

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΠΑΝΤΩΝΗ ΧΡΥΣΟΥΛΑ

ΟΞΕΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΧΡΗΣΗ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΠΟΥ
ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΣΤΕΦΑΝΙΟΓΡΑΦΙΑ – ΑΓΓΕΙΟΠΛΑΣΤΙΚΗ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ
ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2017

Οξεία νεφρική τοξικότητα από χρήση σκιαγραφικών σε ασθενείς που υποβλήθηκαν
σε στεφανιογραφία – αγγειοπλαστική: ο ρόλος του οξειδωτικού στρες

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΤΣΑΡΟΥΧΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ (επιβλέπων): MD, MSc, PhD, ERT, Ιατρός Καρδιολόγος,
Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ: PhD, Post Doc, ERT, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών
Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΝΕΠΚΑ ΧΑΡΙΤΙΝΗ: MD, PhD, Ιατρός Κυτταροπαθολόγος, Πανεπιστημιακό
Νοσοκομείο Λάρισας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 ΟΞΕΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΧΡΗΣΗ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΩΝ (CIN).....	9
1.1.1 Γενικά.....	9
1.1.2 Σκιαγραφικά μέσα	10
1.1.3 Παθοφυσιολογία	12
1.1.4 Στρατηγικές ανίχνευσης και έγκαιρης διάγνωσης	14
1.1.5 Στρατηγικές προφύλαξης.....	17
1.1.6 Αντιμετώπιση	21
1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	22
1.2.1 Ελεύθερες ρίζες	22
1.2.2 Πηγές ελευθέρων ριζών.....	23
1.2.3 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών.....	25
1.2.4 Αντιοξειδωτικές ουσίες και μηχανισμοί	26
1.2.5 Οξειδωτικό στρες.....	28
1.3 ΜΕΛΕΤΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΧΡΗΣΗ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΩΝ (CIN) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ	29
1.3.1 Μελέτες σε ανθρώπους	29
1.3.2 Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα	33
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	39
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
3.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	40
3.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ (ΜΕΘΟΔΟΙ).....	41
3.2.1 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε πλάσμα - TAC (Total Antioxidant Capacity) ..	41
3.2.2 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) σε πλάσμα	43
3.2.3 Πρωτεϊνικά καρβονύλια (Carbonyls)	44
3.2.4 Επεξεργασία ερυθροκυτταρικού αιμολύματος	47
3.2.5 Γλουταθειόνη (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.....	48
3.2.6 Δραστικότητα της Καταλάσης (CAT)	50
3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	53
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	54

4.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ	54
4.2 ΚΛΑΣΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	55
4.2.1 Επίπεδα ουρίας	55
4.2.2 Επίπεδα κρεατινίνης	55
4.3 ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ	56
4.3.1 Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	56
4.3.2 Επίπεδα TBARS	57
4.3.3 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων	57
4.3.4 Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	58
4.3.5 Επίπεδα καταλάσης (CAT).....	58
4.4 ΟΛΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΙΜΩΝ (BIVARIATE CORRELATION)	59
4.4.1 Συσχέτιση τιμών ανά χρονική στιγμή	59
4.4.2 Συσχέτιση τιμών μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών	59
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	61
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΩΝ ΜΕΣΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΩΣΜΩΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΟ ΙΞΩΔΕΣ.....	11
ΕΙΚΟΝΑ 2. ΓΕΝΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΟΞΕΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΑ ΜΕΣΑ.....	13
ΕΙΚΟΝΑ 3. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΚΑΙ ΕΛΕΥΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ.....	22
ΕΙΚΟΝΑ 4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ.....	24
ΕΙΚΟΝΑ 5. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	28
ΕΙΚΟΝΑ 6. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΒΑ (1) ΜΕ ΜΔΑ (2), ΠΟΥ ΟΔΗΓΕΙ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΤΒΑ-ΜΔΑ. .	43
ΕΙΚΟΝΑ 8. ΣΥΝΤΑΚΤΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ	48
ΕΙΚΟΝΑ 9. ΑΝΑΚΥΚΛΩΣΗ ΚΑΙ ΑΡΧΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ.....	49
ΕΙΚΟΝΑ 10. ΦΑΣΜΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΤΟΥ 2-ΝΙΤΡΟ-5-ΘΕΙΟΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (DOJINDO MOLECULAR TECHNOLOGIES).....	50
ΕΙΚΟΝΑ 11. ΜΟΝΟΠΑΤΙ ΑΝΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ H ₂ O ₂ ΣΕ H ₂ O.....	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΤΥΠΟΙ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ.....	28
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ TAC	42
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ.....	47
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ GSH.....	49

ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΣΕΙΡΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΚΑΙ ΟΙ ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ, ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ.....	52
ΠΙΝΑΚΑΣ 6. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ.	54
ΠΙΝΑΚΑΣ 7. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΙΜΩΝ ΑΝΑ ΧΡΟΝΙΚΗ ΣΤΙΓΜΗ.....	59
ΠΙΝΑΚΑΣ 8. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΙΜΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΧΡΟΝΙΚΩΝ ΣΤΙΓΜΩΝ.....	60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. ΕΠΙΠΕΔΑ ΟΥΡΙΑΣ.	55
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΡΕΑΤΙΝΙΝΗΣ.....	55
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4. ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΑΣ.....	56
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5. ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΒΑΡS.....	57
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6. ΕΠΙΠΕΔΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ.....	57
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7. ΕΠΙΠΕΔΑ GSH.	58
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8. ΕΠΙΠΕΔΑ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ.	58

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η έκθεση των ασθενών σε σκιαγραφικά μέσα κατά την διάρκεια επεμβατικών διαδικασιών όπως είναι η στεφανιογραφία και η αγγειοπλαστική ενέχει τον κίνδυνο δημιουργίας οξείας νεφροπάθειας, η οποία συνήθως αναστρέφεται. Στην παθοφυσιολογία της νεφροτοξικότητας από σκιαγραφικά μέσα εμπλέκεται και η δημιουργία ελευθέρων ριζών και οξειδωτικού στρες. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες και κλασικών δεικτών νεφρικής λειτουργίας για την διευκρίνιση του ρόλου που μπορεί να έχει το οξειδωτικό στρες στην οξεία νεφρική τοξικότητα που προκαλείται από την χρήση σκιαγραφικών μέσων. Στην μελέτη συμμετείχαν 20 νεφρολογικά υγιείς ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία/αγγειοπλαστική, από τους οποίους λήφθηκαν δείγματα αίματος σε τρεις χρονικές στιγμές: πριν την χορήγηση του σκιαγραφικού ($t = 0$), αμέσως μετά την επεμβατική διαδικασία ($t = 1$) και κατά το εξιτήριο των ασθενών (2 - 4 ώρες μετά – $t = 2$). Για την αξιολόγηση της νεφρικής λειτουργίας και την εμφάνιση νεφροπάθειας από το σκιαγραφικό μετρήθηκαν οι κλασικοί δείκτες ουρία και κρεατινίνη, καθώς και πέντε δείκτες οξειδωτικού στρες (ολική αντιοξειδωτική ικανότητα – TAC, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ – TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια – CARBONYLS, ανηγμένη γλουταθειόνη – GSH, καταλάση – CAT). Στα αποτελέσματα οι κλασικοί δείκτες νεφρικής λειτουργίας δεν παρουσίασαν ουσιαστική μεταβολή. Όσον αφορά τους δείκτες οξειδωτικού στρες, η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) αυξήθηκε σημαντικά (177%) ενώ τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μειώθηκαν σημαντικά (27%) 2 – 4 ώρες μετά την επεμβατική διαδικασία. Στατιστικά σημαντική μείωση είχαμε, επίσης, στα πρωτεϊνικά καρβονύλια (31%) αμέσως μετά την επεμβατική διαδικασία. Οι υπόλοιποι 3 δείκτες (TAC, TBARS, CAT) δεν μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά.

ABSTRACT

Contrast media administration to healthy patients during invasive procedures such as coronary angiography and PCI can cause contrast induced nephropathy (CIN). In the pathophysiology of CIN the generation of free radicals and oxidative stress is involved. The aim of the present study was to assess oxidative stress markers and biochemical indices of renal function, in order to clarify the potential role of oxidative stress in CIN. Twenty (20) patients with normal renal function who underwent coronary angiography/PCI were enrolled. Blood samples were taken at three different time intervals: before contrast media administration ($t = 0$), at the end of the invasive procedure ($t = 1$) and at the patients discharge (2 - 4 hours after the invasive procedure – $t = 2$). For the evaluation of renal function urea and creatinine were monitored, and five oxidative stress biomarkers, namely total antioxidant capacity – TAC, thiobarbituric acid reactive substances – TBARS, protein carbonyls, reduced glutathione – GSH and catalase activity – CAT, were also measured. Urea and creatinine remained practically unchanged. As far as oxidative stress markers are concerned, GSH levels were significantly increased (177%), while protein carbonyls significantly decreased (27%) 2 – 4 hours after the invasive procedure. Furthermore, protein carbonyls showed a statistically significant reduction of 31% right after the invasive procedure. As for the other three biomarkers (TAC, TBARS, CAT), no statistically significant changes were observed.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΞΕΙΑ ΝΕΦΡΙΚΗ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΑΠΟ ΧΡΗΣΗ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΩΝ (CIN)

1.1.1 Γενικά

Με την πάροδο του χρόνου αυξάνεται όλο και περισσότερο η έκθεση των ασθενών σε σκιαγραφικά μέσα, μέσα από επεμβατικές διαδικασίες όπως η στεφανιογραφία/αγγειοπλαστική και η αξονική τομογραφία. Εκτιμάται ότι περίπου 60 εκατομμύρια ανθρώπων παγκοσμίως εκτίθενται σε σκιαγραφικά μέσα κάθε χρόνο. [1] [2] Ένας μεγάλος κίνδυνος που προκύπτει από αυτό είναι η οξεία νεφρική τοξικότητα (Contrast Induced Nephropathy - CIN) που ορίζεται ως η νεφρική βλάβη που οφείλεται σε ενδοαγγειακή χορήγηση σκιαγραφικών μέσων (Contrast Media - CM). [3] [4] [5] Θεωρείται ότι είναι η τρίτη αιτία νεφρικής βλάβης στην κατηγορία των ενδονοσοκομειακών νοσημάτων. [6] [7] Επηρεάζει το 1 - 2% του γενικού πληθυσμού και πάνω από το 50% των ευπαθών ομάδων που υποβάλλονται σε στεφανιογραφία (Coronary Angiography - CA) ή διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση – αγγειοπλαστική (Percutaneous Coronary Angioplasty - PCI). [8] [7]

Διαγνωστικά η CIN χαρακτηρίζεται από αύξηση της κρεατινίνης (serum creatinine - SCr) κατά 0.5 mg/dL ή αλλιώς αύξησή της κατά 25% σε χρονικό διάστημα 72 ωρών από την χορήγηση του σκιαγραφικού, με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει εναλλακτική εξήγηση. [5] [7] [2]

Ο πιο σημαντικός παράγοντας κινδύνου που μπορεί να ευνοήσει την δημιουργία της CIN είναι η προϋπάρχουσα χρόνια νεφροπάθεια (Chronic Kidney Disease), που χαρακτηρίζεται από επίπεδα eGFR<60mL. [9] [10] Άλλοι σημαντικοί παράγοντες κινδύνου είναι η αφυδάτωση καθώς και η υπόταση (που έχει σαν αποτέλεσμα την έλλειψη αιμάτωσης των νεφρών, άρα αυξάνονται οι πιθανότητες πρόκλησης νεφρικής ισχαιμίας από την έγχυση σκιαγραφικού). [7] Επίσης ο σακχαρώδης διαβήτης είναι ένας σημαντικός, ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου ανάπτυξης CIN, ειδικά όταν συνυπάρχει με χρόνια νεφροπάθεια. Ενδιαφέρον παρουσιάζει έρευνα που συνδέει τα επίπεδα γλυκόζης με την ύπαρξη νεφροτοξικότητας από σκιαγραφικά σε ασθενείς που υποβάλλονται σε στεφανιογραφία. Αξιολογήθηκαν

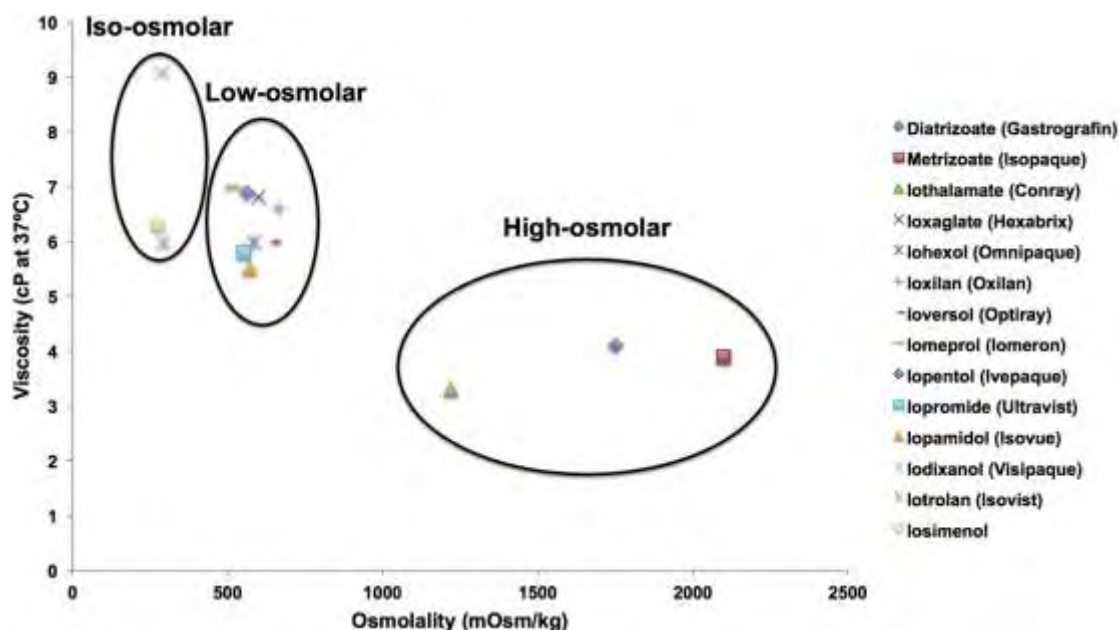
6.358 ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία. Η έρευνα έδειξε ότι τα ανεβασμένα επίπεδα γλυκόζης πριν την επεμβατική διαδικασία σχετίζονται με μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση CIN στους ασθενείς χωρίς διάγνωση διαβήτη, σε αντίθεση με τους ασθενείς που είχαν διαβήτη όπου δεν υπήρχε συσχέτιση με CIN. [11] Στους παράγοντες κινδύνου βέβαια συγκαταλέγεται και η συνακόλουθη χρήση κάποιων άλλων φαρμάκων που μπορεί να έχουν νεφροτοξική δράση, όπως τα αντιβιοτικά αμινογλυκοσίδη και αμφοτερικίνη, όπως επίσης και η συνακόλουθη χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων. [12] [13] Τέλος, οι μεγάλες ηλικίες (περίπου από 75 ετών και πάνω) [7] [14] καθώς και η αναιμία (πολύ χαμηλός αιματοκρίτης) [15] σχετίζονται άμεσα με την πρόκληση CIN.

1.1.2 Σκιαγραφικά μέσα

Εκτός από τους προαναφερθέντες παράγοντες που σχετίζονται με τον ασθενή, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν και τα σκιαγραφικά μέσα που χρησιμοποιούνται (δηλαδή παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με την διαδικασία). Ακολούθως λοιπόν, θα αναφερθούμε στα είδη των σκιαγραφικών, στην οδό χορήγησής τους, καθώς και στη δοσολογία.

Τα σκιαγραφικά μέσα ταξινομούνται ανάλογα με την ωσμωτικότητα (osmolality) και το ιξώδες (viscosity) και με το αν είναι ιονικά ή μη. Η σύγκριση της ωσμωτικότητας του σκιαγραφικού με αυτή του πλάσματος έχει ιδιαίτερη σημασία στη CIN. Η ωσμωτικότητα εκφράζει την αναλογία των ατόμων ιωδίου και των σωματιδίων του σκιαγραφικού, το οποίο συνήθως έχει μεγαλύτερη ωσμωτικότητα και υψηλό ιξώδες σε σχέση με το πλάσμα. Όσο μεγαλύτερη είναι η αναλογία ιωδίου – σωματιδίων τόσο μεγαλύτερη εξασθένηση των ακτίνων Χ έχουμε. Από την άλλη ο ιονισμός αφορά την ικανότητα ενός μορίου να διασπάται σε κατιόν και ανιόν (άρα περισσότερα μόρια ανά kilogram νερού, δηλαδή μεγαλύτερη ωσμωτικότητα). Οπότε βλέπουμε ότι τα μη ιονικά σκιαγραφικά είναι λιγότερο ωσμωτικά. Τα ιονικά υψηλής ωσμωτικότητας σκιαγραφικά, λοιπόν, έχουν αναλογία 1,5: 1, τα μη – ιονικά χαμηλής ωσμωτικότητας έχουν 3: 1, ενώ τα μη – ιονικά ισοωσμωτικά έχουν 6: 1. Έχει αποδειχθεί ότι τα χαμηλής ωσμωτικότητας σκιαγραφικά είναι λιγότερο

επιβλαβή από τα υψηλής ωσμωτικότητας όσον αφορά την πρόκληση της CIN. [16] [12] [17] [18] [19]



Εικόνα 1. Απεικόνιση σκιαγραφικών μέσων με βάση την ωσμωτικότητα και το ιξώδες.

ΠΗΓΗ ΕΙΚΟΝΑΣ: [18]

Σε ότι αφορά την οδό χορήγησης, μελέτες έχουν δείξει ότι η πιθανότητα νεφρικής βλάβης αυξάνεται όταν το σκιαγραφικό χορηγείται ενδοαρθριακά από ότι όταν χορηγείται ενδοφλεβίως. [20] [21] Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την στεφανιογραφία/ PCI η ποσότητα του σκιαγραφικού που χορηγείται ενδοαρθριακά είναι μεγαλύτερη από ότι αυτή που χορηγείται κατά την αξονική τομογραφία ενδοφλεβικά, με αποτέλεσμα τα νεφρά να εκτίθενται σε οξεία και μεγαλύτερη συγκέντρωση του σκιαγραφικού. Υπάρχουν βέβαια και μελέτες που υποστηρίζουν ότι και οι δύο οδοί χορήγησης αυξάνουν εξίσου τον κίνδυνο ανάπτυξης CIN. [22] [23]

Και φυσικά η δοσολογία του σκιαγραφικού παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην πιθανότητα πρόκλησης νεφρικής βλάβης. Οι μεγάλες δόσεις και οι πολλαπλές εγχύσεις σκιαγραφικού σε διάστημα 72 ωρών αυξάνουν τον κίνδυνο ανάπτυξης CIN. [16] Αν και δεν έχουν προσδιοριστεί ακόμα τα ακριβή δοσολογικά όρια, έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση πάνω από 30ml χαμηλής ωσμωτικότητας σκιαγραφικού μέσου αυξάνει τον κίνδυνο για CIN στους ασθενείς. [24] [16]

1.1.3 Παθοφυσιολογία

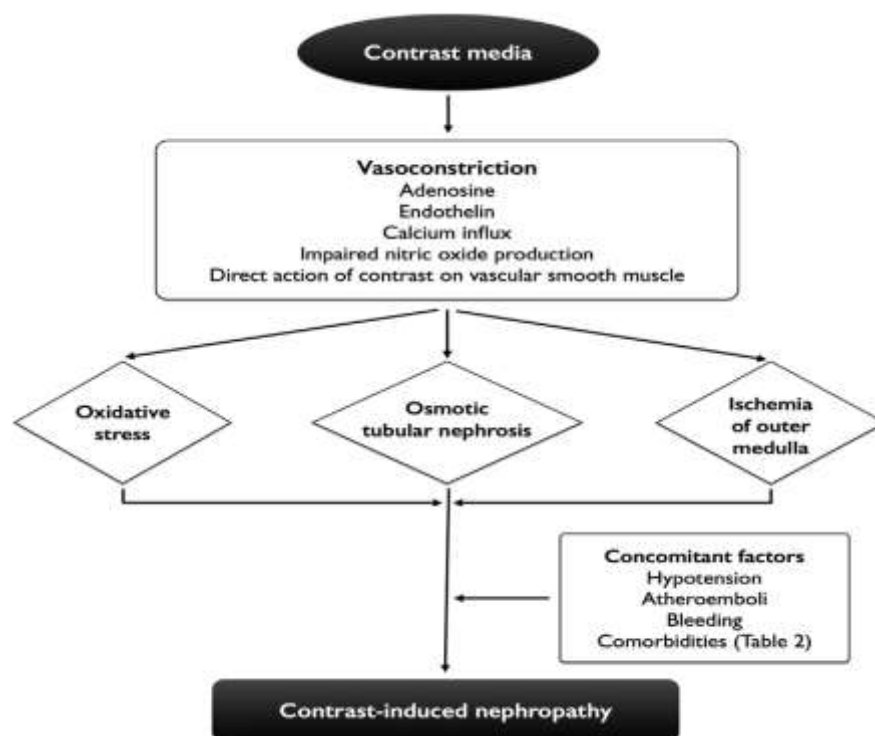
Δυστυχώς οι μηχανισμοί δράσης της CIN είναι περίπλοκοι και όχι απόλυτα κατανοητοί. Οι μέχρι τώρα μελέτες δείχνουν ότι εμπλέκονται αιμοδυναμικές διαταραχές, καθώς και η άμεση νεφροτοξικότητα από το σκιαγραφικό και η παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Γενικά, κάθε νεφρός διακρίνεται σε 2 μούρες: την μυελώδη εσωτερικά και την φλοιώδη εξωτερικά. Από τα νεφρά περνάει το 25% της καρδιακής παροχής αίματος, το μεγαλύτερο μέρος της οποίας πηγαίνει στον νεφρικό φλοιό. Συνεπώς ο νεφρικός μυελός είναι ήδη στα όρια της υποξίας. Η φυσιολογική του λειτουργία και η αποφυγή παθολογικών καταστάσεων εξαρτάται από την ισορροπία που υπάρχει ανάμεσα σε κάποιες αγγειοδιασταλτικές και αγγειοσυσπαστικές ουσίες. [25] [26] [16]

Όταν, λοιπόν, το σκιαγραφικό εισέλθει στον οργανισμό αυξάνεται η παραγωγή ενδοθηλίνης και αδενοσίνης, που είναι αγγειοσυσπαστικοί παράγοντες. Παράλληλα μειώνεται η παραγωγή νιτρικού οξειδίου (NO) και προσταγλανδινών (παράγοντες αγγειοδιαστολής) και διαταράσσονται τα επίπεδα ασβεστίου. [18] [27] [26] [28] Κατά συνέπεια προκαλείται μια παροδική νεφρική αγγειοδιαστολή που ακολουθείται στη συνέχεια από έντονη αγγειοσυστολή. Αυτή η διφασική αιμοδυναμική αντίδραση οδηγεί σε ισχαιμία του νεφρικού μυελού (ελάττωση της κυκλοφορίας του αίματος) και βλάβη των νεφρικών σωληναρίων. [16] Παρόλα αυτά η αιμοδυναμική αυτή διαταραχή είναι ήπια και παροδική, για να προκαλέσει τέτοια βλάβη στο νεφρικά κύτταρα. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι η αιμοδυναμική διαταραχή από μόνη της δεν μπορεί να προκαλέσει ανάπτυξη της CIN, αλλά μπορεί σε τυχόν προϋπάρχουσα ισχαιμία να επιδρούν έμμεσα τα σκιαγραφικά σε όλη αυτή την διαδικασία.

