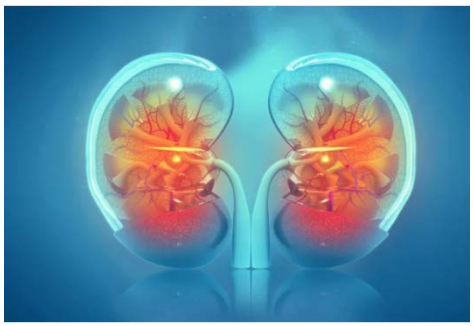
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΒΛΑΒΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΑΡΕΝΤΕΡΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΙΩΔΙΟΥΧΩΝ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ



Ειρήνη Φραγκιαδουλάκη

Ηράκλειο 2023

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Χαράλαμπος Μαμουλάκης, Καθηγητής Ουρολογίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χαράλαμπος Μαμουλάκης, Καθηγητής Ουρολογίας

Αριστείδης Τσατσάκης, Καθηγητής Τοξικολογίας

Ντράγκανα Νικίτοβιτς, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Χαράλαμπος Μαμουλάκης, Καθηγητής Ουρολογίας

2. Αριστείδης Τσατσάκης, Καθηγητής Τοξικολογίας

3. Ντράγκανα Νικίτοβιτς-Τζανακάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ιστολογίας-Εμβρυολογίας

4. Χρήστος Ιωάννου, Καθηγητής Αγγειοχειρουργικής

5. Απόστολος Καραντάνας, Καθηγητής Ακτινολογίας

6. Εμμανουήλ Τζατζαράκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Τοξικολογίας

7. Κωνσταντίνος Στυλιανού, Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καθ' όλη τη διάρκεια της συγγραφής αυτής της διατριβής, έλαβα μεγάλη υποστήριξη και βοήθεια. Θα ήθελα κατ' αρχάς να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή μου κ. Μαμουλάκη Χαράλαμπο, Διευθυντή Ουρολογικής Κλινικής Πα.Γ.Ν.Η., η εμπειρογνωμοσύνη του οποίου ήταν ανεκτίμητη στη διατύπωση των ερευνητικών ερωτημάτων και μεθοδολογίας. Τα διορατικά σας σχόλια με ώθησαν να οξύνω τη σκέψη μου και έφεραν τη δουλειά μου σε ένα υψηλότερο επίπεδο. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Τσατσάκη Αριστείδη, Διευθυντή του Εργαστηρίου Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας που μου έδωσε την ευκαιρία να κάνω τη διδακτορική μου διατριβή στο Εργαστήριό του. Μου παρείχατε τα εργαλεία που χρειαζόμουν για να επιλέξω τη σωστή κατεύθυνση και να ολοκληρώσω με επιτυχία τη διατριβή μου. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Καθηγήτρια κα. Νικίτοβιτς Ντράγκανα για την πολύτιμη καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Η υποστήριξή και η κριτική σας με καθοδήγησαν σε όλη τη διάρκεια των διδακτορικών μου σπουδών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου από το Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης καθώς και την κ. Δήμητρα Πανταρτζή (Επιστημονική Γραμματεία Ουρολογικής Κλινικής της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης), για την υπέροχη συνεργασία τους. Θέλω να σας ευχαριστήσω για την υπομονετική υποστήριξη και για όλες τις ευκαιρίες που μου δόθηκαν για να συνεχίσω και να εξελίξω την έρευνά μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, ιδιαίτερα τους γονείς μου, τον Μανώλη και την Ελευθερία καθώς και την αδελφή μου Εμμανουέλα, για την ηθική και οικονομική τους υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Είστε πάντα εκεί για μένα. Τέλος, δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω αυτήν τη διατριβή χωρίς την υποστήριξη των αγαπημένων μου φίλων και ιδιαίτερα του Γιώργου, ο οποίος παρείχε διεγερτικές συζητήσεις καθώς και χαρούμενους περισπασμούς για να ξεκουράσω το μυαλό μου έξω από την έρευνά μου.

Ηράκλειο, Απρίλιος 2023

Περιεχόμενα

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....10

2. ABSTRACT.....13

3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 15

3.1 Ο νεφρός.....15

3.1.1 Ανατομία νεφρού 15

3.1.2 Φυσιολογία του νεφρού 20

3.2 Οξεία νεφρική βλάβη από σκιαγραφικά 21

3.3 Τύποι ιωδιούχων σκιαγραφικών 22

3.4 Φαρμακοκινητική.....23

3.5 Παθοφυσιολογία της CIN 24

3.5.1 Αιμοδυναμικές διαταραχές.....25

3.5.2 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου.....26

3.5.3 Τοξικότητα νεφρικών σωληναρίων.....27

3.5.4 Απόπτωση 28

3.5.5 Νεκρόπτωση.....29

3.6 Παράγοντες κινδύνου.....30

3.7 Πρόληψη 32

3.7.1 Ενυδάτωση 33

3.7.2 Αντιοξειδωτικά.....35

3.8 Βασικοί Βιολογικοί δείκτες.....40

3.8.1 Κρεατινίνη.....40

3.8.2 Κυστατίνη C.....41

3.8.3 Λιποκαλίνη που συνδέεται με ουδετεροφιλική ζελατινάση (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, NGAL) 41

3.8.4 Δείκτης νεφρικής βλάβης 1 (Kidney Injury Marker 1, KIM-1).....42

3.8.5 Ουρικό οξύ (Uric Acid, UA).....43

3.8.6 Ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη (Asymmetric Dimethylarginine, ADMA).....43

4. ΣΚΟΠΟΣ 43

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 44

5.1 Κατευθυντήριες γραμμές για την έρευνα σε ζώα 44

5.2 Σχεδιασμός μελέτης 44

5.3 Βιοχημική ανάλυση 46

5.4 Αξιολόγηση SDMA και ADMA 47

5.5 Οξειδωτικό στρες 48

5.5.1 Καταλάση (CAT) 48

5.5.2 Μηλονοδιαλδεΰδη (MDA) 50

5.5.3 Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) 52

5.5.4 Γλουταθειόνη (GSH) 54

5.6 Αξιολόγηση των Β και Τ λεμφοκυττάρων 56

5.7 Touch preparation ανάλυση (TPT) 57

5.8 Στατιστική ανάλυση 57

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 58

6.1 Βιοχημική ανάλυση 58

6.2 Αξιολόγηση SDMA και ADMA 59

6.3 Οξειδωτικό στρες 62

6.3.1 MDA 62

6.3.2 TAC 64

6.3.3 CAT 67

6.3.4 GSH 69

6.4 Β και Τ λεμφοκύτταρα 71

6.5 Νεφρική κυτταρολογική εξέταση 72

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 75

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 83

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 85

10. ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....103

11. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ - ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ/ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΩΝ 104

12. ΟΚΟΝΟΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....105

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1: Ανάλυση επιπέδων κρεατινίνης ορού.....59

Πίνακας 2: Ανάλυση επιπέδων συμμετρικής διμεθυλαργινίνης στο αίμα ……..60

Πίνακας 3: Ανάλυση επιπέδων ασύμετρης διμεθυλαργινίνης στο αίμα ……61

Πίνακας 4: Ανάλυση επιπέδων μαλονδιαλδεΰδης στο αίμα ……..62

Πίνακας 5: Ανάλυση επιπέδων μαλονδιαλδεΰδης στους νεφρούς.....63

Πίνακας 6: Ανάλυση συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος.....65

Πίνακας 7: Ανάλυση συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στους νεφρούς.....66

Πίνακας 8: Ανάλυση επιπέδων καταλάσης στο αίμα ……67

Πίνακας 9: Ανάλυση επιπέδων καταλάσης στους νεφρούς 68

Πίνακας 10: Ανάλυση επιπέδων γλουταθειόνης στο αίμα ……70

Πίνακας 11: Ανάλυση επιπέδων γλουταθειόνης στους νεφρούς ……71

Πίνακας 12: In vivo μελέτες αξιολόγησης ρεσβερατρόλης/λυκοπενίου στη CIN..80

ΕΙΚΟΝΕΣ

Εικόνα 1. Δομή του νεφρού 16

Εικόνα 2. Μαλπιγγιανό σωμάτιο - Παρασπειραματική συσκευή.....17

Εικόνα 3. Σύστημα σωληναρίων του νεφρού (Νεφρώνας: η λειτουργική μονάδα του νεφρού, Αθροιστικό σωληνάριο και αθροιστικός πόρος) 18

Εικόνα 4. Νεφρική αγγείωση……19

Εικόνα 5: Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην ανάπτυξη CIN...30

Εικόνα 6: Σχεδιασμός μελέτης.....46

Εικόνα 7: Διακύμανση επιπέδων κρεατινίνης ορού.....58

Εικόνα 8: Διακύμανση επιπέδων συμμετρικής διμεθυλαργινίνης στο αίμα.....60

Εικόνα 9: Διακύμανση επιπέδων ασύμετρης διμεθυλαργινίνης στο αίμα.....61

Εικόνα 10: Διακύμανση επιπέδων μαλονδιαλδεΰδης στο αίμα ……...……63

Εικόνα 11: Διακύμανση επιπέδων μαλονδιαλδεΰδης στους νεφρούς.....64

Εικόνα 12: Διακύμανση συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος ……65

Εικόνα 13: Διακύμανση συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στους νεφρούς...66
Εικόνα 14: Διακύμανση επιπέδων καταλάσης στο αίμα.....68
Εικόνα 15: Διακύμανση επιπέδων καταλάσης στους νεφρούς.....69
Εικόνα 16: Διακύμανση επιπέδων γλουταθειόνης στο αίμα.....70
Εικόνα 17: Διακύμανση επιπέδων γλουταθειόνης στους νεφρούς.....71
Εικόνα 18: Μέσος όρος των λεμφοκυττάρων CD20+ και CD3+.....72
Εικόνα 19: Κυτταρολογική αξιολόγηση νεφρών.....73
Εικόνα 20: Κυτταρολογική αξιολόγηση νεφρών.....73
Εικόνα 21: Κυτταρολογική αξιολόγηση νεφρών.....74
Εικόνα 22: Κυτταρολογική αξιολόγηση νεφρών.....74

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πρόσφατες εξελίξεις στην ιατρική έχουν οδηγήσει σε αυξημένη χρήση ιωδιούχων σκιαγραφικών σε διαγνωστικές και επεμβατικές διαδικασίες. Παρά την πρόοδο στις μοριακές δομές, όλα τα σκιαγραφικά μπορούν να προκαλέσουν ήπιες έως σοβαρές παρενέργειες όπως οξεία νεφρική βλάβη (Contrast-induced nephropathy, CIN). Η CIN σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα/θνητότητα, αύξηση των εισαγωγών στο νοσοκομείο και αυξημένο κόστος ιατρικής περίθαλψης.

Η παθοφυσιολογία της CIN δεν είναι πλήρως κατανοητή αλλά φαίνεται ότι είναι πολυπαραγοντική. Το οξειδωτικό στρες κατέχει κεντρικό ρόλο. Οι αιμοδυναμικές μεταβολές που οδηγούν σε υποξία του νεφρικού μυελού και οι άμεσες τοξικές επιδράσεις των σκιαγραφικών στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων φαίνεται να αποτελούν κύριους παθοφυσιολογικούς παράγοντες. Τα σκιαγραφικά προκαλούν αγγειοσυστολή μέσω επαγωγής αδενοσίνης και ενδοθηλίνης, μείωση της αιματικής ροής από το μυελό προς τον νεφρικό φλοιό και ισχαιμία του μυελού που οδηγεί σε απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) μέσω οξειδωτικού στρες. Οι άμεσες τοξικές επιδράσεις στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων οδηγούν σε ωσμωτική νέκρωση/κενοτοπιώδη εκφύλιση τους οδηγώντας σε νέκρωση των σωληναρίων. Οι ελεύθερες ρίζες συστέλλουν άμεσα τη νεφρική μικροκυκλοφορία και επηρεάζουν έμμεσα τον νεφρικό αγγειακό τόνο μεσολαβώντας στις επιδράσεις άλλων αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, διεγείροντας την παραγωγή αγγειοσυσταλτικών και ρυθμίζοντας τη δράση αγγειοδιασταλτικών παραγόντων, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (Nitric oxide, NO).

Είναι γενικά αποδεκτό ότι όσο υψηλότερη η δόση του χορηγούμενου σκιαγραφικού τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος εμφάνισης CIN, ενώ δεν συνιστώνται πολλαπλές χορηγήσεις μέσα σε λίγες ημέρες. Η ηλικία είναι παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, καθώς συσχετίζεται με μειωμένη νεφρική μάζα, λειτουργία και αιμάτωση. Ο χαμηλότερος ρυθμός σπειραματικής διήθησης αυξάνει τον κίνδυνο και η προϋπάρχουσα νεφρική δυσλειτουργία αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα κινδύνου. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι εξασθενημένοι και τα άτομα παρουσιάζουν αυξημένο επίπεδο οξειδωτικού στρες λόγω προϋπάρχουσας φλεγμονής/ενδοθηλιακής δυσλειτουργία. Επίσης, ο διαβήτης είναι πολύ σημαντικός παράγοντας προδιάθεσης για CIN, ενώ οι διαβητικοί ασθενείς

με CIN έχουν μειωμένη επιβίωση σε σύγκριση με τους μη διαβητικούς. Οι ασθενείς με διαβήτη και νεφρική ανεπάρκεια διατρέχουν υψηλό κίνδυνο λόγω μείωσης των επιπέδων ενδογενών αγγειοδιασταλτικών (NO και προσταγλανδινών) που οδηγούν σε μείωση νεφρικής ροής αίματος και σπειραματικής διήθησης. Άλλοι παράγοντες που οδηγούν σε νεφρική ανεπάρκεια, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η υπόταση και η κίρρωση του ήπατος προδιαθέτουν επίσης για εμφάνιση CIN.

Όλα τα άτομα που πρόκειται να λάβουν σκιαγραφικά πρέπει να αξιολογούνται για τον κίνδυνο εμφάνισης CIN και τα άτομα υψηλού κινδύνου πρέπει να εξετάζονται για μεθόδους πρόληψης που υποστηρίζονται από κλινικά δεδομένα αφού η CIN είναι μια κλινική κατάσταση που δυνητικά μπορεί να προληφθεί. Σε άτομα χαμηλού κινδύνου, η συχνότητα εμφάνισης φαίνεται να είναι μικρή (< 5%) σε αντίθεση με άτομα υψηλού κινδύνου, στα οποία η συχνότητα εμφάνισης είναι υψηλή (έως 20%). Η διαχείριση παραμένει υποστηρικτική με βάση κυρίως την ενδοφλέβια ενυδάτωση σε άτομα υψηλού κινδύνου χρησιμοποιώντας φυσιολογικό ορό ή διττανθρακικά. Νέοι βιοδείκτες και παράγοντες με αντιοξειδωτικές και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες προσελκύουν την προσοχή λόγω της ικανότητας να μειώνουν το οξειδωτικό στρες και να ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο. Οι πιθανές νεφροπροστατευτικές επιδράσεις αρκετών αντιοξειδωτικών έχουν αξιολογηθεί, αλλά κανένα δεν έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό σε μελέτες στον άνθρωπο. Η ρεσβερατρόλη (Res) και το λυκοπένιο (Lyc) είναι ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά με αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη δράση που βρίσκονται στα κόκκινα σταφύλια και στις ντομάτες, αντιστοίχως. Τα νεφροπροστατευτικά τους αποτελέσματα έχουν αξιολογηθεί σε περιορισμένο αριθμό μελετών σε ζώα και έχουν αποδοθεί στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών, στην αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης και στην αλλαγή της αιμοδυναμικής μέσω προαγωγής της σύνθεσης NO. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογήσει τις δυνητικές νεφροπροστατευτικές δράσεις της Res και του Lyc σε ένα ζωικό μοντέλο CIN.

Είκοσι τέσσερα ενήλικα αρσενικά λευκά κουνέλια τύπου Νέας Ζηλανδίας χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες: ομάδα μαρτύρων (φυσιολογικός ορός), ομάδα CIN (ενδοφλέβια χορήγηση ιοπρομίδης, 7,5 g ιώδιο/kg), ομάδα Res+CIN (από το στόμα χορήγηση Res, 5 mg/kg) και ομάδα Lyc+CIN (από το στόμα χορήγηση Lyc, 4 mg/kg). Αξιολογήθηκαν τα επίπεδα κρεατινίνης ορού (sCr), συμμετρικής και ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης (SDMA και ADMA), δεικτών οξειδωτικού στρες

(μαλονδιαλδεΰδη, συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα, καταλάση, γλουταθειόνη) σε δείγματα αίματος σε τρία χρονικά σημεία: αμέσως μετά (0), 24 και 48 ώρες μετά τη χορήγηση ιοπρομίδης/φυσιολογικού ορού. Τα λεμφοκύτταρα $CD20^+/CD3^+$ προσδιορίστηκαν 48 ώρες μετά την έκθεση στο σκιαγραφικό. Όλα τα ζώα θυσιάστηκαν στις 48 ώρες και συλλέχθηκαν οι νεφροί. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν και στον νεφρικό ιστό. Τα επίπεδα sCr, SDMA και ADMA αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα CIN σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες. Η Res και το Lyc έδειξαν να μειώνουν το οξειδωτικό στρες στο αίμα και στους νεφρούς. Τα Β και Τ λεμφοκύτταρα μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα CIN σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες. Η μελέτη παρέχει πρόδρομες ενδείξεις ότι οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες Res και Lyc συμβάλουν στην πρόληψη CIN ρυθμίζοντας την οξειδωτική/αντιοξειδωτική ισορροπία και αναστέλλοντας την αγγειοσύσπαση/κυτταροτοξικότητα.

2. ABSTRACT

Recent advances in medicine have led to increased use of iodinated contrast media (CM) in diagnostic and interventional procedures. Despite advances in molecular structures, all CM can cause mild to severe side effects such as contrast-induced nephropathy (CIN). CIN is associated with significant morbidity/mortality, increased hospital admissions, and increased medical care costs.

The pathophysiology of CIN is not fully understood but appears to be multifactorial. Oxidative stress plays a central role. Hemodynamic changes leading to renal medulla hypoxia and direct toxic effects of contrast agents on renal tubular epithelial cells appear to be major pathophysiological factors. Contrast agents cause vasoconstriction through induction of adenosine and endothelin, reduction of blood flow from the medulla to the renal cortex, and ischemia of the medulla leading to the release of reactive oxygen species (ROS) through oxidative stress. Direct toxic effects on renal tubular epithelial cells lead to their osmotic necrosis/vacuolar degeneration leading to tubular necrosis. Free radicals directly constrict renal microcirculation and indirectly affect renal vascular tone by mediating the effects of other vasoconstrictor factors, stimulating the production of vasoconstrictors and modulating the action of vasodilators, such as nitric oxide (NO).

It is generally accepted that the higher the dose of CM administered, the greater the risk of CIN, and multiple administrations within a few days are not recommended. Age is also a factor to consider as it is associated with reduced renal mass, function and perfusion. A lower glomerular filtration rate increases the risk, and pre-existing renal dysfunction is the most important risk factor. Antioxidant mechanisms in chronic kidney disease are impaired and individuals have an increased level of oxidative stress due to pre-existing inflammation/ endothelial dysfunction. Also, diabetes is a very important predisposing factor for CIN, and diabetic patients with CIN have a reduced survival compared to non-diabetics. Patients with diabetes and renal failure are at high risk due to decreased levels of endogenous vasodilators (NO and prostaglandins) leading to decreased renal blood flow and glomerular filtration. Other factors leading to renal failure, such as cardiovascular disease, hypotension, and liver cirrhosis also predispose to CIN.

All individuals who are to receive CM should be assessed for risk of CIN, and high-risk individuals should be considered for preventive methods supported by clinical data since CIN is a potentially preventable clinical condition. In low-risk individuals, the incidence appears to be low (< 5%) in contrast to high-risk individuals, in whom the incidence is high (up to 20%). Management remains supportive based primarily on intravenous hydration in high-risk individuals using saline or bicarbonate. New biomarkers and agents with antioxidant and vasodilator properties are attracting attention due to their ability to reduce oxidative stress and regulate vascular tone. The potential reno-protective effects of several antioxidants have been evaluated, but none have been shown to be effective in human studies. Resveratrol (Res) and lycopene (Lyc) are powerful natural antioxidants with antimicrobial and anti-inflammatory effects found in red grapes and tomatoes, respectively. Their reno-protective effects have been evaluated in a limited number of animal studies and have been attributed to neutralization of free radicals, inhibition of cell apoptosis, and alteration of hemodynamics through promotion of NO synthesis. The aim of the present study was to evaluate the potential reno-protective actions of Res and Lyc in an animal model of CIN.

Twenty-four adult male New Zealand white rabbits were equally assigned into four groups: control (normal saline), CIN (intravenous iopromide; 7.5g iodine/kg), Res+CIN (per os Res; 5mg/kg), and Lyc+CIN (per os Lyc; 4mg/kg). Serum Cr (sCr); symmetric and asymmetric dimethylarginine (SDMA and ADMA); oxidative stress biomarkers: malondialdehyde; total antioxidant capacity; catalase; reduced glutathione) were evaluated in blood samples at three time points: right after 0h; 24h; 48h after iopromide/saline administration. CD20+ and CD3+ lymphocytes were determined at 48h post CM exposure. All animals were sacrificed at 48h and both kidneys collected. Oxidative stress biomarkers were measured in renal tissue, as well. sCr, SDMA and ADMA levels increased significantly in CIN compared to all groups. Oxidative stress secondary to CIN in blood and kidneys was suppressed by Resveratrol and Lycopene. B and T lymphocytes decreased significantly in CIN compared to all groups. The present study provides emerging evidence that Resveratrol and Lycopene ameliorate CIN by modulating oxidant and antioxidant balance in blood and renal tissue and by inhibiting vasoconstriction and blood cytotoxicity.

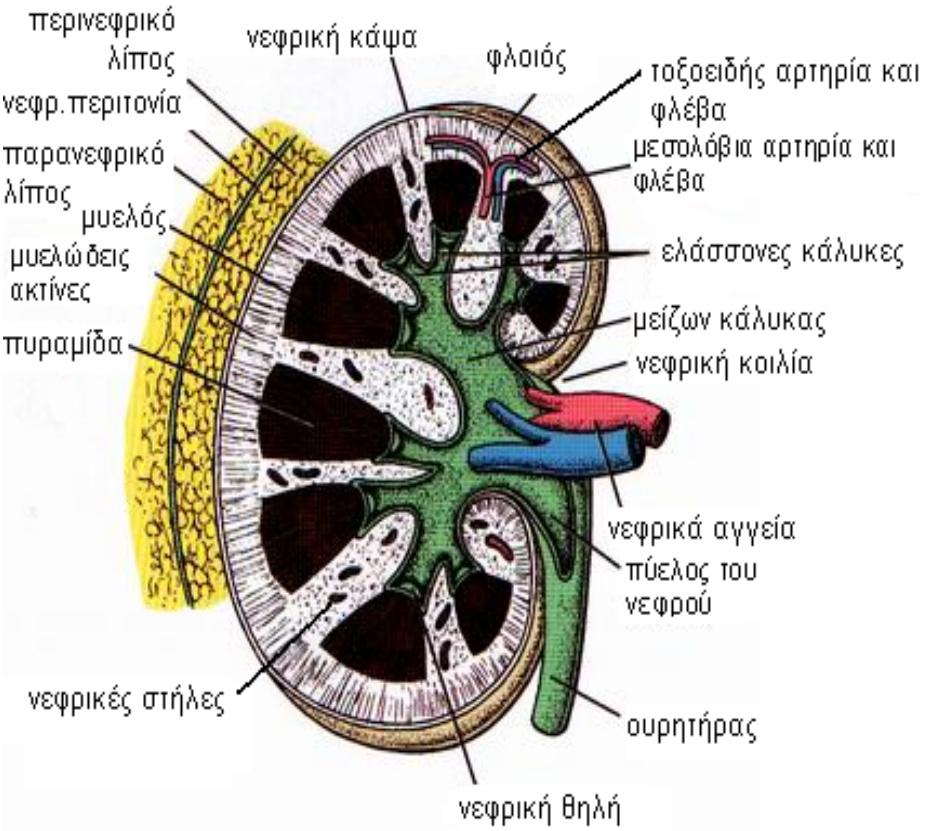
3. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

3.1 Ο νεφρός

3.1.1 Ανατομία νεφρού

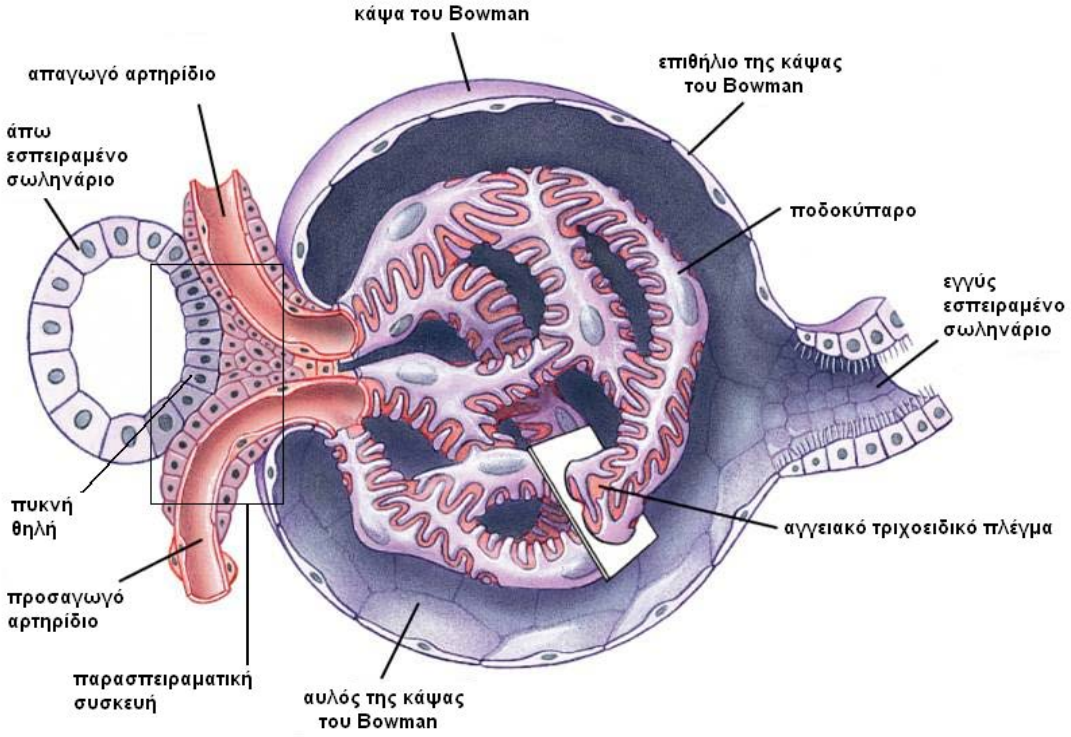
Οι νεφροί βρίσκονται στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο, εκατέρωθεν της σπονδυλικής στήλης και εκτείνονται μεταξύ των σπονδύλων $Θ_{12}$ - O_3 κατά μήκος του έξω χείλους του λαγονοψοΐτη μυ. Έχουν λοξή φορά από άνω και έσω προς τα κάτω και έξω. Ο δεξιός βρίσκεται χαμηλότερα λόγω πίεσης από το ήπαρ. Το βάρος κάθε νεφρού είναι 150 gr περίπου, ενώ το μήκος κυμαίνεται μεταξύ 9 - 12 cm. Ο δεξιός νεφρός βρίσκεται σε στενή σχέση προς τα πάνω με το σύστοιχο επινεφρίδιο και το ήπαρ, προς τη μέση γραμμή με την κάτω κοίλη φλέβα και προς τα εμπρός με το δωδεκαδάκτυλο και το ανιόν κόλο. Ο αριστερός νεφρός εφάπτεται με τον σπλήνα προς τα πάνω, το σύστοιχο επινεφρίδιο και την ουρά του παγκρέατος προς τα έσω και με το κατιόν κόλο προς τα εμπρός. Προς τα πίσω οι νεφροί έρχονται σε επαφή με τις εγκάρσιες αποφύσεις των οσφυϊκών σπονδύλων.

Ο νεφρός αποτελείται από δύο μοίρες, τη φλοιώδη και τη μυελώδη. Η φλοιώδης έχει πάχος 1 - 1,5 cm και αποτελεί το λειτουργικό τμήμα. Από τη φλοιώδη μοίρα ξεκινούν προσεκβολές προς τη μυελώδη μοίρα και την πύελο, παρεμβάλλονται μεταξύ των πυραμίδων και ονομάζονται στήλες του Bertini. Η μυελώδης μοίρα βρίσκεται κεντρικότερα και αποτελείται από 11-12 μεγάλες πυραμίδες, τις πυραμίδες του Malpighi, οι οποίες περιέχουν αθροιστικά σωληνάρια διαφόρων διαβαθμίσεων που καταλήγουν στην κορυφή κάθε πυραμίδας, στις λεγόμενες θηλές των καλύκων. Από τη βάση κάθε πυραμίδας ξεκινούν προσεκβολές της μυελώδους μοίρας προς την φλοιώδη μοίρα και ονομάζονται μυελώδεις ακτίνες ή πυραμίδες του Ferrein. Κάθε πυραμίδα του Ferrein μαζί με το τμήμα του φλοιού που την περιβάλλει, αποτελεί ένα νεφρικό λοβίδιο.



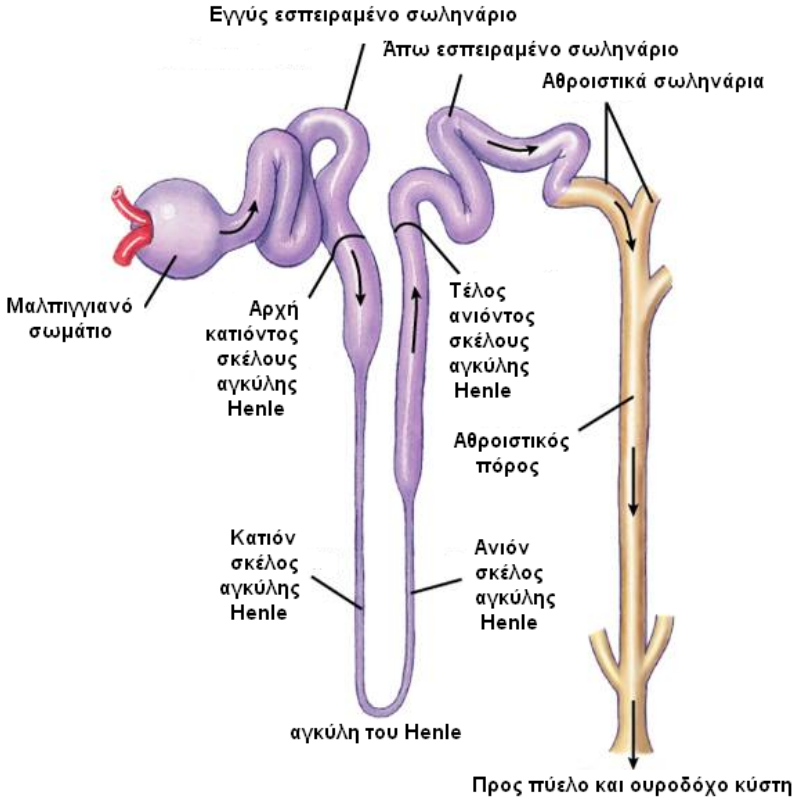
Εικόνα 1. Δομή του νεφρού («Σύγχρονη Ουρολογία» Μ. Μελέκος, 2005).

