VEGF ekspresyonunun arttığını gösteren ilk çalışma olup, terlipressin profilaksisi ile VEGF ekspresyonunun azaldığı, kontrast maddenin renal parankim dokusu üzerindeki olumsuz etkilerini engellediği gösterilmiştir.

Sonuçta deneysel modelde saptanan terlipressinin kontrast nefropatisini önlemedeki bu etkinliği klinik çalışmalarla desteklenmelidir.

8. ÖZET (İNGİLİZCE)

Radiocontrast administration is a common cause of hospital-acquired acute renal failure (2). It is associated with significant in-hospital and long-term morbidity and mortality and increases the costs of medical care by at least extending the hospital stay (2).

Although the reduction in renal blood flow and direct toxic action on renal tubular cells are considered to be involved, little is known about the etiology of radiocontrast nephropathy (9).

A variety of therapeutic interventions have been clinically tested for prevention of radiocontrast nephropathy (9). A number of agents that improve renal circulation, including calcium channel antagonists, theophylline, endothelin receptor antagonists, dopamin, fenoldopam (dopamine-1 receptor agonists) have been used in attempt to prevent radiocontrast nephropathy, but none of them has succeeded (1,2,9). Prophylactic effects of antioxidants such as N-Acetylcysteine and ascorbic acid have been reported by several investigators, although the effectiveness of these compounds is still a matter of debate (9). Of these, saline hydration is the sole efficacious therapy to protect against radiocontrast-induced nephropathy (1).

The effects of oxygen on cellular functions of the kidney are poorly understood (65,67). High rates of oxygen consumption in the proximal tubule and thick ascending limb, together with limited oxygen supply, are thought to be responsible for the high sensitivity to ischemic injury (65,67). Genes induced by hypoxia play an important role in adaptation to low oxygen supply at the cell and tissue level (65). Central to this regulation are hypoxia-inducible transcription factors (HIF-1 and HIF-2) (63,64,65). Up-regulation of HIF and HIF target genes including VEGF play an important role in the response to regional renal hypoxia (63,64,65). In experimental radiocontrast-induced nephropathy, location and kinetics of overt cell injury on the one hand and immunohistochemical markers (HIF-1 and HIF-2) on the other hand suggest that hypoxia occurs within the kidney and that it contributes to cell damage (68). In normoxic kidney, VEGF was detected in medullary and cortical thick ascending limbs as well as in some glomerular cells (65). Two to 3 days after renal artery branch ligation, VEGF became detectable and particularly intense in the

outer and inner stripe of renal medulla (65). The location of VEGF signals thus partly corresponds to areas of HIF-1 α induction (65).

Hepatorenal syndrome is a common complication of advanced cirrhosis characterized not only by renal failure but also by marked alterations in systemic haemodynamics and activity of endogenous vasoactive systems (93). Renal failure is due to a severe vasoconstriction of the renal circulation (93). The pathogenesis of hepatorenal syndrome is not completely understood but it is probably the result of extreme underfilling of the arterial circulation secondary to arterial vasodilatation located in the splanchnic circulation (62). In accordance with the pathogenesis of hepatorenal syndrome, the administration of terlipressin (vasopressin-1 receptor agonist) able to produce vasoconstriction of the splanchnic circulation would improve the effective arterial blood volume, suppress the activity of endogenous vasoconstrictor factors renin and angiotensin-2 and reduce the vasoconstriction in the renal circulation (49,51,93).

Terlipressin, an agent that suppresses endogenous norhumoral activity and improves intrarenal vasodilatation was used a prophylactic regimen in contrast-induced nephropathy.

In our study, we used terlipressin as a prophylactic agent on experimental contrast-induced nephropathy model. For assessing the efficacy of terlipressin, we calculated renal function parameters, evaluated renal histopathologic findings of contrast nephropathy and immunohistochemical VEGF expression on rat kidney.

Rats were divided into 4 groups (n=8 each): terlipressin and contrast agent was given in Group 1, terlipressin was given in Group 2, contrast agent was given in Group 3 and control rats in Group 4. Blood and urine samples were collected and left kidneys were excised for histopathologic and immunohistochemical staining on the 48. hour of the study.