Η άμεση νεφροτοξικότητα από το σκιαγραφικό (χωρίς να σχετίζεται με την αιμοδυναμική κατάσταση του νεφρού) βασίζεται στην απευθείας δράση του σκιαγραφικού στην κυτταρική μεμβράνη των σωληναριακών κυττάρων, επηρεάζοντας έτσι την διαπερατότητά της και την ικανότητα μεταφοράς ουσιών. Επίσης παρατηρείται διαταραχή στη μιτοχονδριακή λειτουργία και απόπτωση των σωληναριακών κυττάρων. [4] [26] [29]

Επίσης, μελετάται ιδιαίτερα ο ρόλος των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού στρες στην δημιουργία ή την ενίσχυση της CIN. Λόγω της υποξίας στον νεφρικό μυελό αυξάνεται η παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Κανονικά η έλλειψη οξυγόνου οδηγεί σε μείωση της παραγωγής ROS στα μιτοχόνδρια. Όμως σε άλλες περιοχές του κυττάρου επαρκές οξυγόνο είναι διαθέσιμο για την αύξηση παραγωγής των ROS. [30] [31] Συγκεκριμένα, κατά την υποξία μεγαλύτερες ποσότητες ATP υδρολύονται σε ADP και AMP, που περαιτέρω μεταβολίζονται σε αδενοσίνη και ινοσίνη και ακολούθως σε υποξανθίνη. Έπειτα, μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη. Παράλληλα όμως η οξειδάση της ξανθίνης παράγει και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), που ανήκει στις δραστικές μορφές οξυγόνου. [32] Επιπλέον οι ROS αντιδρούν με το νιτρικό οξείδιο (NO) δημιουργώντας την ρίζα peroxinitrite ($ONOO^-$) και μειώνοντας περαιτέρω τη βιοδιαθεσιμότητα του NO. [30] [32] Μπορεί όμως η αύξηση παραγωγής των ROS να μην οφείλεται στις αιμοδυναμικές διαταραχές που τυχόν προκαλούνται από το σκιαγραφικό αλλά, ως προϋπάρχοντα μόρια, να επιδρούν έμμεσα ενισχύοντας τη δράση των αγγειοσυστολικών παραγόντων ή να αντιδρούν με το NO και να περιορίζουν την παραγωγή του όπως αναφέραμε παραπάνω. [26]



Εικόνα 2. Γενική απεικόνιση παθοφυσιολογίας της οξείας νεφρικής τοξικότητας από σκιαγραφικά μέσα.

ΠΗΓΗ ΕΙΚΟΝΑΣ: [18]

Όσο πιο σύντομα διασαφηνιστούν οι μηχανισμοί δράσης της νεφροτοξικότητας που προκαλείται από τα σκιαγραφικά μέσα, τόσο πιο εύκολη και αποτελεσματική θα είναι τόσο η προσέγγιση όσο και η πρόληψή της.

1.1.4 Στρατηγικές ανίχνευσης και έγκαιρης διάγνωσης

Γενικά, στην συσχέτιση που ενδεχομένως να υπάρχει ανάμεσα στην CIN και τις ROS βάσιαν διάφορες μελέτες. Για παράδειγμα, η υπερουριχαιμία (υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος στο αίμα) χαρακτηρίζεται εκτός άλλων από αύξηση των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με επακόλουθο την δημιουργία οξειδωτικού στρες και την ύπαρξη νεφρικής δυσλειτουργίας. [33] [34] Έτσι μελετήθηκε η σχέση μεταξύ υπερουριχαιμίας και CIN σε 1950 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία ή/και αγγειοπλαστική. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση των επιπέδων ουρικού οξέος σχετίζεται όντως με τον κίνδυνο ανάπτυξης CIN. [35]

Αντίστοιχα μελέτησαν και τον ρόλο της ομοκυστεΐνης που αποτελεί δομικό συστατικό των πρωτεϊνών. Οι υψηλές συγκεντρώσεις της στον οργανισμό σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο αθηροσκλήρωσης και καρδιαγγειακών παθήσεων, [36] ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα νιτρικού οξειδίου (NO), παραγωγή ελευθέρων ριζών και δημιουργία οξειδωτικού στρες (μηχανισμοί που όπως είδαμε συνδέονται και με την CIN). [37] [38] [39] [40] Μελέτησαν λοιπόν τη σχέση ανάμεσα στην υπερομοκυστεΐναιμία και στην CIN σε 572 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε PCI. Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα ομοκυστεΐνης ήταν σημαντικά αυξημένα σε ασθενείς που εμφάνιζαν CIN από ότι σε ασθενείς χωρίς CIN. Συμπερασματικά είδαν ότι, όντως, η υπερομοκυστεΐναιμία σχετίζεται με έναν μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης CIN. [41] Την έρευνα αυτή έρχονται να επιβεβαιώσουν οι Barbieri L et al. το 2015 με τη μελέτη τους στην οποία συμμετείχαν 876 ασθενείς με χρόνια νεφροπάθεια που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία ή PCI. Τα αποτελέσματα και σε αυτή την κατηγορία ασθενών έδειξαν ότι η αυξημένη ομοκυστεΐνη στο αίμα ενέχει τον κίνδυνο ανάπτυξης CIN. [40]

Συνεπώς μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε δείκτες όπως το ουρικό οξύ και την ομοκυστεΐνη για την προσέγγιση της CIN. Υπάρχει όμως μεγάλος προβληματισμός όσον αφορά τον ρόλο της κρεατινίνης στην ανίχνευση της CIN και εντοπίζουμε και πολλές μελέτες που προσπαθούν να την αντικαταστήσουν με άλλους καταλληλότερους δείκτες. Όπως είδαμε, η CIN χαρακτηρίζεται από $\geq 0.5\text{mg/dL}$ αύξηση της κρεατινίνης (SCr) σε 48 – 72 ώρες μετά την έκθεση στο σκιαγραφικό. Αμφισβητείται όμως ως αποτελεσματικός δείκτης για την CIN, λόγω της μη ευαισθησίας του στις άμεσες αλλαγές της νεφρικής λειτουργίας. Επιπλέον, η κρεατινίνη επηρεάζεται ιδιαίτερα και από άλλους παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η μυϊκή μάζα, η δίαιτα, τα φάρμακα και τα επίπεδα ενυδάτωσης του οργανισμού. [42] Η όσο το δυνατόν πιο σύντομη ανίχνευση νεφροτοξικότητας μετά την έκθεση σε σκιαγραφικό μέσο, είναι πολύ σημαντική για την κατάλληλη αντιμετώπιση των ασθενών. [43] Οι βιοδείκτες που μελετώνται για την έγκαιρη και αποτελεσματική διάγνωση της CIN είναι η NGAL, η συστατίνη C (cystatin C – Cys C), η ιντερλευκίνη 18 (interleukin 18, IL-18), το μόριο νεφρικής βλάβης 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1), η πρωτεΐνη L-FABP (Liver fatty acid-binding protein) και η ρεναλάση (renalase). [44]

A) Η λιποκαλίνη σχετιζόμενη με τη ζελατινάση των ουδετεροφίλων (Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin - NGAL) ή αλλιώς Lipocalin 2 είναι μια 25-kDa πρωτεΐνη, μέλος της οικογένειας λιποκαλινών, η οποία απομονώθηκε από το υπερκείμενο ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων ανθρώπου. [45] Λόγω του χαμηλού μοριακού βάρους της η NGAL περνάει στα ούρα και μπορεί να ανιχνευθεί σ' αυτά. Φυσιολογικά επαναρροφάται στα εγγύς σωληνάκια. [46] Όμως, μετά τον τραυματισμό των εγγύς σωληναρίων λόγω της CIN μειώνεται η επαναρρόφησή της και αυξάνεται η συγκέντρωσή της στα ούρα. Επιπλέον, η NGAL παράγεται στα νεφρικά σωληνάκια σε αντίδραση της νεφρικής βλάβης που δημιουργείται και απεκκρίνεται με τα ούρα. [47] [42] Έτσι, μελετήθηκε ο ρόλος της στην πιο έγκαιρη διάγνωση της CIN σε σχέση με την κρεατινίνη. Συμμετείχαν 100 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επεμβατικές διαδικασίες που αφορούν την καρδιά, όπως η στεφανιογραφία και η PCI. Συμπερασματικά αποδείχθηκε ότι η εξέταση NGAL στα ούρα δίνει αποτελέσματα μέσα σε 24 ώρες από την επεμβατική διαδικασία,

δεδομένο πολύ χρήσιμο για την άμεση επιλογή των ασθενών που χρειάζονται μεγαλύτερη παραμονή στο νοσοκομείο και στενότερη παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας. Αποδεικνύεται, λοιπόν, καλύτερος δείκτης από τον ορό κρεατινίνης (καθώς και τους άλλους κλασικούς δείκτες νεφρικής βλάβης) για την έγκαιρη διάγνωση της CIN. [42]

Β) Η ρεναλάση είναι μια πρωτεΐνη που παράγεται και εκκρίνεται από τα εγγύς σωληναριακά κύτταρα. Περνάει στην κυκλοφορία του αίματος, μεταβολίζει κατεχολαμίνες και μειώνει την πίεση του αίματος (μειώνοντας την καρδιακή συστολή και τον καρδιακό ρυθμό και αποτρέποντας την αντισταθμιστική αύξηση του περιφερικού αγγειακού τόνου). Η μείωση της συγκέντρωσης της ρεναλάσης στο αίμα (που σχετίζεται άμεσα με την αύξηση των κατεχολαμινών) παρατηρείται σε ασθενείς με σοβαρές παθήσεις των νεφρών. Η μείωση της σύνθεσής της με αποτέλεσμα την μείωσή της στο πλάσμα μπορεί να λειτουργήσει ως δείκτης ανίχνευσης της CIN. [44] [48]

Γ) Η συστατίνη C είναι μια μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη με χαμηλή μοριακή μάζα (13kDa). Είναι ένας αναστολέας πρωτεασών που διηθείται μέσω του σπειράματος και επαναρροφάται πλήρως και αποικοδομείται στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα. Μελέτη που έγινε σε 300 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία, με βάση τους οποίους σύγκριναν την αποτελεσματικότητα της συστατίνης C και του ορού κρεατινίνης (sCr) χρονικά, απέδειξε ότι η συστατίνη C είναι πιο γρήγορος δείκτης ανίχνευσης της CIN από την κρεατινίνη. [49]

Δ) Η ιντερλευκίνη 18 (IL-18) είναι μια κυτταροκίνη που ρυθμίζει την πρόοδο της φλεγμονής στα νεφρά και εκκρίνεται από τα τραυματισμένα σωληναριακά κύτταρα. Μελετήθηκε ως δείκτης νεφροτοξικότητας από σκιαγραφικά σε 180 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία ή/και αγγειοπλαστική. Συμπερασματικά παρατήρησαν ότι η IL-18 στα ούρα είναι ένας ικανοποιητικός δείκτης γρήγορης ανίχνευσης της CIN. [50] Μια άλλη έρευνα όμως απέδειξε το αντίθετο για την ιντερλευκίνη 18 (IL-18) ως δείκτη άμεσης ανίχνευσης CIN. Συμμετείχαν 157 ασθενείς που προορίζονταν για PCI και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ανάμεσα στους ασθενείς που ανέπτυξαν CIN και σε αυτούς χωρίς CIN δεν υπήρχε στατιστικά

σημαντική διαφορά στις τιμές της ιντερλευκίνης 18 στα ούρα. Εδώ λοιπόν φαίνεται πως η συγκεκριμένη ουσία δεν είναι δείκτης ανίχνευσης της CIN. [51]

Ε) Το μόριο νεφρικής βλάβης 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στη φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Αυξάνεται όμως δραματικά σε περίπτωση νεφρικής ισχαιμίας. [52] [53] Σε μελέτη όπου συμμετείχαν 3200 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία, βρέθηκαν αυξημένα τα επίπεδα της KIM-1 (στις πρώτες 6 ώρες) σε αυτούς που ανέπτυξαν CIN, σε αντίθεση με αυτούς που δεν είχαν αναπτύξει CIN. Αποδεικνύεται ότι ο συγκεκριμένος δείκτης ίσως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την έγκαιρη διάγνωση της CIN. [54]

Στ) Η L-FABP (Liver fatty acid-binding protein) είναι μια πρωτεΐνη που εκφράζεται στο ήπαρ και στα εγγύς σωληναριακά κύτταρα. Συμμετέχει στη μεταφορά και τον μεταβολισμό λιπαρών οξέων και απορυθμίζεται σε περίπτωση νεφρικού τραυματισμού περνώντας στα ούρα. [55] Μελέτες έχουν δείξει ότι η αύξηση της ουρικής L-FABP πριν την χορήγηση του σκιαγραφικού δηλώνει ότι οι ασθενείς είναι σε μεγάλο κίνδυνο ανάπτυξης CIN. [56] Βέβαια, μελέτη που έγινε σε 96 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε PCI έδειξε ότι τα επίπεδα της L-FABP αυξήθηκαν σημαντικά 24 ώρες μετά την επεμβατική διαδικασία στους ασθενείς που ανέπτυξαν CIN. Φαίνεται, πάντως, ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιείται περισσότερο ως δείκτης πρόβλεψης και προδιάθεσης για νεφροπάθεια από σκιαγραφικά. [48] [57]

1.1.5 Στρατηγικές προφύλαξης

Αφού αναλύσαμε τους πιθανούς τρόπους ανίχνευσης της CIN, θα δούμε στη συνέχεια διάφορες μελέτες που έχουν γίνει για τυχόν προστατευτική δράση ουσιών έναντι της CIN (με βάση τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες) και θα διαπιστώσουμε ότι η αντιοξειδωτική δράση μιας ουσίας δεν συνεπάγεται απαραίτητα προστασία απέναντι στα σκιαγραφικά. Αυτό προκαλεί προβληματισμό όσον αφορά το ρόλο του οξειδωτικού στρες στην CIN και, όπως ήδη αναφέραμε, ανάγκη για πλήρη εξακρίβωση της παθοφυσιολογίας της.

Για παράδειγμα, η Ν-ακετυλοκυστεΐνη (NAC) είναι μια μορφή του αμινοξέος κυστεΐνης που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Έτσι μελέτησαν την επίδραση που

έχει η NAC στην εμφάνιση νεφροτοξικότητας από σκιαγραφικά (CIN) και στην μυοκαρδιακή βλάβη που προκαλείται μετά από ισχαιμία – επαναιμάτωση (Myocardial Reperfusion Injury) που έχει ως επακόλουθο την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS). Η μελέτη έγινε σε 251 ασθενείς με STEMI (ST – segment elevation myocardial infarction) (τύπος καρδιακής προσβολής) που υποβλήθηκαν σε πρωτογενή αγγειοπλαστική. Συμπερασματικά, η ενδοφλέβια χορήγηση υψηλής δόσης NAC μειώνει το οξειδωτικό στρες μετά από επαναιμάτωση σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, αλλά δεν φαίνεται να παίζει ρόλο στην CIN και στο σύνδρομο επαναιμάτωσης που μελετήθηκε. [58]

Από την άλλη, η αλλοπουρινόλη (allopurinol) είναι αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης (το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ) και επιδρά στο μεταβολισμό των πουρινών, περιορίζοντας τη σύνθεση ουρικού οξέος (που όπως είδαμε παραπάνω σε αυξημένα επίπεδα σχετίζεται με τον κίνδυνο ανάπτυξης CIN) [35], χωρίς να παρεμποδίζει τη σύνθεση των κανονικών ζωτικών πουρινών. Σύγκριναν, λοιπόν, την προστατευτική ικανότητα της αλλοπουρινόλης σε σχέση με αυτή της ακετυλοκυστεΐνης, με ταυτόχρονη χορήγηση αλατούχου διαλύματος. Στη μελέτη συμμετείχαν 500 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία, τους οποίους χώρισαν σε 2 γκρουπ: το πρώτο αποτελούνταν από 275 ασθενείς, θετικούς στην στεφανιογραφία (στους οποίους ακολούθησε αγγειοπλαστική) και το δεύτερο από 225 ασθενείς, αρνητικούς στη στεφανιογραφία (οι οποίοι δεν συμμετείχαν περαιτέρω στην μελέτη). Από τους 500 ασθενείς οι 56 εμφάνισαν CIN και υποβλήθηκαν σε αγγειοπλαστική αφού τα επίπεδα κρεατινίνης τους επανήλθαν στα φυσιολογικά. Έπειτα, χώρισαν το πρώτο γκρουπ σε 2 ομάδες: στην πρώτη ομάδα (125 ασθενείς) χρησιμοποιήθηκε το σκιαγραφικό μέσο ιοεξόλη (omnipaque). Από αυτή την ομάδα σε 40 ασθενείς χορήγησαν 12 ώρες πριν και μετά το σκιαγραφικό αλατούχο διάλυμα ενδοφλέβια, σε 40 ασθενείς αντίστοιχα αλατούχο διάλυμα και ακετυλοκυστεΐνη και σε 45 ασθενείς αλατούχο διάλυμα και αλλοπουρινόλη (300mg/ημέρα). Στην δεύτερη ομάδα (150 ασθενείς) χρησιμοποιήθηκε το σκιαγραφικό μέσο ιοδιξανόλη (visipaque). Χορηγήθηκαν και εδώ οι ίδιες ουσίες στις ίδιες συνθήκες και ποσότητες (με τη διαφορά ότι η κάθε ομάδα αποτελούνταν από 50 ασθενείς). Συμπερασματικά

η έρευνα έδειξε ότι η από του στόματος χορήγηση αλλοπουρινόλης σε συνδιασμό με ενυδάτωση προστατεύει σε μεγαλύτερο βαθμό έναντι της CIN από ότι η ακετυλοκουστεΐνη με αλατούχο διάλυμα. [59]

Ακολούθως σε μελέτη που έγινε για τη νεμπιβολόλη τα αποτελέσματα ήταν επίσης αποθαρρυντικά. Η νεμπιβολόλη (Nebivolol) είναι μια τρίτης γενιάς β – αποκλειστής (Beta blocker) που έχει και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ενεργοποιεί την αγγειοδιαστολή διευκολύνοντας την απελευθέρωση νιτρικού οξειδίου (NO). [60] [61] [62] Μελετήθηκε λοιπόν ο ρόλος της στην αποτροπή δημιουργίας CIN. Συμμετείχαν 159 ασθενείς με τουλάχιστον έναν παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση CIN που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία, τους οποίους χώρισαν σε 2 γκρουπ: το ένα ήταν με χορήγηση νεμπιβολόλης ενώ το άλλο όχι. Λόγω της μη ευαισθησίας της κρεατινίνης στην ανίχνευση της CIN, μέτρησαν και τα επίπεδα του δείκτη NGAL. Εξέτασαν δείγματα σε χρονικές στιγμές πριν και 48 ώρες μετά την επεμβατική διαδικασία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η νεμπιβολόλη δεν βοηθάει στην αποτροπή δημιουργίας της CIN. [63]

Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι μελέτες που έγιναν για τον ρόλο των στατινών στην πρόληψη της CIN. Οι στατίνες αποδεικνύεται πως έχουν πλειοτροπική επίδραση, δηλαδή έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν χαρακτηριστικά που μπορεί να μην έχουν καμία σχέση μεταξύ τους. Για παράδειγμα συμβάλλουν στην μείωση της χοληστερίνης αλλά παράλληλα έχουν και αντιφλεγμονώδη και αντιοξειδωτική δράση (μείωση οξειδωτικού στρες). Έτσι απέδειξαν την πρόληψη έναντι της CIN χορηγώντας στατίνες σε 434 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε PCI. [64] Αντίστοιχα σε μετα- ανάλυση για την δραστηριότητα των στατινών έναντι της CIN σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση υψηλής δόσης στατινών πριν την διαδικασία έχει άμεση σχέση με την στατιστικά σημαντική μείωση ανάπτυξης νεφροτοξικότητας από τα σκιαγραφικά. Οι υψηλές δόσεις στατινών παρείχαν μεγαλύτερη προστασία απ' ότι οι χαμηλές δόσεις έναντι της CIN. [65] Στη μελέτη, όμως, των Kandula P et al. τα αποτελέσματα είναι αντίθετα. Συμμετείχαν 540 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένη PCI. Στους 89 ασθενείς χορήγησαν 10 – 80mg ατορβαστατίνη (atorvastatin), σε 74 ασθενείς 10 – 80mg

σιμβαστατίνη (simvastatin), σε 53 ασθενείς 10 – 40mg πραβαστατίνη (pravastatin), σε 13 ασθενείς 20 – 40mg λοβαστατίνη (lovastatin), σε 9 ασθενείς 5 – 20mg ροσουβαστατίνη (rosuvastatin) και σε έναν ασθενή φλουβαστατίνη (fluvastatin). Τα αποτελέσματα εδώ έδειξαν ότι η χορήγηση των στατινών πριν από PCI δεν προστατεύει έναντι της CIN. [66] Τέλος, ερευνώντας την συμβολή του φαρμάκου σιμβαστατίνη (simvastatin) στην μείωση του κινδύνου για CIN σε ασθενείς με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία (με παράλληλη ενυδάτωσή τους), παρατήρησαν ότι το συγκεκριμένο φάρμακο δεν αποτρέπει την χειροτέρευση της νεφρικής λειτουργίας στους ασθενείς αυτής της κατηγορίας μετά την έκθεση σε σκιαγραφικό μέσο. [67] Έτσι, και μετά από σύγκριση των φαρμάκων σιμβαστατίνη και πραβαστατίνη, οι ασθενείς στους οποίους χορήγησαν πραβαστατίνη (οι οποίοι εδώ δεν είχαν κάποια νεφρική δυσλειτουργία) είχαν σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό ανάπτυξης CIN απ' ό,τι αυτοί στους οποίους χορήγησαν σιμβαστατίνη, επιβεβαιώνοντας έτσι και τα συμπεράσματα της προηγούμενης έρευνας, παρότι οι ασθενείς εκεί ήταν κατηγορίας υψηλού κινδύνου. [68] Βλέπουμε λοιπόν πόσο αμφιλεγόμενα είναι τα αποτελέσματα από μελέτες μίας μόνο κατηγορίας ουσιών.

