



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ANKARA ŞEHİR HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

KARDİYOLOJİ KLİNİĞİ

SIÇANLARDA İNDİREKT BİLİRUBİNİN KONTRAST İLİŞKİLİ NEFROPATİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Fatih Ünal

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2022

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ANKARA ŞEHİR HASTANESİ SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

KARDİYOLOJİ KLİNİĞİ

SIÇANLARDA İNDİREKT BİLİRUBİNİN KONTRAST İLİŞKİLİ NEFROPATİ ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Fatih Ünal

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Timur Selçuk

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2022

TEŞEKKÜR

Kardiyoloji kliniğinde tıpta uzmanlık eğitimim sürecinde eğitimime katkısı bulunan ailem, hocalarım ve asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Öncelikli olarak eğitim ve öğrenim sürecimde her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Şerife Ünal'a ve babam Hasan Ünal'a şükranlarımı sunarım.

Tıpta uzmanlık tez sürecinde tez hocam Prof. Dr. Mehmet Timur Selçuk'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışma süresince deneysel modelleme, histokimyasal, biyokimyasal ve moleküler analiz yönünden desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Sevil Atalay Vural; Doç. Dr. Kamil Turan, Dr. Mehmet Kara, Dr. Samet Ece, Veteriner Hekim Fatih Özden, Vet. Teknikeri Vedat Demirtaş, Muzaffer Sevdalı hoca ve mesai arkadaşlarıma şükranlarımı sunarım.

Tıpta uzmanlık eğitimim sürecinde eğitimime katkı sağlayan bütün hoca, uzman abi ve ablalarıma teşekkürlerimi bildiririm.

Eğitim sürecimde her zaman yanımda olan, aile gibi olduğumuz başta Dr. Ceren Özdemir Al, Dr. Ertan Andaç Al, Dr. Ceren Yağmur Doğru, Dr. Elmas Kaplan, Dr. Halenur Sarıbaş, Dr. Ertan Ekici, Dr. İrem Dilara Can, Dr. Uğur Çalışkan olmak üzere tüm mesai arkadaşlarıma şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
KISALTMALAR iv
ŞEKİL LİSTESİ vii
TABLO LİSTESİ viii
ÖZET x
ABSTRACT xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1 NEFRON 3
2.1.1 Nefron Histoanatomisi 3
2.1.2 Nefron Fizyolojisi 5
2.2 KONTRAST MADDELER: 6
2.3 KONTRAST İLİŞKİLİ NEFROPATİ 8
2.3.1 Tanımlama 8
2.3.2 Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri 8
2.3.3 Patomekanizma 10
2.3.4 Tedavi 14
2.4 İNDİREKT BİLİRUBİN 17
2.4.1 Unkonjuge (indirekt) Bilirubinin Antiinflamatuar, Antioksidan, Antiapoptotik Etkinliği ve Kardiyovasküler, Renal Koruyucu Etkinliği 18
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER 22
3.1 ÇALIŞMA TÜRÜ ve ETİK KURUL İZNİ 22
3.2 HAYVAN ÇALIŞMASININ YÜRÜTÜLDÜĞÜ YER 22
3.3 ÇALIŞMA DİZAYNI 22
3.3.1 Deney Hayvanı Türü, Temini ve Bakımı 22
3.3.2 Etik Açıdan Esas Alınan Bildirgeler 22
3.3.3 Deney Hayvanlarının Gruplandırılması 23
3.3.4 Deney Protokolü 23
3.3.5 Ötenazi Protokolü 25
3.4 ANALİZ YÖNTEMLERİ 26
3.4.1 Biyokimyasal Analiz 26

3.4.2 Histopatolojik Analiz 26
3.4.3 Moleküler Analiz 27
3.4.4 İstatistiksel Analiz 29
4. BULGULAR 30
4.1 NEKROPSİ BULGULARI 30
4.2 BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI 31
4.3 HİSTOPATOLOJİ ANALİZ BULGULARI 37
4.3.1 Böbrek Korteks ve Medullasında Görülen Değişiklikler 37
4.3.2 Histopatoloji Bulgularına Ait Şekil ve Tablolar 40
4.3.3 Histopatoloji Verilerine İlişkin İstatistiksel Analiz Tabloları 42
4.4 MOLEKÜLER ANALİZ BULGULARI 47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 52
6. KAYNAKLAR 66
7. ÖZGEÇMİŞ 75
8. EKLER 77
EK1. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL ONAY FORMU 77
EK 2. TEZ KONUSU ONAY FORMU 78

KISALTMALAR

APAF-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1	**CD**	cluster of differentiation
ACC	American College of Cardiology	**DMSO**	Dimetil sülfoksit
ACR	American College of Radiology	**DM**	Diyabetes Mellitus
ATP	Adenozin trifosfat	**D1a**	Dopamin 1a reseptörü
ADP	Adenozin difosfat	**eNOS**	Endotelyal Nitrik Oksit sentaz
AMP	Adenozin monofosfat	**ET-1**	Endotelin 1
ACE inh.	Anjiyotensin Dönüştürcü Enzim inhibitörü	**Erk ½**	extracellular signal-regulated kinases
ANOVA	Analysis of variance	**ESC**	European Society of Cardiology
ADH	Anti diüretik Hormon	**ESUR**	European Society of Urogenital Radiology
A1a	Adenozin 1 a Reseptörü	**EPO**	Eritropoetin
BT	Bilgisayarlı Tomografi	**ER**	Endoplazmik Retikulum
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large	**Fos**	Finkel–Biskis–Jinkins murine osteosarcoma
Bax	Bcl-2 associated X protein	**FADD**	FAS-associated death domain
Bad	Bcl-2 associated death promoter	**GPX4**	Glutatyon Peroksidaz
BM/BD	Bilirubin mono/di glukuronid	**GFR**	Glomerüler Filtrasyon Hızı
CIN	Contrast Induced Nephropathy	**HbA1C**	Hemoglobin A1C
cJUN	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	**HMG-CoA Red.**	Hidroksi Metil Glutoril Koenzim A Redüktaz
CxCl 12	C-X-C motif chemokine ligand 12	**HMGB-1**	high mobility group box 1
CCl 2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	**HD**	Hemodiyaliz
Ct	threshold cycle	**HT**	Hipertansiyon
CxCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4	**HDL**	High-density lipoprotein
CO	Karbonmonoksit	**H&E**	Hemotoksilen & Eozin
CO_2	Karbondioksit	**H_20_2**	Hidrojen Peroksit
cDNA	complementary DNA	**HSP70**	Heat shock protein 70

HIF 1α	Hypoxia-inducible factor	**NAC**	N asetil sistein
HO-1	Hemoksijenaz 1	**NFκB**	Nükleer Faktör Kappa B
H+ NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans	**NLRP3**	NLR family pyrin domain containing 3
i.p.	intraperitoneal	**NOX**	Nitrik Oksit Sentaz
i.v.	intravenöz	**NO**	Nitrik Oksit
iNOS	İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz	**NADPH**	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
IL	interlökin	**NaCl**	Sodyum klorür
ICAM 1	Intercellular adhesion molecules	$NaHCO_3$	Sodyum Bikarbonat
IFN-γ	İnterferon gamma	**oxLDL**	Oxidized low-density lipoprotein
JAK-STAT	Janus kinase - Signal transducer and activator of transcription	O_2	Oksijen
KY	Kalp Yetmezliği	O_2^-	Süperoksit
KBH	Kronik Böbrek Hastalığı	$ONOO^-$	Peroksinitrit
KD	Kardiyak Debi	**OATP**	Organik Anyon Transport Peptitleri
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes	**Puma**	p53 upregulated modulator of apoptosis
Kim-1	Kidney Injury Molecule-1	**PGE1**	Prostoglandin E1
L-NAME	L- Nitro Arjinin Metil Ester	**PARP**	Poly-(ADP-ribose) polymerase
LOX 12	Lysyl oxidase 12	**PAR-1**	Protease Activated Receptor
LSD	Least Significant Difference	$P2X_1$	Purinerjik reseptör
LDL	low-density lipoprotein	PO_2	Parsiyel oksijen basıncı
MKK 3,6	Mitogen-activated protein kinase kinase	**PPARγ**	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
MMP	Matriks Metalloproteinaz	**PMNL**	Polimorfonükleer lökosit
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	**Ras**	Rat sarcoma virus
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1	**Raf**	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
mRNA	Mesajcı Ribonükleikasit	**RAR**	Reaktif oksijen radikalleri
NSAİİ	Non steroidal anti inflamatuar ilaç	**RAAS**	Renin anjiyotensin aldesteron sistemi
SOD	Süperoksit Dismutaz	**TG**	Trigliserid

SIRT 1	Sirtuin	**TNF-α**	Tümör nekroz faktör alpha
SMAD	Suppressor of Mothers against Decapentaplegic	**TRAIL**	TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
SPSS	Statistical Package for Social Sciences	**UDPGT 1**	UDP Glukuronil transferaz 1
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling	**UFH**	Ultrafiltrasyon
TRADD	TNFR1-associated death domain protein	**UDP**	Uridid n di fosfat
TNFR	Tümör nekroz faktör Reseptörü	**V1, V2**	Vazopressin reseptörü
TGFβ	Transforming growth factor beta	**VEGF**	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
TLR	Toll like Receptor		

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa No.
Şekil 1	Renal Tübül ve Vasküler Yapıların Şeması	4
Şekil 2	Renal Korpüskül	4
Şekil 3	Glomerüler Filtrasyon Bariyeri, Elektron mikroskobi görüntüsü	4
Şekil 4	Kontrast ilişkili Nefropatinin Endotel ve Tübüler Hücrelerdeki Patomekanizma Diyagramı	14
Şekil 5	Hem & Bilirubin Metabolizması	18
Şekil 6	İndirekt (Unkonjuge) Bilirubin Kimyasal Yapısı	18
Şekil 7	İndirekt Bilirubin'in Antioksidan, Antiinflamatuar, Antiapoptotik ve Terapötik Etkinlikleri	21
Şekil 8	Metabolik Kutu ve Deneysel Sabitleme Aracı	25
Şekil 9	Faz Ayrımı	27
Şekil 10	Ekspresyon-Döngü Eğrisi	28
Şekil 11	Nekrotik Doku Değişiklikleri	30
Şekil 12	Serum Kreatinin ve Üre Değerlerinin Kruskal-Wallis ile Non-Parametrik Grup Analizi ve Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U ile Non-Parametrik Post-Hoc Analizi	32
Şekil 13	İdrar Kreatinin ve Üre Değerlerinin Tek Yönlü ANOVA ile Parametrik Grup Analizi ve LSD ile Parametrik Post-Hoc Analizi	33
Şekil 14	Total idrar kreatinin değerlerinin Tek Yönlü ANOVA ve LSD Post-Hoc Yöntemiyle Analizi; İdrar Kreatinin/Serum Kreatinin Oranının Kruskal-Wallis ve Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney Post-Hoc Yöntemiyle Analizi	34
Şekil 15	24 Saatte Alınan Sıvı ve Çıkarılan İdrar Miktarlarının İstatistiksel Analizi	36
Şekil 16	Tubül epitellerinde hidropik dejenerasyon, vaküollerdeki granüler materyal birikimleri ve vakuoler dejenerasyon	38
Şekil 17	Kortekstеki tubul epitel sitoplazmalarında vakuolüzasyon	39
Şekil 18	Tubul epitel hücrelerinde parankim dejenerasyonu	40

Şekil 19	İntersitisyel alanda lenfosit ve makrofajların çoğunlukta olduğu mononüklear hücre infiltrasyonları. Damar çevrelerinde ekstrasellüer amiloid birikimleri	40
Şekil 20	Tübüler Dejeneratif Değişiklikler	42
Şekil 21	Böbrek Dokusunda Sitokrom C Gen Ekspresyonu	48
Şekil 22	Böbrek Dokusunda TNF-α Sitokininin Gen Ekspresyonu	49
Şekil 23	Böbrek Dokusunda IL-6 Sitokininin Gen Ekspresyonu	50
Şekil 24	Böbrek Dokusunda IL-1β Sitokininin Gen Ekspresyonu	50

TABLO LİSTESİ

		Sayfa No.
Tablo 1	Kontrast Maddelerin Farmakolojik ve Farmakokinetik Parametreleri	7
Tablo 2	Mehran Kontrast Nefropati Risk Skoru	9
Tablo 3	Kontrast ilişkili Nefropati Çalışması Deney Grupları	23
Tablo 4	Deney Protokolü	24
Tablo 5	Livak Metodu	28
Tablo 6	Gen Ekspresyon Primer Kodonları	28
Tablo 7	Biyokimya Verilerinin Normalite Testi	31
Tablo 8	Kortekste Dejeneratif Değişiklikler	41
Tablo 9	Medullada Görülen Histopatolojik Değişiklikler	41
Tablo 10	Deney Grupları ile Böbrek Tübüler Dejenerasyon Arasındaki İlişki	43
Tablo 11	Kontrast Nefropati Modellenen Gruplarla (Kontrol ve İndirekt Bilirubin) Böbrek Tübüler Dejenerasyon Arasındaki İlişki	44
Tablo 12	Deney Grupları (Kontrol ve Sham) ile Böbrek Tübüler Dejenerasyon Arasındaki İlişki	44
Tablo 13	Deney Grupları (İndirekt Bilirubin [Tedavi] ve Sham) ile Böbrek Tübüler Dejenerasyon Arasındaki İlişki	45
Tablo 14	Deney Grupları ile Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	45

	Arasındaki İlişki	
Tablo 15	Deney Grupları ile Damarlardaki Proteinöz Madde (Amiloidozis) Birikimi Arasındaki İlişki	46
Tablo 16	Deney Grupları ile Böbrek Medullar Tübüllerdeki Hyalin Silendiri Arasındaki İlişki	47
Tablo 17	Normalite Testleri	48

ÖZET

Giriş: Kontrast ilişkili nefropati tanım olarak; herhangi bir sebeple kontrast maruziyeti (Kontrastlı Bilgisayarlı Tomografi (BT); Koroner Anjiyografi, Periferik Anjiyografi) sonrası ilk 48-72 saat içerisinde, özellikle de maruziyetten 24 saat sonra kreatinin seviyesinde 0,5 mg/dl artış ya da GFR değerinde %25-30 oranında kayıp olmasıdır. Özellikle hastalarda hipotansiyon, kalp yetmezliği (KY), diyabetes mellitus (DM) gibi patolojilerin varlığında kontrast ilişkili nefropati olma olasılığı artmaktadır. Oluşan bu nefropati hastalarda mortalite ve morbidite artışlarına sebebiyet vermektedir. Kontrast ilişkili nefropatinin patogenezinde; temel olarak medüller vazokontriksüyon; apoptoz; nekroz patolojileri; inflamasyon yatmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız indirekt bilirubinin kanıtlanmış antiapoptotik; antioksidan özelliklerinden faydalanarak kontrast ilişkili nefropatinin modellendiği Wistar Albino cinsi sıçanlarda patolojinin gerilemesinde; buna ikincil olarak böbrek fonksiyonlarının iyileşmesinde faydasının olup olmadığını değerlendirmektir. Literatürde daha önce indirekt bilirubin ile ilgili diyabetik nefropati üzerine yapılmış deneysel çalışma mevcut olup, kontrast ilişkili nefropati üzerine bilirubin düzeyi ile istatiistiksel ilişkisini gösteren klinik çalışmalar incelenmiş; ancak herhangi bir deneysel-hayvan çalışmasına rastlanmamıştır. Bu anlamda yapmış olduğumuz bu çalışma kontrast ilişkili nefropati ve bilirubin ilişkisi konusunda ilk deneysel-hayvan çalışması özelliğini taşımaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamız deneysel-hayvan çalışmasıdır. Çalışmada toplamda 24 adet erkek 8 haftalık Wistar Albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 8'er adetten oluşan üç adet gruba ayrılmıştır. İlk iki grupta 10mg/kg indometazin; 10 mg/kg L-nitro arjinin metil ester (L-NAME) intraperitoneal (i.p.) enjeksiyonundan 15 dk. sonra intravenöz (i.v.) yolla 3 mg/kg iyoheksol enjekte edilerek kontrast ilişkili nefropati indüklenmiştir. Üçüncü grup sham grubu olarak kullanılmıştır. Kontrast ilişkili nefropati oluşturulan iki gruptan birine 30 mg/kg indirekt bilirubin, di- metil sulfoksit'te (DMSO) çözülerek i.p. yoldan kontrast enjeksiyonundan sonraki 48 saat süresince 24 saatte bir enjekte edilmiştir. Diğer kontrast nefropati indüklenen gruba kontrol olarak DMSO çözücüsü enjekte edilmiştir. Her üç gruptan metabolik kafes vasıtası ile 24 saatlik idrar örnekleri toplanmıştır. Kontrast enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanlara ötenazi işlemi uygulanmış olup serum ve

böbrek doku örnekleri alınmıştır. Her sıçandan alınan böbrek dokularından biri %10'luk formalin solüsyonuna gömülerek patolojiye; diğer böbrek ve serum örnekleri kuru buz vasıtası ile moleküler ve biyokimyasal analiz yapılmak üzere -80 C'ye transfer edilmiştir. Histopatolojik inceleme hemotoksilen-eozin boyası vasıtasıyla nefron ve glomerüler hasar incelenmek üzere yapılmıştır. Moleküler araştırmada ise böbrek dokusunda TNF-α, IL-1β, IL-6 ve sitokrom-c gen ekspresyon analizi yapılmıştır. İdrar örneklerinde üre, kreatinin, 24 saatlik toplam kreatinin, idrar/serum kreatinin oranı ölçümü; serum örneklerinde ise üre, kreatinin ölçümleri yapılmıştır.

Bulgular: Biyokimyasal analizde kontrol grubunda ve indirekt bilirubin verilen grupta, serum kreatinin değerleri sham grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek ($p<0,05$) bulundu. 24 saatlik idrarda total kreatinin değerleri ve idrar/serum kreatinin oranları kontrol grubu ve indirekt bilirubin grubunda, sham grubuna kıyasla anlamlı daha düşük olduğu görüldü ($p<0,05$). Serumda saptanan kreatinin değerleri indirekt bilirubin grubunda kontrol grubuna göre sayısal olarak daha düşük; idrarda ise (kreatinin düzeyi, total kreatinin, idrar/serum kreatinin oranı) daha yüksek görüldü ancak farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Serum ve idrardaki üre değerlerine bakıldığında; serumdaki üre değeri indirekt bilirubin grubunda sayısal veri açısından kontrol gruba göre düşük görülse de istatiksel analiz neticesinde kontrol ve indirekt bilirubin grupları arasında serum ve idrar üre değerleri açısından anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$). Metabolik kafes ile 24 saatlik sıvı alımı ve idrar miktarı hesaplandığında; çıkardıkları idrar miktarları açısından her üç grup arasında hem grup analizinde hem de post-hoc analizlerde anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p>0,05$); ancak kontrol ve indirekt bilirubin grubunda alınan sıvı miktarları sham grubuyla ayrı ayrı kıyaslandığında anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p>0,05$). Alınan sıvı miktraları açısından kontrol ve indirekt bilirubin grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

Böbrek dokusundaki histopatolojik verilerin kategorik olması ve çapraz tabloda 5'ten küçük değerlerin olduğu hücre oranı toplam hücrelerin %20' sinden fazlasını oluşturması nedeniyle, istatistiksel analiz Fisher's Exact yöntemi ile yapıldı. Tübüler dejenerasyon açısından gruplar ile böbrek tübüler dejenerasyon şiddeti arasındaki ilişki, istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi (Fisher's Exact $p<0,001$).

Moleküler analizlerde; gerçek zamanlı PCR ile böbrek dokularında TNF-α, IL-1β, IL-6 ve sitokrom C gen ekspresyonlarına bakıldı. IL-6 ekspresyonu açısından üç grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$). TNF-α, IL-1β ve sitokrom C gen ekspresyonları ise beklenilenin aksine kontrol kontrast nefropati grubunda indirekt bilirubin grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı daha düşük olduğu bulundu ($p<0,05$).

Sonuç: Kontrast nefropatiyi modellediğimiz invivo deneysel hayvan çalışmamızda; indirekt bilirubin molekülünün verildiği sıçanların histopatolojik analizlerinde, tübüler dejenerasyon düzeyinin sham grubuyla benzer olduğu, kontrol grubuna göre ise tübüler hasar şiddetinin daha az olduğu saptanmıştır. Biyokimyasal analizde istatistiksel anlamlı farklılık olmasa da, indirekt bilirubin verilen grupta kontrol gruba göre sayısal olarak serum kreatinin ve üre değerleri daha düşük bulunmuştur. Bununla birlikte, indirekt bilirubin verilen grupta idrar kreatinin değerleri daha yüksektir. Bu sonuçlar, indirekt bilirubinin kontrast nefropatisi üzerine olumlu etkisinin olabileceğini göstermektedir. Yaptığımız bu invivo hayvan çalışması, gelecekte yapılacak klinik/deneysel çalışmalara öncülük edebilir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, akut böbrek hasarı, indirekt bilirubin, iyoheksol, kontrast ilişkili nefropati, nekroz

ABSTRACT

Aim: Contrast-related nephropathy by definition; after contrast exposure for any reason (Contrast Computed Tomography (CT); Coronary Angiography, Peripheral Angiography) within the first 48-72 hours, especially 24 hours after exposure, 0.5 mg/dl increase in creatinine level or 25-30% GFR value rate of loss. Especially in the presence of pathologies such as hypertension, heart failure, and diabetes mellitus, the possibility of contrast-related nephropathy increases. This nephropathy causes increased mortality and morbidity in patients. In the pathogenesis of contrast-associated nephropathy; there are medullary vasoconstriction; apoptosis in proximal tubules and necrosis in distal tubules. Our aim in this study is using indirect bilirubin for regression of pathology in Wistar Albino rats, in which contrast-associated nephropathy is modeled; secondly, to evaluate whether it is beneficial in improving kidney functions. In the literature, there is an experimental study on diabetic nephropathy related to indirect bilirubin, and clinical studies showing the statistical relationship between bilirubin level and contrast-related nephropathy have been examined; however there was no experimental-animal studies on contrast related nephropathy. In this sense, our study is the first experimental-animal study on the relationship between contrast-related nephropathy and indirect bilirubin.

Materials and methods: Our study is an experimental-animal study. A total of 24 male 8-week-old Wistar Albino rats were used in the study. The rats were divided into three groups of 8 each.; Contrast-related nephropathy was induced by intravenous injection of 3 mg/kg iohexol 15 minutes after the intraperitoneal (i.p.) injection of 10 mg/kg L-nitro arginine methyl ester (L-NAME) and 10mg/kg indomethacin in the first two groups. The third group was used as the sham group. 30 mg/kg indirect bilirubin dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) was administered to one of the two groups with contrast-related nephropathy i.p. was injected every 24 hours for 48 hours after intravenous contrast injection. The other contrast nephropathy induced group was injected with DMSO solvent as a control. 24-hour urine samples were collected from all three groups via metabolic cage. The rats were euthanized 48 hours after the contrast injection and serum and kidney tissue samples were taken. One of the kidney tissues taken from each rat was embedded in 10%

formalin solution for histopathological analysis; other kidney and serum samples were transferred to -80 °C for molecular and biochemical analysis by means of dry ice. Histopathological examination was performed to examine nephron and glomerular damage by means of Hemotoxylin-Eosin stain. In molecular research, TNF-α, IL-1β, IL-6 and cytochrome-c gene expression analyzes were performed in kidney tissue.

Results: In the biochemical analysis, serum creatinine values of the control and indirect bilirubin groups were significantly higher than the sham group ($p<0.05$); Total creatinine values in 24-hour urine and urine/serum creatinine ratios were found to be significantly lower in the control and indirect bilirubin groups compared to the sham group ($p<0.05$). The serum creatinine values were numerically lower in the indirect bilirubin group than in the control group; although creatinine level was higher in urine (creatinine level, total creatinine [24 hour], urine/serum creatinine ratio), the difference was not statistically significant ($p>0.05$). Considering the urea levels in serum and urine; although the urea value in the serum was numerically low in the indirect bilirubin group; according to the statistical analysis, no significant difference was found between the control and indirect bilirubin groups in terms of serum and urine urea values ($p>0.05$). When the 24-hour fluid intake and urine amount are calculated with the metabolic cage; there was no significant difference between the three groups in terms of urine amount in both group and post-hoc analysis ($p>0.05$); however, the amount of fluid intake in the control and indirect bilirubin groups was found to be significantly lower when compared with the sham group separately ($p>0.05$). There was no significant difference between the control and indirect bilirubin groups in terms of the amount of fluid intake ($p>0.05$).

In the histopathological analysis of kidney tissue, the analysis was performed by Fisher's Exact method, since the data were categorical and values less than 5 per cell in the crosstab which comprised more than 20%. In terms of tubular degeneration, the relationship between the groups and the severity of renal tubular degeneration was considered statistically significant (Fisher's Exact $p<0.001$).

In molecular analysis, TNF-α, IL-1β, IL-6 and cytochrome C gene expressions in kidney tissues were examined by real-time PCR. There was no

statistically significant difference between the three groups in terms of IL-6 expression ($p>0.05$). Contrary to expectations, TNF-α, IL-1β and cytochrome C gene expressions were found to be statistically significantly lower in the control contrast nephropathy group than in the indirect bilirubin group ($p<0.05$).

Conclusion: In our in vivo animal study, in which we modeled contrast nephropathy, according to the histopathological analysis, in rats given indirect bilirubin molecule, it was observed that the level of tubular degeneration was almost similar to the sham group and the severity of tubular damage was less than the control group. At the same time, although there is no statistically significant difference in biochemical analysis, the fact that serum creatinine and urea values are numerically lower and urinary creatinine values are higher in the group given indirect bilirubin may shed light on future experimental/clinical studies on the effect of indirect bilirubin on contrast nephropathy treatment, and shows us that indirect bilirubin may have a place in the treatment of CIN.

Key words: Apoptosis, acute kidney injury, indirect bilirubin, iohexol, contrast-induced nephropathy nephropathy, necrosis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Girişimsel Kardiyoloji alanında sıklıkla karşılaşılan kontrast ilişkili nefropati; iyoheksol, iopamidol, ioversol vb. gibi kontrast madde kullanımı sonrasında hastalarda ya da sağlıklı bireylerde serum kreatinin seviyesinde ilk 48-72 saat içerisinde; özellikle de ilk 24 saatten sonra temel kreatinin seviyesinde 0,5 mg/dl düzeyinde ya da %25-30 oranında artış göstermesidir. Kontrast maddelerin böbrek üzerindeki toksik etkisi 7-10 güne kadar uzayacağından; bu süre zarfındaki kreatinin düzeyinde anlamlı artış kontrast ilişkili nefropati ile ilişkilendirilmelidir (1).

Genel popülasyonda kontrast ilişkili nefropati insidansı %0,6-2,3 aralığında iken; hipotansiyon, KY, DM, anemi, ileri yaş (>75), kronik böbrek hastalığı (KBH) ve nefrotoksik ilaç kullanımı (Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörü [ACE inh.], non steroidal anti inflamatuar ilaç [NSAİİ], böbrek yoluyla atılan antibiyotikler vb.) gibi risk faktörleri altında bu oran %25-50'lere kadar çıkmaktadır. (2).

Patogenezde ise: medüller vazokonstriksiyon ve iskemi; tübüler apoptoz ve nekroz yatmaktadır. Kontrast maddeler; özellikle de yüksek osmolar ve iyonik kontrast ajanlar doğrudan reaktif oksijen radikalleri (RAR), pro-inflamatuar sitokin ve kemokinler (Tumor nekrozis faktör α [TNF-α]; interlökin-1 [IL-1]; interlökin-6 [IL-6]) vasıtasıyla apoptoz, nekroz ve inflamasyon süreçlerini başlatarak tübüler hasar oluşturabileceği gibi; dolaylı yoldan nitrik oksit (NO) salınımını azaltıp, endotelin, anjiyotensin 2 (AT-2) gibi vazokonstriktör ajanlarla medüller iskemi oluşturarak özellikle proksimal ve distal tübüllerde hasar oluşturabilirler (1,3).

Kontrast ilişkili nefropatiyi önlemek, iyileştirmek ya da progresyonu engellemek amacıyla pek çok klinik ve deneysel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar: intravenöz hidrasyon, endotelin reseptör antagonisti (Bosentan, Ambrisentan), adenozin reseptör antagonisti (Teofilin), asetilsistein, statin (Atorvastatin, Rosuvastatin) vitamin E vb. gibi antioksidanları/vazodilatatör ajanları içermektedir (4). Ancak bu maddelerin hiçbiri, i.v. hidrasyon dışında kardiyoloji tedavi kılavuzunda sınıf I endikasyonu sağlamamaktadır (5).

Hemoglobin (Hb) molekülünün yapıtaşı olan Hem'in metabolik ürünü olan indirekt bilirubin; lipofilik yapıda olup, antioksidan, antiinflamatuar ve antiapoptotik özellikleri pre-klinik çalışmalarda gösterilmiştir (6–8). İndirekt bilirubinin daha önce diyabetik nefropati ve piyelonefrit gibi böbrek hasar patolojilerinde deneysel çalışmaları mevcuttur (6,9). Güncel literatürde indirekt bilirubinin kontrast nefropati üzerine sadece istatistiksel korelasyonu değerlendiren klinik çalışmaları mevcuttur (10,11). Ancak kontrast nefropati tedavisinde, nefropatolojinin gerilemesinde ya da iyileşmesinde indirekt blirubinin katkısı olup olmadığını değerlendiren deneysel invivo/ invitro çalışması bulunmamaktadır.

Bu bilgiler ışığında planladığımız bu çalışmada oluşturduğumuz hipotez: "Kontrast ilişkili nefropati üzerine indirekt bilirubinin patolojiyi gerileticiya da iyileştirici etkinliği var mıdır?" sorusudur. Bu çalışmadaki amacımız; indirekt bilirubin molekülünün kontrast nefropatisi modellenen Wistar Albino cinsi sıçanlarda oluşan kontrast nefropatisi üzerine etkisini; nefropatolojinin gerilemesini sağlayıp sağlamadığını; hangi mekanizma ya da mekanizmalar üzerinden nefropati üzerine etki gösterdiğini, moleküler- histopatolojik ve biyokimyasal analiz yöntemleri ile incelemek ve bu alanda yapılacak çalışmalara yol göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

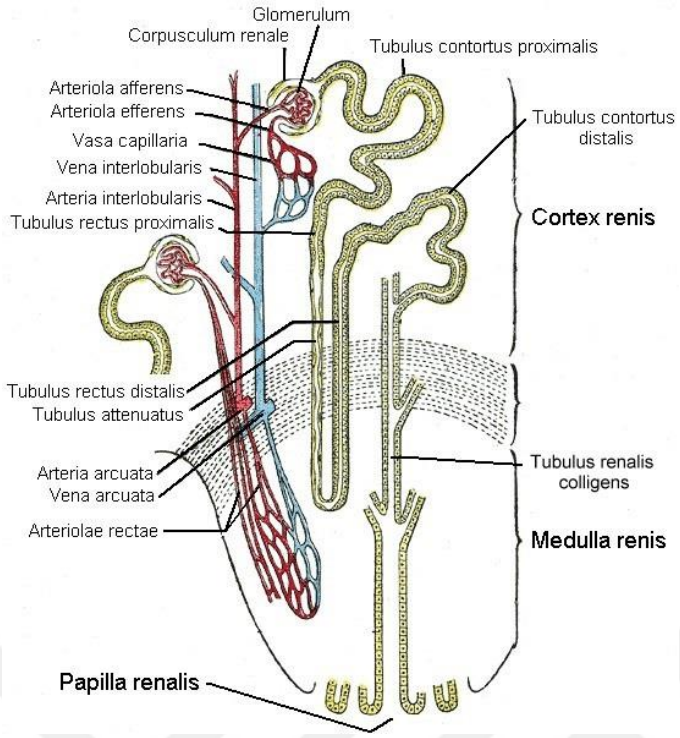
2.1 NEFRON

Nefron böbrek dokusunun en küçük işlevsel yapıtaşıdır. Ortalama bir böbrek dokusundan yaklaşık 1,5 milyon nefron vardır. Nefron yapısı böbrek dokusunda sadece sıvı ve elektrolit dengesini değil; bunun yanında nefronun proksimal tübül kısmındaki enzimatik aktivitesi ve salgıladığı hormonlarla Hb üretimi, Vitamin D aktivasyonu, Renin anjiyotensin aldesteron sistem (RAAS) aktivasyonu, yoğun glukoneogenez aktivitesi ile vücut enerji dengesini düzenleme gibi hemoestatik olaylara büyük oranda katkı sağlar.