Οι νεφρώνες αποτελούν τις μορφολειτουργικές μονάδες του νεφρού και είναι περίπου 1.000.000/νεφρό. Κάθε ένας αποτελείται από το μαλπιγγιανό (νεφρικό) σωμάτιο και το ουροφόρο σωληνάριο. Τα μαλπιγγιανά σωμάτια έχουν διάμετρο 150-250μ και βρίσκονται στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού. Αποτελούνται από το αγγειακό σπείραμα (αγγειακό τριχοειδικό πλέγμα) που σχηματίζεται από το προσαγωγό και το απαγωγό αρτηρίδιο και από το έλυτρο του Bowman. Το έλυτρο του Bowman εμφανίζει δύο πέταλα, το έσω και το έξω, τα οποία σχηματίζουν μια σχισμοειδή κοιλότητα (ουροφόρος κοιλότητα) που υποδέχεται το πρόουρο και επικοινωνεί με τον αυλό του ουροφόρου σωληναρίου. Η παρασπειραματική συσκευή είναι περιοχή του νεφρού που περιβάλλεται από το προσαγωγό/απαγωγό αρτηρίδιο και τα κύτταρα της πυκνής θηλής (macula densa). Το προσαγωγό αρτηρίδιο, προτού εισέλθει στο μαλπιγγιανό σωμάτιο, παρουσιάζει διεύρυνση του τοιχώματος του και στην περιοχή αυτή ανευρίσκονται τα κοκκιώδη μεσαγγειακά κύτταρα που εκκρίνουν ρενίνη, ένζυμο που παίζει σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της αιματικής κυκλοφορίας και της ομοιόστασης των υγρών του σώματος.



Εικόνα 2. Μαλπιγγιανό σωμάτιο - Παρασπειραματική συσκευή («Σύγχρονη Ουρολογία» Μ. Μελέκος, 2005)

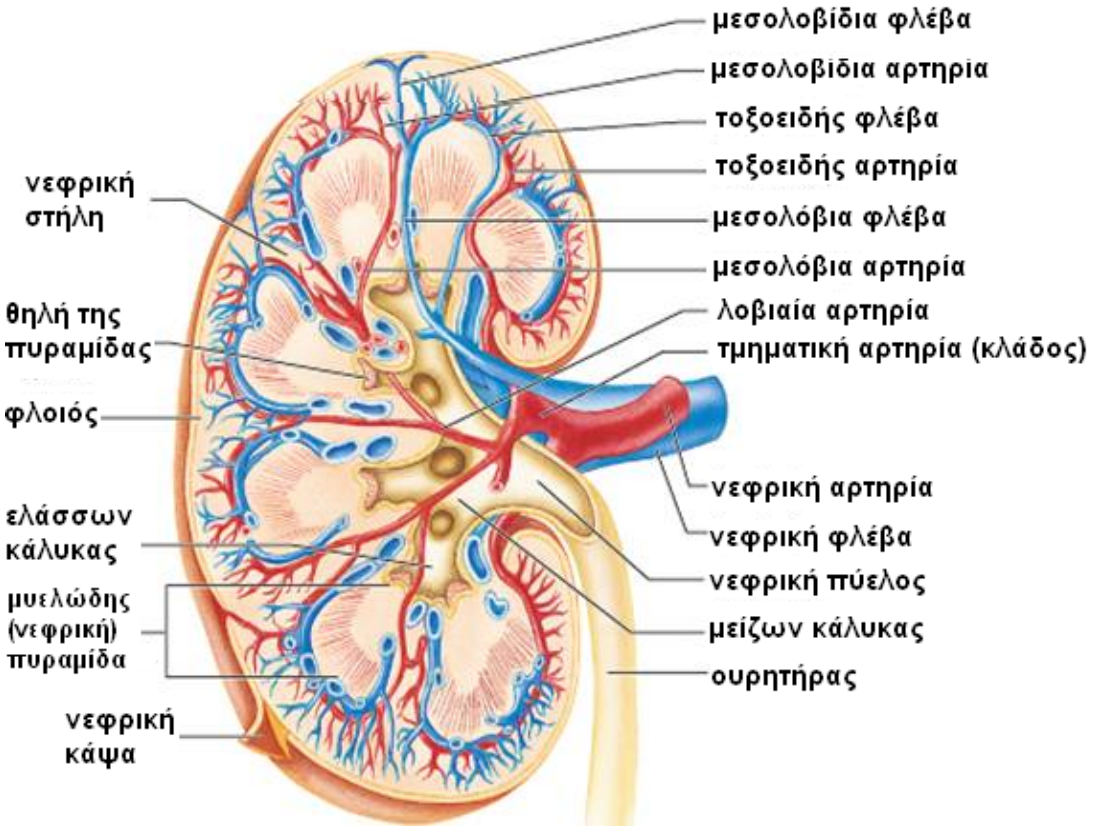
Το ουροφόρο σωληνάριο αποτελείται από: α) το εγγύς εσπειραμένο (ή εσπειραμένο α΄ τάξης) που αρχίζει από τον ουρικό πόλο του μαλπιγγιανού σωμάτιου, πορεύεται σπειροειδώς και ελίσσεται γύρω από το νεφρικό σωμάτιο μέσα στη φλοιώδη μοίρα, β) Την αγκύλη του Henle που αποτελεί συνέχεια του εγγύς εσπειραμένου σωληναρίου. Πορεύεται στη μυελώδη μοίρα και εμφανίζει ένα κατιόν και ένα ανιόν σκέλος, γ) Το άπω εσπειραμένο (ή εσπειραμένο β΄ τάξης), το οποίο συνεχίζει από το ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle έως το αθροιστικό σωληνάριο και πορεύεται στη φλοιώδη μοίρα. Βρίσκεται σε στενή επαφή με το προσαγωγό και το απαγωγό αρτηρίδιο όπου και σχηματίζει μια ελλειπτική πάχυνση, την πυκνή θηλή (macula densa), δ) Τέλος, το αθροιστικό σωληνάριο που αποτελεί το τελικό τμήμα του ουροφόρου σωληναρίου (δεν ανήκει στον νεφρώνα αλλά στην αποχέτευση). Παίζει σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό συμπύκνωσης-αραίωσης των ούρων. Πολλά αθροιστικά σωληνάρια εκβάλλουν σε κοινό αθροιστικό πόρο (δεν ανήκει στο ουροφόρο σωληνάριο). Οι αθροιστικοί πόροι εκβάλλουν στις θηλές των πυραμίδων του Malpighi και τα σχηματισμένα ούρα οδηγούνται στους μικρούς κάλυκες του νεφρού.



Εικόνα 3. Σύστημα σωληναρίων του νεφρού (Νεφρώνας: η λειτουργική μονάδα του νεφρού – μωβ, Αθροιστικό σωληνάριο και αθροιστικός πόρος – κίτρινο («Σύγχρονη Ουρολογία» Μ. Μελέκος, 2005)

Κάθε νεφρός αρδεύεται από τη σύστοιχη νεφρική αρτηρία που είναι κλάδος της κοιλιακής αορτής. Η νεφρική αρτηρία στις πύλες του νεφρού διαιρείται σε πρόσθιο και οπίσθιο κλάδο. Οι κλάδοι αυτοί εισέρχονται στο νεφρό από την πύλη του νεφρού και ο καθένας υποδιαιρείται στους ακόλουθους κατά σειρά κλάδους: τις μεσολόβιες αρτηρίες που πορεύονται στη μυελώδη μοίρα μεταξύ των πυραμίδων και φθάνοντας στη βάση των πυραμίδων ως τοξοειδείς αρτηρίες φέρονται τοξοειδώς και παράλληλα προς τη βάση της κάθε πυραμίδας, μεταξύ φλοιώδους και μυελώδους μοίρας, τις οποίες αιματώνουν. Από τις τοξοειδείς προέρχονται οι μεσολοβίδιες αρτηρίες, οι οποίες πορεύονται στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού ανάμεσα στις πυραμίδες του Ferrein. Από τα πλάγια των μεσολοβίδιων αρτηριών εκφύονται τα προσαγωγά αρτηρίδια, τα οποία εισέρχονται στο μαλπιγγιανό σωμάτιο και σχηματίζουν το αγγειακό σπείραμα. Από το τελευταίο αρχίζει το απαγωγό αρτηρίδιο. Το αρτηρίδιο αυτό, μετά την έξοδό του από το μαλπιγγιανό σωμάτιο, σχηματίζει ένα τριχοειδικό πλέγμα που περιβάλλει το μαλπιγγιανό σωμάτιο και το ουροφόρο σωληνάριο,

ακολουθώντας την πορεία του τελευταίου μέχρι τη βάση της πυραμίδας του Malpighi, οπότε αρχίζει το φλεβικό δίκτυο. Οι φλέβες του νεφρού διακρίνονται σε φλοιώδεις και μυελώδεις. Οι φλοιώδεις αρχίζουν από τα τριχοειδή των απαγωγών αρτηριδίων σχηματίζοντας τις μεσολοβίδιες φλέβες, οι οποίες εκβάλλουν στις τοξοειδείς φλέβες. Οι μυελώδεις σχηματίζουν τις ευθείες φλέβες που με τη σειρά τους εκβάλλουν στις τοξοειδείς φλέβες. Οι τελευταίες συνενώνονται στις μεσολόβιες φλέβες από τη συμβολή των οποίων παράγονται 3-5 νεφρικά στελέχη. Τα στελέχη αυτά συνενώνονται στην πύλη και τελικά σχηματίζουν τη νεφρική φλέβα, η οποία εκβάλλει στην κάτω κοίλη φλέβα.



Εικόνα 4. Νεφρική αγγείωση («Σύγχρονη Ουρολογία» Μ. Μελέκος, 2005)

Η αποχέτευση των ούρων από το νεφρό γίνεται από τους κάλυκες, την πύελο και τον ουρητήρα. Το καλυκικό σύστημα περιλαμβάνει τους ελάσσονες κάλυκες (8 - 12), στις κορυφές των οποίων εκβάλουν οι πυραμίδες. Αυτοί, καθώς ενώνονται, σχηματίζουν τους μείζονες κάλυκες (2 - 3) που εκβάλλουν στην πύελο. Το τοίχωμα των καλύκων, της πυέλου και του ουρητήρα αποτελείται από μεταβατικό επιθήλιο, λείες μυϊκές ίνες

και εξωτερικά από ινώδη συνδετικό ιστό. Στο εσωτερικό των καλύκων, της πυέλου και του ουρητήρα υπάρχουν κυτταρικές ομάδες που δρουν ως ερεθιστικά κέντρα (pacemakers) και παράγουν περισταλτικά κύματα. Η νεφρική πύελος έχει σχήμα χοάνης και μπορεί να βρίσκεται μέσα στο νεφρό (ενδονεφρική) ή έξω από αυτό (εξωνεφρική). Τοπογραφικά, βρίσκεται στο έξω χείλος του ψοΐτη και πίσω από την νεφρική αρτηρία και φλέβα. Ο ουρητήρας εκφύεται από την κορυφή της πυέλου με την πυελοουρητηρική συμβολή. Το αρχικό του τμήμα φέρεται σχεδόν παράλληλα προς τα άκρα των εγκάρσιων αποφύσεων των οσφυϊκών σπονδύλων, επάνω στην περιτονία του ψοΐτη. Στη συνέχεια, εισέρχεται στην ελάσσονα πύελο, αντίστοιχα προς το σημείο που διχάζεται η κοινή λαγόνια αρτηρία μπροστά από την ιερολαγόνια άρθρωση. Κατόπιν, πορεύεται προς τα κάτω, στο πλάγιο τοίχωμα της πυέλου, προς την περιοχή της ισχιακής άκανθας και, τέλος, στρέφεται προς τα εμπρός για να εισέλθει στον πυθμένα της ουροδόχου κύστης. Η πορεία του είναι ελικοειδής και το μήκος του στους ενήλικες είναι 25 - 28 cm ανάλογα με τη σωματική διάπλαση.

3.1.2 Φυσιολογία του νεφρού

Οι κυριότερες λειτουργίες του νεφρού είναι: 1) η αποβολή προϊόντων του καταβολισμού (κυρίως των λευκωμάτων) και εξωγενών ουσιών (π.χ. φαρμάκων), 2) η διατήρηση της ομοιόστασης ύδατος (H_2O), ηλεκτρολυτών και της οξεοβασικής ισορροπίας, 3) η παραγωγή και έκκριση ορμονών όπως η ερυθροποιητίνη, η ρενίνη, οι προσταγλανδίνες και η ενεργός βιταμίνη D (1,25 διυδροξυχοληκαλσιφερόλη) και 4) η συμμετοχή στον καταβολισμό των πεπτιδίων (ιδίως των πεπτιδικών ορμονών) και τη νεογλυκογένεση. Οι δύο πρώτες λειτουργίες είναι οι κυριότερες και συνιστούν τη νεφρική απέκκριση που επιτελείται από τους νεφρώνες. Τα νεφρά είναι υπεύθυνα να ρυθμίζουν την λειτουργία της απέκκρισης μέσω της σπειραματικής διήθησης και την παθητική ή ενεργητική μεταφορά ουσιών. Η μεταφορά προς τον αυλό των σωληναρίων ονομάζεται σωληναριακή απέκκριση, ενώ η μεταφορά από τον αυλό προς το διάμεσο χώρο επαναπορρόφηση. Τελικά, η σύνθεση των ούρων σε φυσιολογικές συνθήκες παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις ώστε να προσαρμόζεται ανάλογα με την πρόσληψη δια της τροφής, την ενδογενή παραγωγή κατά τη διαδικασία του μεταβολισμού και τις απώλειες. Όλο το αίμα στο ανθρώπινο σώμα

φιλτράρεται πολλές φορές την ημέρα από τα νεφρά. Αυτά τα όργανα χρησιμοποιούν σχεδόν το 25% του οξυγόνου που απορροφάται μέσω των πνευμόνων για να εκτελέσουν αυτή τη λειτουργία. Το οξυγόνο επιτρέπει στα κύτταρα των νεφρών να παράγουν αποτελεσματικά χημική ενέργεια με τη μορφή ATP μέσω της αερόβιας αναπνοής. Τα νεφρά απομακρύνουν τα απόβλητα από το σώμα. Τα ούρα είναι το διήθημα που εξέρχεται από τα νεφρά.

3.2 Οξεία νεφρική βλάβη από σκιαγραφικά

Οι πρόσφατες εξελίξεις στην ιατρική έχουν οδηγήσει σε αυξημένη χρήση ιωδιούχων σκιαγραφικών (contrast media, CM) σε διαγνωστικές και επεμβατικές διαδικασίες [1]. Παρά την πρόοδο στις μοριακές δομές, όλα τα CM μπορούν να προκαλέσουν ήπιες έως σοβαρές παρενέργειες όπως οξεία νεφρική βλάβη (Contrast-induced nephropathy, CIN) [2, 3]. Ο πιο πρόσφατος ορισμός σύμφωνα με τα διαγνωστικά κριτήρια Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) σχετίζεται με απόλυτη ή σχετική αύξηση των βασικών επιπέδων κρεατινίνης ορού, (serum creatinine, sCr) ≥0,3 mg/dL ή ≥1,5 φορές από τα φυσιολογικά επίπεδα μέσα στις πρώτες 7 μέρες, αντίστοιχα ή μείωση στην παραγωγή ούρων <0,5 mL/kg/h για 6 ώρες που εμφανίζεται σχεδόν αμέσως (μέσα σε 48 ώρες) μετά από ένα νεφροτοξικό συμβάν όπως η έκθεση σε σκιαγραφικό, χωρίς να υπάρχει άλλη αιτιολογία [4].

Η CIN σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα/θνητότητα. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις περιλαμβάνουν ήπια και παροδική νεφρική δυσλειτουργία, η CIN αποτελεί την τρίτη κύρια αιτία ενδονοσοκομειακής οξείας νεφρικής ανεπάρκειας [5] και ενδέχεται να καταλήξει σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια και ανάγκη μόνιμης αιμοκάθαρσης [6]. Η CIN σχετίζεται με αυξημένο αριθμό εισαγωγών στα νοσοκομεία [7] που αυξάνει το κόστος ιατρικής περίθαλψης λόγω νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου [8] και ανάγκη για αιμοκάθαρση [9], καθώς και αυξημένη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη θνησιμότητα [10]. Ετησίως, περίπου 150.000 ασθενείς αναπτύσσουν CIN και τουλάχιστον 1% χρειάζονται αιμοκάθαρση και παρατεταμένη παραμονή στο νοσοκομείο. Η αιμοκάθαρση εκτιμάται ότι κοστίζει περίπου $ 32 εκατομμύρια κάθε χρόνο και μια μέση αύξηση 2 ημερών νοσηλείας μπορεί να

προσθέσει άλλα $ 148 εκατομμύρια [11]. Λόγω της ταχείας αύξησης του αριθμού των παρεμβάσεων που απαιτούν χρήση CM, η μελέτη της παθοφυσιολογίας και των μηχανισμών οξείας νεφρικής δυσλειτουργίας από CM είναι αναγκαία, ώστε να κατανοηθούν καλύτερα οι βραχυπρόθεσμες/μακροπρόθεσμες συνέπειες της CIN.

3.3 Τύποι ιωδιούχων σκιαγραφικών

Τα κλασικά CM είναι παράγωγα τρι-ιωδιούχου βενζολίου που παρουσιάζουν ακτινοσκιερότητα λόγω ιωδίου [12]. Όσο υψηλότερη η συγκέντρωση ιωδίου και η μοριακή συγκέντρωση παραγώγων βενζολίου, τόσο μεγαλύτερη είναι η εξασθένηση που επιτυγχάνεται. Στη CIN, η ωσμωμοριακότητα και το ιξώδες είναι δύο σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες που ορίζονται από τη μοριακή συγκέντρωση. Η ανάγκη παραγωγής CM που θα προσφέρουν υψηλή εξασθένηση με ελαχιστοποίηση των παρενεργειών έχει οδηγήσει στη δημιουργία ενώσεων με ποικίλα αποτελέσματα και φυσικοχημικές ιδιότητες [13]. Τα ιωδιούχα CM διακρίνονται σε τέσσερεις τύπους: 1) μονομερή ιονικά υψηλής ωσμωμοριακότητας (High-Osmolar, HO: 1000-2500 mosmol/kg H_2O), 2) ιονικά διμερή χαμηλής ωσμωμοριακότητας (Low-Osmolar, LO: 400-800 mosmol/kg H_2O), 3) μη ιονικά μονομερή χαμηλής ωσμωμοριακότητας (400-800 mosmol/kg H_2O) και μη ιονικά ισο-ωσμωτικά διμερή (Iso-Osmolar, IO: 290 mosmol/kg H_20) [14]. Ωστόσο, η ωσμωμοριακότητα των CM χαμηλής ωσμομοριακότητας είναι υψηλότερη από αυτή στο πλάσμα (290 mosmol/kg H_2O) [15]. Η ωσμωμοριακότητα ενός διαλύματος σχετίζεται γραμμικά με τη μοριακή συγκέντρωσή του αλλά αυξάνεται επίσης με τον ιονισμό του. Τα μη ιονικά CM σε σύγκριση με τα ιοντικά CM έχουν χαμηλότερο ωσμωτικό φορτίο και έλλειψη ηλεκτρικού φορτίου. Επιπλέον, οι τοξικές επιδράσεις των CM υψηλής ωσμωμοριακότητας είναι πιο έντονες από τις επιδράσεις αυτών με χαμηλή ή ίση ωσμωμοριακότητα [16].

Τα CM HO αντιπροσωπεύουν την πρώτη γενιά. Παρά την καλή σκιαγράφησή τους, σχετίστηκαν με ψευδοαλλεργικές αντιδράσεις/αυξημένο κίνδυνο νεφροτοξικότητας σε ασθενείς υψηλού κινδύνου [13]. Επιπλέον, μειώνουν την παραμόρφωση των ερυθροκυττάρων, αυξάνοντας την ακαμψία των κυττάρων και των ερυθρών

αιμοσφαιρίων που συσσωρεύονται πυκνά στα τριχοειδή αγγεία. Αυτό περιπλέκει τη ροή των ερυθρών αιμοσφαιρίων καθώς μπορεί να σταματήσει [17]. Ωστόσο, αρκετές μελέτες δείχνουν ότι οι δυσμενείς επιπτώσεις τους μπορεί να βασίζονται στο ηλεκτρικό φορτίο τους και όχι στην υψηλή ωσμωμοριακότητα τους [12]. Οι ενώσεις της επόμενης γενιάς ήταν τα CM LO, έχοντας ωσμωμοριακότητα 2-3 φορές χαμηλότερη. Αν και υπήρξε σημαντική βελτίωση, η ωσμωμοριακότητα τους ήταν ακόμη μεγαλύτερη από αυτή του πλάσματος και σχετίστηκε επίσης με εμφάνιση CIN σε μικρότερο ποσοστό από τα CM πρώτης γενιάς [13]. Τέλος, τα IO CM μέσα παρήχθησαν με ωσμωμοριακότητα 290 mOsm/kg H_2O [14, 18].

Το ιξώδες είναι πολύ σημαντική φυσικοχημική παράμετρος καθώς είναι αντιστρόφως σχετιζόμενη με την ωσμωμοριακότητα [19]. Μετά την ενδοφλέβια έγχυση, τα υγρά υψηλού ιξώδους ενδέχεται να επηρεάσουν την τοπική κυκλοφορία σε μεγαλύτερο βαθμό από εκείνα με χαμηλότερο ιξώδες [14]. Τα CM υψηλού ιξώδους μειώνουν τη ροή αίματος στους νεφρούς, τη συγκέντρωση των ερυθροκυττάρων και το pO_2. Πρόσφατα δεδομένα από μελέτες σε πειραματόζωα δείχνουν ότι τα μη ιονικά διμερή IO σε σύγκριση με τα μη ιονικά μονομερή HO αυξάνουν σημαντικά το ιξώδες των ούρων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη κατακράτηση ιωδίου στους νεφρούς αυξάνοντας το σχηματισμό κενοτοπίων στα εγγύς και άπω σωληνάρια («ωσμωτική νέφρωση») [20].

3.4 Φαρμακοκινητική

Μετά την ενδοφλέβια χορήγηση, τα CM κατανέμονται γρήγορα μέσω ενδοαγγειακού και εξωκυτταρικού υγρού και έχουν μικρό χρόνο ημιζωής. Συνήθως, η διάρκεια της διασποράς μέσω των υγρών κυμαίνεται από 2 έως 30 λεπτά. Ενώ, η δέσμευση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι περίπου 1-3% [16]. Τα CM δεν μεταβολίζονται στο σώμα των θηλαστικών, αλλά απεκκρίνονται κυρίως μέσω σπειραματικής διήθησης από τους νεφρούς. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποβάλλεται σχεδόν εξολοκλήρου εντός των πρώτων 24 ωρών σε ασθενείς με φυσιολογική νεφρική λειτουργία, σε σύγκριση με αυτούς με νεφρική ανεπάρκεια, των οποίων ο χρόνος ημιζωής μπορεί να αυξηθεί σε 40 ώρες ή περισσότερο. Υπάρχουν και άλλοι τρόποι αποβολής όπως η χοληφόρα

οδός, αλλά είναι σχετικά αργοί. Αν είναι επιθυμητή η απομάκρυνση του CM από το κυκλοφορικό σύστημα, η αιμοκάθαρση/περιτοναϊκή κάθαρση είναι αποτελεσματικοί τρόποι [21]. Καθώς >95% ενός ενδοαγγειακού CM αποβάλλεται από το νεφρό, είναι σαφές γιατί αυτό είναι το όργανο-στόχος τοξικότητας από τα CM [22].

3.5 Παθοφυσιολογία της CIN

Η παθοφυσιολογία της CIN δεν είναι πλήρως κατανοητή αλλά φαίνεται ότι είναι πολυπαραγοντική [14]. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να κατέχει κεντρικό ρόλο. Οι αιμοδυναμικές μεταβολές που οδηγούν σε υποξία του νεφρικού μυελού και οι άμεσες τοξικές επιδράσεις των CM στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων φαίνεται να αποτελούν κύριους παθοφυσιολογικούς παράγοντες. Τα CM προκαλούν αγγειοσυστολή μέσω επαγωγής αδενοσίνης και ενδοθηλίνης, μείωση της αιματικής ροής από το μυελό προς τον νεφρικό φλοιό και ισχαιμία του μυελού που οδηγεί σε απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) μέσω οξειδωτικού στρες. Οι άμεσες τοξικές επιδράσεις στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων οδηγούν σε ωσμωτική νέκρωση/κενοτοπιώδη εκφύλιση οδηγώντας σε νέκρωση των σωληναρίων. Οι ελεύθερες ρίζες συστέλλουν άμεσα τη νεφρική μικροκυκλοφορία και επηρεάζουν έμμεσα τον νεφρικό αγγειακό τόνο μεσολαβώντας στις επιδράσεις άλλων αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, διεγείροντας την παραγωγή αγγειοσυσταλτικών και ρυθμίζοντας τη δράση αγγειοδιασταλτικών παραγόντων, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (Nitric oxide, NO).

Υπάρχουν πολλές in vitro και in vivo μελέτες που έχουν συμβάλει στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας [13]. Η κάκωση των εγγύς και άπω σωληναρίων συμβαίνει κατά την επαφή τους με τα CM και πιστεύεται ότι οφείλεται στο συνδυασμό τριών παραγόντων, τον άμεσο θάνατο των κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων, της νεφρικής αγγειοσυστολής και της υποξίας του νεφρικού μυελού. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μπορεί να εμφανιστεί εντοπισμένη νεφρική ισχαιμία λόγω μειωμένης νεφρικής ροής αίματος [11, 17, 21]. Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν με χρήση μαγνητικής τομογραφίας [23, 24]. In vitro και in vivo πειράματα οδηγούν στην υπόθεση ότι η νεφρική υποξία ενισχύει το σχηματισμό ROS [25]. Τα διάφορα

αντιοξειδωτικά φαίνεται ότι προστατεύουν από τη νεφρική βλάβη, γεγονός που εγείρει την υποψία ότι οι ROS εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία της CIN [19].

Η ισχαιμική βλάβη θεωρείται ότι αποτελεί πρωταρχικό μηχανισμό και προκαλείται με τρεις τρόπους: Αιμοδυναμικές διαταραχές, παραγωγή ROS και άμεση βλάβη των νεφρικών σωληνάριων.

3.5.1 Αιμοδυναμικές διαταραχές

Υπό κανονικές συνθήκες, το 25% περίπου της καρδιακής παροχής κατευθύνεται προς τους νεφρούς, με τη μεγαλύτερη ποσότητα αίματος στο νεφρικό φλοιό. Ο μυελός βρίσκεται σε συνθήκες σχετικής υποξίας και τα επίπεδα PO_2 μπορεί να είναι έως 20 mmHg στα περιφερικά τμήματα, με αποτέλεσμα η περιοχή αυτή να είναι πιο ευαίσθητη στις διακυμάνσεις επιπέδων οξυγόνου [17, 26]. Ο εξωτερικός μυελός αποτελεί το πιο ευαίσθητο τμήμα αφού περιέχει τα παχιά ανιόντα σκέλη των αγκύλων Henle που εκτελούν μεταβολικές δραστηριότητες όπως ενεργό επαναρρόφηση νατρίου, κατά τη διάρκεια των οποίων, απαιτείται μεγάλη ποσότητα οξυγόνου [27]. Ως αποτέλεσμα μείωσης της μυελικής ροής αίματος κατά τη χορήγηση CM, διαταράσσεται η λεπτή ισορροπία μεταξύ κατανάλωσης και διαθεσιμότητας οξυγόνου στους ιστούς [16]. Η υποξία στο μυελό χαρακτηρίζεται από μειωμένη ροή αίματος στη μικροκυκλοφορία που συνοδεύεται από αυξημένη ζήτηση οξυγόνου στα σωληναριακά κύτταρα [26].

Ένα CM που εγχέεται ενδοαρτηριακά σε ζώα παράγει διφασική αιμοδυναμική απόκριση: αρχικά αγγειοδιαστολή με επακόλουθη παροδική αύξηση της νεφρικής αιματικής ροής, της σπειραματικής διήθησης και της παραγωγής ούρων που ακολουθείται από παρατεταμένη αγγειοσυστολή, με αποτέλεσμα τη μείωση της ροής αίματος. Ο μηχανισμός αυτού του φαινομένου δεν είναι πλήρως κατανοητός, αλλά η έρευνα έχει επισημάνει τη σημασία της εισροής ασβεστίου στην αγγειοσυστολή μετά από θεραπεία με CM [28]. Μελέτη των αναστολέων διαύλων ασβεστίου ως μέσο μείωσης της αγγειοσυστολής σε μοντέλο σκύλου έδειξε ότι οι τύπου T (διλτιαζέμη ή βεπαραμίλη) ή το τετραοξικό οξύ αιθυλενογλυκόλης (Ethylene Glycol Tetra-acetic acid, EGTA) αναστέλλουν σημαντικά την αγγειοσυστολή [29].

Η αγγειοσυστολή πιστεύεται επίσης ότι προκαλείται από μια ανισορροπία διαφόρων αγγειοδραστικών ουσιών, όπως η ενδοθηλίνη, η αδενοσίνη και το NO [28]. Τα CM μπορούν να προκαλέσουν απελευθέρωση ενδοθηλίνης/αδενοσίνης από ενδοθηλιακά κύτταρα, αυξάνοντας την αγγειοσυστολή και μειώνοντας την απελευθέρωση NO και προσταγλανδινών που δρουν αγγειοδιασταλτικά [17, 30]. Η μείωση στην παραγωγή NO είναι ανάλογη με την ωσμωμοριακότητα του CM σε καλλιεργημένα μυϊκά κύτταρα νεφρικής αρτηρίας που σημαίνει ότι εκτός από άμεση αγγειοσυστολή των νεφρικών αγγείων τα CM εμποδίζουν την αγγειοσυστολή και αυτορρύθμιση [31].

3.5.2 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Αυτά τα μόρια μετατρέπονται σε νερό μετά από αντιδράσεις μείωσης. Λιγότερο επιθετικά μόρια όπως το H_2O_2 ονομάζονται ROS [32]. Ως μέρος των φυσιολογικών λειτουργιών της σωληναριακής μεταφοράς, ο σχηματισμός ROS συνδέεται με αυτό, ειδικά στο παχύ ανιόν σκέλος, όπου η NAD(P)H-οξειδάση στα μιτοχόνδρια παράγει ανιόντα υπεροξειδίου (O_2^-) και ρίζες υδροξυλίου (OH^-) [33]. Οι ROS παίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες κυτταρικής σηματοδότησης, στη ρύθμιση της περιφερικής μικροκυκλοφορίας (μέσω των επιδράσεών της στα επίπεδα NO) και στη δραστηριότητα σωληναριακής μεταφοράς. Σε μια κατάσταση όπου η ποσότητα των ROS υπερβαίνει την ικανότητα του σώματος να τις εξουδετερώσει, μπορεί να προκληθεί βλάβη στους ιστούς.

Η χορήγηση CM μειώνει σημαντικά την οξυγόνωση του μυελού, αλλά η επαναπορρόφηση στην περιοχή παραμένει η ίδια [25]. Η παρουσία των ROS αυξάνει τα επίπεδα δύο αγγειοσυστολέων, της αγγειοτασίνης-II και της ενδοθηλίνης-I (ενεργοποιώντας το ένζυμο μετατροπέα της ενδοθηλίνης-1) και μειώνει τη βιοδιαθεσιμότητα του NO [25, 33]. Σε σοβαρές περιπτώσεις αγγειοσυστολής που σχετίζεται με απώλεια αυτορρύθμισης, η δραστηριότητα των μιτοχονδριακών εξουδετερωτών μπορεί να κατασταλεί και ως αποτέλεσμα μπορεί να απελευθερωθούν ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Κατά τη διάρκεια της υποξίας, το ATP μετατρέπεται σε ADP και AMP, τα οποία με τη σειρά τους μεταβολίζονται σε αδενοσίνη και τελικά σε υποξανθίνη που χρησιμοποιεί το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης για να μετατραπεί σε

ξανθίνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η ξανθίνη χρησιμοποιεί επίσης αυτό το ένζυμο για να παράγει ουρικό οξύ και περισσότερο υπεροξείδιο του υδρογόνου που είναι επίσης καταλύτες που εξουδετερώνουν το NO [25]. Το NO προλαμβάνει τη βλάβη των ενδοθηλιακών κυττάρων που προκαλείται από τις ROS και μειώνει την εξαρτώμενη από τη μεταφορά παραγωγή ROS στα παχιά ανιόντα σκέλη του μυελού. Οι ρίζες υπεροξειδίων αντιδρούν με το NO, μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του και παράγοντας υπεροξυνιτρώδες, ένα οξειδωτικό και πολύ δραστικό νιτρώδες που προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και περαιτέρω βλάβη στους ιστούς [25, 34].