Ενώ στη μελέτη που αναφέρεται στην αντιοξειδωτική δράση του ασκορβικού οξέος έναντι της νεφροτοξικότητας από σκιαγραφικά σε ασθενείς με κάποια νεφρική δυσλειτουργία (συγκέντρωση κρεατινίνης πάνω από 1.2 mg/dl), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία και/ή αγγειοπλαστική, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η από του στόματος χορήγηση ασκορβικού οξέος μπορεί να έχει προστατευτικό ρόλο έναντι της CIN σε αυτή την κατηγορία ασθενών που υποβάλλονται σε στεφανιογραφία και/ή αγγειοπλαστική. [69]

Μελέτες έχουν δείξει ότι η ενδοφλέβια χορήγηση διαφόρων διαλυμάτων αποτρέπει τυχόν ανεπιθύμητες επιδράσεις που προκαλεί η χορήγηση σκιαγραφικού μέσου. Αυτό οφείλεται σε 2 μηχανισμούς. Πρώτον, επιτυγχάνεται μείωση της αγγειοσυστολής που προκαλείται από το σκιαγραφικό στον μυελό των νεφρών, επειδή εμποδίζεται η έκκριση αντιδιουρητικής ορμόνης, αναστέλλεται το σύστημα ρενίνης – αγγειοτενσίνης – αλδοστερόνης και αυξάνεται η σύνθεση προσταγλανδίνης. Δεύτερον, εξασθενεί η άμεση τοξική επίδραση που έχει το

σκιαγραφικό στα σωληναριακά, επιθηλιακά κύτταρα του νεφρού. Αυτό επιτυγχάνεται μειώνοντας την επαναπρόσληψη νερού, με αποτέλεσμα την αραιώση των υγρών και την μείωση του ιξώδους (viscosity) εντός των σωληναρίων. [3] [70] Η πρώτη κλινική μελέτη για την ενδοφλέβια χορήγηση απλού αλατούχου διαλύματος ως μέτρο πρόληψης της CIN έγινε το 1994 όπου αποδείχτηκε ότι η χορήγησή του μπορεί να παρέχει κάποια προστασία έναντι του σκιαγραφικού. [3] [71]

Τέλος, κλείνουμε αυτό το αμφιλεγόμενο κομμάτι για την πρόληψη της CIN με μια βιβλιογραφική έρευνα που ασχολήθηκε με τα ευρήματα 9 κλινικών μελετών για την αξιολόγηση τεσσάρων διαφορετικών τρόπων προφύλαξης έναντι της CIN σε ασθενείς με STEMI που υποβλήθηκαν σε PCI. Συμπεριλήφθηκαν 6 μελέτες για την N – ακετυλοκυστεΐνη, 1 μελέτη για την πρώιμη και μεταγενέστερη ενυδάτωση, 1 μελέτη για την ανασυνδιασμένη BNP (recombinant Brain Natriuretic Peptide) και 1 μελέτη σύγκρισης ενός σκιαγραφικού χαμηλής ωσμωτικότητας (iopromide) με ένα ισοωσμωτικό σκιαγραφικό (iodixanol). Η αποτελεσματικότητα της NAC είναι αμφιλεγόμενη και στο μέλλον θα πρέπει να ξεκαθαριστεί η συμβολή της ή μη στην προστασία έναντι της CIN. Η πρώιμη χορήγηση διττανθρακικού νατρίου μειώνει σημαντικά την εμφάνιση CIN, συγκριτικά με τη μεταγενέστερη χορήγηση αλατούχου διαλύματος ή την χορήγηση κανενός διαλύματος. Επίσης, η ανασυνδιασμένη BNP μειώνει αποτελεσματικά την εμφάνιση CIN. Τέλος, δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των δύο σκιαγραφικών (iodixanol και iopromide). [72]

Οι μέχρι τώρα έρευνες είναι μεν ελπιδοφόρες, όμως χρειάζονται περισσότερες μελέτες προκειμένου να συμπεριληφθεί κάποια συγκεκριμένη στρατηγική για την προφύλαξη έναντι της CIN στις επεμβατικές διαδικασίες ρουτίνας των ασθενών.

1.1.6 Αντιμετώπιση

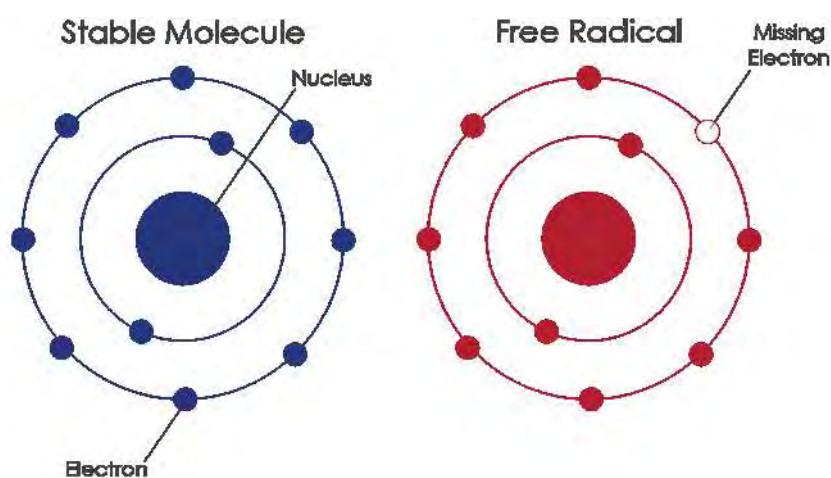
Φυσικά η καλύτερη στρατηγική αντιμετώπισης της νεφροτοξικότητας από τα σκιαγραφικά μέσα είναι η πρόληψη. Παρ' όλα αυτά σε περίπτωση δημιουργίας CIN, η αντιμετώπιση είναι η εξής: γίνεται ταυτοποίηση της νεφρικής βλάβης και παρακολούθηση της πορείας των ηλεκτρολυτών, της διατροφής (όπως είναι προσαρμοσμένη στα δεδομένα), του σωματικού βάρους και της ισορροπίας των υγρών. Οι μεταβολικές διαταραχές, όπως η υπερφωσφαταιμία (περίσσια

φωσφόρου στο αίμα) αντιμετωπίζεται με χορήγηση ανθρακικού ασβεστίου (calcium carbonate) που είναι δεσμευτικό του φωσφόρου στη νεφρική ανεπάρκεια. Η υπερκαλιαιμία (αύξηση καλίου πέραν των φυσιολογικών τιμών) αντιμετωπίζεται διατροφικά με μείωση χορήγησης καλίου, με φάρμακα που δεσμεύουν το κάλιο ή με έγχυση δεξτρόζης και ινσουλίνης. Τέλος, η μεταβολική οξείδωση αντιμετωπίζεται με από του στόματος χορήγηση διττανθρακικού νατρίου (sodium bicarbonate). [73] [16]

1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.2.1 Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες (Free Radicals) είναι χημικά μόρια που έχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους. Αυτό γίνεται είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα. [74] Είναι ιδιαίτερα ασταθή, πάρα πολύ δραστικά και έχουν πολύ μικρή διάρκεια ζωής. Λόγω της υψηλής δραστικότητάς τους μπορούν να αποσπών ηλεκτρόνια από άλλα χημικά μόρια με σκοπό να πετύχουν τη σταθερότητα. Τότε όμως τα «επιτιθέμενα» μόρια, χάνοντας το ηλεκτρόνιό τους, γίνονται τα ίδια ελεύθερες ρίζες, ξεκινώντας έτσι μια αλληλουχία αντιδράσεων που βλάπτουν τα κύτταρα. [75] Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο.



Εικόνα 3. Απεικόνιση σταθερού μορίου και ελεύθερης ρίζας.

ΠΗΓΗ ΕΙΚΟΝΑΣ:

https://www.google.gr/search?q=free+radicals&espv=2&biw=1366&bih=638&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKewi146rcgYrRAhUB2xokHdZFCs0Q_AUIBigB#tbm=isch&q=free-radical-lza5ivs9y7k1c43ct0anyrzpwygy1mepp1hmslfgz0&imgsrc=4WqyGdh34ihoLM%3A

Οι ελεύθερες ρίζες που συναντάμε πιο συχνά είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS), οι οποίες περιλαμβάνουν τις ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), υδροξυλίου (OH^{\bullet}), υπεροξειδίου (RO_2^{\bullet}), αλκοξειδίου (RO^{\bullet}), υδρουπεροξειδίου (HO_2^{\bullet}), περοξυλίου (ROO^{\bullet}), καθώς και τις μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2). Εκτός από τις δραστικές μορφές οξυγόνου υπάρχουν, επίσης, οι δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species – RNS) και οι δραστικές μορφές θείου (Reactive Sulfur Species – RSS). [76]

Στις δραστικές μορφές αζώτου συγκαταλέγονται οι ρίζες μονοξειδίου του αζώτου (NO^{\bullet}) και διοξειδίου του αζώτου (NO_2^{\bullet}), καθώς και οι μη ρίζες τριοξειδίου του αζώτου (N_2O_3), νιτρώδες οξύ (HNO_2) και υπεροξεινιτρικό (peroxinitrite - $ONOO^{\bullet-}$). [77] [78]

1.2.2 Πηγές ελευθέρων ριζών

A) Ενδογενείς πηγές

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο στοιχείο για την ζωή. Όταν τα κύτταρα το χρησιμοποιούν για να παράγουν ενέργεια μπορεί να δημιουργηθούν ελεύθερες ρίζες κατά την παραγωγή του ATP από τα μιτοχόνδρια (διαδικασία οξειδωτικής φωσφορυλίωσης). Οι ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία είναι ROS και RNS. [79]

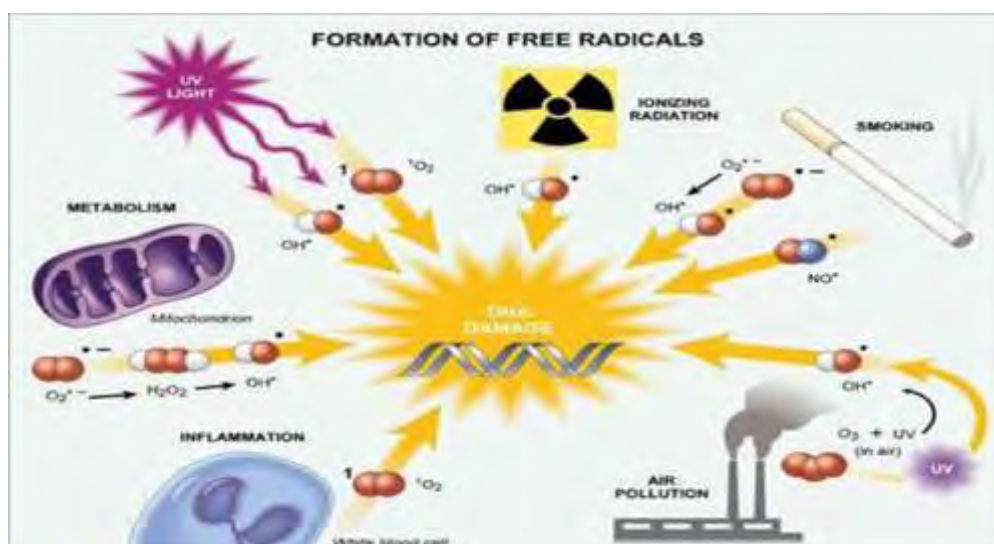
Τα υπεροξειδιοσώματα (peroxisomes ή microbodies) είναι μικρά κυστίδια που περιβάλλονται από μεμβράνη και περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα μέσω των οποίων διασπώνται διάφορες ουσίες που είναι επικίνδυνες για το κύτταρο. Βρίσκονται κυρίως στα κύτταρα του ήπατος και των νεφρών. Αυτά λοιπόν περιέχουν οξειδάσες που ανάγουν το οξυγόνο σε υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) κατά την οξείδωση του υποστρώματος RH_2 . [80] [81]

Το κυτόχρωμα P450 είναι ένα σύνολο ενζύμων που παίζει ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών. Βρίσκεται κυρίως στα ηπατικά κύτταρα και κατά την μεταφορά ηλεκτρονίων μπορεί να υπάρχει παραγωγή ROS και συγκεκριμένα σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). [82] [83] [84]

Επίσης, κατά την διάρκεια έντονης άσκησης έχουμε παραγωγή ROS που μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους, όπως στην αυξημένη μεταφορά οξυγόνου (μέσω της αιμοσφαιρίνης) για παραγωγή ενέργειας και στην αυξημένη απελευθέρωση κατεχολαμινών που μπορεί να αυτοοξειδωθούν και έτσι να οδηγήσουν σε παραγωγή ελεύθερων ριζών. Επίσης, η φλεγμονή (πιθανόν, λόγω μυϊκού τραυματισμού) και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα μπορεί να οδηγήσουν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών. [85] [86]

B) Εξωγενείς πηγες

Εδώ συναντάμε την υπεριώδη ακτινοβολία, την ατμοσφαιρική ρύπανση (όπως το όζον και το διοξείδιο του αζώτου), τον καπνό του τσιγάρου, τα βιομηχανικά απόβλητα, διάφορες ξενοβιοτικές ουσίες (όπως το αλκοόλ), φάρμακα, καθώς και τη διατροφή που μπορούν να αποτελέσουν πηγές ελευθέρων ριζών. [77] [87] [88] [89] [90] [91]



Εικόνα 4. Παραγωγή ελευθέρων ριζών.

ΠΗΓΗ ΕΙΚΟΝΑΣ: <http://symmetrydirectbuy.com/what-are-free-radicals-and-what-effect-do-antioxidants-have-on-them/>

1.2.3 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

A) Θετικές

Αν και οι ελεύθερες ρίζες συνήθως μας απασχολούν λόγω των βλαβών που προκαλούν στον οργανισμό, υπάρχουν και οι περιπτώσεις όπου δρουν θετικά συμμετέχοντας στην άμυνα του οργανισμού και χρησιμεύοντας ως σηματοδοτικά μόρια. [92] Συγκεκριμένα, δρουν ενάντια στα αντιγόνα κατά την διάρκεια της φαγοκύττωσης, ρόλος που ενισχύεται κατά την διάρκεια της φλεγμονής. [93] [94] [95] Παίζουν σημαντικό ρόλο ως σηματοδοτικά μόρια, όπως ήδη αναφέραμε, αλλά και στην βιογένεση των κυττάρων επειδή μπορούν να λειτουργήσουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι ή να τροποποιήσουν την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση και, επίσης, συνδέονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση και την μιττική συστολή. [96] [95] [97] [98] [99] Τέλος, συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των ενζύμων και στην αποτοξίνωση από φάρμακα. [94]

B) Αρνητικές

Όσον αφορά τις αρνητικές τους επιδράσεις, οι ROS μπορούν και αντιδρούν με άλλα βιομόρια οξειδώνοντάς τα. Σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να βλάψουν την δομή των κυττάρων, τα νουκλεϊκά οξέα, τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες. [82] [100]

Η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με όλα τα συστατικά του μορίου DNA προκαλώντας βλάβες στις βάσεις πουργινών και πυριμιδίνης. Η βλάβη του DNA που έχει μελετηθεί εκτενέστερα είναι ο σχηματισμός του 8-OH-G. Μόνιμες τροποποιήσεις του γενετικού υλικού λόγω οξειδωτικής βλάβης, οδηγούν σε μεταλλαξιγένεση, καρκινογένεση και γήρανση. [100]

Κατά την οξείδωση των λιπιδίων οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν κυρίως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids – PUFA) που είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε οξείδωση και βρίσκονται στις μεμβράνες των κυττάρων. Κατά την διαδικασία αυτή παράγονται ρίζες περοξυλίου (ROO•) που οδηγούν σε παραγωγή μηλονικής διαλδεΰδης (MDA – Malondialdehyde) και HNE (4-hydroxy-2-nonenal) ως τελικά προϊόντα λιπιδικής υπεροξείδωσης. [82] [100] [101] Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, γεγονός σημαντικό στην διαδικασία της αθηρογένεσης. [102]

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν απευθείας με αυτές ή να αντιδράσουν με μόρια όπως σάκχαρα και λιπίδια, παράγοντας προϊόντα τα οποία έπειτα θα αντιδράσουν με τις πρωτεΐνες. Κατά την οξείδωση των πρωτεϊνών παράγονται πρωτεϊνικά καρβονύλια. Το αποτέλεσμα όλης αυτής της διαδικασίας είναι η τροποποίηση της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. [103] [104]

Η βλάβη από τις ελεύθερες ρίζες συσχετίζεται με διάφορες ασθένειες όπως την αθηροσκλήρωση και τον καρκίνο. Επίσης σχετίζεται και με την διαδικασία της γήρανσης καθώς και με ασθένειες νευρολογικής φύσης όπως τις νόσους Alzheimer και Parkinson. [103]

1.2.4 Αντιοξειδωτικές ουσίες και μηχανισμοί [78]

Οι Halliwell και Gutteridge όρισαν ως αντιοξειδωτικά τις ουσίες, οι οποίες σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μπορούν να συναγωνιστούν άλλα προς οξείδωση υποστρώματα και να καθυστερήσουν σημαντικά ή να αναστείλουν την οξείδωση των υποστρωμάτων αυτών. Διακρίνονται σε ενδογενή (ενζυμικά και μη ενζυμικά) και εξωγενή αντιοξειδωτικά.

A) Ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Εδώ περιλαμβάνονται τα ένζυμα υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) και αναγωγάση της γλουταθειόνης (GRx). [77] [86] [105]

Η υπεροξειδική δισμουτάση βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα αερόβια κύτταρα και διακρίνεται στις εξής τρεις μορφές που εντοπίζονται σε διαφορετικά σημεία: στην Copper zinc superoxide dismutase (CuZn- SOD) που βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στην Manganese superoxide dismutase (MnSOD) που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και στην Extracellular superoxide dismutase (EC - SOD) που συντίθεται από λιγοστούς κυτταρικούς τύπους (όπως οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα) και εκφράζεται στην επιφάνια των κυττάρων. [87] [106] [107] [108]

Η SOD καταλύει τη μετατροπή σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). [109]

SOD



Η καταλάση (CAT), με τη σειρά της, που βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα [87] καταλύει την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε H_2O και O_2 . [109]

CAT



Αντίστοιχα και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) καταλύει την μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε H_2O και O_2 . [109] Χρησιμοποιεί το H_2O_2 και οξειδώνει την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Επίσης η GPx, καθώς οξειδώνει την GSH, ανάγει το υδρουπεροξύδιο. [77]

GPx



Τέλος, η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GRx) αναγεννά την GSH από την GSSG χρησιμοποιώντας το NADPH. [77]

B) Ενδογενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Εδώ περιλαμβάνονται μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά που όμως παράγονται από τον οργανισμό, όπως η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, το συνένζυμο Q10, η μελατονίνη, η χολερυθρίνη, η τρανσφερίνη κ.λπ. [77] [79] [86]

Γ) Εξωγενή αντιοξειδωτικά

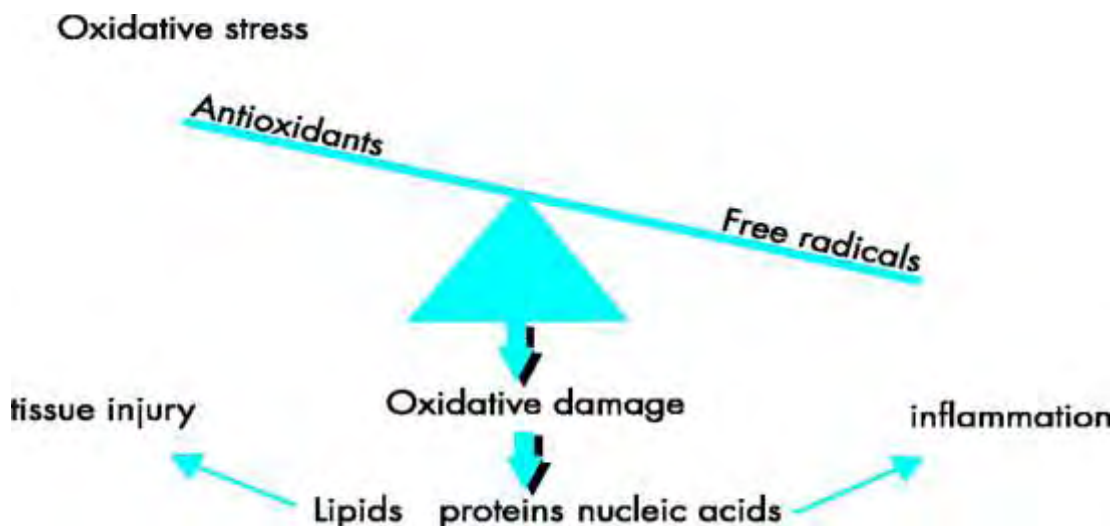
Στα εξωγενή αντιοξειδωτικά περιλαμβάνονται οι ουσίες που παίρνουμε μέσω της διατροφής και των συμπληρωμάτων, όπως η α -τοκοφερόλη (βιταμίνη E), το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η β -καροτίνη, τα φλαβονοειδή, διάφορα μέταλλα (σελήνιο, μαγγάνιο, ψευδάργυρος), τα ωμέγα-3 και ωμέγα-6 λιπαρά κ.λπ. [77] [86]

ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΜΗ ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	ΕΞΩΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)	Γλουταθειόνη	α – τοκοφερόλη (βιταμίνη E)
Καταλάση (CAT)	Ουρικό οξύ	Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	Συνένζυμο Q10	β–καροτίνη
Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GRx)	Μελατονίνη	Μέταλλα (σελήνιο, μαγγάνιο, ψευδάργυρος)

Πίνακας 1. Τύποι αντιοξειδωτικών.

1.2.5 Οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες καθώς και οι μη ρίζες υπάρχουν στα κύτταρα και στους ιστούς σε χαμηλές αλλά μετρήσιμες συγκεντρώσεις. Οι συγκεντρώσεις αυτές καθορίζονται από την ισορροπία μεταξύ των επιπέδων παραγωγής τους και των επιπέδων καθαρισμού τους (από τα αντιοξειδωτικά). [110] [86] Όταν αυτή η ισορροπία μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών διαταραχθεί υπέρ των προοξειδωτικών δημιουργείται το οξειδωτικό στρες. Ο όρος αυτός διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 1985 στο βιβλίο του Sies «Oxidative Stress». [111] [112] [113]



Εικόνα 5. Οξειδωτικό στρες.

ΠΗΓΗ ΕΙΚΟΝΑΣ: Frank J Kelly, OXIDATIVE STRESS: ITS ROLE IN AIR POLLUTION AND ADVERSE HEALTH EFFECTS

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες, όπως από την διατροφή (είτε ανεπαρκή πρόσληψη τροφών που περιέχουν αντιοξειδωτικά, είτε υπερβολική πρόσληψη προοξειδωτικών), από έκθεση σε επικίνδυνα χημικά ή σε υπεριώδη ακτινοβολία και από τραυματισμούς – πληγές. [114]

1.3 ΜΕΛΕΤΕΣ ΟΞΕΙΑΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΠΟ ΧΡΗΣΗ ΣΚΙΑΓΡΑΦΙΚΩΝ (CIN) ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

Οι κλασικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, και τους οποίους θα αναλύσουμε στο πειραματικό μας μέρος, είναι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, η γλουταθειόνη και η καταλάση. Από όσο γνωρίζουμε, μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποια μελέτη που να ερευνά την σχέση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της CIN χρησιμοποιώντας και τους 5 αυτούς δείκτες. Επίσης οι δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι κατά το πλείστον για την αξιολόγηση της προστατευτικής δράσης διαφόρων ουσιών.

1.3.1 Μελέτες σε ανθρώπους

Ας ξεκινήσουμε λοιπόν από τις ελάχιστες μελέτες που έχουν βρεθεί ως τώρα για την νεφροτοξικότητα από σκιαγραφικά με χρήση δεικτών οξειδωτικού στρες σε ανθρώπους.

Σε μελέτη που έγινε για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τα σκιαγραφικά και της μακροπρόθεσμης νεφρικής λειτουργίας, συμμετείχαν 36 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία. Προσδιόρισαν και σύγκριναν μεταξύ τους τα επίπεδα του δείκτη οξειδωτικού στρες, F2-ισοπροσάνη (Urinary F2-isoprostane) (με αποτελέσματα δύο χρόνων: 12 – 24 ώρες πριν και 24 ώρες μετά την στεφανιογραφία), της sCr (τριών χρόνων: 12 – 24 ώρες πριν και 24 ώρες μετά τη στεφανιογραφία και 1 χρόνο μετά) και της eGFR (επίσης τριών χρόνων). Τα αποτελέσματα ταυτοποίησαν τη σχέση μεταξύ οξειδωτικού στρες και νεφρικής βλάβης λόγω χορήγησης σκιαγραφικών, και διαπιστώθηκε ότι, ναι μεν η CIN μπορεί να είναι παροδική, αλλά η αύξηση οξειδωτικού στρες και η μείωση της eGFR 24 ώρες μετά την στεφανιογραφία σχετίζεται με την χρόνια νεφρική ανεπάρκεια στο μέλλον (δεδομένα που συνιστούν την προσοχή των ασθενών με τέτοιες ενδείξεις μετά την επεμβατική πράξη). [115]

Γενικά, η νεφροτοξικότητα από σκιαγραφικά είναι μια πιθανή επιπλοκή σε ασθενείς με STEMI (έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάσπαση του ST) που υποβάλλονται σε πρωτογενή PCI (διαδερμική αγγειοπλαστική στεφανιαίων αρτηριών). Το ένζυμο παραοξονάση 1 (Paraoxonase 1 – PON1) προστατεύει τις λιποπρωτεΐνες από το οξειδωτικό στρες. [116] Η μείωση του PON1 στον ανθρώπινο οργανισμό σχετίζεται με την αύξηση του οξειδωτικού στρες και τον κίνδυνο αθηροσκλήρωσης. [117] Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα μελέτησαν τα επίπεδα ολικού αντιοξειδωτικού συστήματος (TAS - total antioxidant status), ολικού οξειδωτικού συστήματος (TOS - total oxidant status), οξειδωτικών παραμέτρων (OSI - oxidative stress index) και PON1 σε δείγμα ορού 289 ασθενών με παλαιότερο STEMI που υποβλήθηκαν σε PCI, τους οποίους χώρισαν σε δύο ομάδες: την ομάδα CIN και την ομάδα χωρίς CIN. Τα επίπεδα TAS και PON1 βρέθηκαν χαμηλότερα, ενώ τα επίπεδα TOS και OSI υψηλότερα, στους ασθενείς με CIN απ' ότι στους ασθενείς χωρίς CIN. Διαπιστώνουμε ότι υπάρχει σαφής σύνδεση μεταξύ των ελαττωμένων επιπέδων PON1 και των αυξημένων επιπέδων οξειδωτικού στρες στην κατηγορία ασθενών που παρουσίασαν CIN όταν υποβλήθηκαν σε πρωτογενή PCI. Επίσης, διαπιστώνουμε την αύξηση οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με CIN έναντι ασθενών χωρίς CIN. [118]

Στη συνέχεια θα δούμε ότι παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον οι μελέτες που έγιναν για την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και την N – ακετυλοκυστεΐνη (NAC) ως μέσα πρόληψης της CIN. Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό το οποίο μελετήθηκε για την προστατευτική του ιδιότητα έναντι της CIN καταστέλλοντας την παραγωγή των ROS στους νεφρούς. Στην συγκεκριμένη μελέτη σύγκριναν τα αποτελέσματα ενδοφλέβιας χορήγησης GSH έναντι της, από το στόματος χορήγησης, NAC. Συμμετείχαν 21 ασθενείς που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία, τους οποίους χώρισαν σε 3 ομάδες (control, GSH και NAC). Προσδιόρισαν τα επίπεδα sCr, LOOHs (lipid hydroperoxides) και GSH. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η NAC δεν μπόρεσε να αποτρέψει την ύπαρξη οξειδωτικού στρες που παρατηρήθηκε 2 ώρες μετά την στεφανιογραφία. Σε αντίθεση με την GSH που εμπόδισε την δημιουργία οξειδωτικού στρες (ενισχύοντας την μειωμένη τιμή της ενδογενούς γλουταθειόνης). [119]

Τα συμπεράσματα αυτά για την NAC έρχεται να επαληθεύσει μια μελέτη όπου συμμετείχαν 60 ασθενείς με στεφανιαία νόσο που υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένη PCI. Χωρίζοντάς τους σε 2 γκρουπ χορήγησαν ενδοφλέβια στο ένα γκρουπ 600mg NAC, ενώ στο άλλο όχι. Χρησιμοποίησαν δείγματα αίματος και ούρων που πήραν 24 ώρες πριν και μετά την επεμβατική πράξη και μέτρησαν την ολική οξειδωτική ικανότητα (Total Oxidant Capacity - TOC), την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (total antioxidant capacity (TAC), και το oxidative stress index (OSI). 24 ώρες μετά την PCI τα επίπεδα TOC και OSI αυξήθηκαν σημαντικά ενώ τα επίπεδα TAC ήταν σαφώς μειωμένα. Επίσης, δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες. Συμπερασματικά, η NAC δεν επηρεάζει τους παράγοντες οξείδωσης, ούτε παρέχει προστασία έναντι της CIN (τουλάχιστον σε ασθενείς χωρίς κάποια νεφροπάθεια ή κάποια προδιάθεση σ' αυτή). [120]

Και για την GSH όμως οι μελέτες δίνουν διφορούμενα αποτελέσματα. Ενώ δηλαδή οι Saitoh, T. et al. το 2011 έδειξαν ότι η GSH δρα ευεργετικά στον οργανισμό προλαμβάνοντας την CIN, [119] μία έρευνα που έγινε το 2015, χωρίς όμως προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες έρχεται να μας αποδείξει ότι δεν υπάρχει κάποια επίδραση της GSH έναντι της CIN. Συμμετείχαν 505 κινέζοι ασθενείς 75 ετών και πάνω που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία ή σε PCI. Χωρίζοντάς τους σε 2 ομάδες, χορήγησαν στη μια ομάδα αλατούχο διάλυμα 6 ώρες πριν, κατά τη διάρκεια και 6 ώρες μετά την διαδικασία, και έκαναν το ίδιο στην άλλη αφού πρώτα πρόσθεσαν στο διάλυμα GSH. Παρατηρώντας τις τιμές της κρεατινίνης, της ουρίας και της eGFR βλέπουμε ότι ναι μεν έχουμε δημιουργία CIN σε 35 από τους 505 ασθενείς, αλλά δεν υπάρχει ιδιαίτερη διαφορά στα αποτελέσματα των 2 ομάδων. Αυτό υποδηλώνει ότι ενώ γενικά η GSH λέγεται ότι μειώνει τις πιθανότητες δημιουργίας CIN, στην συγκεκριμένη μελέτη δεν μείωσε τον κίνδυνο. Ίσως τα αποτελέσματα να ήταν διαφορετικά αν προσδιορίζονταν και δείκτες οξειδωτικού στρες, ή αν το δείγμα ασθενών ήταν μεγαλύτερο, ή αν η μελέτη δεν ήταν «single-center study». [121] Από την άλλη όμως, έρχονται οι Wang, C. et al. επίσης το 2015 να επαληθεύσουν ότι η GSH δεν μειώνει τον κίνδυνο, χρησιμοποιώντας 2 δείκτες οξειδωτικού στρες. Προσδιόρισαν τα επίπεδα MDA και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στα δείγματα αίματος 525 ασθενών που υποβλήθηκαν σε

στεφανιογραφία ή PCI. Τα αποτελέσματα λοιπόν, έδειξαν ότι η ενδοφλέβια χορήγηση GSH σε αυτούς τους ασθενείς δεν μείωσε τον κίνδυνο νεφροτοξικότητας από τα σκιαγραφικά. [122]

Δείκτες οξειδωτικού στρες έχουν χρησιμοποιηθεί και για την μελέτη προστατευτικής δράσης 3 ακόμα ουσιών έναντι της CIN. Πιο συγκεκριμένα, σύγκριναν την μετοπρολόλη (Metoprolol) και την καρβεδιλόλη (Carvedilol) για την προστασία τους έναντι της CIN μετά από στεφανιογραφία. Η μετοπρολόλη είναι ένας καρδιοεκλεκτικός β-αναστολέας που μειώνει την αυξημένη αρτηριακή πίεση. Η καρβεδιλόλη από την άλλη είναι ένας αγγειοδιασταλτικός, μη εκλεκτικός β-αποκλειστής με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. [123] [124] Συμμετείχαν 200 ασθενείς εκ των οποίων στους 100 χορηγήθηκε μετοπρολόλη και στους άλλους 100 καρβεδιλόλη. Με βάση αυτά τα δεδομένα εξέτασαν τον δείκτη οξειδωτικού στρες MDA και την συστατίνη C (cystatin C). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καρβεδιλόλη μπορεί να δράσει προστατευτικά έναντι της CIN σε σχέση με την μετοπρολόλη, μειώνοντας το οξειδωτικό στρες σε ασθενείς που υποβάλλονται σε στεφανιογραφία. [125] Τέλος, μια άλλη ουσία, η τριμεταζιδίνη (trimetazidine), έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες και βοηθά τα κύτταρα που βρίσκονται σε κατάσταση μειωμένης παροχής αίματος ή οξυγόνου να λειτουργήσουν σωστά και να διατηρήσουν την ισορροπία τους. [126] Μελετήθηκε, λοιπόν, ο ρόλος της στην προστασία έναντι της CIN, σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα κρεατινίνης που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία ή/και αγγειοπλαστική. Χωρίστηκαν σε 2 γκρουπ: στο control γκρουπ και σε αυτό όπου χορήγησαν την ουσία. Η τριμεταζιδίνη χορηγούνταν στους ασθενείς δια του στόματος για 72 ώρες, ξεκινώντας 48 ώρες πριν την διαδικασία. Σε όλους χορηγούσαν ενδοφλεβίως και αλατούχο διάλυμα για 24 ώρες ξεκινώντας 12 ώρες πριν. Μελετήθηκαν τα επίπεδα TAC σε δείγματα αίματος πριν την χορήγηση της τριμεταζιδίνης, αμέσως μετά και μέσα σε 2 ώρες μετά την αγγειογραφία. Επίσης μετρήθηκαν και οι κλασικοί δείκτες για νεφρική βλάβη (ουρία, κρεατινίνη). Τα αποτελέσματα έδειξαν εμφάνιση CIN στο 16,6% των ασθενών στο control γκρουπ, ενώ μόλις 2,5% στο γκρουπ της τριμεταζιδίνης. Συμπερασματικά, η χορήγηση αυτής της ουσίας σε συνδιασμό με χορήγηση αλατούχου διαλύματος είναι ένα αποτελεσματικό μέσο πρόληψης της CIN και είναι

πιο αποτελεσματικό από τη χορήγηση μόνο αλατούχου διαλύματος στους ασθενείς με προϋπάρχουσα νεφρική δυσλειτουργία. [127]

1.3.2 Μελέτες σε πειραματικά μοντέλα

Θα συνεχίσουμε με αντίστοιχες έρευνες ουσιών που μελετήθηκαν για την προστατευτική τους δράση με χρήση δεικτών οξειδωτικού στρες σε πειραματικά μοντέλα. Σε αντίθεση με τις έρευνες που είδαμε παραπάνω, στις στρατηγικές προφύλαξης, εδώ θα παρατηρήσουμε ότι οι περισσότερες προς μελέτη ουσίες που έχουν αντιοξειδωτική δράση ή εμπλέκονται με κάποιο τρόπο με τις ελεύθερες ρίζες παρέχουν προστασία έναντι της CIN.

Για παράδειγμα, η καρνιτίνη (L-Carnitine) είναι συστατικό του κυττάρου που αφορά την παραγωγή και μεταφορά ενέργειας. Μεταφέρει μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα στα μιτοχόνδρια που υποβάλλονται εκεί σε β-οξείδωση. [128] [129] Λέγεται ότι μειώνει τη δημιουργία ελεύθερων ριζών, αποτρέποντας έτσι την εξασθένηση της β-οξείδωσης των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια και προστατεύοντας τους ιστούς από βλάβη μέσω επιδιόρθωσης των οξειδωμένων μεμβρανών των λιπιδίων. [130] [131] Έτσι, μελέτησαν τις προστατευτικές ιδιότητες της καρνιτίνης έναντι της CIN προσδιορίζοντας τα επίπεδα SOD, CAT, GSH και MDA σε νεφρικούς ιστούς αρουραίων. Η δραστηριότητα των SOD και CAT ήταν αυξημένη στα δείγματα που είχαν εκτεθεί σε σκιαγραφικό και καρνιτίνη και μειωμένη στα δείγματα που εκτέθηκαν μόνο στο σκιαγραφικό. Το ίδιο συνέβη και με τα επίπεδα της GSH. Αντίθετα, τα επίπεδα MDA ήταν αυξημένα στα δείγματα με σκιαγραφικό και μειωμένα στα δείγματα με σκιαγραφικό και καρνιτίνη. Φαίνεται από τα παραπάνω, ότι η καρνιτίνη μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο στην πρόληψη της CIN μειώνοντας τις ελεύθερες ρίζες και, συνεπώς, περιορίζοντας το οξειδωτικό στρες. [132]

Η παρικαλσιτόλη (paricalcitol) είναι ένα συνθετικό ανάλογο της βιταμίνης D που, συγκριτικά με αυτή, προκαλεί λιγότερες ανεπιθύμητες ενέργειες. Έχει αντιοξειδωτικές επιδράσεις στην κυτταρική ομοιόσταση [133] και στο μυοκάρδιο [134] και καταστέλλει το σύστημα ρενίνης – αγγειοτενσίνης στα νεφρά. [135] Με βάση, λοιπόν, το γεγονός ότι η εξέλιξη της CIN οφείλεται κυρίως στην αύξηση του

οξειδωτικού στρες, έγινε μελέτη για τυχόν μείωσή της μέσω χορήγησης της παρικαλσιτόλης. Μελετήθηκαν οι βιοδείκτες TBARS και MDA σε 32 αρσενικούς αρουραίους Wistar Albino, τους οποίους χώρισαν σε 4 γκρουπ (control γκρουπ, παρικαλσιτόλη γκρουπ, CIN γκρουπ και CIN με παρικαλσιτόλη γκρουπ). Χρησιμοποιήθηκε δείγμα ορού για τις μετρήσεις MDA και δείγμα ιστού για τις μετρήσεις TBARS. Στα αποτελέσματα φάνηκε ότι οι δείκτες MDA και TBARS ήταν σημαντικά μειωμένοι στο γκρουπ CIN με παρικαλσιτόλη σε σχέση με το CIN γκρουπ και περίπου στα ίδια επίπεδα σε σχέση με τα άλλα 2 γκρουπ. Η μελέτη αποδεικνύει ότι η χορήγηση παρικαλσιτόλης για 4 μέρες πριν την έκθεση σε σκιαγραφικό μέσο μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο ανάπτυξης CIN στους αρουραίους. [136]

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η έρευνα που έγινε για την προστασία που παρέχει η σουλφοραφάνη (sulforaphane) στους νεφρούς έναντι των σκιαγραφικών (πριν την χορήγησή τους). Η σουλφοραφάνη είναι ένα συστατικό που περιέχεται κυρίως στο μπρόκολο, ενεργοποιεί τον Nrf2 (ο οποίος ελέγχει την δραστηριότητα διαφόρων αντιοξειδωτικών) και είναι γνωστό για τις αντικαρκινικές και αντιοξειδωτικές του ικανότητες. [137] Σε αρουραίους χωρισμένους σε 4 γκρουπ, μελετήθηκαν τα επίπεδα MDA και SOD, όπου σαφώς παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων SOD και μείωση της MDA. Παράλληλα, όμως, μελετήθηκε και ο Nrf2 στα HK2 (Human Kidney 2) κύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση σουλφοραφάνης πριν την έκθεση στο σκιαγραφικό προκάλεσε την ενεργοποίηση του Nrf2 στα κύτταρα και κατά συνέπεια την αύξηση παραγωγής αντιοξειδωτικών στον οργανισμό και την μείωση του οξειδωτικού στρες. Προκάλεσε, επίσης, την ενεργοποίηση των οξυγενάσων της αίμης (Heme Oxygenases, HOs-1). Αυτά είναι ένζυμα, των οποίων τα τελικά προϊόντα έχει αναφερθεί ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Τέλος, μέτρησαν τα επίπεδα των ROS αφού εξέθεσαν τα HK2 κύτταρα αρχικά σε σουλφοραφάνη και έπειτα σε H₂O₂, διαπιστώνοντας, έτσι, τον περιορισμό της αύξησης των ελεύθερων ριζών. [138]