The absolute increase of creatinine value was significantly higher in Group 3 than the other 3 groups. The creatinine value of Group 1 was similar with the control groups. The absolute decrease of creatinine clearance (CrCl) was significantly higher in Group 3 than the other groups. And the CrCl value of Group 1 was similar with the control groups. Also we found that FENa>1 in Group 3, but FENa<1 in the other groups.

The absolute increase of tubular necrosis, proteinaceous casts and medullary congestion scores were significantly higher in Group 3 than the other groups. Treatment with terlipressin, attenuated the development of all these lesions, although significant protective effects were observed in tubular necrosis and medullary congestion.

The absolute increase of VEGF expression score was significantly higher in Group 3 than the other groups. Treatment with terlipressin, attenuated the expression of VEGF, although VEGF is a hypoxia marker in kidney.

Consequently, one of the vasopressin analog agent terlipressin, improves renal medullary blood flow, maintains intrarenal microcirculation and reverses radiocontrast-induced medullary hypoxemia. Also treatment with terlipressin reverses the histopathological findings occurred by radiocontrast agent and attenuated the VEGF expression in experimental radiocontrast-induced nephropathy model.

The present experimental study demonstrated the protective role of terlipressin (a treatment choice of hepatorenal syndrome) against radiocontrast-induced nephropathy. Terlipressin, leads to a decrease in renal vasoconstriction by inhibiting renin and angiotensin-2 secretion and reverses medullary ischemia. In addition, VEGF expression enhances in radiocontrast-induced nephropathy and terlipressin reverses hypoxic effects of radiocontrast agent and attenuates VEGF immunoreexpression on kidneys.

Terlipressin prophylaxis may be useful in the prevention of radiocontrast-induced nephropathy; further research on humans is needed.

9. KAYNAKLAR

1. Rudnick MR, Tumlin AJ, Palevsky PM, Sheridan AM. Pathogenesis, clinical features and diagnosis of radiocontrast media-induced acute kidney injury (acute renal failure). *Uptodate*. 2009; 17(1):1-26.
2. Asif A, Epstein M. Prevention of Radiocontrast-induced nephropathy. *Am J of kidney disease*. 2004; 44(1):12-24.
3. Ozono Y, Maeda T, Matsushita T, Miyazaki M. Drug induced nephropathy. *Nippon Rinsho*. 2002; 60:493-500.
4. Morcos SK, Thomsen HS. European Society of Urogenital Radiology guidelines on administering contrast media. *Abdom Imaging*. 2003; 28:187-190.
5. Meyrier A. Nephrotoxicity of iodine contrast media. *Ann Radiol*. 1994; 37:286-295.
6. Barrett BJ, Parfey PS, Vavasor HM. Contrast nephropathy in patients with impaired renal function: high versus low osmolar media. *Kidney Int*. 1992; 41:1274-1279.
7. Parfrey PS, Griffiths SM, Baret BJ. Contrast material-induced renal failure in patients with diabetes mellitus, renal insufficiency, or both. A prospective controlled study. *N Engl J Med*. 1989; 320:143-149.
8. Cigarroa RG, Lange RA, Williams RH, Hillis LD. Dosing of contrast material to prevent contrast nephropathy in patients with renal disease. *Am J Med*. 1989; 86:649-652.
9. Yoshinori I, Takahisa Y, Toshiaki S, Ryoza O. Clinical and experimental evidence for prevention of acute renal failure induced by radiographic contrast media. *J Pharmacol Sci*. 2005; 97:473-488.
10. Rudnick MR, Goldfarb S, Wexler L, Ludbrook PA, Murphy MJ, Halpern EF. Nephrotoxicity of ionic and nonionic contrast media in 1196 patients: a randomized trial. The Iohexol Cooperative Study. *Kidney Int*. 1995; 47:254-261.