Η διακοπή της ροής οδηγεί σε μυελική υποξία και μειωμένη παροχή θρεπτικών συστατικών στα σωληναριακά επιθηλιακά κύτταρα. Δημιουργούνται ROS, με αποτέλεσμα τη διάσπαση της δομής των επιθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα την υπεροξείδωση των λιπιδίων, η οποία καταδεικνύεται από τα αυξημένα επίπεδα μηλονοδιαλδεΰδης (Malondialdehyde, MDA), με απώλεια της κυτταρικής ισορροπίας και κυτταρικό θάνατο [30, 34, 35].

3.5.3 Τοξικότητα νεφρικών σωληναρίων

Τα CM φαίνεται ότι ασκούν άμεση κυτταροτοξικότητα στα νεφρικά σωληνάρια [36]. Η ανακατανομή των ROS των μεμβρανικών πρωτεϊνών, η αλλοιωμένη μιτοχονδριακή λειτουργία, η μείωση εξωκυτταρικού Ca^{+2}, ο κατακερματισμός του DNA, η διακοπή των ενδοκυτταρικών συνδέσεων, η μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και η αυξημένη απόπτωση έχουν περιγραφεί ως πιθανοί κυτταροτοξικοί μηχανισμοί. [17, 34, 36, 37]. Τα CM προκαλούν αποπτωτικές επιδράσεις στα σπειραματικά μεσαγγειακά κύτταρα που σχετίζονται με αυξημένα επίπεδα ROS στα κύτταρα [37]. Η οξεία νεφρική βλάβη που προκαλείται από τα CM σχετίζεται με βλάβη των νεφρικών σωληναρίων είτε λόγω άμεσης σωληναριακής βλάβης είτε λόγω νεφρικής ισχαιμίας. Οι βλάβες αφορούν κυρίως στο επιθήλιο του εγγύς σωληναρίου και τυπικά περιλαμβάνουν σωληναριακή κενοτοπίωση/νέκρωση και παρουσία πρωτεϊνικών εκμαγείων (κυλίνδρων) στους αθροιστικούς πόρους του νεφρικού μυελού, ενώ τα σπειράματα παραμένουν άθικτα [38-41].

3.5.4 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι μορφή προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που εμφανίζεται ως φυσιολογικός μηχανισμός κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της γήρανσης για τη διατήρηση της ομοιόστασης αλλά και ως αμυντικός μηχανισμός, όπως στις ανοσολογικές αντιδράσεις ή όταν οι πληθυσμοί των κυττάρων καταστρέφονται από φάρμακα, μολυσματικούς ή τοξικούς παράγοντες [42]. Υπάρχουν δύο κύριες αποπτωτικές οδοί: η εξωτερική οδός ή η οδός του υποδοχέα θανάτου και η ενδογενής ή μιτοχονδριακή οδός. Ωστόσο, υπάρχουν στοιχεία ότι οι δύο οδοί συνδέονται και ότι τα μόρια στη μία οδό μπορούν να επηρεάσουν την άλλη [43].

Η εξωγενής οδός ξεκινά από τους υποδοχείς θανάτου, μέλη της υπεροικογένειας του υποδοχέα παράγοντα νέκρωσης όγκου (Tumor Necrosis Factor receptor superfamily, TNFR) και έχει ως αποτέλεσμα έκφραση των παραγόντων που προσδένονται στους φαγοκυτταρικούς υποδοχείς και τελική πρόσληψη από τα φαγοκύτταρα [44, 45]. Στην ενδογενή οδό που είναι ανεξάρτητη από τους υποδοχείς θανάτου, τα ερεθίσματα προκαλούν αλλαγές στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη που καταλήγουν σε άνοιγμα του πόρου μετάβασης μιτοχονδριακής διαπερατότητας (Mitochondrial Permeability Transition, MPT), απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής διαμεμβράνης και απελευθέρωση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα, όπως το κυτόχρωμα c [46]. Και οι δύο οδοί καταλήγουν στη φάση εκτέλεσης, η οποία θεωρείται η τελική οδός απόπτωσης, όπου ενεργοποιούνται οι κασπάσες εκτέλεσης που ξεκινούν την απόπτωση. Η κασπάση-3 θεωρείται ως η πιο σημαντική από τις κασπάσες και ενεργοποιείται από οποιαδήποτε κασπάση εκκίνησης (κασπάση-8, κασπάση-9 ή κασπάση-10) [47]. Τα αποπτωτικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από κυτταρική συρρίκνωση, πυρηνική και κυτταροπλασματική συμπύκνωση και κατακερματισμό του πυρήνα, κενοτόπια που περιέχουν κυτταροπλασματικά τμήματα και θραύσματα σε διακριτά κομμάτια [44].

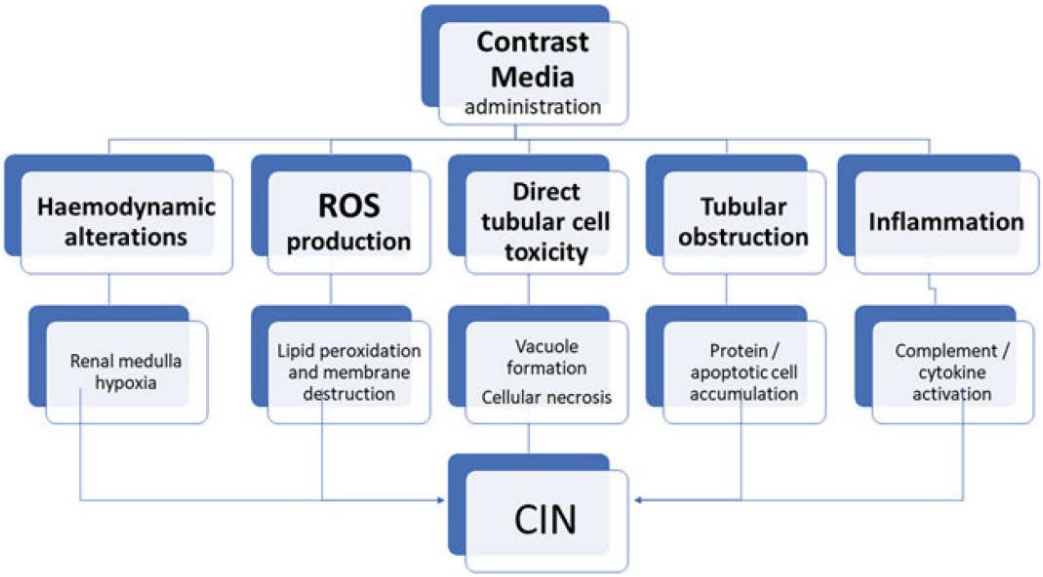
Υπάρχουν πολλές in vitro και in vivo μελέτες που δείχνουν ότι η απόπτωση είναι εξέχον και χαρακτηριστικό γνώρισμα της οξείας νεφρικής βλάβης που προκαλείται από CM [19, 40, 41, 48-51]. Μια πρόσφατη in vitro/in vivo αξιολόγηση των οδών που συμμετέχουν στην εμφάνιση της CIN έδειξε ότι η απόπτωση αποτελεί βασικό μηχανισμό και συγκεκριμένα, ότι ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος προκλήθηκε μέσω τριών μονοπατιών: το μονοπάτι των ROS, το μονοπάτι της κινάσης του στρες

και το ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι [52]. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που αμφισβητούν τον ρόλο του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου στη CIN [44].

3.5.5 Νεκρόπτωση

Οι ερευνητικές εξελίξεις χαρακτηρίζουν και άλλες μορφές κυτταρικού θανάτου πέραν της απόπτωσης που ενδεχομένως εμπλέκονται στην παθογένεση της CIN καθώς η νέκρωση έχει μελετηθεί εκτενέστερα στην οξεία νεφρική βλάβη [44]. Η νεκρόπτωση είναι προγραμματισμένη μορφή νέκρωσης με μορφολογικά χαρακτηριστικά νέκρωσης αλλά μοριακά ελεγχόμενη [53]. Εισήχθη το 2005 όταν οι Degterev et al. εντόπισαν τη νεκροστατίνη-1 (Nec1), η οποία είναι ένας αναστολέας της νέκρωσης [54]. Τα νεκρωτικά φαινόμενα μπορεί να ξεκινήσουν με τη δέσμευση υποδοχέων θανάτου, υποδοχέων τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) και σημάτων ιντερφερόνης που εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αλληλοεπιδρώντα με τον υποδοχέα της πρωτεϊνικής κινάσης 3 (Receptor-interacting protein kinase 3, RIP-3) και με την πρωτεΐνη lineage kinase domain- like (MLKL)[44].

Η νέκρωση συνδέθηκε πρόσφατα με την παθοφυσιολογία της CIN. Οι Linkermann κ.α. έδειξαν ότι ο τραυματισμός των νεφρών που προκλήθηκε από CM προλήφθηκε σχεδόν πλήρως σε ποντίκια που έλαβαν Nec-1 [55]. Οι Liang et. al. ανέφεραν ότι η νεκρόπτωση συνεισέφερε στη CIN σε ένα μοντέλο χωρίς ATP [56]. Ωστόσο, οι Huang et. al. σε μια in vitro μελέτη ανθρώπινης εγγύς επιθηλιακής κυτταρικής σειράς νεφρού (HK-2) έδειξε νέκρωση, καθώς δεν υπήρχαν αλλαγές στην έκφραση RIP3 και το Nec-1 δεν μείωσε την παρατηρούμενη κυτταροτοξικότητα [48]. Η καλύτερη κατανόηση της οδού της νεκρόπτωσης θα μπορούσε να οδηγήσει σε νέες στρατηγικές πρόληψης της CIN [53].



Εικόνα 5. Παθοφυσιολογικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην ανάπτυξη CIN [57]

3.6 Παράγοντες κινδύνου

Υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες κινδύνου που προδιαθέτουν για την εμφάνιση της CIN. Ο σημαντικότερος είναι η προϋπάρχουσα νεφρική δυσλειτουργία [58]. Ασθενείς με εκτιμώμενο ρυθμό σπειραματικής διήθησης (Glomelural Filtration Rate, GFR) <60 mL/min/1,73 m^2 πριν την ενδοαρτηριακή και GFR <45 mL/min/1,73 m^2 πριν την ενδοφλέβια χορήγηση διατρέχουν κίνδυνο [21]. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί σε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια είναι εξασθενημένοι και τα άτομα εμφανίζουν αυξημένο οξειδωτικό στρες λόγω φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας [59, 60]. Όσο μεγαλύτερη η δόση του CM και χαμηλότερος ο GFR, τόσο μεγαλύτερος είναι ο κίνδυνος για CIN [61].

Ο όγκος των CM αποτελεί ασαφή παράγοντα κινδύνου. Πιστεύεται ότι υπάρχει συσχέτιση. Μελέτες έχουν δείξει ότι η παραγωγή ROS και η πιθανότητα εμφάνισης CIN αυξήθηκε αναλογικά με τις δόσεις των CM [62, 63]. Ωστόσο, σε πρόσφατη μετα-ανάλυση ο όγκος του CM δεν φάνηκε να συσχετίζεται σημαντικά με τη συχνότητα εμφάνισης της CIN [64].

Ο διαβήτης είναι πολύ σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας καθώς οι διαβητικοί με CIN έχουν μειωμένο ποσοστό επιβίωσης συγκριτικά με τους μη διαβητικούς [65]. Τα ιοντικά CM προκάλεσαν μεγαλύτερο βαθμό απόπτωσης συγκριτικά με τα μη ιονικά [49]. Ένας πιθανός μηχανισμός δράσης είναι ότι η γλυκόζη επιδεινώνει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τα CM στα μεσαγγειακά κύτταρα ανεξάρτητα ωσμωτικής δράσης [66]. Επιπλέον, οι ασθενείς με διαβήτη και νεφρική ανεπάρκεια βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο λόγω μείωσης των ενδογενών αγγειοδιασταλτικών (NO και προσταγλανδινών), οδηγώντας σε μείωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και της νεφρικής αιματικής ροής [28, 67]. Πρόσφατη μεγάλη μελέτη σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία έδειξε ότι τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης συσχετίζονται με αύξηση κινδύνου εμφάνισης CIN παρόλο που οι ασθενείς αυτοί δεν είχαν διαγνωσθεί ως διαβητικοί [67].

Η ηλικία του ασθενούς είναι παράγοντας που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη, καθώς συσχετίζεται με μειωμένη νεφρική μάζα, λειτουργία και αιμάτωση. Άλλοι παράγοντες που οδηγούν σε νεφρική ανεπάρκεια, όπως η καρδιαγγειακή νόσος, υπόταση και κίρρωση είναι πιθανό να προδιαθέτουν για CIN. Η νεφρική βλάβη μπορεί επίσης να προκληθεί από σήψη μέσω απελευθέρωσης βακτηριακών τοξινών στα νεφρικά σωληνάρια [68]. Δεν συνιστώνται πολλαπλές χορηγήσεις CM μέσα σε λίγες ημέρες, καθώς συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο [21].

Τα HO CM έχουν δείξει συσχέτιση με αυξημένο κίνδυνο CIN σε σύγκριση με τα IO και τα LO καθώς και η ενδοαρτηριακή σε σύγκριση με την ενδοφλέβια χορήγηση [68]. Μια μεγάλη ανασκόπηση των εργασιών από το 1996 έως τον Απρίλιο του 2010 διενεργήθηκε από την Contraceptive Safety Committee of the European Society of Urogenital Radiology για να συγκρίνει τον κίνδυνο μετά από ενδοφλέβια και ενδοαρτηριακή χορήγηση CM. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενδοφλέβια οδός ήταν ασφαλέστερη από την ενδοαρτηριακή [69]. Μια εξήγηση θα ήταν ότι το CM που ταξιδεύει μέσω των αρτηριών φτάνει στους νεφρούς γρηγορότερα και αραιώνεται λιγότερο, ενώ η ενδοφλέβια οδός απαιτεί μικρότερες ποσότητες και το CM αραιώνεται στην κυκλοφορία πριν φτάσει στο νεφρικό αγγείο [2, 70]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μελέτης έχουν αμφισβητηθεί από μια πρόσφατη μελέτη που έδειξε ασήμαντη αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης CIN στην ενδοαρτηριακή και όχι στην ενδοφλέβια χορήγηση (14% και 11,7%, αντίστοιχα) μετά από έλεγχο συγχυτικών παραγόντων κινδύνου σχετιζόμενων με τον ασθενή [71].

Η συστηματική φλεγμονή αποτελεί δυνητικό παράγοντα κινδύνου. Μελέτες δείχνουν ότι η αυξημένη C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) αποτελεί ισχυρό και ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα εμφάνισης CIN και οι στατίνες, των οποίων ο ευεργετικός ρόλος στη συστηματική φλεγμονή έχει αποσαφηνιστεί, έχουν συσχετιστεί με μειωμένη συχνότητα εμφάνισης CIN [72-74]. Η αυξανόμενη συστηματική φλεγμονή συσχετίζεται με αυξανόμενο αριθμό προσβεβλημένων αγγείων συνδέοντας την CRP με την αθηροσκληρωτική νόσο, αλλά μπορεί να μην υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ των επηρεασμένων αγγείων και της CIN [72, 75]. Ωστόσο η στεφανιαία αθηροσκλήρωση μπορεί να αποτελεί παράγοντα κινδύνου καρδιαγγειακής και νεφρικής νόσου [76]. Η συστηματική φλεγμονή, η οποία εκφράζεται από την αθηροσκλήρωση μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στη μικροκυκλοφορία των νεφρών προδιαθέτοντας για εμφάνιση CIN [72].

3.7 Πρόληψη

Όλα τα άτομα που πρόκειται να λάβουν CM πρέπει να αξιολογούνται για τον κίνδυνο εμφάνισης CIN και τα άτομα υψηλού κινδύνου πρέπει να εξετάζονται για μεθόδους πρόληψης που υποστηρίζονται από κλινικά δεδομένα αφού η CIN είναι μια κλινική κατάσταση που δυνητικά μπορεί να προληφθεί. Σε άτομα χαμηλού κινδύνου, η συχνότητα εμφάνισης φαίνεται να είναι μικρή (< 5%) σε αντίθεση με άτομα υψηλού κινδύνου, στα οποία η συχνότητα εμφάνισης είναι υψηλή (έως 20%) [77]. Η διαχείριση παραμένει υποστηρικτική με βάση κυρίως την ενδοφλέβια ενυδάτωση σε άτομα υψηλού κινδύνου χρησιμοποιώντας φυσιολογικό ορό ή διττανθρακικά. Νέοι βιοδείκτες και παράγοντες με αντιοξειδωτικές και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, μεταξύ άλλων τα αντιοξειδωτικά και οι αναστολείς της 5-φωσφοδιεστεράσης, προσελκύουν την προσοχή λόγω της ικανότητας να μειώνουν το οξειδωτικό στρες και να ρυθμίζουν τον αγγειακό τόνο [78-80].

3.7.1 Ενυδάτωση

Η ενυδάτωση προκαλεί αύξηση της ροής των ούρων, μειώνει τη συγκέντρωση των CM στα σωληνάρια και επιταχύνει απέκκριση τους, μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά τους στα σωληναριακά κύτταρα. Υπό αυτήν την έννοια, ελαχιστοποιούνται οι χρόνο-εξαρτώμενες τοξικές επιδράσεις [81]. Η ενυδάτωση μειώνει τη δραστηριότητα του συστήματος ρενίνης - αγγειοτενσίνης προκαλώντας μείωση των αγγειοσυσταλτικών ορμονών, όπως η ενδοθηλίνη. Η διούρηση με νάτριο είναι αυξημένη, ενώ η μειωμένη σωληναριακή-σπειραματική ανατροφοδότηση αποτρέπει περαιτέρω την σωληναριακή απόφραξη [67]. Η διούρηση οδηγεί επίσης σε αγγειοδιαστολή στην ευάλωτη περιοχή του μυελού πιθανόν μέσω αύξησης της παραγωγής προστακυκλίνης [81]. Η ενυδάτωση (αύξηση ενδοφλεβίου όγκου) χρησιμοποιείται ευρέως ως κλινική πρακτική, λόγω χαμηλού κόστους και του κινδύνου. Η ενυδάτωση πριν από έκθεση σε CM είναι η παρέμβαση που έχει αποδειχθεί πιο αποτελεσματική στη μείωση κινδύνου εμφάνισης CIN και ο χρυσός κανόνας έναντι του οποίου συγκρίνονται όλες οι δυνητικά προληπτικές μέθοδοι σε άτομα υψηλού κινδύνου.

Το ισότονο διάλυμα χλωριούχου νατρίου θεωρείται η καλύτερη επιλογή. Οι λόγοι δεν έχουν τεκμηριωθεί επαρκώς, αλλά ο μηχανισμός πιθανόν να σχετίζεται κυρίως με τις αυξημένες σωληναριακές ροές που προκύπτουν από την αύξηση όγκου και επομένως τη μειωμένη συγκέντρωση του φιλτραρισμένου CM κατά τη διέλευση από τα νεφρικά σωληνάρια καθώς και μια ελαφρά μείωση του σωληναριακού pH που δημιουργείται από έκκριση οξέος σε αυξημένο σωληναριακό όγκο που παράγεται από τις αυξημένες ροές των σωληναρίων [82]. Η ενδοφλέβια χορήγηση ισότονου φυσιολογικού ορού είναι αποτελεσματικότερη από τη χορήγηση διαλύματος φυσιολογικού ορού-γλυκόζης 1:1 [81]. Η ενυδάτωση 12 ώρες πριν/12 ώρες μετά τη χορήγηση του CM είναι αποτελεσματικότερη από την ενυδάτωση κατά την στιγμή της χορήγησης του CM [83]. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Αμερικανικού Κολεγίου Ακτινολογίας (ACR Committee on Drugs and Contrast Media, 2016), δεν είναι γνωστός ο ιδανικός ρυθμός ενυδάτωσης, αλλά προτιμώνται τα ισότονα διαλύματα (Lactated Ringer's ή 0,9% NaCl). Ένα πιθανό πρωτόκολλο θα ήταν 0,9% NaCl στα 100 ml/h, ξεκινώντας 6-12 ώρες πριν/4-12 ώρες μετά, όμως αυτό είναι πρακτικό μόνο σε νοσοκομειακό περιβάλλον (ACR Committee on Drugs and Contrast Media, 2016). Οι κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ουρογεννητικής

Ακτινολογίας προτείνουν 1,0 – 1,5 ml/kg/h ενδοφλεβίως τουλάχιστον 6 ώρες πριν και μετά τη χορήγηση του CM [69]. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Καρδιολογίας και Ευρωπαϊκής Ένωσης Καρδιοχειρουργικής, όλοι οι ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο (ιδιαίτερα αν ο εκτιμώμενος GFR είναι <40 ml/min/1,73m^2), που υποβάλλονται σε διαγνωστικό καθετηριασμό, είναι απαραίτητο να ενυδατώνονται προληπτικά με ισότονο φυσιολογικό ορό, αρχίζοντας περίπου 12 ώρες πριν από την αγγειογραφία και συνεχίζοντας για τουλάχιστον 24 ώρες μετά, ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος εμφάνισης νεφρικής ανεπάρκειας [84]. Εκτός από την ενδοφλέβια χορήγηση, ενυδάτωση μπορεί να γίνει και από το στόμα. Τα αποτελέσματα ωστόσο είναι αντικρουόμενα [69]. Μια μετα-ανάλυση έξι τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων δοκιμών κατέληξε ότι η από του στόματος ενυδάτωση μπορεί να είναι εξίσου αποτελεσματική με την ενδοφλέβια, όσον αναφορά στην αύξηση του όγκου και πρόληψη της CIN. [85]. Ωστόσο, σύμφωνα με τα τρέχοντα δεδομένα, η από του στόματος ενυδάτωση θεωρείται λιγότερο αποτελεσματική (ACR Committee on Drugs and Contrast Media, 2016).

Η ενυδάτωση κάποιες φορές εφαρμόζεται συνδυαστικά με διάφορους παράγοντες όπως διουρητικά (μαννιτόλη ή φουροσεμίδη) ή ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η χορήγηση φουροσεμίδης συνδυαστικά με ενδοφλέβιο φυσιολογικό ορό φαίνεται να επιδεινώνει τη νεφρική δυσλειτουργία [86]. Ούτε η χρήση μαννιτόλης αλλά ούτε και φουροσεμίδη συνιστάται για μείωση του κινδύνου CIN (ACR Committee on Drugs and Contrast Media, 2016). Παρ' όλα αυτά, σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρείας/Ευρωπαϊκής Εταιρείας Καρδιοθωρακικής Χειρουργικής [78] η φουροσεμίδη σε συνδυασμό με αντίστοιχη ενυδάτωση μπορεί να εφαρμοστεί σε άτομα πολύ υψηλού κινδύνου ή σε περιπτώσεις όπου η προφυλακτική ενυδάτωση δεν μπορεί να επιτευχθεί. Το συνιστώμενο πρωτόκολλο είναι αρχική χορήγηση 250 ml φυσιολογικού ορού ενδοφλέβια σε διάστημα 30 λεπτών (150 ml σε περίπτωση δυσλειτουργίας αριστερής κοιλίας) ακολουθούμενη από ενδοφλέβιο έγχυση (0,25–0,5 mg/kg) φουροσεμίδης εντός 30 λεπτών. Όταν ο ρυθμός παραγωγής ούρων είναι > 300 mL/h, οι ασθενείς υποβάλλονται σε στεφανιαία επέμβαση. Η κατάλληλη χορήγηση υγρών διατηρείται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας και για 4 ώρες μετά.

Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων δοκιμών συγκριτικής αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας των N-ακετυλοκυστεΐνη (N-acetylcysteine,

NAC), διττανθρακικού νατρίου, στατινών ή βιταμίνης C για πρόληψη CIN μετά από ενδοφλέβια ή ενδοαρτηριακή χορήγηση CM σε ενήλικες κατέληξε ότι τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με την ενδοφλέβια χορήγηση αλατούχου ορού + NAC σε άτομα που έλαβαν LO CM και με ενδοφλέβια χορήγηση φυσιολογικού ορού + NAC + στατίνες [87].

3.7.2 Αντιοξειδωτικά

Η χορήγηση CM μπορεί να προκαλέσει αύξηση παραγωγής ROS στα κύτταρα των αγγείων και των νεφρικών σωληναρίων και ενεργοποίηση της απόπτωσης. Αρκετές ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες έχουν ερευνηθεί, συμπεριλαμβανομένης της N-ακετυλοκυστεΐνης (NAC), του ασκορβικού οξέος, στατινών, και προσφάτως, αναστολέων της φωσφοδιεστεράσης τύπου 5 (PDE5Is).

Το διττανθρακικό νάτριο έχει προταθεί ως μια αποτελεσματική μέθοδος ενυδάτωσης, κυρίως λόγω των αλκαλικών ιδιοτήτων [81, 88]. Η μείωση του οξειδωτικού στρες στα νεφρικά σωληνάρια μπορεί να είναι ο βασικός μηχανισμός της νεφροπροστασίας του διττανθρακικού νατρίου. Τα διττανθρακικά είναι σε θέση να επιβραδύνουν την αντίδραση Haber-Weiss που παράγει ελεύθερες ρίζες. Τα διττανθρακικά μπορούν να καθαρίσουν άμεσα τα υπεροξυνιτρώδη που παράγονται από το NO. Η αλκαλιοποίηση των ούρων και η ενδοσωληναριακή αύξηση του pH, ως άμεση επίδραση της ενδοφλέβιας χορήγησης όξινου ανθρακικού νατρίου, μπορεί να μειώσει την εξαρτώμενη από το pH παραγωγή μεθαιμοσφαιρίνης (Fe^{3+}) στα σωληναριακά εκμαγεία, την παραγωγή ελεύθερων ριζών που καταλύονται από ιόντα σιδήρου, καθώς και οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από πρωτεϊνουρία. Έτσι, η εξασθένηση του οξειδωτικού στρες μέσω αλκαλιοποίηση των ούρων με διττανθρακικό νάτριο μπορεί προφυλάξει από εμφάνιση CIN. Ενώ ο μηχανισμός δράσης του διττανθρακικού νατρίου έχει εικασθεί κυρίως σε μελέτες σε ζώα, υπάρχουν στοιχεία για την αποτελεσματικότητά στους ανθρώπους. [89, 90].

Παρά το μεγάλο αριθμό κλινικών δοκιμών και μετα-αναλύσεων που έχουν διεξαχθεί, ο πιο αποτελεσματικός τρόπος αύξησης του ενδαγγειακού όγκου (ισότονο όξινο ανθρακικό έναντι χλωριούχου νατρίου) για την πρόληψη της CIN παραμένει ασαφής

λόγω μεθοδολογικών αδυναμιών των αντίστοιχων μελετών. Μια καλά σχεδιασμένη, μεγάλη, πολυκεντρική, διπλή-τυφλή, τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή προσπαθεί να απαντήσει οριστικά σε αυτές τις ερωτήσεις που αφορούν στην πρόληψη σοβαρών επιπλοκών που σχετίζονται με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια σε ασθενείς υψηλού κινδύνου που υποβάλλονται σε αγγειογραφία [91].

Επίσης, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η αύξηση του ενδοαγγειακού όγκου με χρήση όξινου ανθρακικού νατρίου είναι αποτελεσματικότερη από τον φυσιολογικό ορό [92-94] αλλά αυτά τα αποτελέσματα αμφισβητήθηκαν από άλλες έρευνες [87, 95] και δεν μπορεί να θεωρηθούν οριστικά. Το ενδοφλεβίως χορηγούμενο όξινο ανθρακικό νάτριο μία ώρα πριν τη χορήγηση CM έχει αναφερθεί πιο αποτελεσματικό στην πρόληψη της CIN από το ισότονο αλατούχο μαζί με NAC από το στόμα μετά τη διαδικασία [96]. Ακόμα, έχει βρεθεί ότι το διττανθρακικό νάτριο είναι πιο αποτελεσματικό από τον φυσιολογικό ορό σε ασθενείς με προϋπάρχουσα νεφρική ανεπάρκεια [97]. Ωστόσο, το εύρημα αυτό είναι αμφιλεγόμενο [81, 98]. Τέλος, ο συνδυασμός ενυδάτωσης με διττανθρακικό νάτριο και NAC έχει αναφερθεί ότι μειώνει σημαντικά τη συχνότητα εμφάνισης CIN συγκριτικά με τη χορήγηση φυσιολογικού ορού μαζί με NAC, καθώς και την ενυδάτωση με φυσιολογικό ορό και ασκορβικό οξύ μαζί με NAC [99, 100].

Οι κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Ουρογεννητικής Ακτινολογίας αναφέρουν ότι η ενυδάτωση είτε με ισότονο αλατούχο διάλυμα είτε με όξινο ανθρακικό νάτριο (3 ml/kg/ώρα για 1 ώρα πριν από το CM ακολουθούμενο από 1 ml/kg/ώρα για 6 ώρες μετά) μειώνει την συχνότητα εμφάνισης CIN [69]. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Καρδιολογίας/Ευρωπαϊκής Ένωσης Καρδιοχειρουργικής για ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή χρόνια νεφρική νόσο που υποβάλλονται σε στεφανιογραφία ή υπολογιστική τομογραφία δεν ενδείκνυται έγχυση διττανθρακικού νατρίου 0,84% αντί για συνήθη ενυδάτωση [84].

Η NAC είναι ακετυλιωμένο παράγωγο κυστεΐνης που έχει μελετηθεί ως παράγοντας πρόληψης CIN στον άνθρωπο [101, 102]. Ασκεί σημαντικές προστατευτικές/ βελτιωτικές επιδράσεις έναντι της νεφρικής βλάβης από φάρμακα σε πειραματικά μοντέλα που αποδίδονται σε διάφορους μηχανισμούς σε διαφορετικά πειραματικά περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένης της αντιοξειδωτικής δράσης αποκαθιστώντας τη μειωμένη ενδοκυτταρική δεξαμενή της φυσικής αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης,

την άμεση εξουδετέρωση των ROS και/ή την αλληλεπίδραση με τις ROS και την πρόληψη νεφρικής απόπτωσης που προκαλείται από τα CM [102, 103]. Εκτός από τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες, η NAC παρουσιάζει και άλλα βιολογικά αποτελέσματα σημαντικά για την πρόληψη του CIN. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ενδέχεται να έχει αγγειοδιασταλτικές επιδράσεις μέσω σταθεροποίησης του NO [101] ή ακόμη και με αύξηση της παραγωγής NO μετά τη χορήγηση CM [103]. Επιπλέον, η σουλφυδρυλ-ομάδα της NAC μπορεί να αναστέλλει το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτασίνης, με αποτέλεσμα μείωση της παραγωγής της αγγειοτασίνης II [101].

Η NAC διατίθεται δια στόματος και ενδοφλέβια αν και η βιοδιαθεσιμότητα της είναι πολύ χαμηλή. Μετά την από του στόματος χορήγηση, η βιοδιαθεσιμότητα είναι < 5%, πιθανώς λόγω εκτεταμένου ηπατικού μεταβολισμού (μόνο η οξειδωμένη μορφή είναι ανιχνεύσιμη σε πολύ μικρές ποσότητες στην κυκλοφορία) [101]. Λόγω των φαρμακολογικών ιδιοτήτων της NAC, ιδιαίτερα της χαμηλής βιοδιαθεσιμότητάς, η in vivo αποτελεσματικότητά της θα πρέπει να εξετάζεται χωριστά από την in vitro. Οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις της μπορεί να είναι έμμεσες στους ανθρώπους και μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού από οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα [104]. Η κυκλοφορούσα κυστεΐνη μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα των νεφρών που χρησιμεύει ως πρόδρομη ουσία για την παραγωγή γλουταθειόνης.