Το ινδικό φραγκοστάφυλο (*Phyllanthus emblica*) είναι ένα φρούτο με υψηλές συγκεντρώσεις ασκορβικού οξέος [139] [140] και φαινολικών συστατικών, [141] πλούσιο σε αντιοξειδωτικές, [142] [143] αντικαρκινικές, [144] [145] αντιφλεγμονώδεις [146] και ακτινοπροστατευτικές ιδιότητες. [147] Μελέτησαν,

λοιπόν, τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες όσον αφορά την πρόληψη έναντι στην CIN, εξετάζοντας τους δείκτες οξειδωτικού στρες MDA, SOD, CAT και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) σε πλάσμα και σε νεφρικό ιστό ποντικών. Στους ποντικούς στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα του συγκεκριμένου φρούτου παρατηρήθηκε μείωση της MDA και αύξηση της SOD, της CAT και της TAC που σημαίνει μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και αύξηση των αντιοξειδωτικών ενζύμων που οδηγούν σε προστασία έναντι των ROS και, στην περίπτωση μας, σε προστασία από την CIN (αν το εκχύλισμα χορηγηθεί για 5 ημέρες πριν την έκθεση στο σκιαγραφικό μέσο). [148]

Ένας συγκεκριμένος τύπος υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD), η ανασυνδιασμένη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση γνωστή και ως recombinant manganese SOD (rMnSOD), μελετήθηκε για την συμβολή της στην μείωση της νεφροτοξικότητας από σκιαγραφικά. Την rMnSOD χαρακτηρίζει η ικανότητά της να εισέρχεται στα κύτταρα μετά την χορήγησή της και να τα «καθαρίζει», εσωτερικά και εξωτερικά, από τις ρίζες O_2^- που δημιουργεί το οξειδωτικό στρες. [149] [150] Χρησιμοποιήθηκαν 43 αρουραίοι χωρισμένοι σε 3 γκρουπ και με μέθοδο ανοσοιστοχημείας προσδιορίστηκε το συγκεκριμένο ένζυμο. Η μελέτη έδειξε ότι η rMnSOD μπορεί να μειώσει τις ρίζες ROS, με αποτέλεσμα την πρόληψη της νεφροτοξικότητας που δημιουργείται από τα σκιαγραφικά. [151]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η χρησιμοποίηση της πρόπολης για την πρόληψη και την αντιμετώπιση της νεφρικής βλάβης που δημιουργείται από το σκιαγραφικό μέσο diatrizoate. Η πρόπολη είναι ένα βιολογικό προϊόν που παράγεται από τις μέλισσες και έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αντί-ικές ιδιότητες. [152] Επιπλέον σχετίζεται με την θεραπεία ή την αντιμετώπιση διαφόρων σοβαρών ασθενειών. Από την άλλη, η συμβολή των NAC και CALPAIN στην πρόληψη της CIN θεωρήθηκε αποδεδειγμένη στη συγκεκριμένη έρευνα, γι' αυτό τις συμπεριέλαβαν στη μελέτη χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα ως τιμές αναφοράς. Ανέλυσαν, λοιπόν, τους δείκτες οξειδωτικού στρες MDA, CAT, GSH, GSH-PX, SOD σε 35 αρσενικούς αρουραίους, με βιοχημικές μεθόδους, χρησιμοποιώντας ομογενοποιημένους νεφρικούς ιστούς. Συμπερασματικά, η πρόπολη αύξησε τις

τιμές των αντιοξειδωτικών και μείωσε την MDA επιβεβαιώνοντας την ικανότητά της να προστατεύει από την CIN. [153]

Το όζον στην συστηματική του εφαρμογή προκαλεί την δημιουργία ελεύθερων ριζών. Αντί όμως να δημιουργεί οξειδωτικές στρες, ενεργοποιεί ένζυμα του αντιοξειδωτικού συστήματος, ενισχύοντας τον οργανισμό (με την προϋπόθεση ότι οι επαναλαμβανόμενες συγκεντρώσεις όζοντος που χορηγούνται πρέπει να είναι αυστηρά ελεγχόμενες). Η διαδικασία αυτή λέγεται Ozone oxidative preconditioning και αποτρέπει τη νεφρική δυσλειτουργία που προκαλείται από την ισχαιμία – απαναιμάτωση αυξάνοντας την παραγωγή νιτρικού οξειδίου. [154] [155] Σ' αυτή τη μελέτη εξετάζεται η πιθανότητα να αποτρέπεται η CIN μέσα από αυτήν τη διαδικασία. Χρησιμοποιήθηκαν 32 αρουραίοι, χωρισμένοι σε 4 ομάδες (control, με χορήγηση σκιαγραφικού, χορήγηση όζοντος και σκιαγραφικού, χορήγηση οξυγόνου και σκιαγραφικού). Παίρνοντας δείγματα νεφρικών ιστών μελέτησαν τα επίπεδα MDA, νιτρικού οξειδίου (NO) και το ολικό αντιοξειδωτικό σύστημα (TAS). Τα επίπεδα της MDA βρέθηκαν σημαντικά μειωμένα στο γκρουπ του όζοντος, σε σχέση με τα γκρουπ του απλού σκιαγραφικού και του σκιαγραφικού με οξυγόνο, ενώ τα επίπεδα NO ήταν αυξημένα σε σχέση με τα 2 γκρουπ του σκιαγραφικού και του οξυγόνου. Στο γκρουπ όπου χορηγήθηκε όζον και σκιαγραφικό βρέθηκαν μειωμένα τα επίπεδα της MDA και αυξημένα τα επίπεδα NO και TAS, σε σύγκριση με το γκρουπ όπου χορηγήθηκε σκιαγραφικό και αυτό όπου χορηγήθηκε σκιαγραφικό και οξυγόνο. Συμπερασματικά φαίνεται ότι το όζον, ενισχύοντας το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού, μειώνει τις πιθανότητες νεφροτοξικότητας από τα σκιαγραφικά. [156]

Έχει δειχθεί επίσης ότι η προβουκόλη, ένα φάρμακο με ικανότητα μείωσης των λιπιδίων και αντιοξειδωτικές ικανότητες, μειώνει την νεφρική βλάβη από σκιαγραφικά. Μελετήθηκαν και εδώ οι δείκτες MDA και SOD, χρησιμοποιώντας νεφρικό ιστό 28 ποντικών. Χρησιμοποιήθηκε και εδώ η NAC για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που αφορούν την προβουκόλη, καθώς και το νουκλεοτίδιο 8-OHdG, που αποτελεί δείκτη οξειδωτικής βλάβης του DNA. Όπως φάνηκε, τα επίπεδα του νουκλεοτιδίου ήταν μειωμένα στις ομάδες όπου χορηγήθηκε

προβουκόλη και NAC, κάτι που επιβεβαιώνει την μείωση της CIN στις ομάδες αυτές. [157]

Το δέντρο *Viola Oleifera* παράγει μια ουσία, την ρητίνη ή ρετσίνι (resin), που συχνά χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς. Έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες λόγω των φλαβονοειδών και φαινολών που περιέχει. Χρησιμοποίησαν ως μοντέλα CIN ποντικούς τους οποίους χώρισαν σε 6 γκρουπ: control, CIN, NAC, ρητίνη 10mg/kg, ρητίνη 100mg/kg, ρητίνη 300mg/kg και προσδιόρισαν την αντιοξειδωτική ικανότητα της ρητίνης μετρώντας τις ελεύθερες ρίζες με την χρήση μεθόδου DPPH•. Το μεγάλο ποσοστό «καθαρισμού» από τις ρίζες DPPH επιβεβαίωσε την υψηλή της δράση. Επιπλέον, χρησιμοποίησαν την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής για την ποσοτικοποίηση των ROS. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής των ελεύθερων ριζών στο CIN γκρουπ και μείωσή τους σε φυσιολογικά επίπεδα στο γκρουπ όπου χορηγήθηκε η υψηλότερη δόση ρητίνης. Αντίστοιχη μείωση είχε και το γκρουπ όπου χορηγήθηκε η NAC. Σύμφωνα με τα δεδομένα, η υψηλότερη δόση ρητίνης προστατεύει από τη νεφρική δυσλειτουργία που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες στην CIN. [158]

Το φυτό μαγνόλια (*Magnolia fargesii*) περιέχει ένα σημαντικό συστατικό, το magnolin, που έχει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες. [159] [160] Έτσι θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθεί τυχόν ευεργετική του δράση έναντι στην CIN. Χρησιμοποιήθηκαν ιστοί αρσενικών αρουραίων τους οποίους αρχικά χώρισαν σε 4 ομάδες. Εξετάστηκαν οι δείκτες οξειδωτικού στρες MDA και SOD και παρατηρήθηκε μείωση της MDA και αύξηση της SOD στην ομάδα που τους χορηγήθηκε η magnolin. Επίσης, για να μελετήσουν την αντιοξειδωτική και αντιαποπτωτική δράση της ουσίας χρησιμοποίησαν ένα μοντέλο *in vitro* όπου HK2 κύτταρα (Human Kidney 2) επεξεργάστηκαν και εκτέθηκαν σε magnolin και σε H₂O₂ και στη συνέχεια μέτρησαν την δραστηριότητα του caspase – 3 (CASP3) καθώς και τις ROS βρίσκοντας τα επίπεδά τους μειωμένα λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης της magnolin. Αντίστοιχα, μελετώντας την έκφραση του γονιδίου Bcl-2 παρατήρησαν ότι αυξήθηκε. Όλα τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν την προστασία των νεφρών από τα σκιαγραφικά μέσα μέσω της αντιοξειδωτικής δράσης του συστατικού της μαγνόλιας. [161]

Σε αντίστοιχη μελέτη χρησιμοποιώντας τους δείκτες MDA και SOD αλλά και την in vitro μέθοδο με τα HK2 κύτταρα, απέδειξαν κάποιοι ερευνητές την προστατευτική, αντιοξειδωτική δράση της ρεναλάσης, που είναι μια πρόσφατα ανακαλυφθείσα μονοαμινοξειδάση (MAO), έναντι της CIN. Τα δείγματα που χρησιμοποίησαν ήταν νεφρικοί ιστοί ποντικού. [162]

Η ταδαλαφίλη (Tadalafil) είναι μια ουσία που ανήκει στους αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης τύπου 5 (PDE5). Έχει αγγειοδιασταλτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και μελετάται η πιθανότητα χρήσης της έναντι της νεφροτοξικότητας από σκιαγραφικά. Χρησιμοποιήθηκαν 24 θηλυκοί αρουραίοι χωρισμένοι σε 3 ομάδες (control, CIN και CIN με ταδαλαφίλη). Τα επίπεδα MDA ήταν σημαντικά ανεβασμένα στην ομάδα όπου χορηγήθηκε σκιαγραφικό σε σύγκριση με την ομάδα control και την ομάδα όπου χορηγήθηκε ταδαλαφίλη. Παρατηρούμε, λοιπόν, την μείωση οξειδωτικού στρες μετά την χορήγηση σκιαγραφικού όταν πριν έχει χρησιμοποιηθεί ταδαλαφίλη. [163]

Μια ουσία με παρόμοια δράση, η σιλденаφίλη (Sildenafil) – αναστολέας της PDE5, μελετήθηκε για την ευεργετική της δράση έναντι της CIN, αυτή τη φορά με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής σε δείγματα αρσενικών αρουραίων. Στα αποτελέσματα φάνηκε ότι η σιλденаφίλη στα 50 mg/kg αποτρέπει την ανάπτυξη της νεφροτοξικότητας από τα σκιαγραφικά, προστατεύοντας τους νεφρούς και μειώνοντας το οξειδωτικό στρες. [164]

Όπως μπορούμε εύκολα να κατανοήσουμε, οι μελέτες που αφορούν την οξεία νεφρική τοξικότητα από χρήση σκιαγραφικών παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Επειδή όμως δεν είναι πλήρως εξακριβωμένος ο ρόλος των ελευθέρων ριζών και του οξειδωτικού στρες στην δημιουργία της CIN, παρατηρούμε ότι οι μελέτες δίνουν διαφορετικά αποτελέσματα, ασχέτως με την αντιοξειδωτική δράση ουσιών που μπορεί να εμπλέκεται. Εκτός αυτού, στα αποτελέσματα πάντα παίζουν ρόλο και άλλες μεταβλητές, όπως οι προϋπάρχουσες ασθένειες και η ηλικία. Χρειάζονται ακόμα πολλές έρευνες για να φτάσουμε σε επίπεδο πλήρους κατανόησης της CIN και συνεπώς σε σίγουρους, χωρίς αντικρούσεις, τρόπους προφύλαξης.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες καθώς και κλασικών δεικτών νεφρικής λειτουργίας για την διευκρίνιση του ρόλου που μπορεί να έχει το οξειδωτικό στρες στην οξεία νεφρική τοξικότητα που προκαλείται από την χρήση σκιαγραφικών μέσων. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν 5 δείκτες οξειδωτικού στρες (TAC, TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια, GSH και καταλάση) καθώς και 2 κλασικοί δείκτες νεφρικής λειτουργίας (ουρία, κρεατινίνη) σε δείγματα αίματος 20 ασθενών που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία – αγγειοπλαστική.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 31 νεφρολογικά υγιείς ασθενείς από το Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών Κοργιαλένιο Μπενάκειο Ε.Ε.Σ (Ερυθρός Σταυρός), οι οποίοι υποβλήθηκαν σε προγραμματισμένη στεφανιογραφία ή/και αγγειοπλαστική (χωρίς επιπλοκές κατά την επεμβατική διαδικασία). Από αυτούς χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα 20 ασθενών, λόγω διαφόρων αστοχιών του υλικού των υπολοίπων (αιμόλυση, μη επαρκές δείγμα, κλπ). Όλοι οι ασθενείς παρείχαν έγγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους σε αυτή μελέτη παρατήρησης.

Κατά την επεμβατική διαδικασία έγινε σε όλους ενδοαρτηριακή χορήγηση του σκιαγραφικού μέσου «Ultravist 370». Το Ultravist είναι ένα ιωδιούχο μη – ιονικό νεφροδιαπερατό σκιαγραφικό μέσο με χαμηλή ωσμωτική πίεση. Η ποσότητα που χορηγήθηκε στον κάθε ασθενή ήταν διαφορετική ανάλογα με τις ανάγκες, με ελάχιστη δόση τα 50ml και μέγιστη τα 200ml. Αιμοληψίες πραγματοποιούνταν σε τρεις χρονικές στιγμές: πριν την χορήγηση του σκιαγραφικού $t = 0$, αμέσως μετά την επεμβατική διαδικασία $t = 1$ και 2 - 4 ώρες μετά $t = 2$. Η συλλογή αίματος έγινε σε φιαλίδια με EDTA. Το πλάσμα διαχωρίστηκε και απομονώθηκε από το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα με φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10min. Ο μέγιστος χρόνος αναμονής μέχρι την φυγοκέντρηση ήταν 2 – 3 ώρες στο ψυγείο. Έπειτα το πλάσμα συλλέχθηκε σε φιαλίδια erpendorf τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20°C . Έγινε μεταφορά του πλάσματος και του ερυθροκυτταρικού αιμολύματος από το νοσοκομείο στο εργαστήριο Φυσιολογίας ζωικών οργανισμών του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, μέσα σε ξηρό πάγο. Στο εργαστήριο, επίσης, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν και διατηρήθηκαν στους -20°C .

Για την αξιολόγηση της νεφρικής λειτουργίας και την ύπαρξη νεφροπάθειας από το σκιαγραφικό μετρήθηκαν δύο κλασικοί δείκτες (ουρία, κρεατινίνη), καθώς και πέντε δείκτες οξειδωτικού στρες (TAC, TBARS, CARBONYLS, GSH, CAT).

3.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ (ΜΕΘΟΔΟΙ)

3.2.1 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε πλάσμα - TAC (Total Antioxidant Capacity)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος και τα αποτελέσματα δεν είναι ακριβή επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο, που εξασφαλίζει μια επισκόπηση των βιολογικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αντιοξειδωτικών.

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι ο πιο δυνατός ανεξάρτητος παράγοντας (predictor) για την TAC, προκαλώντας μεγάλη αύξηση στην TAC αν η συγκέντρωσή της είναι αυξημένη στο πλάσμα. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα από ότι σε άλλα μόρια, με εξαίρεση τις θειόλες. Η βιταμίνη C είναι ο δεύτερος πιο δυνατός παράγοντας, και ακολουθούν η βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Αρχή της μεθόδου

Η TAC του ορού αίματος υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH•) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszweska και Bartosz, (2002). [165] Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 10mM, pH 7.4	500μL	480μL
DPPH 0.1 mM	500μL	500μL
Πλάσμα	—	20μL

Πίνακας 2. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της TAC

Ανακινούμε τα Eppendorfs μερικές φορές και τα επιάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του δείγματος, εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη.

Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25°C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση).

Μεταφέρουμε 900 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ, % Abs μείωση = $(Abs_{\text{τυφλού}} - Abs_{\text{δείγματος}}) / Abs_{\text{τυφλού}} \times 100$

ii) μmol DPPH που απομακρύνθηκαν/mL πλάσματος = $[(\% \text{ Abs μείωση}/100) \times 50 \times 50] / 1000$.

α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας.

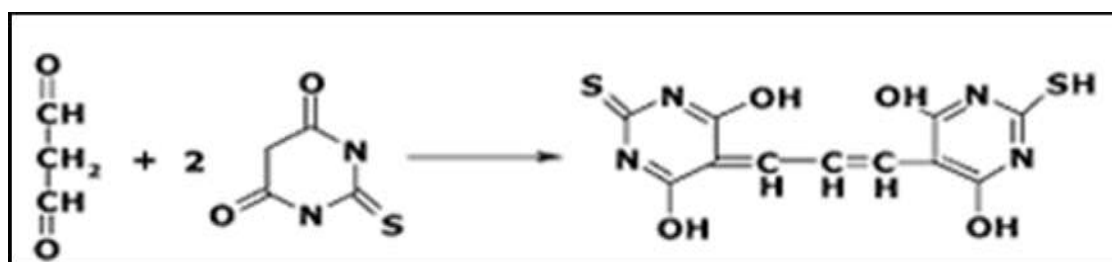
γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50 – πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.
Παράδειγμα: αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν/ mL πλάσματος είναι: $20 / 100 \times 50 \times 50 / 1000 = 0.5 \mu\text{mol DPPH}$ που απομακρύνθηκαν/ mL πλάσματος ή 0.5mmol DPPH που απομακρύνθηκαν/ L πλάσματος ή 0.5 mmol DPPH/L.

3.2.2 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) σε πλάσμα

Αρχή της μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη (MDA). Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων.



Εικόνα 6. Αντίδραση TBA (1) με MDA (2), που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου TBA-MDA.

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001). [166] Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95°C.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσμα (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό). Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95°C για 45min στο υδατόλουτρο. Κατόπιν, μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5min. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε erpendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25°C για 3min. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Το TBARS τεστ είναι ένας γρήγορος και εύκολος τρόπος προσδιορισμού λιπιδικής υπεροξειδωσης, όπως τα επίπεδα της παραγόμενης μαλονδιαλδεΐδης (MDA). Το προϊόν είναι η MDA(TBA)₂, της οποίας η απορρόφηση μετριέται στα 530 nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 x 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3100/100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L.

* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

3.2.3 Πρωτεϊνικά καρβονύλια (Carbonyls)

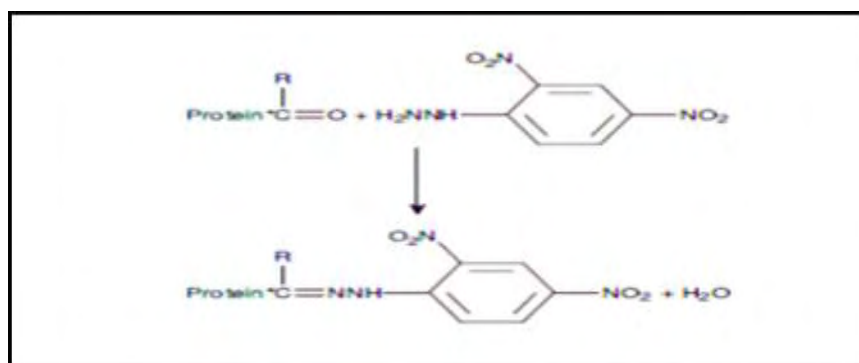
Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου C = O, ως συνήθως αποτελούν μέρος σε άλλες μεγαλύτερες λειτουργικές ομάδες. Παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της

αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμείες βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα.

Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δίνιτριφαιλυδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαιλυδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al., (2004). [167]



Πειραματικό πρωτόκολλο

Σε 50 μl πλάσμα προσθέτουμε 50 μl 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)*. Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμνιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C και απομακρύνουμε το υπερκείμενο. Κατόπιν, προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Μετά την πάροδο της μίας ώρας, φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C.

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού ειθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C.

Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει. Αυτήν την διαδικασία την επαναλαμβάνουμε άλλες δύο (2) φορές και απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37°C για 15 λεπτά.

Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4°C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

*(Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N).

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \times \text{cm}^{-1}$.

Το 0.022 υπολογίζεται ως εξής: 22 mmol/L ισούται με 22 μmol/mL, ισούται με 0.022nmol/mL. Όπου 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000μL στην κυψελίδα/ 50μL δείγματος).

3.2.4 Επεξεργασία ερυθροκυτταρικού αιμολύματος

Αφού κάναμε ήδη, όπως αναφέραμε παραπάνω, διαχωρισμό του πλάσματος από τα ερυθροκύτταρα συνεχίζουμε ως εξής:

1. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα.
2. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4000 g, για 15 λεπτά, στους 4°C.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μL).
4. Χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα ανάλογα με τις μετρήσεις που θα γίνουν. Διατήρηση στους -20°C.

Μέτρηση αιμοσφαιρίνης (Hb)

Αρχικά κάνουμε αραίωση 1:10 στο αντιδραστήριο της αιμοσφαιρίνης.

Έπειτα βάζουμε σε erpendorfs:

	Blank	Δείγμα
Αραιωμένο αντιδραστήριο αιμοσφαιρίνης	1mL	1mL
Δείγμα	—	5μL

Πίνακας 3. Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της αιμοσφαιρίνης.

Αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι για 10 λεπτά. Έπειτα μετράμε την απορρόφηση στα 540nm.

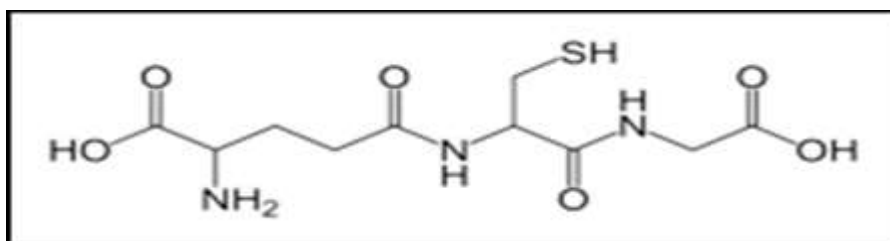
Στην συνέχεια καθαρίζεται το αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της γλουταθειόνης.

1. Προσθέτουμε 500 μl αιμολύματος σε 500 μl 5% TCA σε erpendorf και ανακινούμε στο vortex.
2. Φυγοκεντρούμε στα 22.000 g για 5 min στους 5°C.

3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε errendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμόλυματος / 90 μL 5% TCA και ανακινούμε στο vortex.
4. Φυγοκεντρούμε στα 22.000 g για 5 min στους 5°C.
5. Μεταφέρουμε το καθαρό υπερκείμενο σε errendorfs, τα οποία αποθηκεύονται στον καταψύκτη και θα χρησιμοποιηθούν για την μέτρηση της γλουταθειόνης.

3.2.5 Γλουταθειόνη (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Η γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου, με ενδοκυτταρική συγκέντρωση 1-15 mM. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (δισουλφίδιο της γλουταθειόνης, GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH χρησιμοποιείται ως δείκτης της αντιοξειδωτικής ικανότητας (Pastore., A., et al., 2003).



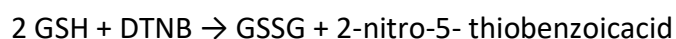
Εικόνα 7. Συντακτικός τύπος γλουταθειόνης

Η GSH λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα. Ενδεικτικά αναφέρονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των φαρμάκων και του ασβεστίου καθώς και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και των κυτταρικών μεμβρανών. Είναι επίσης ζωτική η συμμετοχή της στην απομάκρυνση των ξενοβιοτικών ουσιών από τον οργανισμό, στην απομάκρυνση των υπεροξειδίων και των ελεύθερων ριζών αλλά και στη μεταφορά των αμινοξέων διαμέσου των

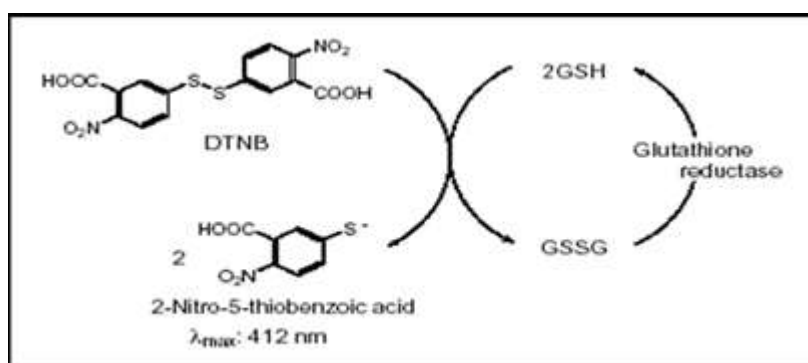
μεμβρανών. Οι φυσιολογικές τιμές για την συγκέντρωση της GSH ενδοκυτταρικά γενικά κυμαίνεται από 1 μέχρι 10 mM.

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειόδιο νιτρο-βενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετريέται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm (Reddy., Y.N., 2004). Από τη στιγμή που το DTNB είναι κίτρινο προϊόν, η συγκέντρωση της GSH στο δείγμα μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της απορρόφησης στα 412nm.



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Αυτή η ανακυκλώσιμη αντίδραση βελτιώνει την ευαισθησία ανίχνευσης της ολικής γλουταθειόνης.



Εικόνα 8. Ανακύκλωση και Αρχή Προσδιορισμού της Γλουταθειόνης.

Πειραματικό πρωτόκολλο

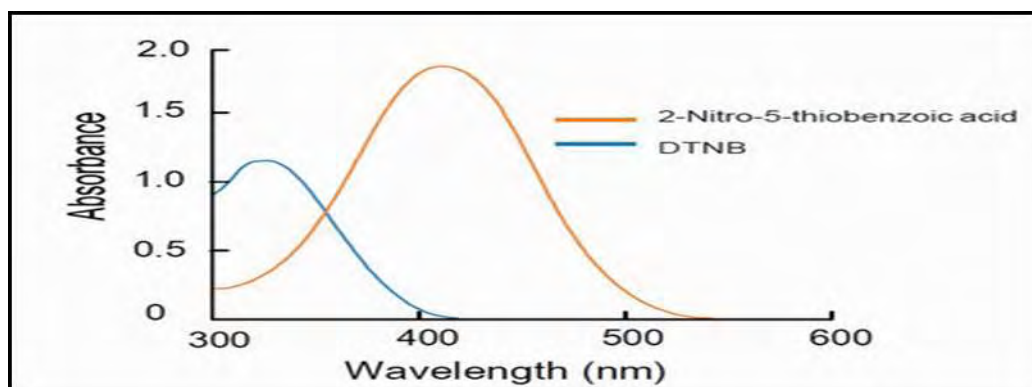
Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια erpendorf:

	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απιονισμένο νερό	20 μL	—
RBCL	—	20 μL

Πίνακας 4. Διαδοχική Σειρά Προσθήκης και οι Ποσότητες των Αντιδραστηρίων για τη Μέτρηση της GSH.

Αναδεύουμε τα αντιδραστήρια και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 25 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH.

Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm (Roland., F., et al., 1952).



Εικόνα 9. Φάσμα απορρόφησης του 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος (Dojindo Molecular Technologies).

Υπολογισμοί

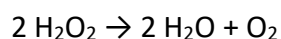
Δραστικότητα GSH (mmol/L) = $(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta Abs_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 262.6$, όπου 262.6 είναι ο συντελεστής αραιώσης (DF). Το 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μL) με τον όγκο του αιμολύματος (20μL) ($1010/20=50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να λάβουμε υπ' όψη την πρώτη αραιώση που έγινε από απιονισμένο νερό (1:1), για την λύση των ερυθροκυττάρων και τέλος πολλαπλασιάζουμε με 2×1.3 για να λάβουμε υπόψη την δεύτερη και την τρίτη αραιώση που έγινε από το TCA 5% (500μL/ 500μL και είτε 390μL / 300μL ή 260μL / 200μL). Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

GSH (mmol/g Hb): Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μετατρέπεται σε mg/mL πολλαπλασιάζοντας την τιμή της απορρόφησης 10×2 . Η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης είναι η τιμή της απορρόφησης σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας με 10 μετατρέπεται σε g/L (mg/mL) και με 2 η αραιώση 1/1 κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων λαμβάνεται υπόψη.

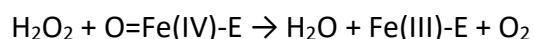
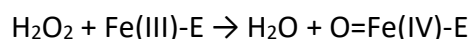
3.2.6 Δραστικότητα της Καταλάσης (CAT)

Αρχή της μεθόδου

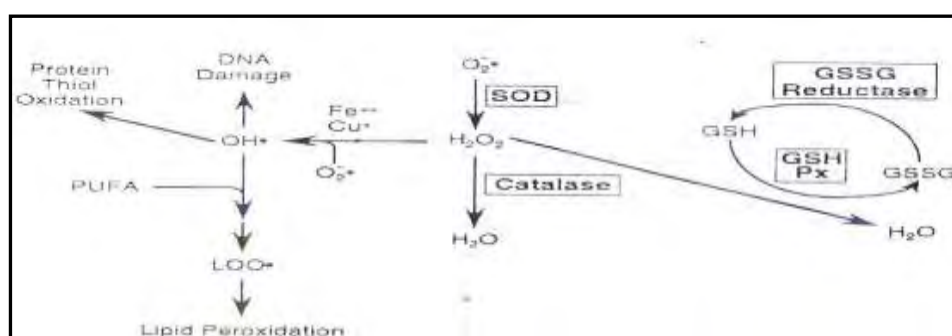
Η καταλάση είναι ένα κοινό ένζυμο, το οποίο απαντάται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Το υπεροξειδίου του υδρογόνου διαμορφώνεται ως προϊόν μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς. Είναι τοξικό και πρέπει να μετατραπεί γρήγορα σε άλλο, λιγότερο επικίνδυνη χημική ουσία. Για να διαχειριστεί αυτό το πρόβλημα, η ενζυμική καταλάση καταλύει γρήγορα την αποσύνθεση του υπεροξειδίου υδρογόνου, σε αβλαβή οξυγόνο και νερό. Chelikani P, et. al., (2004). Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια H₂O₂ το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Boon EM, et. al. (2007). Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H₂O₂. Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H₂O₂ από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



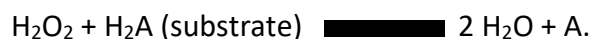
(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεμένη στο ένζυμο).



Εικόνα 10. Μονοπάτι αναγωγής του H₂O₂ σε H₂O

Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H₂O₂ για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H₂A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:

CAT



Για τον προσδιορισμό της δραστηρότητας της καταλάσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Aebi et al., (1984). [168]

Πειραματικό πρωτόκολλο

Αρχικά κάνουμε στα δείγματα (αιμόλυμα) αραιώση 1:10.

Δηλαδή βάζουμε σε erpendorfs 180μL dH₂O + 20μL δείγμα και αναδεύουμε.

Έπειτα προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991μL
Δείγμα RBL αραιωμένο 1/10 σε απιονισμένο νερό	4μL

Πίνακας 5. Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για την μέτρηση της Καταλάσης.

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37°C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση.

Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία UV κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 5μL 30% H₂O₂ στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 125 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστηρότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample}} \text{ per min} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$.

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του

κυλίνδρου (3000 μ L) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μ L) (3000/4 =750). 10 είναι η αραίωση του δείγματος (1/10) και 2 είναι η αραίωση των ερυθρών αιμοσφαιρίων με H₂O όταν έχουμε λύση.

Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μετατρέπεται σε mg/ mL πολλαπλασιάζοντας την τιμή της απορρόφησης 10 x 2. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης είναι η απορρόφηση σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας με 10 μετατρέπεται σε g/L (mg/mL) και με 2 η 1/1 αραίωση κατά την λύση των ερυθροκυττάρων λαμβάνεται υπόψη.
U = μ mol/min.

Δ Abs (min) = η αλλαγή στην απορρόφηση σε ένα λεπτό.

Δ Abs_{blank} είναι πάντοτε μηδέν και έτσι δεν απαιτείται μέτρηση του τυφλού.

Η συγκέντρωση του H₂O₂ σε κυψελίδα είναι περίπου 16 mM.

3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Tukey. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $p < 0.05$. . Οι συσχετίσεις στις μεταβολές των μετρούμενων παραμέτρων υπολογίστηκαν με τους συντελεστές Pearson και Spearman. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας επίσης ορίστηκε στο $p < 0,05$. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Αριθμός ασθενών: N = 20

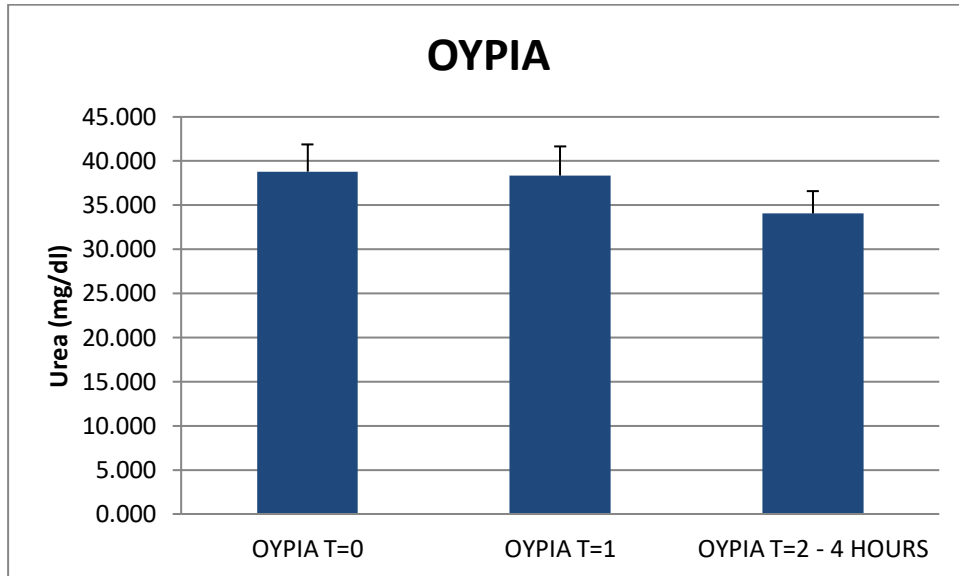
ΗΛΙΚΙΑ	64,8 ± 10,6 *
ΑΝΔΡΕΣ / ΓΥΝΑΙΚΕΣ	13 / 7
ΒΑΡΟΣ	81,5 ± 10,3 *
ΚΑΠΝΙΖΟΝΤΕΣ	4
ΥΠΕΡΤΑΣΗ	13
ΔΥΣΛΙΠΙΔΑΙΜΙΑ	15
ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	4
ΣΑΚΧΑΡΟ Τ0 (mg/dl)	114 ± 27,2 *
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ Τ0	16,3 ± 12,2 *
ΑΙΜΑΤΟΚΡΙΤΗΣ	38,3 ± 4,37 *
Salospir**	14
B – BLOCKERS**	11
ΣΤΑΤΙΝΕΣ**	13
ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗ**	7
ΑΝΤΙΠΗΚΤΙΚΑ PER OS**	3
ΑΝΤΙΥΠΕΡΤΑΣΙΚΑ α – ΜΕΑ, α – ΑΤΙΙ**	10
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΣΠΙΡΙΝΗΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΣΤΕΦΑΝΙΟΓΡΑΦΙΑ	13
ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΚΛΟΠΙΔΟΓΡΕΛΗΣ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΣΤΕΦΑΝΙΟΓΡΑΦΙΑ	5
ΧΟΡΗΓΗΣΗ Verapamil (ΑΓΓΕΙΟΔΙΑΣΤΑΛΤΙΚΟ) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΤΕΦΑΝΙΟΓΡΑΦΙΑ	4
PCI	4

Πίνακας 6. Χαρακτηριστικά ασθενών.

4.2 ΚΛΑΣΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μεταβολές της ουρίας και της κρεατινίνης στις 3 χρονικές στιγμές.

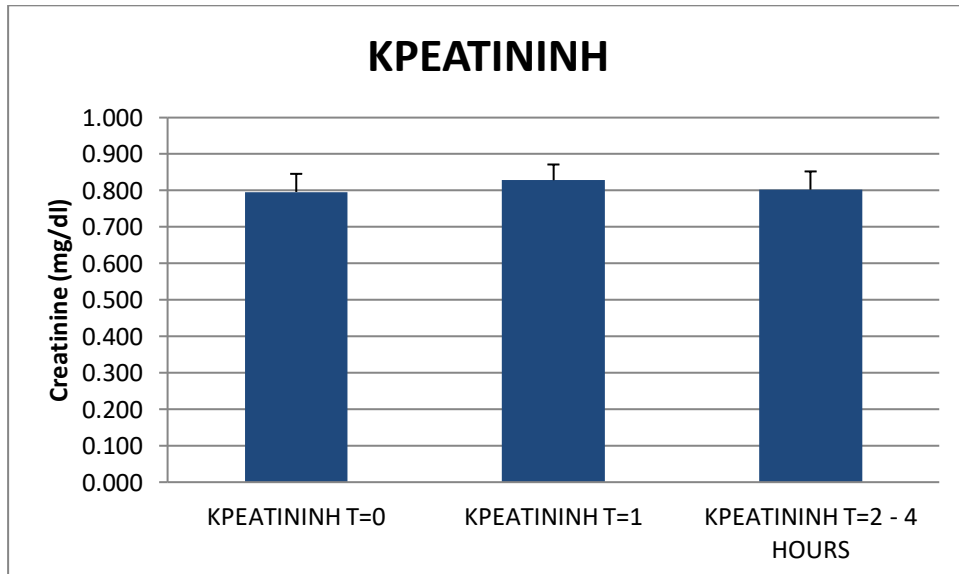
4.2.1 Επίπεδα ουρίας



Διάγραμμα 1. Επίπεδα ουρίας.

Έχουμε μείωση της δεύτερης χρονικής στιγμής (post) κατά 1,16% σε σχέση με την πρώτη και μείωση της τρίτης χρονικής στιγμής (2 – 4 hours post) κατά 12,2% σε σχέση με την πρώτη. Δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή.

4.2.2 Επίπεδα κρεατινίνης



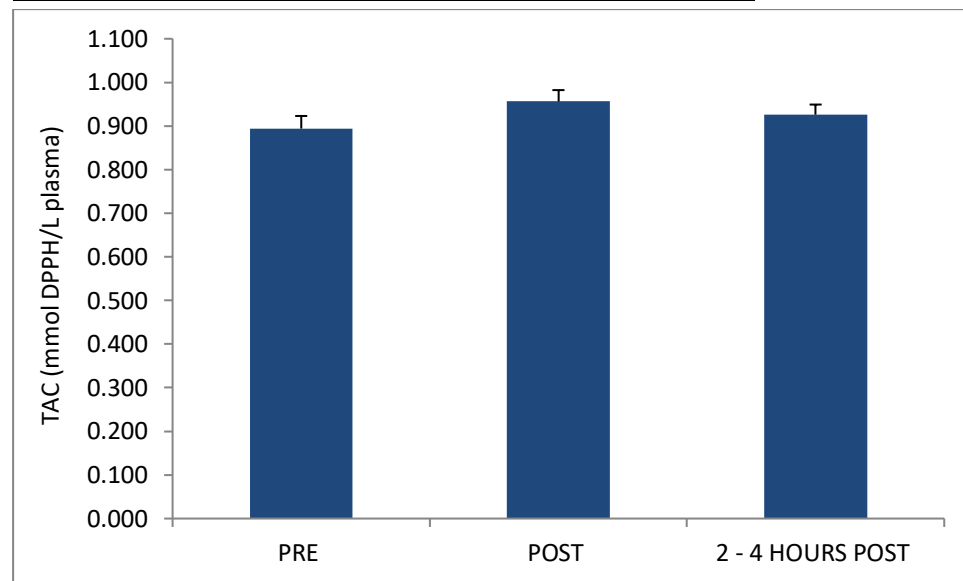
Διάγραμμα 2. Επίπεδα κρεατινίνης.

Έχουμε αύξηση της δεύτερης χρονικής στιγμής (post) κατά 4,15% σε σχέση με την πρώτη, και αύξηση της τρίτης χρονικής στιγμής (2 – 4 hours post) κατά 0,880% σε σχέση με την πρώτη. Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή.

4.3 ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται οι μεταβολές του κάθε δείκτη οξειδωτικού στρες στις 3 χρονικές στιγμές.