11. Schwab SJ, Hlatky MA, Pieper KS, Davidson CJ, Morris KG, Skelton TN. Contrast nephrotoxicity: a randomized controlled trial of a nonionic and an ionic radiographic contrast agent. *N Engl J Med.* 1989; 320:149-153.
12. Baret BJ, Carlisle EJ. Metaanalysis of the relative nephrotoxicity of high-and low-osmolality iodinated contrast media. *Radiology.* 1993; 188:171-178.
13. Apselin P, Aubry P, Franson SG, Strasser R, Willenbrock R, Berg KJ. Nephrotoxicity in high-risk patients study of iso-osmolar and low-osmolar non-ionic contrast media study investigators: nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography. *N Engl J Med.* 2003; 348:491-499.
14. Detrenis S, Meschi M, Musini S, Savazzi G. Lights and shadows on the pathogenesis of contrast-induced nephropathy: state of the art. *Nephrol Dial Transplant.* 2005; 20:1542-1550.
15. Heyman S, Rosen S, Rosenberger C. Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3:288-296.
16. Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na-K ATPase during ischemia. *Am J Physiol.* 1992; 263:488-492.
17. Fang LS, Sirota RA, Ebert TH, Lichtenstein NS. Low fractional excretion of sodium with contrast media-induced acute renal failure. *Arch Intern Med.* 1980; 140:531-533.
18. Cantley LG, Clark BA. Role of endothelin and prostaglandins in radiocontrast-induced renal artery constriction. *Kidney Int.* 1993; 44:1217-1223.
19. Russo D, Minutola R, Cianciaruso B, Memoli B, Conte G, De Nicola L. Early effects of contrast media on renal hemodynamics and tubular function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 6(5):1452-1458.
20. Pflueger A, Larson TS, Nath KA, King BF, Gross JM, Knox FG. Role of adenosine in contrast media-induced acute renal failure in diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc.* 2000; 75(12):1275-1283.

21. Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S. Regional alterations in renal haemodynamics and oxygenation: a role in contrast medium-induced nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2005; 20 Suppl:6-11.
22. Agmon Y, Peleg H, Greenfield Z. Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat. *J Clin Invest*. 1994; 94:1069-1075.
23. Persson PB, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney Int*. 2005; 68(1):14-22.
24. Weisberg LS, Kurnik PB, Kurnik BR. Radiocontrast-induced nephropathy in humans: role of renal vasoconstriction. *Kidney Int*. 1992; 41(5):1408-1415.
25. 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):1008-1015.
26. Goodman AI, Olszanecki R, Yang LM, Quan S, Li M, Omura S, Stec DE, Abraham NG. Heme oxygenase-1 protects against radiocontrast-induced acute kidney injury by regulating anti-apoptotic proteins. *Kidney Int*. 2007; 72(8):945-953.
27. Heyman SN, Brezis M, Epstein FH, Spokes K, Silva P, Rosen S. Early renal medullary hypoxic injury from radiocontrast and indomethacin. *Kidney Int*. 1991; 40(4):632-642.
28. Hofmann L, Frey FJ, Vogt B. BOLD-MRI for the assessment of renal oxygenation in humans: acute effect of nephrotoxic xenobiotics. *Kidney Int*. 2006; 70:144-150.
29. 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 rat kidney. *Kidney Int*. 1996; 49(5):1268-1275.
30. Rosenberger C, Heyman SN, Rosen S, Shina A, Goldfarb M, Griethe W, Frei U, Reinke P, Bachmann S, Eckardt KU. Up-regulation of HIF in experimental acute renal failure: evidence for a protective transcriptional response to hypoxia. *Kidney Int*. 2005; 67(2):531-542.

