

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA RADYOKONTRAST MADDE
NEFROPATİSİNİ ÖNLEMEDE MONTELUKAST'IN NF-KB,
NOX4 VE P22 PHOX EKSPRESYONU ARACILI ETKİSİ

OĞUZHAN ŞİMŞEK
0000-0003-2756-8440

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
Farmakoloji Yüksek Lisans Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
TEMMUZ 2021

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2018970032

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA RADYOKONTRAST MADDE
NEFROPATİSİNİ ÖNLEMEDE MONTELUKAST'IN NF-KB,
NOX4 VE P22 PHOX EKSPRESYONU ARACILI ETKİSİ

OĞUZHAN ŞİMŞEK
0000-0003-2756-8440

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
Farmakoloji Yüksek Lisans Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mualla Aylin ARICI
0000-0003-2221-9356

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü
tarafından 2019.KB.SAG.068 sayı ile desteklenmiştir.

İZMİR
TEMMUZ 2021

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “Sıçanlarda Radyokontrast Madde Nefropatisini Önlemede Montelukast’ın NF-KB, NOX4 ve p22 phox Ekspresyonu Aracılı Etkisi” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Oğuzhan ŞİMŞEK

14/07/2021

TEŐEKKÖR

Tezimin planlanması ve yürütölmesi aşamalarında tez danışmanım Doç. Dr. M. Aylin ARICI'ya, hayvan modellemesi kısımlarında, Arş. Gör. Dr. Canet İNCİR ve Prof. Dr. Osman YILMAZ'a, biyokimyasal ve moleküler analizler kısımlarında Arş. Gör. Elif Barış ve Dr. Zehra Tavşan'a, son olarak tüm Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'na desteklerini esirgemedikleri için teşekkürlerimi sunarım.



SIÇANLARDA RADYOKONTRAST MADDE NEFROPATİSİNİ ÖNLEMEDE MONTELUKAST'IN NF-KB, NOX4 VE P22 PHOX EKSPRESYONU ARACILI ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Oğuzhan ŞİMŞEK

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Farmakoloji Anabilim Dalı**

ÖZET

Kontrast madde nefropatisi patofizyolojisinde, serbest oksijen radikallerinde artış, inflamasyon ve apoptozis gözlenmektedir. NADPH oksidaz 4, daha çok böbrekte eksprese edilen, p22phox ile ko-lokalize ve reaktif oksijen türlerinin üretiminde regülatör enzimdir. Montelukast, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik etkilere sahiptir. Bu çalışmada, montelukast profilaksisinin sıçanlarda kontrast madde nefropatisini önlemede NF- κ B, NOX4 ve p22 phox ekspresyonu aracılı etkisi araştırılmıştır.

Nefropati modeli; 15 dakika ara ile sırasıyla 10 mg/kg indometazin, 10 mg/kg NG-Nitro-L-arjinin metil ester ve 3 g I/kg ioheksol enjeksiyonlarıyla 16 saatlik susuzluk periyodu sonrasında 6.günde oluşturulmuştur. Sıçanlar 8. günde tiyopental sodyum anestezisi altında sakrifiye edilmiştir. Tüm enjeksiyonlar, intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Nefropati modelinin uygulanmasından sonra; serum KIM-1 seviyeleri, TNF- α , NF- κ B, NOX4, p22phox ve KIM-1 mRNA ekspresyonları, doku ROS seviyeleri, tübüler hasar skoru ve apoptozis kontrol grubuna göre artmıştır. 10 mg/kg montelukast uygulaması, serum KIM-1 seviyelerini, TNF- α , NF- κ B, NOX4, p22phox ve KIM-1 mRNA ekspresyonlarını, doku ROS seviyelerini ve NF- κ B p65 protein ekspresyonlarını azaltmıştır.

Sonuçlar montelukast profilaksisinin, kontrast madde nefropatisinde koruyucu etkisi bulunduğunu göstermektedir. Montelukast, kontrast madde nefropatisini önlemede etkili olabilecek bir ajandır. Montelukast profilaksisinin etkililiğinin değerlendirilmesi için ileri araştırmalar gereklidir.

Anahtar Sözcükler: Kontrast madde nefropatisi, montelukast, oksidatif stres, NOX4, p22phox

Tezin Sayfa Adedi: 76

Danışman: Doç. Dr. M. Aylin ARICI

**PREVENTITATIVE EFFECT OF MONTELUKAST IN THE
RADIOCONTRAST INDUCED NEPHROPATHY IN RATS VIA NF-KB,
NOX4 AND P22 PHOX EXPRESSION**

**Master Thesis
Oğuzhan ŞİMŞEK**

**DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE
Department of Pharmacology
ABSTRACT**

In pathophysiology of contrast-induced nephropathy, reactive oxygen species generation, inflammation and apoptosis are observed. NOX4 is mostly expressed in the kidney, co-localized with p22phox and main regulatory enzyme for ROS generation. Montelukast has antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties. Therefore this study investigated the effect of montelukast pre-treatment for preventing contrast-induced nephropathy in rats, via NF- κ B, NOX4 and p22 phox expressions.

Nephropathy model was initiated by administration of 10 mg/kg indomethacin, 10 mg/kg NG-Nitro-L-arginine methyl ester and 3 g I/kg iohexol at 15-minute intervals after 16h of water deprivation on 6th day. Rats were sacrificed on the 8th day under thiopental sodium anesthesia. All enjections are performed intraperitoneally. After the initiation of nephropathy model; serum KIM-1 levels, TNF- α , NF- κ B, NOX4, p22phox and KIM-1 mRNA expressions, tissue ROS levels, tubular injury score and apoptosis increased compared to control group. Administration of 10 mg/kg montelukast, decreased serum KIM-1 levels, TNF- α , NF- κ B, NOX4, p22phox and KIM-1 mRNA expressions, tissue ROS levels and NF- κ B p65 protein expression.

These results suggest that montelukast pre-treatment has a protective effect in contrast-induced nephropathy. It is possible that montelukast could be used as a useful agent for preventing contrast-induced nephropathy. Further studies needed for evaluating the efficacy of montelukast pretreatment in contrast-induced nephropathy.

Keywords: Contrast-induced nephropathy, montelukast, oxidative stress, NOX4, p22phox

Page Number: 76

Advisor: Assoc. Prof. M. Aylin ARICI

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kontrast Madde	3
2.1.1. Kontrast Maddelerin Yapısı ve Sınıflandırılması	3
2.1.2. Kontrast Maddelerin Farmakokinetik Özellikleri.....	4
2.1.3. Kontrast Maddelerin Yan Etkileri	5
2.2 Kontrast Madde Nefropatisi	6
2.2.1 Kontrast Madde Nefropatisinde Patofizyoloji	8
2.2.2 NADPH Oksidaz	12
2.2.3 NADPH Oksidaz 4 ve p22 phox.....	14
2.2.4 Kontrast Madde Nefropatisinde Tedavi ve Profilaksi	15
2.3 Montelukast	15
2.3.1 Montelukastın Farmakokinetik Özellikleri.....	16
2.3.2. Montelukastın Advers Reaksiyonları	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
3.1 Araştırmanın Tipi	18
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	18
3.3 Çalışma Materyali	18
3.5 Araştırmanın Değişkenleri	19
3.6 Veri Toplama Araçları.....	19
3.6.1 Kontrol grubu.....	23
3.6.2 Kontrast madde nefropatisi grubu	24
3.6.3 Montelukast grubu	24
3.6.4 Montelukast+kontrast madde nefropatisi grubu	24

İÇİNDEKİLER (DEVAMI)

3.6.5 Biyokimyasal ve moleküler analizler	25
3.6.6 Histolojik analizler.....	33
3.7 Araştırma Planı ve Takvimi	37
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi.....	38
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları	38
4. BULGULAR.....	39
4.1 Biyokimyasal ve Moleküler Analizlerin Bulguları	39
4.1.1 Serum ve idrar kreatinin düzeyleri	39
4.1.2 Serum KIM-1 düzeyleri	40
4.1.3 Doku reaktif oksijen türleri düzeyleri.....	41
4.1.4 TNF- α , KIM-1, NF- κ B, NOX4 ve p22 phox mRNA düzeyleri	41
4.1.5 NF- κ B Protein Ekspresyonu	46
4.2 Histolojik Analiz Bulguları	47
4.2.1 İmmünohistokimyasal bulgular	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER.....	73
9. KATKI	74
10. ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACTB	Beta aktin
APS	Amonyum persülfat
BT	Bilgisayarlı tomografi
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CysLT	Sisteinil lökotrien
DAB	Diaminobenzidin
DEÜTF	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DUOX	Dual oksidaz
ECL	Gelişmiş kemilüminesans
Ex	Eksitasyon
Em	Emisyon
ET	Endotelin
GFR	Glomerüler filtrasyon hızı
HRP	Yabancur peroksidazı
HOCM	Yüksek ozmolar kontrast madde
IL-6	İnterlökin-6
i.a.	İntraarteriyel
i.p.	İntraperitoneal
i.v.	İntravenöz
IOCM	İzoosmolar kontrast madde
kDa	Kilodalton
KIM-1	Böbrek Hasar Molekülü-1 (Kidney Injury Molecule-1)
KMN	Kontrast madde nefropatisi
L-NAME	L-Nitro arjinin metil ester (L-NG-Nitro arginine methyl ester)
LOCM	Düşük osmolar kontrast madde
LTD4	Lökotrien D4
MNH	Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	Nükleer faktör kappa-B
NO	Nitrik oksit
NOX	NADPH oksidaz
NSAİİ	Nonsteroid anti inflamatuvar ilaç
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffer Saline)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVDF	Poliviniliden florür
RENOX	Renal oksidaz
RNA	Ribonükleik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBS	Tris tamponlu salin
TBST	Tris-Tamponlu Salin-Tween 20
TEMED	N,N,N,N'-Tetrametil etilendiamin
TMB	Tetrametilbenzidin
TNF-α	Tümör nekrozis faktör-alfa

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Triiodobenzen türevi olan ioheksolün kimyasal yapısı.....	3
Şekil 2. Kontrast madde nefropatisinde moleküler mekanizmaların değişimi.....	11
Şekil 3. NOX4 ve p22 phox'un yapısı.....	14
Şekil 4. Montelukast sodyumun kimyasal yapısı.....	16
Şekil 5. Deneysel çalışmanın akış şeması.....	23
Şekil 6. Araştırma planı ve takvimi.....	37
Şekil 7. Deney gruplarında serum KIM-1 düzeyleri.....	40
Şekil 8. Deney gruplarında doku reaktif oksijen türleri düzeyleri.....	41
Şekil 9. Deney gruplarında TNF- α mRNA ekspresyon düzeyleri.....	42
Şekil 10. Deney gruplarında NOX4 mRNA ekspresyon düzeyleri.....	43
Şekil 11. Deney gruplarında p22phox mRNA ekspresyon düzeyleri.....	44
Şekil 12. Deney gruplarında KIM-1 mRNA ekspresyon düzeyleri.....	45
Şekil 13. Deney gruplarında NF- κ B mRNA ekspresyon düzeyleri.....	46
Şekil 14. Deney gruplarında, böbrek dokusuna ait homojenatlarda gösterilen nükleer NF- κ B p65 proteinin Western Blot görüntüleri.....	46
Şekil 15. Deney gruplarında, böbrek dokusuna ait homojenatlarda gösterilen nükleer NF- κ B p65 protein ekspresyonu düzeyleri.....	47
Şekil 16. Deney gruplarında böbrek dokusuna ait histolojik görüntülemeler.....	48
Şekil 17. Deney gruplarında böbrek dokusuna ait kaspaz-3 immünhistokimyasal boyama örnekleri.....	50
Şekil 18. Deney gruplarında kaspaz-3 immünhistokimyasal boyama skoru ortalaması.....	51

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Kullanımda olan kontrast maddelerin bazı fizikokimyasal özellikleri.....	4
Tablo 2. Kontrast madde yan etkilerinin faktörleri ve karakteristikleri.....	6
Tablo 3. Kontrast madde nefropatisi gelişimi açısından risk faktörleri.....	7
Tablo 4. NOX izoformları ve eksprese edildiği doku ve hücreler.....	13
Tablo 5. Kullanılan cihazlar.....	19
Tablo 6. Kullanılan sarf malzemeleri.....	20
Tablo 7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için ilgili genlerin forward ve reverse sekansları.....	28
Tablo 8. Rutin doku takibi.....	34
Tablo 9. Hematoksilen-eozin boyama protokolü.....	34
Tablo 10. Randomize edilen sıçanların bazal ve deney sonu ağırlıkları.....	39
Tablo 11. Serum ve idrar kreatinin düzeyleri.....	40
Tablo 12. Histolojik skorlama tablosu.....	49

1. GİRİŞ VE AMAC

Kontrast madde kullanımı, radyolojik görüntüleme tekniklerinin gelişmesi ve yeni kontrast madde ajanlarının kullanıma girmesi nedeniyle günümüzde oldukça artmıştır. Kontrast maddelerin intravasküler uygulanması sonrasında ani olarak gelişen ve böbrek fonksiyonlarındaki ciddi azalma, kontrast madde nefropatisi (KMN) olarak tanımlanmıştır (1).

Kontrast madde nefropatisinde, serum kreatinin konsantrasyonu, normal değerinden 0.5 mg/dL veya %25 daha fazla olduğunda nefropati gelişimi yönünde değerlendirilmektedir (2). Ayrıca, serum kreatinin seviyeleri dışında sistatin C, böbrek hasarı molekülü-1 (KIM-1), nötrofil jelatinaz lipokalin-2 (NGAL), interlökin-18, beta-2 mikroglobulin (β_2 M) seviyelerinin daha hassas ve erken biyobelirteçler olabileceği ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (3).

Kontrast madde nefropatisinin patofizyolojisi multifaktöriyel olup, birkaç mekanizma ile gelişmektedir. İntravenöz kontrast madde enjeksiyonu sonrasında endotelin aracılı gerçekleşen vazokonstriksiyon, nitrik oksit (NO) aracılı vazodilasyonun inhibisyonu ve düz kaslardaki intrasellüler kalsiyum seviyelerindeki değişim şiddetli vazokonstriksiyonu tetikler. Renal kan akımının vazokonstriksiyon nedeniyle azalması sonucunda böbrek hasarı, reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınımı ve kontrast maddenin tübüller üzerinde direkt toksik etkisi sonucu akut tübüller hasar oluşması ile gerçekleşir (4,5).

NADPH oksidaz (NOX), membrana bağlı olup, NADPH'den moleküler oksijene iki elektron transferi ile süperoksit radikali oluşumunu sağlayan katalitik bir enzimdir. NOX enzim ailesi; NOX1-5 ve Dual oksidaz (DUOX) 1-2 olmak üzere yedi adet izoformdan oluşmaktadır (6). NOX4 böbrek dokusunda ağırlıklı olarak bulunan izoform olup, çoğunlukla tübüller, fibroblastlar, mesangial hücreler ve podositlerde eksprese edilmektedir (7). p22 phox, birçok NOX izoformunun stabilizasyonu ve aktivasyonunda rol alan membran bağlı olan bir proteindir (8). Oksidatif strese bağlı böbrekte NADPH oksidazın, böbrekte en yaygın bulunan izoformu olan p22phox ile ko-lokalize olan NOX4 ekspresyonunda artış yanı sıra inflamasyonla orantılı olarak Nükleer Faktör kappa B (NF- κ B) aktivasyonunda da

artış gözlenmektedir. Kontrast madde nefropatisinde, NOX4'ün aktivasyonuna bağlı gelişen oksidatif stres ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (9).

Montelukast, astım tedavisinde kullanılan anti-inflamatuar ve antioksidan özellikleri tanımlanmış bir sisteinil lökotrien-1 (CysLT) reseptör antagonistidir (10). Literatürde, montelukastın sıçanlarda farklı akut ve kronik böbrek hasarı modellerinde antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri gösterilmiştir (11–13).

Bu çalışmada, sıçanlarda kontrast madde uygulaması sonrasında gelişen nefropatide, antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik etkileri bilinen montelukast profilaksisinin NOX4, p22 phox ve NF-κB ekspresyonları aracılı etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

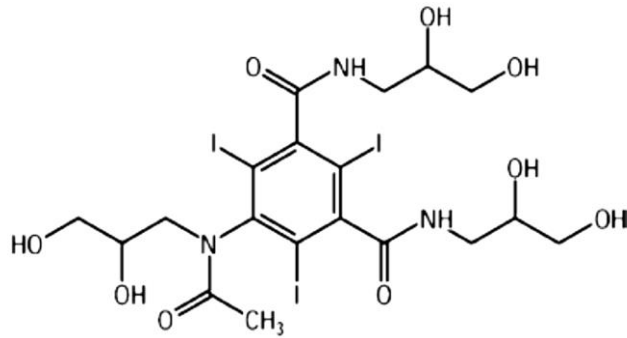
2.1 Kontrast Madde

Kontrast maddeler, uzun yıllardır anatomik sınırların görüntülenmesi ve normal/anormal fizyolojik bulguların değerlendirilmesinde oldukça yaygın olarak kullanılan ajanlardır. İyot içeren kontrast maddeler, X-ışınlarının absorpsiyonunu artırarak vücuttaki yapıların görüntülenmelerine olanak verirler. İyot içeren kontrast maddenin, x-ışınlarını absorbe etme yeteneği, görüntülenecek dokuda bulunan iyot moleküllerinin sayısına bağlıdır ve görüntüleme için kullanılan x-ışını enerjisi ile ters orantılıdır. Kontrast maddeler, sıklıkla intravasküler, enteral ve direkt enjeksiyon yolları ile uygulanırlar (14).

İyot içeren kontrast maddeler ilk olarak 1950’li yıllarda klinikte kullanıma girmiş olup, günümüzde dünya çapında yılda 75 milyon dozdan fazla kullanıldığı bilinmektedir (15).

2.1.1. Kontrast Maddelerin Yapısı ve Sınıflandırılması

Günümüzde kullanılan kontrast maddeler 2,4,6-triiodobenzen türevlerinin kimyasal modifikasyonudur. Kontrast maddeler fizikokimyasal yapıları dikkate alınarak; iyonik özellik, osmolarite ve moleküler özellikler olmak üzere üç grupta sınıflandırılırlar (16).



Şekil 1. Triiodobenzen türevi olan iohexolün kimyasal yapısı (17).

Kontrast maddeler, iyonik özelliklerine göre iyonik veya non-iyonik olarak iki alt grupta sınıflandırılırlar. Kanın osmolaritesi dikkate alınarak (~290 mOsm/kg) sınıflandırıldığında yüksek osmolar (HOCM: High Osmolar Contrast Media), düşük osmolar (LOCM: Low Osmolar Contrast Media) ve izoosmolar (IOCM: Isoosmolar Contrast Media) olarak üç alt grupta sınıflandırılırlar. Yüksek osmolar kontrast maddelerin osmolaritesi, plazmadan 5-8 kat daha fazla, düşük osmolar kontrast maddelerin osmolaritesi plazmadan 2-3 kat daha az ve izoosmolar kontrast maddelerin osmolaritesi plazma ile eşittir.

Tablo 1. Kullanımda olan kontrast maddelerin bazı fizikokimyasal özellikleri (17).

Etken Madde	İyot Miktarı (mg I/mL)	İyonik Özelliği	Yapısı	Ozmolarite
Diatrizoat	146	İyonik	Monomer	HOCM
İoksitalamat	300	İyonik	Monomer	HOCM
Iopamidol	370	Non-İyonik	Monomer	LOCM
İoheksol	350	Non-İyonik	Monomer	LOCM
Iopromid	370	Non-İyonik	Monomer	LOCM
İoksaglat	320	İyonik	Dimer	LOCM
Iodixanol	320	Non-İyonik	Dimer	IOCM

Tıbbi görüntüleme yöntemlerinin gelişimi ile şu an rutinde kullanılan çok sayıda kontrast madde vardır (18). İdeal bir kontrast madde, uygulama sonrası tamamen vücuttan atılmalı ve hastada herhangi bir toksik etkiye neden olmamalıdır.

2.1.2. Kontrast Maddelerin Farmakokinetik Özellikleri

İntravasküler enjeksiyon sonrasında kontrast maddeler, hızlı bir şekilde intravasküler ve interstisyel sıvılara dağılım eğilimindedir. Kontrast maddelerin dağılım yarı ömrü 2-30 dakika arasında değişse de genellikle dakikalar içerisinde gerçekleşir. Sadece %1-3 kadarı plazma proteinlerine bağlanır (19).

Kontrast maddeler, metabolize edilmezler fakat hızlı bir şekilde böbreklerden glomerüler filtrasyon ile elimine edilirler. Eliminasyon yarı ömürleri 1-2 saat arasında değişmektedir (19). Kontrast maddelerin intravasküler enjeksiyonu

sonrasında böbrek fonksiyonları normal olan hastalarda tama yakın oranda idrar ile atılırken, böbrek fonksiyonlarında azalma olan hastalarda bu süre 40 saati aşabilmekte, kontrast maddeler alternatif olarak safra yoluyla atılabilmektedir (19).

2.1.3. Kontrast Maddelerin Yan Etkileri

Kontrast madde kullanımına bağlı olarak yan etki insidansı, osmolaritesi yüksek kontrast maddelerde %5-12 iken, osmolaritesi düşük kontrast maddelerde %1-3'tür (20). Kontrast maddelere karşı gelişen advers reaksiyonların nedeni, tam olarak anlaşılamasa da birden çok faktöre bağlı olması olasıdır. Kontrast maddelere bağlı olarak gözlenen advers reaksiyonlar, anafilaktoid (idiosenkratik) tip ve diğer advers reaksiyonlar olarak sınıflandırılabilir (18).