Η NAC χορηγείται κατά κανόνα (σε τυποποιημένη δόση 600 mg από το στόμα δύο φορές την ημέρα για 24 ώρες) την ημέρα πριν και την ημέρα της διαδικασίας [69] για πρόληψη σε πληθυσμούς που βρίσκονται σε κίνδυνο, μετά από δημοσίευση μιας τυχαιοποιημένης ελεγχόμενης με εικονικό φάρμακο δοκιμής [105]. Η μελέτη συμπέρανε ότι η NAC (600 mg από το στόμα δύο φορές ημερησίως, πριν και μετά τη χορήγηση του CM), μαζί με ενυδάτωση (0,45% φυσιολογικός ορός ενδοφλέβια), αναστέλλει τη μείωση της λειτουργείας των νεφρών που δημιουργείται από μη ιονικά CM χαμηλής ωσμωμοριακότητας σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο [105]. Στη συνέχεια, η NAC μελετήθηκε σε υψηλότερες δόσεις από το στόμα (δύο φορές την ημέρα για 48 ώρες) (1200 mg δύο φορές την ημέρα για 48 ώρες) και ενδοφλέβια (οι δόσεις κυμαίνονταν από 2400 mg έως 150 mg/kg). Η αποτελεσματικότητά της στη πρόληψη παραμένει αμφιλεγόμενη κυρίως λόγω μεθοδολογικών περιορισμών των μελετών [91, 106]. Μια πολυκεντρική, διπλά-τυφλή, τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη δοκιμή στοχεύει να δώσει μια οριστική απάντηση σε αυτό το ερώτημα, ειδικά σε

ασθενείς υψηλού κινδύνου που υποβάλλονται σε αγγειογραφία. [91]. Έχουν εκφραστεί επίσης αμφιβολίες σχετικά με την πιθανή τεχνητή επίδραση στη συγκέντρωση της sCr που μπορεί να είναι υπεύθυνη για τα θετικά αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν λόγω του ότι η NAC μειώνει την sCr σε φυσιολογικούς εθελοντές χωρίς να αλλάζουν τα επίπεδα της κυστατίνης-C (καλύτερος δείκτης GFR από ότι η sCr), αυξάνοντας την πιθανότητα ότι απλά μειώνει τη συγκέντρωση της sCr χωρίς να αποτρέπει την εμφάνιση CIN [107].

Μια μελέτη έδειξε ότι η NAC προφυλάσσει από CIN σε άτομα με προϋπάρχουσα νεφρική νόσο αλλά όχι σε ασθενείς με διαβήτη [108]. Μια άλλη μεγάλη έρευνα [87] έδειξε ότι χαμηλή δόση NAC (1200 mg/ημέρα ή λιγότερο) είχε οριακά κλινικά σημαντική επίδραση και μια υψηλή δόση NAC (> 1200 mg/ημέρα) είχε μη κλινικά σημαντική επίδραση συγκριτικά με την ενδοφλέβια χορήγηση φυσιολογικού ορού. Στατιστικά σημαντική μείωση της CIN παρατηρήθηκε όταν η NAC συγκρίθηκε με φυσιολογικό ορό ενδοφλεβίως σε ασθενείς που λάμβαναν LO αλλά όχι IO CM, με τις εκτιμήσεις του λόγου κινδύνου να μην διαφέρουν μεταξύ ενδοφλέβιας και ενδοαρτηριακής χορήγησης του CM [87]. Τέλος, μια άλλη μεγάλη μελέτη έδειξε αντιστροφή και σημαντική συσχέτιση μεταξύ NAC και κινδύνου εμφάνισης CIN σε άτομα που υποβάλλονται σε στεφανιογραφία, ενώ οι προστατευτικές δράσεις σε περιφερική αγγειογραφία δεν ήταν προφανής [109].

Η NAC είναι οικονομική, άμεσα προσβάσιμη, εύκολα χορηγούμενη, μη σχετιζόμενη με σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες (κίνδυνο αναφυλακτικής αντίδρασης με μεγάλες δόσεις ενδοφλεβίως) [107] και η χρήση της γενικά δεν αντενδείκνυται επειδή σπάνια προκαλεί φαρμακευτικές αλληλεπιδράσεις [106]. Ωστόσο, τα υπάρχοντα δεδομένα αποτελεσματικότητας δεν είναι επαρκή και δεν θα πρέπει να θεωρείται υποκατάστατο για τον κατάλληλο προ-επεμβατικό έλεγχο ασθενών με επαρκή αύξηση του ενδοαγγειακού όγκου [84, 106]. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για τον καθορισμό ειδικών πλαισίων, στα οποία οι ασθενείς θα μπορούν να ωφεληθούν από τη χρήση της [87].

Το ασκορβικό οξύ έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και η αποτελεσματικότητά του στην πρόληψη οξειδωτικών νόσων που συνδέονται με στρες έχει ευρέως ερευνηθεί. Είναι ασφαλές, καλά ανεκτό και άμεσα προσβάσιμο αντιοξειδωτικό, το οποίο έχει δειχθεί ότι μειώνει τη νεφρική βλάβη σε ένα μοντέλο CIN αρουραίου [110]. Εκτός

από τη απελευθέρωση ROS που εμπλέκονται στην κυτταρική νέκρωση μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου και μετά από αγγειοπλαστική, το ασκορβικό οξύ μπορεί επίσης να δράσει ως αντιοξειδωτικό για την παρεμπόδιση του κυτταρικού θανάτου στα νεφρά από ισχαιμία [111]. Ωστόσο, τα αποτελέσματα σε ανθρώπους είναι αντιφατικά. Έχει αναφερθεί ότι η από του στόματος χορήγηση μπορεί να προστατεύσει σε δόση 3 g από 2 ώρες πριν από τη διαδικασία και σε δόση 2 g κατά τη διάρκεια της νύχτας και το πρωί μετά την κλινική πράξη [112]. Σε μια άλλη έρευνα, οι ασθενείς που έλαβαν ασκορβικό οξύ εμφάνισαν 33% μικρότερο κίνδυνο ανάπτυξης CIN [113]. Σε άτομα που υποβλήθηκαν σε αγγειογραφία με LO CM και έλαβαν ασκορβικό οξύ συνδυαστικά με επαρκή ενυδάτωση, η συχνότητα εμφάνισης CIN ελαττώθηκε σημαντικά [114]. Σε ασθενείς με προϋπάρχουσα νεφρική ανεπάρκεια δεν έχει αποδειχθεί καμία επίδραση [115]. Η από του στόματος χορήγηση υψηλής δόσης ασκορβικού οξέος σε συνδυασμό με ενυδάτωση μπορεί να έχει αντιοξειδωτική δράση στη νεφρική λειτουργία, σε ασθενείς που λαμβάνουν χαμηλή δόση LO CM, όμως δεν μειώνει τα επίπεδα sCr και δεν είναι αποτελεσματική σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια κατά την έναρξη της θεραπείας [111]. Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι οι τακτικές δόσεις ασκορβικού ενδοφλεβίως την προηγούμενη και την ημέρα της έκθεσης στο CM δεν ήταν πιο αποτελεσματικές από το εικονικό φάρμακο σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια που υποβλήθηκαν σε καρδιακό καθετηριασμό. [114].

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι οι στατίνες μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο CIN μέσω μη λιπιδικών επιδράσεων σε παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξη CIN, όπως η βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου, η διατήρηση της παραγωγής NO, η μείωση φλεγμονωδών και άνοσο-τροποποιητικών διεργασιών, του οξειδωτικού στρες και της προσκόλλησης των αιμοπεταλίων που μπορεί να συνεισφέρουν στην προστασία της καρδιάς και στη νεφροπροστασία ακόμη και βραχυπρόθεσμα [116, 117]. Η δράση των διαφόρων στατινών όπως η ροσουβαστατίνη και η ατορβαστατίνη δεν είναι η ίδια. Οι διαφορές μπορεί να σχετίζονται με αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη που μειώνει τη χοληστερόλη, νεφροπροστασία και επιδράσεις στη λειτουργία του μυοκαρδίου [118].

Οι PDE5Is (sildenafil, tadalafil, vardenafil, and avanafil) συνιστώνται ως θεραπεία πρώτης γραμμής για τη στυτική δυσλειτουργία ενισχύοντας τις αγγειοδιασταλτικές επιδράσεις του NO. Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι οι PDE5Is μειώνουν

τη νεφρική βλάβη που προκαλείται από ισχαιμία λόγω έκθεσης σε CM [78, 119]. Επιπλέον, άλλες μελέτες που χρησιμοποίησαν PDE5Is σε μοντέλα CIN, τους συσχέτισαν με μειωμένα επίπεδα δεικτών οξείας νεφρικής βλάβης, μειωμένη ηλεκτρολυτική διαταραχή, μειωμένη sCr, ουραιμία και πρωτεϊνουρία, καθώς και μειωμένα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες [79, 80, 120]. Τα αποτελέσματα των μελετών σε ζώα είναι ελπιδοφόρα, αν και τα δεδομένα εξακολουθούν να είναι περιορισμένα.

3.8 Βασικοί Βιολογικοί δείκτες

3.8.1 Κρεατινίνη

Η κρεατινίνη είναι ένα προϊόν του μεταβολισμού των μυών και των πρωτεϊνών. Σε καθημερινή βάση, 1-2% της κρεατίνης του ανθρώπινου μυός μετατρέπεται μη αναστρέψιμα σε κρεατινίνη και απομακρύνεται κυρίως από τα νεφρά μέσω σπειραματικής διήθησης και σωληναριακής έκκρισης. Η sCr αντιπροσωπεύει τον πιο συχνά χρησιμοποιούμενο δείκτη νεφρικής λειτουργίας – εκτίμησης GFR. Ωστόσο, έχει πολλά μειονεκτήματα: προσφέρει έμμεση εκτίμηση της νεφρικής λειτουργίας, επηρεάζεται από την ηλικία, το φύλο, τη μυϊκή μάζα και τη διατροφική κατάσταση και ένα μικρό ποσοστό επαναρροφάται στα σωληνάρια. Υπάρχουν φάρμακα που μπορεί να μειώσουν τη σωληναριακή έκκριση αναστέλλοντας κατιονικούς μεταφορείς στα εγγύς εσπειραμένα σωληνάρια, και το πιο σημαντικό, αλλαγές στα επίπεδα της sCr δεν εμφανίζονται μέχρι να χαθεί το 50% της νεφρικής λειτουργίας. Τα επίπεδα της sCr μεταβάλλονται στις αλλαγές αργά, απαιτώντας περίπου 24-72 ώρες. Ως εκ τούτου, η πιθανότητα έγκαιρης ανίχνευσης οποιασδήποτε αλλαγής είναι μειωμένη. Παρά όλα αυτά, η sCr εξακολουθεί να αποτελεί τον δείκτη που υιοθετούν όλοι οι επίσημοι ορισμοί της CIN.

3.8.2 Κυστατίνη C

Η Κυστατίνη C (Cystatin-C, Cys-C) είναι μια πρωτεΐνη που υπάρχει σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς καθώς παράγεται με σταθερό ρυθμό από όλα τα εμπύρηνα κύτταρα. Αναστέλλει τα λυσοσωμικά ένζυμα και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της εξωκυτταρικής δομής αναστέλλοντας τις εξωκυτταρικές πρωτεάσες κυστεΐνης. Η Cys-C διηθείται στο σπείραμα και στη συνέχεια απορροφάται σχεδόν πλήρως και μεταβολίζεται στα εγγύς νεφρικά σωληναριακά κύτταρα. Σε κανονικά λειτουργούντα σωληναριακά κύτταρα, τα επίπεδα Cys-C αντικατοπτρίζουν τον GFR. Τα επίπεδα δεν επηρεάζονται από το φύλο, τη μυϊκή μάζα, την ηπατική νόσο, την άσκηση ή τη φλεγμονή, σε αντίθεση με την sCr. Ως εκ τούτου, είναι ένας πιο αξιόπιστος δείκτης νεφρικής λειτουργίας. Επιπλέον, η Cys-C κατανέμεται στον όγκο του εξωκυττάριου υγρού σε σύγκριση με την κρεατινίνη, η οποία κατανέμεται στον συνολικό όγκο του υγρού. Με άλλα λόγια, η κρεατινίνη κατανέμεται σε τρεις φορές μεγαλύτερο όγκο. Έτσι, η Cys-C αυξάνεται πιο γρήγορα. Τα επίπεδα Cys-C στον ορό εμφανίζουν μια σχετιζόμενη με την ηλικία αύξηση που υποδηλώνει την αξία του ως δείκτη θνησιμότητας που σχετίζεται με όλα τα αίτια, θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα και επιδείνωση της νοητικής λειτουργίας. Το πλεονέκτημα της ταχείας αύξησης καθιστά την Cys-C ελκυστικό δείκτη για έγκαιρη ανίχνευση της CIN και προληπτικές στρατηγικές. Οι αλλαγές στα επίπεδα 24 ώρες μετά την έκθεση στο CM συσχετίζονται καλύτερα από τις αλλαγές στα επίπεδα sCr στις 48 ώρες [121]. Έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα Cys-C στον ορό του αίματος αυξάνονται 8 ώρες μετά τη διαδικασία έκθεσης στο CM και κορυφώνονται στις 24 ώρες [122].

3.8.3 Λιποκαλίνη που συνδέεται με ουδετεροφιλική ζελατινάση (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, NGAL)

Η NGAL, που αναφέρεται επίσης ως λιποκαλίνη-2, είναι ένα μικρό πεπτίδιο 25 kDA που ανήκει στην υπεροικογένεια των λιποκαλινών και συνδέεται με τη ζελατινάση των ουδετερόφιλων. Παράγεται από τα ουδετερόφιλα καθώς και από τα νεφρά, το ήπαρ, τον προστάτη και την αναπνευστική και πεπτική οδό, ως πρωτεΐνη οξείας φάσης. Η NGAL δεσμεύεται σε χηλικές ενώσεις σιδήρου και αναστέλλει την ανάπτυξη των βακτηρίων. Στο νεφρό, εκτός από τη μεταφορά λιπόφιλων ουσιών και

ρύθμιση της μεταφοράς σιδήρου, η NGAL έχει δραστηριότητα αυξητικού παράγοντα που ρυθμίζει την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων μετά από νεφρική προσβολή [123]. Παράγεται στον ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle και στους αθροιστικούς πόρους και απελευθερώνεται εύκολα στο αίμα και στα ούρα. Η αξία της ως προγνωστικού δείκτη για τη CIN έχει μελετηθεί σε διάφορα κλινικά πλαίσια. Σε παιδιά που υποβάλλονται σε στεφανιογραφία, έχει αναφερθεί τετραπλάσια και πενταπλάσια αύξηση των επιπέδων στο πλάσμα σε 2 ώρες και 6 ώρες, αντίστοιχα. Ομοίως, τα επίπεδα NGAL στα ούρα εμφάνισαν οκταπλάσια και δεκαπλάσια αύξηση στις 2 και 6 ώρες μετά τον καρδιακό καθετηριασμό, αντίστοιχα [124]. Ομοίως για τους ενήλικες που εμφανίζουν CIN, τα επίπεδα NGAL ορού αυξάνονται στις 6 ώρες, κορυφώνονται στις 12-24 ώρες και μειώνονται στις 48 ώρες με πολύ υψηλά ποσοστά ευαισθησίας/ειδικότητας από 6-24 ώρες [125]. Ταυτόχρονα, οι ασθενείς που υποβάλλονται σε αξονική αγγειογραφία παρουσιάζουν παρόμοιες αλλαγές, ξεκινώντας από τις 6 ώρες [126]. Σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, η ικανότητα των επιπέδων της NGAL στο πλάσμα να προβλέπουν το CIN είναι ικανοποιητική, παρουσιάζοντας σημαντική αυξητική τάση από 2-24 ώρες. Σε αντίθεση με τα επίπεδα στο πλάσμα, τα επίπεδα ούρων δεν έχουν προγνωστική αξία σε τέτοιους ασθενείς [127]. Σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα σχετικά με τα επίπεδα NGAL στα ούρα, η κακή προγνωστική της απόδοση επιβεβαιώνεται από μια μελέτη που κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η NGAL των ούρων απέτυχε να αναγνωρίσει την εμφάνιση της CIN σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια μετά από αγγειογραφία [128].

3.8.4 Δείκτης νεφρικής βλάβης 1 (Kidney Injury Marker 1, KIM-1)

Η KIM-1 είναι μια καλά μελετημένη διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που εκφράζεται στην επιθηλιακή κυτταρική γραμμή του εγγύς σωληναρίου ως απόκριση στην ισχαιμική βλάβη. Η KIM-1 απουσιάζει στον υγιή άνθρωπο και η έκφραση σχετίζεται με διήθηση μακροφάγων, φαγοκυττάρωση, κυτταρική διαφοροποίηση και σωληναριακή απόφραξη. Τα στοιχεία που υποστηρίζουν την αξία της ως πρώιμου δείκτη για τη διάγνωση της CIN προέρχονται από μελέτες που κατέδειξαν μια πρώιμη σημαντική αύξηση στα επίπεδα των ούρων από τις 6 έως τις 48 ώρες [129].

3.8.5 Ουρικό οξύ (Uric Acid, UA)

Το ουρικό οξύ είναι προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Είναι ένα φυσιολογικό συστατικό του ανθρώπινου αίματος και ούρων. Τα αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με νεφρική δυσλειτουργία προκαλώντας αναστολή του NO, διέγερση ενδοθηλίνης-1 και ρενίνης-αγγειοτενσίνης, σχηματισμό κρυστάλλων ουρικού άλατος, σχηματισμό ROS και προ φλεγμονώδη επιδράσεις. Πολλαπλές μελέτες έχουν διερευνήσει την αξία του ειδικά σε ασθενείς που υποβάλλονται σε αγγειογραφία που δείχνει συσχέτιση μεταξύ αυξημένων επιπέδων UA και CIN [130].

3.8.6 Ασύμμετρη διμεθυλαργινίνη (Asymmetric Dimethylarginine, ADMA)

Η ADMA είναι ενδογενής αναστολέας όλων των συνθασών NO. Ταυτόχρονα, είναι γνωστό ότι παρεμβαίνει σε άλλες διεργασίες όπως η φλεγμονή, η αγγειοδιαστολή, η ευαισθητοποίηση στην ινσουλίνη, η αντιοξειδωτική δράση, καθώς και στη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση και τη λειτουργικότητα των πρόδρομων κυττάρων [131]. Σε ασθενείς με στηθάγχη που υποβλήθηκαν σε αγγειογραφία, βρέθηκε ότι τα επίπεδα σχετίζονται με εμφάνιση CIN, ενισχύοντας έτσι την υπόθεση ότι η ADMA είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την ανάπτυξη της CIN [132].

4. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνήσει τις νεφροπροστατευτικές ιδιότητες των φυσικών αντιοξειδωτικών Ρεσβερατρόλη (Res) και Λυκοπένιο (Lyc) σε ένα ζωικό μοντέλο CIN.

5. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Κατευθυντήριες γραμμές για την έρευνα σε ζώα

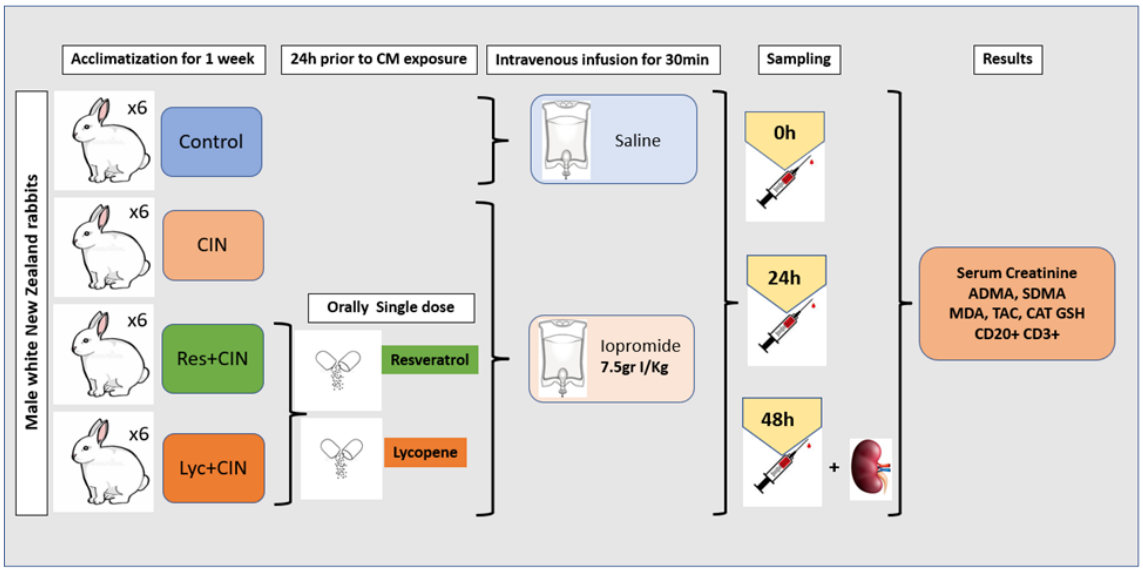
Η παρούσα μελέτη διεξάχθηκε και συμμορφώθηκε με τις National and European Union Directions/Directives/Guidelines (the American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition, DIRECTIVE 2010/63/EU, The Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) Guidelines) σχετικά με τη φροντίδα και τη θεραπεία των πειραματοζώων, ώστε να επιτευχθούν τα απαιτούμενα κριτήρια και να ελαχιστοποιηθεί η πιθανή ταλαιπωρία. Όλες οι διαδικασίες παρακολουθήθηκαν από κτηνιάτρους και βιολόγους. Όλες οι διαδικασίες ευθανασίας έγιναν έτσι ώστε να αποκλειστούν οποιεσδήποτε μη αποδεκτές μέθοδοι.

5.2 Σχεδιασμός μελέτης

Αν και η CIN μελετάται κυρίως σε μοντέλα αρουραίων, αυτό δεν είναι το ιδανικό μοντέλο, καθώς δεν μπορεί να προκληθεί σε φυσιολογικά ζώα [133]. Οι περισσότερες έρευνες προκάλεσαν προνεφρική αζωθαιμία μέσω στέρησης νερού για 16-24 ώρες ή ακόμα και με την αφαίρεση μεγάλου μέρους των νεφρών του ζώου που συνοδευόταν από 48ωρη στέρηση νερού [41, 51, 120]. Μερικοί ερευνητές χρησιμοποίησαν νεφροτοξικά φάρμακα ή συνδυασμό ουσιών που προκάλεσαν νεφροτοξικότητα [134]. Το λευκό κουνέλι της Νέας Ζηλανδίας επιλέχθηκε ως πειραματόζωο [61]. Αν και μορφολογικά το κουνέλι μοιάζει με τα τρωκτικά, τα στοιχεία αλληλουχίας πρωτεϊνών δείχνουν ότι τα κουνέλια είναι πιο στενά συνδεδεμένα με τα πρωτεύοντα από ότι με τα τρωκτικά [135], είναι γνωστό ότι η νεφρική λειτουργία τους είναι ευαίσθητη στα CM και συγκριτικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα κουνέλια είναι πιο ευαίσθητο στα CM από ότι οι αρουραίοι [136]. Τα λευκά κουνέλια της Νέας Ζηλανδίας είναι γνωστό ότι είναι πιο ευαίσθητα στη CIN και η CIN μπορεί να προκληθεί σε φυσιολογικά κουνέλια με εφάπαξ ένεση ιωδιούχων CM [137]. Για όλους αυτούς τους λόγους τα κουνέλια θεωρούνται πιο αξιόπιστο μοντέλο νεφροτοξικότητας [134].

Χρησιμοποιήθηκαν 24 λευκά αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, βάρους περίπου 3 kg. Το ζωικό μοντέλο βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες αξιολόγησης της CIN σε

κουνέλια [137, 138]. Τα ζώα στεγάζονταν σε ατομικούς μεταλλικούς κλωβούς κάτω από ένα σκοτεινό/φωτεινό κύκλο 12 ωρών και σταθερή θερμοκρασία περιβάλλοντος 20-23 °C. Εμπορική τροφή και πόσιμο νερό χορηγήθηκαν κατά βούληση και υπήρξε περίοδος εγκλιματισμού μιας εβδομάδας πριν την πειραματική διαδικασία. Τα ζώα χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες (n=6 ανά ομάδα): ομάδα control (φυσιολογικός ορός), ομάδα CIN (CM [iopromide]: Ultravist® 370, Bayer Healthcare, Berlin, Germany), ομάδα Res+CIN (Resveratrol, Solgar®, N.J, USA) και ομάδα Lyc+CIN (Tomato Lycopene, SUPERFOODS®, Greece). Η Res και το Lyc χορηγήθηκαν 24 ώρες πριν την έκθεση στο CM σε μία εφάπαξ δόση 5 mg/kg [139] και 4 mg/kg [39] αντιστοίχως από το στόμα. Πριν τη χορήγηση του CM, τα ζώα ζυγίστηκαν και αναισθητοποιήθηκαν με ενδομυϊκή χορήγηση υδροχλωρικής ξυλαζίνης (Xylapan®, Vetoquinol SA, Lure Cedex, Γαλλία) σε μία εφάπαξ δόση των 4 mg/kg και υδροχλωρικής κεταμίνης (Narketan®, Vetoquinol SA, Lure Cedex, Γαλλία) σε μία εφάπαξ δόση των 40 mg/kg. Ένας ενδοφλέβια καθετήρας τοποθετήθηκε σε φλέβα του αυτιού για τη χορήγηση του CM για μια περίοδο 30 λεπτών σε μια εφάπαξ δόση των 20,3 ml/kg (768,86 mg ιοπρομίδη/ml, 370 mg ιώδιο/ml, 7,5 g ιώδιο/kg). Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές: αμέσως μετά τη χορήγηση CM/φυσιολογικού ορού (0 ώρες), 24 ώρες και 48 ώρες μετά τη χορήγηση, και τα ζώα θυσιάστηκαν στις 48 ώρες μετά την έγχυση του CM/φυσιολογικού ορού, χρησιμοποιώντας πεντοβαρβιτάλη νατρίου (Dolethal®, Vetoquinol S. A., Lure Cedex, Γαλλία) ενδοφλέβια σε μία δόση των 5 ml/ζώο και αφαιρέθηκαν και τα δύο τους νεφρά.



Εικόνα 6. Σχεδιασμός μελέτης [140]

Twenty-four adult male New Zealand white rabbits were assigned into four equal groups: control, CIN, Res+CIN, and Lyc+CIN. Res and Lyc were administered by oral gavage, 24 h before CM exposure at a single dose. Blood samples were collected at three time points: right after CM/saline 0 h, 24 h and 48 h CM/saline administration for determining the level of sCr, SDMA/ADMA, oxidative stress and $CD20^{+}/CD3^{+}$ lymphocyte numbers. Animals were euthanized at 48h, and both their kidneys were removed for oxidative stress evaluation.

5.3 Βιοχημική ανάλυση

Το αίμα συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια χωρίς αντιπηκτικό. Ο ορός απομονώθηκε μετά από φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 4000 rpm για 10 λεπτά στους 21 °C και αποθηκεύτηκε στους -20 ^{o}C μέχρι τη βιοχημική ανάλυση. Δείγματα sCr μετρήθηκαν με χρήση αυτόματου βιοχημικού αναλυτή (Architect c4000, Abbott, Abbott Park, Illinois, USA). Ως CIN ορίστηκε η απόλυτη αύξηση ≥0,3 mg/dl sCr εντός 48 ωρών μετά την έκθεση σε CM. Οι φυσιολογικές τιμές sCr στο ενήλικο κουνέλι είναι 0,5-2,6 mg/dl.

5.4 Αξιολόγηση SDMA και ADMA

Η φασματομετρία μάζας υγρής χρωματογραφίας (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS) είναι τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό ενώσεων από δείγμα πριν την ανάλυση και συχνά συνδέεται με τη φασματομετρία μάζας. Ο διαχωρισμός βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις των ενώσεων με την κινητή και τη στατική φάση και ο βαθμός διαχωρισμού σχετίζεται με τη συγγένεια κάθε ένωσης για την κινητή φάση. Μετά τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, οι ενώσεις εκλούονται από τη στήλη, αποδιαλύονται στην αέρια φάση και ιονίζονται σε πηγή ιονισμού και στη συνέχεια εισάγονται στο φασματόμετρο μάζας για ανάλυση μάζας. Τα πρότυπα διαλύματα μεθανόλης της συμμετρικής διμεθυλαργινίνης (symmetric dimethylarginine, SDMA) και της ADMA (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις των 0, 100, 250, 500, 1000 ng/ml και τα επιμολυσμένα διαλύματα πλάσματος παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις των 0, 100, 200, 400 και 600 ng/ml. Η μέθοδος εκχύλισης έχει περιγραφεί [141] όπου 50 μl πλάσματος αναμείχθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα 60 μl (1 ml μυρμηκικού οξέος, 1 g μυρμηκικού αμμωνίου και 200 ml H_2O) και 375 μl ακετονιτριλίου. Μετά από φυγοκέντρηση στα 10.000 x rpm για 5 λεπτά, χρησιμοποιήθηκαν 20 μl υπερκείμενου. Τα επίπεδα SDMA και ADMA μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας φασματομετρία μάζας υγρής χρωματογραφίας (Shimadzu LC-MS 2010 EV) με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (electrospray ionization, ESI) σε θετική λειτουργία και φίλτρο μάζας ενός τετράπολου. Ο διαχωρισμός των ουσιών επιτεύχθηκε με χρήση στήλης LC-Si Supelco 15 cm x 4,6 mm, 3 μm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ως κινητή φάση επιλέχθηκε μια βαθμίδα νερού με 0,1% μυρμηκικό οξύ και 10 mM οξικό αμμώνιο (διαλύτης A) και μεθανόλη -ακετονιτρίλιο με 10 mM οξικό αμμώνιο 50-50 (διαλύτης B) με παροχή 0,35 ml/min. Ο χρόνος κράτησης των SDMA και ADMA ήταν 9,96 και 10,39 λεπτά αντίστοιχα. Το πλάσμα απομονώθηκε από το περιφερικό αίμα με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 λεπτά στους 4 °C και διατηρήθηκε στους −20 °C μέχρι την ανάλυση.

5.5 Οξειδωτικό στρες

Για την αξιολόγηση των δεικτών οξειδωτικού στρες, συλλέχθηκαν δείγματα αίματος 0, 24 ώρες, 48 ώρες μετά την επαγωγή CIN, σε φιαλίδια EDTA. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm για 10 λεπτά στους 4 °C, το πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα διαχωρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν σε - 80 ^{o}C μέχρι την ανάλυση. Δείγματα ιστών από τα νεφρά συλλέχθηκαν στις 48h και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ομογενοποίηση σύμφωνα με τα διαφορετικά κιτ χρωματομετρικής ανάλυσης που αγοράστηκαν για τον πειραματισμό. Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες που αναφέρθηκαν σε αυτήν τη μελέτη είναι η Μηλονοδιαλδεΰδη (Malondialdehyde, MDA) για τον προσδιορισμό της υπεροξείδωσης των λιπιδίων (Abcam, Cambridge, Ηνωμένο Βασίλειο), η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant capacity TAC) (Abcam, Cambridge, Ηνωμένο Βασίλειο), η καταλάση (Catalase, CAT) (Abcam, Cambridge, Ηνωμένο Βασίλειο) και η μειωμένη γλουταθειόνη (reduced glutathione, GSH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ΗΠΑ).