31. Beri R, Symon Z, Brezis M, Ben-Sasson SA, Baehr PH, Rosen S, Zager RA. Rapid DNA fragmentation from hypoxia along thick ascending limb of rat kidneys. *Kidney Int.* 1995; 47(6):1806-1810.
32. Heyman SN, Reichman J, Brezis M. Pathophysiology of radiocontrast nephropathy: a role for medullary hypoxia. *Invest Radiol.* 1999; 34(11):685-691.
33. Metren GJ, Burgess WP, Gray LV, Holleman JH, Roush TS, Kowalchuk GJ, Bersin RM, Van Moore A, Simonton CA, Rittase RA, Norton HJ, Kennedy TP. Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2004; 291(19):2328-2334.
34. Heyman SN, Clark BA, Kaiser N, Spokes K, Rosen S, Brezis M, Epstein FH. Radiocontrast agents induce endothelin release in vivo and in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 1992; 3(1):58-65.
35. Clark BA, Kim D, Epstein FH. Endothelin and atrial natriuretic peptide levels following radiocontrast exposure in humans. *Am J Kidney Dis.* 1997; 30(1):82-86.
36. Wang A, Holcslaw T, Bashore TM, Freed MI, Miller D, Rudnick MR. Exacerbation of radiocontrast nephrotoxicity by endothelin receptor antagonism. *Kidney Int.* 2000; 57:1675-1680.
37. Erley CM, Heyne N, Burgert K, Langanke J, Risler T, Osswald H. Prevention of radiocontrast-induced nephropathy by adenosine antagonists in rats with chronic nitric oxide deficiency. *J Am Soc Nephrol.* 1997; 8(7):1125-1132.
38. Katholi RE, Taylor GJ, McCann WP, Woods WT, Womack KA, McCoy CD, Katholi CR, Moses HW, Mishkel GJ, Lucore CL. Nephrotoxicity from contrast media: attenuation with theophylline. *Radiology.* 1995; 195(1):17-22.
39. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY. Radiographic contrast media-induced tubular injury: evaluation of oxidant stress and plasma membrane integrity. *Kidney Int.* 2003; 64(1):128-139.
40. Erley CM, Duda SH, Rehfuss D, Scholtes B, Bock J, Müller C, Osswald H, Risler T. Prevention of radiocontrast media-induced nephropathy in patients with pre-existing renal insufficiency by hydration in combination with the

- adenosine antagonist theophylline. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14(5):1146-1149.
41. Kramer BK, Preuner J, Ebenburger A, Kaiser M, Bergner U, Eilles C, Kammerl MC, Riegger GA, Birnbaum DE. Lack of renoprotective effect of theophylline during aortocoronary bypass surgery. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17(5):910-915.
 42. Bakris GL, Lass NA, Glock D. Renal hemodynamics in radiocontrast medium-induced renal dysfunction: a role for dopamine-1 receptors. *Kidney Int.* 1999; 59(1):206-210.
 43. Stone GW, McCullough PA, Tumlin JA, Lepor NE, Madyoon H, Murray P, Wang A, Chu AA, Schaer GL, Stevens M, Wilensky RL, O'Neill WW; CONTRAST Investigators. Fenoldopam mesylate for the prevention of contrast-induced nephropathy: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2003; 290(17):2284-2291.
 44. Wang YX, Jia YF, Chen KM, Morcos SK. Radiographic contrast media induced nephropathy: experimental observations and the protective effect of calcium channel blockers. *Br J Radiol.* 2001; 74(888):1103-1108.
 45. Neumayer HH, Junge W, Kűfner A, Wenning A. Prevention of radiocontrast media-induced nephrotoxicity by the calcium channel blocker nitrendipine: a prospective randomised clinical trial. *Nephrol Dial Transplant.* 1989; 4(12):1030-1036.
 46. Pannu N, Manns B, Lee H, Tonelli M. Systematic review of the impact of N-acetylcysteine on contrast nephropathy. *Kidney Int.* 2004; 65(4):1366-1374.
 47. Spargias K, Alexopoulos E, Kyrzopoulos S, Iokovis P, Greenwood DC, Manginas A, Voudris V, Pavlides G, Buller CE, Kremastinos D, Cokkinos DV. Ascorbic acid prevents contrast-mediated nephropathy in patients with renal dysfunction undergoing coronary angiography or intervention. *Circulation.* 2004; 110(18):2837-2842.
 48. Krag A, Bendsten F, Pedersen EB, Holstein-Rathlou NH, Moller S. Effects of terlipressin on the aquaretic system: evidence of antidiuretic effects. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295(5):295-300.