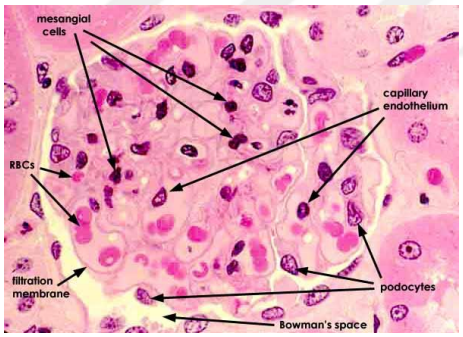
2.1.1 Nefron Histoanatomisi

Bir nefron "Glomerül (Kapiller yatak, mezengiyal hücreler), glomerülü saran Bowman kapsülü, proksimal tübül, Henle'nin inen ince kulbu, Henle'nin çıkan ince ve kalın kulbu, distal tübül ve toplayıcı kanal sistemi (sırasıyla bağlayıcı kanal, kortikal ve medüller kanal, papiller [iç medüller] ana kanal)" kısımlarından oluşmaktadır. Nefron sistemine eşlik eden damar sistemleri ise: nefron cisimciğine (Glomerül, Bowman kapsülü) kanı getiren ve götüren, afferent ve efferent arteriyoller; tübüler sistemi saran peritübüller kapiller yataktır. Nefron sistemi içerisinde yerleşmiş ve farklılaşmış hücre gruplarından oluşan jukstaglomerüler aparatın bileşenleri: Maküla densa (distal tübüldeki farklılaşmış epitel hücreleri); extraglomerüler mezengiyal hücreler ve jukstaglomerüler hücrelerdir (afferent arteriolün media tabakasındaki özelleşmiş düz kas hücreleri).

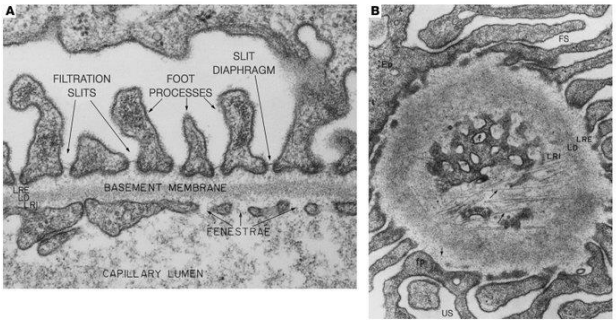
Glomerülün histolojik yapısını değerlendirecek olursak, en önemli yapılar; glomerüler bazal membran; podosit hücreleri ve kapiller ağdaki endotel hücreleridir. Podosit hücreleri ayakları arasında ve endotel hücrelerinin birbirleri arasında bulunan yarıklar, maksimum 4,5 nm olması nedeni ile 5 kD üstündeki molekülleri filtre ederken; glomerüler bazal membrandaki proteoglikan ve glikoproteinler, negatif yüklü moleküllerin geçişini engellemektedir. Böylece bu yapılar hem mekanik hem de iyonik filtre görevi görmektedirler. Glomerül içerisinde bulunan mezengiyal hücreler ise kapiller yatağa mekanik destek sağlamakta, kasılma özelliği ile glomerül içi direnç oluşturmakta ve glomerül içi protein yapılara, yabancı hücrelere karşı fagositoz görevi göstermektedirler (12).



Şekil 1 Renal Tübül ve Vasküler Yapıların Şeması "*Henry Vandyke Carter, Henry Grey (1918); Anatomy of the Human Body, Gray's Anatomy Fig. 1128*" den alınıştır.



Şekil 2 Renal Korpüskül, 1µm kesit *"Histoloji Bölümü, Güney Illinois Üniversitesi Carbondale"*



Şekil 3 Glomerüler Filtrasyon Bariyeri, Elektron mikroskobi görüntüsü: "*Marilyn G. Farquhar, J Clin Invest.* 2006;116 (8):2090-2093"

2.1.2 Nefron Fizyolojisi

Böbrek dokuları kardiyak debi (KD)'nin %20'sini alır. Dakikada ortalama glomerüler filtrasyon hızı (GFH) ise 125 ml'dir. Elde edilen plazma-ultrafiltrat; proteinden ve negatif yüklü moleküllerden fakir; glukoz, elektrolit ve diğer metabolitlerden zengindir. Ultrafiltrat sırasıyla Bowman kapsül, proksimal tübül, Henle'nin inen ve çıkan kolları, distal tübül ve toplayıcı sistemlerden kalikselere doğru yol alır. Ultrafiltrat içerisindeki glukoz, aminoasit ve oligopeptidelerin hepsi; su, üre, sodyum (Na^+), potasyum (K^+), klorür (Cl^-) ve kalsiyum (Ca^+)'un %65'i proksimal tübülden geri emilmektedir. Su, elektrolit ve metabolitlerin (üre vs.) geri kalan kısmı Henle kulpu (inen-çıkan ince kolu, çıkan kalın kolu), distal tübül ve toplayıcı kanallardan geri emilmekte veya sekrete edilmektedir. Henle kulpunun inen ince kolundan sadece su geri emilimi olurken, Henle kulpunun çıkan kalın kolundan su emilimi olmaksızın elektrolit (Na^+, K^+, $2Cl^-$, NH_4^+) emilimi olmaktadır. Böylelikle filtre edilen suyun %1'i, elektrolitlerin (Na, Cl, Ca, Mg) ise %5'inden daha az kısmı idrar ile atılmaktadır.

Böbrek dokusunda, nefron düzeyinde üç adet oto-regülasyon sitemi vardır. Bunlar: "miyojen vazokonstriksiyon sistemi, tübüloglomerüler feedback sistemi ve jukstaglomerüler aparat üzerinden RAAS aktivasyon sistemi" dir.

2.1.2.1 Miyojen vazokonstriksiyon sistemi: Sistemik kan basıncı artışı nedeniyle afferent arteriyol lümeninde basınç artışı; buna karşılık arteriyollerde vazokonstriktör mediyatörler vasıtası ile vazokonstriksiyon yanıtının olmasıdır. Vücudun tüm arteriyol sistemlerinde oluşabilecek bu basınç yükselmesine karşı oluşan tepkiye Bayliss etkisi denmektedir.

2.1.2.2 Tubuloglomerüler feedback: GFH artışı sonucu artış gösteren Na^+ ve Cl^- konsantrasyonu, distal tübüldeki özelleşmiş epitel hücreleri olan maküla densa tarafından algılanıp, vazokonstriksiyonu indükleyen mediyatörler (endotelin vb.) vasıtası ile afferent arteriyollerde meydana gelen vazokonstriksüyondur. GFH artışı afferent arteriyolde vazokonstriksiyona yol açarken; GFH düşüklüğü vazodilatasyona yol açmaktadır.

2.1.2.3 Renin, Anjiyotensin II: Renin doğrudan, kan basıncı düşüklüğü jukstaglomreüler hücreler tarafından algılanıp salgılanırken; dolaylı olarak da maküla densada ultrafiltrattaki Cl^- düşüklüğü algılanıp, mediyatörler vasıtası ile jukstaglomerüler hücreler aktive edilerek salgılanmaktadır. Renin de RAAS sistemini aktive ederek anjiyotensin II salınım ve aktivasyonunu, dolayısıyla da aldosteron salınımını sağlamaktadır **(**13).

2.2 KONTRAST MADDELER:

Gastrointestinal sistem, üriner sistem ve dolaşım sistemi gibi kanal yapısına sahip doku tiplerinde radyolojik görüntüleme için X-ray ışınını geri yansıtıp alıcı ekranda yoğunluk oluşturan; ağızdan ya da i.v. yoldan verilebilen kimyasal ajanlara 'kontrast madde' denmektedir.

Kontrast maddelerin kısaca tarihçesine bakacak olursak: 1895 yılında Wilhelmm Röntgen'in X-ışını keşfinden sonra, X ışını ile yapılan görüntüleme işlemleri tıp hayatına girmiştir. Görüntülemeyi damar dokusu ve organ bazında odaklamak amacıyla kullanılan kontrast maddeler ilk olarak 1896 yılında; Haschek ve Lintendhal tarafından kadavrada brakiyal artere kalsiyum karbonat enjekte edip, X-ray altında brakiyal arterin yapısını görüntüleyerek ortaya çıkmıştır. Sonrasında 1898 yılında Hicks tarafından kurşun tetraoksit kontrast ajan olarak kullanılarak kadavrada renal arter görüntülemesi yapılmıştır.

Günümüzde sıklıkla kullanılan kontrast maddelerin temelini oluşturan iyot içeriğinin ilk olarak görüntülemede kullanılabileceği fikri, 1917 yılında sodyum iyodid ile yapmış olduğu üriner sistem ve mesane görüntülemesiyle aslen savaş cerrahı olan Douglas Comeron'a aittir. Bu keşfi takip eden yıllarda, sodyum iyodit ilk olarak canlı insanda 1922 yılında üriner sistemi değerlendirmek için i.v. yoldan verilerek uygulanmıştır. Damar sistemini değerlendirmek üzere ilk olarak canlı insanda arteriyografi amacıyla sodyum iyodit 1923 yılında Barney Brooks tarafından uygulanmıştır. 1928 yılında Dr. Swick'in suda çözünürlüğü yüksek iyonik kontrast ajan olan "iopax" keşfinden sonra 1968 yılına kadar iyot temelli "diatrizoate, iothalamate, ioxaglate, ioxitalaminic asit vb." iyonik kontrast ajanların keşfi ve bu ajanların radyolojik görüntüleme, girişimsel kardiyoloji gibi alanlarda kullanımı olmuştur. İyonik, yüksek osmolariteye sahip bu ajanların vücutta olumsuz yönde

oluşturduğu; alerji, kontrast ilişkili cilt ve doku hasarı (cilt nekrozu, nefropati) gibi reaksiyonlar sebebiyle 1968 yılında Dr. Torest Almen tarafından iyonize olmayan iyot temelli metrizamide kontrast ajanı buluşu yapılmıştır. Bu tarihten itibaren günümüze kadar; radyolojik - kardiyolojik görüntüleme ve işlemlerde, vücutta yüksek reaksiyon oluşturma özelliği olan iyonik kontrast ajanların yerini iohexol, iopromide, ioversol, iomeprol, iobitridol gibi iyonik olmayan kontrast ajanlar almıştır. Günümüzde ise; klinik çalışmalar neticesinde kontrast ilişkili nefropati riskini daha az oluşturan iyonik olmayan, düşük osmolariteye sahip kontrast ajanlar (iotrolan, iodixanol) tercih edilmektedir (14).

Aşağıda verilen tabloda klinikte sıklıkla kullanılan bazı kontrast ajanların moleküler özellikleri verilmiştir (3).

Tablo 1. Kontrast Maddelerin Farmakolojik ve Farmakokinetik Parametreleri

Jenerik isim, tanıtıldığı yıl	**mg / ml**	**İyonik**	**Monomer**	**mOsm/kg Osmolalite**	**t½ dk**
Ioxitalaminik asit (Telebrix) 1989	350	Evet	Evet	2130	66
Ioxaglate (Hexabrix) 1979	320	Evet	Hayır	600	60
Iopromide (Ultravist) 1979	370	Hayır	Evet	770	120
Iohexol (Omnipaque) 1983	350	Hayır	Evet	780	120
Iotrolan (Isovist) 1988	300	Hayır	Hayır	320	-
Ioversol (Optiray) 1989	350	Hayır	Evet	790	96-120
Iomeprol (Iomeron) 1994	350	Hayır	Evet	618	110
Iobitridol (Xenetix) 1995	350	Hayır	Evet	915	108
Iodixanol (Visipaque) 1995	320	Hayır	Hayır	290	120

2.3 KONTRAST İLİŞKİLİ NEFROPATİ

2.3.1 Tanımlama

Kontrast ilişkili nefropatinin bilinen en yaygın tanımlaması, kontrast madde verildikten sonraki ilk 48-72 saat içerisinde; özellikle de kreatinin bazal değerinde 24 saatten sonra meydana gelen 0,5 mg/dl düzeyinde ya da %25-30 oranında artış olmasıdır (15). Ancak kontrast maddenin böbrekler üzerine oluşturduğu hasar etkisi 1 hafta-10 güne kadar uzayabildiğinden; 2012 yılında yayımlanan Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) akut böbrek hasarı tedavi yönergesinde, kontrast ilişkili nefropati tanımlaması 'kontrast madde maruziyetinden sonraki ilk 48 saat içerisinde kreatinin değerinin 0,3 mg/dl'lik artışı ya da ilk 7 gün içerisinde kreatinin bazal değerinin en az 1,5 kat artışı olarak belirtilmiştir (16).

2.3.2 Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Girişimsel radyoloji, kardiyolojik girişimsel işlemler veya radyolojik görüntüleme sırasında uygulanan kontrast madde sonrası oluşabilecek nefropati insidansı çalışmadan çalışmaya farklılık gösterse de, genel olarak bu oran %0,6-15 aralığında değişmektedir. Uygulanan kontrast maddenin: miktarı, iyonik olup-olmaması, osmolarite seviyesi; eşlik eden diyabet, kronik böbrek hasarı, nefrotoksik ajan kullanımı (antibiyotik, antifungal ajan, kemoterapötik ilaç vb.) gibi risk faktörleri varlığı ya da yokluğunda kontrast ilişkili nefropati oluşma olasılığını arttırıp azaltabilmektedir. Farklı risk faktörlerinin bir araya gelmesi ile kontrasta bağlı nefropati insidansı %25-50'lere kadar çıkabilmektedir (2). McDonald Robert J. ve arkadaşları tarafından 2013 yılında 13 klinik çalışma taranarak yayımlanan meta analiz çalışmasında; i.v. yoldan kontrast madde verilen 15582 hastada, kontrast ilişkili nefropati insidansı %6,2 olarak tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada kontrasta bağlı olarak diyaliz ve ölüm oranı ortalama %2,4 olarak verilmiştir (17). Başka bir çalışmada ise; kontrast ilişkili nefropati; hastalarda, hastane içi gelişen akut böbrek hasarlarının %11'ini oluşturduğu ve böbrek perfüzyon bozukluğu, nefotoksik ilaçlardan sonra, hastalarda akut böbrek yetmezliğine gidişte en önemli üçüncü sebep olduğu belirtilmiştir (18).

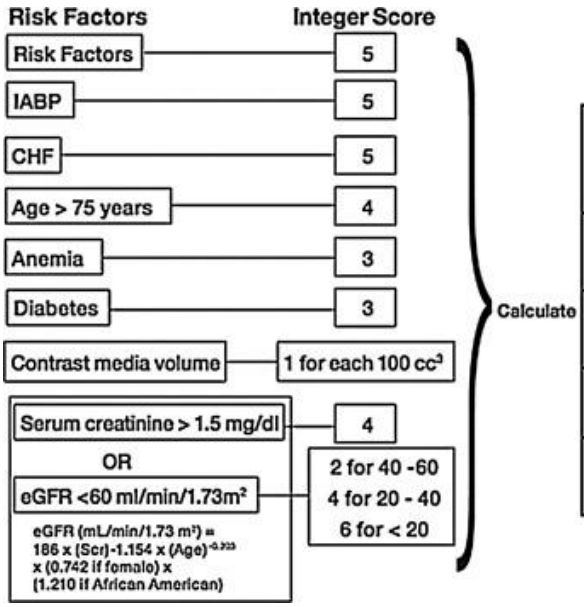
Girişimsel Kardiyolojide ise literatürde perkütanöz koroner girişimsel işlemler sonrası kontrast ilişkili nefropati insidansı %3,3 verilirken (19); DM, KBH

gibi risk faktörleri altında bu oran %25-50' lere; HD ihtiyacının da %10-15' lere çıkabildiği gösterilmiştir (2). Primer koroner girişimler; Transkateter aortik valf implatasyonu (TAVI), kompleks koroner girşim (bifurkasyon vs.) gibi uzun süren, zorlu kardiyolojik girişimlerde CIN insidansı %12,1-25'lere yükselebilmektedir (20–22). Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise; koroner girişim yapılan 2604 hastada CIN insidansı %13,3 olarak verilmiştir (23).

Kullanılan kontrast maddenin osmolaritesi ve iyonik olup olmaması da CIN insidansını etkilemektedir. RECOVER ve NEPHRIC çalışmalarında hipo-osmolar non-iyonik iodixanol (290 mosm/kg); hiper-osmolar non-iyonik iohexol (780 mosm/kg) ve ioxaglate (600 mosm/kg) kontrast maddelerine kıyasla daha az oranda CIN geliştirdiği gösterilmiştir (24).

Risk faktörleri taşımayan sağlıklı bireylerde ya da düşük riskli hastalarda kontrast kullanımı sonrasında nefropati olasılığı çok düşükken; ileri yaş (>75 yaş), DM, KY, KBH, hipotansiyon, anemi, nefrotoksik ilaç kullanımı (Antibiyotik, anti-viral ajan, antifungal, kemoterapötik [sisplatin, mitomisin, doxorubicine]) vb. risk faktörleri eşliğinde nefropati insidansı belirgin artmaktadır. Bu risk faktörlerinden yola çıkarak, oluşabilecek nefropati/diyaliz ihtiyacını öngörebilmek adına, günümüzde de kullanılan risk skorlaması Mehran tarafından tanzim edilmiştir (25).

Tablo 2. Mehran Kontrast Nefropati Risk Skoru



Risk Score	Risk CIN	Risk of Dialysis
≤ 5	7.5%	0.04%
6 to 10	14.0%	0.12%
11 to 16	26.1%	1.09%
≥ 16	57.3%	12.6%

2.3.3 Patomekanizma

Kontrast ilişkili nefropatinin patomekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. CIN patomekanizmasında literatürde özellikle üzerinde durulan üç önemli patolojik mekanizma mevcuttur. Bu mekanizmalar; medüller vazokonstriksiyon, tübüler nekroz ve apoptozdur. Genel kanı kontrast maddenin, vazokonstriktör mediyatörler (endotelin, anjiyotensin II vs.) aracılığıyla indüklediği kortikomedüller hattaki vazokonstriksiyonun oluşturduğu hipoksi zemininde tübüler sistemde (proksimal ve distal tübül) apoptoz, nekroz ve inflamasyon süreçlerinin başladığı yönde olsa da; kontrast maddenin kendisi de; özellikle iyonik ve osmolaritesi yüksek olanlar, doğrudan tübüler ve endotel hücrelerde apoptotik ve nekrotik süreçleri başlatabilmektedirler. Vazokonstriksiyon/medüller hipoksi ve direkt tübüler hasar patomekanizmalarına ayrı ayrı bakacak olursak (3):

2.3.3.1 Kortikomedüller vazokonstriksiyon, hiperviskozite, medüller hipoksi ve hücre hasarı: Özellikle osmolaritesi yüksek olan kontrast maddeler, vasküler lümene fazla miktarda difüzyonla sıvı geçişine sebebiyet verip, başlangıçta glomerüler filtrasyonu arttırmaktadır. Oluşturdukları bu osmotik diürez ile Henle kulpunun çıkan koluna, distal tübül ve toplayıcı kanallara fazla miktarda elektrolit (Na^+, Cl^-, K^+) ve su ulaşmasını sağlamaktadırlar. Distal tübüldeki özelleşmiş epitelyal hücrelerden oluşan maküla densa tarafından artmış Na^+, Cl^- düzeyleri algılanıp; adenozin ve ATP uyaranlarının aracılık ettiği tübüloglomerüler feedback sistemi ile afferent arterioldeki miyofibriller yapı ve mesengial hücreler, A1a ve $P2X_1$ reseptörleri üzerinden uyarılarak vazokonstriksiyon meydana gelmektedir (26). Toplayıcı tübüllere ulaşan artmış su ve vasküler sistem içerisindeki osmolaritesi yüksek kontrast madde içeriği toplayıcı tübül ve arteriol sistemdeki V1, V2 reseptörleri tarafından algılanıp vazopressin (ADH) sistemini aktive etmekte ve beraberinde ultrafiltrattaki yüksek Na^+ içeriği Aldesteron hormon sistemini aktive edip, Na^+ geri emilimini sağlamaktadır. Aktive ADH V1a reseptörü üzerinden renal arteriyollerde ve peritübüler kapiller yatakta (medulla tabakasının derinlerine ulaşan vasa recta) şiddetli vazokonstriksiyona; V2 reseptörleri üzerinden su geri emilimine neden olmaktadır (27–29). Bunun yanında Kontrast madde viskositesi kana göre yüksek olduğu için oluşturduğu hiperviskozite durumu; özellikle kontrast ajanın böbrek sisteminde yoğunlaştığı peritübülüler kapiller yatak ve tübüler sistemdeki

endotel ve tübüler epitelyal hücre membranlarına yüzey kayma gerilimiyle hasar vermekte ve oluşturduğu bu membran hasarı da hücrelerde p38 MAPK, c JUN N terminal kinaz (cJNK) gibi hücre içi tehlike sinyallerini aktive edip apoptozu uyarabilmektedir. Apoptoz uyarımı yanında, hiperviskozite endotel hücrelerinin membran yapısına bağlı yoğun glikokaliks yapısını harabiyete uğratıp, hücre içine yoğun Ca^{+2} akışına neden olmakta ve Ca^{+2} aracılı intrinsik mitokondriyal apoptoz indüksiyonuyla birlikte oksidaz enzimlerinin aktivasyonu ile reaktif oksijen radikalleri oluşumuna sebebiyet vermektedir. Bunun yanında hiperviskozite endotelin salınımı ve anjiyotensin II vb. mediyatörler üzerinde arteriyol ve vasa rectada vazokonstriksiyona katkı sağlamaktadır (30–35).

Böbrek tübül sistemi (proksimal, distal ve toplayıcı tübüller) içerinde kontrast maddenin oluşturduğu hiperviskozite akımın yavaşlamasına, dolayısıyla tübül içi basınç artışı ile medüller interstisyuma ve kapiller sisteme bası yoluyla doku harabiyetine ve vazokonsitriksiyona neden olmaktadır (36). Aynı mekanizma ile vasa recta içerinde kan akışını yavaşlattığı için platelet agregasyonu, koagülasyon kaskadı aktivasyonu ve trombin salınımı gibi olaylar dizinini başlatabilmektedir. Açığa çıkan trombin, endotel hücrelerinde PAR-1 aracılı apoptozu; ICAM-1, IL-6, IL-1, CxCL12, MCP-1 gibi sitokin, kemokin ve adezyon molekülleriyle inflamatuar hürelerin (Monosit, nötrofil) vasküler yapıya adezyon ve transmigrasyonunu tetikleyebilmektedir. Ayrıca radyolojik kardiyovasküler görüntülemede kullanılan kontrast maddeler iyot temelli olduğu için; içeriğindeki yoğun iyot, yüzeyinde yoğunlaştığı tubuler ve endotelyal hücrelerde p38 MAPK yolağı üzerinden Bcl-XL, Bcl-2 aracı molekül inhibisyonu ve Bax aktivasyonu ile intrinsik apoptotik yolağı (mitokondri, sitokrom-c) aktive edebilmekte, sonuçta DNA fragmantasyonuna neden olabilmektedir (30,37–40).

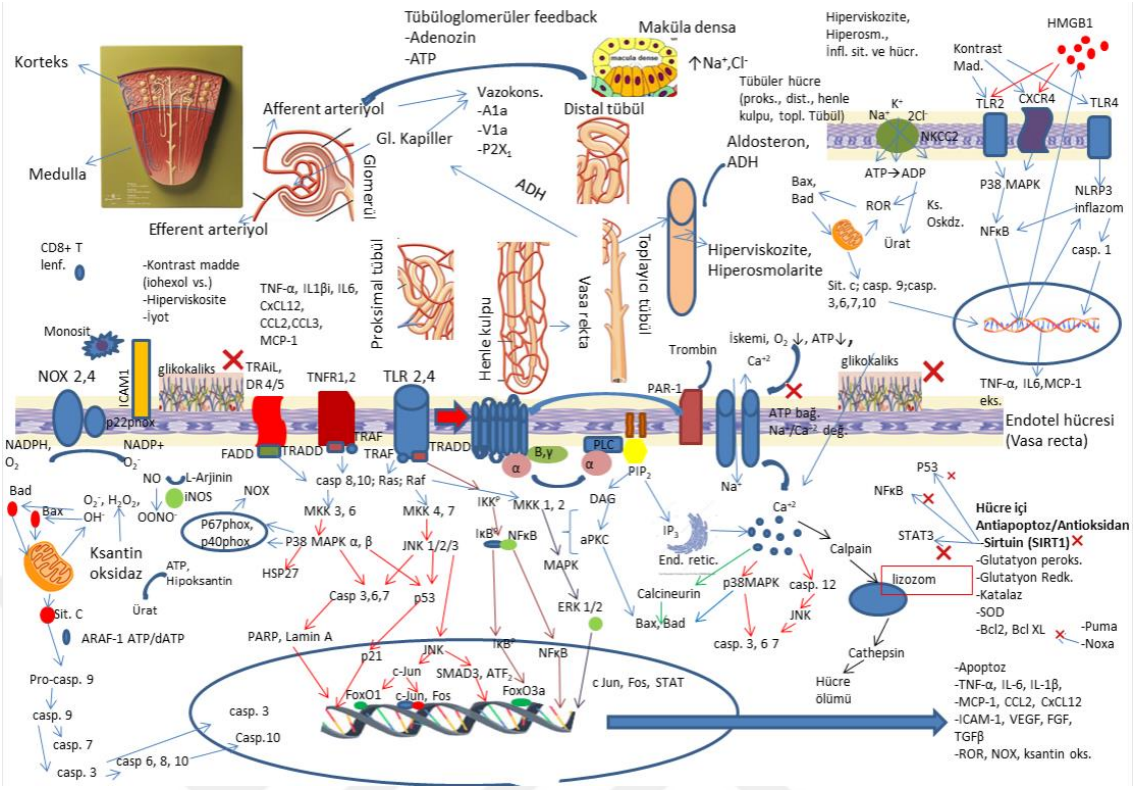
Henle çıkan kulbuna ve distal- toplayıcı tübüllere kontrast maddenin oluşturduğu osmotik diürez kaynaklı ulaşan aşırı Na^{+} ve Cl^{-} içeriği; tübüllerde yer alan ATP bağımlı Na+ kanallarının (özellikle de Henle kulpu çıkan kalın kolunda yer alan ATP bağımlı Na^{+}-K^{+}-$2Cl^{-}$ kanalının) Na^{+} geri emilimi için aşırı çalışmasına bağlı olarak ATP tüketim artışına neden olmaktadır. Artan ATP ihtiyacını karşılamak için mitokondriyal sistem aktivasyonu meydana gelmekte ve ATP'nin yıkımıyla da ATP sırasıyla ATP → ADP → AMP → İnosin → Hipoksantin'e dönüşmektedir.

Hipoksantin ise enzimatik aktivitesi sırasında süperoksit (O_2^-) oluşturan xantin oksidaz enzimi aracılığıyla iki aşamada ürik asite dönüşmektedir. Hem mitokondriyal aktivite hem de kantin oksidaz enzim aktivitesi sırasında açığa çıkan ROR'leri tübüler hücre membran harabiyeti, intrinsik apoptotik yolak indüksiyonu; inflamatuar sitokin (TNF-α, IL-1β, IL-6 vb.) salınımını uyarması ile ekstrinsik apoptotik yolak indüksiyonu ve nekroz sürecine gidiş gibi patolojik olaylara neden olabilmektedir (37,38,41).

Yukarıda sayılan: 1- Kontrast madde kaynaklı hiperviskozite temelli tübüler ve endotelyal hücre harabiyeti 2- Tübül içi basınç artışı ile böbrek interstisyel doku üzerine oluşan bası 3- Peritübüler kapiller yatak (özelikle de medulla derinlerine kadar uzanan vasa recta) içerisinde kan akımının yavaşlamasına bağlı koagülasyon kaskad aktivasyonu ve endotelin salınımı 4- Hiperosmolorite kaynaklı oluşan diürez nedeniyle aktive olan ADH, aldesteron sistemi ve tubuloglomerüler feedback 5- Kontrast maddenin gerek kendi kimyasal yapısı, gerekse de yoğun iyot içeriği nedeniyle oluşturduğu direkt tübüler ve endotelyal hücre hasarı 6- Sitokin ve inflamatuar hücre aracılı proinflamasyon gibi mekanizmalar; nefron sitemindeki afferent arteriyollerde ve tübül sistemine eşlik eden kapiller yatakta, özellikle de medulla tabakasının iç yüzeylerine kadar uzanan vasa recta isimli kapiller yatakta vazokonstriksiyona, apoptoz ve nekroz indüksiyonuna aracılık etmektedirler. Meydana gelen vazokonstriksiyon; korteks- medulla tabakalarında iskemiye ve PO_2 düşüklüğüne sebebiyet vermektedir. Korteks, böbrek kan akımının %90'dan fazlasını aldığı için, iskemi öncelikle daha az kanlanan medulla tabakasında olmaktadır (3,38). Oluşan medüller iskemiye karşılık, kompansatuar mekanizma olarak vasküler yataktaki endotel hücrelerinden eNOS aktivitesi ile NO salgılanmakta vasküler-peritübüler kapiller yatakta vazodilatasyon ve bunun neticesinde medullada reperfüzyon oluşmaktadır. Zamanla inflamasyon, apoptoz ve nekroz süreci ile vasküler-endotelyal sistemde eNOS yerine, inflamasyon sürecinde açığa çıkabilen iNOS sentezlenmektedir. İskemi ve sentezlenen NO vasıtasıyla oluşan reperfüzyon sonucu olarak; aşırı ATP üretimi ve tüketimi, hücre O_2 temininde dengesizlikler sonucu mitokondriyal sistem ve ksantin oksidaz artmış aktivitesi aracılığıyla RAR (O_2^- vb.) açığa çıkmakta, endotel ve tübüler sistem hücrelerinde apoptoz, nekroz ve inflamatuar sitokin sentez süreçleri meydana gelmektedir (37,42). İskemik stres

altında kalan endotel hücrelerinden O_2^- oluşumuna katkı sağlayan NADPH oksidaz 2,4 enzimlerinin ekspresyonu artmakta ve farklı enzimatik aktiviteler sonucu meydana gelen O_2^-, iNOS aktivitesi sonucu açığa çıkan NO'i peroksinitrite çevirmektedir. Açığa çıkan peroksinitrit endotel hücrelerinde ve komşu tübüler hücrelerde nekroz ve DNA hasarına yol açmaktadır (43,44). Bunların yanında oluşan iskemi sürecinde hücre içi ATP'nin azalmasına ikincil ATP bağımlı Na^+/Ca^+ değiştirici iyon kanalının aktivitesinde azalma; sonuç olarak Ca+ hücre dışına atılamadığı için hücre içi Ca^+ miktarında artış olmaktadır (45–47). Bundan başka iskemik strese maruz kalan endotel hücrelerinden salınan ET-1, iskemik sahada toplanan aktive aldosteron ve ADH, oluşan vazokonstriksiyonu güçlendirmekte; tübüler ve endotel hücrelerden sitokin (TNF-α, IL-6, IL-1β, IFN-γ vs.) ve kemokin (CxCL12, MCP-1 vb.) salınımını uyarmaktadır (3,37,48,49).