Anafilaktoid reaksiyonlar, hafif (kaşınma, ürtiker, mide bulantısı, kusma), orta (bronkospazm, dispne, taşikardi/bradikardi, laringal ödem) ve şiddetli (nöbet, senkop, ciddi aritmiler, hipotansiyon, şiddetli bronkospazm ve ölüm) olarak sınıflandırılır (21). Ciddi ve ölümcül komplikasyonlara neden olabilirler. Etiyolojileri tam olarak açıklanamasa da, enzim indüksiyonu, histamin ve serotonin gibi vazoaaktif maddelerin salınımı, kompleman sisteminin aktivasyonu ile geliştikleri bildirilmektedir (22). Görülme sıklığı astım hastalarında (5 kat), kardiyovasküler ve renal hastalıkları bulunan hastalarda, önceden kontrast maddeye karşı advers reaksiyon gelişen hastalarda (4-6 kat) ve beta bloker kullanan hastalarda daha yüksektir.

Diğer advers reaksiyonlar arasında; sıcak basması, metalik tat alma, mide bulantısı, kusma, bradikardi, hipotansiyon, vazovagal reaksiyonlar ve nöropati, nöbet, anksiyete, göğüs ağrısı vardır. Bunlar, kontrast maddenin homeostazı bozması sonucunda gerçekleşir. Kontrast maddenin iyot içerip içermemesi, osmolaritesi, uygulama yolu ve uygulama hacmi de advers reaksiyon gelişimi açısından önemlidir (1,18,23).

Tablo 2. Kontrast madde kullanımında advers reaksiyon gelişme riski olan durumlar ve karakteristikleri

Faktör	Karakteristik
Yaş	Çocuklar ve 60 yaşından büyük yetişkinler
Cinsiyet	Kadınlarda erkeklere göre fazla
Komorbidite	Astım, kalp hastalıkları, dehidrasyon, renal hastalıklar, diyabet, önceden kontrast maddeye karşı advers reaksiyon gelişimi
Hematolojik Hastalıklar	Myelom, orak hücre anemisi ve polisitemi
İlaçlar	Nonsteroid anti inflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), interlökin-2 (IL-2), Beta blokerler, biguanidler
Kontrast madde	Hızlı enjeksiyon, intraarteriyel enjeksiyon (i.a.), 20 mg'dan fazla iyot enjeksiyonu

Bu advers reaksiyonların profilaksisinde ve tedavisinde kortikosteroidler (prednison, hidrokortizon, metilprednisolon) ve antihistaminikler (difenhidramin) kullanılır (24).

2.2 Kontrast Madde Nefropatisi

Kontrast Madde Nefropatisi (KMN), kontrast maddenin intravasküler enjeksiyonundan 48-72 saat sonra meydana gelen, üçüncü ila beşinci gün arasında pik yapan ve bazal serum kreatinin değerlerine kıyasla serum kreatinininde (sCr) mutlak (0.3 veya 0.5 mg/dL) veya göreceli (% 25) bir artış olarak tanımlanır. Serum kreatinin düzeyleri, 10-14 gün içinde bazal serum kreatinin düzeylerine döner (25). KMN tanısı açısından serum kreatinin seviyelerindeki değişimin yavaş kinetiği ve kreatininin yaş, cinsiyet, kas kütlesi, hidrasyon, diyet gibi faktörlerden etkilenmesi nedeniyle KMN'nin tanısında hassas ve erken tanıda yardımcı olabilecek farklı biyobelirteçlerin araştırılması devam etmektedir (26).

Erken tanıda sistatin C, böbrek hasarı molekülü-1 (KIM-1), nötrofil jelatinaz lipokalin-2 (NGAL), interlökin-18, beta-2 mikroglobulin (β_2 M) seviyelerinin daha hassas ve erken biyobelirteçler olabileceği ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır (3).

KMN'nde risk faktörleri, hasta ilişkili ve kontrast madde ilişkili olmak üzere iki grupta incelenebilir. Hasta ile ilişkili faktörler; kronik böbrek hastalığı, kontrast madde uygulanması öncesi var olan hipoperfüzyon (hipotansiyon, dehidratasyon vb.) kardiyovasküler hastalıklar (myokard infarktusu), anemi, metabolik sendrom, hiperürisemi ve nefrotoksik ilaç kullanımı olarak sıralanabilir (27). Kontrast madde ilişkili faktörler ise; görüntülemeye yüksek hacimlerde kontrast madde kullanımı, yüksek osmolar kontrast madde kullanımı, 72 saat içerisinde birden fazla kontrast maddeye maruziyet ve görüntüleme tekniği olarak sıralanabilir (27). Anjiyografi uygulamalarında KMN gelişme olasılığı Bilgisayarlı Tomografi (BT) uygulamalarına göre daha yüksektir.

Tablo 3. Kontrast madde nefropatisi gelişimi açısından risk faktörleri (27)

Hasta İlişkili Faktörler	• Renal yetmezlik • Diyabetik nefropati • Dehidrasyon • Hipotansiyon • Kardiyovasküler hastalıklar • Anemi • Metabolik sendrom • Hiperürisemi • Nefrotoksik ilaç kullanımı (NSAİİ, antiviral ilaçlar, aminoglikozidler, amfoterisin B, furosemid vb.)
Kontrast Madde İlişkili Faktörler	• Yüksek hacimde kontrast madde kullanımı • Yüksek osmolaritede kontrast maddeye maruziyet • 72 saat içerisinde kontrast maddeye birden fazla kez maruziyet

2.2.1 Kontrast Madde Nefropatisinde Patofizyoloji

Kontrast madde nefropatisinin patogenezi multifaktöriyeldir. Temel olarak kontrast maddeye bağılı olarak renal arteriyel kan akımında ve glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalma ile renal tubuler hasar gözlenmektedir (28). Afferent arteriyolde gelişen vazokonstriksiyon ve renal medüller iskeminin de KMN'nin patofizyolojisine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (29). Serum fizyolojik, volüm genişletici etkisi ile tübüler kan akımını artırmakta ve KMN'nde gelişen patolojileri geri çevirmede faydalı olmaktadır (30). Aynı zamanda kontrast madde nefropatisinde vazopresin, anjiyotensin II, dopamin, endotelin (ET) ve adenozin gibi renal vazokonstriktörlerin aktivitelerinde artma bildirilmektedir. Vazodilatörler ve vazokonstrüktörler, böbreklerdeki metabolik değişimlere karşı cevap olarak salınmakta ve mikrosirkülasyonun ayarlanmasında önemli rol oynamaktadırlar. Endotelden salınan endotelin ve adenozin böbrekte güçlü vazokonstriksiyon oluştururken, Nitrik Oksit (NO) ve prostaglandin E₂ (PGE₂) ise güçlü vazodilatörlerdendir (31,32).

Kontrast maddeler, böbrek tübüllerindeki transportu etkileyerek enerji ihtiyacını arttırmırlar. Adenozin trifosfat (ATP) bu ihtiyaç sonucu önce, adenozin difosfat (ADP)'ye sonra adenozin monofosfata (AMP) yıkılırlar. AMP, 5'nükleotidaz ile adenozine hidrolize edilir (33). Adenozin etkisini, A₁ ve A₂ olmak üzere iki reseptörü üzerinden gösterir. Adenozin A₁ reseptörünün blokajı diatrizoat enjekte edilen sıçanlarda renal kan akımını etkilememiştir (34). Adenozin A₂ reseptörleri üzerinden renal medüllada NO salınımı aracılı vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir (35).

NO, hipoksi durumunda endotelden salınan ve asetilkolin, bradikinin, ET, anjiotensin II salınımı ile stimüle edilen bir vazodilatördür (31). KMN'nde öne sürülen bir mekanizmaya göre, kontrast maddeye bağılı gelişen adenozin salınımına bağılı gelişen vazokonstriksiyon, ksantin oksidaz aktivitesi ile açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin (ROS) NO ile birleşmesi sonucu NO aracılı vazodilasyonu inaktive etmektedir (36). Renal medüller hipoksiye bağılı üretilen ROS'un salınımı da NO aracılı vazodilasyonun ortadan kalkmasına neden olabilmektedir (5).

Kontrast madde infüzyonu ile, plazma ET ve atrial natriüretik peptid (ANP) seviyelerinin 5 dakika içerisinde yükselmeye başladığı ve 30 dakika içerisinde bazal seviyesine döndüğü gösterilmiştir (4). Endotelin, ET_A reseptörü aracılığıyla vazokonstriksiyon, ET_B reseptörü aracılığıyla vazodilatasyona neden olan bir peptiddir. Kontrast maddelerin, *in vitro* ve *in vivo* deneysel çalışmalarda, ET salınımını indüklediği ve transkripsiyon seviyesinde ET mRNA düzeyleri artırdığı, ve ET_A reseptörü aracılı vazokonstriksiyona neden olduğu gösterilmiştir (37,38). Ayrıca endotelinin, endotelden prostasiklin ve NO salımı ile vazokonstriktör etkiyi baskıladığı gösterilmiştir (39).

Prostaglandinler, nefronlardan siklooksijenaz aktivitesi ile araşidonik asitten sentezlenen medyatörlerdir (40). PGE₂, G-proteini bağlı 4 adet E-prostanoid (EP) reseptörleri ile etkileşmektedir. EP₁ reseptörüne bağlanma sonucu renal vazokonstriksiyon ve sodyum reabsorpsiyonunun inhibisyonu, EP₂ reseptörüne bağlanma sonucu, glomerüler mikrosirkülasyonda dilatasyon ve anjiotensin-II, katekolaminler ve vazopresin aracılı vazokonstriksiyonu azaltma, EP₃ reseptörüne bağlanma ile vazopresinin su ve tuz transportu üzerindeki etkilerini antagonize etme ve EP₄ reseptörüne bağlanma sonucu renal vazodilatasyon ve renin salınımı gerçekleşmektedir (40). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, iotalamat sodyum (6 mL/kg) enjeksiyonu sonrasında kortikal ve medüller renal kan akımında azalma, beraberinde kortikal ve medüller NO seviyelerinde azalma ve kortikal PGE₂ seviyelerinde azalma gözlenmiştir (32). Prostrasiklin, endotelde prostasiklin sentaz aracılığıyla prostaglandinlerden sentezlenmekte olup, yarı ömrü 3 dakika olan bir vazodilatördür (39). Prostrasiklin analogu olan iloprostun, renal yetmezliği bulunan hastalarda KMN riskini azalttığı bir klinik çalışmada gösterilmiştir (41). Farklı bir klinik çalışmada PGE₁ analogu mizoprostolün, diyabetik ve NSAİİ kullanan hastalarda kontrast maddeye bağlı kreatinin seviyelerindeki yükselmeyi azalttığı gösterilmiştir (42). Prostaglandinler ve prostasiklinin kontrast madde nefropatisinde koruyucu etkileri olduğu belirgindir.

Oksidatif stres, KMN'nde ana patojenik faktörlerdendir. ROS, bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron çifti içeren moleküllerdir. Kontrast maddeler, yüksek oksidasyon potansiyelleri ile endotelial ve tübüler epitel hücrelerde hasara neden

olan ROS oluşumunu stimüle ederler. (43) ROS, KMN’nde birçok moleküler mekanizma ile etkileştiğinden önemli role sahiptir.

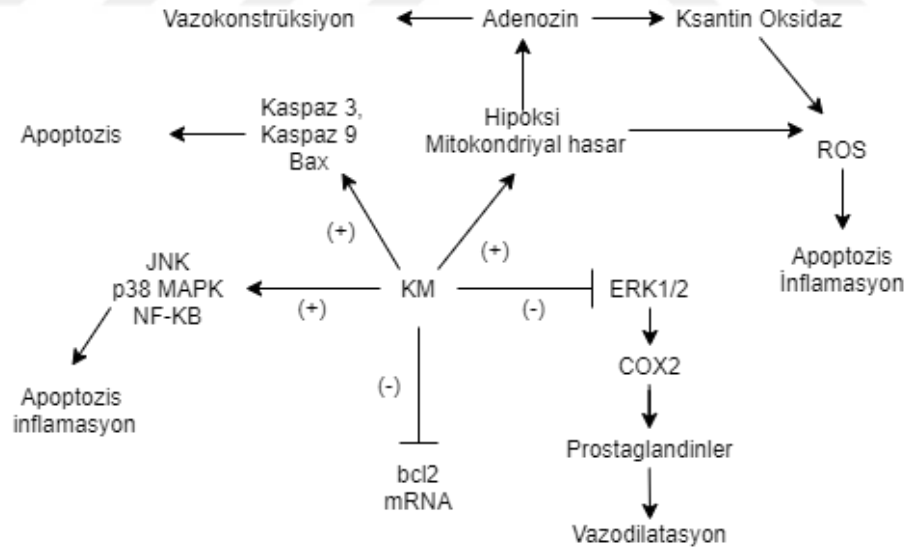
Antioksidan dengenin oksidanlar yönüne bozulması sonucunda mitokondrial ve nükleer DNA hasarı, lipid ve protein oksidasyonu gerçekleşmektedir (43). ROS, c-Jun N-terminal Kinazları (JNK) ve p38 Mitojen-Aktive Edici Protein Kinazları (p38 MAPK) aktive ederek apoptozis ve oluşan nekroza katkıda bulunmaktadırlar (44). Vazokonstrüksiyon nedeniyle mikrosirkülasyonun azalması hipoksi yaratırken hücrel ROS gelişimi, iskemi/reperfüzyon hasarını derinleştirir (43). Yaş ile birlikte oksidatif hasar artmakta fakat antioksidan mekanizmaların etkililiği azalmaktadır (45). Kronik böbrek hastalığı ve diyabet gibi endotel disfonksiyonu, vazokonstrüksiyon ve oksidatif stresin arttığı patolojilerde, diyabetik ve renal yetmezlikli hastalarda KMN görülme olasılığı oldukça artmaktadır (46).

Kontrast madde enjeksiyonuna bağlı olarak özellikle medullada ROS artışı, biyolojik membran bütünlüğünde, doku homeostazında bozulma ve apoptozise neden olmaktadır(47). Sodyum bikarbonatın ROS üretimini azaltmak suretiyle KMN’nde etkili olabileceği belirtilmektedir (48,49).

NADPH oksidaz (NOX), ROS oluşumu için ana düzenleyici enzimdir. Renal tübüler epitelyum ve vasküler endotelial hücre hasarının da göstergesidir. NADPH oksidaz ekspresyonu artışı SOR oluşumundaki artışla koreledir (50). Bu enzimin NOX1, NOX2, NOX4 ve NOX 5 gibi farklı izoformları bulunmaktadır. NOX4, böbrekte en fazla eksprese edilen “RENOX” olarak da adlandırılan bir izoformdur. NOX4 diğer izoformlardan farklı olarak aktivasyon için diğer alt birimler ile etkileşime girmez sadece membrana bağlı alt ünite olan p22 phox ile ko-lokalizedir ve bu haliyle yapısal olarak aktiftir. Bununla birlikte, NOX4’ün aktivasyonu için gerekli subunit olarak da tanımlanan p22 phox mRNA ve protein ekspresyonun patolojik koşullarda (yüksek glukoz, pro-inflamatuar sitokinler vb) arttığı da bildirilmektedir (51). Bazal membran ve mezenşimal hücrelerde yıkım ve nötrofil kemotaksisi de ROS üretimine katkıda bulunmaktadır (52). Allopürinol gibi ROS temizleyiciler ya da süperoksit dismutaz (SOD), kontrasta bağlı GFR ve renal kan akımındaki azalmayı önlemede etkili olmuşlardır (53).

Kontrast maddelerin tümü (LOCM, IOCM ve HOcm), endotelial ve renal tübüler epitel hücreleri üzerinde direkt toksik etkiye sahiptir. Kontrast maddelerin tamamının, hücre kültürü çalışmalarında proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir (54). Deneysel hayvan çalışmalarında eşlik eden iskemi/hipoksi olmadığı sürece kontrast maddelerin tek başına nadiren hasar oluşturduğu gözlenmiştir (55). Sitotoksik etkinin patofizyolojisi tam olarak açıklanamamış olsa da birkaç potansiyel mekanizma önerilmiştir. Kontrast maddenin apoptozis sinyal yolağında bulunan Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve B-hücreli lenfoma 2 (bcl2) yolağını direkt olarak etkileyebileceği bildirilmektedir (56). Farklı bir mekanizma olarak da kontrast maddelerin, mitokondriyal fonksiyonları değiştirerek kalsiyum regülasyonunu bozabileceği bildirilmiştir (57).

KMN'nin patogeneğinde inflamasyonun rol oynadığı, deneysel modellerde, böbrekte interlökin (IL)1-beta, IL-6 ve Monosit kemoatraktant protein (MCP)-1 ekspresyonlarında artma, NF-κB aktivasyonunda artma ve serum ve böbrek doku homejenatlarında tümör nekrozis faktör (TNF)-α, IL-6 artışı ile gösterilmektedir (58,59).



Şekil 2. Kontrast madde nefropatisinde moleküler mekanizmaların değişimi (60)

2.2.2 NADPH Oksidaz

NADPH oksidaz (NOX), membrana bağılı olup, NADPH'den moleküler oksijene iki elektron transferini ile süperoksit radikali oluşumunu sağlayan katalitik bir enzimdir. NOX enzim ailesi; NOX1-5 ve DUOX 1-2 olmak üzere yedi adet izoformdan oluşmaktadır (6). NOX alt birimleri, heterodimerik flavositokrom b558 içeren gp91phox ve p22 phox integral membran proteinlerdir (61). Stimüle edilmemiş koşullarda, multidomain regülatör alt üniteler p40phox, p47phox ve p67phox sitozolde kompleks halinde bulunur (61).

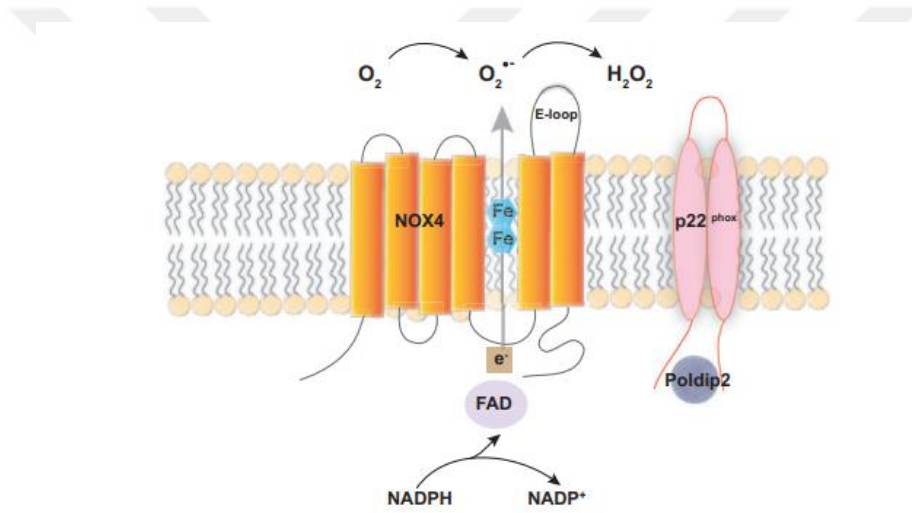
NADPH oksidaz enzimin izoformlarının ağırlıklı olarak eksprese edildiği dokular ve hücreler aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4). NOX4 böbrekte ağırlıklı olarak eksprese edilen izoformdur.

Tablo 4. NOX izoformları ve eksprese edildiği doku ve hücreler (61)

NOX İzoformu	Eksprese Edilen Doku	Eksprese Eden Hücreler
NOX1	Kolon, vasküler düz kaslar, uterus, rektum, prostat, plasenta	Endotel hücreler, osteoklastlar, nöronlar, astrositler, mikroglialar,
NOX2	Karaciğer, iskelet kası, kardiyovasküler sistem	Fagositler/granülositler, hepatositler, hematopoetik kök hücreler, iskelet kas hücreleri, kardiyomiyositler, fibroblastlar
NOX3	Fetal böbrek, karaciğer, akciğer, dalak, iç kulak	Erişkinlerde kolon ve böbrek epital hücreleri (az)
NOX4	Böbrek, karaciğer, göz ve beyin	Mesangial hücreler, düz kas hücreleri, fibroblastlar, keratinositler, nöronlar, hepatositler
NOX5	Dalak, testis, fetal beyin, karaciğer, akciğer ve timus	Vasküler düz kas hücreleri
DUOX1	Lenfatik doku, tiroid, ileum, çekum, akciğer	Tiroid hücreleri, akciğer hücreleri
DUOX2	Pankreas, mide, ileum, jejunum, çekum, tiroid, akciğer	Tiroid hücreleri, trakeal ve bronşial epitel hücreleri

2.2.3 NADPH Oksidaz 4 ve p22 phox

Fizyolojik koşullarda NOX4 böbrek proksimal tübüler hücrelerinde en çok eksprese edilen NOX izoformudur ve bu dağılım göz önüne alındığında renal oksidaz (RENOX) olarak da adlandırılmaktadır (62). NOX4 eksprese eden diğer hücreler kardiyomiyositler, osteoklastlar, endotel hücreler, keratinositler ve düz kas hücreleridir (8). NOX4'ün subsellüler lokasyonu hala tartışmalı olsa da endoplazmik retikulum, mitokondri veya nükleer membranda lokalizasyonu tanımlanmıştır (63). p22 phox, 195 aminoasitten oluşan, membran-bağlı NOX alt birimidir. p22 phox, gp91phox ile kompleks oluşturarak proteinin olgunlaştırılması ve stabilizasyonunda görev almaktadır (64).



Şekil 3. NOX4 ve p22 phox'un yapısı (65)

Hipoksi, inflamasyon ve profibrotik faktörler, NOX4 ekspresyonunda artışa neden olmaktadır (66). Artan NOX4 ekspresyonu/aktivitesi oksidatif stres temelli birçok patoloji ile ilişkilendirilmiştir. Böbreklerde eksprese edilen NOX4'ün fizyolojik rolü hala tam olarak bilinmemektedir. Farelerde NOX4 delesyonu herhangi bir patolojiye neden olmaz iken, insanlarda herhangi hastalık yaratan NOX4 mutasyonu belirlenmemiş olup NOX4 varyantlarının ise değişen homosistein metabolizması ve vücut uzunluğu ile ilgili olduğu ilişkilendirilmiştir (67–69). NOX4'ün akut ve kronik böbrek hasarında rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir(9,70–73).