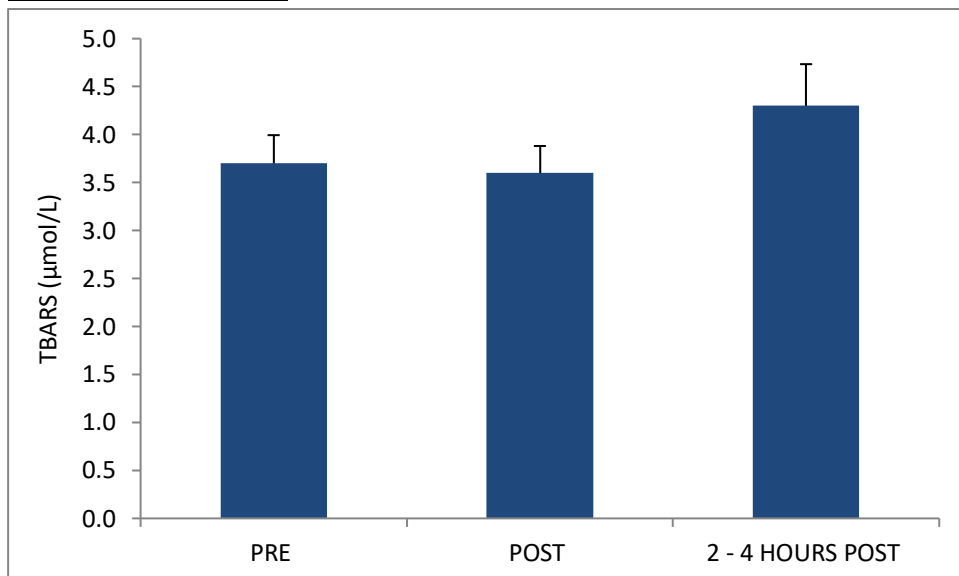
4.3.1 Επίπεδα ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)



Διάγραμμα 3. Επίπεδα TAC.

Έχουμε αύξηση της δεύτερης χρονικής στιγμής (post) κατά 6,9% σε σχέση με την πρώτη και αύξηση της τρίτης χρονικής στιγμής (2 – 4 hours post) κατά 3,6% σε σχέση με την πρώτη. Δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή.

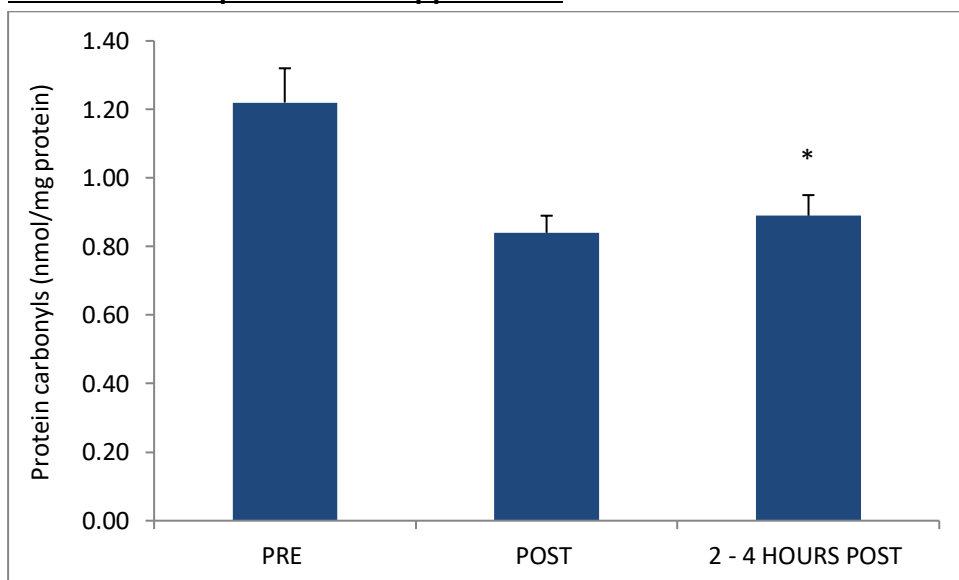
4.3.2 Επίπεδα TBARS



Διάγραμμα 4. Επίπεδα TBARS.

Έχουμε μείωση της δεύτερης χρονικής στιγμής (post) κατά 2,7% σε σχέση με την πρώτη και αύξηση της τρίτης χρονικής στιγμής (2 – 4 hours post) κατά 16,2% σε σχέση με την πρώτη. Δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή.

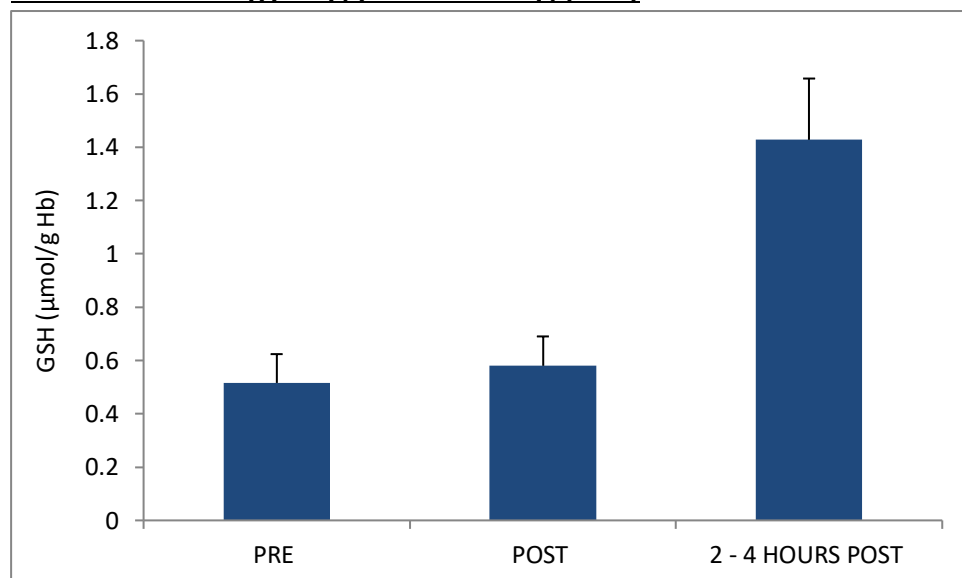
4.3.3 Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων



Διάγραμμα 5. Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Έχουμε στατιστικά σημαντική μείωση της δεύτερης χρονικής στιγμής (post) κατά 31% σε σχέση με την πρώτη και στατιστικά σημαντική μείωση της τρίτης χρονικής στιγμής (2 – 4 hours post) κατά 27% σε σχέση με την πρώτη.

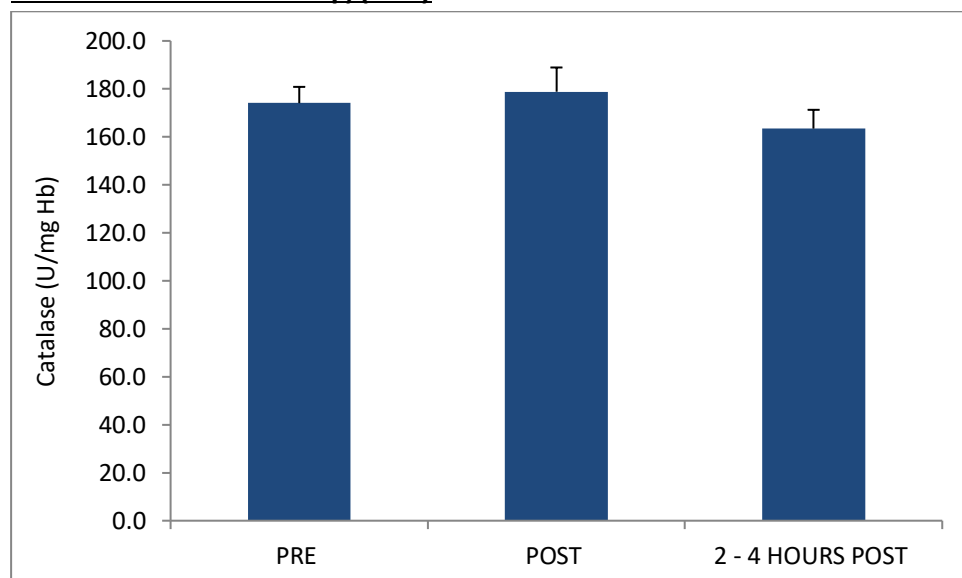
4.3.4 Επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)



Διάγραμμα 6. Επίπεδα GSH.

Έχουμε αύξηση της δεύτερης χρονικής στιγμής (post) κατά 12,4% σε σχέση με την πρώτη χωρίς στατιστική σημαντικότητα, αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση της τρίτης χρονικής στιγμής (2 – 4 hours post) κατά 177% σε σχέση με την πρώτη.

4.3.5 Επίπεδα καταλάσης (CAT)



Διάγραμμα 7. Επίπεδα καταλάσης.

Έχουμε αύξηση της δεύτερης χρονικής στιγμής (post) κατά 2,7% σε σχέση με την πρώτη και μείωση της τρίτης χρονικής στιγμής (2 – 4 hours post) κατά 6,1% σε σχέση με την πρώτη. Δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή.

4.4 ΟΛΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΙΜΩΝ (BIVARIATE CORRELATION)

Ελέγχθηκε η σχέση μεταξύ των τιμών πριν την χορήγηση του σκιαγραφικού (PRE), των τιμών 2 – 4 ώρες μετά την χορήγηση του σκιαγραφικού (2 – 4 hours POST), καθώς και η σχέση μεταξύ των τιμών PRE με 2 – 4 hours POST. Στους πίνακες που ακολουθούν παραθέτονται οι συσχετίσεις που έχουν στατιστική σημαντικότητα.

4.4.1 Συσχέτιση τιμών ανά χρονική στιγμή

	<i>Κρεατινίνη PRE</i>	<i>TAC PRE</i>	<i>TBARS PRE</i>	<i>Κρεατινίνη 2– 4 hours post</i>
<i>Ουρία PRE</i>	Significant p = 0,007 r = +			
<i>Καρβονύλια PRE</i>		Significant p = 0,038 r = -	Significant p = 0,001 r = -	
<i>Καταλάση PRE</i>		Significant p = 0,037 r = +		
<i>Ουρία 2 – 4 hours post</i>				Significant p = 0,006 r = +

Πίνακας 7. Συσχέτιση τιμών ανά χρονική στιγμή

4.4.2 Συσχέτιση τιμών μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών

	<i>Ουρία 2 – 4 hours POST</i>	<i>Κρεατινίνη 2 – 4 hours POST</i>	<i>GSH 2 – 4 hours POST</i>	<i>TAC 2 - 4 hours POST</i>	<i>TBARS 2 – 4 hours POST</i>	<i>Καταλάση 2 – 4 hours POST</i>
<i>Ουρία PRE</i>	Significant p = 0,000 r = +					
<i>Κρεατινίνη PRE</i>	Significant p = 0,013 r = +	Significant p = 0,020 r = +				
<i>GSH PRE</i>			Significant p = 0,001 r = +			
<i>Καρβονύλια PRE</i>				Significant p = 0,007 r = -	Significant p = 0,007 r = -	
<i>TAC PRE</i>				Significant p = 0,001		

				r = +		
TBARS PRE					Significant p = 0,000 r = +	
Καταλάση PRE						Significant p = 0,000 r = +

Πίνακας 8. Συσχέτιση τιμών μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών

Ελέγχθηκε επίσης η συσχέτιση μεταξύ του αιματοκρίτη και της GSH και της καταλάσης, όπου δεν βρέθηκε να έχει στατιστική σημαντικότητα. Αντίστοιχη συσχέτιση έγινε μεταξύ του όγκου του σκιαγραφικού και όλων των δεικτών (ουρίας, κρεατινίνης, δεικτών οξειδωτικού στρες) στις χρονικές στιγμές POST και 2 – 4 hours POST, όπου επίσης δεν βρέθηκε κάποια στατιστική σημαντικότητα.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία έγινε με σκοπό την προσέγγιση του ρόλου που μπορεί να έχει το οξειδωτικό στρες στην οξεία νεφρική τοξικότητα που προκαλείται από την χρήση σκιαγραφικών μέσων (CIN). Για την αξιολόγηση της νεφρικής λειτουργίας μελετήσαμε τους δείκτες ουρία και κρεατινίνη. Αντίστοιχα για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες μελετήσαμε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα TBARS, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, την γλουταθειόνη και την καταλάση. *Απ' όσο γνωρίζουμε μέχρι στιγμής, είναι η πρώτη μελέτη που ερευνά την σχέση μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της CIN χρησιμοποιώντας και τους 5 αυτούς δείκτες οξειδωτικού στρες.* Η βιβλιογραφία αναφέρει πάρα πολλές έρευνες (κυρίως σε ζωικά μοντέλα) που μελετούν ουσίες με αντιοξειδωτική δράση για την πρόληψη έναντι της CIN, γεγονός που μας δείχνει ότι θεωρείται δεδομένη κάποια σύνδεση της CIN με το οξειδωτικό στρες.

Η μελέτη έγινε σε δείγματα ασθενών που υποβλήθηκαν σε στεφανιογραφία/αγγειοπλαστική από τους οποίους πήραμε δείγμα αίματος πριν, αμέσως μετά και 2 – 4 ώρες μετά την επεμβατική διαδικασία (λόγω της καινούριας τάσης που θέλει την προσπέλαση να είναι κερκιδική και όχι μηριαία, συνεπώς τους ασθενείς να παίρνουν εξιτήριο πολύ γρήγορα). Αυτές λοιπόν οι χρονικές στιγμές μας επιτρέπουν να δούμε τις άμεσες επιδράσεις που μπορεί να έχει το σκιαγραφικό στον οργανισμό, και συγκεκριμένα στους νεφρούς, και να δούμε αν υπάρχουν πρώιμα στοιχεία που μπορούμε να παρατηρήσουμε όσο οι ασθενείς βρίσκονται ακόμα στο νοσοκομείο. Επιπλέον, η χορήγηση του σκιαγραφικού έγινε ενδοαρτηριακά, γεγονός που μας επιτρέπει να ταυτοποιήσουμε ότι όντως η συγκεκριμένη οδός χορήγησης αυξάνει τις πιθανότητες δημιουργίας βλάβης.

Η CIN, όπως ξέρουμε, χαρακτηρίζεται από αύξηση της κρεατινίνης (serum creatinine - SCr) κατά 0.5 mg/dL ή αλλιώς αύξησή της κατά 25% σε χρονικό διάστημα 72 ωρών από την χορήγηση του σκιαγραφικού. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι δεν δημιουργείται νεφροτοξικότητα από το σκιαγραφικό μέσο μέχρι και 2 – 4 ώρες μετά την έκθεση του οργανισμού σε αυτό, αφού η αύξηση της κρεατινίνης σ' αυτή τη χρονική στιγμή ήταν μόλις 0,88%. Λόγω όμως της μη ευαισθησίας της κρεατινίνης

στις άμεσες αλλαγές της νεφρικής λειτουργίας, μπορεί να ξεκινάει μεν η δημιουργία CIN αλλά να μην είναι ορατές οι αλλαγές από τόσο νωρίς. Οπότε ναι μεν βλέπουμε ότι όντως η κρεατινίνη μπορεί να είναι ένας αργός δείκτης υπόδειξης δημιουργίας CIN, όπως έχουν ήδη δείξει πολλές μελέτες, αλλά χρειάζονται περισσότερες έρευνες που να περιλαμβάνουν τη σύγκριση ανάμεσα σε περισσότερες χρονικές στιγμές. Από την άλλη, στους δείκτες ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) και πρωτεϊνικά καρβονύλια είχαμε στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις 2 – 4 ώρες. Παρατηρήσαμε αύξηση της GSH κατά 177% και μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κατά 27%, γεγονός που μας υποδεικνύει την ενεργοποίηση αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Φαίνεται λοιπόν ότι από πολύ νωρίς έχουμε δημιουργία οξειδωτικού στρες και ότι ο οργανισμός αντιδρά ώστε να επαναφέρει την ισορροπία. Παρατηρούμε επίσης στατιστικά σημαντική μείωση των καρβονυλίων κατά 31% αμέσως μετά την έκθεση στο σκιαγραφικό μέσο (POST), χωρίς καμία σημαντική μεταβολή στους υπόλοιπους δείκτες σ' αυτή τη χρονική στιγμή. Γι' αυτό ελέγχθηκε τυχόν αντιοξειδωτική δράση του σκιαγραφικού μέσου «Ultravist 370» με την μέθοδο DPPH, όπου βρέθηκε αναστολή της ρίζας 8%, αποδεικνύοντας ότι το σκιαγραφικό δεν έχει αντιοξειδωτική δράση.

Σε έρευνα που έκαναν οι Tasanarong A, et al. μελετώντας την προληπτική δράση του ινδικού φραγκοστάφυλου έναντι της CIN σε δείγματα ποντικών τα TBARS αυξήθηκαν ενώ η TAC και η καταλάση μειώθηκαν στο γκρουπ της CIN σε σχέση με το control γκρουπ. [148] Αντίστοιχα σε έρευνα που έκαναν οι Baykara M, et al. για την προληπτική δράση της πρόπολης έναντι της CIN σε δείγματα αρουραίων που ανέλυσαν 3 μέρες μετά τη χορήγηση σκιαγραφικού, τα επίπεδα της MDA αυξήθηκαν ενώ της GSH και της καταλάσης μειώθηκαν σημαντικά στο CIN γκρουπ. [153] Τα επίπεδα MDA ήταν σημαντικά αυξημένα στο CIN γκρουπ και στην έρευνα των Özbek K, et al. για την προληπτική δράση της ταδαλαφίλης, όπου συμπεριέλαβαν δείγματα αρουραίων που ανέλυσαν 48 ώρες μετά την έκθεση στο σκιαγραφικό. [163] Αντίθετα στην παρούσα έρευνα τα TBARS, η TAC και η καταλάση δεν είχαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μέχρι και 2 – 4 ώρες μετά τη χορήγηση του σκιαγραφικού. Είναι όμως πιθανό οι συγκεκριμένοι δείκτες να επηρεάζονταν σε διάστημα 24 – 72 ωρών μετά. Βλέπουμε, βέβαια, ότι σε μελέτη των Garofalo AS, et

αι. τα επίπεδα της MDA δεν αυξήθηκαν, παρότι υπήρχε νέκρωση και απόπτωση κυττάρων που υποδήλωνε την ύπαρξη CIN. [169]

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη βλέπουμε ότι μέχρι και 2 – 4 ώρες μετά την έκθεση στο σκιαγραφικό μέσο η ουρία και η κρεατινίνη δεν έχουν στατιστικά σημαντική μεταβολή. Άρα σ' αυτήν τη χρονική στιγμή δεν έχουμε δημιουργία οξειάς νεφρικής τοξικότητας από το σκιαγραφικό μέσο. Οι δείκτες TBARS, TAC και καταλάση, επίσης, δεν έχουν στατιστικά σημαντική μεταβολή. Από την άλλη, όμως, η GSH έχει στατιστική αύξηση 177% και τα καρβονύλια στατιστική μείωση 27% στις 2 – 4 ώρες μετά. Επίσης, τα καρβονύλια έχουν στατιστική μείωση κατά 31% αμέσως μετά την χορήγηση του σκιαγραφικού. Βλέπουμε, λοιπόν, ότι στις 2 – 4 ώρες μετά έχουμε δημιουργία οξειδωτικού στρες.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Assareh, A., et al., *Contrast induced nephropathy among patients with normal renal function undergoing coronary angiography*. J Renal Inj Prev, 2016. **5**(1): p. 21-4.
2. Morcos, S.K., H.S. Thomsen, and J.A. Webb, *Contrast-media-induced nephrotoxicity: a consensus report*. Contrast Media Safety Committee, European Society of Urogenital Radiology (ESUR). Eur Radiol, 1999. **9**(8): p. 1602-13.
3. Pattharanitima, P. and A. Tasanarong, *Pharmacological strategies to prevent contrast-induced acute kidney injury*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 236930.
4. Tepel, M., P. Aspelin, and N. Lameire, *Contrast-induced nephropathy: a clinical and evidence-based approach*. Circulation, 2006. **113**(14): p. 1799-806.
5. Murphy, S.W., B.J. Barrett, and P.S. Parfrey, *Contrast nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(1): p. 177-82.
6. Nash, K., A. Hafeez, and S. Hou, *Hospital-acquired renal insufficiency*. Am J Kidney Dis, 2002. **39**(5): p. 930-6.
7. Rear, R., R.M. Bell, and D.J. Hausenloy, *Contrast-induced nephropathy following angiography and cardiac interventions*. Heart, 2016. **102**(8): p. 638-48.
8. Mehran, R. and E. Nikolsky, *Contrast-induced nephropathy: definition, epidemiology, and patients at risk*. Kidney Int Suppl, 2006(100): p. S11-5.
9. 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.
10. Dangas, G., et al., *Contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary interventions in relation to chronic kidney disease and hemodynamic variables*. Am J Cardiol, 2005. **95**(1): p. 13-9.
11. Stolker, J.M., et al., *Pre-procedural glucose levels and the risk for contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing coronary angiography*. J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(14): p. 1433-40.
12. Andreucci, M., et al., *Acute kidney injury by radiographic contrast media: pathogenesis and prevention*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 362725.
13. Kolonko, A., F. Kokot, and A. Wiecek, *Contrast-associated nephropathy--old clinical problem and new therapeutic perspectives*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(3): p. 803-6.
14. Mehran, R., et al., *A simple risk score for prediction of contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary intervention: development and initial validation*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(7): p. 1393-9.
15. Nikolsky, E., et al., *Low hematocrit predicts contrast-induced nephropathy after percutaneous coronary interventions*. Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 706-13.
16. Gleeson, T.G. and S. Bulughapitiya, *Contrast-induced nephropathy*. AJR Am J Roentgenol, 2004. **183**(6): p. 1673-89.
17. Aspelin, P., et al., *Nephrotoxic effects in high-risk patients undergoing angiography*. N Engl J Med, 2003. **348**(6): p. 491-9.
18. Azzalini, L., V. Spagnoli, and H.Q. Ly, *Contrast-Induced Nephropathy: From Pathophysiology to Preventive Strategies*. Can J Cardiol, 2016. **32**(2): p. 247-55.
19. Seeliger, E., et al., *Contrast-induced kidney injury: mechanisms, risk factors, and prevention*. Eur Heart J, 2012. **33**(16): p. 2007-15.
20. Katzberg, R.W. and B.J. Barrett, *Risk of iodinated contrast material--induced nephropathy with intravenous administration*. Radiology, 2007. **243**(3): p. 622-8.
21. Stacul, F., et al., *Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines*. Eur Radiol, 2011. **21**(12): p. 2527-41.