Böbrek medullasındaki tübüler hücrelerde ve peritübüler kapiller yatakta oluşan ve yukarda da belirtilen iskemik değişiklikler, artan hücre içi Ca^{+2}, oluşan RAR (O_2^-, H_2O_2, $ONOO^-$)'leri, endotel tabakasından salınan endotelin-1 ve iNOS aracılı NO, aktive aldosteron ve ADH'ın vasküler yatağa ve tübüler sisteme akümülasyonu, sentezlenen TNF-α ve kontrast ajanın hücre üzerine direkt toksik etkisi: oluşturdukları hücre içi oksidatif stres ile p38 MAPK, cJNK tehlike sinyal yolakları üzerinden sırasıyla Bax, Bad aktivasyonu, mitokondriyal sitokrom c salınımı, caspase 9 ve caspase 3, 6, 7, 10 aktivasyonu ile intrinsik apoptotik yolağı; TNF-α, IFN-γ, Endotelin 1 sitokin ve mediyatörleri ile TRAIL 4/5, TNFR ½, TLR4 vb. reseptörleri üzerinden p38 MAPK, NFκB sinyal yolakları ile ekstrinsik apoptotik yolağı (Caspase 3/ 6/ 7); hücre nekrozunu; Erk1/2, JAK STAT başta olmak üzere diğer sinyal yolakları ile sitokin (TNF-α, Il-1β, IL-6, IFN-γ), kemokin (HMGB1, MCP1, NLRP3 (50,51)]), adezyon molekülleri (ICAM-1 vb.) ekspresyonunu, dolayısıyla da inflamatuar hücreleri (Monosit, Makrofaj, CD8+ T hücre) iskemik/nekrotik sahaya çağırarak inflamasyonu potansiye etmektedirler (38,41,42,48). Neticede birbirini aktive eden tüm bu sistemler bir kör döngü oluşturmakta, karşısında hücre sisteminde yer alan antiapoptotik (Sirtuin [SIRT1]), antioksidan (katalaz, glutatyon peroksidaz, süper oksit dismutaz vb) mekanizmalar yetersizse ve altta yatan böbrek hasarı, böbrek perfüzyon bozukluğu gibi patolojiler yer alıyorsa, kontrast nefropatolojisini oluşturabilmektedir (48,52).



Şekil 4. Kontrast ilişkili Nefropatinin Endotel ve Tübüler Hücrelerdeki Patomekanizma Diyagramı, *Dr. Fatih Ünal 06.05.2022*

2.3.4 Tedavi

Kontrast ilişkili nefropatinin patomekanizma kısmında anlatılan hücre içi tehlike sinyal yolakları (p38 MAPK, cJNK, ERK ½); apoptoz mekanizmaları; caspase sistemi; ROR (O_2^-, H_2O_2, $ONOO^-$, OH^-) salınımı; hücre içi Ca^{+2} birikimi; proinflamatuar sitokin, kemokin ve hücreler; vazokonstriksiyon; nekroz gibi patolojik mekanizmaları geri döndürmeye ya da baskılamaya yönelik pek çok invivo ve invitro klinik öncesi deneysel çalışmalar yapılmıştır. Ancak birçok deneysel çalışma, preklinik aşamada anlamlı faydası gösterilmesine rağmen; klinik çalışmalarda i.v. hidrasyon ve HMG-CoA redüktaz inhibitörleri (atorvastatin, rosuvastatin) dışında kontrast ilişkili nefropatisi üzerine anlamlı klinik faydası gösterilememiş ve klinik pratiğe yansımamıştır. Deneysel ve klinik çalışmalarda CIN tedavisine yönelik kullanılan tedavi metotları ya da maddeler koruyucu tedavi şeklinde; yani kontrast maddeye maruz kalmadan önce kullanılmıştır. Kardiyoloji ve nefroloji klinik tedavi kılavuz ve protokollerine yansımış bazı tedavi yöntemlerine ve preklinik aşamada kalan deneysel çalışmalarının başlıca olanlarına bakacak olursak:

CIN tedavisinde i.v. hidrasyon güncel (ESC, ACC-AHA, ACR, KDIGO ve ESUR gibi) kardiyoloji, nefroloji ve radyoloji tedavi kılavuzlarında ilk sırada ve en önemli koruyucu tedavi olarak bildirilmektedir (4,16). Özellikle ESC revaskülarizasyon ve ACC-AHA perkütan girişim kılavuzlarında i.v. hidrasyon; CIN için altta yatan DM, KY, KBH gibi risk faktörleri durumunda sınıf 1 olarak önerilmektedir (5,53). İntravenöz hidrasyonda ise klinik ve pre-klinik çalışmalarda en çok kullanılan mayiler ise sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$; %1,4; 154-167 mEq/l) ve izotonik sodyum klorür (NaCl; %0,9) çözeltileridir. İzotonik NaCl çözeltisinin bilimsel çalışmalarda dayandırıldığı temel mekanizmalar; tübüler diürezis sağlayarak oluşturduğu tübül içi dilüsyonel hiponatremi ve volüm artışı ile maküla densa üzerinden RAAS inhibisyonu; viskoziteyi azaltıp tübül ve kapiller içi basınç azalması ve sıvı akımının hızlanması; kapiller yavaş akımı inhibe ederek koagülasyon kaskad inhibisyonu; prostosiklin salınımı ve vazodilatasyondur. Sodyum bikarbonatın etkinlik mekanizmaları ise; oluşturduğu üriner alkalizasyon ile ROR oluşum inhibisyonu, Haber-Weiss reaksiyonu inhibisyonu ve doğrudan peroksinitriti bağlayarak $ONOO^-$'in toksik etkisinin baskılanmasıdır (3,4). İşlem ya da görüntüleme öncesi ve sonrası uygulanacak i.v. hidrasyonun protokolleri kılavuzlara ve çalışmalara göre farklılık gösterse de; ESUR ve KDIGO'ya göre i.v. $NaHCO_3$ (%1,4; 154 mEq/l) işlem öncesi ortalama 1 saat süreyle 3ml/kg/sa hızında ve işlem sonrası ortalama 4-6 saat süreyle 1-1,5 ml/kg/sa hızında verilmektedir. NaCl çözeltisi (%0,9) ise güncel kılavuzlara göre i.v. veriliş protokolü; ortalama 1-1,5 ml/kg/sa ya da 100 ml/sa hızında işlem öncesi 6-12 saat ve işlem sonrası 6-24 saattir (3,4,16). Yine bunların dışında POSEIDON ve REMEDIAL II/III gibi farklı klinik çalışmaların farklı sıvı verme protokolleri mevcuttur. Bu protokoller idrar çıkış miktarına göre (i.v. hidrasyon ve diüretiğin >300 ml/sa olacak şekilde verilmesi [REMEDIAL]); sol ventrikül diyastol sonu basıncına göre (<13 mmhg→5 ml/kg/sa; 13-18 mmhg→ 3 ml/kg/sa; >18 mmhg→1,5 ml/kg/sa); santral toplardamar basıncına göre (<6 cmH_2O→3/ml/kg/sa; 6-12 cmH_2O→1,5 ml/kg/sa; >12 cmH_2O→1 ml/kg/sa) belirlenmiştir. Kılavuzlardan bağımsız bu protokoller uygulandıkları çalışmalarda standart i.v. hidrasyona göre CIN insidansını anlamlı olarak azalttıkları gösterilmiştir (54–56). Bunların dışında NaCl ve $NaHCO_3$ çözeltilerinin CIN insidansını azaltmadaki etkinliklerini kıyaslayan bazı küçük çalışmalarda (57,58) $NaHCO_3$ çözeltisi NaCl'ye göre üstün olsa da; randomize kontrollü PRESERVE

çalışmasında NaCl ile $NaHCO_3$ arasında CIN insidansı açısından anlamlı farklılık bulunamamıştır (59). Ayriyeten yapılan çalışmalarda izotonik NaCl (%0,9), hipotonik NaCl (% 0,045)'ye kıyasla düşük CIN insidansı yönünden üstün bulunmuştur (15). Bütün bu sebeplerden dolayı ESC ve ACC-AHA kardiyoloji kılavuzlarında i.v hidrasyon için izotonik NaCl (%0,9) önerilmektedir (5,53).

Antioksidan, antiinflamatuar özellikleri barındıran HMG-CoA redüktaz inhibitörleri (statin); CIN patogenezinde; apoptoz, nekroz ve inflamasyon patolojilerin ön planda olması nedeniyle CIN ile ilgili klinik ve deneysel çalışmalarda kullanılmış olup; özellikle yüksek doz ator- ve rosuvastatin klinik çalışmalarda CIN insidansını anlamlı azalttığı gösterilmiştir. Deneysel çalışmalarda ise statinler; ROR aktivitesini , NADPH oksidazı, adezyon molekül ekspresyonunu (ICAM1, VCAM), inflamatuar sitokin (TNF-α, IL-6 vb.) salınımını ve dokudaki oksidatif stresi azaltarak kontrast nefropatolojisini geriletmektedirler (4,15,60). Statinlerin CIN üzerine bu sonuçlarından dolayı, ACC-AHA ve ESC kılavuzlarında; sınıf 2a ve sınıf 2b olarak özellikle ator- (80 mg) ve rosuvastatin (20, 40 mg) önerilmektedir (5,53).

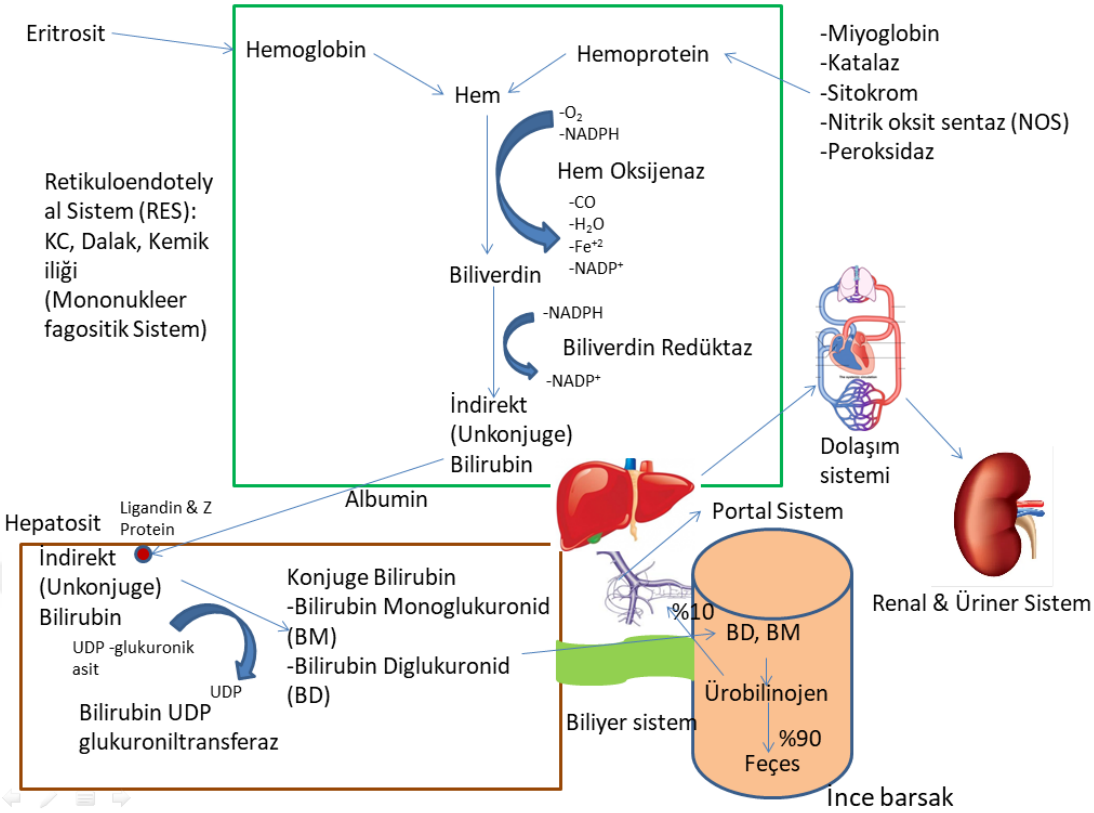
N-asetilsistein (NAC); serbest O2 radikallerini azaltma, antioksidan sistemin temel öğesi olan glutatyon için sistein kaynağı sağlama; vazodilatasyon; eNOS aktivasyonu gibi özelliklerinden dolayı CIN tedavisinde, deneysel ve klinik çalışmalarda oral ya da i.v. yollardan kullanılmıştır. Özellikle oral NAC olmak üzere uygulanan NAC küçük çalışmalarda CIN tedavisinde fayda sağladığı gösterilse de (4); PRESERVE ve ACT gibi randomize kontrollü çalışmalarda CIN üzerine anlamlı faydası bulunamamıştır (59,61). Bu nedenle ASC-AHA kılavuzunda CIN tedavisinde NAC kullanımı önerilmemektedir (sınıf III) (53) . Oral ya da i.v. NAC uygulamasının CIN tedavisinde ne ESC ne de AHA-ACC kardiyoloji kılavuzlarında yeri olmasa da; KDIGO'da oral NAC kullanımı önerilmektedir (16).

Ultrafiltrasyon ise ESC-revakülarizasyon kılavuzunda, özellikle yüksek riskli (DM, KY, KBH, anemi vs.) hastalarda, CIN insidansını gerilettiği için kompleks koroner girişim öncesi zayıf kanıt düzeyiyle önerilmektedir. Profilaktik hemodiyaliz ise çalışmalarda CIN üzerine anlamlı faydası olmadığı için önerilmemektedir (5,62).

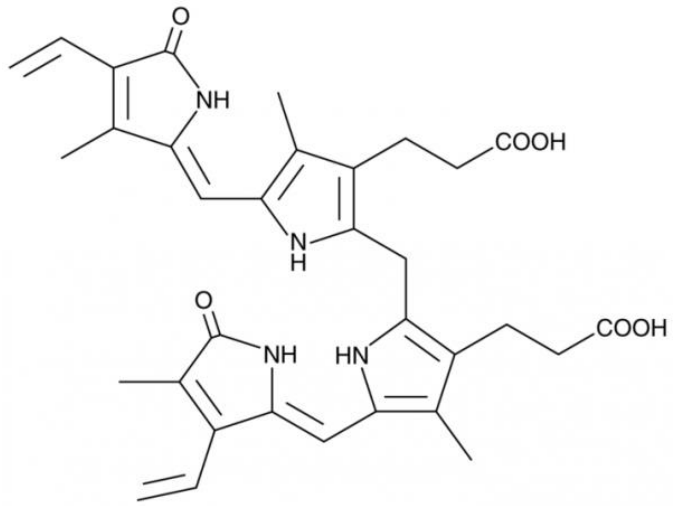
Fenoldopam (D1a agonisti→vazodilatasyon); teofilin (adenozin [ROR için substrat, vazokonstriksiyon] reseptör antagonisti); askoribik asit (Vit. C, antioksidan); endotelin reseptör antagonisti (Bosentan→vazodilatasyon); PGE1 (vazodilatasyon, anti-iskemik); eritropoeitin (EPO→p38 MAPK, cJNK yolak inh.); kalsiyum kana blokeri (KKB; nifedipin amlodipin vs.) gibi kimyasal ajanlar CIN tedavisinde klinik ve deneysel çalışma amacıyla kullanılsa da; CIN üzerine anlamlı faydası olmadığı veya aksine nefropatolojiyi daha da kötüleştirdiği için nefroloji/kardiyoloji tedavi kılavuzlarına girememişlerdir (63,64).

2.4 İNDİREKT BİLİRUBİN

Retiküloendotelyal sistemde (KC, dalak, kemik iliği) bulunan mononükleer fagositik hücrelerde (monosit, makrofaj vs.) yaşlı ya da dejenere eritrositlerin yıkımı ile açığa çıkan hemoglobin ve miyoglobin, katalaz, sitokrom, peroksidaz gibi hemoproteinlerin enzimatik yıkımıyla hem proteini oluşmaktadır. Hem proteini ise memeli hücrelerde yaygın olarak bulunan hem oksijenaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile O_2 ve NADPH kullanılarak biliverdine dönüşmektedir. Bu reaksiyon sırasında Fe^{+2}, H_2O, karbon monoksit (CO), $NADP^+$ açığa çıkmaktadır. Meydana gelen biliverdin de retiküloendotelyal sistem başta olmak üzere memeli organizmasında yaygın olarak bulunan biliverdin redüktaz enzimi ile NADPH kullanılarak indirekt (unkonjuge) bilirubine redükte olmaktadır. İndirekt bilirubin hidrofobik bir molekül olduğu için vasküler sisteme diffüze olduğunda albümine bağlanarak taşınmaktadır. İndirekt bilirubin albümine bağlı şekilde KC sinüzoidal sisteme geldiğinde, bilirubin albüminden ayrılarak hepatositlerin bazolateral membranından, birçoğu pasif diffüzyonla bir kısmı da organik anyon transport polipeptidleri (OATP) aracılığıyla aktif olarak hücre içine alınmaktadır. İndirekt bilirubin hepatosit içerisinde ligandin (Y protein) ve Z proteinine bağlanıp endoplazmik retikuluma (ER) geçerek UDP glukuroniltransferaz enzim tarafından glukuronik asitle konjuge edilmektedir. Konjugasyon işlemi sırasında UDP glukuronik asit kullanılmakta ve reaksiyon sonucu UDP ve bilirubin monogkukuronid (BM)/ bilirubin diglukuronid (BD) açığa çıkmaktadır. BM/BD biliyer sistem ile ince barsağa geçerek urobilinojene dönüşmekte; sonrasında %90'ı feçes ile atılmakta, %10'u da portal sistem üzerinden dolaşım sistemine katılarak renal-üriner sistem ile vücuttan uzaklaştırılmaktadır (65,66).



Şekil 5. Hem & Bilirubin Metabolizması, *Dr Fatih Ünal 09.05.2022*



Şekil 6. İndirekt (Unkonjuge) Bilirubin Kimyasal Yapısı, $C_{33}H_{36}N_4O_6$, *Bilirubin | CAS 635-65-4 | Cayman Chemical | Biomol GmbH*

2.4.1 Unkonjuge (indirekt) Bilirubinin Antiinflamatuar, Antioksidan, Antiapoptotik Etkinliği ve Kardiyovasküler, Renal Koruyucu Etkinliği

Dolaşımda sürekli yüksek seyreden indirekt bilirubin Crigler Najar sendromunda olduğu gibi nöronal hücrelerde toksisiteye (kernikterus) sebebiyet

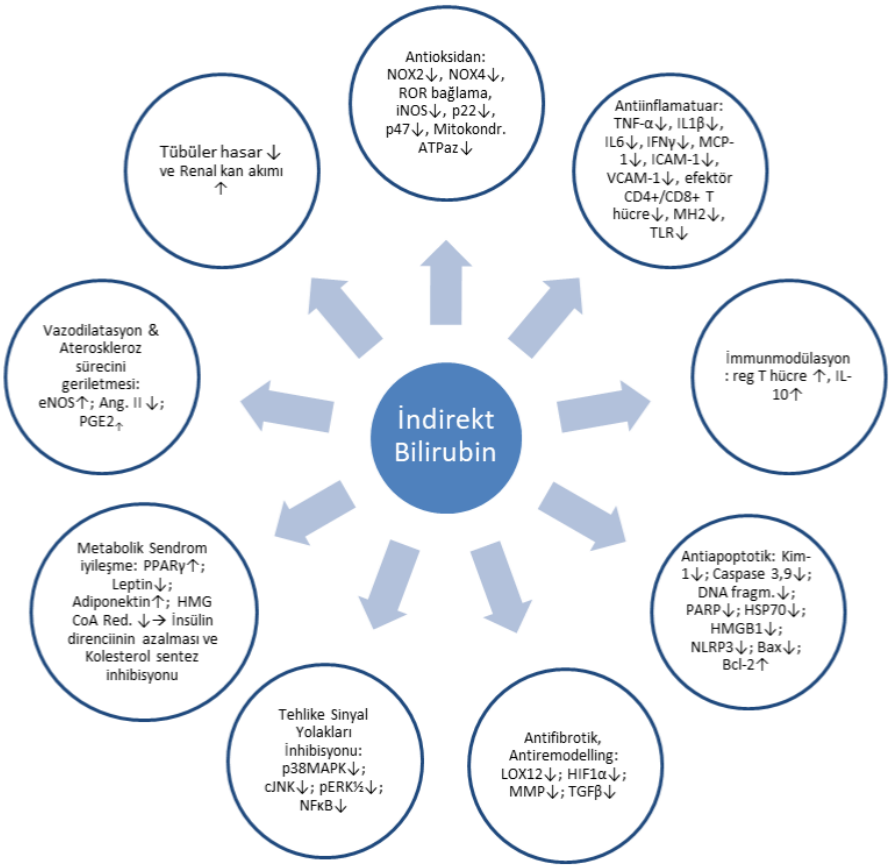
verse de (67); Gilbert sendromunda olduğu gibi kanda dönemsel yükselen ya da fizyolojik sınırlarda dolaşım sisteminde yüksek seyreden indirekt bilirubinin, klinik çalışmalarda hastalarda koroner arter hastalığını ve aterosklerotik patolojiyi gerilettiği (68,69); tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarında daha iyi glisemik kontrol sağladığı, HbA1C ve mikroalbuminüriyi gerilettiği, böbrek fonksiyonlarını iyileştirdiği (yüksek GFR, düşük kreatinin seviyesi) (70–72); metabolik sendromlu hastalarda vücut kitle indeksini düşürdüğü ve lipit parametrelerinde (↓TG, ↓LDL, ↓oxLDL, ↑HDL/LDL) olumlu yönde düzeltme sağladığı gözlemlenmiştir (73,74).

Klinik çalışmaların yanında indirekt (unkonjuge) bilirubinin antiinflamatuar, antioksidan, antifibrotik, antiapoptotik etkinliği; kardiyovasküler, renal sistem patolojiler üzerine düzeltici etkisi ve bu etkilerinin başlıca hangi hücresel mekanizmalara dayandığı invivo ve invitro deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmaların içeriklerine bakacak olursak; İndirekt bilirubin antioksidan özelliğini yapısında bulunan C atomlarına bağlı H^+ iyonları ile serbest oksijen radikallerini (O_2^-, OH^-, $OHOO^-$) kendine bağlayarak toksik etkilerini baskılamanın yanında (66) ROR üretimini sağlayan NOX2, NOX4, p22 phox, p47 pox, mitokonriyal ATPaz, iNOS gibi enzim ve enzim alt yapı proteinlerini inhibe ederek göstermektedir (8,66,75). Antiinflamatuar ve immunmodülatör etkinliklerini ise indirekt bilirubin TNFα, IL-1β, IL-6, IFNγ, MCP-1 gibi sitokin ve kemokin sentezini inhibe ederek (66,76); CD11, TLR'leri, MH2 gibi hücre yüzeyinde bulunan antijen sunumu ve inflamasyonda yer alan reseptörleri baskılayarak (8,77); efektör CD4+/CD8+ T hücreleri gibi hücresel ve humoral immun sistem hücrelerinin aktivitelerini azaltarak (77); iltihabi hücre göçünü sağlayan ICAM-1 ve VCAM-1 adezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe ederek (78); immunmodülsyonda yer alan CD10 antijenini ve regülatuar T hücrelerini aktive ederek (77) oluşturmaktadır. Bunların yanında indirekt bilirubin apoptotik süreçte yer alan ve aktive eden Kim-1, caspase 3, caspase 9, Bax, HSP70, NLRP3, poli ADP riboz fosfat (PARP), HMGB1 proteinlerini baskılayıp; apoptozun intrinsik yolağını baskılayan Bcl-2 'yi aktive ederek hücre apoptozunu baskılamakta ve DNA fragmantasyonunu önlemektedir (75,76,79,80). Lizil oksidaz like 12 (LOX12), HIF1α, TGFβ, MMP gibi fibrozis ve remodelling oluşum süreçlerinde yer alan enzim ve proteinleri inaktive ederek indirekt bilirubin antifibrotik etki oluşturmakta ve dokunun yeniden şekillenmesini önlemektedir

(77,80,81). Unkonjuge bilirubinin oluşturduğu diğer bir etki ise hücre içi tehlike sinyal yolakları üzerinedir. Bu yolaklardan özellikle p38 MAPK, pERK ½, cJNK, NFκB sinyal yolaklarını indirekt bilirubin inhibe ederek sitokin, kemokin , mitojenik faktör gen ekspresyonunu; dolayısıyla inflamatuar hücre göçü ve hücre apoptoz aktvasyonunu, vasküler düz kas hücre proliferasyonunu baskılamaktadır (81–83). Ayriyeten tüm bu mekanizmaların yanında indirekt bilirubin adipöz dokudan leptin salınımını inhibe ederek ve PPARγ, adiponektin salınımı arttırarak insülin direncini kırmakta (84); vasküler alanda eNOS, PGE2 salınımını aktive edip, anjiyotensin II'nin vazokonstriktör etkisini bloke ederek vazodilatasyonu stimüle etmekte (85,86) ve HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe ederek kolesterol sentezini azaltmaktadır (87).

İndirekt bilirubin, yapılan invivo – invitro çalışmalarda, yukarıda bahsedilen mekanizmalar üzerinden aterosklerotik süreci baskılamakta, miyokardiyal iskemi-infarkt patolojisinde infarkt zonunu daraltıp apoptottik-nekrotik hücre oranlarını azalmakta (88); diyabet ve adipozitas zemininde gelişen insülin direncini geriletmekte; diyabet (82), piyelonefrit (9), iskemi-reperfüzyon hasarı (89) sonucu oluşan renal vasküler, tübüler, parankim hasarını ve remodelling sürecini geriletmektedir.

Kontrast ilişkili nefropati ile bilirubin molekülleri arasında doğrudan ilişkiyi gösteren herhangi bir invivo-invitro deneysel çalışma olmasa da, literatürü taradığımızda CIN ile indirekt bilirubin seviyesi arasında ters oranda ilişki olduğunu ve indirekt bilirubinin diyabetik nefropati, iskemi-reperfüzyon hasarı sonucu oluşan nefropati üzerine patolojiyi geriletici yönde etkisi olduğu gibi, kontrast ilişkili nefropati üzerine de patolojiyi düzeltici etkisinin olabileceğini gösteren klinik çalışmalar mevcuttur (10,11).



Şekil 7. İndirekt Bilirubin'in Antioksidan, Antiinflamatuar, Antiapoptotik ve Terapötik Etkinlikleri

.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1 ÇALIŞMA TÜRÜ ve ETİK KURUL İZNİ

Tıpta uzmanlık sürecinde yürütülen bu çalışma "İnvivo Deneysel Hayvan Çalışması"dır. Deneysel hayvan çalışması için etik kurul izni 'Karabük Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' tarafından 2022/2/1 nolu karar ile 16.02.2022 tarihinde verilmiştir (Ek-1).

3.2 HAYVAN ÇALIŞMASININ YÜRÜTÜLDÜĞÜ YER

İnvivo denyesel hayvan çalışması, 07.03.2022-24.03.2022 tarihleri arasında "Karabük Üniversitesi, Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi" nde yukarıda bahsedilen, hayvan deneyleri yerel etik kurul onayıyla uygulanmıştır.

3.3 ÇALIŞMA DİZAYNI

3.3.1 Deney Hayvanı Türü, Temini ve Bakımı

Deneysel çalışmada kullanılan deney hayvanı türü 8-10 haftalık yaşlarda Wistar Albino cinsi erkek sıçanlardır (36). Sıçanların temini Karabük Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma merkezinden sağlanmış olup; deneysel çalışma süresince barındırılması yine bu merkezde gerçekleştirilmiştir. Deney süresince sıçanlar, otomatik sistem tarafından 12 saat ışıklı, 12 saat karanlık ortam sağlanan odalarda, üstünde hava geçişine izin veren ızgara metal kapağa sahip standart kafeslerde barındırılmıştır. Hayvanların beslenme ve su ihtiyaçları kafes üstüne yerleştirilebilen suluk sistemi ve standart yem (%55 karbonhidrat; %24 protein; %16 yağ; %5 lif, vitamin ve mineraller) ile sağlanmıştır. Kafes temizliği; kafes sistemindeki talaş, su ve yem yenilenmesi gibi rutin bakımlar deney hayvanları merkezindeki görevliler tarafından üç günde bir olacak şekilde yapılmıştır.

3.3.2 Etik Açıdan Esas Alınan Bildirgeler

Deney hayvanlarının bakımı; barınması; beslenmesi; stres faktörlerine (açlık, susuzluk, ağrı) asgari düzeyde maruziyet hususunda gösterilen hassasiyet; deney sonunda organ, doku alımı ve dokuların biyokimyasal, histopatolojik ve/veya moleküler analizi için yapılacak olan ötenazi işleminin uygulanma şekli gibi etik konular; '*European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (ETS 123)* ve 15 Ekim 1978 tarihinde

ilan edilen *'Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi'* etik bildirgelerine uygun olarak icra edilmiştir.

3.3.3 Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Kontrast ilişkili nefropati deneysel çalışması için toplamda 3 grup oluşturulmuştur. Bu gruplardan ikisinde CIN patolojisi modellenmiş olup, birine tedavi grubu olarak indirekt bilirubin i.p. enjekte edilmiş olup; diğerine ise kontrol grubu olarak DMSO çözücüsü i.p. enjekte edilmiştir. Üçüncü grup ise sham grubu olarak seçilmiştir ve bu grupta ne CIN patolojisi oluşturulmuş ne de bu gruba indirekt bilirubin enjekte edilmiştir. Sadece bu sham grubunda diğer gruplarla benzer stresör faktörlere sahip olması için DMSO çözücüsü enjekte edilmiştir. Grup başına örneklem sayısı, G power analiz yöntemi kullanılarak asgari 8 olarak belirlenmiştir ve toplamda 24 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan deneysel çalışmada kullanılmıştır. Sıçanlar aynı soydan olduğu için ve benzer genotipik yapılara sahip olduklarından gruplara rastgele olarak dağıtılmıştır.