2.2.4 Kontrast Madde Nefropatisinde Tedavi ve Profilaksi

Kontrast maddeye bağılı nefropatide, intravenöz (i.v.) izotonik sıvı replasmanı (Laktatlı Ringer veya %0.9 Serum fizyolojik) tedavisi önerilmektedir. Amerikan Radyoloji Derneği, yayımladığı kontrast madde kılavuzunda, KMN'nin tedavisinde, protokol olarak infüzyon hızı 100 mL/saat olmak üzere 4-12 saatlik %0.9 Serum fizyolojik (SF) tedavisi uygulanmasını önermiştir (1). Nefropati gelişme riski bulunan hastalarda da aynı protokol ile profilaktik olarak 6-12 saatlik hidrasyon önerilmiştir (1). Oral hidrasyonun da yararlı olabileceği belirtilse de i.v. hidrasyona göre etkililiğinin düşük olduğu belirtilmiştir.

KMN'nin tedavisinde, sodyum bikarbonat uygulamasının %0.9 SF uygulamasına göre etkin olduğu bazı çalışmalarda belirtilse de, aksini gösteren çalışma sonuçları nedeniyle etkililiği tartışmalıdır (74). KMN'nde, N-asetilsisteinin etkililiği ile ilgili de yeterli kanıt yoktur. Bir çalışmada, N-asetilsisteinin serum kreatinin seviyelerini düşürdüğü ancak renal hasarı önlemede etkili olmadığı bildirilmiştir (75).

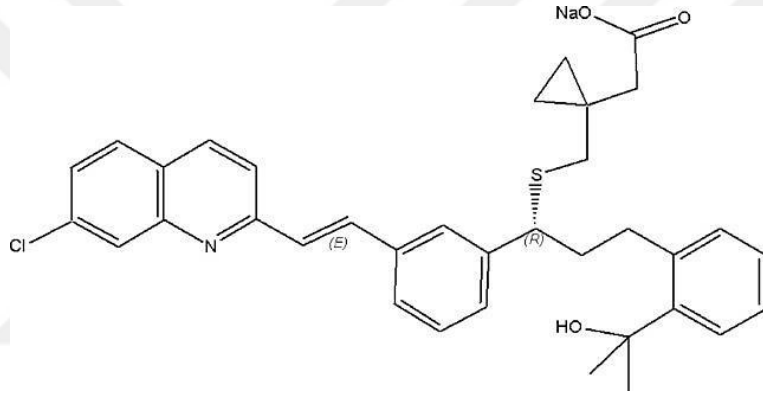
KMN'ni önlemede; statinler, atrial natriüretik peptid, kalsiyum kanal blokörleri, dopamin, endotelin reseptör antagonistleri, fenoldopam, glutatyon, mannitol, furosemid, L-arjinin, iloprost ve teofilinin, etkili olduğu bildirilse de, etkililikleri ile ilgili yeterli kanıt bulunmaması nedeniyle klinikte kullanımları önerilmemektedir (76).

2.3 Montelukast

Montelukast, astım tedavisinde kullanılan antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri tanımlanmış bir sisteinil lökotrien-1 (CysLT) reseptör antagonistidir (10). Sisteinil lökotrienler, araşidonik asitten 5-Lipoksigenaz enzimi aracılığı ile esas olarak mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller, makrofajlar, nötrofiller, trombositler, lenfositler, endotel hücreleri ve eritrositlerde sentezlenir ve kendi reseptörleri üzerinden etki gösterirler (77).

Montelukast, potent ve yüksek oranda selektif özellikli bir lökotrien reseptör antagonistidir. Montelukast, lökotrien D4 (LTD4)'ün fizyolojik etkisini inhibe etmekte ve reseptörüne herhangi bir agonistik etki göstermemektedir (78).

Montelukastın, gentamisin ile indüklenmiş bir nefrotoksisite modelinde, oksidatif hasarı baskılayarak etkili olduğu ve böbrekte lökotrienlerin, proinflamatuvar sitokinler ve oksidatif hasarın düzenlenmesinde rolü olabileceği belirtilmiştir (13). Montelukastın, sıçanlarda, kronik böbrek yetmezliği modelinde, nötrofil infiltrasyonu ve apoptozisini önleme, oksidan-antioksidan dengeyi koruma ve proinflamatuvar medyatör üretimini düzenleme yoluyla koruyucu etkili olduğu bildirilmiştir (79). Sisplatin ile indüklenmiş farklı nefrotoksisite modellerinde de oksidatif hasar ve inflamasyona bağlı renal tübüler hasarı iyileştirmede ve renal hasardan koruyucu olarak montelukastın etkili olduğu saptanmıştır (11).



Şekil 4. Montelukast sodyumun kimyasal yapısı (80)

2.3.1 Montelukastın Farmakokinetik Özellikleri

Montelukast, oral yolla alındığında hızlıca absorbe edilir. Erişkinlerde oral yolla alınan 10 mg tablet sonrasında montelukast plazma pik konsantrasyonuna (C_{max}) 3-4 saat içerisinde ulaşır (81). Oral biyoyararlanımı %64 olup, biyoyararlanımı ve plazma pik konsantrasyonu besinlerle değişiklik göstermemektedir (82).

Montelukast %99 oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır (81). Kararlı haldeki dağılım hacmi 8-11 L'dir. Kan-beyin bariyerini az miktarda geçtiği bilinmektedir.

Montelukast, karaciğerde CYP3A4 ve CYP2C9 mikrozomal enzimleri tarafından metabolize edilmektedir (82). Yapılan *in vitro* çalışmalara göre CYP3A4,

CYP2C9, CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19 veya CYP2C6'yı inhibe etmediği gösterilmiştir (82).

Montelukastın plazma yarı ömrü sağlıklı erişkinlerde 2.7-5.5 arasında değişmektedir (82). Plazma klirensi ortalama 45 mL/dakikadır. Montelukast ve metabolitlerinin eliminasyonu ağırlıklı olarak safra yoluyla gerçekleşmektedir (81,82).

2.3.2. Montelukastın Advers Reaksiyonları

Montelukast, pediatrik ve erişkin hastalarda iyi tolere edilen bir ilaçtır. Advers reaksiyonları, baş ağrısı, yorgunluk, farenjit, üst solunum yolu enfeksiyonları, kaşıntı ve gastrointestinal rahatsızlıklar olarak tanımlanmıştır (78). Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), montelukast ve diğer lökotrien reseptör antagonisti kullanan hastalarda bazı psikiyatrik (depresyon, anksiyete, intihar eğilimi) ve psikiyatrik olmayan (tremor) yan etkiler raporlamıştır (82).

Lökotrien reseptör antagonisti kullanan hastalarda karaciğer fonksiyon testlerinin periyodik olarak takibi önerilmektedir. Mevcut karaciğer hastalığı, alkolizm, hepatit, çok sayıda ilaç kullanımı gibi eşlik eden faktörlerin varlığında, montelukastın hafiften ciddi dereceye değişebilen karaciğer fonksiyon bozukluğuna neden olabileceği bildirilmektedir (82).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma, deneysel bir hayvan çalışmasıdır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın ilk basamağı olan, sıçanlarda kontrast madde nefropatisinin oluşturulması için planlanan hayvan deneyleri çalışmaları; Eylül 2020-Ekim 2020 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Laboratuvar Hayvan Bilimleri Anabilim Dalı'na ait konvansiyonel hayvan laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Hayvan deneyleri çalışmalarından elde edilen serum ve idrar örneklerinden yapılan incelemeler; Ekim 2020-Ocak 2021 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında; böbrek dokularından yapılan moleküler ve histolojik incelemeler; Aralık 2020-Mayıs 2021 tarihleri arasında; İzmir Ekonomi Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarı, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Çalışma Materyali

Araştırmada, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 28 erişkin erkek Wistar Albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar, DEÜTF Laboratuvar Hayvan Bilimleri Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Sıçanlar, kontrollü koşullarda ($22\pm2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, 12 saat aydınlık/karanlık) DEÜTF Laboratuvar Hayvanları Bilim Dalı sıçan barınma odasında standart yem ve su ile beslenmiştir. Deney süresince, hayvan hakları ile ilgili olarak "National Institute of Health (NIH)"'in belirlediği kriterler (Principles of Laboratory Animal Care) esas alınmıştır.

Deneysel protokolün sonunda, sıçanlardan kan, idrar örnekleri ve böbrek dokuları toplanmıştır. Toplanan kanlar, 4°C 'de 10000 g'de santrifüjlendikten sonra serumları ayrılarak, idrar örnekleri 4°C 'de 5000 g'de santrifüjlenerek tortularından arındırılarak DEÜTF Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda -20°C 'de saklanmıştır. Deneysel protokol sonunda toplanan böbrek dokuları; histolojik analizler için formaldehit içerisine alınmış, moleküler analizler için de hızlı bir

şekilde sıvı azotla dondurularak DEÜTF Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda -80°C'de saklanmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız Değişkenler: Montelukast (10 mg/kg) profilaksisinin etkililiği

Bağımlı Değişkenler: Kontrast madde enjeksiyonu (3 g I/kg ioheksol) ile oluşan nefropati (histolojik değerlendirmeler ve biyokimyasal parametreler), apoptozis, ROS oluşumu, NF-κB translokasyonu ve NF-κB, TNF-α, KIM-1, NOX4 ve p22 phox gen ekspresyonlarıdır.

3.6 Veri Toplama Araçları

Araştırma içerisinde kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler aşağıda tablo olarak verilmiştir (Tablo 5 ve 6).

Tablo 5. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Kod	Kullanım Amacı
Orbital Çalkalayıcı	Biosan/MR-1	ELISA ve Western blot inkübasyonlarının yapılması
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı	Biorad/CFXConnect	qRT-PCR deneylerinin yürütülmesi
Dikey Elektforez Sistemi	Biorad/Mini-Protean Tetra Gel	Western blot deneylerinin yürütülmesi
Plaka Okuyucu Spektrofotometre	Thermo Fischer/Multiskan	Kolorimetrik reaksiyonların absorbanlarının ölçümü
Plaka Okuyucu Fluorometre	BioTek/Synergy HTX	Fluorometrik reaksiyonların emisyonlarının ölçümü

Tablo 6. Kullanılan sarf malzemeleri (kimyasallar, kitler vb)

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
İndometazin	Santa-Cruz Biotechnology /sc-200503	Nefropati modelinin oluşturulması
L-NAME	Biovision/2356-500	Nefropati modelinin oluşturulması
İohexsol	Opakim/Omnipaque IV enjeksiyon için çözelti içeren flakon 300 mg I/mL,	Nefropati modelinin oluşturulması
Montelukast sodyum	Bilim İlaç	Nefropati modelinde koruyuculuğunun gösterilmesi
Serum KIM-1 ELISA Kiti	Invitrogen/ERHAVCR1	Serum KIM-1 seviyelerinin analizi
Reaktif Oksijen Türleri Kiti	Cellbiolabs/STA-347	Doku serbest oksijen radikallerinin analizi
RNA İzolasyon Kiti	Thermo Fischer/K0732	qRT-PCR analizleri için RNA eldesi
cDNA Sentez Kiti	ABM/G236	qRT-PCR analizleri için cDNA eldesi
PCR MasterMix	ABM/Mastermix-S	qRT-PCR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi
PVDF Membran	Thermo Fischer/88585	Western Blot için proteinlerin transferi
Yağsız Süt Tozu	BioShop Canada/ SKI400.500	Western blot için membranların bloklanması
Blotlama Kağıdı	Thermo Fischer/88605	Western Blot için proteinlerin transferi
Kemilüminesans substrat	Cell Signaling/6883P3	Membran üzerindeki protein bantlarının görüntülenmesi

Anti-ACTB Antikoru	Cell Signaling/4970S	Western Blot için sitozolik referans protein
Anti-Lamin B1 Antikoru	Invitrogen/PA5-42709	Western Blot için nükleer referans protein
Anti-NF-κB Antikoru	p65 Cell Signaling/8242S	NF-κB protein ekspresyonunun Western blot ile gösterilmesi
Anti-Rabbit HRP Bağlı Sekonder Antikor	Jackson Immuno Research/111-035-045	Membrana bağlanan primer antikorların görüntülenmesi
Anti-Kaspaz-3 Antikoru	BiossUsa/bsm-33199m	Doku apoptozis seviyesinin immünhistokimya ile gösterilmesi
DAB Substratı	Roche/011718096001	İmmünhistokimya yöntemi ile Caspase-3 seviyesinin gösterilmesi
Anti-Rat Biotin Bağlı Sekonder Antikor	Sensitek/SHP125	İmmünhistokimya yöntemi ile Caspase-3 seviyesinin gösterilmesi

Araştırmada, ioheksol (3 g I/kg) ile erkek Wistar albino sıçanlarda kontrast madde nefropatisi modeli oluşturulmuştur (83). KMN'de montelukastın koruyucu etkisi değerlendirilmiştir (84,85) Sıçanlara sodyum tiyopental (125 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edilmişlerdir (86).

Sıçanlar dört gruba randomize edilmiştir:

1. Kontrol grubu (K) (n=7)
2. Kontrast Madde Nefropatisi grubu (KMN) (n=7)
3. Montelukast grubu (M) (n=7)
4. Montelukast tedavisi almış Kontrast Madde Nefropatisi grubu (M+KMN) (n=7)

Kontrast madde nefropatisi oluşturulması

KMN ve M+KMN grubundaki sıçanlara uygulanan nefropati protokolü

- 16 saat susuz bırakma
- Prostaglandin inhibisyonu (İndometazin, 10 mg/kg, i.p., Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözünmüş)
- Nitrik oksit inhibisyonu (L-NAME, 10 mg/kg i.p., %0.9 sodyum klorür içinde çözünmüş)

Bu üç uygulama, ioheksolün nefropati oluşturabilmesini kolaylaştıran ve literatürde yer alan uygulamalardır. Günümüzde sıklıkla kullanılan radyokontrast maddeler (ioheksol gibi) daha çok risk grubunda olan hastalarda (dehidratasyonu olan hastalar, diyabet veya böbrek fonksiyonlarında bozukluk olan hastalar gibi) nefropati oluştururlar.

K ve M grubundaki sıçanlara uygulanan protokol

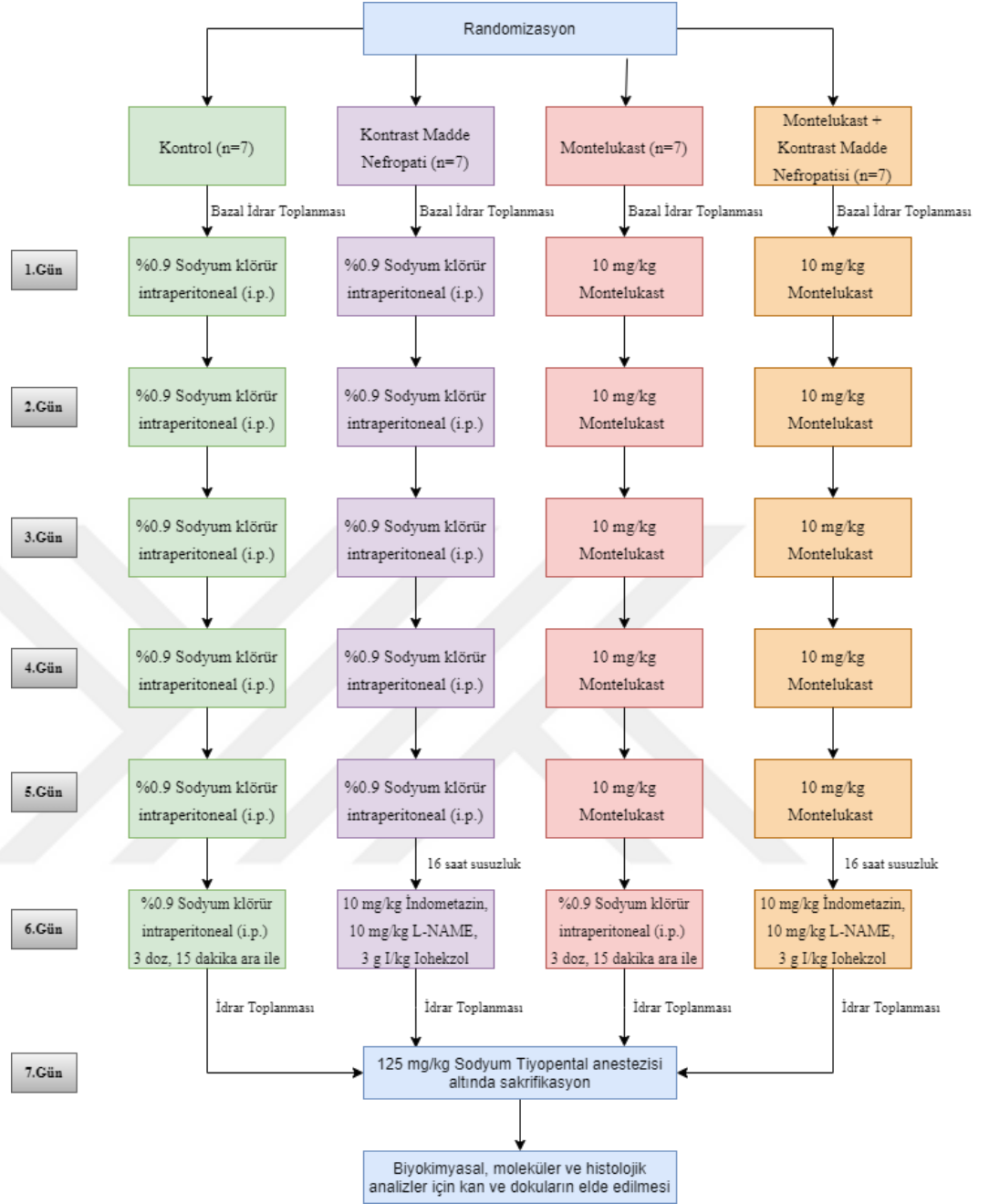
Kontrol grubu ve Montelukast grubundaki sıçanlar, susuz bırakılmamıştır. KMN ve M+KMN gruplarında; sırasıyla indometazin, L-NAME ve ioheksol uygulamaları yapılmıştır. Kontrol ve Montelukast grubundaki sıçanlara, uygulamaların yapıldığı zaman dilimlerinde 0.5 mL içerisinde %0.9 sodyum klorür uygulamaları yapılmıştır.

Çalışmadan dışlama kriterleri

Tüm deney gruplarında, sıçanların başlangıç ve deney sırasındaki ağırlıkları kaydedilmiştir. Günde iki kez sulukları ve yemleri kontrol edilmiştir.

Bu süre içerisinde;

- Vücut ağırlığının %15'inden fazlasını kaybeden
- Enfeksiyon geliştiği düşünülen
- KMN grubunda histolojik ve biyokimyasal olarak nefropati bulguları gözlenmeyen
- Kontrol grubunda histolojik ve biyokimyasal olarak renal hasar gösteren sıçanlar deney ve çalışmadan dışlanmıştır.



Şekil 5. Deneysel çalışmanın akış şeması

3.6.1 Kontrol grubu

Bu grupta yer alan sıçanlara, protokolün 1. günü saat 16.30'da 0.5 mL %0.9'luk sodyum klorür enjekte edilmiştir. %0.9 sodyum klorür enjeksiyonları geri kalan 4 gün boyunca tekrarlanmıştır. Sıçanlara, 6.gün sabahında 3 kez, 15 dakika ara ile 0.5 mL %0.9'luk sodyum klorür enjekte edildikten sonra sıçanlar metabolizma kafeslerine alınmıştır.

3.6.2 Kontrast madde nefropatisi grubu

Bu grupta yer alan sıçanlara, protokolün 1. günü saat 16.30'da 0.5 mL %0.9'luk sodyum klorür enjekte edilmiştir. %0.9 sodyum klorür enjeksiyonları geri kalan 4 gün boyunca tekrarlanmıştır. 6.gün sabahında KMN modelinin oluşturulması için sırası ile L-NAME (10 mg/kg), İndometazin (10 mg/kg) ve İohexsol (3 g I/kg) 15 dakika ile aryla enjekte edildikten sonra sıçanlar metabolizma kafeslerine alınmıştır.

3.6.3 Montelukast grubu

Bu grupta yer alan sıçanlara protokolün 1. günü akşamı 0.5 mL Montelukast (10 mg/kg) enjekte edilmiştir. Montelukast enjeksiyonları geri kalan 4 gün boyunca tekrarlanmıştır. 6.gün sabahında 3 kez, 15 dakika ara ile 0.5 mL %0.9'luk sodyum klorür enjekte edildikten sonra sıçanlar metabolizma kafeslerine alınmıştır.

3.6.4 Montelukast+kontrast madde nefropatisi grubu

Bu grupta yer alan sıçanlara protokolün 1. günü akşamı 0.5 mL Montelukast (10 mg/kg) enjekte edilmiştir. Montelukast enjeksiyonları geri kalan 4 gün boyunca tekrarlanmıştır. 6.gün sabahında KMN modelinin oluşturulması için sırası ile L-NAME (10 mg/kg), İndometazin (10 mg/kg) ve İohexsol (3 g I/kg) 15 dakika ile aryla enjekte edildikten sonra sıçanlar metabolizma kafeslerine alınmıştır.

Tüm gruplarda,

- Tüm enjeksiyonlar, intraperitoneal (i.p) uygulanmıştır.
- Sıçanlar, 0.gün ve 6. gün, metabolizma kafesine konarak 24 saatlik idrarları toplanmıştır.
- Sıçanlar, 7. günün sabahı sıçanlar sodyum tiyopental (125 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edilmişlerdir. Sakrifikasyon sonrası sıçanların batinları longitudinal bir insizyonla açılmıştır, Biyokimyasal ve moleküler analizler için vena cava caudalis'ten alınan kanların serumları ayrılarak analize dek - 80°C'de saklanmıştır.
- Kan alma işleminden sonra her iki böbrek hızlıca alınmıştır. Sol böbrek, histomorfolojik değerlendirmeler için %10'luk formalin içerisine konmuş,

sağ böbrek ise biyokimyasal ve moleküler analizler için soğuk (+4°C) Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra sıvı azot ile hızlıca dondurulmuş ve analiz yapılincaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.6.5 Biyokimyasal ve moleküler analizler

Biyokimyasal ve moleküler analizler serum, idrar ve doku homojenatlarında gerçekleştirilmiştir.