49. Arroya V, Gines P, Gerbes AL, Dudley FJ, Gentilini P, Laffi G, Reynolds TB, Ring-Larsen H, Schölmerich J. Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. Internal Ascites Club. *Hepatology*. 1996; 23(1):164-176.
50. Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology*. 1988; 8(5):1151-1157.
51. Krag A, Moller S, Henriksen JH, Holstein-Rathlou NH, Larsen FS, Bendtsen F. Terlipressin improves renal function in patients with cirrhosis and ascites without hepatorenal syndrome. *Hepatology*. 2007; 46(6):1863-1871.
52. Moller S, Hansen EF, Becker u, Brinch K, Henriksen JH, Bendtsen F. Central and systemic haemodynamic effects of terlipressin in portal hypertensive patients. *Liver*. 2000; 20(1):51-59.
53. Kiszka-Kanowitz M, Henriksen JH, Hansen EF, Moller S, Bendtsen F. Effect of terlipressin on blood volume distribution in patients with cirrhosis. *Scand J Gastroenterol*. 2004; 39(5):486-492.
54. Manning PT, Schwarts D, Katsube NC, Holmberg SW, Needleman P. Vasopressin-stimulated release of atriopeptin: endocrine antagonists in fluid homeostasis. *Science*. 1985; 229(4711):395-397.
55. Lebrech D. Review article: future indications for terlipressin therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20(3):65-68.
56. Ruiz-del-Arbol I, Monescillo A, Jimenez W, Garcia-Plaza A, Arroyo V, Rodes J. Paracentesis-induced circulatory dysfunction: mechanism and effect on hepatic hemodynamic in cirrhosis. *Gastroenterology*. 1997; 113(2):579-586.
57. Patel BM, Chittock DR, Russel JA, Walley KR. Beneficial effects of short-term vasopressin infusion during severe septic shock. *Anesthesiology*. 2002; 96(3):576-582.
58. Hollenberg SM, Broussard M, Osman J, Parrillo JE. Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2000; 86(7):774-778.

59. Yamamoto K, Ikeda U, Okada K, Saito T, Shimada K. Arginine vasopressin inhibits nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Hyperten Res.* 1997; 20(3):209-216.
60. Moreau R, Barriere E, Tazi KA, Lardeux B, Dargere D, Urbanowicz W, Poirel O, Chauvelot-Moachon L, Guimont MC, Bernuau D, Lebrec D. Terlipressin inhibits in vivo aortic iNOS expression induced by lipopolysaccharide in rats with biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2002; 36(5):1070-1078.
61. Gluud LL, Kjaer MS, Christensen E. Terlipressin for hepatorenal syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; 18(4):1-17.
62. Moreau R. Hepatorenal syndrome in patients with cirrhosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2002; 17:739-747.
63. Nangaku M, Eckardt KU. Hypoxia and the HIF system in kidney disease. *J Mol Med.* 2007; 85:1325-1330.
64. Haase VH. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291(2):271-281.
65. Rosenberger C, Griethe W, Gruber G, Wiesener M, Frei U, Bachmann S, Eckardt KU. Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction. *Kidney Int.* 2003; 64(3):874-886.
66. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol.* 1996; 271(4):1172-1180.
67. Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, Wiesener MS, Hörstrup JH, Frei U, Ratcliffe PJ, Maxwell PH, Bachmann S, Eckardt KU. Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(7):1721-1732.
68. Rosenberger C, Goldfarb M, Shina A, Bachmann S, Frei U, Eckardt KU, Schrader T, Rosen S, Heyman SN. Evidence for sustained renal hypoxia and transient hypoxia adaptation in experimental rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2008; 23(4):1135-1143.