5.5.1 Καταλάση (CAT)

Η καταλάση (CAT) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που υπάρχει στα περισσότερα αερόβια κύτταρα. Εμπλέκεται στην αποτοξίνωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O), ενός τύπου ROS που είναι τοξικό προϊόν τόσο του αερόβιου μεταβολισμού όσο και της παθογόνου παραγωγής ROS. Το ένζυμο καταλύει τη μετατροπή δύο μορίων H_2O_2 σε μοριακό οξυγόνο και δύο μορίων νερού (καταλυτική δραστηριότητα), όπως φαίνεται στην ακόλουθη εξίσωση:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O$$

Η CAT παρουσιάζει επίσης υπεροξειδωτική δραστηριότητα, στην οποία το χαμηλό μοριακό βάρος μπορεί να χρησιμεύσει ως δότης ηλεκτρονίων. Ενώ οι αλειφατικές αλκοόλες χρησιμεύουν ως ειδικά υποστρώματα για την CAT, άλλα ένζυμα με υπεροξειδωτική δράση δεν χρησιμοποιούν αυτά τα υποστρώματα.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα CAT (Catalase assay Buffer): Έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.
2. Διάλυμα θετικού ελέγχου CAT (Catalase Positive Control): Αραιώθηκε σε 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού της CAT και αναμίχθηκε καλά.
3. H_2O_2 πρότυπο διάλυμα (H_2O_2 Standard solution): Έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.
4. HRP: Ανασυστάθηκε σε 220 μL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού Καταλάσης και αναμιγνύεται καλά.
5. OxiRed Probe (σε DMSO): Έτοιμο για χρήση ως παρέχεται.
6. Διάλυμα τερματισμού (Stop solution): Έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.

Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Standard	H_2O_2 Standard (μL)	Assay Buffer (μL)	Final volume standard in well (μL)	End amount H_2O_2 in well (nmol/well)
1	0	270	90	0
2	6	264	90	2
3	12	258	90	4
4	18	252	90	6
5	24	246	90	8
6	30	240	90	10

Προετοιμασία του δείγματος

Τα δείγματα πλάσματος αναλύθηκαν κατευθείαν με την προσθήκη τους στα πηγάδια των μικροπλακών, ενώ τα δείγματα ιστών ξεπλύθηκαν με κρύο PBS, και στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος (Assay buffer). Ακολούθησε η ομογενοποίηση των ιστών με ομογενοποιητή Dounce και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά σε 10.000xg χρησιμοποιώντας μια κρύα φυγόκεντρο και το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε.

Ανάλυση

Τα δείγματα (78 μl), τα πρότυπα (90 μl) και ο θετικός έλεγχος (78 μl) προστέθηκαν στις κοιλότητες της μικροπλάκας, 12 μl φρέσκου διαλύματος H_2O_2 προστέθηκαν σε κάθε πηγάδι και ακολουθήθηκε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, 10 μl του stop διαλύματος προστέθηκε σε κάθε πηγάδι, τελικά, 50 μl του Developer mix διαλύματος (ρυθμιστικό διάλυμα Catalase 46 μl, OxiRed Probe 2 μl και διάλυμα HPR 2 μl) προστέθηκε σε κάθε πηγάδι, και τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά προστατεύοντας τα από το φως. Η μικροπλάκα μετρήθηκε αμέσως στα 570nm OD με φωτόμετρο.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα CAT (mmol/min/ml) = B (nmol) * D /30 (min) * V (ml)

Όπου B= ποσότητα H_2O_2 στο δείγμα καλά υπολογισμένη από την τυποποιημένη καμπύλη, 30min= χρόνος αντίδρασης Καταλάσης, V= όγκος αρχικού δείγματος σε κάθε κοιλότητα και D= συντελεστής αραίωσης δείγματος.

1 Unit Catalase activity = ποσότητα Καταλάσης που θα αποσυνθέσει 1,0 μmol H_2O_2 ανά λεπτό σε pH 4,5 στους 25°C.

5.5.2 Μηλονοδιαλδεΰδη (MDA)

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα να σχηματιστούν πολύ αντιδραστικά και ασταθή υδροϋπεροξείδια λιπιδίων. Η Μηλονοδιαλδεΰδη (MDA) είναι το τελικό προϊόν της υπεροξείδωσης των λιπιδίων των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της μεμβράνης από τις ελεύθερες ρίζες και αποτελεί δείκτη οξειδωτικής βλάβης. Η χορήγηση CM οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων MDA του νεφρικού ιστού και του ορού σε πειραματικά μοντέλα CIN [142].

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης MDA (MDA Lysis Buffer): Έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.
2. Διάλυμα φωσφοβολφραμικού οξέος: Έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.
3. BHT (100X): Έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.

4. Διάλυμα TBA: Ανασυστάθηκε το φιαλίδιο TBA (250 mg) σε 7,5 mL παγωμένου Οξικού Οξέος. Ο τελικός όγκος προσαρμόστηκε στα 25 mL με ddH_2O.
5. Πρότυπο διάλυμα MDA (MDA Standard) (4,17 μ.): έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.

Τα πρότυπα καταρτίστηκαν σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Standard	Volume of MDA Standard (μL)	Volume ddH20 (μL)	Final volume standard in well (μL)	Amount of MDA standard in well (nmol/well)
1	0	600	200	0
2	6	594	200	4
3	12	588	200	8
4	18	582	200	12
5	24	576	200	16
6	30	570	200	20

Προετοιμασία του δείγματος

Δείγματα πλάσματος αναμίχθηκαν ελαφρά με 500 μL των 42 mM H_2SO_4 σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης. 125 μL διαλύματος φωσφοβολφραμικού οξέος προστέθηκαν και αναμίχθηκαν με τη μέθοδο vortexing. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 13.000 x 1 g για 3 λεπτά. Τέλος, το σφαιρίδιο που συλλέχθηκε και επαναδιαλύθηκε στον πάγο με 100 μL ddH_2O (με 2 μL BHT (100X)). Τα δείγματα ιστών ξεπλύθηκαν με κρύο PBS και ομογενοποιήθηκαν σε διάλυμα λύσης 303 μL (Buffer + BHT) με ομογενοποιητή Dounce που κάθεται σε πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 13.000 x g για 10 λεπτά για να απομακρυνθεί αδιάλυτο υλικό και συλλέχθηκε υπερκείμενο υγρό.

Ανάλυση

600 μL αντιδραστηρίου TBA προστέθηκαν σε κάθε δείγμα/πρότυπο και επωάστηκαν στους 95°C για 60 λεπτά. 200μL του υπερκείμενου υλικού συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε στη μικροπλάκα για μέτρηση της απορρόφησης με φωτόμετρο σε μήκος κύματος OD 532nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση MDA στα δείγματα δοκιμής υπολογίζεται ως εξής:

$MDA\ Concentration$ = (□/□□ $or\ m$l) * 4 * □ = □□□□/□□ $or\ nmol/$mg

Όπου: A = Ποσότητα MDA στο δείγμα που υπολογίζεται από την πρότυπη καμπύλη (nmol). mg = Χρησιμοποιούμενη αρχική ποσότητα ιστού. mL = Χρησιμοποιούμενος αρχικός όγκος πλάσματος (0,020 mL). 4 = Διόρθωση για τη χρήση 200 μL του μείγματος αντίδρασης 800 μL. D = Συντελεστής αραίωσης δείγματος, αν το δείγμα αραιώνεται για να χωρέσει εντός του τυποποιημένου εύρους καμπυλών.

5.5.3 Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Ο όρος Συνολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Είναι ένας δείκτης της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός ιστού.

Τα αντιοξειδωτικά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη του σχηματισμού και απομάκρυνσης των ελεύθερων ριζών και άλλων οξειδωτικών ειδών. Υπάρχουν τρεις κατηγορίες αντιοξειδωτικών ειδών: ενζυμικά συστήματα (GSH αναγωγάση, καταλάση, υπεροξειδάση, κλπ.), μικρά μόρια (ασκορβικό, ουρικό οξύ, GSH, βιταμίνη E, κλπ.) και πρωτεΐνες (λευκωματίνη, τρανσφερίνη, κλπ.). Τα διαφορετικά αντιοξειδωτικά ποικίλουν ως προς τη δύναμη αναγωγής τους, και η συνεργασία όλων των διαφορετικών αντιοξειδωτικών παρέχει μεγαλύτερη προστασία από τις ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου και του αζώτου από οποιαδήποτε μεμονωμένο παράγοντα μόνο του. Συνεπώς, η TAC μπορεί να δώσει πιο σημαντικές βιολογικές πληροφορίες σε σύγκριση με εκείνες που προκύπτουν από τη μέτρηση των επιμέρους συστατικών, καθώς λαμβάνει υπόψη τη σωρευτική επίδραση των αντιοξειδωτικών που υπάρχουν.

Το Trolox χρησιμοποιείται για την προτυποποίηση των αντιοξειδωτικών, με όλα τα άλλα αντιοξειδωτικά να μετρώνται με ισοδύναμα του Trolox. Η μέτρηση της συνδυασμένης μη ενζυματικής αντιοξειδωτικής ικανότητας βιολογικών υγρών και άλλων δειγμάτων παρέχει μια ένδειξη της συνολικής ικανότητας εξουδετέρωσης των ROS, της αντίστασης στην οξειδωτική βλάβη και της καταπολέμησης ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Διαλύτης (Assay Diluent): Έτοιμο για χρήση όπως διατίθεται.
2. Αντιδραστήριο Cu2+: έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.
3. Πρωτεΐνη Mask: Έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.
4. Πρότυπο διάλυμα Trolox (Trolox Standard): Διαλύθηκε σε 20 μL καθαρού DMSO με vortexing. Στη συνέχεια προστέθηκαν και αναμίχθηκαν 980 μL fdH_2O για να παραχθεί ένα πρότυπο διάλυμα Trolox 1 mM.

Τα πρότυπα καταρτίστηκαν σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Standard	Trolox Standard (μL)	ddH_2O (μL)	Final volume standard in well (μL)	End amount Trolox in well (nmol/well)
1	0	300	100	0
2	12	288	100	4
3	24	276	100	8
4	36	264	100	12
5	48	252	100	16
6	60	240	100	20

Προετοιμασία του δείγματος

Τα δείγματα πλάσματος αναλύθηκαν κατευθείαν με την προσθήκη δειγμάτων στις πηγάδια μικροπλακών, ενώ τα δείγματα ιστών ξεπλύθηκαν με κρύο PBS, και στη συνέχεια επαναδιαλύθηκαν σε 500 μL παγωμένου PBS. Ακολούθησε ομογενοποίηση, με ομογενοποιητή Dounce και επώαση σε πάγο για 10 λεπτά. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκαν για 2 - 5 λεπτά στους 4°C με την κορυφαία ταχύτητα σε μια κρύα φυγόκεντρο για να αφαιρέσει οποιοδήποτε αδιάλυτο υλικό και το υπερκείμενο υλικό συλλέχθηκε.

Ανάλυση

Τόσο τα δείγματα πλάσματος και νεφρικού ιστού όσο και τα πρότυπα μεταφέρθηκαν στα πηγάδια μικροπλακών, 100 μL διαλύματος Cu^{2+} προστέθηκαν στις κοιλότητες

και επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 90 λεπτά σε ένα τροχιακό αναδευτήρα προστατευμένο από το φως. Τέλος, η μικροπλάκα μετρήθηκε στα 570nm OD με φωτόμετρο.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση Trolox (nmol/μL ή mM) στα δείγματα δοκιμής υπολογίζεται ως εξής:

$Sample\ Total\ Antioxidant\ Capacity = (Ts/Sv) * D$

Όπου: T = Ποσότητα TAC στο δείγμα καλά υπολογισμένη από την τυπική καμπύλη (nmol). Sv = όγκος δείγματος που προστίθεται στις κοιλότητες δείγματος (μL). D = συντελεστής αραίωσης του δείγματος.

5.5.4 Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη (GSH), ένα τριπεπτίδιο που περιέχει θειόλες (γ-γλουταμυλο-κυστεϊνυλο-γλυκίνη), είναι ένα βασικό αντιοξειδωτικό σε πολλά είδη. Έχει εμπλακεί ιδιαίτερα στην αποτοξίνωση/εξάλειψη των ξενοβιοτικών (φυσικά εμφανιζόμενων επιβλαβών ενώσεων όπως οι ελεύθερες ρίζες, τα υδροϋπεροξείδια κλπ.) και στη διατήρηση της κατάστασης οξείδωσης των πρωτεϊνικών σουλφυδρυλίων. Επιπλέον, η GSH διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση πολυάριθμων ανθρώπινων ασθενειών, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και των καρδιαγγειακών παθήσεων. Η GSH είναι παρούσα στα κύτταρα και στις δύο μορφές ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης (GSSG), η GSH είναι, το κύριο είδος υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες μέσα στα κύτταρα. Έτσι, οι παθολογικές καταστάσεις που προκαλούν οξειδωτικό στρες θα είχαν ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα GSSG. Ως εκ τούτου, η μέτρηση της ενδοκυτταρικής GSH φαίνεται να είναι ένας ευαίσθητος δείκτης της συνολικής κυτταρικής υγείας και της ικανότητας των κυττάρων να ανθίστανται στις τοξικές προκλήσεις.

Η ανάλυση μειωμένης GSH βασίζεται σε μια κυκλική ενζυματική μέθοδο παρουσία GSH και χρωμοφόρου. Η αναγωγή του χρωμοφόρου παράγει ένα σταθερό προϊόν, το οποίο μπορεί να ακολουθηθεί κινητικά στα A450 nm. Ως εκ τούτου, η απορρόφησή του είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα GSH στο δείγμα.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα GSH (GSH Assay Buffer): Έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.
2. Μίγμα υποστρώματος A, Μείγμα ενζύμων A και Μείγμα ενζύμων B: Έτοιμο για χρήση όπως παρέχεται.
3. Μίγμα υποστρώματος B: Ανασυστάθηκε σε 220 μL ρυθμιστικού διαλύματος GSH και αναμίχθηκε καλά.
4. Μείγμα ενζύμων C: Διαλυμένο σε 220 μL ρυθμιστικού διαλύματος GSH.
5. Σουλφοσαλικυλικό οξύ (SSA, 1 γραμμάριο): 19 mL υπερυδατικού διαλύματος προστίθενται για να κάνουν ένα διάλυμα 5%.
6. Πρότυπο διάλυμα GSH (GSH Standard): Ανασυστάθηκε με 65 μL υπερυδατικού διαλύματος για την παραγωγή διαλύματος 50 nmol/μL GSH Standard.

Τα πρότυπα καταρτίστηκαν σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

Well	0.2 nmol/μL Premix	GSH Assay Buffer	GSH (nmol/well)
1	0 μM	20 μM	0
2	2 μM	18 μM	0,4
3	4 μM	16 μM	0,8
4	6 μM	14 μM	1,2
5	8 μM	12 μM	1,6
6	10 μM	10 μM	2

Προετοιμασία του δείγματος

Δείγματα νεφρικού ιστού και κύτταρα από σφαιρίδια αίματος ομογενοποιήθηκαν με 100 μL διαλύματος SSA 5% και διατηρήθηκαν σε πάγο για 10 λεπτά. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 12.000 ×g στους 4°C για 20 λεπτά και συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό.

Διαδικασία προσδιορισμού

Τα δείγματα και το control του δείγματος, φορτώθηκαν στην ποσότητα των 10 μL στα πηγάδια της μικροπλάκας και ο όγκος ρυθμίστηκε σε 20 μL ρυθμιστικού

διαλύματος GSH. Το δείγμα μείγματος αντίδρασης παρασκευάστηκε με τη χρήση του Υποστρώματος Mix A 10 μL, του Αραιωμένου Ενζύμου Mix A 10 μL, του Ενζύμου Mix B 1 μL, του Ενζύμου Mix C 2 μL, του Υποστρώματος Mix B 2 μL και του Ρυθμιστικού Διαλύματος Προσδιορισμού GSH 55 μL για κάθε δείγμα και 80μL αυτού του μείγματος αντίδρασης προστέθηκαν στα πηγάδια των μικροπλακών. Τέλος, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm (A450) σε κινητική λειτουργία σε θερμοκρασία δωματίου για 40-60 λεπτά. Επιλέχθηκαν δύο χρονικά σημεία (t1 και t2) στο γραμμικό εύρος της παρατήρησης και ελήφθησαν οι αντίστοιχες τιμές απορρόφησης [A450(1) και A450(2)].

Υπολογισμός

Ποσότητα GSH στο δείγμα (nmol/mg) = B * D/ (V * P)

Όπου: B = GSH από την πρότυπη καμπύλη (nmol), V = όγκος δείγματος που προστίθεται σε καλά αντίδραση (mL), P = συγκέντρωση δείγματος σε mg πρωτεΐνης/mL, D= συντελεστής αραίωσης δείγματος.

5.6 Αξιολόγηση των B και T λεμφοκυττάρων

Τα δείγματα αίματος, 48 ώρες μετά την έκθεση στο CM, ξηράθηκαν στον αέρα πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες και εφαρμόστηκε η ανοσοκυτταροχημική μέθοδος της ανοσοϋπεροξειδάσης. Μονοκλωνικά αντισώματα ποντικού κατά του ανθρώπου και πολυκλωνικά αντισώματα κουνελιών κατά του ανθρώπου (Dako, Glostrup, Hovedstaden, Δανία) χρησιμοποιήθηκαν έναντι των υποδοχέων CD20 και CD3 σε B-λεμφοκύτταρα και T-λεμφοκύτταρα, αντίστοιχα. Τα αντισώματα σημαδεύτηκαν από την αντίδραση της ανοσοϋπεροξειδάσης με το χρωμογόνο DAB (Dako, Glostrup, Hovedstaden, Δανία). Ο αριθμός των $CD20^+$ και $CD3^+$ λεμφοκυττάρων ορίστηκε κάτω από οπτικό μικροσκόπιο με μεγέθυνση 400x (Nikon eclipse E 400) σε 100 τυχαία οπτικά πεδία.

5.7 Touch preparation ανάλυση (TPT)

Η κυτταρολογική εξέταση των ιστών διενεργήθηκε με τη χρήση της τεχνικής touch preparation (touch preparation technique, TPT). Η τεχνική αυτή είναι μια μέθοδος προετοιμασίας ιστού κατά την οποία ένας φρέσκος ιστός θα αποτυπώσει τα κύτταρα σε μια γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα. Εκτελείται συνήθως σε βιοψίες κατά τη διάρκεια ταχείας επιτόπιας αξιολόγησης, ώστε να επιβεβαιωθεί η επάρκειά τους και να γίνει κατάλληλη διαλογή δειγμάτων. Τα φρέσκα όργανα, λοιπόν, τεμαχίστηκαν και αποτυπώθηκαν σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Τα δείγματα μονιμοποιηθήκαν μέσω αλκοόλης, χρωματίστηκαν με επίχρισμα Pap και παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 20x [143].

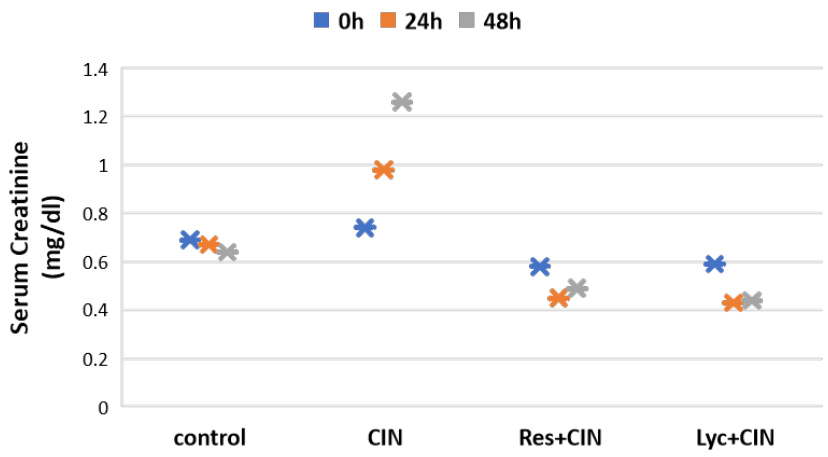
5.8 Στατιστική ανάλυση

Το μέγεθος του δείγματος υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό G Power 3.1.9 (επίπεδο σημαντικότητας: 0.05, ισχύς: 0.80, ανάλυση διακύμανσης (ANOVA)). Οι μεταβλητές ενδιαφέροντος (βιοδείκτες νεφρικής δυσλειτουργίας, συνεχείς) ελέγχθηκαν για κανονικότητα διασπορών με χρήση της δοκιμασίας Shapiro-Wilk W. Στη συνέχεια συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων με χρήση ανάλυσης της διακύμανσης (ANOVA) διπλής κατεύθυνσης ή Kruskal Wallis U test κατά περίπτωση. Συγκρίσεις με την πάροδο του χρόνου (χρονικά σημεία: 0h, 24h και 48h) πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων ANOVA ή της μη παραμετρικής δοκιμής του Friedman, ανάλογα. Οι περιγραφικές στατιστικές για όλους τους δείκτες παρουσιάστηκαν ως μέση τιμή (τυπική απόκλιση) ανεξάρτητα από την κατανομή των μεταβλητών για λόγους ομοιομορφίας. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα R: The R Project for Statistical Computing and Graphics, για τα Windows, R Version 4.0.4 (2021-02-15). $p < 0,05$ θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Βιοχημική ανάλυση

Τα βιοχημικά αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα ζώα στην ομάδα CIN παρουσίασαν αύξηση >0,5mg/dl (25%) της sCr 48 ώρες μετά τη χορήγηση του CM, επομένως η εγκυρότητα του μοντέλου CIN επιβεβαιώνεται σε αυτήν τη μελέτη. Ο μέσος όρος της sCr στην ομάδα CIN αυξήθηκε σημαντικά στις 24ώρες φτάνοντας στο μέγιστο επίπεδο έκθεσης στις 48 ώρες μετά τη χορήγηση. Αντίθετα και στις δύο ομάδες Res +CIN και Lyc+CIN υπήρξε μικρή μείωση στη μέση τιμή της sCr 24 και 48 ώρες μετά την έκθεση σε σύγκριση με το χρονικό σημείο 0 ώρες. Δεν ανιχνεύτηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων κατά το χρονικό σημείο 0, με το εύρος τιμών κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα (ομάδα control). Τέλος, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας CIN και των δύο ομάδων θεραπείας παρατηρήθηκε στις 24 ώρες και 48 ώρες μετά την πρόκληση της CIN. Τα αποτελέσματα της βιοχημικής ανάλυσης συνοψίζονται στον Πίνακα 1.



Εικόνα 7. Διακύμανση επιπέδων κρεατινίνης ορού.

Serum Creatinine (mg/dl)						
Time points	**0h**		**24h**		**48h**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	0.69	0.29	0.67*	0.26	0.64*	0.21
CIN	0.74	0.17	0.98	0.13	1.26	0.58
Res+CIN	0.58	0.16	0.45*	0.16	0.49*	0.18
Lyc+CIN	0.59	0.25	0.43*	0.13	0.44*	0.09
p-value	0.690		0.032		0.008	

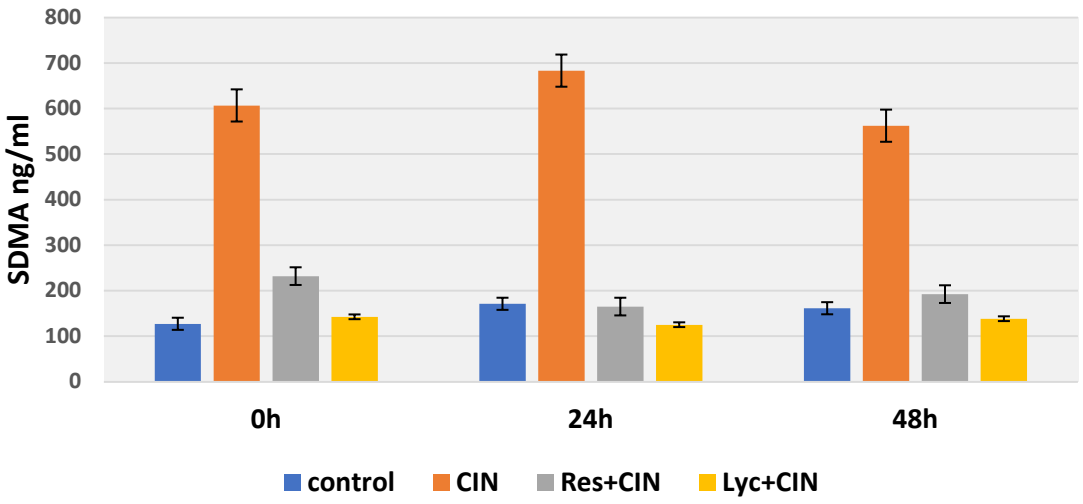
*Πίνακας 1. Ανάλυση επιπέδων κρεατινίνης ορού. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*

6.2 Αξιολόγηση SDMA και ADMA

Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων SDMA/ADMA στην ομάδα CIN σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες σε όλα τα χρονικά σημεία. Το μέγιστο της αύξησης παρατηρήθηκε στις 24 ώρες για τη SDMA και στις 0 ώρες για την ADMA, ενώ και οι δύο μειώθηκαν ελαφρά στις 48 ώρες. Τα επίπεδα SDMA/ADMA στις ομάδες Res+ CIN και Lyc+CIN κυμάνθηκε με την πάροδο του χρόνου σε χαμηλά επίπεδα χωρίς σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως, η μέση διαφορά και των δύο ομάδων θεραπείας σε σύγκριση με την ομάδα CIN ήταν στατιστικά σημαντική και παρέμεινε σταθερή με την πάροδο του χρόνου. Τέλος, τα επίπεδα SDMA/ADMA στην ομάδα Lyc+CIN ήταν ελαφρώς χαμηλότερα σε κάθε χρονική στιγμή σε σύγκριση με την ομάδα Res+CIN αλλά χωρίς σημαντική διαφορά. Τα αποτελέσματα των επιπέδων SDMA/ADMA συνοψίζονται στους πίνακες 2 και 3.

SDMA (ng/ml)						
Time points	**0h**		**24h**		**48h**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	127.2*	63.48	171.12*	106.29	161.38*	78.42
CIN	606.75	494.72	683.2	568.35	562.27	471.53
Res+CIN	231.89*	78.43	165.02*	86.81	192.35*	141.12
Lyc+CIN	142.54*	16.56	125.21*	68.77	138.36*	77.28
p-value	0.012		0.009		0.021	

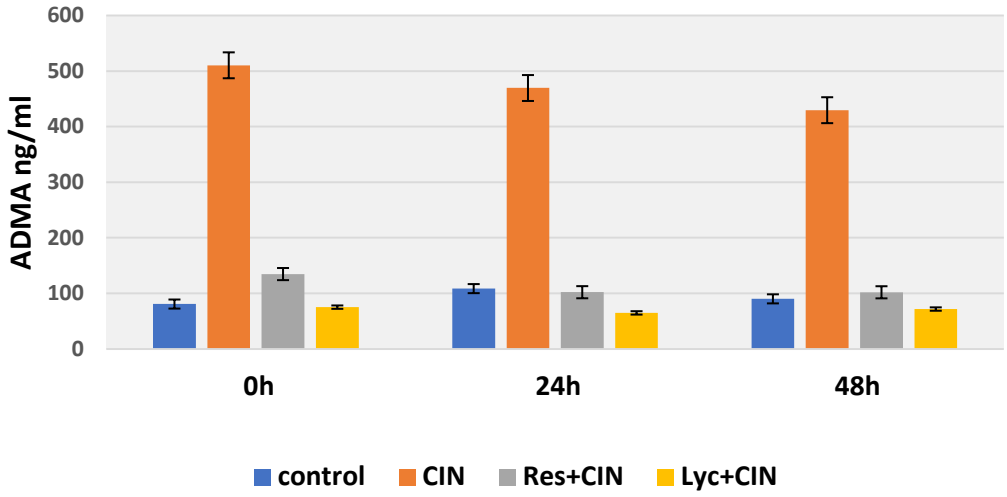
*Πίνακας 2. Ανάλυση επιπέδων συμμετρικής διμεθυλαργινίνης στο αίμα. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*



Εικόνα 8. Διακύμανση επιπέδων συμμετρικής διμεθυλαργινίνης στο αίμα. * Η μέση διαφορά είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05.

ADMA (ng/ml)						
Time points	**0h**		**24h**		**48h**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	80.78*	85.86	108.55*	92.38	90.14*	58.74
CIN	510.37	431.31	469.51	351.27	429.6	385.70
Res+CIN	134.72*	104.84	102.08*	87.37	101.93*	96.91
Lyc+CIN	75.21*	51.94	64.87*	66.30	71.78*	67.83
p-value	0.005		0.002		0.013	

*Πίνακας 3. Ανάλυση επιπέδων ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης στο αίμα. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*



Εικόνα 9. Διακύμανση επιπέδων ασύμμετρης διμεθυλαργινίνης στο αίμα. * Η μέση διαφορά είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05.