3.6.5.1. Serum ve idrar kreatinin analizleri

Serum ve idrar kreatinin analizleri Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Oto analizör ile gerçekleştirilen ölçümde, endpoint up metoduyla kolorimetrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Alkali ortamda, kreatininin pikrik asitle reaksiyonu sonucu oluşan kreatinin-pikrat kompleksinin 520/800 nm'de verdiği absorbanstaki artış kreatinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. (Beckman Coulter, OSR6178).

3.6.5.2. Serum kidney injury molecule-1 (KIM-1) analizi

Serum Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) analizi, ticari ELISA kiti ile gerçekleştirilmiştir (Invitrogen, ERHAVCR). Antikor kaplı 96 kuyulu plaklar üzerine seyreltilmiş örnekler ve kit standartları 100 µl uygulanmıştır. Üstü kapatılarak 2.5 saat boyunca oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. Kuyucuklar dökülerek 300 µl 1X yıkama tamponu ile 4 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 100 µl Biotin Konjugatı eklenerek üstü kapalı olarak 1 saat oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. Kuyucuklar dökülerek 300 µl 1X yıkama tamponu ile 4 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 100 µl Streptavidin-HRP solüsyonu eklenerek üstü kapalı olarak 45 dakika boyunca oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. Kuyucuklar dökülerek 300 µl 1X yıkama tamponu ile 4 kere yıkanmıştır. Yıkama sonrasında 100 µl tetrametilbenzidin (TMB) substratı eklenerek mavi renk oluşumu gözlenmiştir, kuyuların üstü kapatılarak 30 dakika boyunca karanlıkta hafifçe çalkalanarak inkübe edilmiştir. İşlem sonrasında 50 µl stop solüsyonu eklenerek mavi renkten sarı renge değişim gözlenmiştir. 30 dakika içerisinde 450 nm'de absorbans ölçülerek standart absorbans değerlerinden standart

grafik çizilmiştir. Oluşturulan standart grafikten örneklerde bulunan KIM-1 miktarı hesaplanmıştır. Hesaplamada dilüsyon faktörü de çarpıma eklenmiştir.

3.6.5.3. Doku reaktif oksijen türleri (ROS) analizi

Doku reaktif oksijen türleri analizi, ticari fluorometrik kit ile gerçekleştirilmiştir (Cellbiolabs, STA-347). 50 mg doku tartılarak PBS ile buzda homojenizatör yardımıyla parçalanmıştır. 10.000 g'de 5 dakika santrifüj edilerek elde edilen homojenatlar ölçüm için kullanılmıştır. Seyreltilmiş örnekler ve hidrojen peroksit standartları siyah-şeffaf dipli 96 kuyucuklu plakaya 50 µl pipetlenmiştir. Üzerine 50 µl Katalizör reaktifi eklenerek oda sıcaklığında çalkalanarak 5 dakika inkübe edilmiştir. 100 µl diklorofluoresein solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. 480 nm eksitasyon (ex) / 530 nm emisyon (em) dalga boylarında ölçüm gerçekleştirilmiştir. Standartların "Fluoresans Yoğunluk" değerleri ile hidrojen peroksit standart grafiği oluşturularak, örneklerin µM cinsinden içerdikleri ROS miktarları hesaplanmıştır. Hesaplamada dilüsyon faktörü de çarpıma eklenmiştir.

3.6.5.4. TNF-α, KIM-1, NF-κB, NOX4 ve p22 phox genlerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Total RNA izolasyonu ticari kit ile gerçekleştirilmiştir (Thermo Scientific, K0731). 30 mg doku tartılarak PBS ile buzda 30 saniye boyunca homojenizatör yardımıyla parçalanmıştır. Üzerine 600 µl Proteinaz K eklenerek vortekslenerek oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. 12.000 g'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant yeni steril tüpe aktarılmıştır. Süpernatantlara 450 µl %100'lük etanol eklenerek karıştırılmıştır. Kit içerisinde bulunan kolonlara 700 µl aktararak 12.000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Tüm süpernatant kolona aktarılan kadar bu işlem tekrarlanmış ve kolonun alt kısmına geçen faz atılmıştır. Bu işlemden sonra, 700 µl yıkama tamponu-1 eklenerek 12.000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir ve kolonun alt kısmına geçen faz atılmıştır. Kolona 600 µl yıkama tamponu-2 eklenerek 12.000'de 1 dakika santrifüjlenmiştir ve kolonun alt kısmına geçen faz atılmıştır. Kolona 250 µl yıkama tamponu-2 eklenerek 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve alt kısımda bulunan tüp atılarak, kolonlar 1.5 mL'lik steril tüplere aktarılmıştır. Son olarak kolonlara 100 µl steril su eklenerek 12.000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiş

ve kolona bağlanan RNA elüe edilmiştir. Kolonlar atılarak, alt faz saklanmıştır. RNA miktarı ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) ve izolasyon verimi spektrofotometrik A260/A280/A230 oranları ile hesaplanarak belirlenmiştir. Elde edilen total RNA -80°C 'de saklanmıştır.

Elde edilen ve miktarı bilinen RNA'lardan cDNA sentezi ticari kit ile gerçekleştirilmiştir (ABM, G236). 4 μL RT Tamponu, 1 μL dNTP, 1 μL Oligo(dT), 1 μL OneScript® Plus RTase ve 1 μg 'a karşılık gelecek RNA miktarı eklenerek reaksiyon hacmi 20 μL 'ye steril su ile tamamlanmıştır. Karışım pipet yardımı ile karıştırılarak reaksiyonun başlaması için termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. 55°C 'de 15 dakikada reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 85°C 'de 5 dakika inkübasyon yapılmıştır. Tüpler buzda soğutulurak -20°C 'de saklanmıştır.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için, 96 kuyulu PCR plakasına 6.25 μL 2X MasterMix (ABM, MasterMix-S), 1 μL cDNA, 1.5 μL ilgili genin Forward-Reverse Primer karışımı eklenerek reaksiyon hacmi steril su ile 25 μL 'ye tamamlanmıştır. 96 kuyulu PCR plakasının üstü uygun şekilde kapatılarak cihaza yerleştirilmiştir. TNF- α , KIM-1, β -aktin, NF- κB , NOX4 ve p22 phox'un forward ve reverse primer dizileri ilgili tabloda yer almaktadır (Tablo 7).

Tablo 7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için ilgili genlerin forward ve reverse sekansları

Hedef Gen	Forward Sekans (5'→3')	Reverse Sekans (5'→3')
NOX4	GTGAACGCCCTGAACTTCTC	TTCTGGGATCCTCATTCTGG
p22 phox	TGTTGCAGGAGTGCTCATCTGTCT	AGGACAGCCCGGACGTAGTAATTT
β-aktin	TGCAGAAGGAGATTACTGCC	CGCAGCTCAGTAACAGTCC
TNF-α	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
KIM-1	ACTCCTGCAGACTGGAATGG	CAAAGCTCAGAGAGCCCATC
NF-κB	CAAAGCTCAGAGAGCCCATC	CCAGGTCATAGAGAGGCTCAA

Reaksiyon basamakları; 95°C'de 10 dakika polimeraz aktivasyonu/denatürasyon, 95°C'de 15 saniye, amplifikasyon aşamasında TNF-α için 56°C'de 60 saniye, β-aktin için 51°C'de 60 saniye, KIM-1, NF-κB, NOX4 ve p22 phox için 58°C'de 60 saniye (40 döngü) ve son olarak dissosiyasyon aşamasında 65°C'den başlayarak 5 saniyede 0,5°C'lik artışlarla 95°C'ye yükselmiştir. β-aktin normalizasyon için pozitif kontrol gen olarak kullanılmış ve elde edilen C_q değerleri ile gen ifadenin değişimi -2^{ΔΔCt} yöntemi ile hesaplanmıştır.

3.6.5.5. Western Blot Yöntemi ile NF-κB Translokasyonunun Gösterilmesi

NF-κB translokasyonunun gösterilmesi için kit (Biovision, K266) yardımı ile sitozolik/nükleer fraksiyonlama gerçekleştirilmiştir. Böbrek dokuları 200 mg tartılarak üzerine 1 mL soğuk PBS eklenmiştir. Homojenizatör yardımıyla parçalan dokular, 500 g'de 3 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz atılarak, pellet üzerine 200 µl sitozol ekstraksiyon tamponu-A (CEB-A) eklenmiştir. 15 saniye yüksek hızda vortekslendikten sonra 10 dakika buzda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda, 11 µl sitozol ekstraksiyon tamponu-B eklenerek 5 saniye yüksek hızda vortekslendikten sonra 1 dakika buzda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası tekrardan 5 saniye yüksek hızda vorteksleme sonrasında 5 dakika 16.000 g'de santrifüj gerçekleştirilmiştir. Üst faz hızlı bir şekilde önceden soğutulmuş tüplere aktarılarak sitozolik fraksiyon elde edilmiştir. Kalan

pellet 100 µl nükleer ekstraksiyon tamponu ile resüspanse edilerek 15 saniye boyunca yüksek hızda vortekslenmiş ve buza alınmıştır. Bu işlem 40 dakika boyunca her 10 dakikada tekrardan gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrası 10 dakika 16.000 g'de santrifüjlenmiştir. Üst faz hızlı bir şekilde önceden soğutulmuş tüplere aktarılarak nükleer fraksiyon elde edilmiştir. Tüm sitozolik ve nükleer örnekler protein tayini öncesi -80°C'de saklanmıştır.

Protein tayini ticari kolorimetrik kit (Thermo Fischer, 23225) ile gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler ve standartlar iki tekrarlı çalışılmıştır. Örnekler distile su ile 20 kat seyreltilerek 96 kuyuculuklu plakaya 25 µl pipetlenmiştir. Standartlar 2 mg/mL sıgır serum albümini içeren flakonlardan uygun seyreltmeler ile hazırlanmıştır. Kit talimatlarında önerilen standart aralık kullanılmıştır. Çalışma reaktifi kit talimatlarında belirtilen 50:1 oranında sırası ile Reaktif A ve Reaktif B birbirine karıştırılarak hazırlanmıştır. Örneklerin üzerine kit talimatlarında belirtilen 1:8 oranında 200 µl çalışma reaktifi eklenmiştir. Standartlara da aynı işlem uygulanmıştır. 96 kuyuculuklu plaka kapağı kapatılarak 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda oda sıcaklığında soğuması beklendikten sonra spektrofotometre yardımı ile 562 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbanslardan standart grafik çizilerek örneklerdeki protein miktarı belirlenmiştir.

Gerekli tamponların hepsi 10X olarak hazırlanarak, kullanım sırasında 1X olacak şekilde seyreltilmiştir.

- **10X Yürütme (Running) Tamponu:** 30 gram Tris, 144 gram Glisin, 10 gram SDS tartılarak 1L distile suda çözülmüştür. 1L 1X olarak kullanımı için 100 mL 10X yürütme tamponundan alınarak 900 mL distile su eklenerek seyreltilmiştir.
- **10X Transfer Tamponu:** 58 gram Tris, 29,13 gram Glisin, 3,7 gram SDS tartılarak 1 L distile suda çözülmüştür. 1L 1X olarak kullanımı için 100 mL 10X transfer tamponu, 200 mL metanol ve 700 mL distile su ile birbirine karıştırılmıştır. 1X transfer tamponu 4°C'de saklanmıştır.
- **10X Tris-Tamponlu Salin (TBS):** 24.23 gram Tris ve 80.06 gram sodyum klörür tartılarak 900 mL distile suda çözülmüştür. pH metre yardımı ile

Çözelti pH'sı 7,6'ya ayarlanarak 1 L'ye tamamlanmıştır. Bloklama tamponu hazırlamak için kullanılmıştır.

- **1X Tris-Tamponlu Salin-Tween 20 (TBST):** 100 mL 10X tris-tamponlu salin, 900 mL distile su ile seyreltilmiştir. 1 L'lik çözeltiye 1 mL Tween-20 eklenerek manyetik bar yardımıyla karıştırılmıştır.
- **%5'lik Yağsız Süt Tozu:** 5 gram yağsız süt tozu tartılarak 100 mL TBST ile çözülmüştür. Bu   zelti primer-sekonder antikor hazırlanması ve bloklama aşamalarında kullanılmıştır.
- **%20'lik sodyum dodesil sülfat (SDS):** 10 gram SDS tartılarak 50 mL distile suda çözülmüştür. Bu   zelti poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
- **%10'luk amonyum persülfat (APS):** 1 gram APS tartılarak 5 mL distile suda çözülmüştür. Çözelti 500  l olacak şekilde alikatlanarak -20 C'de saklanmıştır. Bu   zelti poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
- **0.5 M Tris Tamponu (pH: 6.8):** 6 gram Tris 80 mL distile suda   z l r k pH'sı hidroklorik asit ile 6.8'e ayarlanmıştır. Bu   zelti poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılmıştır.
- **1.5 M Tris Tamponu (pH: 8.8):** 18 gram Tris 80 mL distile suda   z l r k pH'sı hidroklorik asit ile 8.8'e ayarlanmıştır. Bu   zelti poliakrilamid jellerin hazırlanmasında kullanılmıştır.

Çalışılan proteinlerin moleküler ağrılıkları (NF- B: 65 kDA,  -actin: 45 kDA, Lamin B: 64 kDA) dikkate alınarak ayırım (seperating) jelinin yüzdesi %10 olarak belirlenmiştir. Paketleme (stacking) jel yüzdesi ise sabit oran olan %4 olarak seçilmiştir.  -aktin sitozolik referans protein olarak, Lamin B nükleer referans protein olarak kullanılmıştır. M_w

Jeller hazırlanırken 1.0 mm camlar kullanılmıştır. Jel standında cam plakalar yerleştirilerek sızdırmazlıkları distile su ile kontrol edilmiştir. İlk olarak ayırım (seperating) jeli hazırlanmıştır. Ayırım jeli için; 7.275 mL distile su, 3.75 mL 1.5 M Tris Tamponu (pH: 8.8), 75  l %20'lik SDS, 3.75 mL %40'lık akrilamid/bisakrilamid küçük bir beher içerisinde 5 dakika manyetik bar yardımıyla karıştırılması sağlanmıştır. Bu karışıma hızlı bir şekilde 150  l %10'luk APS ve 15

μ l TEMED eklenerek kısa süre karışması sağlanmıştır. Daha sonrasında serolojik pipet yardımıyla 1.0 mm'lik camlar arasına 5 mL bu karışım dökülerek üstü izopropanol ile kapatılmıştır. Jelleşme belirli sürelerle kontrol edilmiştir. Jelleşme gerçekleştikten sonra peçete yardımı ile izopropanol uzaklaştırılmıştır.

İkinci olarak paketleme jeli hazırlanmıştır. Paketleme jeli için; 3.20 mL distile su, 1.25 mL 0.5 M Tris Tamponu (pH: 8.8), 25 μ l %20'lik SDS, 470 μ l %40'lık akrilamid/bisakrilamid küçük bir beher içerisinde 5 dakika manyetik bar yardımıyla karıştırılması sağlanmıştır. Bu karışıma hızlı bir şekilde 50 μ l %10'luk APS ve 5 μ l TEMED eklenerek kısa süre karışması sağlanmıştır. Daha sonrasında serolojik pipet yardımıyla 1.0 mm'lik camlar arasına 5 bu karışım dökülerek üzerine yükleme kuyularının oluşması için 10'luk taraklar hafifçe yerleştirilmiştir. Jelleşme gerçekleştiğinde kullanıma hazır hale gelen jeller, stanttan çıkarılarak tank içerisine yüklemeye hazır hale gelmiştir.

Protein miktarları belirlenen örnekler, tüm kuyulara eş olacak şekilde 50 μ g değeri belirlenerek yüklenmiştir. Örneklerin kuyulara yüklenmesi için, Laemmli tamponu hazırlanmıştır. Örnekler son hacimde 50 μ g olacak şekilde, 4X Yükleme Tamponu (SDS, gliserol, bromfenol mavisi ve Tris içeren) ile 4:1 oranında karıştırılarak içerisine son hacimde %5 olacak şekilde β -merkaptoetanol eklenmiştir. Bu karışım 95°C'de 10 dakika ısıtılarak kullanım için hazır hale getirilmiştir.

Western Blot Protokolü

Yürütme tankı 1X yürütme tamponu ile gerekli çizgiye kadar doldurulmuştur. Jeller dikey aparat içerisinde dikkatli ve sıkı şekilde yerleştirilerek aradaki boşlukta yürütme tamponu ile doldurulması sağlanmıştır. Kuyu tarakları tek hamlede ve dikkatlice çıkarılarak, ilgili kuyulara örnek yükleme gerçekleştirilmiştir. Molekül ağırlığı belirli proteinlerden oluşan protein belirteci de yüklenerek sistemin kapağı kapatılarak ve güç kaynağından sabit voltaj ayarı seçilerek ilk 30 dakika 70 V, sonrasında 100 V'ta yürütme gerçekleştirilmiştir. Protein belirteci ile gerekli ayırım periyodik olarak takip edilmiştir. Gerekli ayırım gerçekleştiğinde sistem durdurularak jeller dikey aparattan çıkarılmıştır. 1X transfer tamponu içeren derin bir kap içerisine yerleştirilmiştir.

Transferde ıslak transfer yöntemi kullanılmıştır. poliviniliden florür (PVDF) membran, önce metanol ile ıslatılarak daha sonrasında 5 dakika derin kap içerisinde 1X transfer tamponu içerisinde aktive edilmiştir. Jeller, iki cam arası dikkatlice açılarak serbest bırakılmıştır. Blotlama kağıtları ve süngerler de transfer tamponu içerisinde ıslatıldıktan sonra transfer paketleri hazırlanmıştır. Transfer paketleri; gözenekli kaset içerisinde, siyah tarafından başlanarak sırası ile sünger, blotlama kağıdı, jel, PVDF membran, blotlama kağıdı ve sünger olacak şekilde paketlenmiştir. Hava kabarcıklarına dikkat edilerek jel ve membranın üzerinden hafifçe geçilmiştir. Kasetler kapatılarak dikey tutucuya yerleştirilmiştir. Yürütme tankının içi boşaltılarak, içerisine soğuk 1X transfer tamponu ve buz aküleri yerleştirilmiştir. Dikey tutucu tankın içerisine yerleştirildikten sistemin kapağı kapatılarak ve daha sonra güç kaynağından sabit akım seçilerek 250 mA'de 2 saat transfer işlemi soğuk odada gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda kasetler açılarak transfer işlemi kontrol edilmiştir.

Transferi tamamlanan membranlar kurumadan hızlıca bloklama aşaması için kutular içerisinde %5'lik yağsız süt tozuna alınmıştır. Membranın üzerinden tüm çözelti geçtiğinden emin olunacak şekilde 1 saat boyunca orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Kutu içerisindeki süt tozu dökülerek üzerine ilgili primer antikorun süt tozundaki dilüe çözeltisi eklenerek ve membranın üzerinden tamamen geçtiğinden emin olunarak gece boyu soğuk odada inkübe edilmiştir. Daha sonra primer antikor toplanarak, membranlar 1X TBST ile 5'er dakika 3 kez yıkanmıştır. Membranların üzerine HRP-bağlı sekonder antikorun süt tozundaki dilüe çözeltisi eklenerek ve membranın üzerinden tamamen geçtiğinden emin olunarak 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra sekonder antikor toplanarak, membranlar 1X TBST ile 5'er dakika 3 kez yıkanmıştır. Görüntüleme, kemilüminesans substrat (ECL) kiti ile gerçekleştirilmiştir (Cell Signaling, 6883P3). Membranlar görüntüleme cihazına yerleştirilerek, 1:1 oranında iki kit reaktif karıştırılarak membranların ilgili bölgelerine damlatılmıştır. Cihazda bantların net ve uygun görüntüleri otomatik ve manuel olarak alınarak, ilgili bant yoğunluğu analizleri (Biorad, Image Lab) yapılmıştır.

3.6.6 Histolojik analizler

Sol böbreklerden alınan örneklerde histolojik değerlendirme ve immünohistokimyasal incelemeler gerçekleştirilmiştir.

3.6.6.1. Histolojik değerlendirme

Böbrek dokuları %10' luk tamponlanmış nötral formalin içerisinde 3 gün süreyle tespit edilerek rutin doku takip işlemi başlatılmıştır. Tespit maddesinin uzaklaştırılması için 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra, 60°C de etüvde 20' şer dakika sırasıyla %70, %80, %96 artan etil alkol serilerinden geçirilmiştir. Daha sonra 60°C de etüvde 20' şer dakika dört değişim asetonda dehidrate edildi. Şeffaflandırma amacıyla 60°C de etüvde 30' ar dakika iki kez ksilolde bekletilmiştir. 60°C' lik etüvde iki değişim halinde 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlanarak parafin bloklar içerisine gömülmüştür (Tablo 8). Rotary mikrotom (RM 2255, Leica, Germany) aracılığı ile 5 µm'lik kesitler alınmıştır. Her deneğe ait kesitler dokunun genel histomorfolojik özelliklerini değerlendirmek için hematoksilin-eozin ile boyanmıştır.

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 2 saat 60°C'lik etüvde bırakılmıştır. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutulmuştur. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirilmiştir. Kesitler distle su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyanmıştır. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyanmıştır. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflştırma amacıyla 20'ser dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır (Tablo 9).