Tablo 3. Kontrast ilişkili Nefropati Çalışması Deney Grupları

	Tedavi Grubu: İndirekt Bilirubin + CIN	**Kontrol Grubu:** CIN	**Sham Grubu:**
Wistar Albino cinsi Sıçanlar	n=8	n=8	n=8

3.3.4 Deney Protokolü

Deney grupları oluşturulduktan sonra CIN oluşturulacak tedavi ve kontrol grubundaki sıçanlar, CIN protokolü gereği i.v. kontrast (iyoheksol) enjeksiyonundan 24 saat önce başlayacak şekilde susuz bırakıldılar. 24 saatlik su kısıtlamasından sonra her iki gruptaki sıçanlara nefropati indüksiyonu ve CIN oluştırmak için ilk olarak i.p. yoldan L-NAME (Cayman® CAS No: 51298-62-5) %0,9 NaCL içinde çözülerek 10 mg/kg dozunda ve indometazin (Cayman® CAS No: 53-86-1) saf DMSO'da çözülerek 10 mg/kg dozunda enjekte edildi. 15 dk. sonra sıçanlar deneysel sabitleme aracında (şekil 8) sabitlenmek suretiyle kuyruk toplardamarından 3 g/kg dozunda iyoheksol (Bemexol® 350 mg/ml) dolaşım sistemine enjekte edildi. Kimyasal ve kontrast madde enjeksiyon işlemleri bittikten sonra, sıçanlara uygulanan

su kısıtlaması kaldırıldı ve sıçanlar serbest su alımına bırakıldı (90). CIN protokolü uygulandıktan sonraki 12. Saat ve 24. Saatlerde tedavi grubuna 30 mg/kg dozunda saf DMSO'da çözülerek ışıklı ortamdan korunmak suretiyle indirekt bilirubin (Cayman® CAS No: 635-65-4) i.p. yoldan enjekte edildi (78). Kontrol grubundaki sıçanlara ise CIN protokolü uygulandıktan sonraki aynı periyotlarda (12. ve 24. Saatte) sadece saf DMSO i.p. yoldan verildi. 24. Saatten sonra tedavi ve kontrol grubundaki sıçanlar su alımını ve idrar çıkışını ölçmek, idrar analizi için numune toplamak amacıyla metabolik kafeslere (şekil 8) yerleştirildi. Sıçanlar metabolik kafeslerde 24 saat bekletildikten sonra 24 saatte aldıkları su; çıkardıkları idrar miktarları hesaplanıp kaydedildi ve idrar numuneleri alınarak sonraki biyokimyasal analiz için -80°C'ye kaldırıldı. Sıçanlar metabolik kafeslerden çıkarıldıktan sonra (CIN protokolünden sonraki 48. Saat) ötenazi protokolüne tabi tutuldu. Sham grubundaki sıçanlara ise CIN protokolü uygulanmadı ve indirekt bilirubin enjekte edilmedi. Sham grubundaki sıçanlar, tedavi ve kontrol grubundaki sıçanlar gibi ayni stres faktörlerine maruz kalması için aynı şekilde 24 saat susuz bırakılıp kuyruk veninden ve i.p. yoldan boş salin enjekte edildi. Sonrasında da 12 ve 24'üncü saatlerde boş saf DMSO çözücüsü i.p. yoldan enjekte edildi. 24. Saatte metabolik kafeslere alınarak 24 saat bekletildikten sonra su alımı, idrar çıkımı kaydedildi; idrar örnekleri toplanıldı ve kafeslerden çıkarılıp 48. Saatte sham grubuna ötenazi protokolü uygulandı.

Tablo 4. Deney Protokolü

	Tedavi grubu	**Kontrol grubu**	**Sham grubu**
24 saat önce	Su kısıtlaması	Su kısıtlaması	Su kısıtlaması
0. saat	CIN protokolü L-NAME 10 mg/kg & Indometazin 10 mg/kg i.p.;15 dk. sonra Iohexol 3 g/kg i.v	CIN protokolü L-NAME 10 mg/kg & Indometazin 10 mg/kg i.p.; 15 dk. sonra Iohexol 3 g/kg i.v	Saline %0,9 NaCl
12 ve 24. Saatlerde	30 mg/kg İ. Bilirubin (saf DMSO'da)	saf DMSO (%99,9)	saf DMSO (%99,9)
24-48 saat arası	Metabolik Kafes	Metabolik Kafes	Metabolik Kafes
48. saat	Ötenazi	Ötenazi	Ötenazi



Şekil 8. Metabolik Kutu ve Deneysel Sabitleme Aracı

3.3.5 Ötenazi Protokolü

Tedavi; kontrol ve sham grubundaki sıçanlara metabolik kafes işlemi bittikten sonra i.p. yoldan yüksek doz ketamin (90 mg/kg) ve xylazin (10 mg/kg) enjekte edilip bilinç ve solunum depresyonu sağlandıktan sonra, gruplardaki her bir sıçan ayrı ayrı disseke edildi. Akabinde sıçanların kalbinin sol karıncığından enjektör yardımı ile terminal kan alımı yapılarak ötenazi işlemi tamamlandı. Sonrasında böbrek dokuları alındı. Her bir sıçanın sol böbreği; böbrek dokusunun kapsülü soyularak ve sagittal düzlemde böbrek kalikslerine kadar ikiye bölünüp her iki lateral düzlemine kesikler atılarak içinde %10 formalin solüsyonu olan steril numune kaplarına histopatolojik analiz için ayrı ayrı üzeri kodlanarak konuldu. Sıçanların sağ böbrekleri ise bisturi yardımı ile küçük parçalara ayrılıp, kapakları kodlanan 1,5 ml'lik eppendorf tüplere her bir sıçanın böbreği bir adet eppendorf tüpe denk gelecek şekilde yerleştirildi ve sonrasında kuru buz (sıkıştırılmış CO_2 gazı) yardımıyla moleküler analiz için -80°C'ye transfer edildi. Alınan terminal kanlar ise 5000 rpm'de santrifüj cihazında santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Alınan serum örnekleri biyokimyasal analiz için yine kuru buz dolu transfer kabı yardımı ile -80°C'ye transfer edildi.

3.4 ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.4.1 Biyokimyasal Analiz

Her üç gruptan (tedavi, kontrol, sham) metabolik kafes yardımı ile toplanılan idrar örneklerinden ve ötenazi işlemi sırasında alınan terminal kandan Nüve marka santrifüj cihazında 5000 rpm'de 5 dk. santrifüj ile elde edilen serum örneklerinden İlmed İlaç Medikal A.Ş.'ye ait Hitachi marka 'cobas c 311' kodlu tam otomatik biyokimya analiz cihazında, Roche® firmasının kitleri kullanılarak serumda üre, kreatinin; idrar örneklerinde üre, kreatinin, total protein ve albümin analizleri yapıldı. Kreatinin ölçümü, serumda ve idrar örneklerinde alkalin pikrat kinetik (Jaffe) metoduyla (91,92) CREJ2 (cobas®, Roche®) kiti kullanılarak yapıldı. Üre ise üreaz enzimi aracılığıyla enzimatik yöntemle (93), UREAL (cobas®, Roche®) kiti kullanılarak serum ve idrar örneklerinde ölçüldü. İdrar örneklerinde total protein ölçümü Biüret reaksiyonu (94) ile TP2 (cobas®, Roche®) kiti kullanılarak; albümin ölçümü de bromkrezol yeşili aracılığıyla (95), ALB2 (cobas®, Roche®) kiti kullanılarak yapıldı.

3.4.2 Histopatolojik Analiz

Histopatolojik analiz için kesit alma; kesitlerin hazırlanması ve boyanması; mikroskop altında kesitlerin analizi ve veri haline getirilmesi Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı'nda öğretim üyesi Prof. Dr. Sevil Atalay Vural ve veteriner hekim Kamil Alpler tarafından yapılmıştır.

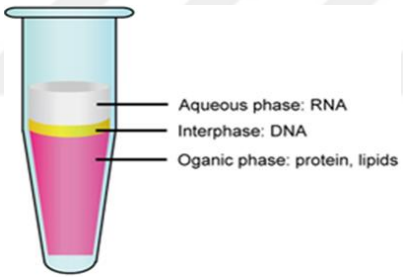
Ötenazi sırasında alınan sol böbrek, ötenazi protokolünde belirtildiği gibi alınıp hazırlandıktan sonra, %10'luk formalin solüsyonuna (pH=7,2-7,4) konulup 24 saat bekletildi. Formalin solüsyonuyla tespit edilen böbrek dokuları kasetlenip; sonrasında rutin doku takip cihazına (Leica TP1020) alınarak parafinde bloklandı (Thermo Scientific HistoStar A81010100). Mikrotom (Leica RM2255) cihazı ile bloklanan her bir dokudan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Sonrasında hazırlanan kesitler otomatik doku boyama cihazında (Leica ST5020) deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemlerinden sonra Harris'in Hematoksilen-Eozin (HE) yöntemiyle boyandı (96). Boyama işlemi bittikten sonra otomatik kapama cihazında (Leica CV5030) lamlarda bulunan kesitler lamel ile kapatıldı. H&E boyama neticesinde gerekli görülen örneklere önceden hazırlanmış bloklardan kesitler alınarak

Masson'un Üçlü (97), Periodik Asit Schiff (98), Kongo Kırmızısı (99) boyamaları yapıldı. Tüm boyamalar ışık mikroskobu altında (Leica DM4000) değerlendirilerek, gerekli görülenler ise fotoğraflandı (Leica DF-280).

3.4.3 Moleküler Analiz

Moleküler analiz kapsamında olan mRNA izolasyonu, cDNA eldesi, TNFα; IL-6; IL-1β; sitokrom C gen lokasyonlarına özgü tasarlanan primerler vasıtasıyla yapılan gen ekspresyonu işlemleri, sonuçların eldesi ve istatiksel yönden verilerinin analiz işlemleri DİAGEN® firmasında Dr. Samet Ece ve moleküler biyolog Berat Hamdi Şahin destekleri ile gerçekleştirildi.

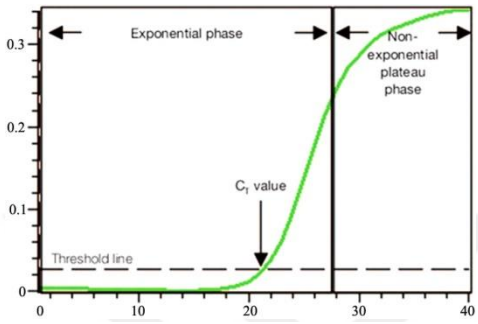
Böbrek dokularından RNA ekstraksiyonu bistüri vasıtasıyla küçük parça alınıp eppendorf tüplere alınıp üzerine faz ayırımı için Hızol reaktifi ve dokuyu parçalayıcı boncuk yapıları eklenip doku homojenizatör cihazına (FP120 FASTPREP, Thermo, USA) alınarak süspansiyon haline getirildi. Sonrasında santrifüjlenerek elden edilen fazın RNA bulunan üst kısmı otomatik pipetle alındı.



Şekil 9. Faz Ayrımı

Faz ayrımı işleminden elde edilen RNA numunelerindeki nükleik asit miktarlarının ng cinsinden miktarlarını belirlemek ve sonraki aşamalarda tutarsız veri eldelerinden kaçınmak amacıyla NanoDrop^{TM} cihazında ölçümler alındı. Elde edilen ve belirli ng değerinde standardize edilen RNA örneklerindeki mRNA zincirlerini uzatarak kararlı hale getirmek ve bu mRNA dizilerinden karşı kopyası şeklinde cDNA elde etmek için Oligo (dT); Hexamer primerleri ve Reverse Transkripaz enzimleri ters transkripsiyon reaksiyonu için kullanıldı. Ters transkiripsiyon işlemi ABI Veriti 96 cihazında gerçekleştirildi. Oluşturulan cDNA üzerinden dolaylı olarak mRNA görece ekspresyon seviyelerini ölçmek amacıyla hedef gen bölgelerine (TNFα; IL-6; IL-1β; sitokrom C) özgü tasarlanan primerler ve eksprese olan çift

zincirli cDNA'ya bağlanabilip; floresan ışıma verebilen SensiFAST^{TM} SYBR Green I reaktifi kullanılarak gerçek zamanlı PCR (ABI 7500 FAST) cihazında analiz tamamlandı. Analiz sırasında 40 döngü üzerinden elde edilen ekspresyon-döngü eğrisinde, ekspresyon seviyesinin floresan değerinin eşik değerini geçtiği döngü sayısı ekspresyon düzeyi verisi (Ct) olarak kullanıldı. Analiz neticesinde elde edilen veriler $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Livak) metodu kullanılarak işlenmiştir (100).



Şekil 10. Ekspresyon-Döngü Eğrisi

Tablo 5. Livak Metodu $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$

Gen Ekspresyon metodu (2^-ΔΔCt Livak metod)		
Grup	**Hedef Gen**	**Referans Gen**
Hasta örnek	A	A*
Control örnek	B	B*
2^-[(ΔCt(A)- ΔCt(A*))-(ΔCt(B)- ΔCt(B*))]		
"*" Gen ekspresyon çalışmasında standardizasyon için kullanılan referans gen sonucu		

Tablo 6. Gen Ekspresyon Primer Kodonları

Tip	Oligo Adı	5'- Diziler -3'
DNA	IL6_rno_F	GAGACAAGCAACGACAA
DNA	IL6_rno_R	ACACAGGACAGGTATAGAT
DNA	IL1Beta_rno_F	GCAATGGCAATTCTGATT
DNA	IL1Beta_rno_R	TTGTTTGAAGATATGAACTAGG
DNA	TNF_rno_F	ACAAGGAGGAGAAGTTC
DNA	TNF_rno_R	TTGAGAAGATGATCTGAGT
DNA	CYCS_hsa_F	AAGAACAAAGGCATCATC
DNA	CYCS_hsa_R	TGTAATAAATAAGGCAGTGG

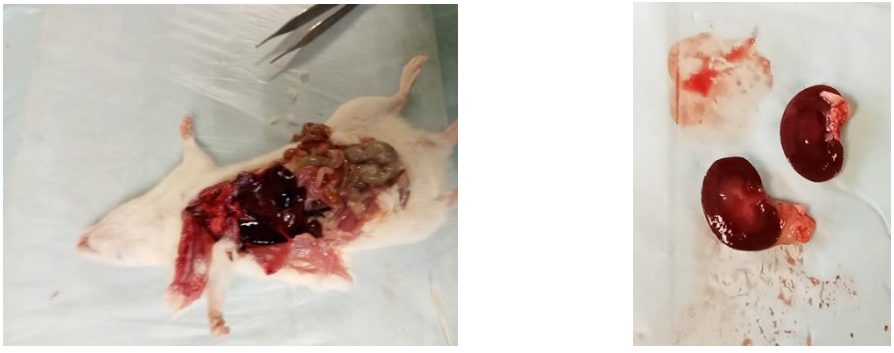
3.4.4 İstatistiksel Analiz

Normalite testi için gruplardaki denek sayısı 30'un altında olduğu için Shapiro-Wilk testi; parametrik veriler için grup analizinde tek yönlü ANOVA, post-hoc analizde LSD; non-parametrik veriler için grup analizinde Kruskal-Wallis, post-hoc analizde Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U istatiksel analiz yöntemleri kullanıldı. Bonferroni düzeltmesi için p=0,05 eşik değeri grup sayısına (3) bölündü ve p=0,017 eşik değer olarak kabul edildi. Kategorik verilerin analizi Ki-Kare yöntemi ile; 5'ten küçük değerlerin olduğu hücre sayısı toplam hücrelerin %20' sinden fazlasını oluşturduğu çapraz tablo kategorik verilerde ise istatistiksel analiz Fisher's Exact yöntemi ile yapıldı. İstatistiksel analiz verileri SPSS istatistik programı kullanılarak elde edildi. Grafikler ise Graph Pad Prism 1,0 bilgisayar programı aracılığıyla hazırlandı.

4. BULGULAR

4.1 NEKROPSİ BULGULARI

Kontrast ilişkili nefropati modellenen tedavi ve kontrol gruplarında nefropati indükisyonu amacıyla i.p. olarak enjekte edilen L-NAME ve indometazin sonrasında kontrol (kontrast nefropati grubu) ve tedavi (kontrast nefropati + indirekt bilirubin grubu) gruplarında her gruptan bir adet sıçanda ani ölüm gelişti. L-NAME ve indometazin i.p enjeksiyonundan 15 dk. sonra i.v. yoldan 3 g/kg dozunda verilen iyoheksol sonrası yine kontrol ve tedavi grubunun her ikisinden birer sıçanda ani ölüm tablosu izlendi. Ani ölüm gelişen dört sıçana nekropsi uygulaması yapıldı. Kontrol grubundaki iyoheksol verilmeden önce, L-NAME ve indometazin uygulamasından hemen sonra exitus olan sıçanda yapılan nekropsi sonucu trakea dokusunda ve lingual bölgede yoğun ödem olduğu tespit edildi ve mortalitenin anaflaktoid reaksiyon sonucu gelişmiş olabileceği kanısına varıldı. Kontrol grubunun iyoheksol uygulamasının hemen akabinde mortalite gerçekleşen diğer sıçanda ve tedavi grubundaki (indirekt bilirubin) mortalite oluşan her iki sıçanda (biri L-NAME ve indometazin sonrası; diğeri iyoheksol sonrası) nekropsi uygulaması sonrası özellikle karaciğer, akciğer ve böbrek dokularında yaygın nekrotik değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Mevcut bu nekrotik değişikliklerin, NO sentaz inhibitörü olan ve şiddetli vazokonstriksiyona sebebiyet verebilen; aynı zamanda karaciğer üzerinden elimine olan L-NAME kimyasal maddesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Ancak Karabük Üniversitesi deney hayvanları uygulama ve araştırma biriminde patoloji birimi ve frozen section analiz imkanı olmadığından, ani ölüm gerçekleşen sıçanların nekroza giden veya makroskopik yönden değişiklik gözlemlenen dokularına mikroskobik yönden nekropsi analizi yapılamadı.



Şekil 11 Nekrotik Doku Değişiklikleri

4.2 BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI

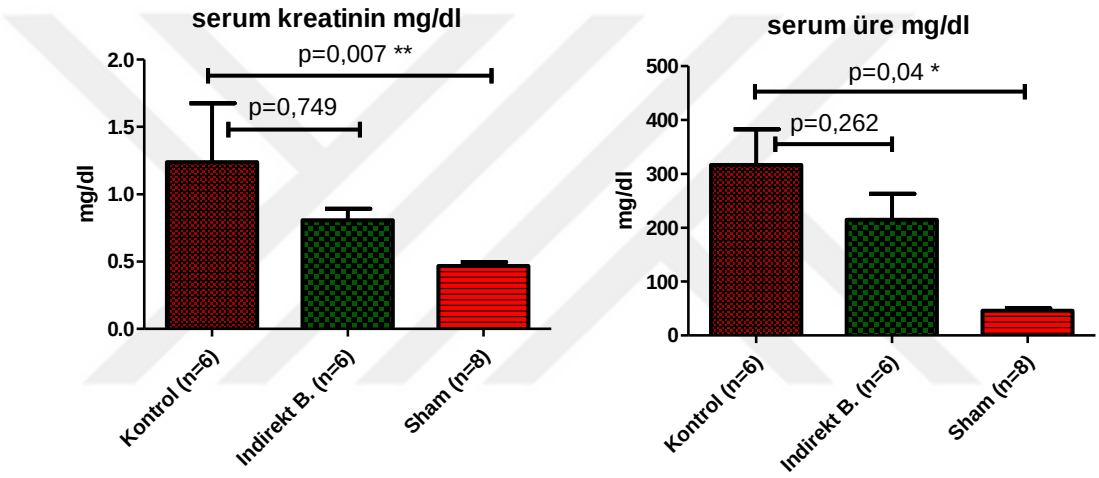
Gereç ve yöntemler bölümünde de belirtildiği gibi serumda üre, kreatinin; spot idrarda üre, kreatinin, total protein, albümin; 24 saatlik idrarda toplam kreatinin analizleri yapıldı. Beraberinde 24 saat süresince sıçanların aldığı sıvı, çıkardığı idrar miktarları ve idrar-serum kreatinin oranları ölçüldü. Kontrol kontrast nefropati grubundaki idrar numune kaybı nedeniyle bu gruptaki idrar üre, total protein, albumin ölçümündeki n sayısı 2; kreatinin, idrar-serum kreatinin oranı, 24 saatlik toplam kreatinin düzeyi ölçümündeki n sayısı ise 3; analiz öncesi aldığı sıvı ve çıkardığı idrar ölçümleri alınabildiğinden n sayıları her iki analiz için 6'dır. Aldığı sıvı, çıkardığı idrar ölçümleri, spot ve 24 saatlik idrar analizlerinde tedavi grubu (i. bilirubin) için n sayısı 6; sham grubu için n sayısı ise 8'dir. Serum analizlerinde numune kaybı yaşanmadığından n sayısı kontrol grubu için 6; tedavi grubu (i. bilirubin) için 6 ve sham grubu için 8'dir. 10 farklı parametrede parametrik/non-parametrik dağılımı ve analiz yöntemlerini belirlemek için ilk olarak SPSS programı üzerinden normalite testi yapıldı.

Tablo 7. Biyokimya Verilerinin Normalite Testi

	Kolmogorov-Smirnova	**Shapiro-Wilk**
Serum Kreatinin	0,127	0,031
Serum Üre	0,002	0,003
İdrar Kreatinin	,200	0,664
İdrar Üre	0,039	0,332
Aldığı Sıvı Miktarı	0,147	0,337
İdrar Miktarı	0,068	0,035
İdrar Total Kreatinin	,200	0,41
İdrar Kreatinin/Serum Kreatinin	0,131	0,012
İdrar Protein	0,017	0,003
İdrar Albumin	-	-

Normalite testine göre $p \geq 0,05$ olan değerler parametrik; $p < 0,05$ olan değerler ise non-parametrik olarak dağılmaktadır. 3 gruptan oluşan deneysel çalışmada grup başına örneklem sayısı 30'un altında kaldığı için Shapiro-Wilk normalite testi

kullanıldı. Shapiro-Wilk metoduna göre serum kreatinin, serum üre, idrar kreatinin/serum kreatinin oranı, idrar protein düzeyleri ve idrar miktarı analizlerinin p değerleri 0,05'in altında kaldığı için bu değerler non-parametrik analiz grubuna alındı. İdrar kreatinin, idrar üre, idrar total kreatinin değerleri ve alınan sıvı miktarı düzey analizlerinin p değerleri ise ≥0,05 olduğu için, söz konusu değerler parametrik analiz grubuna dahil edildi. İdrar albümin seviyesi bütün deneklerde aynı düzeyde olduğu ve varyasyon içermediği için normalite testi analizinde herhangi bir analiz grubuna giremedi. Bu nedenden dolayı albumin verileri istatistiksel analizden çıkarıldı.

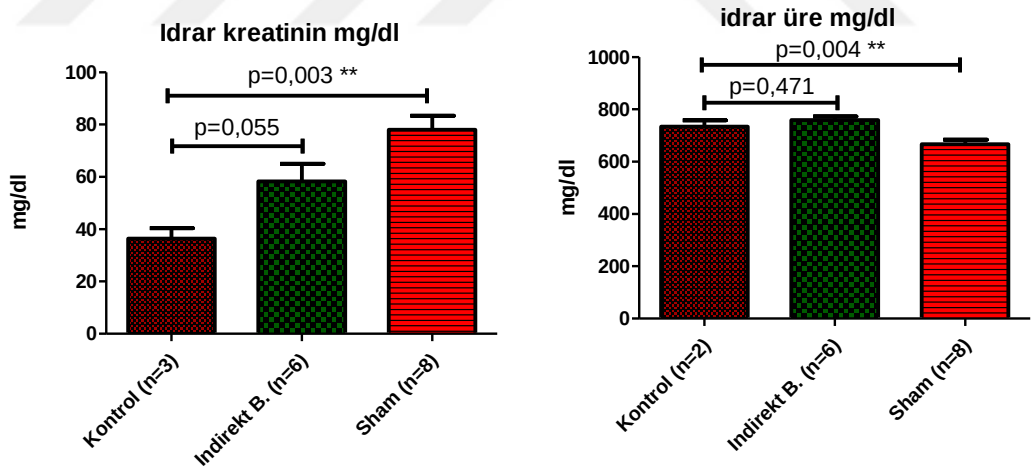


Şekil 12. Serum Kreatinin ve Üre Değerlerinin Kruskal-Wallis ile Non-Parametrik Grup Analizi ve Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U ile Non-Parametrik Post-Hoc Analizi

Serum kreatinin değerleri normalite testine göre non-parametrik olduğu ve üç gruptan oluştuğu için grup analizi Kruskal-Wallis ile yapıldı. Analiz sonucuna göre p=0,007 gelmesi ve 0,05'in altında olması nedeniyle gruplar arasındaki fark anlamlı kabul edildi. Grup analizinden sonra ikişerli grupların kıyaslandığı post-hoc analizi Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U ile yapıldı. Gereç ve yöntemler bölümünde de belirtildiği gibi istatiksel analizde eşik değer kabul edilen p=0,05 değeri grup sayısına; yani üçe bölünde ve 0,017 altında kalan değerler anlamlı kabul edildi. Bizim analizimizde gruplar ikişerli olarak ayrı ayrı kıyaslandığında tedavi grubu (i. bilirubin) ve kontrol kontrast nefropati grubu arasındaki fark istatistiksel yönden

p=0,749 gelmesi üzerine anlamsız kabul edildi. Kontrol grubu sham grubuna post-hoc analizle istatistiksel yönden kıyaslandığında p=0,012; tedavi grubu ile sham grubu kıyaslandığında ise p=0,005 sonucu geldi. Her iki p değeri 0,017'nin altında kaldığı için sham grubuna göre hem tedavi grubunda hem de kontrol grubunda serum kreatinin seviyesindeki yükseklik, istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Deneklerin serumundaki üre değerleri de non-parametrik dağıldığı için aynı grup analiz ve post-hoc analiz metotları kullanıldı. Üçlü grup analizinde, gruplar arasındaki fark p=0,04 gelmesi üzerine anlamlı kabul edildi. Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U ile yapılan post-hoc analizine göre kontrol ile tedavi (indirekt bilirubin) grupları arasında p değeri 0,262 gelmesi üzerine aralarındaki fark istatistiksel yönden anlamsız kabul edildi. Kontrol kontrast nefropati grubu sham grubu ile kıyaslandığında p=0,002 olması nedeniyle istatistiksel anlamlı farklılık izlendi; ancak indirekt bilirubin ve sham grubu arasındaki p değeri 0,028 gelmesi ve 0,017 değerinden büyük olması nedeniyle iki grup arasındaki fark istatistiksel yönden anlamsız bulundu.

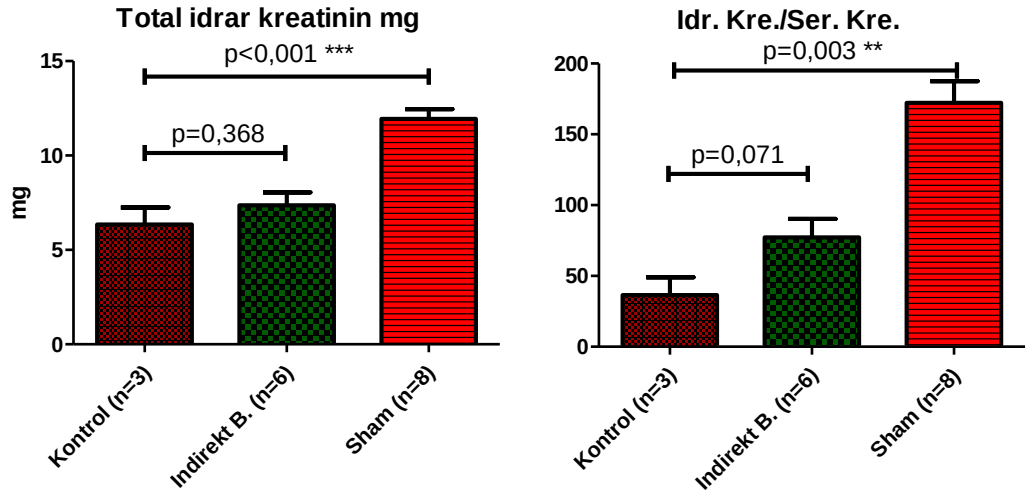


Şekil 13. İdrar Kreatinin ve Üre Değerlerinin Tek Yönlü ANOVA ile Parametrik Grup Analizi ve LSD ile Parametrik Post-Hoc Analizi

Tek yönlü ANOVA yöntemiyle parametrik grup analizi sonucu sıçanların idrar kreatinin değerlerinde; tedavi, kontrol ve sham grupları arasındaki farklılık, p değeri 0,003 gelmesi üzerine istatistiksel yönden anlamlı kabul edildi. İkili grupların ayrı ayrı kıyaslanması amacıyla post-hoc analiz yöntemi olarak gruplardaki örneklem

sayıları farklılık gösterdiği için LSD yöntemi tercih edildi. Bu yönteme göre kontrol grubu ile tedavi (indirekt bilirubin) grubu arasındaki farklılık p=0,055 gelmesi üzerine her ne kadar kontrol grubunda idrar kreatinin seviyesi düşük ve p değeri eşik değere yakın olsa da, farklılık istatistiksel açıdan anlamsız olarak kabul edildi. Kontrol grubu ve indirekt bilirubin grubundaki idrar kreatinin seviyeleri post-hoc LSD analiziyle ayrı ayrı sham grubu ile kıyaslandığında, p değerleri sırasıyla 0,001 ve 0,027 olarak bulunması üzerine sham grubuna göre, indirekt bilirubin ve kontrol gruplarındaki idrar kretainin seviyelerindeki düşüklük istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

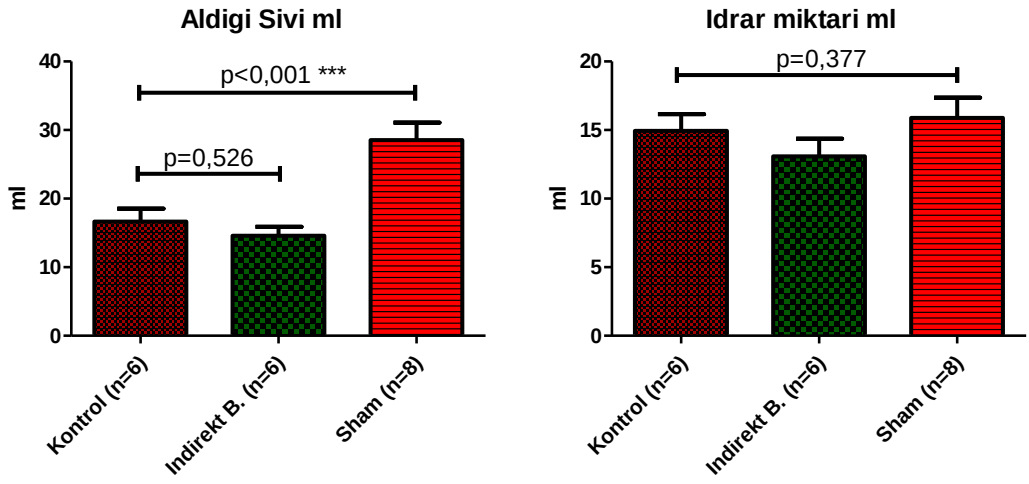
Gruplardaki idrar üre değerlerinin dağılımları parametrik seyretmesi üzerine, aynı şekilde grup analizi tek yönlü ANOVA ile ve post-hoc analizi ise LSD yöntemiyle yapıldı. Analiz sonucunda üç grup arasındaki p değeri 0,004 gelmesi üzerine, üç grup arasında istatistiksel anlamlı farklılığın olduğu bulundu. LSD ile post-hoc analizde ise kontrol ve indirekt bilirubin grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı (p=0,471). Kontrol ve sham grupları arasındaki farklılık da p değeri 0,063 gelmesi nedeniyle anlamlı kabul edilmedi; ancak indirekt bilirubin grubundaki idrar üre değerleri sham grubundakilere göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü (p=0,01).