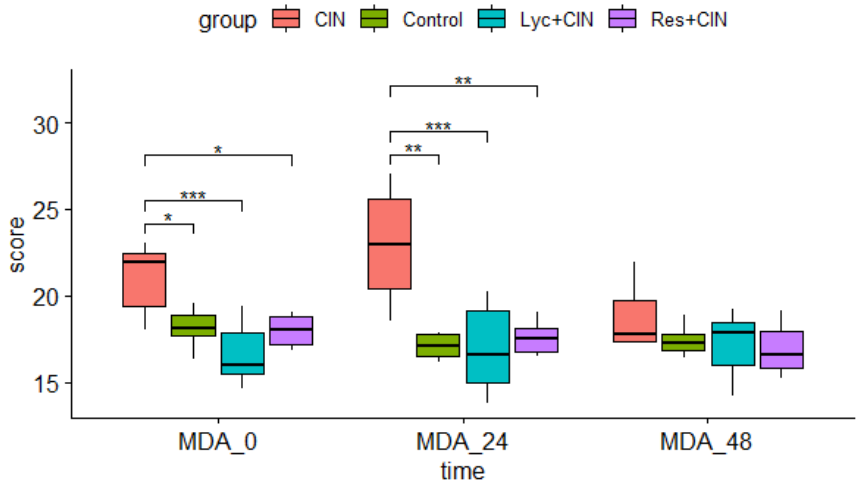
6.3 Οξειδωτικό στρες

6.3.1 MDA

Τα επίπεδα του MDA στο πλάσμα αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα CIN σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες στις 0 και 24 ώρες, υποδεικνύοντας υπεροξείδωση των λιπιδίων, ενώ παρατηρήθηκε μείωση στις 48 ώρες, όπου τα επίπεδα ήταν παρόμοια με την ομάδα ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στα επίπεδα MDA στις ομάδες Res+CIN και Lyc+CIN σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε όλα τα χρονικά σημεία. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων Res+ CIN και Lyc+CIN σε όλα τα χρονικά σημεία, αν και η ομάδα που έλαβε Lyc είχε μη σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα στις 0 και 24 ώρες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα Res+CIN. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

MDA (nmol/ml)						
Time points	**0h**		**24h**		**48h**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	18.146*	1.174	17.094*	0.764	17.424	0.885
CIN	21.029	2.158	22.923	3.421	18.719	1.935
Res+CIN	18.008*	0.953	17.564*	0.989	16.933	1.531
Lyc+CIN	16.619*	1.848	16.917*	2.648	17.192	1.952
p-value	0.003		0.001		0.8	

*Πίνακας 4. Ανάλυση επιπέδων μαλονδιαλδεΰδης στο αίμα. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*

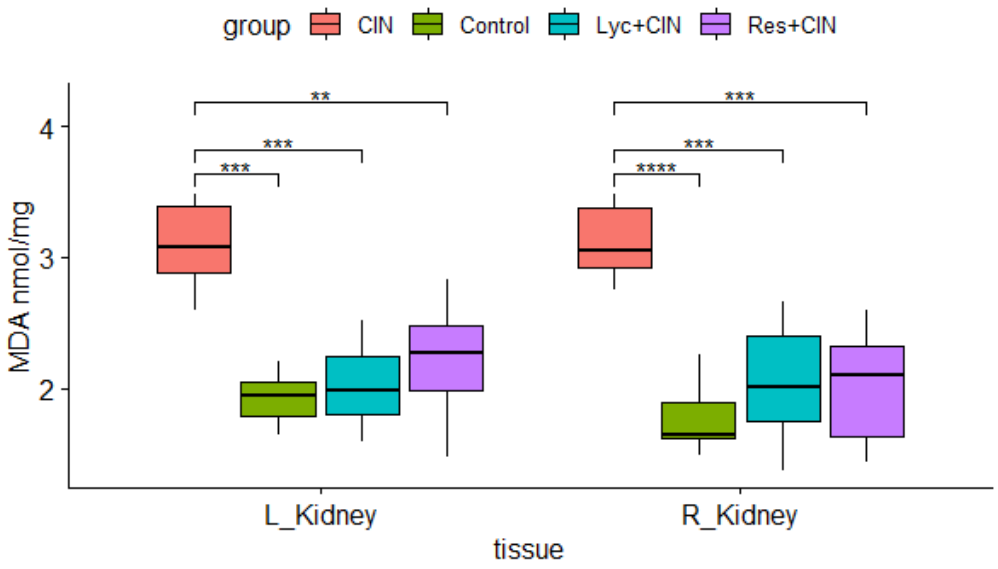


*Εικόνα 10. Διακύμανση επιπέδων μαλονδιαλδεΰδης στο αίμα. * Η μέση διαφορά είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05.*

Τα επίπεδα MDA και στους δύο νεφρούς (δεξιά και αριστερά) στις 48 ώρες, έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην ομάδα CIN σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τις δύο ομάδες θεραπείας. Αντίθετα, οι τιμές MDA στις ομάδες Res+CIN και Lyc +CIN παρουσίασαν μη στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων θεραπείας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

MDA nmol/mg	**Right Kidney**		**Left Kidney**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	1.768*	0.287	1.925*	0.208
CIN	3.114	0.299	3.091	0.357
Res+CIN	2.014*	0.465	2.211*	0.476
Lyc+CIN	2.041*	0.484	2.025*	0.346
p-value	0.000		0.000	

*Πίνακας 5. Ανάλυση επιπέδων μαλονδιαλδεΰδης στους νεφρούς. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*



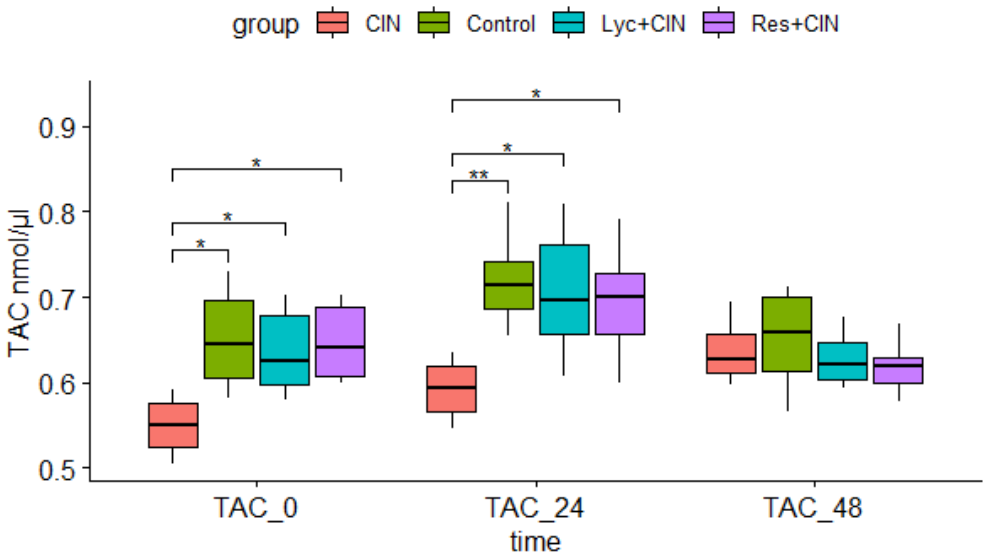
*Εικόνα 11. Διακύμανση επιπέδων μαλονδιαλδεΰδης στους νεφρούς. * Η μέση διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0,05.*

6.3.2 TAC

Η TAC στο πλάσμα της ομάδας CIN, στις 0 και 24 ώρες εμφάνισε σημαντική μείωση σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τις δύο ομάδες θεραπείας. Η μείωση εξαλείφθηκε στις 48 ώρες, όπου οι τιμές TAC φαίνεται να είναι παρόμοιες σε όλες τις πειραματικές ομάδες. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων Res+CIN και Lyc+CIN σε όλα τα χρονικά σημεία και τα επίπεδα TAC παρέμειναν κοντά στα φυσιολογικά επίπεδα σε όλα τα χρονικά σημεία σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

TAC (nmol/μl)						
Time points	**0h**		**24h**		**48h**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	0.651*	0.060	0.720*	0.054	0.651	0.059
CIN	0.550	0.034	0.592	0.035	0.637	0.036
Res+CIN	0.647*	0.046	0.695*	0.067	0.618	0.031
Lyc+CIN	0.636*	0.051	0.706*	0.077	0.627	0.033
p-value	0.015		0.018		0.564	

*Πίνακας 6. Ανάλυση συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*

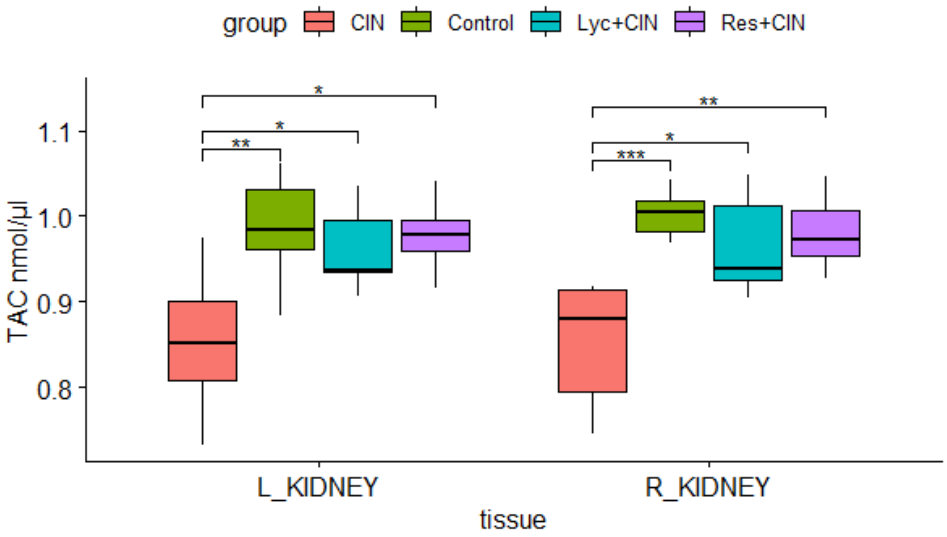


*Εικόνα 12. Διακύμανση συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος. * Η μέση διαφορά είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05.*

Τα επίπεδα της TAC στους νεφρούς μειώθηκαν στην ομάδα CIN σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τις ομάδες θεραπείας, με τη διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική, ενώ στις ομάδες Res+CIN και Lyc+CIN, αν και ήταν ελαφρώς μειωμένες σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές και στους δύο νεφρούς. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

TAC nmol/μl	Right Kidney		Left Kidney	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	1.003*	0.028	0.985*	0.064
CIN	0.852	0.075	0.853	0.085
Res+CIN	0.981*	0.044	0.978*	0.042
Lyc+CIN	0.964*	0.061	0.961*	0.051
p-value	0.010		0.001	

*Πίνακας 7. Ανάλυση συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στους νεφρούς. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*



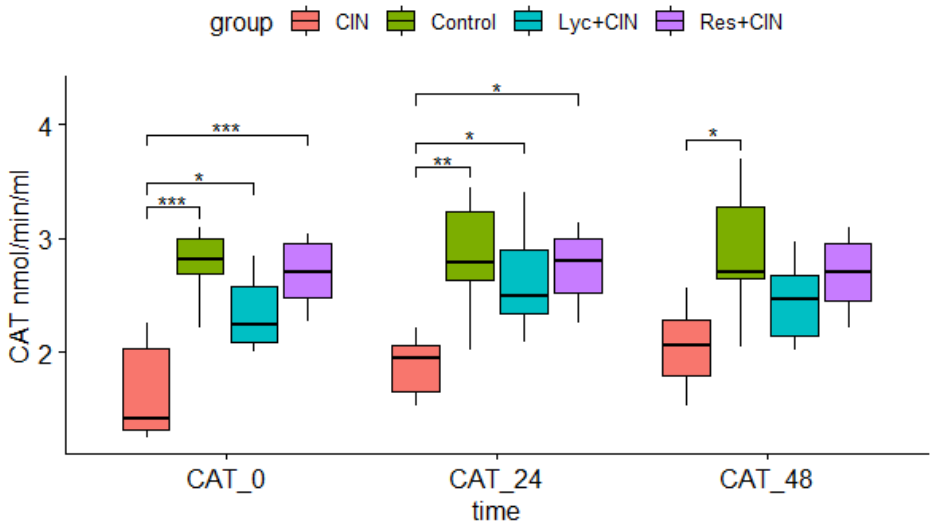
*Εικόνα 13. Διακύμανση συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στους νεφρούς. * Η μέση διαφορά είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05.*

6.3.3 CAT

Γενική μείωση δραστικότητας της CAT παρατηρήθηκε στην ομάδα CIN σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες, ενώ η μείωση τείνει να εξαλειφθεί στις 48 ώρες. Ιδιαίτερα, η διαφορά του μέσου όρου της ομάδας CIN στις 0 και 24 ώρες ήταν στατιστικά σημαντική, σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες, ενώ στις 48 ώρες η μειωμένη δραστηριότητα CAT παρέμεινε στατιστικά σημαντική μόνο με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, τα επίπεδα δραστικότητας της CAT στις αντιοξειδωτικές ομάδες κυμάνθηκαν με την πάροδο του χρόνου εντός φυσιολογικού εύρους (μη σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου), ωστόσο, η ομάδα Res+CIN εμφάνισε ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα TAC σε όλα τα χρονικά σημεία σε σύγκριση με την ομάδα Lyc+CIN αλλά χωρίς στατιστική σημαντικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

CAT (nmol/min/ml)						
Time points	**0h**		**24h**		**48h**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	2.777*	0.320	2.837*	0.525	2.874*	0.600
CIN	1.648	0.466	1.880	0.278	2.049	0.381
Res+CIN	2.693*	0.311	2.750*	0.343	2.690	0.346
Lyc+CIN	2.350*	0.346	2.635*	0.485	2.453	0.369
p-value	0.000		0.009		0.02	

*Πίνακας 8. Ανάλυση επιπέδων Καταλάσης στο αίμα. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*

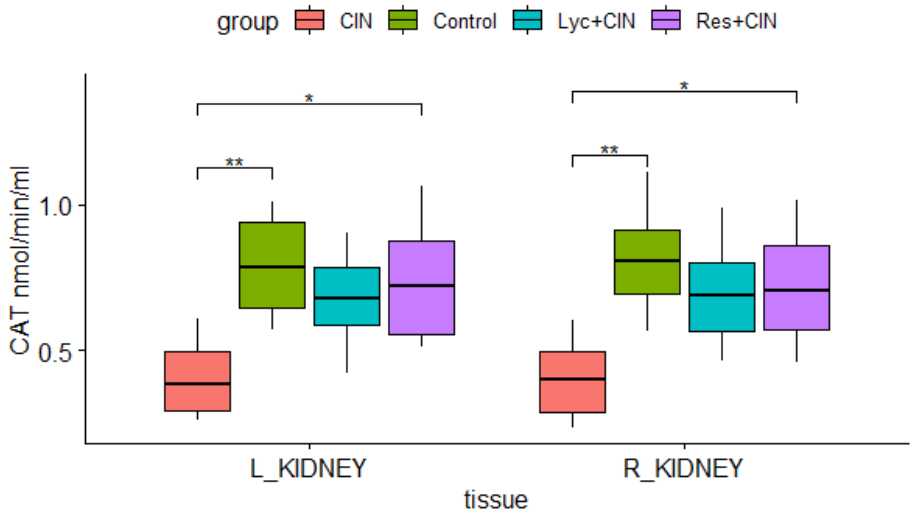


Εικόνα 14. Διακύμανση επιπέδων Καταλάσης στο αίμα. * Η μέση διαφορά είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05.

Παρομοίως, η δραστικότητα της CAT και στους δύο νεφρούς μειώθηκε στην ομάδα CIN σε σύγκριση με τις άλλες ομάδες, αλλά η μείωση ήταν στατιστικά σημαντική μόνο με την ομάδα ελέγχου και με την ομάδα που έλαβε Res και όχι με την ομάδα Lyc+CIN. Αν και η ομάδα Lyc+CIN φάνηκε να εμφανίζει χαμηλότερες μέσες τιμές και στους δύο νεφρούς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και την ομάδα που έλαβε Res, η διαφοροποίηση δεν ήταν σημαντική. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 9.

CAT nmol/min/ml	**Right Kidney**		**Left Kidney**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	0.815*	0.192	0.790*	0.184
CIN	0.403	0.144	0.407	0.137
Res+CIN	0.720*	0.213	0.740*	0.220
Lyc+CIN	0.698	0.191	0.676	0.171
p-value	0.014		0.012	

*Πίνακας 9. Ανάλυση επιπέδων Καταλάσης στους νεφρούς. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*



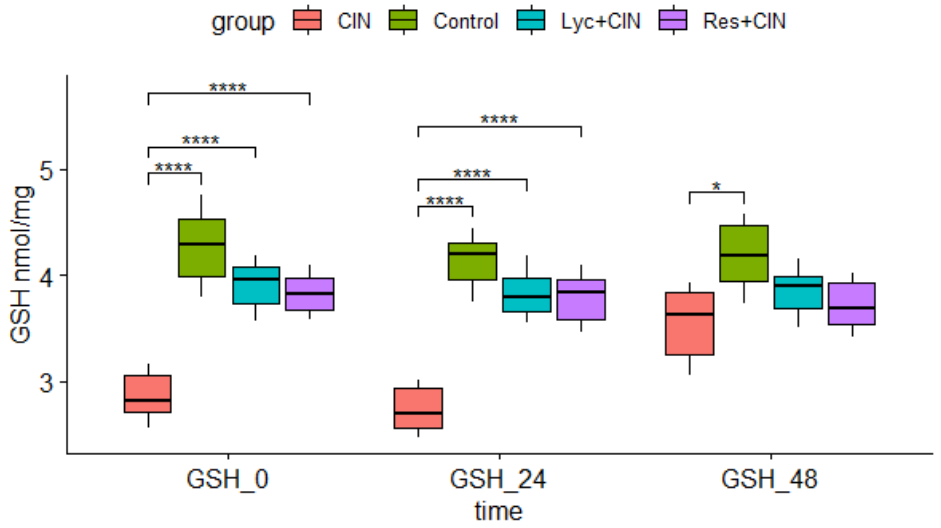
Εικόνα 15. Διακύμανση επιπέδων Καταλάσης στους νεφρούς. * Η μέση διαφορά είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05.

6.3.4 GSH

Τα επίπεδα της GSH στο αίμα μειώθηκαν στην ομάδα CIN σε σύγκριση με όλες τις άλλες ομάδες που έφτασαν στο χαμηλότερο σημείο στις 24 ώρες. Η μείωση ήταν στατιστικά σημαντική συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου και τις ομάδες που έλαβαν αντιοξειδωτικά στις 0 και 24 ώρες, ενώ στις 48 ώρες σημειώθηκε ελαφρά αύξηση χωρίς να φτάσει στις κανονικές τιμές και σε αυτή την περίπτωση η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική μόνο σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Τόσο η ομάδα Res+ CIN, όσο και η ομάδα Lyc+CIN παρουσίασαν διακυμάνσεις των επιπέδων σε φυσιολογικά επίπεδα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και παρέμειναν σταθερές με την πάροδο του χρόνου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

GSH (nmol/mg)						
Time points	**0h**		**24h**		**48h**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	4.265*	0.375	4.131*	0.268	4.183*	0.340
CIN	2.859	0.241	2.734	0.230	3.547	0.366
Res+CIN	3.822*	0.202	3.787*	0.258	3.715	0.249
Lyc+CIN	3.904*	0.244	3.829*	0.238	3.851	0.239
p-value	0.000		0.000		0.000	

*Πίνακας 10. Ανάλυση επιπέδων γλουταθειόνης στο αίμα. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*

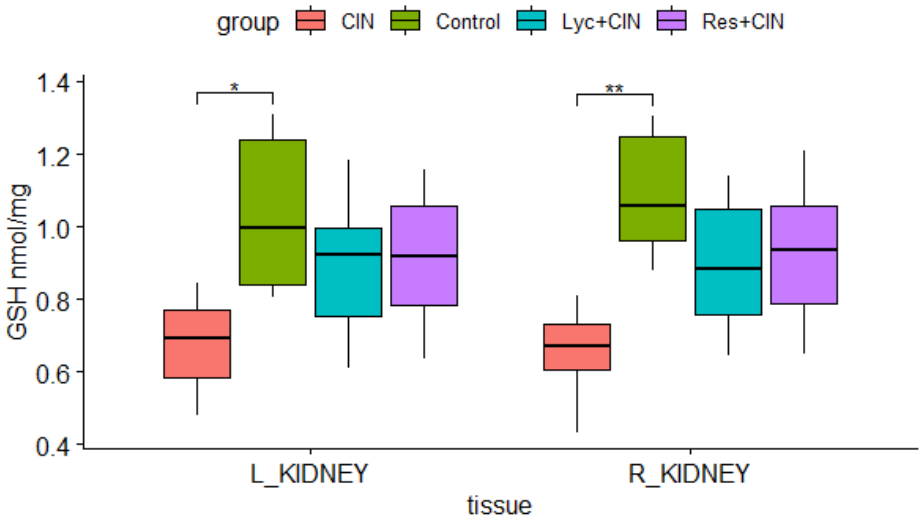


*Εικόνα 16. Διακύμανση επιπέδων γλουταθειόνης στο αίμα. * Η μέση διαφορά είναι στατιστικά σημαντική στο επίπεδο 0,05.*

Τα επίπεδα της GSH και στους δύο νεφρούς μειώθηκαν στην ομάδα CIN σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ωστόσο η μείωση δεν ήταν σημαντική σε σύγκριση με τις ομάδες που έλαβαν Res και Lyc. Επιπλέον, οι ομάδες Res+CIN και Lyc+CIN εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα GSH και στους δύο νεφρούς, χαμηλότερα σε σύγκριση με τον έλεγχο και υψηλότερα από την ομάδα CIN αλλά χωρίς καμία στατιστική σημαντικότητα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

GSH nmol/mg	Right Kidney		Left Kidney	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**
Control	1.090*	0.180	1.036*	0.229
CIN	0.653	0.131	0.675	0.138
Res+CIN	0.928	0.207	0.912	0.199
Lyc+CIN	0.896	0.196	0.893	0.208
p-value	0.004		0.034	

*Πίνακας 11. Ανάλυση επιπέδων γλουταθειόνης στους νεφρούς. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα CIN (p<0,05).*

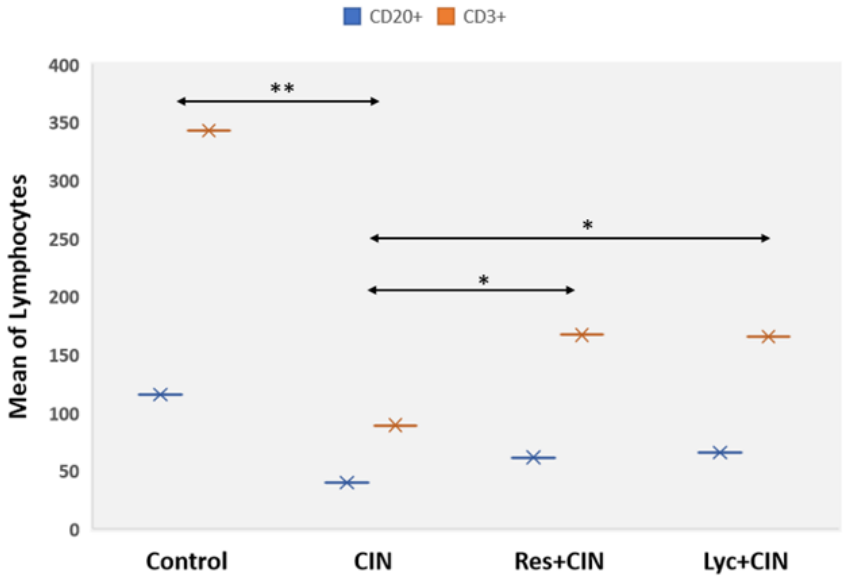


Εικόνα 17. Διακύμανση επιπέδων γλουταθειόνης στους νεφρούς. * Η μέση διαφορά είναι σημαντική στο επίπεδο 0,05.

6.4 Β και Τ λεμφοκύτταρα

Τα $CD20^+$ και $CD3^+$ λεμφοκύτταρα μειώθηκαν σημαντικά στην ομάδα CIN σε σύγκριση με όλες τις πειραματικές ομάδες. Και στις δύο ομάδες θεραπείας, Res+CIN και Lyc+CIN, ο μέσος όρος των $CD20^+$ και $CD3^+$ λεμφοκυττάρων κυμάνθηκε μεταξύ

των τιμών της ομάδας CIN και της ομάδας ελέγχου. Η παρατηρούμενη αύξηση στις ομάδες θεραπείας σε σύγκριση με την ομάδα CIN, ήταν στατιστικά σημαντική.

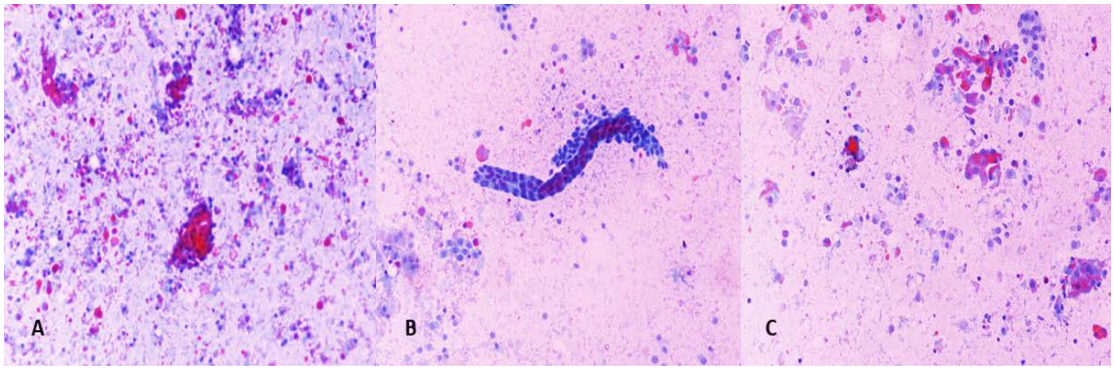


Εικόνα 18. Μέσος όρος των λεμφοκυττάρων CD20+ και CD3+

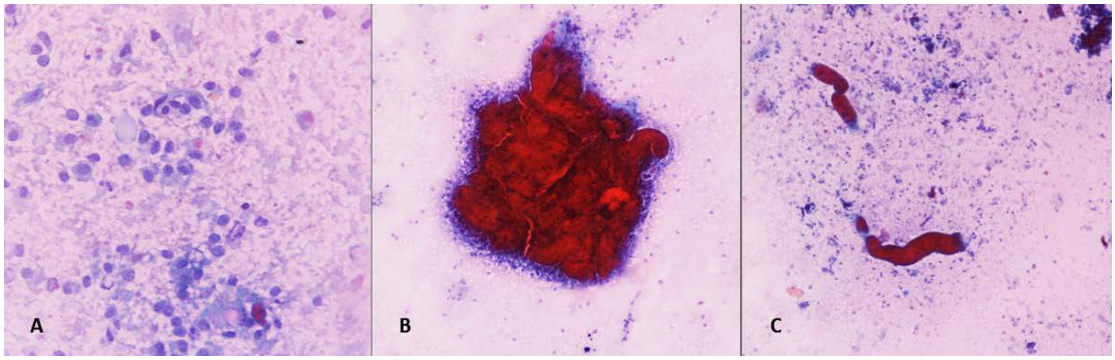
Μέσος αριθμός λεμφοκυττάρων CD20+ (Τ λεμφοκύτταρα) και CD3+ (Β λεμφοκύτταρα) σε όλες τις πειραματικές ομάδες στις 48 ώρες μετά την έκθεση σε CM. *p<0.050; **p<0.01. [140]

6.5 Νεφρική κυτταρολογική εξέταση

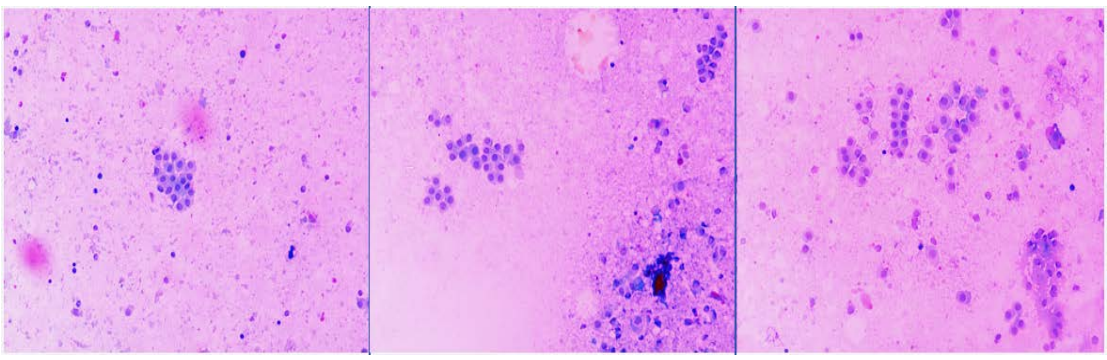
Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε φυσιολογικούς νεφρούς με φυσιολογικά ουροφόρα σωληνάρια, σπειράματα, καθώς και φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια. Αντιθέτως, η ομάδα CIN παρουσίασε έντονες εκφυλιστικές αλλοιώσεις, έντονη φλεγμονή του διάμεσου ιστού, κυτταρική εκφύλιση και μη φυσιολογικά εκμαγεία στα σωληναριακά κύτταρα καθώς και ερυθρά και στους δύο νεφρούς. Οι ομάδες Res+CIN και Lyc+CIN παρουσιάζουν ευρήματα κοντά στη φυσιολογική ιστολογία των νεφρών και λιγότερο έντονες κυτταρολογικές αλλοιώσεις σε σύγκριση με την ομάδα CIN. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις εικόνες 19-22.



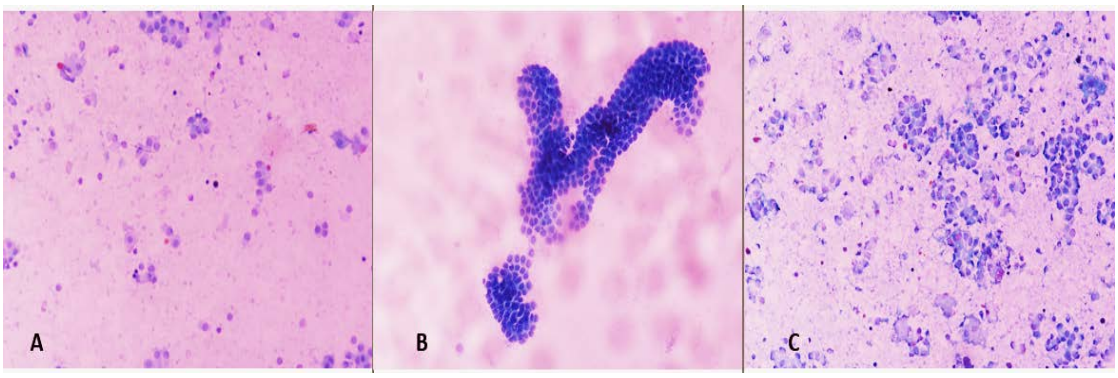
Εικόνα 19. Κυτταρολογική αξιολόγηση των νεφρών στην ομάδα Control. Α) Παρασπειραματική περιοχή δεξιού νεφρού με φυσιολογική κυτταρολογική εικόνα. Β) Φυσιολογικό ουροφόρο σωληνάριο. C) Νεφρικός μυελός δεξιού νεφρού με φυσιολογική κυτταρολογική εικόνα.



Εικόνα 20. Κυτταρολογική αξιολόγηση των νεφρών στην ομάδα CIN. Α) Νεφρικός μυελός δεξιού νεφρού με κυτταρική εκφύλιση. Β) Παρασπειραματική περιοχή δεξιού νεφρού με αποπτωτικά κύτταρα. C) Παρασπειραματική περιοχή δεξιού νεφρού με εκμαγείο ουροφόρου σωληναρίου.



Εικόνα 21. Κυτταρολογική αξιολόγηση των νεφρών στην ομάδα RES+CIN. A) Νεφρικός μυελός δεξιού νεφρού με κυτταρολογική εικόνα κοντά στο φυσιολογικό. B) Νεφρικός μυελός δεξιού νεφρού με κυτταρολογική εικόνα κοντά στο φυσιολογικό (λιγότερα εκμαγεία συγκριτικά με την ομάδα CIN). C) Παρασπειραματική περιοχή δεξιού νεφρού με κυτταρολογική εικόνα κοντά στο φυσιολογικό.



Εικόνα 22. Κυτταρολογική αξιολόγηση των νεφρών στην ομάδα LYC+CIN. A) Νεφρικός μυελός δεξιού νεφρού με κυτταρολογική εικόνα κοντά στο φυσιολογικό. B) Παρασπειραματική περιοχή δεξιού νεφρού με φυσιολογικό ουροφόρο σωληνάριο. C) Παρασπειραματική περιοχή δεξιού νεφρού με κυτταρολογική εικόνα κοντά στο φυσιολογικό.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η CIN αντιπροσωπεύει την τρίτη συχνότερη αιτία οξείας νεφρικής βλάβης (Acute kidney injury, AKI) σε νοσηλευόμενους ασθενείς, με επίπτωση από 5%-20% και σχετίζεται με σημαντική νοσηρότητα και θνησιμότητα. Το πιο τυπικό μοτίβο CIN είναι μια παροδική ασυμπτωματική αύξηση επιπέδων sCr στις 24 ώρες που φτάνουν στο μέγιστο περίπου την ημέρα 4 και στη συνέχεια επιστρέφουν στο φυσιολογικό εύρος εντός 7-10 ημερών. Ωστόσο, η παραμονή της νεφρικής δυσλειτουργίας μπορεί να παρατηρείται έως και στο 18,6% των περιπτώσεων στους 3 μήνες και σε τέτοιες περιπτώσεις, υπάρχει αυξημένος κίνδυνος θνησιμότητας [144]. Οι κύριοι ορισμοί της AKI βασίζονται στη διακύμανση των επιπέδων sCr ή στη μείωση παραγωγής ούρων. Το 2002, η ομάδα Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) πρότεινε τα κριτήρια RIFLE (risk, injury, failure, loss, end stage; κίνδυνος, βλάβη, ανεπάρκεια, απώλεια, τελικό στάδιο) [145]. Το 2007, η ομάδα Acute Kidney Injury Network (AKIN) πρότεινε μια βελτιωμένη και πιο ευαίσθητη έκδοση των κριτηρίων RIFLE προκειμένου να αντιμετωπιστούν ορισμένες ασάφειες της αρχικής αξιολόγησης [146]. Η ομάδα Acute Kidney Injury έδωσε τον ορισμό του AKI (KDIGO 2012) με στόχο την ενοποίηση των διαφόρων ορισμών AKI [4]. Δεδομένου ότι ο όρος CIN εισήχθη πριν από 50 και περισσότερα χρόνια, ο ορισμός της εναλλάσσεται σύμφωνα με τους διάφορους ορισμούς της AKI. Επομένως, δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με τον ορισμό της CIN στη βιβλιογραφία. Επί του παρόντος, ο ορισμός είναι σύμφωνος με τα κριτήρια KDIGO όπως προτείνεται από την ACR Committee on Drugs and Contrast Media (American College of Radiology Committee on Drugs and Contrast Media 2021) [147]. Σύμφωνα με αυτά η CIN προσδιορίζεται ως η απόλυτη αύξηση της sCr ≥ 0,3 mg/dl (≥ 26.5 μmol/L) μέσα σε 48 ώρες από την έκθεση στο CM [57]. Το μοντέλο CIN σε αυτήν τη μελέτη αποδείχθηκε έγκυρο καθώς τα επίπεδα sCr αυξήθηκαν >0,3 mg/dl από τα αρχικά επίπεδα στις 48 ώρες μετά από έκθεση στο CM. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ομάδων ελέγχου, CIN, Res+CIN, Lyc+ CIN αμέσως στις 0 ώρες. Τα επίπεδα sCr αυξήθηκαν σημαντικά στις 24 ώρες στην ομάδα CIN φθάνοντας στο μέγιστο στις 48 ώρες. Τα επίπεδα της sCr στις ομάδες Res+CIN και Lyc+CIN κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα συγκρίσιμα με της ομάδας ελέγχου, ενώ μειώθηκαν ελαφρά με την πάροδο του χρόνου (0 έως 48 ώρες).