Tablo 8. Rutin doku takibi

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk Formaldehit	3 gün
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 Gece
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	20 Dakika
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 2	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 3	20 Dakika
Post Fiksasyon	Aseton 4	20 Dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 1	30 Dakika
Şeffaflandırma	Ksilol 2	30 Dakika
	Parafin 1	60 Dakika
	Parafin 2	60 Dakika
Bloklama	Parafin	

Tablo 9. Hematoksilen-eozin boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda Isısında)	10 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3	10 Dakika
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	% 70 Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eosin	2 Dakika
Yıkama	% 70 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 80 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	% 96 Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolü Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

Kesitlerden elde edilen görüntülerin incelenmesinde bilgisayarlı video kamera esaslı görüntü analiz yöntemi kullanılmıştır (UTHSC Image software). Tüm kesitler analize edilerek; sadece boyamaya bağlı belirgin artefaktları olan kesitler değerlendirme dışı tutulmuştur. Boyama tamamlandıktan sonra kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BX-51 Tokyo, Japan) incelenerek, görüntüler yüksek çözünürlüğe sahip kamera yardımıyla bilgisayara aktararak değerlendirilmiştir (Olympus DP-71, Japan). Bütün kesitler dijital olarak fotoğraflanmıştır.

Deney gruplarına ait böbrek dokusu kesitlerinde ışık mikroskopik olarak; mononükleer hücre infiltrasyonu (MNH), eritrosit ektravazasyonu, kapiller dilatasyon, renal korpüskül morfolojisi, proksimal tübüluslarda vakuolizasyon, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon ve kast formasyonu değerlendirilmiştir. Kesitlerden elde edilen görüntüler değerlendirilirken semikantitatif olarak tübülointertisyel hasar için (tübüler fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon, kast formasyonu, vakuolizasyon, MNH, eritrosit ektravazasyonu, renal korpüskül morfolojisi gibi parametreler için) skorelama yapılmıştır.

Skorelama

- (0) Normal
- (1) <%25 hasar
- (2) %25-%50 hasar
- (3) %50-%75 hasar
- (4) %75-%100 hasar

Değerlendirmeler iki histolog tarafından numaralandırılmış örnekler ile yapılmıştır. Değerlendirenlere örneklerin hangi gruptan olduğuna dair bilgi verilmemiştir. Değerlerin ortalamaları ve standart hataları alınmıştır (87).

3.6.6.2. İmmünohistokimyasal değerlendirme

Aktif Kaspaz-3 immünohistokimyasal inceleme için kesitler deparafinize ve rehidrate edilmiştir. Aktif Kaspaz-3 immünohistokimya uygulanacak kesitler mikrodalgada 5 dakika 10 mM sitrat buffer (Bio-Optica, 15-M103, Milano, ITA) tabii tutulmuştur. Tüm kesitler PBS ile yıkandıktan sonra doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 10 dk %3 H₂O₂ ile oda ısısında bekletilmiştir. Tekrar PBS ile

yıkama yapılarak 30 dakika oda ısısında serum bloklama solüsyonunda bekletilmiştir. Rat spesifik anti-aktif kaspaz-3 antikoru 1:100 (AB3623, Millipore, Temecula, CA, USA) ile +4°C’de 1 gece inkübe edilmiştir. Ardından 30’ar dakika biotinlenmiş sekonder antikor ve peroksidaz konjuge streptavidin uygulanmıştır (Histostain Plus Kit, 85-9043 San Francisco, USA). İmmunohistokimyasal reaksiyonu görünür hale getirmek için DAB (Roche, Darmstadt, Almanya) ile boyanmış ve Mayer’s hematoksilin kullanılarak artalan boyaması yapılmıştır. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmış ve ışık mikroskopunda değerlendirilmiştir.

İmmünohistokimyasal skorlamalar değerlendirmenin standart olması amacıyla böbrek dokusu kesitlerinde farklı bölgelerden 5 standart alan seçilerek yapılmıştır. Pozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 0'den 3'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirilmiştir.

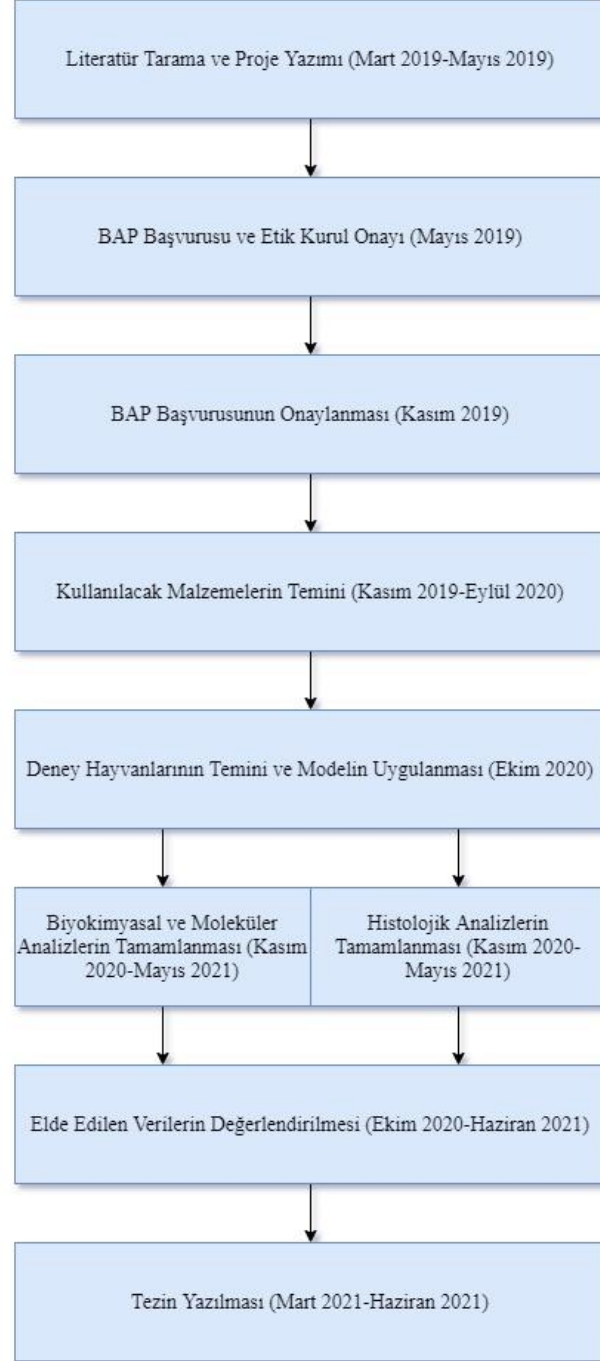
Skorlama

- (0)-Boyanma yok
- (1)-Az boyanma
- (2)-Orta boyanma
- (3)-Şiddetli boyanma

Değerlendirmeler iki histolog tarafından numaralandırılmış örnekler ile yapılmıştır. Değerlendirenlere örneklerin hangi gruptan olduğuna dair bilgi verilmemiştir. Değerlendirme sonucu elde edilen sonuçların ortalamaları alındı ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırma planlanması ve takvimi aşağıdaki akış şemasında kronolojik olarak gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Araştırma planı ve takvimi

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Gruplar arasındaki parametrik değerlerin karşılaştırılması için varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey testi uygulanmıştır. Parametrik olmayan verilerin analizinde gruplar arası farklılık Kruskal-Wallis ve post hoc Mann-Whitney-U testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel analiz için GraphPad (GraphPad Prism 5, La Jolla, USA) isimli bilgisayar programı kullanılmıştır. Çalışmadaki tüm değerler, ortalama $\pm$ standart hata olarak sunulmuştur. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmanın sınırlılıkları;

- Montelukastın tek doz uygulanması (10 mg/kg), düşük ve yüksek dozlarda montelukastın koruyucu etkililiğinin araştırılamamış olması.
- Kullanılan KMN modelinin 24 saatlik nefropati modeli olması, daha geç dönemde nefropatiye bağlı olabilecek etkilerin ve montelukastın etkisinin değerlendirilememesi.
- TNF- α , IL-6 gibi inflamatuvar parametrelerin ölçümlerinin yapılamamış olması

3.10 Etik Kurul Onayı

“Sıçanlarda Radyokontrast Madde Nefropatisini Önlemede Montelukast’ın NF- κ B, NOX4 ve p22 phox Ekspresyonu Aracılı Etkisi” isimli araştırmamız için 22.05.2019 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (HADYEK) 23/2019 protokol numarası ile onay alınmıştır (Ek 1).

4. BULGULAR

Dört gruba randomize edilen sıçanlarda, deney sonu ölçülen ağırlıkları sırası ile kontrol (K) grubu 304.0 ± 15.0 gram, kontrast madde nefropatisi (KMN) grubu 297.5 ± 23.2 gram, montelukast (M) grubu 297.7 ± 19.4 gram ve montelukast+kontrast madde nefropatisi (M+KMN) grubunda 308.4 ± 16.6 gramdı. Deney sonu ağırlıklar karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.704$) (Tablo 10).

Tablo 10. Randomize edilen sıçanların bazal ve deney sonu ağırlıkları

Grup	Bazal Ağırlık (g)	Deney Sonu Ağırlık (g)
K	290.5 ± 8.7	304.0 ± 15.0
KMN	291.7 ± 8.3	297.5 ± 23.2
M	287.8 ± 8.4	297.7 ± 19.4
M+KMN	285.8 ± 5.1	308.4 ± 16.6

4.1 Biyokimyasal ve Moleküler Analizlerin Bulguları

4.1.1 Serum ve idrar kreatinin düzeyleri

Serum kreatinin düzeyleri K grubunda 0.27 ± 0.01 mg/dL, KMN grubunda 0.32 ± 0.02 mg/dL, M grubunda 0.26 ± 0.02 mg/dL, M+RKN grubunda 0.26 ± 0.02 mg/dL olarak ölçüldü. KMN grubunda serum kreatinin düzeyleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında yüksek olsa da gruplar arasında serum kreatinin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ($p=0.091$).

İdrar kreatinin düzeyleri, K grubunda 63.4 ± 8.1 mg/dL, KMN grubunda 78.8 ± 5.4 mg/dL, M grubunda 73.1 ± 9.1 mg/dL ve M+RKN grubunda 69.1 ± 11.4 mg/dL olarak ölçüldü. Gruplar karşılaştırıldığında idrar kreatinin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ($p=0.701$) (Tablo 11).

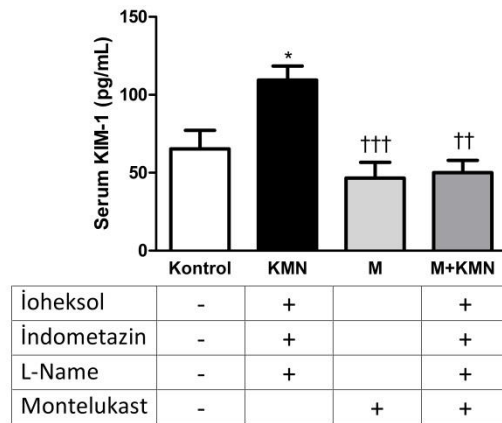
Tablo 11. Serum ve idrar kreatinin düzeyleri (B:bazal, S:deney sonu)

		Kontrol (n=4)	KMN (n=6)	M (n=6)	M+KMN (n=6)
Serum Kreatinin (mg/dL)		0.27 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02
İdrar Kreatinin (mg/dL)	B	63.8 ± 5.9	78.8 ± 3.9	82.5 ± 14.2	71.4 ± 5.4
	S	63.4 ± 8.1	78.8 ± 5.4	73.1 ± 9.1	69.1 ± 11.4

4.1.2 Serum KIM-1 düzeyleri

Serum KIM-1 düzeyleri, K grubunda 65.2 ± 11.9 pg/mL, KMN grubunda 109.4 ± 9.0 pg/mL, M grubunda 46.6 ± 10.1 , M+KMN grubunda 50.0 ± 7.9 pg/mL olarak ölçüldü.

Serum KIM-1 düzeyleri KMN grubunda K grubu ve M grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksekti ($p < 0.05$ ve $p < 0.001$). M grubunda serum KIM-1 düzeyleri K grubu ile karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). M+KMN grubunda serum KIM-1 düzeyleri, KMN grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.01$) (Şekil 7).

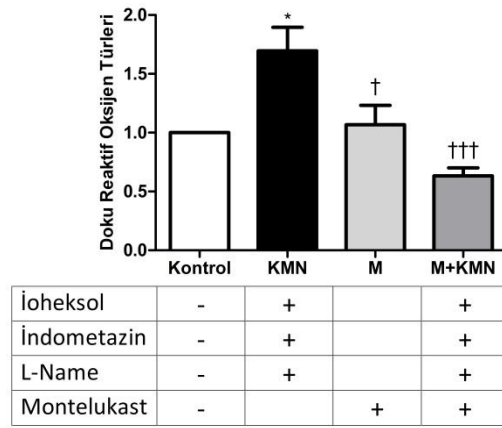


Şekil 7. Deney gruplarında serum KIM-1 düzeyleri (K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (*), $p < 0.05$, K grubuna göre (††), $p < 0.01$ ve (†††), $p < 0.001$ KMN grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

4.1.3 Doku reaktif oksijen türleri düzeyleri

Doku reaktif oksijen türleri (ROS) düzeylerinde, K grubuna göre relatif olarak KMN grubunda 1.69 ± 0.20 kat artış, M grubunda 1.07 ± 0.16 kat artış ve M+KMN grubunda 0.63 ± 0.07 kat artış gözlenmiştir.

Doku ROS düzeyleri, KMN grubunda K grubu ve M grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksekti ($p < 0.05$). M grubunda ise K grubu ile karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). M+KMN grubunda doku ROS düzeyleri, KMN grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 8).



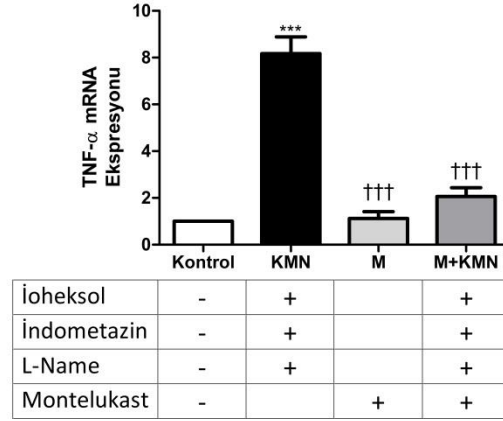
Şekil 8. Deney gruplarında doku reaktif oksijen türleri düzeyleri (K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (*), $p < 0.05$, K grubuna göre (†), $p < 0.05$ ve (†††), $p < 0.001$ KMN grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

4.1.4 TNF- α , KIM-1, NF- κ B, NOX4 ve p22 phox mRNA düzeyleri

TNF- α mRNA ekspresyon düzeyleri K grubu ile karşılaştırıldığında KMN grubunda 8.17 ± 0.71 kat, M grubunda 1.11 ± 0.19 kat ve M+KMN grubunda 2.06 ± 0.38 kat artmıştır.

KMN grubundaki TNF- α mRNA ekspresyonu, K grubuna ve M grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.001$). M grubunda TNF- α mRNA ekspresyonunda artış,

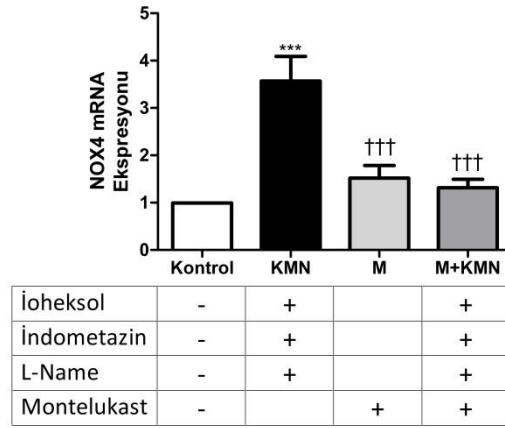
K grubuna göre farklı olarak saptanmamıştır ($p>0.05$). M+KMN grubundaki TNF- α mRNA ekspresyonu KMN grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$).



Şekil 9. Deney gruplarında TNF- α mRNA ekspresyon düzeyleri (K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (***), $p<0.001$, K grubuna göre (†††), $p<0.001$ KMN grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

NOX4 mRNA ekspresyon düzeyleri K grubu ile karşılaştırıldığında KMN grubunda 3.56 ± 0.52 kat, M grubunda 1.51 ± 0.27 kat ve M+KMN grubunda 1.31 ± 0.18 kat artmıştır.

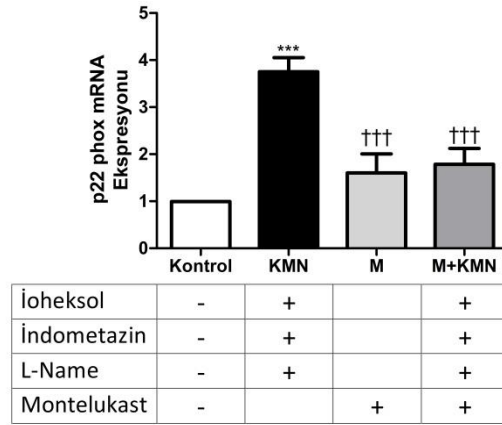
KMN grubundaki NOX4 mRNA ekspresyonu K grubuna ve M grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$). M grubunda NOX4 mRNA ekspresyonunda artış, K grubuna göre farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). M+KMN grubundaki NOX4 mRNA ekspresyonu KMN grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 10).



Şekil 10. Deney gruplarında NOX4 mRNA ekspresyon düzeyleri (K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (***), $p < 0.001$, K grubuna göre (†††), $p < 0.001$ RKN grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

p22 phox mRNA ekspresyon düzeyleri, K grubu ile karşılaştırıldığında KMN grubunda 3.75 ± 0.30 kat, M grubunda 1.60 ± 0.40 kat ve M+RKN grubunda 1.79 ± 0.34 kat artmıştır.

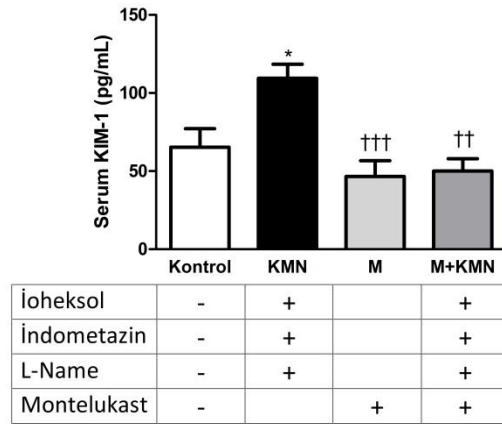
KMN grubundaki p22 phox mRNA ekspresyonu K grubuna ve M grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.001$). M grubunda p22 phox mRNA ekspresyonunda artış, K grubuna göre farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$). M+KMN grubundaki p22 phox mRNA ekspresyonu KMN grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.001$) (Şekil 11).



Şekil 11. Deney gruplarında p22 phox mRNA ekspresyon düzeyleri (K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (***), $p<0.001$, K grubuna göre (†††), $p<0.001$ RKN grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

KIM-1 mRNA ekspresyon düzeyleri, K grubu ile karşılaştırıldığında, KMN grubunda 5.39 ± 0.64 kat, M grubunda 1.14 ± 0.29 kat ve M+KMN grubunda 1.32 ± 0.40 kat artmıştır.

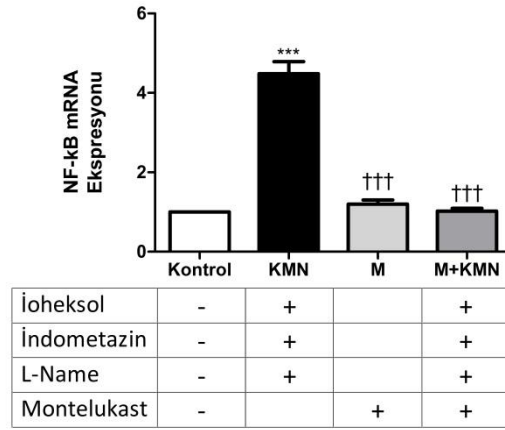
KMN grubundaki KIM-1 mRNA ekspresyonu K grubuna ve M grubuna göre anlamlı oranda artmıştır ($p<0.001$). M grubunda KIM-1 mRNA ekspresyonunda artış, K grubuna farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). M+KMN grubundaki KIM-1 mRNA ekspresyonu KMN grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 12).



Şekil 12. Deney gruplarında KIM-1 mRNA ekspresyon düzeyleri (K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (***) , $p<0.001$, K grubuna göre (†††, $p<0.001$ KMN grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

NF- κ B mRNA ekspresyon düzeyleri, K grubu ile karşılaştırıldığında; KMN grubunda 4.48 ± 0.30 kat, M grubunda 1.20 ± 0.11 kat ve M+KMN grubunda 1.02 ± 0.07 kat artmıştır.

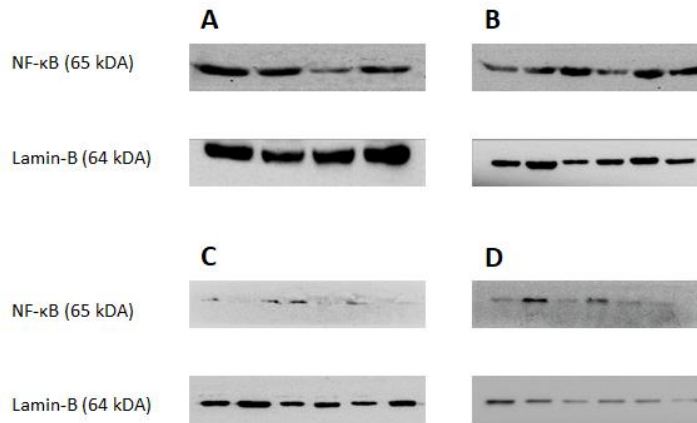
KMN grubunda NF- κ B mRNA ekspresyonu K grubuna ve M grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.001$). M grubunda NF- κ B mRNA ekspresyonunda artış, K grubuna göre farklı bulunmamıştır ($p>0.05$). M+KMN grubundaki NF- κ B mRNA ekspresyonu KMN grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.001$) (Şekil 13).