Şekil 14. Total idrar kreatinin değerlerinin Tek Yönlü ANOVA ve LSD Post-Hoc Yöntemiyle Analizi; İdrar Kreatinin/Serum Kreatinin Oranının Kruskal-Wallis ve Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney Post-Hoc Yöntemiyle Analizi

3 Grupta da metabolik kutu yardımıyla toplanan 24 saatlik idrarda ölçülen total idrar kreatinin düzeylerinin tek yönlü ANOVA metoduyla grup analizi neticesinde üç grup arasında anlamlı düzeyde farklılığın olduğu tespit edildi ($p<0,001$). LSD post-hoc analiz yöntemi ile gruplar ikişerli kıyaslandığında kontrol ile indirekt bilirubin grupları arasında istatistiksel yönden anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,368$). Buna karşın kontrol ve indirekt bilirubin grupları sham grubu ile ayrı ayrı ikişerli olarak LSD post-hoc analiz yöntemi ile kıyaslanıp değerlendirildiğinde total kreatinin seviyeleri her iki grupta sham grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu bulundu ($p<0,001$).

İdrar kreatinin/serum kreatinin oranları ise 3 grupta normalite testi ile non-parametrik dağıldığından Kruskal-Wallis ile grup analizi yapıldı ve 3 grup arasındaki farklılık analiz sonucunda $p=0,003$ olarak gelmesi üzerine anlamlı olarak kabul edildi. İkişerli analiz yine non-parametrik yöntem olan Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U ile yapıldı. Post-hoc analiz neticesinde indirekt billirubin grubuna kıyasla kontrol grubundaki idrar kreatinin/serum kreatinin oranındaki düşüklük anlamlı bulunmadı ($p=0,071$). Her iki grubu sham grubuna kıyasladığımızda, post-hoc analizle kontrol grubundaki değerler sham grubuna göre anlamlı düşük olarak bulundu ($p=0,014$). Aynı şekilde tedavi grubu (indirekt bilirubin) ile sham grubu arasındaki istatistiksel farkın p değeri 0,007 gelmesi ve 0,017'den küçük olması sebebiyle indirekt bilirubin grubundaki değerler sham grubuna göre düşüklüğü istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.



Şekil 15. 24 Saatte Alınan Sıvı ve Çıkarılan İdrar Miktarlarının İstatistiksel Analizi

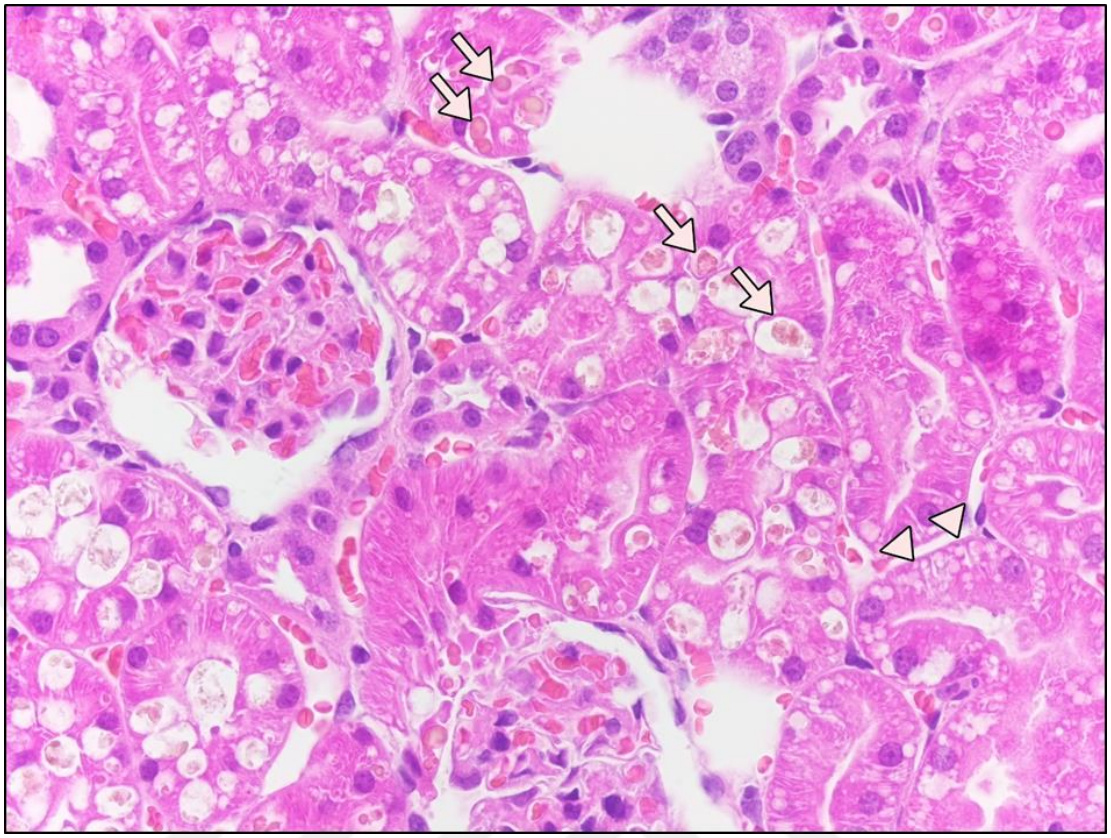
Metabolik kutu aracılığıyla 24 saatte aldığı toplam sıvı miktarı ölçüldü ve normalite analizi sonucu parametrik dağıldığı izlendi. Deneklerin aldıkları sıvı miktarlarının tek yönlü ANOVA analizi sonrası $p<0,001$ gelmesi üzerine gruplar arasındaki farklılık anlamlı olarak kabul edildi. LSD yöntemiyle post-hoc analiz sonrasında kontrol ve indirekt bilirubin grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,526$). Kontrol grubundaki deneklerin aldıkları sıvı miktarları sham grubuna göre post-hoc analizle anlamlı olarak daha düşük olduğu bulundu ($p=0,001$). İndirekt bilirubin (tedavi) grubunda da alınan sıvı miktarları sham grubuna kıyasla anlamlı daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0,001$).

24 saatte çıkardıkları idrar miktarlı 3 grup arasındaki farklılık Kruskal-Wallis analiz yöntemi ile $p=0,377$ gelmesi üzerine istatistiksel yönden anlamlı kabul edilmedi. Akabinde yapılan Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U post-hoc analizi ile kontrol ve indirekt bilirubin grupları arasında anlamlı fark gözlemlenmedi ($p=0,197$). Sham grubuyla kontrol ve indirekt bilirubin grupları ayrı ayrı kıyaslandığında çıkarılan idrar miktarları açısından farklılık analizlerinin p değerleri sırasıyla 0,794 ve 0,269 gelmesi üzerine ikişerli grup kıyaslaması yapılan non-parametrik post-hoc analizlerinde anlamlı fark izlenmedi.

4.3 HİSTOPATOLOJİ ANALİZ BULGULARI

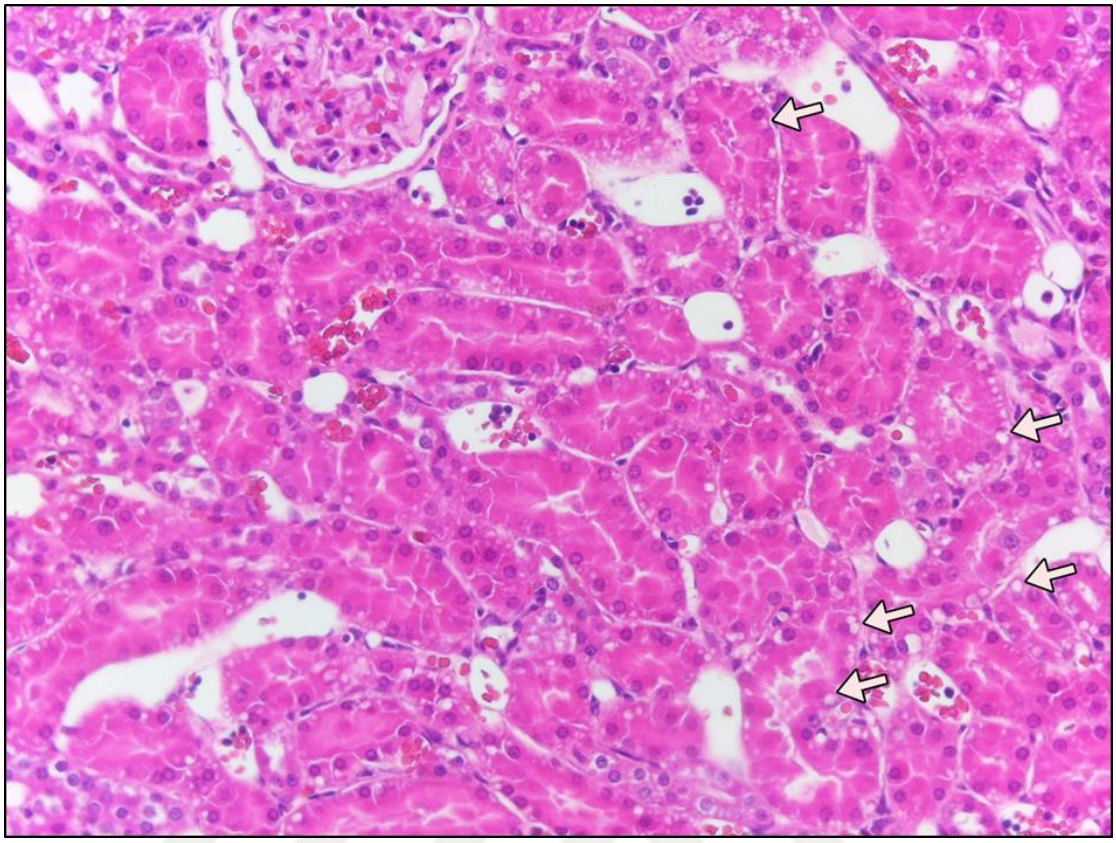
4.3.1 Böbrek Korteks ve Medullasında Görülen Değişiklikler

4.3.1.1 Kontrol kontrast nefropati grubu: Kontrol grubundaki tüm örneklerde kortekste değişen derecelerde dejeneratif değişiklikler görüldü (Tablo 7). Tubul hücrelerinin sitoplazmalarında kenarları düzensiz küçük vakuol yapıları (vakuoler dejenerasyon) ve/veya bu vakuollerin birleşerek hücre sitoplazmasını kaplayan vakuol (hidropik dejenerasyon) yapıları oluşturduğu dikkati çekti. Damar çevresi ve/veya glomerul çevrelerindeki dejeneratif tübüllerin hücre sitoplazmalarındaki vakuollerde sarı-turuncu renkte, granüler ve/veya homojen materyal birikimleri görüldü (Şekil 17). Ayrıca medulla tübül lümenlerinde pembe-homojen görünümde hiyalin silendirleri dikkati çekti (n=5) (Tablo 8). İnterstisyel alanlarda özellikle kortikomedüller bölgelerde, fokal alanlar halinde, çoğunluğunu lenfosit ve makrofajların oluşturduğu mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü (n=3) (Şekil 20; Tablo 7). Kongo kırmızısı boyamasında kollajende damar çevrelerinde ekstraselüler amiloid birikimleri göze çarptı (n=4) (Şekil 20; Tablo 8).



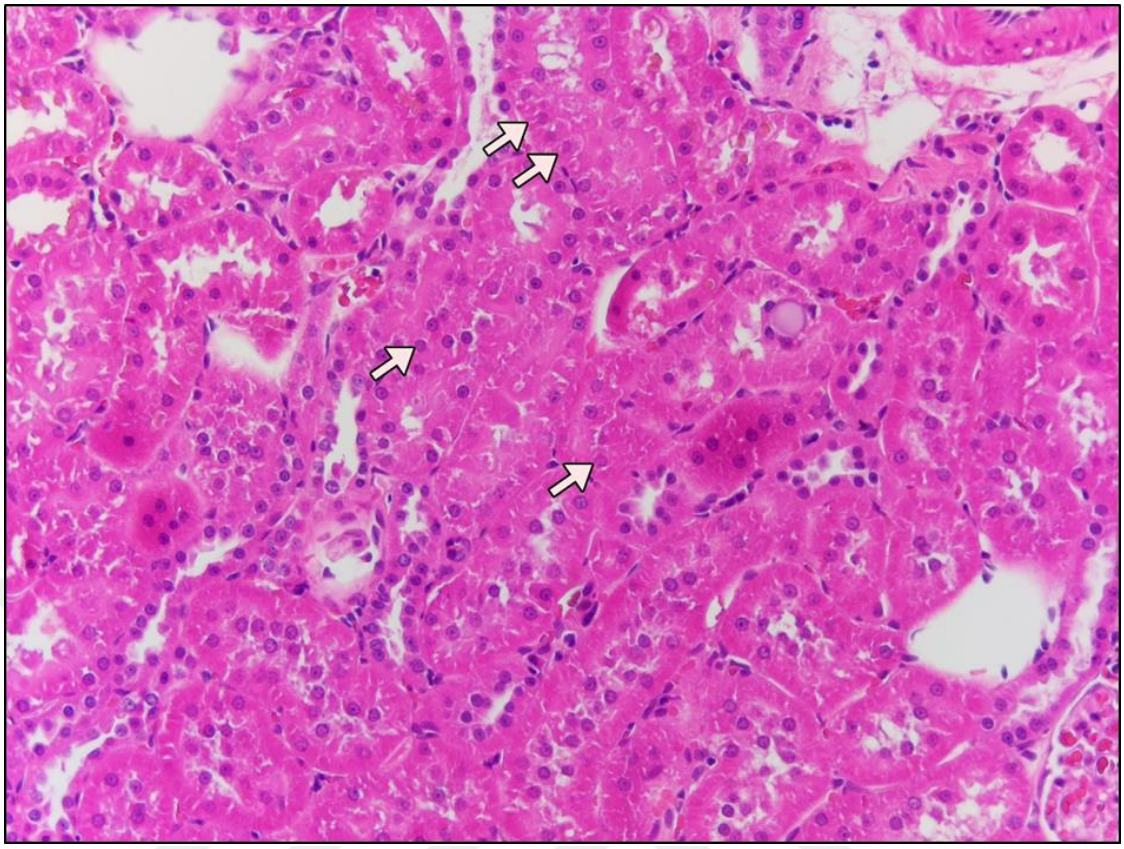
Şekil 16. Tübül epitellerinde hidropik dejenerasyon, vakuollerdeki granüler materyal birikimleri (oklar) ve vakuoler dejenerasyon (ok başları), Böbrek, 400x, HE.

4.3.1.2 Tedavi (İndirekt bilirubin) kontrast nefropati grubu: İndrekt bilirubin grubundaki böbrek örneklerinin tümündeki tubul hücrelerinde dejeneratif değişikler görüldü (Tablo 7). Tübül hücrelerinin sitoplazmalarında kenarları düzensiz küçük vakuol yapıları (vakuoler dejenerasyon) gözlendi (Şekil 18). Damar çevresi ve/veya glomerul çevrelerindeki dejeneratif tübüllerin hücre sitoplazmalarındaki vakuollerde sarı-turuncu renkte, granüler ve/veya homojen materyal birikimleri görüldü. Ayrıca madulla tübül lümenlerinde pembe-homojen görünümde hiyalin silendirleri dikkati çekti (n=6) (Tablo 8). İnterstisyel alanlarda özellikle kortikomedüller bölgelerde, fokal alanlar halinde, çoğunluğunu lenfosit ve makrofajların oluşturduğu mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü (n=5) (Şekil 20; Tablo 7). Kongo Kırmızısı boyasında özellikle damar çevrelerinde ekstraselüler amiloid birikimleri gözlendi (n=5) (Şekil 20; Tablo 8).



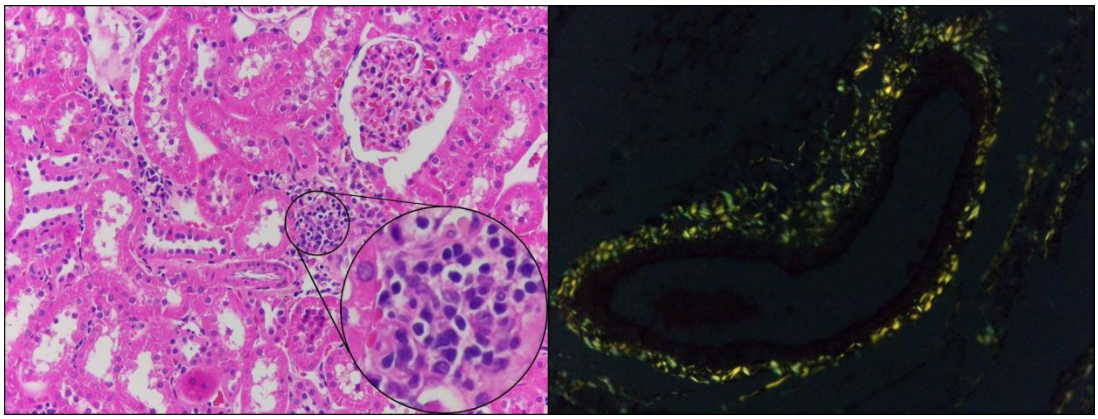
Şekil 167. Korteksteki tübül epitel sitoplazmalarında vakuolizasyon, Böbrek, 200x, H&E.

4.3.1.3 Sham Grubu: Sham grubunda tüm hayvanların böbreklerinde dejeneratif değişikliklere rastlandı (Tablo 7). Tübül hücrelerinin sitoplazmasının granüler görünüm aldığı, çekirdeklerinin de silik ve/veya hayali görüldüğü dikkati çekti (parankim dejenerasyonu) (Şekil 19). Az sayıda tübül hücrelerinin sitoplazmalarında da kenarları düzensiz vakuoller oluştuğu, bu vakuollerde de sarı-turuncu renkte granüler ve/veya homojen materyal birikimleri dikkati çekti (n=6). Ayrıca medulla tübül lümenlerinde pembe-homojen görünümde hiyalin silendirleri dikkati çekti (n=2) (Tablo 8). İnterstisyel alanlarda özellikle kortikomedüller bölgelerde, fokal alanlar halinde, çoğunluğunu lenfosit ve makrofajların oluşturduğu mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü (n=4) (Şekil 20; Tablo 7). Sham grubunda sadece iki örnekte Kongo kırmızısı boyasıyla damar çevrelerinde ekstraselüler amiloid birikimi izlendi (n=2) (Şekil 20; Tablo 8)



Şekil 18. Tübül epitel hücrelerinde parankim dejenerasyonu (oklar), Böbrek, 200x, HE.

4.3.2 Histopatoloji Bulgularına Ait Şekil ve Tablolar



Şekil 19. İnterstisyel alanda lenfosit ve makrofajların çoğunlukta olduğu mononükleer hücre infiltrasyonları (3x büyütülmüş alan), Böbrek, 200x, H&E (Solda). Damar çevrelerinde ekstraselüler amiloid birikimleri, Böbrek, 100x, Kongo Kırmızısı (Sağda).

Tablo 8. Kortekste Dejeneratif Değişiklikler

	Tübüller	İnterstisyel alan
Örnek No.	**Dejeneratif değişiklikler**	**Mononükleer hücre infiltrasyonu**
A1	+++	-
A2	+++	-
A3	+++	+
A4	++++	+
A5	++++	-
A6	+++	+
B1	++	-
B2	++	+
B3	++	+
B4	++	+
B5	++	+
B6	++	+
C1	+	+
C2	+	+
C3	+	-
C4	+	+
C5	+	+
C6	+	-
C7	+	-
C8	+	-

A: Kontrol grubu; B: İndirekt bilirubin grubu; C: Sham grubu. "- : yok, +: az şiddetli, ++: orta şiddetli, +++: şiddetli, ++++: çok şiddetli". Kortikal tübüllerde dejeneratif değişiklikler (Kontrol grubu, n=6; indirekt bilirubin grubu, n=6; sham grubu, n=8). İnterstisyel alanda mononükleer hücre infiltrasyonu (Kontrol grubu, n=3; indirekt bilirubin grubu, n=5; sham grubu, n=4)

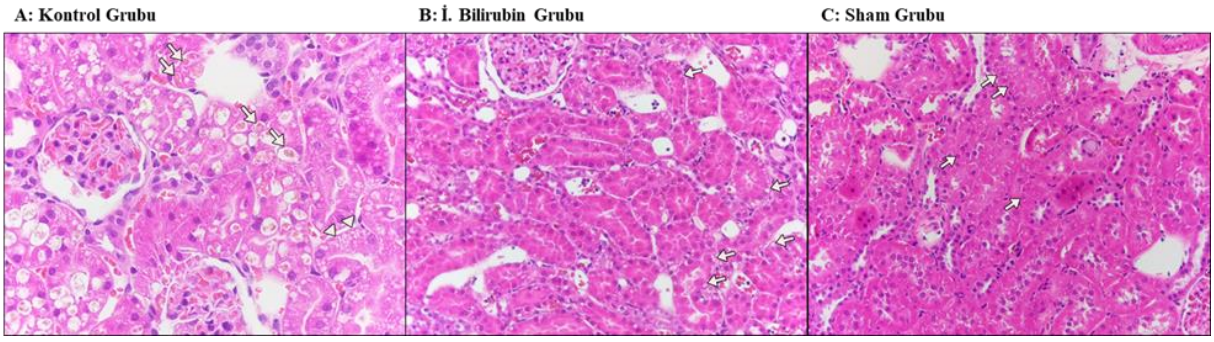
Tablo 9. Medullada Görülen Histopatolojik Değişiklikler

Örnek No.	**Damarlarda proteinöz madde birikimi**	**Tübüllerde hyalin silendiri**
A1	+	+
A2	+	+
A3	-	-

A4	+	+
A5	-	+
A6	+	+
B1	+	+
B2	+	+
B3	+	+
B4	+	+
B5	+	+
B6	-	+
C1	-	+
C2	-	-
C3	+	+
C4	-	-
C5	-	-
C6	-	-
C7	+	-
C8	-	-

A: Kontrol grubu; B: İndirekt bilirubin grubu; C: Sham grubu. Damarlarda proteinöz madde birikimi (Kontrol grubu, n=4; indirekt bilirubin grubu, n=5; sham grubu, n=2); Tübüllerde hyalin silendiri (Kontrol grubu, n=5; indirekt bilirubin grubu, n=6; sham grubu, n=2)

4.3.3 Histopatoloji Verilerine İlişkin İstatistiksel Analiz Tabloları



Şekil 20. Tübüler Dejeneratif Değişiklikler

Tablo 10. Deney Grupları ile Böbrek Tübüler Dejenerasyon Arasındaki İlişki

	Tübüler Dejenerasyon				**Total n**
	az	orta	şiddetli	çok şiddetli	
Kontrol Grubu n (%)	0 (%0)	0 (%0)	4 (%66,7)	2 (%33,3)	6
İndirekt Biluribin Grubu n (%)	0 (%0)	6 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	6
Sham Grubu n (%)	8 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	8
Total n (%)	8 (%40)	6 (%30)	4 (%20)	2 (%10)	20

Fisher's Exact testi: <0,001

Tübüllerdeki dejenerasyon değerleri sayısal veri olmayıp kategori veri olması nedeniyle deney grupları ile ilişkisini değerlendirmek üzere SPSS istatistik programı yardımıyla 3x4 kare sayısındaki tablodan Ki-Kare analizi ve Fisher's Exact testleri uygulandı. Toplam 20 denekten ve 3 gruptan oluşan çalışmada 6 adet denekten oluşan kontrol grubunun histopatolojik analizinde 4 (%66,7) denekte "şiddetli" derecede tübüler dejenerasyon, geri kalan 2 (%33,3) denekte ise "çok şiddetli" derecede tübüler dejenerasyon izlendi. İndirekt bilirubin (Tedavi) grubundaki 6 deneğin tamamındaki böbrek histopatolojisinde "orta" düzeyde tübüler dejenrasyon gözlemlendi. Kontrast nefropati modeli oluşturulmayan ve tedavi (i. bilirubin) verilmeyen sham grubundaki 8 adet deneğin böbrek histopatolojik analizinin hepsinde "az" derecede tübüler hasar izlendi. "az" derecede tübüler hasar tüm deneklerin %40 (8)'ında; "orta" düzeyde hasar %30 (6)'unda; "şiddetli" derecede tübüler hasar %20 (4)'sinde; "çok şiddetli" derecede böbrek tübül hasarı ise %10 (2)'unda izlendi. Deney grupları ile böbrekteki tübüler hasar arasındaki istatistiksel ilişkiyi değerlendirebilmek için yukarıda belirtilen analiz metotları sonucunda, tablonun 12 hücresinde 5'ten küçük değerler toplamda hücrelerin %20'sinden fazlasını oluşturduğu için Fisher Exact's test sonucu seçildi ve değer <0,001 bulundu. Bu analiz metoduna göre deney grupları ile tübüler hasar arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ancak hücre sayıları fazla olduğu için denekler ikişerli olarak seçilerek tekrardan ayrı ayrı çapraz tablo oluşturulup Ki-Kare ve Fisher's Exact analizleri yapıldı.

Tablo 11. Kontrast Nefropati Modellenen Gruplarla (Kontrol ve İndirekt Bilirubin) Böbrek Tübüler Dejenerasyon Arasındaki İlişki

	Tübüler Dejenerasyon			**Total n**
	orta	şiddetli	çok şiddetli	
Kontrol Grubu n (%)	0 (%0)	4 (%66,7)	2 (%33,3)	6
İ. bilirubin Grubu n (%)	6 (%100)	0	0	6
Total n (%)	6 (%50)	4 (%33,3)	2 (%16,7)	12

Fisher's Exact test: 0,002

Bu tabloda kontrast nefropati oluşturulmamış sham grubu ve sahip oldukları dejenerasyon dereceleri çıkarılarak 2x3 düzeninde 6 hücreden oluşan; kontrast nefropati modellenen deney grupları ile böbrek dokusundaki tübüler dejenerasyon ilişkisini ortaya koyan tablo oluşturuldu. Kontrol grubundaki deneklerin 4 (%66,7)' ünde "şiddetli" düzeyde tübüler hasar varken, 2 (%33,3)' sinde ise "çok şiddetli" derecede tübülür hasar izlendi. Kontrast nefropati oluşturulup; diğerinden farklı olarak indirekt bilirubin verilen tedavi grubunda ise böbrek histopatolojik analiz neticesinde 6 deneğin tamamında (%100) "orta" düzeyde tübüler hasar gözlemlendi. Kontrast nefropati oluşturulan deney grupları ile (kontrol ve indirekt bilirubin) tübüler hasar derecesini değerlendirmek üzere Ki-Kare ve Fisher's Exact analizleri uygulandı. Tablo hücrelerinin %20' sinden fazlasında 5'ten küçük değer mevcut olduğu için Fisher's Exact test sonucu kullanıldı. Test neticesinde değerin 0,002 gelmesi üzerine kontrast nefropati deney grupları ile tübüler hasar düzeyi arasındaki ilişki, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 12. Deney Grupları (Kontrol ve Sham) ile Böbrek Tübüler Dejenerasyon Arasındaki İlişki

	Tübüler Dejenerasyon			**Total n**
	az	şiddetli	çok şiddetli	
Kontrol Grubu n (%)	0 (%0)	4 (%66,7)	2 (%33,3)	6
Sham Grubu n (%)	8 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	8
Total n (%)	8 (%57,1)	4 (%28,6)	2 (%14,3)	14

Fisher's Exact test: <0,001

Kontrol ve sham grubunun beraber alınıp, böbrek tübüler dejenerasyon şiddeti arasındaki ilişkiyi değerlendirmek üzere 2*3 şeklinde 6 hücreden oluşan çapraz tablo oluşturuldu. Ki Kare ve Fisher' Exact analizleri yapıldı. Hücrelerin %20'sinden fazlasında 5'ten küçük değer olduğu için Fisher's Exact analizi seçildi. Sonuç değer <0,001 gelmesi nedeniyle sham ve kontrol grubundan oluşan deney grubu ile tübüler dejenerasyon şiddeti arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 13. Deney Grupları (İndirekt Bilirubin [Tedavi] ve Sham) ile Böbrek Tübüler Dejenerasyon Arasındaki İlişki

	Tübüler Dejenerasyon		**Total n**
	az	orta	
İ. Bilirubin Grubu n (%)	0 (%0)	6 (%100)	6
Sham Grubu n (%)	8 (%100)	0 (%0)	8
Total n (%)	8 (%57,1)	6 (%42,9)	14

Fisher's Exact testi: <0,001

Son olarak indirekt bilirubin grubu ile sham grubu beraber alınıp böbrek tübüler dejenerasyon şiddeti arasındaki ilişkiyi istatiksel açıdan değerlendirebilmek için 2x2 şeklinde 4 hücreden oluşan çapraz tablo hazırlandı. Analiz neticesinde hücrelerdeki 5'ten küçük değer yarısını oluşturması nedeni ile test yöntemi olarak yine Fisher's Exact metodu temel alındı. Analiz neticesinde değerin <0,001 gelmesi nedeniyle sham ve indirekt bilirubin gruplarından oluşan deney grubu ile tübüler dejenerasyon şiddeti arsında istatistiksel açıdan anlamlılık var olduğu kabul edildi.

Tablo 14. Deney Grupları ile Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu Arasındaki İlişli

	Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu		**Total n**
	yok	var	
Kontrol Grubu n (%)	3 (%50)	3 (%50)	6
İ. Bilirubin Grubu n (%)	1 (%16,7)	5 (%83,3)	6
Sham Grubu n (%)	4 (%50)	4 (%50)	8
Total n (%)	8 (%40)	12 (%60)	20

Fisher's Exact testi: p=0,519

Örneklem sayısı 6 olan kontrol grubundaki deneklerden 3 deneğin histopatolojik analizinde mononükeer hücre infiltrasyonu görülürken geri kalan 3 denekte infiltrasyon gözlemlenmedi. İndirekt bilirubin grubunda ise 5 denekte mononükleer hücre infiltrasyonu izlenirken 1 denekte gözlemlenmedi. Sham grubunda ise 8 denekten 4'ündeki histopatolojik analizde mononükleer hücre infiltrasyonu izlenirken, geri kalan 4 denekte infiltrasyon yoktu. Yapılan Fisher Exact testi neticesinde deney grupları ile mononükleer hücre infiltrasyonu arasındaki ilişki değerin 0,519 gelmesi üzerine istatistiksel açıdan anlamsız kabul edildi.

Tablo 15. Deney Grupları ile Damarlardaki Proteinöz Madde (Amiloidozis) Birikimi Arasındaki İlişki

	Damarlarda Proteinöz Madde Birikimi		**Total n**
	yok	var	
Kontrol Grubu n (%)	2 (%33,3)	4 (%66,7)	6
İ. Bilirubin Grubu n (%)	1 (%16,7)	5 (%83,3)	6
Sham Grubu n (%)	6 (%75)	2 (%25)	8
Total n (%)	9 (%45)	11 (%55)	20

Fisher's Exact testi: p=0,119

Histopatolojik analiz sırasında H & E boyaması sırasında madde birikimi açısında şüpheli örnekler Kongo kırmızısı boyası ile boyanarak özellikle böbrek medullasında damar duvarın ekstraselüler olarak amiloid birikimi gözlendi. Amiloid birikimi olan denek sayılarından yola çıkılarak 3x2 şeklinde 6 hücreden oluşan çapraz tablo hazırlandı. Analiz neticesinde kontrol grubunda 6 denekten 4'ünde damar duvarında amiloid birikimi izlendi, diğer 2 denekte gözlemlenmedi. İndirekt bilirubin grubunda ise 6 denekten 5'inde amiloid birikimi damar duvarında izlendi ancak 1 denekte birikim görülmedi. Nefropatoloji indüklenmemiş sham grubunda ise 8 denekten 6'sında amiloid birikim tespit edilmedi. Bu gruptan sadece 2 denekte amiloid birikimi gözlemlendi. Deney grupları ile damar duvarındaki amiloid birikimi arasındaki istatistiksel ilişkiyi değerlendirebilmek için Fisher's Exact testi uygulandı; ancak sonuç 0,119 gelmesi nedeniyle ilişki anlamsız olarak kabul edildi.