69. Rosenberger C, Khamaisi M, Abassi Z, Shilo V, Weksler-Zangen S, Goldfarb M, Shina A, Zibertrest F, Eckardt KU, Rosen S, Heyman SN. Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int.* 2008; 73(1):34-42.
70. Kim BS, Goligorsky MS. Role of VEGF in kidney development, microvascular maintenance and pathophysiology of renal disease. *Korean J Intern Med.* 2003; 18(2):65-75.
71. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 2004; 65(6):2001-2017.
72. Nakagawa T, Lan HY, Zhu HJ, Kang DH, Schreiner GF, Johnson RJ. Differential regulation of VEGF by TGF-beta and hypoxia in rat proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; 287(4):658-664.
73. Kim BS, Chen J, Weinstein T, Noiri E, Goligorsky MS. VEGF expression in hypoxia and hyperglycemia: reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(8):2027-2036.
74. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer.* 1996; 32(14):2413-2422.
75. Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature.* 1997; 386:671-674.
76. Gruden G, Thomas S, Burt D, Zhou W, Chusney G, Gnudi L, Viberti G. Interaction of angiotensin II and mechanical stretch on vascular endothelial growth factor production by human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10(4):730-737.
77. Witmer AN, Dai J, Weich HA, Vrensen GF, Schlingemann RO. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2 and 3 in quiescent endothelia. *J Histochem Cytochem.* 2002; 50(6):767-767.
78. Nangaku M, Inagi R, Miyata T, Fujita T. Hypoxia and hypoxia-inducible factor in renal disease. *Nephron Exp Nephrol.* 2008; 110:1-7.
79. Epstein FH, Agmon Y, Brezis M. Physiology of renal hypoxia. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 718:72-81.
80. Kanellis J, Mudge SJ, Fraser S, Katerelos M, Power DA. Redistribution of cytoplasmic VEGF to the basolateral aspect of renal tubular cells in ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 2000; 57(6):2445-2456.

81. De Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(5):993-1000.
82. Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(7):1448-1457.
83. Tomisawa M, Tokunaga T, Oshika Y, Tsuchida T, Fukushima Y, Sato H, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M. Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 1999; 35(1):133-137.
84. Bennet WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: the achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney Int.* 1996; 50(4):1089-1100.
85. Pilmore HL, Eris JM, Painter DM, Bishop GA, McCaughan GW. Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation.* 1999; 67(6):929-933.
86. Bello-Reuss E, Holubec K, Rajaraman S. Angiogenesis in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2001; 60(1):37-45.
87. Birck R, Krzossok S, Markowetz F, Schnülle P, Woude FJ, Braun C. Acetylcysteine for prevention of contrast nephropathy: meta-analysis. *Lancet.* 2003; 362(9384):598-603.
88. Alonso A, Lau J, Jaber BL, Weintraub A, Sarnak MJ. Prevention of radiocontrast nephropathy with N-acetylcysteine in patients with chronic kidney disease: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Am J Kidney Dis.* 2004; 43(1):1-9.
89. Pannu N, Manns B, Lee H, Tonelli M. Systematic review of the impact of N-acetylcysteine on contrast nephropathy. *Kidney Int.* 2004; 65(4):1366-1374.
90. Merten GJ, Burgess WP, Gray LV, Holleman JH, Roush TS, Kowalchuk GJ, Bersin RM, Van Moore A, Simonton CA, Rittase RA, Norton HJ, Kennedy

- TP. Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2004; 291(19):2328-2334.
91. Briguori C, Airoldi F, D'Andrea D, Bonizzoni E, Morici N, Focaccio A, Michev I, Montorfano M, Carlino M, Cosgrave J, Ricciardelli B, Colombo A. Renal insufficiency following contrast media administration trial (REMEDIAL): a randomized comparison of 3 preventive strategies. *Circulation*. 2007; 115(10):1211-1217.
92. Mueller C, Buerkle G, Buettner HJ, Peterson J, Perruchoud AP, Eriksson U, Marsch S, Roskamm H. Prevention of contrast media associated nephropathy: randomized comparison of 2 hydration regimens in 1620 patients undergoing coronary angioplasty. *Arch Intern Med*. 2002; 162(3):329-336.
93. Gines P, Torre A, Terra C, Guevara M. Review article: pharmacological treatment of hepatorenal syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20(3):57-62.
94. Moreau R, Lebrec D. The use of vasoconstrictors in patients with cirrhosis: type 1 HRS and beyond. *Hepatology*. 2006; 43(3):385-394.
95. Vieitez P, Gomez O, Uceda ER, Vera ME, Molina-Holgado F. Systemic and local effects of angiotensin II blockade in experimental diabetic nephropathy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2008; 9(2):96-102.
96. Yamasawa H, Shimizu S, Inoue T, Takaoka M, Matsumura Y. Endothelial nitric oxide contributes to the renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 312(1):153-159.
97. Toprak O, Cirit M, Tanrisev M, Yazici C, Canoz O, Sipahioglu M, Uzum A, Ersoy R, Sozmen EY. Preventive effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23(3):853-859.
98. Solez K, Kramer EC, Fox JA, Heptinstall RH. Medullary plasma flow and intravascular leukocyte accumulation in acute renal failure. *Kidney Int*. 1974; 6:24-37.
99. Bakris GL, Lass N, Gaber AO, Jones JD, Burnett JC. Radiocontrast medium-induced declines in renal function: a role for oxygen free radicals. *Am J Physiol*. 1990; 258:115-120.