Şekil 13. Deney gruplarında NF-κB mRNA ekspresyon düzeyleri (K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (***) , $p < 0.001$, K grubuna göre (†††), $p < 0.001$ KMN grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

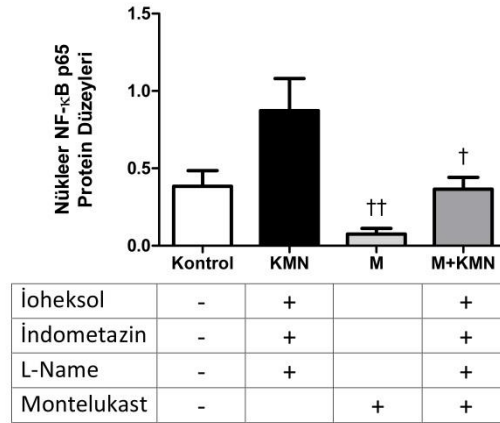
4.1.5 NF-κB Protein Ekspresyonu

Nükleer NF-κB p65 protein ekspresyonu, K grubunda 0.38 ± 0.10 , KMN grubunda 0.87 ± 0.21 , M grubunda 0.07 ± 0.03 ve M+KMN grubunda 0.36 ± 0.07 olarak belirlenmiştir.



Şekil 14. Deney gruplarında, böbrek dokusuna ait homojenatlarda gösterilen nükleer NF-κB p65 proteinin Western Blot görüntüleri. Gruplar, A: Kontrol (K), B: Kontrast madde nefropatisi (KMN), C: Montelukast (M) D: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (M+KMN).

KMN grubunda NF- κ B protein ekspresyonu artışı gözlenmiştir fakat bu artış K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.109$). M+KMN grubunda NF- κ B protein ekspresyonu azalışı KMN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.044$). Sitozolik NF- κ B p65 protein ekspresyonu, örneklerde beklenenin miktarın altında protein bulunması nedeniyle gösterilememiştir (Şekil 14, 15).



Şekil 15. Deney gruplarında, böbrek dokusuna ait homojenatlarda gösterilen nükleer NF- κ B p65 protein ekspresyonu düzeyleri (K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (†), $p<0.05$ ve (††), $p<0.01$ KMN grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

4.2 Histolojik Analiz Bulguları

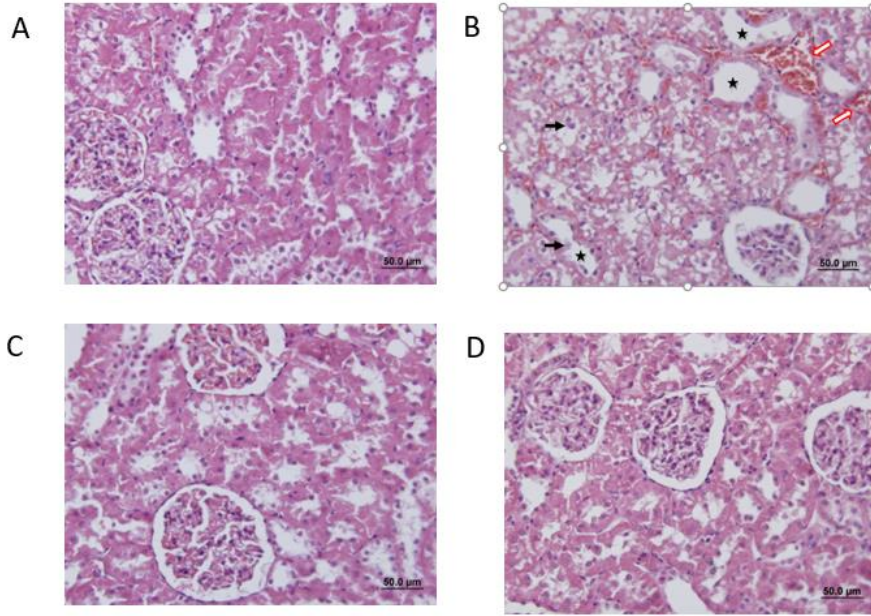
K grubuna ait böbrek kesitleri incelendiğinde normal morfolojik özellikler gözlenmiştir. Korteksin dışında fibröz kapsülün sağlam olarak yer aldığı, korteks ve medulla ayrımının rahatlıkla yapılabildiği saptanmıştır. Kortekste renal korpüsküllerin normal yapıda olduğu, bowman kapsülünün pariyetal ve visseral yaprağının normal histolojik yapıda olduğu belirlenmiştir. Proksimal tübül ve distal tübül, henle kulbu, kollektör tübüllerde yapıların normal olduğu gözlenmiştir. Epitel hücreleri karakteristik yapı ve özelliklerini korumaktaydı. Herhangi bir hücre infiltrasyonu ve fırçamsı kenar kaybı gözlenmemiştir (Şekil 18A).

KMN grubunda, peritübüler alanda az miktarda mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonu, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, ve vakuolizasyon gözlenmiştir. Bazı tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte kast formasyonu ve tübül lümeninde

hücre debrisleri izlenmiştir. Korteksteki bazı bölgelerde, damarlarda vazodilatasyon ve eritrosit ekstravazasyonu saptanmıştır. (Şekil 18B).

M grubunda az miktarda eritrosit ekstravazasyonu ve kapiler dilatasyon, tubuler hasar dışında kontrol grubuna benzer şekilde normal morfolojik özellikler gözlenmiştir (Şekil 18C).

M+KMN grubunda kortikal bölgede özellikle peritübüler alanda MNH infiltrasyonunda, tübül hücrelerinde gözlenen dejenerasyonlarda ve kortekste eritrosit ekstravazasyonunda KMN grubuna göre azalma gözlenmiştir. Tübüluslarda gözlenen tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, vakuolizasyon, tübüllerde proteinöz madde birikimi ile birlikte tübül lümenine hücre debrisleri daha az saptanmıştır (Şekil 18D).



Şekil 16. Deney gruplarında, böbrek dokusuna ait histolojik görüntülemeler. Gruplar, A: Kontrol (K), B: Kontrast madde nefropatisi (KMN), C: Montelukast (M) D: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (M+KMN).

Eritrosit ekstravazasyonu (➡➡), tübüler dilatasyon (★) ve tübüler hücre debrisleri (➡), H-E x40

Histolojik skorlamalarda tüm gruplarda glomerüler hasar saptanmamıştır. Eritrosit ekstrevasyonu ve kapiler dilatasyon skorlamasında kontrol grubunda herhangi bir hasar gözlenmemiş olup, KMN grubunda skor 0.83 ± 0.31 , M grubunda skor 0.17 ± 0.17 , M+KMN grubunda skor 0.33 ± 0.21 olarak belirlenmiştir. KMN ve M gruplarında K grubu skorlaması ile karşılaştırıldığında artan skor istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (sırasıyla; $p=0.067$, $p=0.540$).

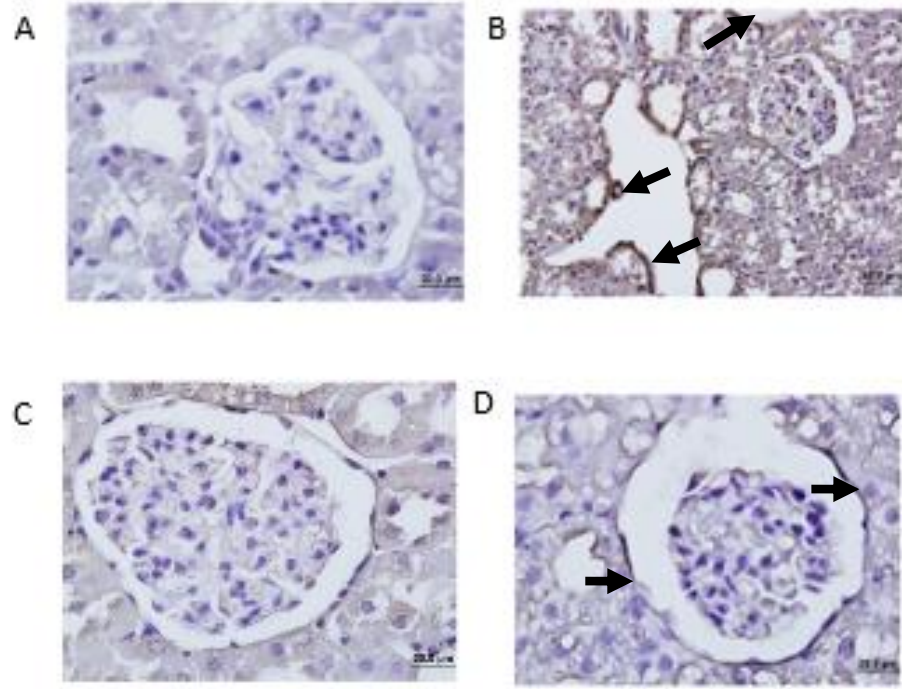
MNH skorlamasında K ve M grubunda herhangi bir hasar gözlenmemiş olup, KMN ve M+KMN grubunda skor 0.17 ± 0.17 olarak belirlenmiştir.

Tübüler hasar skorlamasında K grubunda herhangi bir hasar gözlenmemiş olup, KMN grubunda skor 1.17 ± 0.17 , M grubunda skor 0.33 ± 0.21 , M+KMN grubunda skor 0.50 ± 0.22 olarak belirlenmiştir. KMN grubunda tubuler hasar K grubuna göre anlamlı oranda artmıştır ($p=0.006$) (Tablo 12).

Tablo 12. Histolojik skorlama tablosu (K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi, (**), $p<0.01$, K grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

	K (n=4)	KMN (n=6)	M (n=6)	M+KMN (n=6)
Eritrosit Ekstrevasyonu ve Kapiler Dilatasyon	0.00	0.83 ± 0.31	0.17 ± 0.17	0.33 ± 0.21
Mononükleer Hücre İnfiltrasyonu	0.00	0.17 ± 0.17	0.00	0.17 ± 0.17
Tübüler Hasar	0.00	<u>$1.17 \pm 0.17^{**}$</u>	0.33 ± 0.21	0.50 ± 0.22

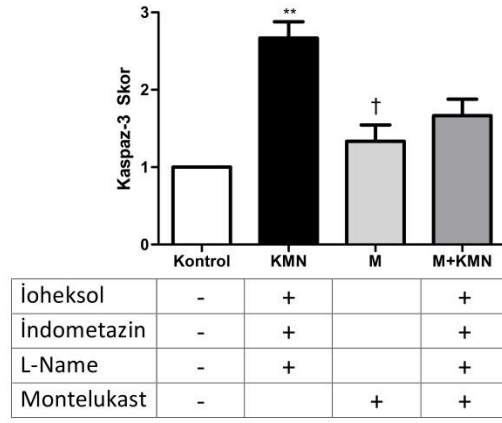
4.2.1 İmmünohistokimyasal bulgular



Şekil 17. Deney gruplarında, böbrek dokusuna ait kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama örnekleri. Gruplar, A: Kontrol (K), B: Kontrast madde nefropatisi (KMN), C: Montelukast (M) D: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (M+KMN). Aktif kaspaz-3 immün pozitif hücreler (➡), x40

Kaspaz-3 immün boyama skorlamasında; K grubunun skoru ortalaması 1.0 ± 0.0 , KMN grubunun skor ortalaması 2.67 ± 0.21 , M grubunun skor ortalaması 1.33 ± 0.21 , M+KMN grubunun skor ortalaması 1.67 ± 0.21 olarak belirlenmiştir.

KMN grubunda kaspaz-3 skor ortalaması K grubuna ve M grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.01$ ve $p < 0.05$). M grubunda skor ortalaması, K grubuna göre farklı saptanmamıştır ($p > 0.05$). Kaspaz-3 skor ortalamaları açısından M+KMN grubu ile KMN grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$) (Şekil 17, 18).



Şekil 18. Deney gruplarında kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama skoru ortalaması
 K: Kontrol, KMN: Kontrast madde nefropatisi, M: Montelukast, M+KMN: Montelukast+Kontrast madde nefropatisi (**), $p<0.01$, K grubuna göre, (†), $p<0.05$ KMN grubuna göre anlamlılığı göstermektedir)

5. TARTIŞMA

Kontrast madde nefropatisi (KMN), radyolojik görüntülemelerde kullanılan kontrast maddelerin infüzyonundan 48-72 saat sonrasında gözlenen ani olarak böbrek fonksiyonlarının azalması ile seyreden akut böbrek hasarıdır. Hastalarda ileri yaş, diyabet, kalp hastalığı, enfeksiyon gibi çeşitli risk faktörlerinin bulunması KMN riskini arttırmaktadır. KMN patofizyolojisinde, oksidatif stres ağırlıklı olmak üzere eşlik eden inflamasyon ve apoptozis yer almaktadır. Montelukastın farklı akut böbrek hasarı modellerinde antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmada, sıçanlarda oluşturulan KMN modelinde, montelukast profilaksisinin KMN'yi önlemede böbrekteki NF- κ B, NOX4 ve p22 phox ekspresyonu aracılı etkisi araştırılmıştır.

İohexsol düşük ozmolariteli, non-iyonik bir kontrast maddedir. Toksisitesi diğer kontrast maddeler ile kıyaslandığında daha düşük olduğundan radyolojik görüntülemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. İohexsol; sağlıklı ve hidrate bireylerde böbrek hasarı oluşturmamasına karşın risk grubunda olan yaşlı, diyabetik, dehidrate ve böbrek fonksiyonları bozuk olan hastalarda nefropati gelişimine neden olabilmektedir. Bu çalışmada yaygın kullanımı nedeniyle KMN modeli oluşturmada iohexsol kullanılmıştır. KMN modelinde, nefropati gelişimini önleyebilecek bir tedavi alternatifi olarak montelukast profilaksisinin etkililiği değerlendirilmiştir.

Çalışmada, KMN modelinin oluşturulmasında 3 g I/kg iohexsol kullanılmıştır (88). İohexsol uygulaması öncesi, 16 saat susuz bırakılan sıçanlara, sırası ile prostaglandin sentezinin inhibisyonu için indometazin ve nitrik oksit sentazın inhibisyonu için L-NAME uygulanmıştır. Oluşturulan nefropatinin şiddeti ve nefropati modelinde montelukast profilaksisinin etkililiği, histolojik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir. Moleküler incelemeler ile gelişen nefropatinin moleküler mekanizmaları ve montelukast profilaksisinin bu moleküler mekanizmalar üzerine etkisi incelenmiştir.

DeneySEL protokolün sonunda sıçanlardan alınan kanlardan ölçülen serum kreatinin düzeyleri ve deneySEL protokolün başında ve sonunda metabolizma kafesleri ile toplanan idrarlarda ölçülen 24 saatlik idrar kreatinin düzeylerinde K ve

KMN grupları arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır. Literatürde bulunan deneysel çalışmalarda, serum kreatinin düzeylerinde birbiri ile çelişkili yanıtlar görülmektedir. Bu yanıtların nedeni seçilen kontrast madde, uygulanan kontrast madde dozu, deney protokolü süresi, model için kullanılan hayvan türü ve hayvanların bireysel yanıtlarındaki farklılıklar gibi faktörlerle ilişkili olabilir. Almeida ve arkadaşlarının (2016), Wistar türü sıçanlarda ioheksol ile oluşturdukları 24 saatlik deneysel KMN modelinde, KMN grubunda K grubuna göre serum kreatinin seviyelerinde %207 oranında artışı gösterilmiştir (89). Zhao ve arkadaşlarının (2016), Sprague-Dawley türü sıçanlarda ioversol ile oluşturdukları 24 saatlik deneysel KMN modelinde, KMN grubunda K grubuna göre serum kreatinin seviyelerinde anlamlı artış gösterilmiştir (90). Barlak ve arkadaşlarının (2010), Wistar türü sıçanlarda iotalamat ile oluşturdukları 48 saatlik KMN modelinde, histolojik olarak orta ve şiddetli bir hasar saptanmasına karşın, gruplar arasında serum kreatinin seviyelerinde istatistiksel anlamlı bir farklılık saptanamamıştır (91). KMN modeli oluşturulması ile ilgili bir araştırmada, ioheksol ile oluşturulan sıçanlarda böbrekte akut fonksiyon değişikliğine direnç nedeniyle serum kreatinin düzeylerinde artış gözlenmediği bildirilmiştir (92). Serum kreatinin seviyelerinin, akut böbrek hasarının tanısında duyarlı bir parametre olmadığı, geri dönüşümsüz bir hasar varlığında serum kreatinin seviyelerinde artışın belirgin olduğu bildirilmiştir (93). Kontrast maddelerin böbrek tübüllerinde hasara neden olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda histolojik olarak böbrek tübüllerinde gelişen hasar skorlamasında, KMN grubunda K grubuna göre yaklaşık %25 oranında fazla hasar saptanmıştır. Oluşturulan hafif-orta düzeyde böbrek hasarı nedeniyle serum kreatinin seviyelerinde anlamlı bir yükseliş saptanamamış olabilir.

Akut böbrek hasarında, hasar sonrasında proksimal tübüllerde eksprese edilen ve sağlıklı böbrekte bulunmayan KIM-1 seviyelerinin arttığı bilinmektedir. Bu çalışmada da, sıçanlardan alınan kanlardan ölçülen serum KIM-1 seviyelerinde, KMN grubunda K ve M gruplarına göre anlamlı artış saptanmıştır. Serum KIM-1 düzeylerinin KMN grubunda kontrole göre artışı KMN gelişimini doğrulamaktadır (94). Büget ve arkadaşlarının (2014) çalışmasında, yoğun bakımda yatan akut böbrek yetmezliği gelişen hastalarda serum KIM-1 düzeylerinin arttığı saptanmıştır (95). Diğer bir çalışmada da akut tubuler nekroz gelişmiş olan hastalardan alınan böbrek

biyopsilerinde de KIM-1 ekspresyonlarında artış saptanmıştır (96). KIM-1 ekspresyonlarının histolojik olarak akut tubuler hasarı gösteme açısından değerli olduğu, üriner ve serum KIM-1 düzeylerinin ise klinik olarak akut tubuler nekroz gelişimini gösterme açısından önemi belirtilmektedir (97).

Kontrast maddelerin böbrek üzerine etkileri, direk ve indirek yolla olmaktadır. Direk nefrotoksik etki ile apoptozise, nekroz gelişimine ve tubuler hasara, indirek etki ile renal hemodinamiklerde değişme sonucu intrarenal vazokonstriksiyon ile meduller hipoksi ve reaktif oksijen türlerinin üretimi ile nefropati ve böbrek fonksiyonlarında bozukluğa neden olmaktadır (98). KMN'de gerçekleşen medüller hipoksi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine katkıda bulunmaktadır. Üretilen ROS, nefropati ve böbrek fonksiyonlarında bozulmaya neden olmaktadır. Bu çalışmada, böbrek dokularında ölçülen ROS seviyelerinin KMN grubunda K ve M gruplarına göre anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Bu bulgu, *in vitro* ve *in vivo* deneysel KMN modellerindeki bulgular ile uyumludur. Toprak ve arkadaşlarının (2008), Wistar türü sıçanlarda diatrizoat oluşturdukları 24 saatlik KMN modelinde, malondialdehit (MDA) seviyelerinde artış gözlenmiştir (99). Liang ve arkadaşlarının (2018), HK2 hücre hattında ioversol ile oluşturdukları deneysel *in vitro* KMN modelinde, ioversolün MDA seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (100). Ko ve arkadaşlarının (2016), C57BL/6J türü farelerde ioheksol ile oluşturdukları 24 saatlik KMN modelinde, KMN grubunda K grubuna göre MDA seviyelerinde anlamlı artış gösterilmiştir (101). Otaibi ve arkadaşlarının (2012), Sprague-Dawley türü sıçanlarda ioheksol ile oluşturdukları 24 saatlik KMN modelinde, lipid peroksidasyonunda artış, redükte glutatyon seviyelerinde azalma, myeloperoksidaz seviyelerinde artış ve MDA seviyelerinde artış gözlenmiştir (102). KMN'de ROS üretiminde artış ve antioksidan kapasitede azalma pek çok deneysel çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada oluşturulan KMN modelinde, böbrek dokusunda saptanan ROS artışı literatürdeki çalışmalarla uyumludur.

NADPH oksidazlar (NOX), ROS üretiminde önemli kaynaklar olup, NOX4 böbrekte yaygın olarak bulunan izoformdur. NOX4 bazal ve patolojik durumlarda ROS üretimine neden olmaktadır ve çeşitli böbrek hasarı ve hastalıklarında indüklendiği gösterilmiştir. p22 phox ise, NOX katalitik alt birimlerinin

stabilizasyonu ve aktivasyonunda görev almaktadır. Bu çalışmada, NOX4 ve p22 phox mRNA ekspresyonları KMN grubunda K grubuna göre anlamlı oranda yükselmiştir. Jeong ve arkadaşlarının (2018), HK2 hücrelerinde ve ioheksol ile oluşturdıkları *in vitro* KMN modelinde, NOX4'ün ROS oluşumu ile ilişkisi ve NOX4 mRNA ile NOX4 protein ekspresyon artışı gösterilmiştir (9). Demir maruziyetine bağlı NOX4 ve p22 phox ekspresyonlarında artış, iki böbrek tek klipsli sıçan modelinde nebivololün NOX4 ve p22 phox ekspresyonlarını azaltarak koruyucu etkisi ve siklosporine bağlı NOX4 ve p22 phox ekspresyonlarındaki artış gösterilmiştir (103–105).