Tablo 16. Deney Grupları ile Böbrek Medüller Tübüllerdeki Hyalin Silendiri Arasındaki İlişki

	Tübüllerde Hyalin Silindiri		**Total n**
	yok	var	
Kontrol Grubu n (%)	1 (%16,7)	5 (%83,3)	6
İ. Biluribin Grubu n (%)	0 (%0)	6 (%100)	6
Sham Grubu n (%)	6 (%75)	2 (%25)	8
Total n (%)	7 (%35)	13 (%65)	20

Fisher's Exact testi: 0,011

Histopatolojik analiz neticesinde kontrol grubundaki 6 denekten 5'inde böbrek medullasında bulunan tübüllerin içerisinde hyalin silendir gözlemlenirken 1'inde izlenmedi. İndirekt bilirubin grubundaki 6 denekten tamamındaki analizde; tübüllerde hyalin silendir izlendi. 8 denekten oluşan sham grubunda ise 6'sında tübüler hyalin silendir gözlenmezken; 2'sinde hiyalin silendir medüller tübüllerde izlendi. Yapılan Fisher's Exact testi ile değer 0,011 bulunması üzerine deney grupları ile tübüler hyalin silendir birikimi arasındaki ilişkini istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

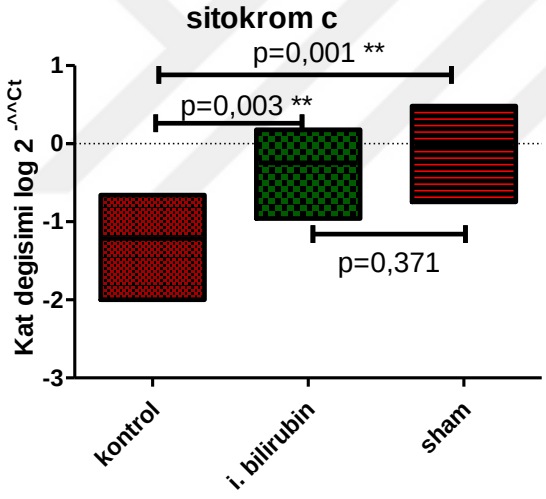
4.4 MOLEKÜLER ANALİZ BULGULARI

Gerçek zamanlı PCR analizi sonucu, elde edilen Ct değerleri (SyberGreen® floresan işaretleyicisinin çift zincirli DNA'ya bağlanıp, floresan ışımanın başladığı en erken döngü sayısı) hem referans gen olan β-aktinin Ct değerinden hem de kontrol nefropati, tedavi (indirekt bilirubin) ve sham gruplarına göre kontrol olarak kullandığımız sham grubundaki deneklerin ilgili genin Ct değerlerinin ortalamasından farkı alındı. Elde edilen ΔΔCt değeri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduyla hesaplandı. Elde edilen veri bize β-aktin referans geni ve sham grubunun ilgili gen ekspresyonuna kıyasla ekspresyon katsayısını verdi. Ekspresyon katsayısı değerlerinde uç değerler çok olması ve dağılımlarının normal olmaması nedeniyle standart bir yöntem olarak katsayıları $\log_{10}$ ile logaritması alınarak kat değişimleri yapıldı. Nihayetinde hesaplanan log $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin dağılımlarını değerlendirmek üzere normalite testi yapıldı. Gruplardaki örneklem sayıları 30'un altında olması

nedeniyle Shapiro-Wilk p değerleri kullanıldı (Tablo 16). Bütün verilerinin dağılımlarının p değerleri 0,05 üstünde gelmesi nedeniyle dağılımlar parametrik olarak kabul edildi. Grup analizi için tek yönlü ANOVA; post-hoc analiz için LSD parametrik analiz yöntemleri uygulandı.

Tablo 17. Normalite Testleri

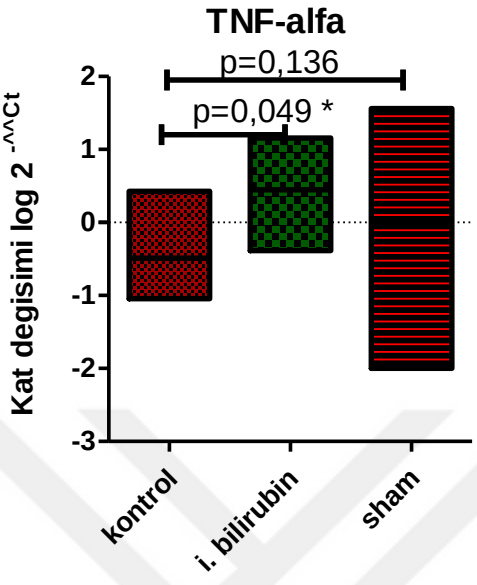
	Kolmogorov-Smirnova	Shapiro-Wilk
	p	p
log-sitokrom c	,200*	0,089
log-TNF alpha	,200*	0,931
log-IL-6	,200*	0,21
log-IL-1 beta	,200*	0,215



Şekil 21. Böbrek Dokusunda Sitokrom C Gen Ekspresyonu

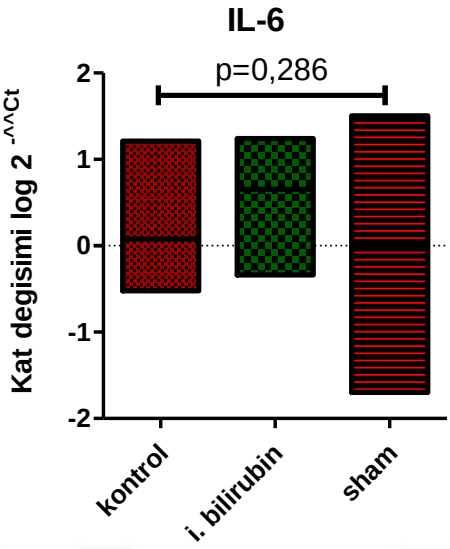
Böbrek dokularından yapılan gerçek zamanlı PCR sitokrom c Ct sonuçlarının $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ve kat değişim (log) metotları ile hesaplanıp, sonuçların tek yönlü ANOVA çoklu grup analiz metoduyla gruplar arasında istatiksel açıdan anlamlı fark olduğu görüldü (p=0,001). Gruplar ikişerli olarak LSD post-hoc metoduyla kıyaslandığında ise kontrol kontrast nefropati grubundaki deneklerin böbrek dokusunda sitokrom c ekspresyon seviyesinin indirekt bilirubin (p=0,003) ve sham (p<0,001) gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu bulundu. İndirekt bilirubin ve sham

grupları arasında ise sitokrom c ekspresyon seviyesi bakımından anlamlı bir fark bulunmadığı izlendi (p=0,371).



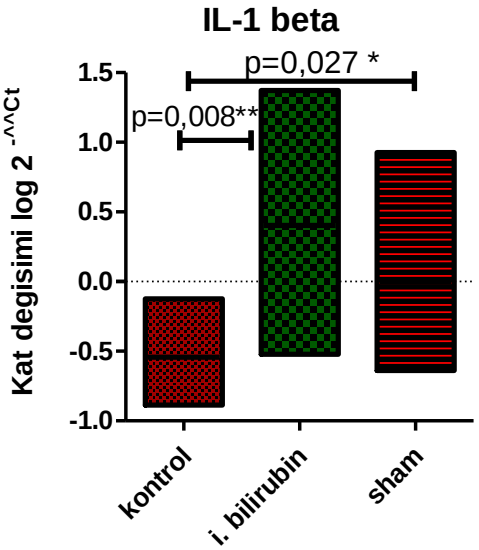
Şekil 22. Böbrek Dokusunda TNF-α Sitokininin Gen Ekspresyonu

TNF-α $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin logaritmik değerleri parametrik dağıldığından grup analizi tek yönlü ANOVA metoduyla yapılıp üç grup arasında istatiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi (p=0,136). LSD ile post-hoc analizde ise kontrol grubunun sınırda anlamlılık ile (p=0,049) indirekt bilirubin grubundaki deneklere kıyasla böbrek dokularında proinflamatuar TNF-α sitokininin daha az eksprese olduğu gözlemlendi. Kontrol (p=0,254) ve indirekt bilirubin (p=0,294) grupları, sham grubu ile ayrı ayrı kıyaslandığında her iki grubun sham grubu ile arasında TNF-α sitokin ekspresyonu açısından anlamlı farkın olmadığı gözlemlendi.



Şekil 23. Böbrek Dokusunda IL-6 Sitokininin Gen Ekspresyonu

Gen ekspresyonu analizi sonucu elde edilen log $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin gruplar arası farkı değerlendirmek üzere tek yönlü ANOVA ile analizi neticesinde üç grup arasında poinflamatuar bir sitokin olan IL-6 gen ekspresyonu açısından anlamlı bir farkın olmadığı görüldü (p=0,286). Post-hoc analizde de kontrol ile indirekt bilirubin (p=0,213); kontrol ile sham (p=0,874) ve indirekt bilirubin ile sham (p=0,141) grupları aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı.



Şekil 24. Böbrek Dokusunda IL-1β Sitokininin Gen Ekspresyonu

TNF-α, IL-6 gibi inflamasyon sitemini aktive eden IL-1β sitokinin deneklerdeki böbrek dokularındaki gen ekspresyonu neticesinde elde edilen log $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinin tek yönlü ANOVA yöntemi ile grup analizi neticesinde gruplar arasında IL-1β gen ekspresyonu bakımından anlamlı farkın olduğu izlendi (p=0,027). Gruplar ikişerli olarak post-hoc LSD analiz metoduyla istatistiksel yönden kıyaslandığında; kontrol kontrast nefropati grubunda IL-1β sitokininin indirekt bilirubin grubundaki deneklere kıyasla anlamlı olarak daha az eksprese olduğu görüldü (p=0,008). Kontrol ile sham (p=0,085) ve indirekt bilirubin ile sham (p=0,19) grupları LSD yöntemi ile IL-1β ekspresyon seviyesi açısından kıyaslandığında ise aralarında istatistiksel bağlamda anlamlılık bulunmadığı görüldü.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Damarsal girişimsel işlemlerin ve damar yapılarını skopi cihazı altında görüntülemek için kontrast maddenin sıklıkla uygulandığı kardiyoloji kliniğinde kontrasta bağlı böbrek hasarı; özellikle KY, DM, KBH gibi risk faktörleri varlığında sıklıkla karşılaşılmakta, hastanın morbidite ve mortalitesini belirgin bir şekilde arttırmaktadır. Kontrast ilişkili nefropatinin patomekanizması çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarla nekroz, apoptoz, vazokonstriksiyon, inflamasyon gibi başlıklar altında incelenmiştir. Patomekanizma inflamatuar hücre (CD4+, CD8+ T hücre; monosit; makrofaj; nötrofil) infiltrasyonu ve sitokin salınımı; hiperviskozite, hiperosmolarite ve kontrast ajanın doğrudan etkisi ile tübüler hücre membran hasarı ve hücre içi Ca^{+2} birikimi; apoptotik ve tehlike sinyal yolakların aktivasyonu ve yolaklarla ilişkili protein ekspresyon artışı; hücre içi antioksidan, antiapoptotik mekanizmaların inaktivasyonu; hücre içine lizozomal enzim salınımı ile hücre ölümü; vazokonstriktör aracı protein ve hormonların salınımı ve aktivasyonu; hiperosmolorite ile interstisyel alanda basınç artışı ile ve hiperviskozite nedeniyle peritübüler kapiller yatakta kan akımının yavaşlaması neticesinde koagülasyon kaskadının aktivasyonu gibi mekanizmalar üzerinden açıklanmaya çalışılmıştır. Fakat günümüzde CIN'ın esas patomekanizması tümüyle aydınlatılamamış olup, belirsizliğini korumakta ve eşlik eden DM, KY, KBH gibi risk faktörleri, organizmaların genetik zeminindeki farklılıklar varlığında hastadan hastaya; türden türe ortaya konan patomekanizmaların nefropatolojiye katılım oranları farklılık gösterebilmektedir. CIN patomekanizmasındaki bu karmaşıklık patolojinin tedavisini ve hasta yönetimini de güçleştirmekte; hastanın hastane içinde yatış süresinin uzamasına, geçici/kalıcı diyaliz ihtiyacına ve mortalitesine neden olabilmektedir. Her ne kadar CIN tedavisinde deneysel ve klinik çalışmalarda bu patogenezin patomekanizma yollarını inhibe ya da kompanse edebilecek farklı tedavı yöntemleri kullanılsa da statin ve i.v. hidrasyon dışında hiçbiri klinik tedavi protokollerine ve kılavuzlarına girememiştir. Renal replasman tedavisi ise rutin profilaktik olarak önerilmemekle birlikte, nefropati açısından yüksek riskteki kişilere ve böbrek fonksiyonlarının akut bozukluğu gibi sınırlı endikasyonlarda uzman görüşüyle önerilmektedir.

Retiküloendotelyal sistemde eritrosit ve hemoproteinlerin yıkımı sonucu açığa çıkan hem metabolitinin HO ve biliverdin redükataz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar sonucu açığa çıkan indirekt (unkonjuge) bilirubin molekülü daha önceki deneysel çalışmalara istinaden; yapısındaki C atomlarına bağlı H^+ iyonları ile ROR'lerini bağlayıp NOX2, NOX4, p22 phox, p47 phox, mitokondriyal ATPaz ve iNOS enzim ve proteinlerini inhibe ederek antioksidan etkinlik; TNF-α, IL-1β, MCP-1, TLR, TNFR ½, gibi sitokin ve reseptörleri inhibe ederek antiinflamatuar etkinlik; reg. T hücrelerini ve CD10 antijenini aktive ederek immun modülatör etkinlik; pro-apoptotik aracı proteinler olan Kim-1, caspase 3/9, HSP70, NLRP3, PARP, HMGB1 moleküllerini inhibe edip antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi aktive ederek anti-apoptotik etkinlik; LOX12, TGFβ, HIF1α, MMP gibi protein ve enzimleri inhibe ederek yeniden şekillenme ve fibrozis sürecini baskılayıcı etkinlik; eNOS ve PGE2 molekülleri aktive ederek vazodilatatör etkinlik ve p38 MAPK, NFκB, cJNK gibi hücre içi tehlike sinyal yolaklarını baskılayarak hücre harabiyeti, hücre ölümü ve hücre hasarını indükleyebilecek sitokin/kemokin salınımını inhibe edici etkinlikler gösterdiği bilinmektedir. İndirekt bilirubin metabolitinin bu mekanizmalar üzerinden aterosklerotik süreci gerilettiğini; miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarını sınırlandırıp infarkt zonunu daralttığını; adipozitas ve metabolik sendrom süreçlerini baskıladığını; insülin reseptör direnci üzerine iyileştirici etkisi olduğunu; diyabet ve diyabete bağlı gelişen nefopati ve böbrek dokusundaki fibrozis süreçlerini gerilettiğini; piyelonefrit modelinde inflamasyonu baskılayıp renal fonksiyonları iyileştirici etkinliğinin olduğunu gösteren pek çok klinik ve deneysel çalışmalar mevcuttur.

Literatürde deneysel olarak hayvanlarda modellenen diyabetik nefropati; piyelonefrit; adenin veya iskemi-reperfüzyon hasarı ile indüklenmiş böbrek hasarı üzerine indirekt bilirubinin koruyucu, patolojiyi-doku fibrozisini geriletici ve böbrek fonksiyonlarını iyileştirici özelliklerini gösterir in vivo çalışmalar mevcut olup indirekt bilirubinin doğrudan kontrast nefropatisi üzerine etkisini gösterir deneysel çalışma bulunamamıştır. Ancak indirekt bilirubin metaboliti oluşumunda yer alan HO-1 enziminin hemin molekülüyle aktive edilmesi, kontrast nefropati modellenen Sprague-Dawley türü sıçanlarda böbrek fonksiyonlarını düzelttiği ve apoptozu çeşitli yolaklar üzerinden baskılayarak böbrek hasarını azalttığı deneysel hayvan çalışması

ile gösterilmiştir (101). Klinik çalışmalara baktığımızda ise indirekt bilirubin seviyesi ile kontrasta bağlı böbrek hasarı arasında ters ilişki olduğu bulunmuştur. Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmamızda, indirekt bilirubinin doğrudan CIN modellenen sıçanlarda böbrek fonksiyonları ve gelişen böbrek hasarı üzerine etkisini gözlemlemek ve değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler analiz yöntemlerinden faydalanılmıştır.

Çalışmamızda deneklerin serum örneklerinde üre ve kreatinin düzeylerini analiz ettiğimizde anlamlı fark izlenmektedir. Hem kontrol kontrast nefropati grubu hem de indirekt bilirubin (tedavi) grubu kontrast nefropatinin modellenmeyip herhangi bir tedavi uygulanmayan sham grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak kreatinin değerleri yüksek olduğu görüldü ($p<0,017$). Serum üre değerlerinin kontrol grubunda sham grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu izlendi ($p<0,017$). Ancak İndirekt bilirubin verilen kontrast nefropati grubunda sham grubuna göre serum üre seviyesi yüksek izlenmekle birlikte post-hoc analiz Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U ile yapıldığından ve $p>0,017$ olması nedeni ile farklılık anlamlı bulunmadı. Özellikle serum kreatinin düzeylerine göre baktığımızda kontrast madde (iyoheksol) verdiğimiz kontrol ve indirekt bilirubin gruplarında sham grubuna kıyasla bu gruplarda CIN modelimizin oluştuğunu teyit etmektedir. Bununla birlikte post-hoc analizlerde serum üre ve kreatinin düzeyleri kontrol grubunda indirekt bilirubin grubuna göre yüksek olduğu; ancak farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,017$). Literatüre baktığımızda ise doğrudan indirekt bilirubin ile kontrast nefropati ilişkisini gösterir çalışma bulunamasa da, dolaylı olarak değerlendirebileceğimiz çalışmalar bulunmuştur. Gao ve arkadaşları tarafından yapılan in vivo hayvan çalışmasında (101); CIN modellenen Sprague Dawley türü sıçanlara indirekt bilirubin metaboliti oluşumunda yer alan HO-1 enzimini uyarıcı hemin molekülü verildiğinde, kontrol grubuna göre anlamlı olarak serum üre ve kreatinin düzeylerinin düşük olduğu kontrast verildikten 24 saat sonraki biyokimyasal analizde bulunmuştur ($p<0,05$). Barabas ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise (102) sisplatin molekülü ile genetik olarak indirekt bilirubini, konjugasyon işlemi ile direkt bilirubine çeviren UDPGT-1 enziminin bulunmadığı Gunn türü sıçanlarda ve UDPGT-1 enzimi bulunan Wistar türü sıçanlarda nefropati oluşturulmuş; neticesinde Gunn türü

sıçanlarda sisplatin verilmesinden sonraki 3. Günden itibaren serum üre ve kreatinin değerlerinde kontrol Wistar türü sıçanlara göre anlamlı düşüklük tespit edilmiştir. Literatürdeki bahsedilen çalışmalarda indirekt bilirubin molekülünün farklı nefropati modellerinde, böbrek süzme foksiyonlarını bize gösteren üre ve kreatinin düzeylerini düşürdüğü gibi; çalışmamızda da benzer olarak indirekt bilirubin verilen kontrast nefropati modellerinde serum üre ve kreatinin düzeyleri, kontrol kontrast nefropati grubuna göre düşük olduğu bulundu; ancak istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyine erişmediği izlendi ($p>0,05$). İstatistiksel anlamlı farklılık düzeyine erişmeme durumunun, her iki gruptaki örneklem ($n=6$) sayılarının düşük olmasından kaynaklandığı kanısına varılmış olup grup büyüklüğü arttırılarak istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Serum üre ve kreatinin ölçümleri dışında böbreğin süzme fonksiyonunu değerlendirebilmek adına metabolik kafes vasıtasıyla deneklerin 24 saatte aldıkları sıvı; çıkardıkları idrar miktarları; idrardaki üre ve kreatinin düzeyleri (mg/dl); 24 saateki toplam idrarda total kreatinin miktarı; idrardaki kreatinin değerinin serumdaki değere oranı ölçüldü. Kreatinin analizlerine bakacak olursak idrar kreatinin (mg/dl) ($p<0,05$), 24 saatlik toplam kreatinin atılımı (mg) ($p<0,05$) ve idrar/serum kreatinin oranları ($p<0,017$ [Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U]) kontrast nefropati oluşturulan gruplarda (kontrol; indirekt bilirubin grubu) sham (nefropati modellenmeyen) grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum kontrast madde ve indükleyici ajanlar ile oluşturduğumuz CIN hayvan modelinin oluştuğunu serum üre ve kreatinin değerleri ile korele bir şekilde göstermektedir. Çalışmamızda her ne kadar post-hoc analizlerde istatistiksel açıdan anlamlılık düzeyine ulaşmasa da, indirekt bilirubin verilen nefropati grubunda kontrol grubundaki deneklere kıyasla idrardaki kreatinin düzeyi (mg/dl), 24 saatlik toplam kreatinin (mg) miktarı, idrar/serum kreatinin oranı daha yüksek olduğu bulundu ($p>0,05$). İdrarla atılan üre (mg/dl) değerleri ise kreatinin verilerinde olduğu gibi serum üre değerleri ile korelasyon göstermedi ve post-hoc analizde indirekt bilirubin verilen nefropati grubu ile kontrol nefropati grubu ($p=0,471$) ve kontrol nefropati grubu ile sham grubu ($p=0,061$) aralarında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı. Buna karşın indirekt bilirubin verilen nefropati grubunda sham grubuna göre idrardaki üre miktarı anlamlı düzeyde yüksek olduğu tespit edildi ($p=0,01$).

Literatürü taradığımızda ise indirekt bilirubinin nefropati modellerinde etkinliğini gösteren çalışmalar içerisinde idrar biyokimya analizi yapılan tek bir çalışmaya rastlandı. Boon ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada (103); UDPGT-1 enziminin bulunmadığı ve serum indirekt bilirubin seviyelerinin yüksek seyrettiği Gunn türü sıçanlarda adenin ile nefropati modeli oluşturulmuş ve adenin ile nefropati oluşturulan kontrol grubu Wistar türü sıçanlarla böbrek fonksiyonu /böbrek hasarı açısından kıyaslanmıştır. Bizim çalışmamızdan farklı olarak bu çalışmada serum indirekt bilirubin seviyesi yüksek seyreden Gunn türü sıçanlarda her ne kadar böbrek histopatoloji ve moleküler analizinde böbrek hasar/apoptoz düzeyi kontrol gruba göre anlamlı düşük çıksa da; erken dönemde idrardaki üre ve kreatinin düzeyi kontrol gruba göre düşük bulunmuş, 28 günlük takibinde bu anlamlı farklılık kaybolmuştur. Boon ve arkadaşlarınıın yapmış olduğu bu çalışma da böbrek fonksiyonu üzerine indirekt bilirubinin koruyucu etkinliği gösterilememiştir. Çalışmamızda ise kontrol ile indirekt bilirubin grupları arasındaki farklılık istatistiki açıdan anlamsız olsa da, indirekt bilirubin verilen gruptaki idrar kreatinin değerlerinin (idrar kreatinin [mg/dl], idrar total kreatinin düzeyi [mg], idrar/serum kreatinin oranı) kontrol grubuna göre görece yüksekliği kontrast verildikten sonraki tedavi amaçlı uygulanan indirekt bilirubin metabolitinin böbrek süzme fonksiyonlarına olumlu etki oluşturabileceği tarafımızca düşünülmektedir. Çalışmamızdaki indirekt bilirubin (n=6) ve kontrol nefropati (n=3) grupları arasındaki farkın anlamlılık düzeyine erişememesi durumu gruplardaki örneklem sayılarının düşüklüğü ile ilişkilendirildi. Grup büyüklüğünü arttırarak ve başka parametrelerin (sistatin c; GFH) de analize eklenerek böbrek fonksiyonlarının daha net değerlendirilip istatistiksel anlamlılık düzeyine erişilebileceği düşünülmektedir. İdrar üre değerleri ise serum üre değerleri ile korele olmamakla birlikte; indirekt bilirubinin post-hoc ikişerli grup kıyaslamalarında her ne kadar sham grubuna göre idrarla üre atılımını arttırdığı gözlense de, böbrek süzme fonksiyonu üzerine etkisini değerlendirebilmek adına tek başına fikir vermemektedir.

Literatürdeki deneklerin sıvı alımı ve idrar çıkımları açısından daha önce yapılmış kontrast nefropati modellerine baktığımızda; Ömer Toprak ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (104) nefropati modellenen sıçanlarda 72 saatlik dehidratasyon protokolünün hemen ardından sıvı alımları ölçüldüğünden deneklerin

sıvı alımlarında belirgin artış gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise 24 saatlik dehidratasyon sonrası kontrast ajan ve nefropati indükleyici ajanlar (L-NAME, indometazin) verildikten sonraki 48 saatlik periyodun son 24 saatinde metabolik kutu vasıtasıyla 24 saatlik sıvı alımları ve idrar çıkışları ölçülmüştür. Ölçüm neticesinde nefropati modellenen gruplardaki deneklerde (kontrol, indirekt bilirubin), nefropati oluşturulmayan sham grubuna kıyasla 24 saatlik sıvı alımları anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). 24 saatlik idrar çıkışlarında ise anlamlı sonuç bulunamamış olup sonuçlar birbirine yakındır ($p>0,05$). Başka bir deneysel çalışmada, Pollock ve arkadaşları (105) tarafından kontrast ilişkili nefropati modellemesinde dehidratasyon basamağını kullanmayıp kontrast maruziyetinden sonraki 24 saatlik süreçte sıvı alım ve idrar çıkış miktarlarına bakılmış olup; nefropati olan grupta kontrol grubuna kıyasla sıvı alımları daha düşük ve idrar çıkımları daha yüksek olduğu bulunmuştur. İdrar çıkımlarındaki artış miktarının kontrast ajanın oluşturduğu osmotik diürezis etkisi ile ilişkili olduğu Pollock ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir. Her ne kadar çalışmamızda bu osmotik diürezis etkiyi gözlemlemesek ve idrar çıkış volümleri arasında anlamlı fark izlemesek de, sıvı alımları Pollock ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayla ile benzer gelmiştir. Nefropati grubundaki sıvı alımlarındaki azalma etkisi aynı zamanda yiyecek alımında da görüldüğü için, patolojinin sebebiyet verdiği iştah azalması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Çalışmamızda indirekt bilirubinin nefropati modellenen denekler üzerine sıvı alımı ve idrar çıkımı açısından kontrol kontrast nefropati grubuna göre istatistiksel anlamlı etki izlenmemiştir. Literatürde de indirekt bilirubinin kontrast nefropatide sıvı alımı ve idrar çıkımı üzerine etkisini değerlendiren bir çalışma bulunamamıştır. Grup büyüklükleri arttırılıp deneklerin aldığı – çıkardığı sıvı miktarı takip süreleri uzatılırsa ve beraberinde sıvı dengesi üzerine etkisi olan vazopressin, anjiyotensin II gibi hormonların biyokimyasal analizleri serumda - nöronal dokuda yapılırsa indirekt bilirubinin kontrast nefropati modelinde sıvı alımı - idrar çıkışı üzerine etkisi moleküler ve istatistiksel açıdan daha etkili değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda indirekt bilirubin molekülünün kontrast nefropati üzerine etkisini ve bu etkiyi hangi olası mekanizmalar ile yaptığını değerlendirmek üzere histopatolojik ve moleküler analiz metotları uygulandı. H&E ile yapılan

histopatolojik analizde her 3 grubun böbrek dokularında tübüler düzensizlik, harabiyet, fibrotik değişiklik, hidropik dejenerasyon ve vakuolizasyon gibi doku hasar kriterleri baz alınarak, doku harabiyeti; "az, orta, şiddetli ve çok şiddetli" olarak sınıflandırıldı. Bu sınıflandırma ile çalışmamızda tübüler hücre düzensizliği-harabiyeti (nekroz), hücre içi vakuolizasyon ve hücresel ödem yoğunluğunun fazla olduğu kontrol kontrast nefropati grubundaki 6 deneğin 4'ünde tübüler dejenerasyon düzeyi "şiddetli" düzeyde tespit edilirken, 2'sinde "çok şiddetli" düzeyde bulundu. Görsel olarak tübüler harabiyet ve hücre içi vakuolizasyon yoğunluğu kontrol grubuna göre daha düşük olan indirekt bilirubin verilen tedavi grubundaki 6 denekten hepsinde tübüler dejenerasyon şiddeti "orta" düzeyde belirlendi. Literatürdeki kontrast nefropati ile yapılmış çalışmalarda (106,107) da çalışmamızla benzer olarak kontrast verilen sıçanlarda verilmeyenlerle kıyaslandığında tübüler vakuolizasyon görülse de; bizim çalışmamızda farklı olarak vakuollerle birlikte vakuollerin içerisinde yoğun kristalize yapılar izlendi. Oluşan bu kristalize yapıların iyot yoğunluğu fazla olan ve kontrast nefropati modellemesi için kullanılan iyoheksol kontrast maddesi kaynaklı olduğu düşünüldü. İlginç olarak kontrast madde (iyoheksol) ve nefropati indükleyici ajan (L-NAME, indometazin) verilmeyip kontrast nefropati modellenmeyen; indirekt bilirubin tedavi ajanı kullanılmayan; ancak diğer 2 grupla (kontrol, tedavi) aynı stres faktörüne maruz kalması amacıyla indirekt bilirubin ve indometazin için çözücü olarak kullanılan DMSO çözücüsü uyguladığımız sham grubunda da "az" şiddette tübüler dejenerasyon/vakuolüzasyon izlendi. Kontrast nefropati oluşturmadığımız halde sham grubundaki "az" şiddetteki tübüler dejenerasyonun DMSO'ya bağlı olabileceği, Alqahtani ve arkadaşlarının DMSO'nun sisplatin ilişkili böbrek hasarının modellendiği farelerde, böbrek hasar şiddetini arttırdığını gösterdikleri çalışmaya (108) istinaden düşünüldü. Hidrofobik maddeler için çözücü olarak kullanılan DMSO çözücüsünün renal tübüler sistem üzerine toksik etki oluşturup oluşturmadığı gelecekteki in vivo ve in vitro çalışmalarla açıklığa kavuşturulmaya ihtiyaç duymaktadır. İndirekt bilirubinin verildiği CIN modellenmiş sıçanlarda tübüler hasar "orta" şiddette iken kontrol CIN modelinde ise hasar düzeyi 4'ünde "şiddetli" 2'sinde de "çok şiddetli" düzeyde olduğu izlenmiş olup histopatolojik analizde görece böbrek hasar düzeyi indirekt bilirubin verilen grupta kontrol gruba kıyasla daha az şiddette olduğu gözlemlendi. Elde edilen veriler sayısal olmayıp kategorik olduğu için deney grupları ile tübüler

dejenerasyon düzeyi arasındaki istatistiksel ilişki çapraz tablo ve Fisher's Exact metoduyla analiz edildi. Bu metotla grup ve gruplarda bulunan tübüler hasar şiddetleri ilişkisi farklı kombinasyonlarda 3*4 kare tablo (kontrol, indirek bilirubin, sham ↔ az, orta, şiddetli, çok şiddetli); 2*3 (kontrol, indirekt bilirubin ↔ orta, şiddetli, çok şiddetli); 2*3 (kontrol, sham ↔ az, şiddetli, çok şiddetli); 2*2 (indirekt bilirubin, sham ↔ az, orta) analiz edildi ve her analizde gruplarla tübüler hasar derecesi arasındaki ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (Fisher's Exact $p<0,05$). Ancak yapılan işlem kategorik analiz olduğu için ve elde sayısal veri olmadığı için gruplar tübüler hasar şiddeti açısından birbiriyle kıyaslanamadı, sadece gruplar ile tübüler hasar arasındaki istatistiksel ilişki ortaya konmuş oldu. Gao ve arkadaşlarının yaptığı deneysel hayvan çalışmasında (101) ise CIN oluşturulan sıçanlara hem molekülünü biliverdine dönüştüren HO-1 enziminin indükleyici ajanı olan "hemin" molekülü verilerek kontrol CIN grubuna göre hem H&E boyamasında hem de apoptotoik hücre analizinin yapıldığı TUNEL boyamada renal tübüler hasarının ve apoptoz düzeyinin (apoptotik hücre↓, bax↓, bcl-2↑) anlamlı olarak düşük olduğu bulunmuştur. Gao ve arkadaşlarının nefropatik ratlara verdikleri hemin molekülü ile indirekt bilirubin miktarının dolaşımda yükseltildiği çalışması ile kontrast nefropati modellenen sıçanları i.p. olarak dışardan verdiğimiz indirekt bilirubin çalışmamızın ortak sonucu olarak indirekt bilirubinin kontrast ilişkili böbrek hasarında oluşan tübüler hasarı geriletebileceği kanısına varılmıştır. Çalışmamızda olduğu gibi indirekt bilirubinin i.p. olarak dışardan verilecek kontrast nefropati çalışmalarında bu molekülün kontrast ilişkili tübüler ve/veya nefron sistemi hasarı üzerine etkisini altta yatan apoptotik hücre düzeyi, inflamasyon (TNF-α IL-6, inflamatuar makrofaj [M1], PMNL, T lenfositler vb.); proapoptotik/antiapoptotik protein düzeyleri (bax; bcl-2; caspase proteinleri 3,6,7,9; GPX4 vb.) gibi mekanizmaları gözlemleyebileceğimiz, sayısal veri elde edip tedavi ve kontrol gruplarını birbirleriyle istatistiksel açıdan kıyaslayabileceğimiz TUNEL ve İmmunohistokimyasal boyama yöntemlerinin kullanıldığı invivo çalışmalarla açıklığa kavuşturulabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda H&E histopatolojik boyama neticesinde 6 denekten oluşan kontrol kontrast nefropati grubunun 3'ünde böbrek dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu izlenirken diğer 3'ünde yoktu. İndirekt bilirubin verilen nefropati grubunda 5 denekte böbrek dokusunda mononükleer hücre infiltrasyonu izlendi,

1'inde infiltrasyon gözlemlenmedi. Kontrast nefropai oluşturulmayan sham grubunda ise 8 denekten 4'ünde infiltrasyon izlenirken geri kalan 4 denekte izlenmedi. 3*2 hücreden oluşan çapraz tabloda Fisher's Exact analizi neticesinde hücre infiltrasyonu ile gruplar arasında istatistiksel anlamlı ilişki izlenmedi. Literatürü taradığımızda ise kontrast nefropati modeli üzerine böbrek dokusu inflamatuar hücre infiltrasyonu ile ilgili çalışma bulunamadı; ancak Kasap ve arkadaşlarının piyelonefrit modeli oluşturulan sıçanlarda indirekt bilirubinin etkisini gözlemledikleri çalışma tespit edildi (9). Bu çalışmada Kasap ve arkadaşları indirekt bilirubin verilen piyelonefrit grubunda PMNL infiltrasyonu, kontrol gruba göre anlamlı daha az tespit edilirken bizim çalışmamızda ise indirekt bilirubin verilen grupta görece olarak kontrol gruba göre daha fazla mononükleer hücre infiltrasyonu izlenip kontrol ve tedavi grupları arasında istatistiki ilişki kurulamadı. İndirekt bilirubinin kontrast ilişkili nefropatolojisinde; inflamatuar hücre ve inflamasyon mekanizmaları üzerine etkisini daha iyi değerlendirebilmek, proinflamatuar ya da antiinflamatuar etkinliğini belirleyebilmek adına M1 makrofaj (CD 80,86, 64 vs.); PMNL (Ly6C vs.) gibi hücre belirteçleri aracılığıyla inflamatuar hücrelerin tespiti için renal dokuda immunohistokimyasal ve/veya akım sitometri analiz metotları kullanılmalıdır.