Η παθοφυσιολογία της CIN είναι σύνθετη και όχι απόλυτα κατανοητή, αλλά έχουν προταθεί αρκετοί παθογενετικοί μηχανισμοί. Έχει παρατηρηθεί ότι η αδενοσίνη/ ενδοθηλίνη, η προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες αγγειοσυστολή, η μείωση της αγγειοδιαστολής από το NO και την προσταγλανδίνη συμβάλλουν στη νεφρική ισχαιμία στο βαθύτερο τμήμα του μυελού [148]. Το NO είναι ένας από τους κύριους αγγειοενεργούς μεσολαβητές που προέρχονται από το ενδοθήλιο, ο οποίος σχηματίζεται από τον πρόδρομο αμινοξύ L-αργινίνη μέσω της συνθάσης του NO (nitric oxide synthase, NOS) [149]. Οι διμεθυλαργινίνες π.χ., SDMA/ADMA, είναι αποτέλεσμα αποικοδόμησης των μεθυλιωμένων πρωτεϊνών και αποβάλλονται με νεφρική απέκκριση. Η SDMA/ADMA δρουν ως ενδογενείς ανταγωνιστικοί αναστολείς της NOS, μειώνοντας την παραγωγή NO και αυξάνοντας τα επίπεδα πλάσματος έχουν αποδειχθεί ότι είναι ο ισχυρότερος παράγοντας κινδύνου που περιλαμβάνεται στην εξέλιξη των προοδευτικών νεφροπαθειών [150-152].

Στη μελέτη μας, τα επίπεδα SDMA/ADMA βρέθηκαν σημαντικά αυξημένα στην ομάδα CIN σε σύγκριση με τις ομάδες ελέγχου και θεραπείας σε όλα τα χρονικά σημεία, ενώ έτειναν να μειώνονται στις 48 ώρες χωρίς να φτάσουν τα φυσιολογικά επίπεδα. Αντίθετα, τα επίπεδα SDMA/ADMA στις ομάδες Res+CIN και Lyc+CIN, κυμάνθηκαν με την πάροδο του χρόνου εντός φυσιολογικών τιμών (μη σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου), με αυτά στην ομάδα Lyc να είναι μη σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα Res. Τα αποτελέσματά μας, όσον αφορά στη θεραπεία με Res, υποστηρίζονται από προηγούμενα in vitro/vivo μοντέλα και μελέτες σε ανθρώπους. Τα επίπεδα ADMA/SDMA ορού λειτουργούν ως προγνωστικοί παράγοντες κινδύνου σε ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, συμπεριλαμβανομένης της νεφρικής δυσλειτουργίας και η θεραπεία με Res μπορεί να μειώσει σημαντικά τα επίπεδα ADMA/SDMA στο αίμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η δράση της Res στο μεταβολισμό των ADMA/SDMA μπορεί να είναι σημαντικός μηχανισμός ευεργετικής επίδραση στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [153-159]. Ωστόσο, τα επίπεδα ADMA/SDMA δεν έχουν αξιολογηθεί εκτενώς σε συνδυασμό με τη θεραπεία Lyc σε παθολογικές καταστάσεις, εκτός από τους Tsitsimpikou κ.ά., οι οποίοι έδειξαν προστατευτική δράση του χυμού ντομάτας στην ενδοθηλιακή λειτουργία που σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα ADMA σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο [160]. Επομένως, η μελέτη μας έδειξε για πρώτη φορά τις

ευεργετικές ιδιότητες της προ-θεραπείας με Lyc να συσχετίζονται με σημαντικά μειωμένα επίπεδα πλάσματος ADMA/SDMA σε ένα ζωικό μοντέλο CIN.

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους κύριους μηχανισμούς που συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία της CIN [161]. Πειραματικά δεδομένα έχουν δείξει ότι η χορήγηση ιωδιούχων CM προκαλεί νεφρική υποξία, η οποία ενισχύει την παραγωγή ROS, και έτσι η διαμόρφωση των επιπέδων των ROS χρησιμοποιώντας φάρμακα ανίχνευσης ROS μπορεί να είναι ένας από τους κύριους στόχους για πρόληψη της CIN [79, 162]. Στη μελέτη αυτή, το οξειδωτικό στρες αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τους δείκτες MDA, TAC, CAT και GSH. Τα λιπίδια είναι πολύ ευαίσθητα στο οξειδωτικό στρες και το MDA είναι ένας από τους σημαντικότερους οξειδωτικούς δείκτες για εκτίμηση της υπεροξείδωσης λιπιδίων [163]. Η TAC είναι η μέτρηση της ποσότητας των ελεύθερων ριζών που δεσμεύονται από ένα δοκιμαστικό διάλυμα και χρησιμοποιείται για αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βιολογικών δειγμάτων [164]. Η CAT είναι ένζυμο κλειδί υπεύθυνο για προστασία των κυττάρων από οξειδωτικές βλάβες από τις ROS [165]. Τέλος, η GSH είναι ένα κύριο αντιοξειδωτικό που υπάρχει στα κύτταρα σε μειωμένη GSH και σε ανηγμένη GSSG μορφή που σε κανονικές συνθήκες βρίσκονται σε ισορροπία. Έτσι, παθολογικές καταστάσεις που προκαλούν οξειδωτικό στρες θα είχαν ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα GSSG. Ως εκ τούτου, η μέτρηση της ενδοκυτταρικής GSH φαίνεται να είναι ευαίσθητος δείκτης συνολικής υγείας και ικανότητάς του κυττάρου να αντιστέκεται στις τοξικές προκλήσεις [166].

Σε αυτήν τη μελέτη φάνηκε ότι τα επίπεδα MDA στο πλάσμα αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα CIN σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και τις ομάδες που έλαβαν αντιοξειδωτικά, 0 και 24 ώρες μετά τη χορήγηση του CM και στους δύο νεφρούς. Τα αποτελέσματα υποστηρίζονται από προηγούμενες μελέτες σε ζώα και ανθρώπους που έδειξαν ότι τα επίπεδα MDA αυξήθηκαν σχεδόν αμέσως μετά την έκθεση στο CM [142, 162, 167]. Από την άλλη πλευρά, βρέθηκε ότι η προ-θεραπεία με Res και Lyc μείωσε σημαντικά τα επίπεδα MDA στο αίμα και τους νεφρούς. Αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι και τα δύο αντιοξειδωτικά είχαν θεραπευτική δράση στο μοντέλο μας λόγω ικανότητάς τους να προστατεύουν τις μιτοχονδριακές και κυτταρικές μεμβράνες από την υπεροξείδωση των λιπιδίων [168-172].

Η χορήγηση ιωδιούχου CM έχει βρεθεί ότι ενισχύει την υποξία και αυξάνει την παραγωγή ROS στο αίμα και στο νεφρό, ενώ η παραγωγή ελεύθερων ριζών

εμποδίζεται από ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα όπως η TAC [173]. Στην παρούσα μελέτη, τα μειωμένα επίπεδα TAC της ομάδας CIN στο πλάσμα/νεφρούς δείχνουν μείωση αντιοξειδωτικής δράσης στη συστηματική ανταπόκριση. Αντίθετα, η θεραπεία με Res και Lyc βρέθηκε να ασκεί ευεργετικές ιδιότητες εξουδετερώνοντας τις ROS, ενισχύοντας έτσι τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ζώων, παρόλο που είχαν εκτεθεί στο CM. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η χρήση Res/Lyc μπορεί να βελτιώσει το οξειδωτικό στρες και συνδέονται στενά με μειωμένα επίπεδα TAC στο αίμα και στους νεφρούς [174-176].

Οι αλλαγές στα επίπεδα GSH και στη δραστηριότητα CAT σε δείγματα αίματος και νεφρών ήταν συνέπεια αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών και της μείωσης του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος ως αντίδραση στο CM [177]. Τα μειωμένα επίπεδα ενζύμων δείχνουν ότι καταναλώθηκαν λόγω αυξημένου οξειδωτικού στρες, όπως βρέθηκε στην ομάδα CIN του μοντέλου, όπου και τα δύο ένζυμα βρέθηκαν να σημαντικά μειωμένα στο αίμα και στα νεφρά ανεξάρτητα από τον χρόνο. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν σε προηγούμενες in vivo μελέτες σχετικά με την παθογένεση της CIN [88, 177]. Παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση των παραμέτρων στα επίπεδα του αίματος στις ομάδες που έλαβαν Res και Lyc, αμέσως και 24 ώρες μετά την έκθεση στο CM, σε σύγκριση με την παθολογική ομάδα CIN. Παρομοίως, παρατηρήθηκε βελτίωση στα επίπεδα των GSH και CAT στους νεφρικούς ιστούς, όπου οι τιμές κυμάνθηκαν κοντά στην ομάδα ελέγχου και ήταν υψηλότερες σε σύγκριση με την ομάδα CIN. Αυτή η βελτίωση μπορεί να εξηγηθεί από την αντιοξειδωτική δράση των Res/Lyc που υποστηρίζεται από προηγούμενες μελέτες σε ζώα [39, 178, 179].

Η κυτταρολογική εξέταση των νεφρών έδειξε φυσιολογικά νεφρά στην ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, η ομάδα της CIN εμφάνισε αλλοιώσεις κυττάρων ως αποτέλεσμα της παραγωγής ROS που προκαλείται από την έκθεση στο CM, κυτταρική απόπτωση και εκφυλισμένα κύτταρα [180]. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σχηματισμός κενοτοπίων στα σωληνάρια και στους δύο νεφρούς της ομάδας CIN και προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι πρόκειται για εκφυλιστική μεταβολή που σχετίζεται με τοξικότητα φαρμάκου, ιδιαίτερα στην περίπτωση της CIN [181, 182]. Τα CM ασκούν άμεση τοξική δράση στα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων, προκαλώντας κενοτοπίωση και απόπτωση μέσω της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και άλλων οδών [17, 183]. Οι ομάδες Res+CIN και Lyc+CIN

παρουσίασαν ευρήματα κοντά στη φυσιολογική ιστολογία των νεφρών με λιγότερο έντονες κυτταρολογικές αλλοιώσεις σε σύγκριση με την ομάδα CIN. Έχει αναφερθεί ότι η Res μειώνει την οξειδωτική βλάβη στα επιθηλιακά κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων και πυροδοτεί ένα προστατευτικό μονοπάτι αυτοφαγίας που είναι κρίσιμο για την προστατευτική του δράση [50, 184]. Υπάρχουν επίσης μελέτες που διερευνούν την αποτελεσματικότητα του Lyc μετά την πρόκληση νεφρικής βλάβης με νεφροτοξικούς παράγοντες και επιδεικνύουν βελτιωμένες ιστοπαθολογικές παραμέτρους, συμπεριλαμβανομένης της σωληναριακής κενοτοπίωσης και της σωληναριακής νέκρωσης [185-187].

Όσον αφορά στην αξιολόγηση λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, διαπιστώθηκε σημαντική μείωση αριθμού των Β και των Τ στην ομάδα CIN σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και αντιοξειδωτικών. Αντίθετα, ο αριθμός λεμφοκυττάρων στο αίμα στις ομάδες Res+CIN και Lyc+CIN ήταν κοντά στο φυσιολογικό και η διαφορά με την ομάδα CIN ήταν στατιστικά σημαντική. Αυτά τα ευρήματα είναι ενδεικτικά μιας γενικευμένης κυτταροτοξικής επίδρασης του CM στα λευκά αιμοσφαίρια, πιθανώς κατά τον προγραμματισμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι τα αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα είναι πολύ ευαίσθητα έναντι πολυάριθμων ερεθισμάτων που μπορεί να αλλάξουν τις ρυθμιστικές οδούς όπως αυτή του πυρηνικού παράγοντα κΒ (Nuclear Factor-κB, Nf-kB) [188]. Ο Nf-kB εμπλέκεται στη διαδικασία φλεγμονής και απόπτωσης των κυττάρων, ενεργοποιώντας διάφορους φλεγμονώδεις παράγοντες και διεγείροντας την έκφραση κυτταροκινών με αποτέλεσμα απόπτωση των κυττάρων και βλάβη των ιστών [189, 190]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η Res/Lyc είναι σε θέση να αναστείλουν την οδό σηματοδότησης NF-κB λόγω ισχυρών αντιφλεγμονωδών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων [191, 192].

Η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει ότι το οξειδωτικό στρες είναι ένας από τους θεμελιώδεις παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς της CIN. Η CIN προκαλεί δομική νεφρική βλάβη και σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ADMA/SDMA. Η ενδοφλέβια χορήγηση CM μειώνει τον αριθμό των Β και Τ λεμφοκυττάρων στο αίμα. Η προηγηθείσα θεραπεία με Res/Lyc φαίνεται να ελαχιστοποιεί τη συχνότητα εμφάνισης CIN τροποποιώντας την οξειδωτική/αντιοξειδωτική ισορροπία σε αυτό το ζωικό μοντέλο, βελτιώνοντας τη δομική βλάβη των νεφρών που σχετίζεται με τη CIN.

Το Lyc/Res είναι ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά με αντιμικροβιακή/αντιφλεγμονώδη δράση [193, 194]. Έχουν αξιολογηθεί σε περιορισμένο αριθμό μελετών σε ζώα με CIN in vivo με υποσχόμενα αποτελέσματα (Πίνακας 12) [39, 195-198]. Πρόκειται για την πρώτη μελέτη που αξιολογεί την επίδραση των Res/Lyc στα επίπεδα ADMA/ SDMA και την πρώτη που διερευνά την πιθανή προστατευτική επίδρασή τους στην γραμμή των λευκών αιμοσφαιρίων από την κυτταροτοξική επίδραση της έκθεσης στο CM. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η μελέτη αυτή παρέχει στοιχεία ότι η Res/ Lyc ασκούν νεφρο-προστατευτική δράση που δικαιολογεί περαιτέρω έρευνα. Η μελέτη παρέχει πρόδρομα στοιχεία ότι η Res/Lyc βελτιώνουν την εικόνα της CIN τροποποιώντας την οξειδωτική/αντιοξειδωτική ισορροπία στο αίμα και στο νεφρικό ιστό, αναστέλλοντας την αγγειοσυστολή και την κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα του αίματος και των νεφρών.

Reference Country/Year	Animal	CIN Induction	Antioxidant	Sample (After CIN)	CIN Effects	Treatment Effects
[195]/China/ 2022	Sprague Dawley male rats	Iopromide (IV, 2 g/kg)	Res (IV, 30 mg/kg) 60 min before CIN	Blood, kidney (24h)	↑ sCr, ↑BUN, ↑NGAL, ↑renal injury, ↓miR17, ↓miR30c, ↑TXNIP, ↑FOXO3, ↑ NLRP3, ↑IL-1β, ↑caspase-3	↓ sCr, ↓ BUN, ↓ NGAL, ↓renal injury, ↑ miR17, ↑miR30c, ↓ TXNIP ↓ FOXO3, ↓ NLRP3, ↓ IL-1β, ↓caspase-3
[196]/China/ 2019	White New Zealand	Iohexol (IV, 2.5 g iodine/kg)	Res (per os, 80 mg/kg/d)	Blood, urine, kidney	↑ sCr, ↑BUN, ↑ CysC,	↓ sCr, ↓ BUN, ↓ CysC,

	male rabbits		for 14 days before CIN	(24h)	↑uNGAL, ↑renal injury, ↑ cell apoptosis, ↑cytotoxicity, ↓ SIRT1, ↓ PGC-1α, ↑ HIF-1α, ↑ Bax, ↑ caspase 3, ↑ Cyt-C	↓ uNGAL, ↓renal injury, ↓ cell apoptosis, ↓cytotoxicity, ↑SIRT1, ↑PGC-1α, ↓ HIF-1α, ↓Bax, ↓caspase 3, ↓Cyt-C
[197]/Taiwan/ 2019	Sprague Dawley male rats	Iopromide (IV, 2 g/kg)	Res (IV, 30mg/kg) 60min before CIN	Blood, kidney (24h)	↑ sCr, ↑BUN, ↑NGAL, ↑renal injury, ↑ cell apoptosis, ↑ NLRP3, ↑IL-1β, ↑ caspase 3,	↓ sCr, ↓ BUN, ↓ NGAL, ↓renal injury, ↓ cell apoptosis, ↓ NLRP3, ↓ IL-1β, ↓caspase 3,
[198]/Korea/ 2017	Male C57BL/ 6J mice	Iohexol (Intraperitonea l, 5 g iodine/kg)	Res (Intraperitoneal 30 mg/kg) simultaneously with CM	Blood, kidney (24h)	↑ sCr, ↑renal injury, ↓ SIRT1, ↓PGC-1α, ↑FoxO1, ↓SOD2, ↑MDA, ↑ cell apoptosis, ↑Renal macrophage	↓ sCr, ↓renal injury, ↑SIRT1, ↑ PGC-1α, ↓ FoxO1, ↑ SOD2, ↓MDA, ↓ cell apoptosis, ↓ Renal macrophage

					infiltration	infiltration
[39]/Turkey/ 2015	Male Wistar albino rats	Iomeprol (IV, 10 ml/kg)	Lyc (per os 4 mg/kg/day) for 10 days before and after CIN	Blood, kidney (5 days)	↑ sCr, ↑ urea, ↓SOD, ↓CAT, ↓GSH, ↑MDA, ↑renal injury, ↑ iNOS, ↑ LC3/B, ↑ caspase 3	↓ sCr, ↓ urea, ↑SOD, ↑CAT, ↑GSH, ↓MDA, ↓renal injury, ↓ iNOS, ↓LC3/B, ↓caspase 3

Πίνακας 12. In vivo μελέτες αξιολόγησης ρεσβερατρόλης/λυκοπενίου στη CIN

sCr: Serum Creatinine; BUN: Blood Urea Nitrogen; NGAL: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin; miR17: micro RNA17; miR30c: microRNA-30; TXNIP: Thioredoxin-interacting protein; FOXO3: Forkhead box O3 protein; NLRP3: NLR family pyrin domain containing 3 protein; IL-1β: Interleukin 1 beta; CysC: Cystatin C; uNGAL: Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin; SIRT1: Sirtuin 1; PGC-1α: Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator; HIF-1a: Hypoxia-inducible factor 1-alpha; Bax: Bcl-2 Associated X-protein; Cyt-C: Cytochrome c; FoxO1: Forkhead box protein O1; SOD2: Superoxide dismutase 2; MDA: Malondialdehyde; CAT: Catalase; GSH: Glutathione; iNOS: Inducible nitric oxide synthase; LC3/B: Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το μοντέλο νεφροτοξικότητας κουνελιού ήταν επιτυχές με βάση τη βιοχημική ανάλυση και η νεφροπάθεια που προκλήθηκε από το CM εμφανίστηκε σε ζώα με φυσιολογική νεφρική λειτουργία χωρίς προηγούμενη παρέμβαση. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων στον άνθρωπο. Τα επίπεδα sCr αντισταθμίστηκαν μετά από 24 ώρες, όταν οι δείκτες οξειδωτικού στρες έδειξαν την υψηλότερη παραγωγή ROS. Το οξειδωτικό στρες φαίνεται να είναι ένας από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη δημιουργία της CIN και η μη στατιστική σημαντικότητα ορισμένων δεικτών μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό ζώων. Η ενδοφλέβια χορήγηση CM μείωσε τον αριθμό B/T λεμφοκυττάρων, υποδεικνύοντας τις άμεσες κυτταροτοξικές δράσεις της ιοπρομίδης στο αίμα. Η ανάλυση επιπέδων SDMA/ADMA αποκάλυψε στατιστικά σημαντική αύξηση αμέσως (0 h), 24 h και 48 h μετά την έκθεση στο CM. Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι η έκθεση οδηγεί σε άμεσα σημαντική αύξηση των επιπέδων SDMA/ADMA, τα οποία παραμένουν σταθερά σε υψηλά επίπεδα με την πάροδο του χρόνου. Με βάση τα στοιχεία που παρέχονται από τη μελέτη συμπεραίνεται ότι οι δείκτες SDMA/ADMA είναι απόλυτοι δείκτες νεφρικής δυσλειτουργίας, τα επίπεδά τους επηρεάζονται άμεσα από τη χορήγηση CM και τα αποτελέσματα παρατηρούνται σε πραγματικό χρόνο. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αξιολογεί τη δράση της Res και του Lyc στα επίπεδα ADMA/SDMA και η πρώτη που διερευνά την πιθανή προστατευτική επίδρασή στη σειρά των λευκών αιμοσφαιρίων από την κυτταροτοξική επίδραση του CM. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η παρούσα μελέτη παρέχει στοιχεία ότι η Res και το Lyc ασκούν νεφροπροστασία, γεγονός που δικαιολογεί περαιτέρω έρευνα. Η μελέτη παρέχει πρόδρομα στοιχεία ότι η Res/Lyc προφυλάσσουν από την εμφάνιση CIN τροποποιώντας την οξειδωτική/ αντιοξειδωτική ισορροπία στο αίμα/νεφρικό ιστό αναστέλλοντας την αγγειοσυστολή και την κυτταροτοξικότητα στα κύτταρα του αίματος και των νεφρών.

Μελλοντική έρευνα σε αυτό το μοντέλο μπορεί να καλύψει επιπλέον πτυχές, όπως μόρια/μονοπάτια σηματοδότησης που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία. Η αποτελεσματικότητα των Res και Lyc μπορεί να διερευνηθεί περαιτέρω αλλάζοντας το χρονικό σημείο χορήγησης και τη δοσολογία. Η μελλοντική έρευνα μπορεί να χρησιμοποιήσει περισσότερα ζώα και να διεξάγει δειγματοληψία πριν και μετά το

χρονοδιάγραμμά που ακολούθησε η παρούσα μελέτη, για να έχουμε μια ευρύτερη εικόνα της διακύμανσης των παραμέτρων.

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Seeliger, E., et al., *Contrast-induced kidney injury: mechanisms, risk factors, and prevention.* Eur Heart J, 2012. **33**(16): p. 2007-15.
2. McCullough, P.A., *Contrast-induced acute kidney injury.* J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(15): p. 1419-28.
3. Georgiadis, G., et al., *Current Concepts on the Reno-Protective Effects of Phosphodiesterase 5 Inhibitors in Acute Kidney Injury: Systematic Search and Review.* J Clin Med, 2020. **9**(5).
4. Khwaja, A., *KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury.* Nephron Clin Pract, 2012. **120**(4): p. c179-84.
5. Asif, A. and M. Epstein, *Prevention of radiocontrast-induced nephropathy.* Am J Kidney Dis, 2004. **44**(1): p. 12-24.
6. Gruberg, L. and R. Waksman, *Intravascular radiation for the prevention of recurrence of restenosis in coronary arteries.* Expert Opin Investig Drugs, 2001. **10**(5): p. 891-907.
7. Subramanian, S., et al., *Economic burden of contrast-induced nephropathy: implications for prevention strategies.* J Med Econ, 2007. **10**(2): p. 119-34.
8. Majumdar, S.R., et al., *Forced euvolemic diuresis with mannitol and furosemide for prevention of contrast-induced nephropathy in patients with CKD undergoing coronary angiography: a randomized controlled trial.* Am J Kidney Dis, 2009. **54**(4): p. 602-9.
9. Guastoni, C., et al., *Continuous venovenous hemofiltration after coronary procedures for the prevention of contrast-induced acute kidney injury in patients with severe chronic renal failure.* Am J Cardiol, 2014. **113**(4): p. 588-92.
10. McCullough, P.A., *Radiocontrast-induced acute kidney injury.* Nephron Physiol, 2008. **109**(4): p. p61-72.
11. Barreto, R., *Prevention of contrast-induced nephropathy: the rational use of sodium bicarbonate.* Nephrol Nurs J, 2007. **34**(4): p. 417-21.
12. Sendeski, M.M., *Pathophysiology of renal tissue damage by iodinated contrast media.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011. **38**(5): p. 292-9.

13. Tumlin, J., et al., *Pathophysiology of contrast-induced nephropathy.* Am J Cardiol, 2006. **98**(6A): p. 14K-20K.

14. Geenen, R.W., H.J. Kingma, and A.J. van der Molen, *Contrast-induced nephropathy: pharmacology, pathophysiology and prevention.* Insights Imaging, 2013. **4**(6): p. 811-20.

15. Pannu, N., et al., *Prophylaxis strategies for contrast-induced nephropathy.* JAMA, 2006. **295**(23): p. 2765-79.

16. Solomon, R., *Contrast media: are there differences in nephrotoxicity among contrast media?* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 934947.

17. Persson, P.B., P. Hansell, and P. Liss, *Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy.* Kidney Int, 2005. **68**(1): p. 14-22.

18. Tsarouhas, K., et al., *Oxidative stress and kidney injury in trans-radial catheterization.* Biomed Rep, 2018. **8**(5): p. 417-425.

19. Romano, G., et al., *Contrast agents and renal cell apoptosis.* Eur Heart J, 2008. **29**(20): p. 2569-76.

20. Lenhard, D.C., et al., *The effect of iodinated contrast agent properties on renal kinetics and oxygenation.* Invest Radiol, 2013. **48**(4): p. 175-82.

21. Thomsen, H.S., S.K. Morcos, and B.J. Barrett, *Contrast-induced nephropathy: the wheel has turned 360 degrees.* Acta Radiol, 2008. **49**(6): p. 646-57.

22. Rudnick, M.R., et al., *Nephrotoxic risks of renal angiography: contrast media-associated nephrotoxicity and atheroembolism--a critical review.* Am J Kidney Dis, 1994. **24**(4): p. 713-27.

23. Zhang, Y., et al., *The serial effect of iodinated contrast media on renal hemodynamics and oxygenation as evaluated by ASL and BOLD MRI.* Contrast Media Mol Imaging, 2012. **7**(4): p. 418-25.

24. Zhang, Y.D., et al., *Effect of iodinated contrast media on renal function evaluated with dynamic three-dimensional MR renography.* Radiology, 2014. **270**(2): p. 409-15.

25. Pisani, A., et al., *Role of reactive oxygen species in pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 868321.

26. Heyman, S.N., S. Rosen, and C. Rosenberger, *Renal parenchymal hypoxia, hypoxia adaptation, and the pathogenesis of radiocontrast nephropathy.* Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(1): p. 288-96.

27. Brezis, M. and S. Rosen, *Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease.* N Engl J Med, 1995. **332**(10): p. 647-55.

28. Thomson, V.S., K. Narayanan, and J.C. Singh, *Contrast induced nephropathy in urology.* Indian J Urol, 2009. **25**(4): p. 437-45.

29. Bakris, G.L. and J.C. Burnett, Jr., *A role for calcium in radiocontrast-induced reductions in renal hemodynamics.* Kidney Int, 1985. **27**(2): p. 465-8.

30. Nunag, M., M. Brogan, and R. Garrick, *Mitigating contrast-induced acute kidney injury associated with cardiac catheterization.* Cardiol Rev, 2009. **17**(6): p. 263-9.

31. Ribeiro, L., et al., *Evaluation of the nitric oxide production in rat renal artery smooth muscle cells culture exposed to radiocontrast agents.* Kidney Int, 2004. **65**(2): p. 589-96.

32. Katzberg, R.W., *Contrast medium-induced nephrotoxicity: which pathway?* Radiology, 2005. **235**(3): p. 752-5.

33. Heyman, S.N., et al., *Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy.* Invest Radiol, 2010. **45**(4): p. 188-95.

34. Detrenis, S., et al., *Lights and shadows on the pathogenesis of contrast-induced nephropathy: state of the art.* Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(8): p. 1542-50.

35. Choudhury, D., *Acute kidney injury: current perspectives.* Postgrad Med, 2010. **122**(6): p. 29-40.

36. Heinrich, M. and M. Uder, *Pathogenesis of contrast-induced nephropathy.* AJR Am J Roentgenol, 2005. **185**(4): p. 1079; author reply 1079.

37. Haller, C. and I. Hizoh, *The cytotoxicity of iodinated radiocontrast agents on renal cells in vitro.* Invest Radiol, 2004. **39**(3): p. 149-54.

38. Ari, E., et al., *Antioxidant and renoprotective effects of paricalcitol on experimental contrast-induced nephropathy model.* Br J Radiol, 2012. **85**(1016): p. 1038-43.

39. Buyuklu, M., et al., *Benefical effects of lycopene against contrast medium-induced oxidative stress, inflammation, autophagy, and apoptosis in rat kidney.* Hum Exp Toxicol, 2015. **34**(5): p. 487-96.

40. Hsu, S.P., T.J. Tsai, and C.T. Chien, *Ioxitalamate induces renal tubular apoptosis via activation of renal efferent nerve-mediated adrenergic signaling, renin activity, and reactive oxygen species production in rats.* Toxicol Sci, 2010. **114**(1): p. 149-58.

41. Ozkan, G., et al., *Protective effect of the grape seed proanthocyanidin extract in a rat model of contrast-induced nephropathy.* Kidney Blood Press Res, 2012. **35**(6): p. 445-53.

42. Norbury, C.J. and I.D. Hickson, *Cellular responses to DNA damage.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 367-401.

43. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(4): p. 277-88.

44. Linkermann, A., et al., *Programmed necrosis in acute kidney injury.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(9): p. 3412-9.

45. Martinvalet, D., P. Zhu, and J. Lieberman, *Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis.* Immunity, 2005. **22**(3): p. 355-70.

46. Saelens, X., et al., *Toxic proteins released from mitochondria in cell death.* Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2861-74.

47. Slee, E.A., C. Adrain, and S.J. Martin, *Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis.* J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 7320-6.

48. Huang, Y.T., et al., *Resveratrol alleviates the cytotoxicity induced by the radiocontrast agent, ioxitalamate, by reducing the production of reactive oxygen species in HK-2 human renal proximal tubule epithelial cells in vitro.* Int J Mol Med, 2016. **37**(1): p. 83-91.

49. Lee, H.C., et al., *Ionic contrast media induced more apoptosis in diabetic kidney than nonionic contrast media.* J Nephrol, 2011. **24**(3): p. 376-80.

50. Liu, T.Q., et al., *A novel contrast-induced acute kidney injury model based on the 5/6-nephrectomy rat and nephrotoxicological evaluation of iohexol and iodixanol in vivo.* Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 427560.

51. Zhao, Y., et al., *Toxic effects of a high dose of non-ionic iodinated contrast media on renal glomerular and aortic endothelial cells in aged rats in vivo.* Toxicol Lett, 2011. **202**(3): p. 253-60.

52. Quintavalle, C., et al., *In vivo and in vitro assessment of pathways involved in contrast media-induced renal cells apoptosis.* Cell Death Dis, 2011. **2**: p. e155.

53. Wang, D., et al., *Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II.* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2783-9.

54. Degterev, A., et al., *Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury.* Nat Chem Biol, 2005. **1**(2): p. 112-9.

55. Linkermann, A., et al., *The RIP1-kinase inhibitor necrostatin-1 prevents osmotic nephrosis and contrast-induced AKI in mice.* J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(10): p. 1545-57.