KMN'de oksidatif strese, inflamasyon ve apoptozisin eşlik ettiği bilinmektedir. Bu çalışmada, KMN grubunda, K ve M gruplarına göre TNF- α ve NF- κ B mRNA ekspresyonlarında anlamlı artış saptanmıştır. KMN grubunda K grubuna göre NF- κ B p65 protein ekspresyonlarında artış gözlenmiş olsa da bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. M+KMN grubunda KMN grubuna göre NF- κ B p65 protein ekspresyonlarında anlamlı bir azalış gözlenmiştir. TNF- α 'nın farklı birçok böbrek hasarı modellerinde arttığı bildirilmektedir. Zhang ve arkadaşları (2019), Sprague-Dawley türü sıçanlarda hipoksi ile indüklenmiş böbrek hasarı modelinde TNF- α , IL-6 ve NF- κ B mRNA ekspresyonlarındaki artışı göstermiştir (106). Topaloğlu ve arkadaşları (2019), Wistar türü sıçanlarda diatrizoat ile oluşturulan KMN modelinde, KMN grubunda K grubuna göre TNF- α ve NF- κ B mRNA ekspresyonlarında artış bildirmişlerdir (107). Sarıtemur ve arkadaşları (2015), Wistar türü sıçanlarda ioheksol ile oluşturdıkları KMN modelinde, KMN grubunda K grubuna göre TNF- α , IL-1 β , TGF-1 β ve Kaspaz-3 mRNA ekspresyonlarındaki artışı göstermişlerdir (108). İoheksole bağlı farelerde gelişen kontrast madde nefropatisinde, TNF- α , ICAM-1, monosit kemoatraktant protein gibi çeşitli pro-inflamatuar medyatörlerin mRNA ekspresyonlarında artış olduğu bildirilmiştir (109). Bu çalışmada da KMN grubunda, NF- κ B mRNA ekspresyonunda kontrole göre artış saptanmıştır. Serum TNF- α düzeyleri ise bu çalışmada ölçülememiş ancak böbrek dokusunda TNF- α ekspresyon düzeylerinin artışı ile NF- κ B mRNA ekspresyonunda artışın orantılı olması ioheksole bağlı gelişen inflamasyonu destekler niteliktedir.

KMN'de kontrast maddelerin direkt nefrotoksik etkisine bağılı olarak apoptozis görülmektedir. Apoptozis sinyal yolakları ile ilişkili Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve bcl2'nin KMN'de indüklendiğı bilinmektedir. Bu çalışmada apoptozis, aktif Kaspaz-3 immünboyaması ile yarı-kantitatif skorlanarak değerlendirilmiştir. KMN grubunda aktif Kaspaz-3 boyanma skoru K grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır. Ma ve arkadaşlarının (2019), Sprague-Dawley türü diyabetik sıçanlarda diatrizoat ile oluşturdukları KMN modelinde, KMN grubunda K grubuna göre Kaspaz-3 immün pozitif hücre sayısında anlamlı artışı göstermişlerdir (110). Gong ve arkadaşları (2019), Sprague-Dawley türü sıçanlarda ioheksol ile oluşturdukları KMN modelinde, KMN grubunda K grubuna göre Kaspaz-3 protein ekspresyonunda anlamlı artışı Western blot yöntemi ile göstermişlerdir (111). Rollins ve arkadaşları (2017), Balb/c türü farelerde ioheksol ile oluşturdukları KMN modelinde, KMN grubunda K grubuna göre Kaspaz-3 ve TUNEL immün pozitif hücre sayısında anlamlı artışı göstermişlerdir (112). Bu modelde de, kaspaz-3 immünboyaması ile ioheksole bağılı olarak gelişen apoptozis, literatürle uyumlu olarak doğrulanmıştır.

Montelukast, lökotrien reseptör antagonisti, antioksidan özelliklere sahip bir anti-inflamatuardır. Çeşitli böbrek toksisite modellerinde, antioksidan ve anti-inflamatuvar etkileri ile koruyuculuğı gösterilmiştir. Bu çalışmada, sıçanlarda oluşturulmuş KMN modelinde montelukast profilaksisinin etkililiğı ve etkililiğinde aracılık eden moleküler mekanizmalar araştırılmıştır. 10 mg/kg ve 5 günlük Montelukast profilaksisi uygulanmış olan KMN modeli geliştirilmiş sıçanlarda, KMN grubuna göre histolojik skorlamada istatistiksel anlamlılık saptanmasa da böbrek korteksinde peritübüler mononükleer hücre infiltrasyonu, eritrosit ekstrasvasyonu, tübül hücrelerinde dejenerasyon, tübüler atrofi, tübüler dilatasyon, tübüllerde proteinöz madde birikimi, KMN grubuna göre daha az olarak saptanmıştır. Ancak serum KIM-1 düzeyleri, montelukast profilaksisi uygulanan KMN grubunda anlamlı oranda düşük bulunmuştur. KMN grubunda, böbrek dokusunda mRNA ekspresyonu artan KIM-1 ise montelukast profilaksisi uygulanan grupta KMN grubuna göre anlamlı oranda azalmıştır.

Montelukastın tek başına böbrekte histolojik hasara neden olmadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde doksorubisine bağılı olarak böbrekte gelişen

glomerüloskleroz ve tübüler hasar montelukast tedavisi ile iyileşme göstermiştir (113). Sisplatine bağlı böbrekte oluşan histolojik değişikliklerin montelukast profilaksisi ile kontrol grubuna gerilemediği ancak montelukast tedavisinin sisplatine bağlı böbrekte gelişen tübüler dejenerasyon üzerine olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir (11). Gentamisine bağlı gelişen nefrotoksisitede gelişen tubular dejenerasyon ve tubuler nekroz montelukast profilaksisi ile iyileşme göstermiştir (13).

KMN'nde gelişen patofizyolojik mekanizmalardan olan oksidatif stres göstergesi KMN grubunda artan ROS düzeyleri de montelukast profilaksisi uygulanan grupta anlamlı oranda düşük bulunmuştur. Montelukast tedavisi ile böbrekte oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında, sepsis modelinde, sisplatin ve gentamisine bağlı akut böbrek hasarında; azalan glutatyon düzeylerinde artma, artan MDA düzeylerinde azalma bildirilmiştir (11,13,114,115). Amikasine bağlı böbrek hasar modelinde ve *E.coli* ile oluşturulan piyelonefrit modellerinde de böbrek dokusunda artan MDA, myeloperoksidaz düzeyleri montelukast tedavisi ile anlamlı oranda azalmıştır (116,117). Doksorubisine bağlı kardiyotoksisite modelinde kalp dokusunda artan ROS düzeyleri, montelukast ile normale dönmüştür (118). Literatürdeki çalışmalarda, bu çalışma ile uyumlu olarak montelukastın antioksidan etkileri ile farklı toksisite modellerinde iyileştirici etkileri bildirilmektedir. Bu çalışmada oksidatif stres gelişimine ek olarak, ROS oluşumunun moleküler mekanizmaları da araştırılmıştır. KMN grubunda artan NOX4 ve p22 phox mRNA ekspresyonları da montelukast profilaksisi uygulanan grupta azalmıştır. Radyasyona bağlı kardiyomyositlerde gelişen ROS artışının ve NOX4 mRNA ekspresyon artışının, montelukast tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (119). Başka bir lökotrien reseptör antagonisti olan pranlukastın 5-fluorourosil ile böbrekte mikrozomal glutatyon-S-transferazı indüksiyonu ve NOX4 translokasyonunu önleyerek fare böbreğinde oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (120). Doksorubisine bağlı nefrotoksisite modelinde montelukast profilaksisinin ve tedavisinin oksidatif stres parametrelerini iyileştirdiği bildirilmiştir (113). Asetaminofen ile farelerde oluşturulan hepatotoksisite modelinde de, artan ROS düzeyleri, montelukast profilaksisi ile azalmıştır (121). Bu çalışmada da bu bulgularla uyumlu olarak NOX4 ekspresyon artışının montelukast profilaksisi ile

azaldığı ve membranda ko-lokalize olduğu p22 phox ekspresyonlarındaki değişimin de bu bulgu ile uyumlu olduğu sonucuna varılmıştır.

KMN'nde patofizyolojik mekanizmalardan biri de inflamasyon gelişimidir. KMN grubunda, böbrek dokusunda mRNA ekspresyonları artan TNF- α ve NF- κ B ise montelukast profilaksisi uygulanan grupta KMN grubuna göre anlamlı oranda azalmıştır. Benzer şekilde deneysel olarak oluşturulmuş böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında da artan pro-inflamatuar sitokinler TNF- α , IL-1, IL-6 ve LTB4 mRNA ekspresyonlarının montelukast ile azaldığı gösterilmiştir (114). *E.Coli* ile oluşturulan piyelonefrit modelinde de montelukast tedavisi ile artan TNF- α düzeyleri azalmıştır (117). Montelukastın THP-1 hücrelerinde doza bağlı olarak NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiği, yüksek dozlarda IL-6, TNF- α ve MCP-1 üretimini modüle ettiği gösterilmiştir (122). Oluşturulan KMN modelinde gelişen inflamasyonun belirteçleri olan serum TNF- α ölçülememiş olsa da montelukast profilaksisi ile böbrek dokusunda mRNA ekspresyonlarının azalması KMN'ye bağlı böbrekte gelişen inflamasyon üzerine montelukastın antiinflamatuvar etkisini destekler niteliktedir.

Kontrast maddelerin direkt nefrotoksik etkisi ile indüklenen apoptozisin, montelukast profilaksisi alan grupta istatistiksel anlamlılık saptanmasa da azalma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Akdemir ve arkadaşlarının (2012), Sprague-Dawley türü sıçanlarda iskemi-reperfüzyon ile indüklenmiş over hasarı modelinde, montelukastın kaspaz-3 aracılığıyla apoptozisi azalttığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (123). Montelukastın sıçanlarda spinal kord hasarında apoptozisi Kaspaz-3 aracılığıyla azalttığı Western Blot yöntemi ile gösterilmiştir (124). Sıçanlarda prednizolon ile indüklenmiş hepatik hasar modelinde montelukastın Kaspaz-3 aktivitesinde azalmaya neden olarak apoptozisi azalttığı ELISA yöntemi ile gösterilmiştir (125). Bu çalışmada da literatürde yer alan bulgularla uyumlu olarak KMN'de Kaspaz-3 aracılı apoptozisin montelukast profilaksisi ile azaldığı sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma, kontrast madde enjeksiyonu sonrasında gelişen KMN olgularında antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik etkileri bulunan sisteinil lökotrien-1 reseptör antagonisti montelukast profilaksisinin sıçanlarda oluşturulmuş KMN modelinde, NOX4, p22 phox ve NF- κ B ekspresyonları aracılığıyla etkililiğinin gösterildiği ilk çalışmadır.

Bu çalışmada, sıçanlarda ioheksol ile oluşturulan KMN’de, biyokimyasal belirteçler (serum ve idrar kreatinin seviyeleri, serum KIM-1 seviyeleri ve ROS seviyeleri), moleküler belirteçler (TNF- α , KIM-1, NF- κ B, NOX4, p22 phox mRNA ekspresyonları ve NF- κ B protein ekspresyonları), apoptozis (Kaspaz-3 immünboyama) ve nefropatik hasara bağlı histolojik bulgular değerlendirilmiştir.

Serum ve 24 saatlik idrardan ölçülen kreatinin seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Serum kreatinin seviyelerinin kas kitlesi, yaş, cinsiyet gibi değişkenlerden etkilendiği ve nefropatik hasarda 48-72 saat arasında seviyelerinin belirgin olarak yükseldiği bildirilmektedir. Serum kreatinin seviyelerinin, KMN grubunda K grubuna göre anlamlılık saptanmasa da artış eğiliminde olduğu dikkati çekmektedir. KMN grubunda serum KIM-1 seviyeleri anlamlı olarak artmış, montelukast tedavisi alan grupta ise anlamlı olarak azalmıştır. KIM-1 mRNA ekspresyonlarında KMN grubunda anlamlı bir artış görülmüştür, montelukast tedavisi alan grupta ise KIM-1 mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir azalma görülmüştür.

Doku reaktif oksijen türleri seviyeleri değerlendirildiğinde, KMN’de ROS seviyeleri anlamlı olarak artmış, montelukast tedavisi alan grupta ise anlamlı olarak azalmıştır. NOX4 ve p22 phox mRNA ekspresyonlarında KMN grubunda anlamlı bir artış meydana geldiği görülmüş ve montelukast tedavisi alan grupta NOX4 ve p22 phox mRNA ekspresyonlarında anlamlı bir azalışın meydana geldiği belirlenmiştir. p22 phox protein ekspresyonlarında M ve M+KMN gruplarında anlamlı ve beklenmeyen bir artış gözlenmiştir.

TNF- α mRNA ekspresyonu değerlendirildiğinde, KMN grubunda anlamlı bir artışın meydana geldiği görülmüş ve montelukast tedavisi alan grupta TNF- α mRNA

ekspresyonunda anlamlı bir azalışın meydana getirdiği belirlenmiştir. NF- κ B mRNA ekspresyonlarında KMN grubunda anlamlı bir artış gerçekleşirken, montelukast tedavisi alan grupta NF- κ B mRNA ekspresyonlarında ise anlamlı bir azalış gözlenmiştir. NF- κ B p65 protein ekspresyonunda KMN grubunda artış gözlenirse de bu artış anlamlı bulunmamıştır fakat montelukast tedavisi alan grupta NF- κ B p65 protein ekspresyonunda anlamlı bir azalış meydana gelmiştir.

Histolojik bulgular değerlendirildiğinde, tüm gruplarda glomerüler hasar saptanmamıştır. Eritrosit ekstrasvazasyonu ve mononükleer hücre infiltrasyonu değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Montelukast mononükleer hücre infiltrasyonuna herhangi bir etkide bulunmamıştır. Tübüler hasar değerlendirilmesinde KMN grubunda anlamlılık bulunmuştur, fakat montelukast tedavisi alan grupta tübüler hasar azalmış olsa da bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kaspaz-3 immünboyama sonuçları değerlendirildiğinde KMN grubunda anlamlı bir apoptozis artışı gözlenmiştir, montelukast tedavisi alan grupta apoptozis azalmış olsa da bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuçlarımız, kontrast madde nefropatisinde NOX4, p22 phox ve NF- κ B ekspresyonları üzerinden, 5 günlük montelukast profilaksisinin etkililiği değerlendirildiğinde, hafif derecede böbrek hasarını önleme açısından umut vaat edici olduğunu düşündürmektedir. Montelukast profilaksisinin etkiliği daha fazla hasar oluşturulmuş ve daha uzun süreli KMN modellerinde de araştırılmalıdır.

Sonuç olarak sıçanlarda ioheksol ile oluşturulan KMN modelinde, montelukast profilaksisi, serum KIM-1 düzeylerinde, böbrek dokusundan ölçülen ROS düzeylerinde, TNF- α , KIM-1, NF- κ B, NOX4, p22 phox mRNA düzeylerinde azalmaya neden olmuştur. Sıçanlarda oluşturulan KMN modelinde montelukast profilaksisi NOX-4, p22phox ekspresyonlarını azaltmak suretiyle böbrek dokusundan ölçülen ROS düzeylerinde azalma yapmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. American College of Radiology. ACR Manual On Contrast Media. 2020.
2. Itoh Y, Yano T, Sendo T, Oishi R. Clinical and experimental evidence for prevention of acute renal failure induced by radiographic contrast media. *J Pharmacol Sci.* 2005 Apr;97(4):473–88.
3. Banda J, Duarte R, Dix-Peek T, Dickens C, Manga P, Naicker S. Biomarkers for diagnosis and prediction of outcomes in contrast-induced nephropathy. *Int J Nephrol.* 2020;2020.
4. Tumlin J, Stacul F, Adam A, Becker CR, Davidson C, Lameire N, et al. Pathophysiology of contrast-induced nephropathy. *Am J Cardiol.* 2006 Sep;98(6A):14K-20K.
5. Persson PB, Hansell P, Liss P. Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy. *Kidney Int.* 2005 Jul;68(1):14–22.
6. Chen S, Meng X-F, Zhang C. Role of NADPH Oxidase-Mediated Reactive Oxygen Species in Podocyte Injury. Rizk MZ, editor. *Biomed Res Int.* 2013;2013:839761.
7. Gorin Y. Nox4 as a potential therapeutic target for treatment of uremic toxicity associated to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2013 Apr;83(4):541–3.
8. Zana M, Péterfi Z, Kovács HA, Tóth ZE, Enyedi B, Morel F, et al. Interaction between p22phox and Nox4 in the endoplasmic reticulum suggests a unique mechanism of NADPH oxidase complex formation. *Free Radic Biol Med.* 2018;116:41–9.
9. Jeong BY, Lee HY, Park CG, Kang J, Yu SL, Choi D ri, et al. Oxidative stress caused by activation of NADPH oxidase 4 promotes contrast-induced acute kidney injury. *PLoS One.* 2018;13(1):1–22.
10. Barbosa JS, Almeida Paz FA, Braga SS. Montelukast medicines of today and tomorrow: from molecular pharmaceuticals to technological formulations. *Drug Deliv.* 2016 Nov;23(9):3257–65.
11. Beytur A, Köse E, Sarihan ME, Sapmaz HI, Dogan Z, Cetin A, et al. Beneficial effects of montelukast against cisplatin-induced acute renal damage in rats. *Ren Fail.* 2012;34(3):343–9.

12. Gad AM, El-Raouf OMA, El-Sayeh BM, Fawzy HM, Abdallah DM. Renoprotective effects of montelukast in an experimental model of cisplatin nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 2017 Dec;31(12).
13. Otunctemur A, Ozbek E, Cekmen M, Cakir SS, Dursun M, Polat EC, et al. Protective effect of montelukast which is cysteinyl-leukotriene receptor antagonist on gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Ren Fail*. 2013;35(3):403–10.
14. Pasternak JJ, Williamson EE. Reactions of Iodinated Contrast Agents : A Primer for the Non-radiologist. *JMCP*. 2012;87(4):390–402.
15. Christiansen C. X-ray contrast media--an overview. *Toxicology*. 2005 Apr;209(2):185–7.
16. Thomsen HS. Contrast media safety-an update. *Eur J Radiol*. 2011 Oct;80(1):77–82.
17. Geenen RWF, Kingma HJ, van der Molen AJ. Contrast-induced nephropathy: Pharmacology, pathophysiology and prevention. *Insights Imaging*. 2013;4(6):811–20.
18. Beckett KR, Moriarity AK, Langer JM. Safe use of contrast media: What the radiologist needs to know. *Radiographics*. 2015;35(6):1738–50.
19. Speck U. Pharmacological Properties Of CM. In: *X-Ray Contrast Media OVERVIEW, USE AND PHARMACEUTICAL ASPECTS*. 2018. p. 72–88.
20. Bush WH, Swanson DP. Acute reactions to intravascular contrast media: types, risk factors, recognition, and specific treatment. *AJR Am J Roentgenol*. 1991 Dec;157(6):1153–61.
21. Cochran ST. Anaphylactoid reactions to radiocontrast media. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005 Jan;5(1):28–31.
22. Almén T. The etiology of contrast medium reactions. *Invest Radiol*. 1994 May;29 Suppl 1:S37-45.
23. Limbruno U, De Caterina R. Vasomotor effects of iodinated contrast media: just side effects? *Curr Vasc Pharmacol*. 2003 Oct;1(3):321–8.
24. Thomsen HS, Bush WH. Treatment of the adverse effects of contrast media. *Acta radiol*. 1998;39(3):212–8.
25. Tehrani S, Laing C, Yellon DM, Hausenloy DJ. Contrast-induced acute

- kidney injury following PCI. *Eur J Clin Invest*. 2013 May;43(5):483–90.
26. Jeon YK, Kim MR, Huh JE, Mok JY, Song SH, Kim SS, et al. Cystatin C as an early biomarker of nephropathy in patients with type 2 diabetes. *J Korean Med Sci*. 2011 Feb;26(2):258–63.
 27. Zhang F, Lu Z, Wang F. Advances in the pathogenesis and prevention of contrast-induced nephropathy. Vol. 259, *Life Sciences*. Elsevier; 2020. p. 118379.
 28. Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, et al. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep*. 2012;64(1):31–44.
 29. Lauver DA, Carey EG, Bergin IL, Lucchesi BR, Gurm HS. Sildenafil citrate for prophylaxis of nephropathy in an animal model of contrast-induced acute kidney injury. *PLoS One*. 2014;9(11):e113598.
 30. Burgess WP, Walker PJ. Mechanisms of contrast-induced nephropathy reduction for saline (NaCl) and sodium bicarbonate (NaHCO₃). *Biomed Res Int*. 2014;2014:510385.
 31. Brenner BM, Troy JL, Ballermann BJ. Endothelium-dependent vascular responses. Mediators and mechanisms. *J Clin Invest*. 1989 Nov;84(5):1373–8.
 32. Myers SI, Wang L, Liu F, Bartula LL. Iodinated contrast induced renal vasoconstriction is due in part to the downregulation of renal cortical and medullary nitric oxide synthesis. *J Vasc Surg*. 2006 Aug;44(2):383–91.
 33. Pflueger A, Larson TS, Nath KA, King BF, Gross JM, Knox FG. Role of adenosine in contrast media-induced acute renal failure in diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc*. 2000 Dec;75(12):1275–83.
 34. Oldroyd SD, Fang L, Haylor JL, Yates MS, El Nahas AM, Morcos SK. Effects of adenosine receptor antagonists on the responses to contrast media in the isolated rat kidney. *Clin Sci (Lond)*. 2000 Mar;98(3):303–11.
 35. Hansen PB, Hashimoto S, Oppermann M, Huang Y, Briggs JP, Schnermann J. Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the mouse kidney due to preferential activation of A₁ or A₂ adenosine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Dec;315(3):1150–7.
 36. Pflueger A, Abramowitz D, Calvin AD. Role of oxidative stress in contrast-induced acute kidney injury in diabetes mellitus. *Med Sci Monit Int Med J*

- Exp Clin Res. 2009 Jun;15(6):RA125-36.
37. Heyman SN, Clark BA, Kaiser N, Spokes K, Rosen S, Brezis M, et al. Radiocontrast agents induce endothelin release in vivo and in vitro. *J Am Soc Nephrol*. 1992 Jul;3(1):58–65.
 38. Sung JM, Shu GH, Tsai JC, Huang JJ. Radiocontrast media induced endothelin-1 mRNA expression and peptide release in porcine aortic endothelial cells. *J Formos Med Assoc*. 1995 Mar;94(3):77–86.
 39. Botting R, Vane JR. Vasoactive mediators derived from the endothelium. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1989 Nov;82 Spec No:11–4.
 40. Breyer MD, Breyer RM. Prostaglandin E receptors and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000 Jul;279(1):F12-23.
 41. Spargias K, Adreanides E, Demerouti E, Gkouziouta A, Manginas A, Pavlides G, et al. Iloprost prevents contrast-induced nephropathy in patients with renal dysfunction undergoing coronary angiography or intervention. *Circulation*. 2009 Nov;120(18):1793–9.
 42. Gurkowski L, MacDougall M, Wiegmann T. Effects of Misoprostol on Contrast-Induced Renal Dysfunction. *Am J Ther*. 1995;2(11):837—842.
 43. Heyman SN, Rosen S, Khamaisi M, Idée J-M, Rosenberger C. Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. *Invest Radiol*. 2010 Apr;45(4):188–95.
 44. Briguori C, Donnarumma E, Quintavalle C, Fiore D, Condorelli G. Contrast-induced acute kidney injury: potential new strategies. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015 Mar;24(2):145–53.
 45. Delp MD, Behnke BJ, Spier SA, Wu G, Muller-Delp JM. Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol*. 2008 Feb;586(4):1161–8.
 46. Heyman SN, Rosenberger C, Rosen S, Khamaisi M. Why is diabetes mellitus a risk factor for contrast-induced nephropathy? *Biomed Res Int*. 2013;2013:123589.
 47. Xing Y, Wei R, Tang L, Yang Y, Zheng X, Wang Z, et al. Protective effect of salidroside on contrast-induced nephropathy in comparison with N-acetylcysteine and its underlying mechanism. *Chin J Integr Med*.