Eritrosit, lökosit, yağ asitleri ve 3 boyutlu yapısı bozulmaya uğramış protein yapılarından oluşan hiyalin silendirler, çalışmamızda kontrol ve indirekt bilirubin kontrast nefropati gruplardaki deneklerin histopatoloji örneklerinde sham grubundaki deneklere kıyasla daha fazla rastlanmaktadır. Ancak veriler sayısal olmayıp kategorik olduğundan istatistiksel analiz 3*2 şeklinde çapraz tablo ile Fisher's Exact analiz metoduyla yapıldı. Her ne kadar gruplarla tübüllerdeki hyalin silendir varlığı arasında anlamlı istatistiksel ilişki (p=0,011) bulunsa da bu analiz yöntemi ile kontrol ve indirekt bilirubin grupları kıyaslanamamaktadır. Kasap ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da indirekt bilirubin verilen piyelonefrit grubuyla kontrol piyelonefrit grubu arasında tübüllerdeki hyalin silendir düzeyi açısından istatistiki anlamlılık taşıyan bir farklılık tespit edilmemiştir (9). Kasap ve arkadaşlarının çalışması ile bizim kontrast nefropati çalışmamızın ortak sonucu; indirekt bilirubinin hiyalin silendirleri azaltmada bir etkisinin olmadığıdır.

Histopatolojik analizin en son verisi olarak bazı deneklerin histopatoloji örneklerinde H&E boyaması sırasında damar duvarı etrafında proteinöz/kollajenöz

materyallerin tespit edilmesi üzerine bu örnekler kongo red boyası ile boyandı. İndirekt bilirubin verilen nefropati grubunda (6 denekten 5'inde) ve kontrol nefropati grubunda (6 denekten 4'ünde) damar çeperinde kongo red boyama ile amilod maddeye sham grubuna (8 denekten 2'sinde) göre daha sıklıkla rastlanmasına rağmen, her 3 grupta da damar duvarı etrafında amiloidozis görülmektedir. Fisher's Exact yöntemi ile gruplarla amiloid birikimi arasında istatistiki ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$). Elde edilen verilerin kategorik veri olması nedeniyle damar duvarında gözlemlenen proteinöz madde birikimi ile tübüllerdeki hyalin silendir varlıkları arasında istatistiksel bir korelasyon kurulamasa da görsel olarak kontrast modellenen gruplarda (kontrol, indirekt bilirubin) hyalin silendir varlığı ile damar duvarındaki amiloid madde birikimi olan deneklerin sayısı benzer ve ilişkili görülmekle birlikte, sham grubuna kıyasla daha fazladır. Buradan yola çıkarak tübüllerdeki hyalin madde birikiminin damar duvarında oluşan amiloid proteinlerden kaynaklandığı düşünülebilir. Bununla birlikte damar duvarındaki amiloidozisin nasıl oluştuğuna dair elimizde veri bulunmamaktadır. Literatürü taradığımızda ne kontrast nefropati oluşturmak ve indüklemek için kullandığımız iyoheksol, L-NAME, indometazin kimyasal maddelerinin; ne de tedavi grubunda i.p. olarak uyguladığımız indirekt bilirubinin amiloidozis oluşumuna sebebiyet verdiğine dair invivo/invitro deneysel ya da klinik çalışmalara rastlanılamamıştır. Ayrıca çalışmamızda indometazin ve indirekt bilirubin gibi hidrofobik özellikteki kimyasal ajanlar için çözücü olarak kullanılan DMSO maddesinin kontrast nefropati modellenen gruplarla aynı stresör faktöre maruz bırakılması için verildiği sham grubunda da az sayıdaki denekte de olsa damar duvarında amiloidozis birikimi gözlemlenmiştir. Literatürde DMSO ile amiloidozis arasındaki ilişki araştırıldığında ise DMSO'nun amiloid birikimine sebep olduğuna dair çalışmaya rastlanılamamıştır. Buna karşın DMSO'nun eski çalışmalarda amiloidozis tedavisinde deneysel amaçlı kullanıldığına dair çalışmalar bulunmuştur (109,110). Bu kimyasal ajanların özellikle de kontrast madde (iyoheksol) ve indirekt bilirubin moleküllerinin amiloidozisi; yani immunglobulin ya da başka yapıdaki proteinlerde katlantı defekti oluşturup oluşturmadığını ve ilişkisini ortaya koyabilmek için: özellikle H^{+}-NMR (proton nükleer manyetik rezonans); kütle spektrofotometrisi gibi ileri düzey araştırma metotlarının uygulandığı invo ve/veya invitro deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Biyokimyasal ve histopatolojik analiz neticesinde indirekt bilirubinin nefropati grubunda, kontrol nefropati grubuna göre böbrek dokusunda tübüler dejenerasyonu geriletici etkisini; istatistiksel anlamlılık düzeyine erişmese de serum kreatinin, üre değerlerini geriletici etkisini; idrar toplam kreatinin miktarını, idrar kreatinin düzeyini ve idrar/serum kreatinin oranını arttırıcı etkilerini açıklayabilmek ve altta yatan mekanizmanın ne olduğuna dair fikir elde edebilmek için, inflamasyon ve apoptoz düzeyini araştırmak üzere sitokrom-c, TNF-α, IL-6, IL-1β protein ve sitokinlerin böbrek dokusundaki gen ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR ile analiz edildi. Analiz neticesinde intrinsik apoptotik yolağın aktivasyonu ile mitokondriden açığa çıkan sitokrom c; kontrol kontrast nefropati grubunda, indirekt bilirubin verilen kontrast nefropati grubu ve sham grubuna göre anlamlı olarak daha az eksprese olduğu ($p<0,05$), indirekt bilirubin grubu ile sham grubu arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$). Literatürde ise mitokondriyal hasarın, sitokrom-c salınım ve düzeyinin, kontrast modellenmiş sıçanlarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, dolayısıyla apoptotik yolakların aktif olduğu gösterilmiştir (45,111). İndirekt bilirubinin sitokrom c ekspresyonu ve apoptoz üzerine etkisini gösteren çalışmalara baktığımızda Rodrigues ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (112); indirekt bilirubinin nöronal hücrelerde sitokrom c ekspresyonunu arttırdığı, dolayısıyla apoptozu indüklediği gösterilse de; Gao ve arkadaşlarının hemin ile HO-1 enziminin aktive edildiği kontrast nefropati çalışmasında (101), serum indirekt bilirubin seviyesinin dolaylı olarak artışının bax seviyesini inhibe edip, bcl-2 düzeyini arttırarak intrinsik apoptotik yolağı baskıladığı gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda ise farklı olarak indirekt bilirubin verilen nefropati grubuyla, nefropati modellenmemiş sham grubunda sitokrom c ekspresyon düzeyi benzer ($p>0,05$); indirekt bilirubin verilmeyen kontrol kontrast nefropati grubuna göre de sitokrom c ekspresyon seviyesi anlamlı daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol grubunda sitokrom c ekspresyon seviyesinde önceki çalışmalara göre beklenilenden farklı olarak sham ve indirekt bilirubin grubuna göre düşük gelmesinin nedeni tübüler hasarın yüksek olduğu kontrol grubunda nekroz patomekanizmasının apoptoza göre daha ön planda olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca apoptoz ve hücre hasarında pek çok mekanizma ve proteinlerin yer almasından dolayı, hangi mekanizma ve yolaklar üzerinden hasarın oluştuğunu tespit edebilmek için genel bilgiler kısmında belirtilen caspase, p38 MAPK, cJNK, NFκB, bax, bcl-2,

PARP, TRAİL, TLR, TNFR, SOD, GPx gibi protein, reseptör, ve enzim düzeyleri; hem gen (RT-PCR vb.) hem de protein seviyesinde (Western Blot, ELISA vb.) analiz edilmelidir. Bunun yanında TUNEL boyama ile apoptotik hücre ve sağlam hücre araştırılması yapılmalıdır.

İnflamatuar belirteç olarak da çalışmamızda 3 grubun deneklerinden alınan böbrek dokusu homojenatından TNF-α, IL-6, IL-1β sitokin ekspresyonlarına gerçek zamanlı PCR ile bakıldı. Analiz neticesinde böbrek dokusunda IL-6 gen ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmezken, TNF-α ve IL-1β ekspresyon düzeyleri ise beklenilenin aksine kontrol kontrast nefropati grubunda indirekt bilirubin verilen kontrast nefropati grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Kontrol grubunda TNF-α ve IL-1β ekspresyonu görece olarak sham grubuna göre düşük gözükse de fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0,05$). TNF-α ekspresyonu indirekt bilirubin verilen grupta sham grubu ile benzerken; IL-1β ekspresyonu görece sham grubuna göre yüksek ancak istatistiksel açıdan farklılık anlamlı değildir ($p>0,05$). Literatürü taradığımızda ise kontrast madde ile nefropati oluşturulan sıçanlarda ve kontrast maddeye maruz bırakılan tübüler hücrelerin kullanıldığı in vitro çalışmalarda TNF-α, IL-1β, IL-6 sitokin seviyelerinin, gerek gen ekspresyonu düzeyinde gerekse protein analiz düzeyinde artış gösterdiği gözlemlenmiştir (113–115). Literatürde indirekt bilirubinin inflamasyon ve inflamatuar hücreler üzerine baskılayıcı etkisini gösteren çalışmaların yanında (66,76,77); Huang ve arkadaşlarının iskemi-reperfüzyon üzerinden sıçanlarda ve tübüler hücre kültüründe indükleyerek akut böbrek hasarı ve akut tübüler hasar oluşturdukları invivo/invitro deneysel çalışmada: indirekt bilirubin molekülünün böbrek dokusunda ve tübüler epitel hücrelerinde TNF-α, IL-6, IL-1β sitokinlerinin salınım ve ekspresyonlarını baskıladığı gösterilmiştir (116). Ancak kontrast ilişkili nefropati modellenip indirekt bilirubinin, böbrek dokusunda inflamasyon üzerine etkisini değerlendiren deneysel invivo/invitro çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız CIN modellenen deneklerin böbrek dokusunda inflamatuar sitokin analizi açısından ilki oluştursa da, literatürdeki farklı metotlar üzerinden oluşturulan böbrek hasarı ya da böbrek dokusu dışındaki farklı dokulardaki patolojiler üzerine indirekt bilirubinin inflamasyon baskılayıcı etkisi, çalışmamızda izlenmemiştir. İndirekt bilirubin verdiğimiz kontrast nefropati

grubunda TNF-α, IL-6, IL-1β sitokin gen ekspresyonları sham grubu ile benzerdir. TNF-α, IL-1β gen ekspresyonları ise kontrol CIN grubuna göre anlamlı daha fazladır ($p<0,05$). Kontrast nefropatide sitokin ekspresyonlarının beklenilenin aksine düşük gelmesi ve indirekt bilirubinin antiinflamatuar etkisinin sitokin ekspresyonu düzeyinde izlenememiş olması; böbrek dokusundan alınan kesitin bir bütün olarak homojenize edilip TNF-α, IL-6, IL-1β sitokin gen ekspresyonuna bu homojenatın tamamında bakılması; spesifik olarak inflamatuar hücrelerin (M1 makrofaj, effektör T hücreleri, PMNL) düzeyine ve bu hücrelerde spesifik olarak sitokin salınımı aktivitesine bakılamamasından kaynaklı olduğu tarafımızca düşünülmektedir. Gelecekte indirekt bilirubinin CIN üzerine etkisinin değerlendirildiği invivo deneysel hayvan çalışmalarında böbrek dokusunda akım sitometri ya da immunohistokimyasal doku boyama yöntemleri ile inflamatuar hücre (M1 makrofaj, efektör CD4/CD8 T hücreler, PMNL) düzeyleri değerlendirilerek ve/veya FACS metodu ile inflamatuar hücre izolasyonu yapılıp bu hücrelerde selektif olarak inflamatuar sitokin salınım düzeylerine gen ekspresyonu ya da protein analizi ile bakılarak indirekt bilirubinin böbrek dokusundaki inflamatuar reaksiyon üzerine etkisi daha belirgin olarak değerlendirilebilir.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Çalışmamızdaki kısıtlılıkları başta; hayvan etiği, kontrast nefropati indüklenmesi sırasında tedavi ve kontrol grubunda meydana gelen denek kayıpları gibi faktörlerden kaynaklı örneklem sayısındaki yetersizlik oluşturmaktadır. Bu grup büyüklüğündeki düşüklük istatiksel analizde anlamlılık düzeyine erişimi engellemede önde gelen neden olarak durmaktadır. Bunun yanında teknik alt yapı ve finansal kısıtlılıklardan kaynaklı; biyokimyasal analizde, böbrek fonksiyonunu değerlendirmede kreatinine göre üstün olan sistatin C (117) analizi; histopatolojik analizde, apoptototik hücre tespiti için TUNEL boyama ve genel bilgiler bölümünde CIN patomekanizmasında yer alan enzim, protein ve reseptörlere yönelik immunohistokimyasal ve elektron mikroskobi değerlendirmesi; gerçek zamanlı PCR ile TNF-α, IL-6, IL-1β dışında apoptoz, nekroz, inflamasyon ve hücre içi tehlike sinyal yolaklarında yer alan enzim, reseptör, protein ve sitokinlerin gen ekspresyonu düzeyinde analizi; Western Blot ya da ELISA gibi yöntemler ile patomekanizmada yer alan yapıların protein düzeyinde analizi; immunohistokimya ve FACS/akım

sitometri gibi yöntemlerle böbrek dokusundaki inflamatuar hücre düzeylerinin ve inflamatuar aktivitelerinin değerlendirilmesi yapılamamıştır.

Sonuç olarak, deneysel çalışmamızın kısıtlılıklarına rağmen dışarıdan verilen indirekt bilirubin molekülünün kontrast ilişkili nefropatide doku hasarını azalttığı ve böbrek fonksiyonlarını (serum üre-kreatinin, idrar kreatinin düzeyleri) örneklem sayısının azlığından kaynaklı istatistiksel anlamlılık düzeyine erişemese de iyileştirdiği gözlemlenmiştir. Çalışmamız doğrudan dışarıdan verilen indirekt bilirubinin CIN üzerine etkisini değerlendiren ilk deneysel hayvan çalışması niteliğini taşımasının yanında, bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutacak niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

1. Persson PB, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium–induced nephropathy. Kidney Int. 2005;68(1):14-22.

2. Mehran R, Nikolsky E. Contrast-induced nephropathy: definition, epidemiology, and patients at risk. Kidney Int. 2006;69:S11-5.

3. Geenen RW, Kingma HJ, van der Molen AJ. Contrast-induced nephropathy: pharmacology, pathophysiology and prevention. Insights Imaging. 2013;4(6):811-20.

4. Mamoulakis C, Tsarouhas K, Fragkiadoulaki I, Heretis I, Wilks MF, Spandidos DA, vd. Contrast-induced nephropathy: Basic concepts, pathophysiological implications and prevention strategies. Pharmacol Ther. 2017;180:99-112.

5. Sousa-Uva M, Neumann FJ, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, vd. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. Eur J Cardiothorac Surg. 01 Ocak 2019;55(1):4-90.

6. Fujii M, Inoguchi T, Sasaki S, Maeda Y, Zheng J, Kobayashi K, vd. Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD (P) H oxidase. Kidney Int. 2010;78(9):905-19.

7. Kim JY, Lee DY, Kang S, Miao W, Kim H, Lee Y, vd. Bilirubin nanoparticle preconditioning protects against hepatic ischemia-reperfusion injury. Biomaterials. 2017;133:1-10.

8. Takei R, Inoue T, Sonoda N, Kohjima M, Okamoto M, Sakamoto R, vd. Bilirubin reduces visceral obesity and insulin resistance by suppression of inflammatory cytokines. PLoS One. 2019;14(10):e0223302.

9. Kasap B, Soylu A, Ertoy Baydar D, Kiray M, Tuğyan K, Kavukçu S. Protective Effects of Bilirubin in an Experimental Rat Model of Pyelonephritis. Urology. 01 Aralık 2012;80(6):1389.e17-1389.e22.

10. Vuruşkan E, Saraçoğlu E. Bilirubin levels are associated with contrast-induced nephropathy in peripheral artery disease. Angiology. 2017;68(8):728-33.

11. Huang SS, Huang PH, Wu TC, Chen JW, Lin SJ. Association of serum bilirubin with contrast-induced nephropathy and future cardiovascular events in patients undergoing coronary intervention. 2012;

12. Farquhar MG. The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. J Clin Invest. 2006;116(8):2090-3.

13. Behrends Jan C. Niere und Salz-/Wasserhaushalt. Içinde: Duale Reihe, Physiologie. 3. bs Thieme; 2016. s. 295-337.

14. Chibuzo AL, Uche EC, Jerome NS. Intravascular Contrast Media in Radiography: Historical Development & Review of Risk Factors for Adverse Reactions. Am J Clin Res. 2016;3(1):1-10.

15. Chandiramani R, Cao D, Nicolas J, Mehran R. Contrast-induced acute kidney injury. Cardiovasc Interv Ther. 2020;35(3):209-17.

16. Kdigo A. Guideline: Chapter 4: contrast-induced AKI. Kidney Int Suppl. 2012;2:69-88.

17. McDonald JS, McDonald RJ, Comin J, Williamson EE, Katzberg RW, Murad MH, vd. Frequency of acute kidney injury following intravenous contrast medium administration: a systematic review and meta-analysis. Radiology. 2013;267(1):119-28.

18. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. Am J Kidney Dis. 2002;39(5):930-6.

19. Rihal CS, Textor SC, Grill DE, Berger PB, Ting HH, Best PJ, vd. Incidence and prognostic importance of acute renal failure after percutaneous coronary intervention. circulation. 2002;105(19):2259-64.

20. Azzalini L, Poletti E, Lombardo F, Laricchia A, Beneduce A, Moscardelli S, vd. Risk of contrast-induced nephropathy in patients undergoing complex percutaneous coronary intervention. Int J Cardiol. 2019;290:59-63.

21. Zungur M, Gul I, Tastan A, Damar E, Tavli T. Predictive value of the mehran score for contrast-induced nephropathy after transcatheter aortic valve implantation in patients with aortic stenosis. Cardiorenal Med. 2016;6(4):279-88.

22. Kumar D, Liaquat H, Sial JA, Saghir T, Kumari R, Kumar H, vd. Risk Factors Associated With Contrast-Induced Nephropathy after Primary Percutaneous Coronary Intervention. Cureus. 2020;12(8).

23. Hasan A, Cosar SO, Selma A, Doganay K, Aydin C, Emlek N, vd. Incidence and risk factors of contrast-induced nephropathy after diagnostic or interventional coronary angiography. Eur Res J. 2017;3(1):16-24.

24. Shoukat S, Gowani SA, Jafferani A, Dhakam SH. Contrast-Induced Nephropathy in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. Hamm CW, editör. Cardiol Res Pract. 19 Eylül 2010;2010:649164.

25. Mehran R, Aymong ED, Nikolsky E, Lasic Z, Iakovou I, Fahy M, vd. A simple risk score for prediction of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention: development and initial validation. J Am Coll Cardiol. 2004;44(7):1393-9.

26. Persson AEG, Lai EY, Gao X, Carlström M, Patzak A. Interactions between adenosine, angiotensin II and nitric oxide on the afferent arteriole influence sensitivity of the tubuloglomerular feedback. Front Physiol. 2013;4:187.

27. Zeynalov E, Jones SM, Elliott JP. Vasopressin and vasopressin receptors in brain edema. Vitam Horm. 2020;113:291-312.

28. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. J Vet Intern Med. 2019;33(2):363-82.

29. Schnermann J, Traynor T, Yang T, Arend L, Huang YG, Smart A, vd. Tubuloglomerular feedback: new concepts and developments. Kidney Int. 1998;54:S40-5.

30. Gori T, Dragoni S, Di Stolfo G, Forconi S. Endothelium and haemorheology. Ann-Ist Super SANITA. 2007;43(2):124.

31. Salmon AH, Satchell SC. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. J Pathol. 2012;226(4):562-74.

32. Salmon AH, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ, vd. Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. J Am Soc Nephrol. 2012;23(8):1339-50.

33. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene. 2004;23(16):2838-49.

34. Kaleli HN, Ozer E, Kaya VO, Kutlu O. Protein kinase C isozymes and autophagy during neurodegenerative disease progression. Cells. 2020;9(3):553.

35. Xu R, Hu J. The role of JNK in prostate cancer progression and therapeutic strategies. Biomed Pharmacother. 2020;121:109679.

36. Özbek K, Ceyhan K, Koç F, Söğüt E, Altunkaş F, Karayakalı M, vd. The protective effect of single dose tadalafil in contrast-induced nephropathy: An experimental study. Anatol J Cardiol. 2015;15(4):306.

37. Zhang F, Lu Z, Wang F. Advances in the pathogenesis and prevention of contrast-induced nephropathy. Life Sci. 2020;259:118379.

38. Michael A, Faga T, Pisani A, Riccio E, Bramanti P, Sabbatini M, vd. Molecular mechanisms of renal cellular nephrotoxicity due to radiocontrast media. BioMed Res Int. 2014;2014.

39. Liu XH, Chen GG, Vlantis AC, Gary MT, van Hasselt CA. Iodine induces apoptosis via regulating MAPKs-related p53, p21, and Bcl-xL in thyroid cancer cells. Mol Cell Endocrinol. 2010;320(1-2):128-35.

40. Popović M, Smiljanić K, Dobutović B, Syrovets T, Simmet T, Isenović ER. Thrombin and vascular inflammation. Mol Cell Biochem. 2012;359(1):301-13.

41. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, vd. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Cell Death Differ. 2018;25(3):486-541.

42. Heyman SN, Rosen S, Khamaisi M, Idée JM, Rosenberger C. Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. Invest Radiol. 2010;45(4):188-95.

43. Crow JP, Beckman JS. The role of peroxynitrite in nitric oxide-mediated toxicity. Role Nitric Oxide Physiol Pathophysiol. 1995;57-73.

44. Guo Y, Li W, Qian M, Jiang T, Guo P, Du Q, vd. D-4F Ameliorates Contrast Media–Induced Oxidative Injuries in Endothelial Cells via the AMPK/PKC Pathway. Front Pharmacol. 2021;11:2226.

45. Nazıroğlu M, Yoldaş N, Uzgur EN, Kayan M. Role of contrast media on oxidative stress, Ca2+ signaling and apoptosis in kidney. J Membr Biol. 2013;246(2):91-100.

46. Yang D, Yang D, Jia R, Ding G. Selective inhibition of the reverse mode of Na+/Ca2+ exchanger attenuates contrast-induced cell injury. Am J Nephrol. 2013;37(3):264-73.

47. Artal-Sanz M, Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. FEBS Lett. 13 Haziran 2005;579(15):3287-96.

48. Kusirisin P, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Contrast-induced nephropathy and oxidative stress: mechanistic insights for better interventional approaches. J Transl Med. 2020;18(1):1-35.

49. Wong PCY, Li Z, Guo J, Zhang A. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. Int J Cardiol. 2012;158(2):186-92.

50. Guan X feng, Chen Q jie, Zuo X cong, Guo R, Peng X dong, Wang J lin, vd. Contrast Media-Induced Renal Inflammation Is Mediated Through HMGB1 and Its Receptors in Human Tubular Cells. DNA Cell Biol. 01 Ocak 2017;36(1):67-76.

51. Tan X, Zheng X, Huang Z, Lin J, Xie C, Lin Y. Involvement of S100A8/A9-TLR4-NLRP3 inflammasome pathway in contrast-induced acute kidney injury. Cell Physiol Biochem. 2017;43(1):209-22.

52. Chaudière J, Ferrari-Iliou R. Intracellular Antioxidants: from Chemical to Biochemical Mechanisms. Food Chem Toxicol. 1999;37(9):949-62.

53. Levine Glenn N., Bates Eric R., Blankenship James C., Bailey Steven R., Bittl John A., Cercek Bojan, vd. 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention: Executive Summary. J Am Coll Cardiol. 06 Aralık 2011;58(24):2550-83.

54. Briguori C, Visconti G, Focaccio A, Airoldi F, Valgimigli M, Sangiorgi GM, vd. Renal Insufficiency After Contrast Media Administration Trial II (REMEDIAL II). Circulation. 2011;124(11):1260-9.

55. Brar SS, Aharonian V, Mansukhani P, Moore N, Shen AYJ, Jorgensen M, vd. Haemodynamic-guided fluid administration for the prevention of contrast-induced acute kidney injury: the POSEIDON randomised controlled trial. The Lancet. 24 Mayıs 2014;383(9931):1814-23.

56. Qian G, Fu Z, Guo J, Cao F, Chen Y. Prevention of Contrast-Induced Nephropathy by Central Venous Pressure–Guided Fluid Administration in Chronic Kidney Disease and Congestive Heart Failure Patients. JACC Cardiovasc Interv. 11 Ocak 2016;9(1):89-96.

57. Ozcan EE, Guneri S, Akdeniz B, Akyıldız İZ, Senaslan O, Baris N, vd. Sodium bicarbonate, N-acetylcysteine, and saline for prevention of radiocontrast-induced nephropathy. A comparison of 3 regimens for protecting contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary procedures. A single-center prospective controlled trial. Am Heart J. 01 Eylül 2007;154(3):539-44.

58. Merten GJ, Burgess WP, Gray LV, Holleman JH, Roush TS, Kowalchuk GJ, vd. Prevention of Contrast-Induced Nephropathy With Sodium BicarbonateA Randomized Controlled Trial. JAMA. 19 Mayıs 2004;291(19):2328-34.

59. Siew ED, Liu KD. Contrast-Induced Acute Kidney Injury in the PRESERVE Trial: Lessons Learned. Clin J Am Soc Nephrol CJASN. 2018/04/19 bs 07 Haziran 2018;13(6):949-51.

60. Quintavalle C, Fiore D, De Micco F, Visconti G, Focaccio A, Golia B, vd. Impact of a High Loading Dose of Atorvastatin on Contrast-Induced Acute Kidney Injury. Circulation. 18 Aralık 2012;126(25):3008-16.

61. null null. Acetylcysteine for Prevention of Renal Outcomes in Patients Undergoing Coronary and Peripheral Vascular Angiography. Circulation. 13 Eylül 2011;124(11):1250-9.

62. Vogt B, Ferrari P, Schönholzer C, Marti HP, Mohaupt M, Wiederkehr M, vd. Prophylactic hemodialysis after radiocontrast media in patients with renal insufficiency is potentially harmful. Am J Med. 15 Aralık 2001;111(9):692-8.

63. Andreucci M, Solomon R, Tasanarong A. Side effects of radiographic contrast media: pathogenesis, risk factors, and prevention. BioMed Res Int. 2014/05/11 bs 2014;2014:741018-741018.

64. Andreucci M, Faga T, Pisani A, Sabbatini M, Russo D, Michael A. Prevention of contrast-induced nephropathy through a knowledge of its pathogenesis and risk factors. ScientificWorldJournal. 2014/11/30 bs 2014;2014:823169-823169.