56. Liang, X., et al., *Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to renal epithelial cell damage in an ATP-depleted renal ischemia model.* Mol Med Rep, 2014. **10**(2): p. 719-24.

57. Georgiadis, G., et al., *Contrast-Induced Nephropathy (CIN) and Biomarkers*, in *Biomarkers in Toxicology*, V.B. Patel, V.R. Preedy, and R. Rajendram, Editors. 2022, Springer International Publishing: Cham. p. 1-24.

58. Barrett, B.J. and P.S. Parfrey, *Clinical practice. Preventing nephropathy induced by contrast medium.* N Engl J Med, 2006. **354**(4): p. 379-86.

59. Martin-Mateo, M.C., et al., *Oxidative stress in chronic renal failure.* Ren Fail, 1999. **21**(2): p. 155-67.

60. Okamura, D.M., et al., *CD36 regulates oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic CKD.* J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(3): p. 495-505.

61. Pettersson, G., et al., *The rabbit renal toxicity test: a sensitive in vivo test for the nephrotoxicity of contrast agents.* Acad Radiol, 2002. **9 Suppl 1**: p. S62-4.

62. Fiaccadori, E., et al., *Plasma and urinary free 3-nitrotyrosine following cardiac angiography procedures with non-ionic radiocontrast media.* Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(4): p. 865-9.

63. Rosovsky, M.A., et al., *High-dose administration of nonionic contrast media: a retrospective review.* Radiology, 1996. **200**(1): p. 119-22.

64. Moos, S.I., et al., *Contrast induced nephropathy in patients undergoing intravenous (IV) contrast enhanced computed tomography (CECT) and the relationship with risk factors: a meta-analysis.* Eur J Radiol, 2013. **82**(9): p. e387-99.

65. Zaytseva, N.V., et al., *Contrast-induced nephropathy in patients with type 2 diabetes during coronary angiography: risk-factors and prognostic value.* Diabetes Res Clin Pract, 2009. **86 Suppl 1**: p. S63-9.

66. Wasaki, M., J. Sugimoto, and K. Shirota, *Glucose alters the susceptibility of mesangial cells to contrast media.* Invest Radiol, 2001. **36**(7): p. 355-62.

67. Sterling, K.A., T. Tehrani, and M.R. Rudnick, *Clinical significance and preventive strategies for contrast-induced nephropathy.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2008. **17**(6): p. 616-23.

68. Gupta, R.K. and T.J. Bang, *Prevention of Contrast-Induced Nephropathy (CIN) in Interventional Radiology Practice.* Semin Intervent Radiol, 2010. **27**(4): p. 348-59.

69. Stacul, F., et al., *Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines.* Eur Radiol, 2011. **21**(12): p. 2527-41.

70. Caiazza, A., et al., *Hemodynamic and tubular changes induced by contrast media.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 578974.

71. Kooiman, J., et al., *Contrast-induced acute kidney injury and clinical outcomes after intra-arterial and intravenous contrast administration: risk comparison adjusted for patient characteristics by design.* Am Heart J, 2013. **165**(5): p. 793-99, 799 e1.

72. Evola, S., et al., *Risk factors for contrast induced nephropathy: a study among Italian patients.* Indian Heart J, 2012. **64**(5): p. 484-91.

73. Patti, G., et al., *Usefulness of statin pretreatment to prevent contrast-induced nephropathy and to improve long-term outcome in patients undergoing percutaneous coronary intervention.* Am J Cardiol, 2008. **101**(3): p. 279-85.

74. Xinwei, J., et al., *Comparison of usefulness of simvastatin 20 mg versus 80 mg in preventing contrast-induced nephropathy in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention.* Am J Cardiol, 2009. **104**(4): p. 519-24.

75. Rizzo, M., et al., *Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look.* Transl Res, 2009. **153**(5): p. 217-23.

76. Kowalczyk, J., et al., *Different types of renal dysfunction in patients with acute myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention.* J Interv Cardiol, 2007. **20**(2): p. 143-52.

77. Rancic, Z.S., *Commentary on 'Contrast Induced Nephropathy and Long-term Renal Decline After Percutaneous Transluminal Angioplasty for Symptomatic Peripheral Arterial Disease'.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 2016. **51**(3): p. 394.

78. Iordache, A.M., et al., *Phosphodiesterase-5 inhibitors ameliorate structural kidney damage in a rat model of contrast-induced nephropathy.* Food Chem Toxicol, 2020. **143**: p. 111535.

79. Iordache, A.M., et al., *Sildenafil and tadalafil reduce the risk of contrast-induced nephropathy by modulating the oxidant/antioxidant balance in a murine model.* Food Chem Toxicol, 2020. **135**: p. 111038.

80. Zisis, I.E., et al., *Renoprotective Effect of Vardenafil and Avanafil in Contrast-Induced Nephropathy: Emerging Evidence from an Animal Model.* J Pers Med, 2022. **12**(5).

81. Ellis, J.H. and R.H. Cohan, *Prevention of contrast-induced nephropathy: an overview.* Radiol Clin North Am, 2009. **47**(5): p. 801-11, v.

82. Burgess, W.P. and P.J. Walker, *Mechanisms of contrast-induced nephropathy reduction for saline (NaCl) and sodium bicarbonate (NaHCO3).* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 510385.

83. Ludwig, U. and F. Keller, *Prophylaxis of contrast-induced nephrotoxicity.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 308316.

84. Authors/Task Force, m., et al., *2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC).* Eur Heart J, 2014. **35**(39): p. 2733-79.

85. Hiremath, S., et al., *Prevention of contrast-induced acute kidney injury: is simple oral hydration similar to intravenous? A systematic review of the evidence.* PLoS One, 2013. **8**(3): p. e60009.

86. Kwok, C.S., et al., *Measures used to treat contrast-induced nephropathy: overview of reviews.* Br J Radiol, 2013. **86**(1021): p. 20120272.

87. Subramaniam, R.M., et al., *Effectiveness of Prevention Strategies for Contrast-Induced Nephropathy: A Systematic Review and Meta-analysis.* Ann Intern Med, 2016. **164**(6): p. 406-16.

88. Tasanarong, A., S. Kongkham, and A. Itharat, *Antioxidant effect of Phyllanthus emblica extract prevents contrast-induced acute kidney injury.* BMC Complement Altern Med, 2014. **14**: p. 138.

89. Pavlidis, A.N., et al., *Prevention of contrast-induced acute kidney injury after percutaneous coronary intervention for chronic total coronary occlusions.* Am J Cardiol, 2015. **115**(6): p. 844-51.

90. Schiffl, H., *Sodium bicarbonate infusion for prevention of acute kidney injury: no evidence for superior benefit, but risk for harm?* Int Urol Nephrol, 2015. **47**(2): p. 321-6.

91. Weisbord, S.D., et al., *Prevention of contrast-induced AKI: a review of published trials and the design of the prevention of serious adverse events following angiography (PRESERVE) trial.* Clin J Am Soc Nephrol, 2013. **8**(9): p. 1618-31.

92. Jang, J.S., et al., *Sodium bicarbonate therapy for the prevention of contrast-induced acute kidney injury - a systematic review and meta-analysis.* Circ J, 2012. **76**(9): p. 2255-65.

93. Merten, G.J., et al., *Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate: an evidence-based protocol.* Crit Pathw Cardiol, 2004. **3**(3): p. 138-43.

94. Navaneethan, S.D., et al., *Sodium bicarbonate therapy for prevention of contrast-induced nephropathy: a systematic review and meta-analysis.* Am J Kidney Dis, 2009. **53**(4): p. 617-27.

95. Zoungas, S., et al., *Systematic review: sodium bicarbonate treatment regimens for the prevention of contrast-induced nephropathy.* Ann Intern Med, 2009. **151**(9): p. 631-8.

96. Kagan, A. and D. Sheikh-Hamad, *Contrast-induced kidney injury: focus on modifiable risk factors and prophylactic strategies.* Clin Cardiol, 2010. **33**(2): p. 62-6.

97. Zhang, B., et al., *The efficacy of sodium bicarbonate in preventing contrast-induced nephropathy in patients with pre-existing renal insufficiency: a meta-analysis.* BMJ Open, 2015. **5**(3): p. e006989.

98. Mehran, R. and A. Caixeta, *N-acetylcysteine in preventing contrast-induced nephropathy. To give, or not to give: that is the question.* Rev Esp Cardiol, 2010. **63**(1): p. 9-11.

99. Andreucci, M., et al., *Prevention of contrast-induced nephropathy through a knowledge of its pathogenesis and risk factors.* ScientificWorldJournal, 2014. **2014**: p. 823169.

100. Pattharanitima, P. and A. Tasanarong, *Pharmacological strategies to prevent contrast-induced acute kidney injury.* Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 236930.

101. Fishbane, S., *N-acetylcysteine in the prevention of contrast-induced nephropathy.* Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(1): p. 281-7.

102. Hosseinjani, H., A. Moghaddas, and H. Khalili, *N-acetylcysteine for the prevention of non-contrast media agent-induced kidney injury: from preclinical data to clinical evidence.* Eur J Clin Pharmacol, 2013. **69**(7): p. 1375-90.

103. Briguori, C., et al., *Nephrotoxicity of contrast media and protective effects of acetylcysteine.* Arch Toxicol, 2011. **85**(3): p. 165-73.

104. Rushworth, G.F. and I.L. Megson, *Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits.* Pharmacol Ther, 2014. **141**(2): p. 150-9.

105. Tepel, M., et al., *Prevention of radiographic-contrast-agent-induced reductions in renal function by acetylcysteine.* N Engl J Med, 2000. **343**(3): p. 180-4.

106. Owen, R.J., et al., *Canadian Association of Radiologists consensus guidelines for the prevention of contrast-induced nephropathy: update 2012.* Can Assoc Radiol J, 2014. **65**(2): p. 96-105.

107. Anderson, S.M., Z.H. Park, and R.V. Patel, *Intravenous N-acetylcysteine in the prevention of contrast media-induced nephropathy.* Ann Pharmacother, 2011. **45**(1): p. 101-7.

108. Kang, X., et al., *N-acetylcysteine for the prevention of contrast-induced nephropathy in patients with pre-existing renal insufficiency or diabetes: a systematic review and meta-analysis.* Ren Fail, 2015. **37**(10): p. 297-303.

109. Xu, R., et al., *Effectiveness of N-Acetylcysteine for the Prevention of Contrast-Induced Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.* J Am Heart Assoc, 2016. **5**(9).

110. McCullough, P.A., et al., *Acute renal failure after coronary intervention: incidence, risk factors, and relationship to mortality.* Am J Med, 1997. **103**(5): p. 368-75.

111. Zhou, L. and H. Chen, *Prevention of contrast-induced nephropathy with ascorbic acid.* Intern Med, 2012. **51**(6): p. 531-5.

112. Spargias, K., et al., *Ascorbic acid prevents contrast-mediated nephropathy in patients with renal dysfunction undergoing coronary angiography or intervention.* Circulation, 2004. **110**(18): p. 2837-42.

113. Sadat, U., et al., *Does ascorbic acid protect against contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing coronary angiography: a systematic review with meta-analysis of randomized, controlled trials.* J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(23): p. 2167-75.

114. Ali-Hasan-Al-Saegh, S., et al., *Protective effects of anti-oxidant supplementations on contrast-induced nephropathy after coronary angiography: an updated and comprehensive meta-analysis and systematic review.* Kardiol Pol, 2016. **74**(7): p. 610-26.

115. Boscheri, A., et al., *Failure of ascorbic acid to prevent contrast-media induced nephropathy in patients with renal dysfunction.* Clin Nephrol, 2007. **68**(5): p. 279-86.

116. Leoncini, M., et al., *Statin treatment before percutaneous cononary intervention.* J Thorac Dis, 2013. **5**(3): p. 335-42.

117. Yang, Y., Y.X. Wu, and Y.Z. Hu, *Rosuvastatin Treatment for Preventing Contrast-Induced Acute Kidney Injury After Cardiac Catheterization: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.* Medicine (Baltimore), 2015. **94**(30): p. e1226.

118. Liu, Y., et al., *Comparison of the efficacy of rosuvastatin versus atorvastatin in preventing contrast induced nephropathy in patient with chronic kidney disease undergoing percutaneous coronary intervention.* PLoS One, 2014. **9**(10): p. e111124.

119. Kucuk, A., et al., *The effects of PDE5 inhibitory drugs on renal ischemia/reperfusion injury in rats.* Mol Biol Rep, 2012. **39**(10): p. 9775-82.

120. Almeida, L.S., et al., *Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats.* Hum Exp Toxicol, 2016. **35**(11): p. 1194-1202.

121. Kim, B.J., et al., *Effect of N-acetylcysteine on cystatin C-based renal function after elective coronary angiography (ENABLE Study): a prospective, randomized trial.* Int J Cardiol, 2010. **138**(3): p. 239-45.

122. Malyszko, J., et al., *Urinary and serum biomarkers after cardiac catheterization in diabetic patients with stable angina and without severe chronic kidney disease.* Ren Fail, 2009. **31**(10): p. 910-9.

123. Connolly, M., et al., *Prediction of contrast induced acute kidney injury using novel biomarkers following contrast coronary angiography.* QJM, 2018. **111**(2): p. 103-110.

124. Hirsch, R., et al., *NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children.* Pediatr Nephrol, 2007. **22**(12): p. 2089-95.

125. Liao, B., et al., *Evaluation of a Diagnostic Test of Serum Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Urine KIM-1 in Contrast-Induced Nephropathy (CIN).* Med Sci Monit, 2019. **25**: p. 565-570.

126. Filiopoulos, V., D. Biblaki, and D. Vlassopoulos, *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a promising biomarker of contrast-induced nephropathy after computed tomography.* Ren Fail, 2014. **36**(6): p. 979-86.

127. Qureshi, A.C., et al., *23 Serum ngal identifies contrast nephropathy early in patients with diabetes mellitus and chronic kidney disease undergoing coronary angiography and angioplasty.* Heart, 2011. **97**(Suppl 1): p. A17-A18.

128. Ribitsch, W., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) fails as an early predictor of contrast induced nephropathy in chronic kidney disease (ANTI-CI-AKI study).* Sci Rep, 2017. **7**: p. 41300.

129. Akdeniz, D., et al., *Is Kidney Injury Molecule 1 a Valuable Tool for the Early Diagnosis of Contrast-Induced Nephropathy?* J Investig Med, 2015. **63**(8): p. 930-4.

130. Mandurino-Mirizzi, A., et al., *Elevated serum uric acid is a predictor of contrast associated acute kidney injury in patient with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2021. **31**(7): p. 2140-2143.

131. Thum, T., et al., *Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine.* J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(9): p. 1693-701.

132. Gunebakmaz, O., et al., *Increased serum asymmetric dimethylarginine level is an independent predictor of contrast-induced nephropathy.* Turk Kardiyol Dern Ars, 2013. **41**(7): p. 581-8.

133. Aspelin, P., et al., *Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography.* N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 491-9.

134. Kiss, N. and P. Hamar, *Histopathological Evaluation of Contrast-Induced Acute Kidney Injury Rodent Models.* Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 3763250.

135. Graur, D., L. Duret, and M. Gouy, *Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies).* Nature, 1996. **379**(6563): p. 333-5.

136. Bhargava, A.S., et al., *Effect of three non-ionic contrast media on rats and rabbits with regard to renal changes. Interspecies comparison.* Arzneimittelforschung, 1990. **40**(7): p. 822-9.

137. Lauver, D.A., et al., *Sildenafil citrate for prophylaxis of nephropathy in an animal model of contrast-induced acute kidney injury.* PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113598.

138. Mamoulakis, C., et al., *Contrast-induced nephropathy in an animal model: Evaluation of novel biomarkers in blood and tissue samples.* Toxicol Rep, 2019. **6**: p. 395-400.

139. Eybl, V., et al., *Effect of melatonin, curcumin, quercetin, and resveratrol on acute ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)-induced renal oxidative damage in rats.* Hum Exp Toxicol, 2008. **27**(4): p. 347-53.

140. Fragkiadoulaki, E., et al., *Resveratrol and lycopene ameliorate contrast-induced nephropathy in a rabbit model.* Hum Exp Toxicol, 2022. **41**: p. 9603271221145355.

141. Martens-Lobenhoffer, J., et al., *Validated high performance liquid chromatography-UV detection method for the determination of daptomycin in human plasma.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **875**(2): p. 546-50.

142. Devrim, E., et al., *Oxidant stress due to non ionic low osmolar contrast medium in rat kidney.* Indian J Med Res, 2009. **130**(4): p. 433-6.

143. Diamantis, A., et al., *A brief chronicle of cytology: from Janssen to Papanicolaou and beyond.* Diagn Cytopathol, 2013. **41**(6): p. 555-64.

144. Mamoulakis, C., et al., *Contrast-induced nephropathy: Basic concepts, pathophysiological implications and prevention strategies.* Pharmacol Ther, 2017. **180**: p. 99-112.

145. Bellomo, R., et al., *Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group.* Crit Care, 2004. **8**(4): p. R204-12.

146. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury.* Crit Care, 2007. **11**(2): p. R31.

147. *ACR Committee on Drugs and Contrast Media. ACR Manual on Contrast Media version 10.3. 2020*.

148. Golshahi, J., H. Nasri, and M. Gharipour, *Contrast-induced nephropathy; A literature review.* J Nephropathol, 2014. **3**(2): p. 51-6.

149. Boger, R.H., *Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor.* J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2842S-2847S; discussion 2853S.

150. Heunisch, F., et al., *ADMA predicts major adverse renal events in patients with mild renal impairment and/or diabetes mellitus undergoing coronary angiography.* Medicine (Baltimore), 2017. **96**(6): p. e6065.

151. Khan, Z. and M. Pandey, *Role of kidney biomarkers of chronic kidney disease: An update.* Saudi J Biol Sci, 2014. **21**(4): p. 294-9.

152. Lu, T.M., et al., *Asymmetric dimethylarginine predicts the risk of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing cardiac catheterization.* Atherosclerosis, 2016. **254**: p. 161-166.

153. Develi-Is, S., et al., *Resveratrol improves high-fructose-induced vascular dysfunction in rats.* Can J Physiol Pharmacol, 2014. **92**(12): p. 1021-7.

154. Frombaum, M., et al., *Piceatannol is more effective than resveratrol in restoring endothelial cell dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression and activity after high-glucose oxidative stress.* Free Radic Res, 2011. **45**(3): p. 293-302.

155. Han, S., et al., *Resveratrol affects histone 3 lysine 27 methylation of vessels and blood biomarkers in DOCA salt-induced hypertension.* Mol Biol Rep, 2015. **42**(1): p. 35-42.

156. Hsu, C.N., et al., *Perinatal Resveratrol Therapy Prevents Hypertension Programmed by Maternal Chronic Kidney Disease in Adult Male Offspring: Implications of the Gut Microbiome and Their Metabolites.* Biomedicines, 2020. **8**(12).

157. Hsu, C.N., et al., *Maternal Resveratrol Therapy Protects Male Rat Offspring against Programmed Hypertension Induced by TCDD and Dexamethasone Exposures: Is It Relevant to Aryl Hydrocarbon Receptor?* Int J Mol Sci, 2018. **19**(8).

158. Tabatabaie, M., et al., *The effect of resveratrol supplementation on serum levels of asymmetric de-methyl-arginine and paraoxonase 1 activity in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind controlled trial.* Phytother Res, 2020. **34**(8): p. 2023-2031.

159. Yuan, Q., et al., *Inhibitory effect of resveratrol derivative BTM-0512 on high glucose-induced cell senescence involves dimethylaminohydrolase/asymmetric dimethylarginine pathway.* Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(5-6): p. 630-5.

160. Tsitsimpikou, C., et al., *Dietary supplementation with tomato-juice in patients with metabolic syndrome: a suggestion to alleviate detrimental clinical factors.* Food Chem Toxicol, 2014. **74**: p. 9-13.

161. Boozari, M. and H. Hosseinzadeh, *Preventing contrast-induced nephropathy (CIN) with herbal medicines: A review.* Phytother Res, 2021. **35**(3): p. 1130-1146.

162. Manda, P., et al., *Study of contrast-induced oxidative stress in nondiabetic patients undergoing coronary angiography.* Saudi J Kidney Dis Transpl, 2019. **30**(1): p. 45-52.

163. Mas-Bargues, C., et al., *Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease.* Arch Biochem Biophys, 2021. **709**: p. 108941.

164. Rubio, C.P., et al., *Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update.* BMC Vet Res, 2016. **12**(1): p. 166.

165. Nandi, A., et al., *Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases.* Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: p. 9613090.

166. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis.* Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 42-59.

167. Aksu, F., et al., *Antioxidant and renoprotective effects of sphingosylphosphorylcholine on contrast-induced nephropathy in rats.* Ren Fail, 2016. **38**(7): p. 1089-98.

168. Aly, H.A., H.A. El-Beshbishy, and Z.M. Banjar, *Mitochondrial dysfunction induced impairment of spermatogenesis in LPS-treated rats: modulatory role of lycopene.* Eur J Pharmacol, 2012. **677**(1-3): p. 31-8.

169. El-Sheshtawy, S.M., et al., *Aflatoxicosis in Pekin duckling and the effects of treatments with lycopene and silymarin.* Vet World, 2021. **14**(3): p. 788-793.

170. Hoseini, A., et al., *The effects of resveratrol on metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease.* Food Funct, 2019. **10**(9): p. 6042-6051.

171. Saracoglu, G., H. Bas, and D. Pandir, *Furan-induced cardiotoxicity in diabetic rats and protective role of lycopene.* J Food Biochem, 2019. **43**(3): p. e12738.

172. Wang, X.L., et al., *The Effects of Resveratrol on Inflammation and Oxidative Stress in a Rat Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease.* Molecules, 2017. **22**(9).

173. Kongkham, S., S. Sriwong, and A. Tasanarong, *Protective effect of alpha tocopherol on contrast-induced nephropathy in rats.* Nefrologia, 2013. **33**(1): p. 116-23.

174. Abd El-Fattah, A.A., et al., *Resveratrol and curcumin ameliorate di-(2-ethylhexyl) phthalate induced testicular injury in rats.* Gen Comp Endocrinol, 2016. **225**: p. 45-54.

175. Javid, A.Z., et al., *Impact of resveratrol supplementation on inflammatory, antioxidant, and periodontal markers in type 2 diabetic patients with chronic periodontitis.* Diabetes Metab Syndr, 2019. **13**(4): p. 2769-2774.

176. Sheikholeslami, S.A., et al., *The evaluation of lycopene and cysteamine supplementation effects on sperm and oxidative stress parameters during chilled storage of canine semen.* Reprod Domest Anim, 2020. **55**(9): p. 1229-1239.

177. Baykara, M., et al., *In vivo nephroprotective efficacy of propolis against contrast-induced nephropathy.* Diagn Interv Radiol, 2015. **21**(4): p. 317-21.

178. Abdel-Daim, M.M., et al., *Lycopene and resveratrol ameliorate zinc oxide nanoparticles-induced oxidative stress in Nile tilapia, Oreochromis niloticus.* Environ Toxicol Pharmacol, 2019. **69**: p. 44-50.

179. Elbe, H., et al., *Resveratrol reduces light and electron microscopic changes in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats: Role of iNOS expression.* Ultrastruct Pathol, 2018. **42**(1): p. 39-48.

180. Rezaee, M.A., et al., *Protective effect of erythropoietin on myocardial apoptosis in rats exposed to carbon monoxide.* Life Sci, 2016. **148**: p. 118-24.

181. Randhawa, P.S., et al., *Clinical significance of renal biopsies showing concurrent acute rejection and tacrolimus-associated tubular vacuolization.* Transplantation, 1999. **67**(1): p. 85-9.

182. Tervahartiala, P., et al., *Contrast media-induced renal morphologic lesions in diabetic rats.* Acta Radiol, 1993. **34**(3): p. 220-5.

183. Aurelio, A. and A. Durante, *Contrast-induced nephropathy in percutaneous coronary interventions: pathogenesis, risk factors, outcome, prevention and treatment.* Cardiology, 2014. **128**(1): p. 62-72.

184. Wu, Y., et al., *Resveratrol Attenuates Oxalate-Induced Renal Oxidative Injury and Calcium Oxalate Crystal Deposition by Regulating TFEB-Induced Autophagy Pathway.* Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 638759.

185. Atessahin, A., A.O. Ceribasi, and S. Yilmaz, *Lycopene, a carotenoid, attenuates cyclosporine-induced renal dysfunction and oxidative stress in rats.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2007. **100**(6): p. 372-6.

186. Dogukan, A., et al., *A tomato lycopene complex protects the kidney from cisplatin-induced injury via affecting oxidative stress as well as Bax, Bcl-2, and HSPs expression.* Nutr Cancer, 2011. **63**(3): p. 427-34.

187. El-Gerbed, M.S., *Protective effect of lycopene on deltamethrin-induced histological and ultrastructural changes in kidney tissue of rats.* Toxicol Ind Health, 2014. **30**(2): p. 160-73.

188. Tilstra, J.S., et al., *Pharmacologic IKK/NF-kappaB inhibition causes antigen presenting cells to undergo TNFalpha dependent ROS-mediated programmed cell death.* Sci Rep, 2014. **4**: p. 3631.

189. D'Ignazio, L., D. Bandarra, and S. Rocha, *NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses.* FEBS J, 2016. **283**(3): p. 413-24.

190. Kaczorowski, D.J., et al., *Toll-like receptors and myocardial ischemia/reperfusion, inflammation, and injury.* Curr Cardiol Rev, 2009. **5**(3): p. 196-202.

191. Shang, X., et al., *Resveratrol Protects the Myocardium in Sepsis by Activating the Phosphatidylinositol 3-Kinases (PI3K)/AKT/Mammalian Target of*

Rapamycin (mTOR) Pathway and Inhibiting the Nuclear Factor-kappaB (NF-kappaB) Signaling Pathway. Med Sci Monit, 2019. **25**: p. 9290-9298.

192. Zhao, Q., et al., *Lycopene attenuates chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome by inhibiting oxidative stress and inflammation via the interaction of NF-kappaB, MAPKs, and Nrf2 signaling pathways in rats.* Andrology, 2020. **8**(3): p. 747-755.
193. Jamshidzadeh, A., et al., *Effects of tomato extract on oxidative stress induced toxicity in different organs of rats.* Food Chem Toxicol, 2008. **46**(12): p. 3612-5.
194. Leonard, S.S., et al., *Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **309**(4): p. 1017-26.
195. Chen, H., X. Yu, and L. Ma, *Synergistic effect of curcumin and resveratrol on the prevention of contrast-induced nephropathy by suppressing inflammation via regulating signaling pathways of microRNA-17/TXNIP/NRLP3 and microRNA-30c/FOXO3/NRLP3.* Biotechnol Appl Biochem, 2022.
196. Wang, Y., et al., *Resveratrol Protects Against Post-Contrast Acute Kidney Injury in Rabbits With Diabetic Nephropathy.* Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 833.
197. Chen, Y.H., Y.C. Fu, and M.J. Wu, *Does Resveratrol Play a Role in Decreasing the Inflammation Associated with Contrast Induced Nephropathy in Rat Model?* J Clin Med, 2019. **8**(2).
198. Hong, Y.A., et al., *Resveratrol Ameliorates Contrast Induced Nephropathy Through the Activation of SIRT1-PGC-1alpha-Foxo1 Signaling in Mice.* Kidney Blood Press Res, 2017. **42**(4): p. 641-653.

10. ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Η Ειρήνη Φραγκιαδουλάκη γεννήθηκε στο Ηράκλειο της Κρήτης στις 5 Απριλίου το 1991. Ολοκλήρωσε τη δευτεροβάθμια εκπαίδευση στο Λύκειο Ν. Αλικαρνασσού, Ηρακλείου, Κρήτης το 2009 και την ίδια χρονιά άρχισε να σπουδάζει στο Δημοκρίτειο Πανεπιστήμιο Θράκης στην Αλεξανδρούπολη, στο Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής. Μετά την ολοκλήρωση των σπουδών της, το 2015 έγινε μέλος του Εργαστηρίου Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και συμμετείχε σε μια σειρά ερευνητικών προγραμμάτων. Το 2023 ολοκλήρωσε το διδακτορικό της υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Ουρολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης κ. Χαράλαμπου Μαμουλάκη στο Εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και συνέχισε να συμμετέχει σε τοπικά και διεθνή ερευνητικά προγράμματα, όπου απέκτησε γνώσεις πάνω σε διάφορες αναλυτικές χημικές και βιολογικές τεχνικές, καθώς και τους τρόπους διεξαγωγής in vivo και in vitro πειραμάτων. Η ερευνητική εμπειρία της Ειρήνης καλύπτει τα πεδία της τοξικολογίας, της μοριακή βιολογίας, της (επι)γενετικής και της βιοπληροφορικής.

11. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΩΝ - ΠΕΡΙΛΗΨΕΩΝ/ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΩΝ

1. **Fragkiadoulaki E**, Tsatsakis A, Nikitovic D, Georgiadis G, Kalogeraki A, Kaloudis K, Alegkakis A, Karzi V, Mamoulakis C. Resveratrol and lycopene ameliorate contrast-induced nephropathy in a rabbit model. Hum Exp Toxicol. 2022 Jan-Dec;41:9603271221145355.
2. Mamoulakis C, Tsarouhas K, **Fragkiadoulaki I**, Heretis I, Wilks MF, Spandidos DA, Tsitsimpikou C, Tsatsakis A. Contrast-induced nephropathy: Basic concepts, pathophysiological implications and prevention strategies. Pharmacol Ther. 2017 Dec;180:99-112.
3. **Ε. Φραγκιαδουλάκη**, Γ. Γεωργιάδης, Χ. Μαυρίδης, Ι. Σκαμάγκας, Ν. Νικίτοβιτς, Ι. Τσιαούσσης, Α. Καλογεράκη, Χ. Τσιτσιμπίκου, Α. Τσατσάκης, Χ. Μαμουλάκης. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά ρεσβερατρόλη και λυκοπένιο προφυλάσσουν από την εμφάνιση οξείας νεφρικής βλάβης από σκιαγραφικές ουσίες ενισχύοντας τη σύνθεση μονοξειδίου του αζώτου: Αποτελέσματα σε ζωικό μοντέλο. 25ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 06-09 Οκτωβρίου 2022, Αθήνα
4. **Ε. Φραγκιαδουλάκη**, Γ. Γεωργιάδης, Χ. Μαυρίδης, Ι. Σκαμάγκας, Ν. Νικίτοβιτς, Ι. Τσιαούσσης, Α. Καλογεράκη, Χ. Τσιτσιμπίκου, Α. Τσατσάκης, Χ. Μαμουλάκης. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά ρεσβερατρόλη και λυκοπένιο προλαμβάνουν τις κυτταροτοξικές επιδράσεις των ιωδιούχων σκιαγραφικών: Αποτελέσματα ανοσοκυτταροχημικής ανάλυσης σε ζωικό μοντέλο. 25ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 06-09 Οκτωβρίου 2022, Αθήνα
5. **Ε. Φραγκιαδουλάκη**, Γ. Γεωργιάδης, Χ. Μαυρίδης, Ι. Σκαμάγκας, Ν. Νικίτοβιτς, Ι. Τσιαούσσης, Α. Καλογεράκη, Χ. Τσιτσιμπίκου, Α. Τσατσάκης, Χ. Μαμουλάκης. Τα φυσικά αντιοξειδωτικά Ρεσβερατρόλη και Λυκοπένιο προφυλάσσουν την νεφροπάθεια από σκιαγραφικές ουσίες μειώνοντας το οξειδωτικό στρες: Αποτελέσματα σε ζωικό μοντέλο. 25ο Πανελλήνιο Ουρολογικό Συνέδριο, 06-09 Οκτωβρίου 2022, Αθήνα

12. ΟΚΟΝΟΜΙΚΗ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

This project was partially funded by the Special Account for Research Funds of the University of Crete (SARF UoC No 3550) and the General Secretariat for Research and Innovation of Greece under the framework of EuroNanoMed III JTC 2018 project name: "CurcumAGE".