- 2015;21(4):266–73.
48. Burgess WP, Walker PJ. Mechanisms of Contrast-Induced Nephropathy Reduction for Saline (NaCl) and Sodium Bicarbonate (NaHCO₃). Andreucci M, editor. Biomed Res Int. 2014;2014:510385.
 49. Solomon R. Contrast media: are there differences in nephrotoxicity among contrast media? Biomed Res Int. 2014;2014:934947.
 50. Duan S Bin, Liu GL, Chen GC, Wang P, Pan P, Xu XQ. Aged rats are susceptible to nephrotoxicity induced by iodinated contrast media. Ren Fail. 2013;35(1):150–4.
 51. Thallas-Bonke V, Jha JC, Gray SP, Barit D, Haller H, Schmidt HHHW, et al. Nox-4 deletion reduces oxidative stress and injury by PKC- α -associated mechanisms in diabetic nephropathy. Physiol Rep. 2014 Nov;2(11).
 52. Ozgur T, Tutanc M, Zararsiz I, Motor S, Ozturk OH, Yaldiz M, et al. The protective effect of ebselen on radiocontrast-induced nephrotoxicity. Ren Fail. 2012;34(8):991–7.
 53. Pisani A, Riccio E, Andreucci M, Faga T, Ashour M, Di Nuzzi A, et al. Role of reactive oxygen species in pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy. Biomed Res Int. 2013;2013:868321.
 54. Haller C, Hizoh I. The cytotoxicity of iodinated radiocontrast agents on renal cells in vitro. Invest Radiol. 2004 Mar;39(3):149–54.
 55. Kiss N, Hamar P. Histopathological Evaluation of Contrast-Induced Acute Kidney Injury Rodent Models. Biomed Res Int. 2016;2016:3763250.
 56. Romano G, Briguori C, Quintavalle C, Zanca C, Rivera N V, Colombo A, et al. Contrast agents and renal cell apoptosis. Eur Heart J. 2008 Oct;29(20):2569–76.
 57. Ward DB, Brown KC, Valentovic MA. Radiocontrast Agent Diatrizoic Acid Induces Mitophagy and Oxidative Stress via Calcium Dysregulation. Int J Mol Sci. 2019 Aug;20(17).
 58. Yue R, Zuo C, Zeng J, Su B, Tao Y, Huang S, et al. Atorvastatin attenuates experimental contrast-induced acute kidney injury: a role for TLR4/MyD88 signaling pathway. Ren Fail. 2017 Nov;39(1):643–51.
 59. Wang Y, Zhang H, Yang Z, Miao D, Zhang D. Rho Kinase Inhibitor, Fasudil,

- Attenuates Contrast-induced Acute Kidney Injury. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;122(2):278–87.
60. Michael A, Faga T, Pisani A, Riccio E, Bramanti P, Sabbatini M, et al. Molecular mechanisms of renal cellular nephrotoxicity due to radiocontrast media. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 61. Panday A, Sahoo MK, Osorio D, Batra S. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(1):5–23.
 62. Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, Leto TL. Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jul;97(14):8010–4.
 63. Block K, Gorin Y, Abboud HE. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug;106(34):14385–90.
 64. Yu L, Zhen L, Dinauer MC. Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b558. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91phox and p22phox subunits. *J Biol Chem*. 1997 Oct;272(43):27288–94.
 65. Rajaram RD, Dissard R, Jaquet V, de Seigneux S. Potential benefits and harms of NADPH oxidase type 4 in the kidneys and cardiovascular system. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2019 Apr;34(4):567–76.
 66. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, Phelan PJ, Ariyan S, Dikalov S, et al. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res*. 2005 Oct;97(9):900–7.
 67. Babelova A, Avaniadi D, Jung O, Fork C, Beckmann J, Kosowski J, et al. Role of Nox4 in murine models of kidney disease. *Free Radic Biol Med*. 2012 Aug;53(4):842–53.
 68. Paré G, Chasman DI, Parker AN, Zee RRY, Mälarstig A, Seedorf U, et al. Novel associations of CPS1, MUT, NOX4, and DPEP1 with plasma homocysteine in a healthy population: a genome-wide evaluation of 13 974 participants in the Women's Genome Health Study. *Circ Cardiovasc Genet*.

- 2009 Apr;2(2):142–50.
69. Marouli E, Graff M, Medina-Gomez C, Lo KS, Wood AR, Kjaer TR, et al. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. *Nature*. 2017 Feb;542(7640):186–90.
 70. Meng X-M, Ren G-L, Gao L, Yang Q, Li H-D, Wu W-F, et al. NADPH oxidase 4 promotes cisplatin-induced acute kidney injury via ROS-mediated programmed cell death and inflammation. *Lab Invest*. 2018 Jan;98(1):63–78.
 71. Yang X, Zhao K, Deng W, Zhao L, Jin H, Mei F, et al. Apocynin Attenuates Acute Kidney Injury and Inflammation in Rats with Acute Hypertriglyceridemic Pancreatitis. *Dig Dis Sci*. 2020 Jun;65(6):1735–47.
 72. He T, Xiong J, Nie L, Yu Y, Guan X, Xu X, et al. Resveratrol inhibits renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by regulating AMPK/NOX4/ROS pathway. *J Mol Med (Berl)*. 2016 Dec;94(12):1359–71.
 73. Yoo J-Y, Cha DR, Kim B, An EJ, Lee SR, Cha JJ, et al. LPS-Induced Acute Kidney Injury Is Mediated by Nox4-SH3YL1. *Cell Rep*. 2020 Oct;33(3):108245.
 74. Zoungas S, Ninomiya T, Huxley R, Cass A, Jardine M, Gallagher M, et al. Systematic review: sodium bicarbonate treatment regimens for the prevention of contrast-induced nephropathy. *Ann Intern Med*. 2009 Nov;151(9):631–8.
 75. ACT Investigators. Acetylcysteine for Prevention of Renal Outcomes in Patients Undergoing Coronary and Peripheral Vascular Angiography. *Circulation*. 2011;124(11):1250–9.
 76. Toso A, Leoncini M, Maioli M, Bellandi F. Pharmacologic Prophylaxis of Contrast-Induced Nephropathy. Vol. 9, *Interventional Cardiology Clinics*. Elsevier Inc; 2020. p. 369–83.
 77. Savari S, Vinnakota K, Zhang Y, Sjölander A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan;20(4):968–77.
 78. Benninger MS, Waters H. Montelukast: Pharmacology, Safety, Tolerability and Efficacy. *Clin Med Ther*. 2009 Jan 1;1:CMT.S1147.
 79. Sener G, Sehirli O, Toklu H, Ercan F, Alican I. Montelukast reduces ischaemia/reperfusion-induced bladder dysfunction and oxidant damage in

- the rat. *J Pharm Pharmacol*. 2007 Jun;59(6):837–42.
80. Okumu A, DiMaso M, Löbenberg R. Dynamic dissolution testing to establish in vitro/in vivo correlations for montelukast sodium, a poorly soluble drug. *Pharm Res*. 2008 Dec;25(12):2778–85.
 81. Cheng H, Leff JA, Amin R, Gertz BJ, De Smet M, Noonan N, et al. Pharmacokinetics, bioavailability, and safety of montelukast sodium (MK-0476) in healthy males and females. *Pharm Res*. 1996 Mar;13(3):445–8.
 82. The United States Food and Drug Administration. Singulair (Montelukast Sodium). 2007;1–19.
 83. Manisalıgil YA, Cilaker Micili S, Kizildag S, Celik A, Bagriyanik HA, Gumustekin M. Assessment of Rac1 and β -PAK Expressions in a Mouse Model for Contrast-Induced Nephropathy. Vol. 4, *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İnciraltı İzmir 35340: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2020. p. 230–6.
 84. Ozkan E, Akyüz C, Sehirli AO, Topaloğlu U, Ercan F, Sener G. Montelukast, a selective cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, reduces cerulein-induced pancreatic injury in rats. *Pancreas*. 2010 Oct;39(7):1041–6.
 85. Kuru S, Kismet K, Barlas AM, Tuncal S, Celepli P, Surer H, et al. The Effect of Montelukast on Liver Damage in an Experimental Obstructive Jaundice Model. *Viszeralmedizin*. 2015 Apr;31(2):131–8.
 86. Zhang Q, Ji Y, Lv W, He T, Wang J. Protective effects of leflunomide on renal lesions in a rat model of diabetic nephropathy. *Ren Fail*. 2016;38(1):124–30.
 87. Yasuda H, Yuen PST, Hu X, Zhou H, Star RA. Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. *Kidney Int*. 2006;69(9):1535–42.
 88. Caliskan F, Koca P, Bora RU, Cilaker Micili S, Kizildag S, Arici A, et al. Kontrast Madde Nefropatisi Modeli ve Probenesidin Etkililiği: Ön Çalışma Sonuçları. In: *ATUDER Kapadokya Toxicology Symposium (KAPATOKS 2017) and 24 Ulusal Farmakoloji Kongresi, 8 Klinik Farmakoloji Sempozyumu ve 7 Klinik Toksikoloji Sempozyumu*. 2017.
 89. Almeida LS De, Barboza JR, Freitas FPS, Porto ML, Vasquez EC, Meyrelles

- SS, et al. Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats. *Hum Exp Toxicol*. 2016;35(11):1194–202.
90. Zhao Z, Liao G, Zhou Q, Lv D, Holthfer H, Zou H. Sulforaphane Attenuates Contrast-Induced Nephropathy in Rats via Nrf2/HO-1 Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:11–3.
 91. Barlak A, Akar H, Yenicerioglu Y, Yenisey C, Meteoğlu I, Yilmaz O. Effect of sodium bicarbonate in an experimental model of radiocontrast nephropathy. *Ren Fail*. 2010;32(8):992–9.
 92. Rowe ES, Rowe VD, Biswas S, Mosher G, Insisienmay L, Ozias MK, et al. Preclinical Studies of a Kidney Safe Iodinated Contrast Agent. *J Neuroimaging*. 2016;26(5):511–8.
 93. Shang W, Wang Z. The Update of NGAL in Acute Kidney Injury. *Curr Protein Pept Sci*. 2017;18(12):1211–7.
 94. Bonventre J V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2008;241:78–83.
 95. Büget Mİ, Özkilitçi E, Küçükgergin C, Seçkin Ş, Küçükay S, Yenigün Y, et al. Diagnosis of Acute Kidney Failure in Intensive Care Unit: Neutrophil Gelatinase Associated Lipocain (NGAL), Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), Interleukine-18 (İL-18), Cystatin C. *Turkish J Intensive Care*. 2014;12(3):0.
 96. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre J V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*. 2002;62(1):237–44.
 97. Cai J, Jiao X, Luo W, Chen J, Xu X, Fang Y, et al. Kidney injury molecule-1 expression predicts structural damage and outcome in histological acute tubular injury. *Ren Fail*. 2019;41(1):80–7.
 98. 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.
 99. Toprak O, Cirit M, Tanrisev M, Yazici C, Canoz O, Sipahioglu M, et al. Preventive effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(3):853–9.
 100. Liang R, Zhao Q, Jian G, Cheng D, Wang N, Zhang G, et al. Tanshinone IIA

- Attenuates Contrast-Induced Nephropathy via Nrf2 Activation in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(6):2616–23.
101. Ko GJ, Bae SY, Hong Y-A, Pyo HJ, Kwon YJ. Radiocontrast-induced nephropathy is attenuated by autophagy through regulation of apoptosis and inflammation. *Hum Exp Toxicol*. 2016 Jul;35(7):724–36.
 102. Al-Otaibi KE, Al Elaiwi AM, Tariq M, Al-Asmari AK. Simvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of oxidative stress, proinflammatory myeloperoxidase, and nitric oxide. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:831748.
 103. Cavdar Z, Oktan MA, Ural C, Kocak A, Calisir M, Heybeli C, et al. Alpha lipoic acid attenuates iron induced oxidative acute kidney injury in rats. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm*. 2020 Sep;1–9.
 104. Oh SW, Lee ES, Kim S, Na KY, Chae DW, Kim S, et al. Bilirubin attenuates the renal tubular injury by inhibition of oxidative stress and apoptosis. *BMC Nephrol*. 2013 May;14:105.
 105. Wang Y, Niu M, Yin S, Zhang F, Shi R. Nephroprotective effects of nebivolol in 2K1C rats through regulation of the kidney ROS-ADMA-NO pathway. *Pharmacol Rep*. 2018 Sep;70(5):917–29.
 106. Zhang C, Dong H, Chen F, Wang Y, Ma J, Wang G. The HMGB1-RAGE/TLR-TNF- α signaling pathway may contribute to kidney injury induced by hypoxia. *Exp Ther Med*. 2019 Jan;17(1):17–26.
 107. Topaloğlu US, Sipahioğlu MH, Güntürk İ, Akgün H, Doğan ME, Sönmez G, et al. Effects of thymoquinone in prevention of experimental contrast-induced nephropathy in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2019 Dec;22(12):1432–9.
 108. Saritemur M, Un H, Cadirci E, Karakus E, Akpınar E, Halici Z, et al. Tnf- α inhibition by infliximab as a new target for the prevention of glycerol-contrast-induced nephropathy. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015 Mar;39(2):577–88.
 109. Lee HT, Jan M, Bae SC, Joo JD, Goubaeva FR, Yang J, et al. A1 adenosine receptor knockout mice are protected against acute radiocontrast nephropathy in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006 Jun;290(6):F1367–75.
 110. Ma X, Jiao Z, Liu Y, Chen J, Li G, Liu T, et al. Probucol Protects Against

- Contrast-Induced Acute Kidney Injury via the Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 (ERK1/2)/JNK-Caspase 3 Pathway in Diabetic Rats. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2019 Feb;25:1038–45.
111. Gong X, Duan Y, Zheng J, Ye Z, Hei TK. Tetramethylpyrazine Prevents Contrast-Induced Nephropathy via Modulating Tubular Cell Mitophagy and Suppressing Mitochondrial Fragmentation, CCL2/CCR2-Mediated Inflammation, and Intestinal Injury. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019:7096912.
 112. Rollins K, Noorani A, Janeckova L, Jones T, Griffiths M, Baker MP, et al. Ascorbic acid ameliorates renal injury in a murine model of contrast-induced nephropathy. *BMC Nephrol.* 2017 Mar;18(1):101.
 113. Köse E, Oğuz F, Vardi N, Ediz Sarihan M, Beytur A, Yücel A, et al. Therapeutic and protective effects of montelukast against doxorubicin-induced acute kidney damage in rats. *Iran J Basic Med Sci.* 2019 Apr;22(4):407–11.
 114. Sener G, Sehirli O, Velioğlu-Oğünç A, Cetinel S, Gedik N, Caner M, et al. Montelukast protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacol Res.* 2006 Jul;54(1):65–71.
 115. Khodir AE, Ghoneim HA, Rahim MA, Suddek GM. Montelukast reduces sepsis-induced lung and renal injury in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2014 Oct;92(10):839–47.
 116. Kose E, Beytur A, Dogan Z, Ekincioglu Z, Vardi N, Cinar K, et al. The effects of montelukast against amikacin-induced acute renal damage. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 Apr;16(4):503–11.
 117. Tuğtepe H, Sener G, Cetinel S, Velioğlu-Oğünç A, Yeğen BC. Oxidative renal damage in pyelonephritic rats is ameliorated by montelukast, a selective leukotriene CysLT1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 2007 Feb;557(1):69–75.
 118. Hafez HM, Hassanein H. Montelukast ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity via modulation of p-glycoprotein and inhibition of ROS-mediated TNF- α /NF- κ B pathways. *Drug Chem Toxicol.* 2020 Feb;1–12.
 119. Zhang Y, Zheng H, Wang M. Montelukast protects H9c2 cardiomyocytes against radiation-induced toxicity. *Arch Med Sci.* 2021;

120. Rubinstein M, Dvash E. Leukotrienes and kidney diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2018 Jan;27(1):42–8.
121. Pu S, Liu Q, Li Y, Li R, Wu T, Zhang Z, et al. Montelukast Prevents Mice Against Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Front Pharmacol*. 2019;10:1070.
122. Maeba S, Ichiyama T, Ueno Y, Makata H, Matsubara T, Furukawa S. Effect of montelukast on nuclear factor kappaB activation and proinflammatory molecules. *Ann allergy, asthma Immunol Off Publ Am Coll Allergy, Asthma, Immunol*. 2005 Jun;94(6):670–4.
123. Akdemir A, Erbaş O, Ergenoğlu M, Özgür Yeniel A, Oltulu F, Yavaşoğlu A, et al. Montelukast prevents ischaemia/reperfusion-induced ovarian damage in rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014 Feb;173:71–6.
124. Erşahin M, Çevik Ö, Akakın D, Şener A, Özbay L, Yegen BC, et al. Montelukast inhibits caspase-3 activity and ameliorates oxidative damage in the spinal cord and urinary bladder of rats with spinal cord injury. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2012 Dec;99(3–4):131–9.
125. Hegab II, El-Horany HE-S, Elbatsh MM, Helal DS. Montelukast abrogates prednisolone-induced hepatic injury in rats: Modulation of mitochondrial dysfunction, oxidative/nitrosative stress, and apoptosis. *J Biochem Mol Toxicol*. 2018 Oct;e22231.

8. EKLER

Ek 1. 22 Mayıs 2019 toplantı tarihli ve 23/2019 protokol numaralı Etik Kurul Kararı

Ek 1.

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

35340 İnciraltı İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 03/10/2019
Toplantı Tarihi : 22 Mayıs 2019

Doç.Dr.Mualla Aylin ARICI
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

23/2019 Protokol No'lu: yürütücüsü olduğunuz "Sıçanlarda radyokontrast madde nefropatisini önlemede Montelukast'ın NF-κB, NOX4 ve p22 phox ekspresyonu aracılı etkisi" isimli; Mukaddes Gümüştekin, Osman Yılmaz, Zahide Çavdar, Seda Özbal, Oğuzhan Şimşek, Elif Barış, Canet İncir, Yaşar Aysun Manisalıgil'in araştırmacı olduğu 28 adet Wistar Albino erkek sıçan verilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

9. **KATKI**

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2019.KB.SAG.068 sayı ile desteklenmiştir.



10. ÖZGEÇMİŞ



OĞUZHAN ŞİMŞEK

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi

Telefon

E-posta

İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

06 Ağustos 2018 - Şu Anda (3 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, FARMAKOLOJİ (YL)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.32 / 4.0

28 Eylül 2015 - Şu Anda (5 yıl 11 ay)
Lisans, Açıköğretim, ANADOLU ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
İKTİSAT FAKÜLTESİ, ULUSLARARASI İLİŞKİLER PR. (AÇIKÖĞRETİM)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.31 / 4.0

02 Eylül 2014 - 28 Mayıs 2018 (3 yıl 9 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
BİYOKİMYA BÖLÜMÜ, BİYOKİMYA PR.
Diploma Numarası: 2017/04/0165
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.44 / 4.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Ocak 2018 - 01 Şubat 2018 (2 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, İZMİR BİYOTIP VE GENOM ENSTİTÜSÜ

01 Ağustos 2017 - 01 Eylül 2017 (2 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, İZMİR BİYOTIP VE GENOM ENSTİTÜSÜ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜRKÇE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

ALMANCA (Okuma: Başlangıç, Yazma: Başlangıç, Konuşma: Başlangıç)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Temel Tıp Bilimleri -- Biyokimya

Sağlık Bilimleri -- Eczacılık -- Meslek Bilimleri -- Farmakoloji

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji -- Tıbbi Farmakoloji ve Toksikoloji

Anahtar Kelimeler

Biyokimya
Farmakoloji
Tıbbi Farmakoloji
Moleküler Farmakoloji
Moleküler Biyokimya

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

E. BARIŞ, O. ŞİMŞEK, H. EFE, Ş. ÖNCÜ, A. GELAL, E. HAMURTEKİN, M. TOSUN, S. ÖZBAL, Z. YÜCE & M. A. ARICI, Effects of CDP-Choline and Choline on COX Pathway in LPS-Induced Inflammatory Response in Rats, International Journal of Pharmacology, 2021, 1811-7775, 17, 2, 84-96.

H. GÜVEN, M. A. ARICI & O. ŞİMŞEK, Flavonoids in Our Foods: A Short Review, Journal of Basic and Clinical Health Sciences, 2019, 2564-7288, 3, 2, 96-106.

Bildiriler

E. BARIŞ, O. ŞİMŞEK, Ş. ÖNCÜ, H. EFE, A. GELAL, E. HAMURTEKİN, S. ÖZBAL, Z. YÜCE & M. A. ARICI, Sıçanlarda Lipopolisakkarit ile Oluşturulan Sepsis Modelinde Kolin ve Sitikolinin Etkileri, Poster Sunumu, 25. ULUSAL FARMAKOLOJİ KONGRESİ, 04 Kasım 2019, 07 Kasım 2019.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0