65. Hansen TWR, Wong RJ, Stevenson DK. Molecular Physiology and Pathophysiology of Bilirubin Handling by the Blood, Liver, Intestine, and Brain in the Newborn. Physiol Rev. 01 Temmuz 2020;100(3):1291-346.

66. Valášková P, Muchová L. Metabolism of bilirubin and its biological properties. Klin Biochem Metab. 2016;24(4).

67. Jansen PLM. Diagnosis and management of Crigler-Najjar syndrome. Eur J Pediatr. 01 Kasım 1999;158(2):S089-94.

68. Hopkins PN, Wu LL, Hunt SC, James BC, Vincent GM, Williams RR. Higher Serum Bilirubin Is Associated With Decreased Risk for Early Familial Coronary Artery Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 01 Şubat 1996;16(2):250-5.

69. Novotný L, Vítek L. Inverse Relationship Between Serum Bilirubin and Atherosclerosis in Men: A Meta-Analysis of Published Studies. Exp Biol Med. 01 Mayıs 2003;228(5):568-71.

70. Singer S, Pilpel N, Pinhas-Hamiel O. Gilbert syndrome in patients with type 1 diabetes—Prevalence, glycemic control, and microalbuminuria. Pediatr Diabetes. 2017;18(8):803-7.

71. Uribe-Weichers AC, Gómez-Pérez FJ, Lam-Chung CE, Cuevas-Ramos D. Patients with Gilbert syndrome and type 2 diabetes have lower prevalence of microvascular complications. Metab Open. 2021;11:100114.

72. Han SS, Na KY, Chae DW, Kim YS, Kim S, Chin HJ. High Serum Bilirubin Is Associated with the Reduced Risk of Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy. Tohoku J Exp Med. 2010;221(2):133-40.

73. Novák P, Jackson AO, Zhao GJ, Yin K. Bilirubin in metabolic syndrome and associated inflammatory diseases: New perspectives. Life Sci. 2020;257:118032.

74. Bulmer AC, Verkade HJ, Wagner KH. Bilirubin and beyond: a review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. Prog Lipid Res. 2013;52(2):193-205.

75. Oh SW, Lee ES, Kim S, Na KY, Chae DW, Kim S, vd. Bilirubin attenuates the renal tubular injury by inhibition of oxidative stress and apoptosis. BMC Nephrol. 2013;14(1):1-12.

76. Adin CA, VanGundy ZC, Papenfuss TL, Xu F, Ghanem M, Lakey J, vd. Physiologic doses of bilirubin contribute to tolerance of islet transplants by suppressing the innate immune response. Cell Transplant. 2017;26(1):11-21.

77. Durante W. Protective role of heme oxygenase-1 against inflammation in atherosclerosis. Front Biosci Landmark Ed. 2011;16:2372.

78. Vogel ME, Idelman G, Konaniah ES, Zucker SD. Bilirubin prevents atherosclerotic lesion formation in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by inhibiting endothelial VCAM-1 and ICAM-1 signaling. J Am Heart Assoc. 2017;6(4):e004820.

79. Gundamaraju R, Vemuri R, Chong WC, Bulmer AC, Eri R. Bilirubin attenuates ER stress-mediated inflammation, escalates apoptosis and reduces proliferation in the LS174T colonic epithelial cell line. Int J Med Sci. 2019;16(1):135.

80. Bianco A, Tiribelli C, Bellarosa C. Translational Approach to the Protective Effect of Bilirubin in Diabetic Kidney Disease. Biomedicines. 2022;10(3):696.

81. Tran DT, Jeong YY, Kim JM, Bae HB, Son SK, Kwak SH. The anti-inflammatory role of bilirubin on "two-hit" sepsis animal model. Int J Mol Sci. 2020;21(22):8650.

82. Abo El Gheit R, Emam MN. Targeting heme oxygenase-1 in early diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. Physiol Int. 2016;103(4):413-27.

83. Boon AC, Bulmer AC, Coombes JS, Fassett RG. Circulating bilirubin and defense against kidney disease and cardiovascular mortality: mechanisms contributing to protection in clinical investigations. Am J Physiol-Ren Physiol. 2014;307(2):F123-36.

84. Liu J, Dong H, Zhang Y, Cao M, Song L, Pan Q, vd. Bilirubin increases insulin sensitivity by regulating cholesterol metabolism, adipokines and PPARγ levels. Sci Rep. 2015;5(1):1-12.

85. Stec DE, Hosick PA, Granger JP. Bilirubin, renal hemodynamics, and blood pressure. Front Pharmacol. 2012;3:18.

86. Kawamura K, Ishikawa K, Wada Y, Kimura S, Matsumoto H, Kohro T, vd. Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular endothelial activation and dysfunction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(1):155-60.

87. Wen G, Yao L, Hao Y, Wang J, Liu J. Bilirubin ameliorates murine atherosclerosis through inhibiting cholesterol synthesis and reshaping the immune system. J Transl Med. 2022;20(1):1-18.

88. Ai W, Bae S, Ke Q, Su S, Li R, Chen Y, vd. Bilirubin Nanoparticles Protect Against Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. J Am Heart Assoc. 2021;10(20):e021212.

89. Adin CA, Croker BP, Agarwal A. Protective effects of exogenous bilirubin on ischemia-reperfusion injury in the isolated, perfused rat kidney. Am J Physiol-Ren Physiol. 2005;288(4):F778-84.

90. Almeida LS de, Barboza JR, Freitas FPS, Porto ML, Vasquez EC, Meyrelles SS, vd. Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats. Hum Exp Toxicol. 2016;35(11):1194-202.

91. Jaffé M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. 1886;

92. Fabiny DL, Ertingshausen G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifiChem. Clin Chem. 1971;17(8):696-700.

93. TALKE, H., SCHUBERT, G. E. ENZYMATISCHE HARNSTOFFBESTIMMUNG IN BLUT UND SERUM IM OPTISCHEN TEST NACH WARBURG [ENZYMATIC UREA DETERMINATION IN THE BLOOD AND SERUM IN THE WARBURG OPTICAL TEST. Klin Wochenschr. 01 Şubat 1965;1(43):174-5.

94. WEICHSELBAUM T. E. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. Am J Clin Pathol. Mart 1946;(10):40-9.

95. Doumas BT, Ard Watson W, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clin Chim Acta. 01 Ocak 1971;31(1):87-96.

96. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. İçinde: Histopathology. Springer; 2014. s. 31-43.

97. Foot NC. The Masson trichrome staining methods in routine laboratory use. Stain Technol. 1933;8(3):101-10.

98. Yamabayashi S. Periodic acid—Schiff—Alcian Blue: A method for the differential staining of glycoproteins. Histochem J. 1987;19(10):565-71.

99. Navarro A, Tolivia J, Valle E del. Congo red method for demonstrating amyloid in paraffin sections. J Histotechnol. 1999;22(4):305-8.

100. Jozefczuk J, Adjaye J. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. İçinde: Methods in enzymology. Elsevier; 2011. s. 99-109.

101. Gao Z, Zhang Z, Gu D, Li Y, Zhang K, Dong X, vd. Hemin mitigates contrast-induced nephropathy by inhibiting ferroptosis via HO-1/Nrf2/GPX4 pathway. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2022;

102. Barabas K, Milner R, Farese J, Baylis C, Croker B, Archer L, vd. Hyperbilirubinemia's protective effect against cisplatin nephrotoxicity in the Gunn rat. Anticancer Drugs. 2008;19(5):495.

103. Boon AC, Lam AK, Gopalan V, Benzie IF, Briskey D, Coombes JS, vd. Endogenously elevated bilirubin modulates kidney function and protects from circulating oxidative stress in a rat model of adenine-induced kidney failure. Sci Rep. 2015;5(1):1-16.

104. Toprak O, Cirit M, Tanrisev M, Yazici C, Canoz O, Sipahioglu M, vd. Preventive effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats. Nephrol Dial Transplant. 2008;23(3):853-9.

105. 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):753-61.

106. Koc E, Reis KA, Ebinc FA, Pasaoglu H, Demirtas C, Omeroglu S, vd. Protective effect of beta-glucan on contrast induced-nephropathy and a comparison of beta-glucan with nebivolol and N-acetylcysteine in rats. Clin Exp Nephrol. 2011;15(5):658-65.

107. Kiss N, Hamar P. Histopathological evaluation of contrast-induced acute kidney injury rodent models. BioMed Res Int. 2016;2016.

108. Osman AMM, Alqahtani AA, Damanhouri ZA, Al-Harthy SE, ElShal MF, Ramadan WS, vd. Dimethylsulfoxide excerbates cisplatin-induced cytotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma cells. Cancer Cell Int. 2015;15(1):1-9.

109. Morassi P, Massa F, Mesesnel E, Magris D, D'Agnolo B. Treatment of amyloidosis with dimethyl sulfoxide (DMSO). Minerva Med. 1989;80(1):65-70.

110. Scheinberg MA, Pernambuco JC, Benson MD. DMSO and colchicine therapy in amyloid disease. Ann Rheum Dis. 1984;43(3):421-3.

111. 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):128-39.

112. Rodrigues CM, Solá S, Silva R, Brites D. Bilirubin and amyloid-β peptide induce cytochrome c release through mitochondrial membrane permeabilization. Mol Med. 2000;6(11):936-46.

113. Lu Z, Cheng D, Yin J, Wu R, Zhang G, Zhao Q, vd. Antithrombin III protects against contrast-induced nephropathy. EBioMedicine. 2017;17:101-7.

114. Kunak CS, Ugan RA, Cadirci E, Karakus E, Polat B, Un H, vd. Nephroprotective potential of carnitine against glycerol and contrast-induced kidney injury in rats through modulation of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and apoptosis. Br J Radiol. 2016;89(1058):20140724.

115. Machado RA, Constantino L de S, Tomasi CD, Rojas HA, Vuolo FS, Vitto MF, vd. Sodium butyrate decreases the activation of NF-κB reducing inflammation and

oxidative damage in the kidney of rats subjected to contrast-induced nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2012;27(8):3136-40.

116. Huang ZW, Shi Y, Zhai YY, Du CC, Zhai J, Yu RJ, vd. Hyaluronic acid coated bilirubin nanoparticles attenuate ischemia reperfusion-induced acute kidney injury. J Controlled Release. 2021;334:275-89.

117. Kumaresan R, Giri P. A comparison of serum cystatin C and creatinine with glomerular filtration rate in Indian patients with chronic kidney disease. Oman Med J. 2011;26(6):421.

7. ÖZGEÇMİŞ

I-Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı: Fatih ÜNAL

Doğum yeri ve tarihi:

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: [redacted]

Yabancı dili: Almanca(C1), İngilizce (B2)

II-Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru):

08.09.2017'den itibaren Türkiye Yüksek İhtisas akabinde Ankara Şehir Hastanesi'nde Kardiyoloji Uzmanlık Eğitimi

05.2017-08.2017: Kocaeli Üniversitesi Kardiyoloji Uzmanlık Eğitimim

2015-2017: Medizinische Doktorarbeit, Albert Ludwigs Universitat Herzzentrum, Ateroskleroz Çalışma Grubu Freiburg im Breisgau, Almanya

2007-2014: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

2004-2008: Karabük Anadolu Öğretmen Lisesi

2001-2004: 60 yıl Vali Nafiz Kayalı ilköğretim Okulu

1997-2001: Wunstorf Oststadtschule (ilkokul), Almanya

1996-1997: Eskipazar Merkez 60. Yıl İlköğretim Okulu

III -Mesleki Deneyimi:

2014 Eylül – 2015 Haziran: Eskipazar Devlet Hastanesi – Pratisyen Hekim

02.05.2017 – 23.08.2017: Kocaeli Üniversitesi Kardiyoloji Asistan Hekim

08.09.2017'den itibaren Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi ve Ankara Şehir Hastanesi- Kardiyoloji asistanı olarak

IV- Bilimsel Yayınlar:

1- Ünal, F. (2020). Die Rolle des P2Y6 Rezeptors im Metabolischen Syndrom (Doctoral dissertation, Dissertation, Universität Freiburg, 2020).

2- Stachon, P., Geis, S., Peikert, A., Heidenreich, A., Michel, N. A., Ünal, F., ... & Zirlik, A. (2016). Extracellular ATP induces vascular inflammation and atherosclerosis via purinergic receptor Y2 in mice. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 36(8), 1577-1586.

3- Von Garlen, S., Merz, J., Stachon, P., Albrecht, P., Uenal, F., Bode, C., & Zirlik, A. (2017). P1590P2y6 depletion enhances metabolic activity and ameliorates outcome of high fat diet induced obesity in mice. European Heart Journal, 38(suppl_1).

8. EKLER

EK1. HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL ONAY FORMU

Evrak Tarih ve Sayısı: 16.02.2022 - E.100948

T.C.
KARABÜK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : E-55212866-050.99-100948 16.02.2022
Konu : 2022/2/1 Nolu Karar

Sayın Prof. Dr. Mehmet Timur SELÇUK

Karabük Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna proje yürütücüsü olarak sunmuş olduğunuz "***Sıçanlarda unkonjuge bilirubin intraperitoneal enjeksiyonunun kontrast ilişkili nefropati üzerine etkisi***" başlıklı tıpta uzmanlık projeniz 10.02.2022 tarihinde yapılan etik kurul toplantısında amaç, gerekçe ve uygulamayla ilgili olarak Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre incelenmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu: BSNKTEJ3Y5 Belge Doğrulama Adresi : https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=4043&eD=BSAK9K6F55&eS=100948

Adres: Karabük Üniversitesi Demir Çelik Kampüsü Merkez/Karabük
Telefon: 444 0478
e-Posta: iletisim@karabuk.edu.tr İnternet Adresi: http://www.karabuk.edu.tr
Kep Adresi: karabukuniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Muharrem KARA
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni

EK 2. TEZ KONUSU ONAY FORMU

Uzmanlık Öğrencisinin Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Fatih Ünal
Uzmanlık Dalı:	Kardiyoloji
Eğitim Kurumu:	Ankara Şehir Hastanesi
Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi:	02/05/2017
Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi:	22/05/2017
Program Yöneticisinin Adı Soyadı:	Prof. Dr. Mehmet Timur Selçuk
Tez Danışmanının Adı Soyadı: **Telefon:** **E-Posta:**	Prof. Dr. Mehmet Timur Selçuk

***Araştırma/Tez Konusu (Study Title)** Sıçanlarda unkonjuge (indirekt) bilirubin intraperitoneal enjeksiyonunun kontrast ilişkili nefropati üzerine etkisi
1-Araştırma Sorusu (Research problem) Kontrast ilişkili nefropati mekanizmasında yer alan apoptoz, nekroz, ,nflamasyon ve medüller vazokonstriksiyonun patomekanizma işleyişi nasıldır? Hangi risk faktörleri altında kontrast ilişkili nefropati gelişmesi kolaylaşmaktadır? Kontrast ilişkili nefropati patomekanizmasında yer alan apoptoz, proinflamasyon gibi faktörler baskılandığında oluşan nefropatolojinin gerilemesine katkı sağlanabilir mi?

2-Arka Plan ve Gerekçe (Background/rationale)

Girişimsel Kardiyoloji ’de sıklıkla kullandığımız kontrast maddeler (Iohexol, Iopamidol, Ioversol vb.); özellikle altta yatan anemi, ileri yaş (>75 yaş), hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, kronik böbrek hastalığı, diyabet gibi patolojiler varlığında renal dokuda apoptoz, nekroz, medüller vazokonstriksiyon, ateroemboli gibi mekanizmalar üzerinden nefropati, nefron hasarı oluşturabilmektedir. Risk faktörleri arttıkça kontrast ilişkili nefropati olasılığı da katlanarak artmaktadır. Kontrast ilişkili nefropati tanım olarak; herhangi bir sebeple kontrast maruziyeti (kontrastlı CT; Koroner Anjiyografi, Periferik Anjiyografi) sonrası ilk 48 saat ya da 72 saat içerisinde, özellikle de maruziyetten 24 saat sonra kreatinin seviyesinde 0,5 mg/dl artış ya da GFR değerinde %25-30 oranında kayıp olmasıdır.[1] Oluşan nefropati hastalarda geçici/kalıcı böbrek hasarlarına, geçici/kalıcı hemodiyaliz ihtiyacına, hastanede yatış süresi uzamasına, mortalite ve morbidite artışlarına sebebiyet vermektedir.[2] Bu patolojiyi önlemek; iyileştirmek ya da progresyonu engellemek amacıyla pek çok klinik ve deneysel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar: intravenöz hidrasyon, endotelin reseptör antagonisti (Bosentan, Ambrisentan), adenozin reseptör antagonisti (Teofilin), Asetilsistein, Statin (Atorvastatin, Rosuvastatin) Vitamin E vb. gibi metotları/ Antioksidanları/ Vazodilatatör ajanları içermektedir[2]. Ancak hiçbiri iv. hidrasyon dışında kardiyoloji tedavi kılavuzunda sınıf I endikasyonu sağlamamaktadır[3]. Planladığımız bu çalışmada antiapoptotik; antioksidan[4–6] özellikleri gösterilmiş indirekt/unkonjuge bilirubinin kontrast ilişkili nefropati patogenezinin modellendiği Wistar Albino cinsi sıçanlarda patolojinin gerilemesinde; buna ikincil olarak böbrek fonksiyonlarında iyileşmesinde faydasının olup olmadığını değerlendirmeyi hedefliyoruz. Literatürde daha önce indirekt bilirubin ile igili diyabetik nefropati üzerine yapılmış deneysel çalışma mevcut olup[7] kontrast ilişkili nefropati üzerine bilirubin düzeyi ile istatistiksel ilişkisini gösteren klinik çalışmalar[8, 9] incelenmiş ancak; herhangi bir deneysel-hayvan çalışmasına rastlanmamıştır. Planladığımız bu çalışma unkonjuge bilirubinin hayvanlarda modellenmiş kontrast nefropati üzerine etkisini; nefropatolojinin regresyonunu sağlayıp sağlamadığını; patolojiyi regrese ediyorsa hangi mekanizma ya da mekanizmaların altta yatabileceğini gösteren ilk deneysel hayvan çalışması niteliğini taşıyacaktır.

1. Persson PB, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium–induced

nephropathy. Kidney Int. 2005;68(1):14-22.

2. Mamoulakis C, Tsarouhas K, Fragkiadoulaki I, et al. Contrast-induced nephropathy: Basic concepts, pathophysiological implications and prevention strategies. Pharmacol Ther. 2017;180:99-112.

3. Franz-Josef Neumann, Miguel Sousa-Uva, Anders Ahlsson, Fernando Alfonso, Adrian P Banning, Umberto Benedetto, Robert A Byrne, Jean-Philippe Collet, Volkmar Falk, Stuart J Head, Peter Jüni, Adnan Kastrati, Akos Koller, Steen D Kristensen, Josef Niebauer, Dimitrios J Richter, Petar M Seferović, Dirk Sibbing, Giulio G Stefanini, Stephan Windecker, Rashmi Yadav, Michael O Zembala, ESC Scientific Document Group, 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization, European Heart Journal, Volume 40, Issue 2, 07 January 2019, Pages 87–165

4. Kadl A, Pontiller J, Exner M, Leitinger N. Single bolus injection of bilirubin improves the clinical outcome in a mouse model of endotoxemia. Shock. 2007;28(5):582-588.

5. Kim JY, Lee DY, Kang S, et al. Bilirubin nanoparticle preconditioning protects against hepatic ischemia-reperfusion injury. Biomaterials. 2017;133:1-10.

6. Takei R, Inoue T, Sonoda N, et al. Bilirubin reduces visceral obesity and insulin resistance by suppression of inflammatory cytokines. PloS One. 2019;14(10):e0223302.

7. Fujii M, Inoguchi T, Sasaki S, et al. Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD (P) H oxidase. Kidney Int. 2010;78(9):905-919.

8. Vuruşkan E, Saraçoğlu E. Bilirubin levels are associated with contrast-induced nephropathy in peripheral artery disease. Angiology. 2017;68(8):728-733.

9. Park S, Kim DH, Hwang JH, et al. Elevated bilirubin levels are associated with a better renal prognosis and ameliorate kidney fibrosis. PloS One. 2017;12(2):e0172434.

3-Araştırma amacı (Objectives)

Bizim bu çalışmadaki amacımız; önceki klinik ve deneysel çalışmalarda antioksidan,

antiapoptotik, antiinflammatuar etkinliği gösterilmiş Hem molekülünün metaboliti indirekt bilirubinin deneysel yolla sıçanlarda modellenen kontrast ilişkili nefropatiyi geriletip geriletmediğini, Serumda: üre; kreatinin, sodyum, potasyum, sistatin C ölçümü; 24 saatlik idrarda: kreatinin, total protein; spot idrarda: üre kreatinin, sodyum, klorür ve albumin ölçümü ile renal fonksiyonları değerlendirmektir. Ayriyeten renal dokudaki inflamatuar ve apoptotik süreci takip edebilmek için immunohistokimyasal boyama yöntemi (Bax, Bcl-2, Caspase 3, p38 MAPKI, sitokrom-C hedeflerine yönelik); ELISA (p38 MAPK, Bax, Bcl2, Caspase 3) ve gerçek zamanlı gen ekspreyon (sitokrom-C, TNF-alfa, IFN-Ɣ, IL-6) analizleri yapılacaktır. Bu analiz metotları sayesinde kontrol grubuna göre indirekt/unkonjuge bilirubinin kontrast ilişkili nefropatoloji regresyonu üzerine etkinliğinin olup olmadığını; patolojiyi geriletiyorsa bunu hangi mekanizmalar aracılığı ile yaptığını değerlendirme imkanı elde edilecektir. Çalışma sonucu anlamlılık düzeyine ulaşırsa, çalışmamız gelecekte indirekt billirubin kontrast ilişkili nefropati tedavisi üzerine yapılacak bilirubin türevli ilaç çalışmalarına öncülük edebilir.

4-Hipotez (Hypothesis)

İndirekt bilirubin antiinflammatuar, antioksidan ve antiapoptotik özellikleri sayesinde kontrast ilişkili gelişmiş nefropati sürecini geriletebilir ve patolojinin iyileşmesine katkı sağlayabilir.

5-Araştırma türü/tasarım (Study Design)

Deneysel hayvan çalışması/ Deneysel-Gözlemsel çalışma

6- Araştırma yeri (Study Setting/ Location)

Ankara Şehir Hastanesi & Karabük Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi

7- Araştırmaya katılanlar/denekler (Study Population)

8 haftalık Wistar Albino cinsi Rat/Sıçan.

Deneysel çalışma için Karabük Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul'una başvurulacaktır. Etik Kurul'dan geçince Sıçanlar Karabük Üniversitesi Deney Hayvanları

merkezinden temin edilecektir.

8- Araştırmanın birincil ve ikincil sonuç değişkenleri (Primary and Secondary Outcome)

Birincil Sonuç: İndirekt bilirubinin kontrast ilişkili nefropati geliştirilen sıçanlarda saline enjekte edilen kontrast nefropatololi kontrol grubuna göre renal fonksiyonlar üzerine etkisi değerlendirilecektir.

İkincil Sonuç: İndirtekt Bilirubin'in kontrast ilişkili nefropati patomekanizmasına regresyon yönünden katkısı incelenecektir.

9- Araştırma Süreçleri (Study procedures)

Kontrast ilişkili nefropati protokolü: 24 saat su kısıtlamasından sonra Wistar Albino cinsi sıçanlara intraperitoneal (i.p.) N^G –Nitro-L-Arjinin-Metil Ester (L-NAME) 10 mg/kg ve Indometazin 10 mg/kg enjekte edilip; ardından 15 dk. sonra 3g/kg Iohexol intravenöz (i.v.) enjekte edilerek kontrast nefropati indüklenmesi planlanmaktadır. [1]

1. Almeida, L. S. D., Barboza, J. R., Freitas, F. P. S., Porto, M. L., Vasquez, E. C., Meyrelles, S. S., ... & Pereira, T. M. C. (2016). Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats. *Human & experimental toxicology*, *35*(11), 1194-1202.

İndirekt bilirubin enjeksiyon protokolü: 2 farklı doz (30 mg/kg; 50mg/kg) 2 farklı Rat grubuna 10 gün süre ile uygulanacaktır. Amacımız deney protokolü sonucunda indirekt bilirubinin farklı dozlarda renal fonkisyon ve nefronlardaki antiapoptotik etkinliği üzerine etkilerini biyokimyasal ve immunohistokimyasal analizlerle incelemek ve kontrol-salin grubuna göre kıyaslamaktır. Çalışmada belirlediğimiz dozlar önceki çalışmalara dayanmaktadır. Çalışmalar ekte sunulmuştur. [1,2]

1. Kadl A, Pontiller J, Exner M, Leitinger N. Single bolus injection of bilirubin improves the clinical outcome in a mouse model of endotoxemia. *Shock*. 2007;28(5):582-588.

2. Vogel, Megan E., et al. "Bilirubin prevents atherosclerotic lesion formation in

low-density lipoprotein receptor-deficient mice by inhibiting endothelial VCAM-1 and ICAM-1 signaling." Journal of the American Heart Association 6.4 (2017): e004820.

Histopatolojik incelemeler: Renal dokudaki Apoptatik süreçleri takip etmek için kullanılacaktır.

Tespit edilen dokular (%10'luk formalin) rutin doku takip cihazına alınarak parafinde bloklanacaktır. Her bir bloktan, adhesivli lama her bir boya için 5 um kalınlığında (Leica RM2255) hazırlanan kesitler; deparafinasyon ve rehidrasyon aşamalarından sonra Harris'in Hematoksilen-Eozin yöntemiyle boyanarak; otomatik kapatma makinesinde (Leica CV5030) lamel ile kapatılacaktır.

TUNEL ve İmmunohistokimyasal boyamalar, kullanılacak olan kit'in prosedürüne göre yapılacaktır. İmmunohistokimyasal boyamalar için primer antikor olarak phospho-p38 MAPK, caspase kullanılacaktır. Boyamalar ışık mikroskobu altında (Leica DM4000) değerlendirilerek, gerekli görülen alanlar fotoğraflanacaktır (Leica DFC-280)

Sarflar :

TUNEL Boyama :

In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Applied Science 50 preparation) [1]

İmmunohistokimyasal Boyamalar :

Rabbit polyclonal antibody to phospho-p38 MAPK (Cell Signaling Technology) [2]

Caspase-3 rabbit anti-rat polyclonal antibody (Abcam) [1]

Anti-Bcl-2 antibody (ab194583) (Abcam)

Recombinant Anti-Bax antibody [E63] (ab32503) (Abcam)

UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/DAB (Catalog No # TP-015-HD)[3]

1. Zhao, B., Zhao, Q., Li, J., Xing, T., Wang, F., & Wang, N. (2015). Renalase protects against contrast-induced nephropathy in Sprague-Dawley rats. *PloS*

one, *10*(1), e0116583.

2. Gong, X., Duan, Y., Zheng, J., Wang, Y., Wang, G., Norgren, S., & Hei, T. K. (2016). Nephroprotective effects of N-acetylcysteine amide against contrast-induced nephropathy through upregulating thioredoxin-1, inhibiting ASK1/p38MAPK pathway, and suppressing oxidative stress and apoptosis in rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2016*.

3. Gobé, G., Rubin, M., Williams, G., Sawczuk, I., & Buttyan, R. (2002). Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer investigation*, *20*(3), 324-332.

Serum örneklerinde biyokimyasal analiz:

İlmed İlaç ve Medikal Sistemler A.Ş. HITACHI marka Biyokimya Cihazında Roche Firmasının Kitlerini ve analiz metodlarını kullanarak Serumda Üre, Kreatinin, Sodyum, Potasyum, Klorür, Total/İndirekt Bilirubin Düzeyleri, Total Protein, Albumin analizi yapılacaktır.

-Sistatin C; Total Antioksidant Status; Total Oxidant Status ölçüm Dia-Gen Firmasında ölçümler yapılacaktır.

24 saatlik idrarda:

Ankara Şehir Hastaneleri Merkez Labartuvarı'nda Siemens Marka Biyokimya Cihazı ile Siemens'in kendi kitlerini kullanarak

Spot İdrarda: Üre, kreatinin, sodyum, potasyum, klorür, albumin

24 saatlik toplam idrarda: Kreatinin, total protein, sodyum

ölçümleri yapılacaktır.

Gen Ekspresyon Analizi: Böbrek dokusundan RNA izolasyon kitleri vasıtasıyla RNA izolasyonu yapılıp Reverse Transkriptaz Enzim aracılığı ile mRNA lar cDNA'ya dönüştürüldükten sonra BioRad Cihazında IL-6, TNF-α, ß-actin, IFN Ɣ, sitokrom C, Caspase 9 sitokin ve proteinlere yönelik hedef qPCR primerleri ile Gen Ekspresyon

analizi DiaGen firmasında yapılacaktır.[1]

1. Siegling, A., Lehmann, M., Platzer, C., Emmrich, F., & Volk, H. D. (1994). A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *Journal of immunological methods*, *177*(1-2), 23-28.

ELISA Analizi: Caspase-3[1],BCL-2[2], p38-MAPK[3] proapoptotik işaretler ELISA yöntemi ile kit metodolojisine uyarak DiaGen Laboratuvarında analiz edilecektir.

1. Jing, D., Bai, H., & Yin, S. (2017). Renoprotective effects of emodin against diabetic nephropathy in rat models are mediated via PI3K/Akt/GSK-3β and Bax/caspase-3 signaling pathways. *Experimental and therapeutic medicine*, *14*(5), 5163-5169.
2. Kutschka, I., Kofidis, T., Chen, I. Y., Von Degenfeld, G., Zwierzchoniewska, M., Hoyt, G., ... & Robbins, R. C. (2006). Adenoviral human BCL-2 transgene expression attenuates early donor cell death after cardiomyoblast transplantation into ischemic rat hearts. *Circulation*, *114*(1_supplement), I-174.
3. Bas, E., Van De Water, T. R., Gupta, C., Dinh, J., Vu, L., Martínez-Soriano, F., ... & Marco, J. (2012). Efficacy of three drugs for protecting against gentamicin-induced hair cell and hearing losses. *British journal of pharmacology*, *166*(6), 1888-1904.

İstatistiksel Analiz:

Cihazın otomatik olarak hesapladığı Ct değerleri Livak metodu kullanılarak Graph-Pad Prism8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programında analiz edilecektir. Analizlerden alınan verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesi Minitap 14 (Tek Yönlü ANOVA) kullanılarak yapılacak, elde edilen sonuçlar $p<0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir

10-Örnek büyüklüğü ve istatistiksel güç (Sample size and statistical power)

Deneysel çalışmada 3 gurup bulunacaktır. Gruplardan biri kontrol diğer ikisi ise deney grubudur. G power analizi ile grup başına minimum 8 denek hesaplanmış olup toplam örneklem sayısı 24 tür.

11- İstatistiksel yöntemler (Statistical methods)

Analizlerden alınan verilerin istatistiksel olarak değerlendirmesi Minitap 14 (Tek Yönlü ANOVA) ve student t testleri kullanılarak yapılacak, elde edilen sonuçlar $p<0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilecektir

12-Etik Öngörü (Ethical Considerations)

Deney hayvanlarının bakımı, barınması, beslenmesi, deney sonunda doku ve organizma analizi için ötenazi işleminin uygulanması 15 Ekim 1978 tarihinde ilan edilen Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi'ne uygun yapılacaktır.

13- Anahtar kelimeler (Key words)

Kardiyoloji, Moleküler Biyoloji, Nefropati, İndirekt Bilirubin, Iohexol