100. Zager RA, Johnson AC, Hanson SY. Radiographic contrast media-induced tubular injury: evaluation of oxidant stress and plasma membrane integrity. *Kidney Int.* 2003; 64(1):128-139.
101. Tervahartiala P, Kivisaari L, Kivisaari R, Vehmas T, Virtanen I. Structural changes in the renal proximal tubular cells induced by iodinated contrast media. *Nephron.* 1997; 76(1):96-102.
102. Goldfarb M, Rosenberger C, Ahuva S, Rosen S, Heyman SN. A role for erythropoietin in the attenuation of radiocontrast-induced acute renal failure in rats. *Ren Fail.* 2006; 28(4):345-350.
103. Pollock DM, Polakowski JS, Wegner CD, Opgenorth TJ. Beneficial effect of ETA receptor blockade in a rat model of radiocontrast-induced nephropathy. *Ren Fail.* 1997; 19(6):753-761.
104. Villanueva S, Cespedes C, Vio CP. Ischemic acute renal failure induces the expression of a wide range of nephrogenic proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 290(4):861-870.
105. Nygren A, Ulfendahl HR, Hansell P, Erikson U. Effects of intravenous contrast media on cortical and medullary blood flow in the rat kidney. *Invest Radiol.* 1988; 23(10):753-761.
106. Raininko R, Ylinen SL. Effect of ionic and non-ionic contrast media on aggregation of red blood cells in vitro. A preliminary report. *Acta Radiol.* 1987; 28(1):87-92.
107. Rosenberger C, Rosen S, Shina A, Bernhardt W, Wiesener MS, Frei U, Eckardt KU, Heyman SN. Hypoxia-inducible factors and tubular cell survival in isolated perfused kidneys. *Kidney Int.* 2006; 70(1):60-70.
108. Rosenberger C, Rosen C, Heyman SN. Current understanding of HIF in renal disease. *Kidney Blood Press Res.* 2005; 28:325-340.
109. Fernandez-Seara J, Prieto J, Quiroga J, Zozaya JM, Cobos MA, Rodriguez-Fire JL, Garcia-Plaza A. Systemic and regional hemodynamics in patients with liver cirrhosis and ascites with and without functional renal failure. *Gastroenterology.* 1989; 97(5):1304-1312.

110. Larson TS, Hudson K, Mertz JI, Romero JC, Knox FG. Renal vasoconstrictive response to contrast medium. The role of sodium balance and the renin-angiotensin system. *J Lab Clin Med.* 1983; 101(3):385-391.
111. Shafferhans K, Strohmaier J, Geiger H. Contrast media induced acute renal failure. Protective action of atrial natriuretic peptide. *Kidney Int.* 1989; 35:417-420.
112. Prasad PV, Priatna A, Spokes K, Epstein FH. Changes in intrarenal oxygenation as evaluated by BOLD MRI in a rat kidney model for radiocontrast nephropathy. *J Magn Reson Imaging.* 2001; 13(5):744-747.
113. Trewhella M, Dawson P, Forsling M, McCarthy P, O'Donnell C. Vasopressin release in response to intravenously injected contrast media. *Br J Radiol.* 1990; 63(747):97-100.