22. 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.
23. Nyman, U., et al., *Are intravenous injections of contrast media really less nephrotoxic than intra-arterial injections?* *Eur Radiol*, 2012. **22**(6): p. 1366-71.
24. Manske, C.L., et al., *Contrast nephropathy in azotemic diabetic patients undergoing coronary angiography*. *Am J Med*, 1990. **89**(5): p. 615-20.
25. Basile, D.P., M.D. Anderson, and T.A. Sutton, *Pathophysiology of acute kidney injury*. *Compr Physiol*, 2012. **2**(2): p. 1303-53.
26. Persson, P.B., P. Hansell, and P. Liss, *Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy*. *Kidney Int*, 2005. **68**(1): p. 14-22.
27. Tumlin, J., et al., *Pathophysiology of contrast-induced nephropathy*. *Am J Cardiol*, 2006. **98**(6A): p. 14K-20K.
28. Keaney, J.J., C.M. Hannon, and P.T. Murray, *Contrast-induced acute kidney injury: how much contrast is safe?* *Nephrol Dial Transplant*, 2013. **28**(6): p. 1376-83.
29. 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.
30. Heyman, S.N., et al., *Reactive oxygen species and the pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy*. *Invest Radiol*, 2010. **45**(4): p. 188-95.
31. Clanton, T.L., *Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle*. *J Appl Physiol* (1985), 2007. **102**(6): p. 2379-88.
32. Pisani, A., et al., *Role of reactive oxygen species in pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 868321.
33. Elbasan, Z., et al., *Contrast-induced nephropathy in patients with ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention*. *Angiology*, 2014. **65**(1): p. 37-42.
34. Filiopoulos, V., D. Hadjiyannakos, and D. Vlassopoulos, *New insights into uric acid effects on the progression and prognosis of chronic kidney disease*. *Ren Fail*, 2012. **34**(4): p. 510-20.
35. Barbieri, L., et al., *Uric acid levels and the risk of Contrast Induced Nephropathy in patients undergoing coronary angiography or PCI*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2015. **25**(2): p. 181-6.
36. Boushey, C.J., et al., *A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes*. *JAMA*, 1995. **274**(13): p. 1049-57.
37. van Guldener, C., F. Stam, and C.D. Stehouwer, *Homocysteine metabolism in renal failure*. *Kidney Int Suppl*, 2001. **78**: p. S234-7.
38. Suliman, M.E., et al., *Hyperhomocysteinemia, nutritional status, and cardiovascular disease in hemodialysis patients*. *Kidney Int*, 2000. **57**(4): p. 1727-35.
39. De Luca, G., et al., *Homocysteine and its effects on in-stent restenosis*. *Circulation*, 2005. **112**(19): p. e307-11.
40. Barbieri, L., et al., *Elevated homocysteine and the risk of contrast-induced nephropathy: a cohort study*. *Angiology*, 2015. **66**(4): p. 333-8.
41. Kim, S.J., et al., *Relation of homocysteinemia to contrast-induced nephropathy in patients undergoing percutaneous coronary intervention*. *Am J Cardiol*, 2011. **108**(8): p. 1086-91.
42. Kafkas, N., et al., *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as an Early Marker of Contrast-Induced Nephropathy After Elective Invasive Cardiac Procedures*. *Clin Cardiol*, 2016. **39**(8): p. 464-70.
43. Perrin, T., E. Descombes, and S. Cook, *Contrast-induced nephropathy in invasive cardiology*. *Swiss Med Wkly*, 2012. **142**: p. w13608.

44. Wybraniec, M.T. and K. Mizia-Stec, *Renalase and Biomarkers of Contrast-Induced Acute Kidney Injury*. *Cardiorenal Med*, 2015. **6**(1): p. 25-36.
45. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans*. *Genomics*, 1997. **45**(1): p. 17-23.
46. Schmidt-Ott, K.M., et al., *Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(2): p. 407-13.
47. Singer, E., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: pathophysiology and clinical applications*. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013. **207**(4): p. 663-72.
48. Xu, J., et al., *Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(5): p. 1275-80.
49. Wang, M., et al., *Significance of Cystatin C for Early Diagnosis of Contrast-Induced Nephropathy in Patients Undergoing Coronary Angiography*. *Med Sci Monit*, 2016. **22**: p. 2956-61.
50. He, H., et al., *Urinary interleukin-18 as an early indicator to predict contrast-induced nephropathy in patients undergoing percutaneous coronary intervention*. *Exp Ther Med*, 2014. **8**(4): p. 1263-1266.
51. Bulent Gul, C.B., et al., *Urinary IL-18: a marker of contrast-induced nephropathy following percutaneous coronary intervention?* *Clin Biochem*, 2008. **41**(7-8): p. 544-7.
52. Briguori, C., et al., *Novel biomarkers for contrast-induced acute kidney injury*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 568738.
53. Ichimura, T., et al., *Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(7): p. 4135-42.
54. 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.
55. Huang, H., et al., *Structural and functional interaction of fatty acids with human liver fatty acid-binding protein (L-FABP) T94A variant*. *FEBS J*, 2014. **281**(9): p. 2266-83.
56. Manabe, K., et al., *Urinary liver-type fatty acid-binding protein level as a predictive biomarker of contrast-induced acute kidney injury*. *Eur J Clin Invest*, 2012. **42**(5): p. 557-63.
57. Nozue, T., I. Michishita, and I. Mizuguchi, *Predictive value of serum cystatin C, beta2-microglobulin, and urinary liver-type fatty acid-binding protein on the development of contrast-induced nephropathy*. *Cardiovasc Interv Ther*, 2010. **25**(2): p. 85-90.
58. Thiele, H., et al., *Impact of high-dose N-acetylcysteine versus placebo on contrast-induced nephropathy and myocardial reperfusion injury in unselected patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. The LIPSIA-N-ACC (Prospective, Single-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Leipzig Immediate Percutaneous Coronary Intervention Acute Myocardial Infarction N-ACC) Trial*. *J Am Coll Cardiol*, 2010. **55**(20): p. 2201-9.
59. Kumar, A., et al., *Comparative study of renal protective effects of allopurinol and N-acetyl-cysteine on contrast induced nephropathy in patients undergoing cardiac catheterization*. *J Clin Diagn Res*, 2014. **8**(12): p. HC03-7.
60. Vanhoutte, P.M. and Y. Gao, *Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease*. *Curr Opin Pharmacol*, 2013. **13**(2): p. 265-73.
61. Gupta, S. and H.M. Wright, *Nebivolol: a highly selective beta1-adrenergic receptor blocker that causes vasodilation by increasing nitric oxide*. *Cardiovasc Ther*, 2008. **26**(3): p. 189-202.
62. Munzel, T. and T. Gori, *Nebivolol: the somewhat-different beta-adrenergic receptor blocker*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(16): p. 1491-9.

63. Altunoren, O., et al., *Is Nebivolol Really Effective in Preventing Contrast Induced Nephropathy?* *Kidney Blood Press Res*, 2015. **40**(5): p. 533-41.
64. Nusca, A., R. Melfi, and G. Di Sciascio, *Percutaneous coronary interventions and statins therapy*. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, 2008. **2**(2): p. 101-7.
65. Ukaigwe, A., et al., *Meta-analysis on efficacy of statins for prevention of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing coronary angiography*. *Am J Cardiol*, 2014. **114**(9): p. 1295-302.
66. Kandula, P., et al., *Statins for prevention of contrast-induced nephropathy in patients undergoing non-emergent percutaneous coronary intervention*. *Nephrology (Carlton)*, 2010. **15**(2): p. 165-70.
67. Jo, S.H., et al., *Prevention of radiocontrast medium-induced nephropathy using short-term high-dose simvastatin in patients with renal insufficiency undergoing coronary angiography (PROMISS) trial--a randomized controlled study*. *Am Heart J*, 2008. **155**(3): p. 499 e1-8.
68. Munoz, M.A., et al., *Pravastatin versus simvastatin for prevention of contrast-induced nephropathy*. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2011. **16**(3-4): p. 376-9.
69. 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.
70. Weisbord, S.D. and P.M. Palevsky, *Prevention of contrast-induced nephropathy with volume expansion*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. **3**(1): p. 273-80.
71. Solomon, R., et al., *Effects of saline, mannitol, and furosemide to prevent acute decreases in renal function induced by radiocontrast agents*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(21): p. 1416-20.
72. Busch, S.V., et al., *Prevention of contrast-induced nephropathy in STEMI patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a systematic review*. *J Interv Cardiol*, 2013. **26**(1): p. 97-105.
73. 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.
74. Mylonas, C. and D. Kouretas, *Lipid peroxidation and tissue damage*. *In Vivo*, 1999. **13**(3): p. 295-309.
75. Phaniendra, A., D.B. Jestadi, and L. Periyasamy, *Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases*. *Indian J Clin Biochem*, 2015. **30**(1): p. 11-26.
76. Gruhlke, M.C. and A.J. Slusarenko, *The biology of reactive sulfur species (RSS)*. *Plant Physiol Biochem*, 2012. **59**: p. 98-107.
77. Pham-Huy, L.A., H. He, and C. Pham-Huy, *Free radicals, antioxidants in disease and health*. *Int J Biomed Sci*, 2008. **4**(2): p. 89-96.
78. Genestra, M., *Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants*. *Cell Signal*, 2007. **19**(9): p. 1807-19.
79. Willcox, J.K., S.L. Ash, and G.L. Catignani, *Antioxidants and prevention of chronic disease*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2004. **44**(4): p. 275-95.
80. Mast, F.D., et al., *Peroxisome biogenesis: something old, something new, something borrowed*. *Physiology (Bethesda)*, 2010. **25**(6): p. 347-56.
81. De Duve, C. and P. Baudhuin, *Peroxisomes (microbodies and related particles)*. *Physiol Rev*, 1966. **46**(2): p. 323-57.
82. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. *Chem Biol Interact*, 2006. **160**(1): p. 1-40.
83. Ogu, C.C. and J.L. Maxa, *Drug interactions due to cytochrome P450*. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2000. **13**(4): p. 421-3.

84. Halliwell, B., *Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation*. *Biochem Soc Trans*, 1996. **24**(4): p. 1023-7.
85. Cooper, C.E., et al., *Exercise, free radicals and oxidative stress*. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(2): p. 280-5.
86. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(1): p. 47-95.
87. Young, I.S. and J.V. Woodside, *Antioxidants in health and disease*. *J Clin Pathol*, 2001. **54**(3): p. 176-86.
88. McCaughan, J.S., Jr., *Photodynamic therapy: a review*. *Drugs Aging*, 1999. **15**(1): p. 49-68.
89. Cross, C.E., et al., *Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids*. *Environ Health Perspect*, 1994. **102 Suppl 10**: p. 185-91.
90. Kelly, F.J., et al., *The free radical basis of air pollution: focus on ozone*. *Respir Med*, 1995. **89**(10): p. 647-56.
91. Pourcelot, S., et al., *Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine and 5-(hydroxymethyl) uracil in smokers*. *Free Radic Res*, 1999. **30**(3): p. 173-80.
92. Fenster, C.P., et al., *Obesity, aerobic exercise, and vascular disease: the role of oxidant stress*. *Obes Res*, 2002. **10**(9): p. 964-8.
93. Finaud, J., G. Lac, and E. Filaire, *Oxidative stress : relationship with exercise and training*. *Sports Med*, 2006. **36**(4): p. 327-58.
94. Jenkins, R.R., *Free radical chemistry. Relationship to exercise*. *Sports Med*, 1988. **5**(3): p. 156-70.
95. Rimbach, G., et al., *Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems*. *Arch Tierernahr*, 1999. **52**(3): p. 203-22.
96. Sen, C.K., *Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction*. *Med Sci Sports Exerc*, 2001. **33**(3): p. 368-70.
97. Sen, C.K. and L. Packer, *Antioxidant and redox regulation of gene transcription*. *FASEB J*, 1996. **10**(7): p. 709-20.
98. Reid, M.B., *Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't*. *J Appl Physiol (1985)*, 2001. **90**(2): p. 724-31.
99. Linnane, A.W., et al., *Human aging and global function of coenzyme Q10*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **959**: p. 396-411; discussion 463-5.
100. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. **39**(1): p. 44-84.
101. Urso, M.L. and P.M. Clarkson, *Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation*. *Toxicology*, 2003. **189**(1-2): p. 41-54.
102. Young, I.S. and J. McEneny, *Lipoprotein oxidation and atherosclerosis*. *Biochem Soc Trans*, 2001. **29**(Pt 2): p. 358-62.
103. Levine, R.L., *Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **32**(9): p. 790-6.
104. Stadtman, E.R. and R.L. Levine, *Protein oxidation*. *Ann N Y Acad Sci*, 2000. **899**: p. 191-208.
105. Halliwell, B., *Biochemistry of oxidative stress*. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 5): p. 1147-50.
106. Liou, W., et al., *Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver*. *Free Radic Biol Med*, 1993. **14**(2): p. 201-7.
107. Weisiger, R.A. and I. Fridovich, *Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization*. *J Biol Chem*, 1973. **248**(13): p. 4793-6.
108. Karlsson, K., et al., *Pharmacokinetics of extracellular-superoxide dismutase in the vascular system*. *Free Radic Biol Med*, 1993. **14**(2): p. 185-90.

109. Zhan, C.D., et al., *Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet*. J Hypertens, 2004. **22**(10): p. 2025-33.
110. Sies, H., *Strategies of antioxidant defense*. Eur J Biochem, 1993. **215**(2): p. 213-9.
111. Sies, H., *Oxidative stress: from basic research to clinical application*. Am J Med, 1991. **91**(3C): p. 31S-38S.
112. Sies, H., *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 291-5.
113. Sies, H., *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. Redox Biol, 2015. **4**: p. 180-3.
114. Kerksick, C. and D. Willoughby, *The antioxidant role of glutathione and N-acetylcysteine supplements and exercise-induced oxidative stress*. J Int Soc Sports Nutr, 2005. **2**: p. 38-44.
115. Tajiri, K., et al., *Prediction of chronic renal insufficiency after coronary angiography by an early increase in oxidative stress and decrease in glomerular filtration rate*. Circ J, 2011. **75**(2): p. 437-42.
116. Aviram, M., et al., *Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase*. J Clin Invest, 1998. **101**(8): p. 1581-90.
117. Akcay, A.B., et al., *The relationship between paraoxonase-1 activity and coronary artery disease in patients with metabolic syndrome*. Turk Kardiyol Dern Ars, 2011. **39**(5): p. 371-7.
118. Borekci, A., et al., *Oxidative stress and paraoxonase 1 activity predict contrast-induced nephropathy in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention*. Angiology, 2015. **66**(4): p. 339-45.
119. Saitoh, T., et al., *Intravenous glutathione prevents renal oxidative stress after coronary angiography more effectively than oral N-acetylcysteine*. Heart Vessels, 2011. **26**(5): p. 465-72.
120. Buyukhatipoglu, H., et al., *N-acetylcysteine fails to prevent renal dysfunction and oxidative stress after noniodine contrast media administration during percutaneous coronary interventions*. Pol Arch Med Wewn, 2010. **120**(10): p. 383-9.
121. Jin, B., et al., *Preventive effect of reduced glutathione on contrast-induced nephropathy in elderly patients undergoing coronary angiography or intervention: a randomized, controlled trial*. Braz J Med Biol Res, 2015. **48**(9): p. 839-42.
122. Wang, C., et al., *Reduced Glutathione for Prevention of Renal Outcomes in Patients Undergoing Selective Coronary Angiography or Intervention*. J Interv Cardiol, 2015. **28**(3): p. 249-56.
123. Flesch, M., et al., *Effect of beta-blockers on free radical-induced cardiac contractile dysfunction*. Circulation, 1999. **100**(4): p. 346-53.
124. Yue, T.L., et al., *Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **263**(1): p. 92-8.
125. Yilmaz, M., et al., *Comparison of Carvedilol and Metoprolol for Preventing Contrast-Induced Nephropathy after Coronary Angiography*. Cardiorenal Med, 2015. **5**(3): p. 199-207.
126. Chrusciel, P., J. Rysz, and M. Banach, *Defining the role of trimetazidine in the treatment of cardiovascular disorders: some insights on its role in heart failure and peripheral artery disease*. Drugs, 2014. **74**(9): p. 971-80.
127. Onbasili, A.O., et al., *Trimetazidine in the prevention of contrast-induced nephropathy after coronary procedures*. Heart, 2007. **93**(6): p. 698-702.

128. Binienda, Z.K. and S.F. Ali, *Neuroprotective role of L-carnitine in the 3-nitropropionic acid induced neurotoxicity*. Toxicol Lett, 2001. **125**(1-3): p. 67-73.
129. Hoppel, C., *The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism*. Am J Kidney Dis, 2003. **41**(4 Suppl 4): p. S4-12.
130. Calo, L.A., et al., *Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage*. Int J Cardiol, 2006. **107**(1): p. 54-60.
131. Gulcin, I., *Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine*. Life Sci, 2006. **78**(8): p. 803-11.
132. Boyacioglu, M., et al., *The effect of L-carnitine on oxidative stress responses of experimental contrast-induced nephropathy in rats*. J Vet Med Sci, 2014. **76**(1): p. 1-8.
133. Park, J.W., et al., *Paricalcitol attenuates cyclosporine-induced kidney injury in rats*. Kidney Int, 2010. **77**(12): p. 1076-85.
134. Husain, K., et al., *Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats*. Am J Nephrol, 2009. **29**(5): p. 465-72.
135. Freundlich, M., et al., *Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol*. Kidney Int, 2008. **74**(11): p. 1394-402.
136. 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.
137. Choi, B.H., K.S. Kang, and M.K. Kwak, *Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease*. Molecules, 2014. **19**(8): p. 12727-59.
138. Zhao, Z., et al., *Sulforaphane Attenuates Contrast-Induced Nephropathy in Rats via Nrf2/HO-1 Pathway*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 9825623.
139. Tarwadi, K. and V. Agte, *Antioxidant and micronutrient potential of common fruits available in the Indian subcontinent*. Int J Food Sci Nutr, 2007. **58**(5): p. 341-9.
140. Krishnaveni, M. and S. Mirunalini, *Therapeutic potential of Phyllanthus emblica (amla): the ayurvedic wonder*. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2010. **21**(1): p. 93-105.
141. Zhang, Y.J., et al., *Novel norsesquiterpenoids from the roots of Phyllanthus emblica*. J Nat Prod, 2000. **63**(11): p. 1507-10.
142. Bandyopadhyay, S.K., S.C. Pakrashi, and A. Pakrashi, *The role of antioxidant activity of Phyllanthus emblica fruits on prevention from indomethacin induced gastric ulcer*. J Ethnopharmacol, 2000. **70**(2): p. 171-6.
143. Kusirisin, W., et al., *Antioxidative activity, polyphenolic content and anti-glycation effect of some Thai medicinal plants traditionally used in diabetic patients*. Med Chem, 2009. **5**(2): p. 139-47.
144. Ngamkitidechakul, C., et al., *Antitumour effects of Phyllanthus emblica L.: induction of cancer cell apoptosis and inhibition of in vivo tumour promotion and in vitro invasion of human cancer cells*. Phytother Res, 2010. **24**(9): p. 1405-13.
145. Baliga, M.S. and J.J. Dsouza, *Amla (Emblca officinalis Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer*. Eur J Cancer Prev, 2011. **20**(3): p. 225-39.
146. Ihantola-Vormisto, A., et al., *Anti-inflammatory activity of extracts from leaves of Phyllanthus emblica*. Planta Med, 1997. **63**(6): p. 518-24.
147. Singh, I., D. Soyal, and P.K. Goyal, *Emblca officinalis (Linn.) fruit extract provides protection against radiation-induced hematological and biochemical alterations in mice*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2006. **25**(4): p. 643-54.
148. 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.
149. Borrelli, A., et al., *A recombinant MnSOD is radioprotective for normal cells and radiosensitizing for tumor cells*. Free Radic Biol Med, 2009. **46**(1): p. 110-6.

150. Rahman, N.A., et al., *Role of peroxyxynitrite and recombinant human manganese superoxide dismutase in reducing ischemia-reperfusion renal tissue injury*. Transplant Proc, 2009. **41**(9): p. 3603-10.
151. Pisani, A., et al., *Effect of a recombinant manganese superoxide dismutase on prevention of contrast-induced acute kidney injury*. Clin Exp Nephrol, 2014. **18**(3): p. 424-31.
152. Khalil, M.L., *Biological activity of bee propolis in health and disease*. Asian Pac J Cancer Prev, 2006. **7**(1): p. 22-31.
153. Baykara, M., et al., *In vivo nephroprotective efficacy of propolis against contrast-induced nephropathy*. Diagn Interv Radiol, 2015. **21**(4): p. 317-21.
154. Chen, H., et al., *Ozone oxidative preconditioning protects the rat kidney from reperfusion injury: the role of nitric oxide*. J Surg Res, 2008. **149**(2): p. 287-95.
155. Bakkal, B.H., et al., *Effect of ozone oxidative preconditioning in preventing early radiation-induced lung injury in rats*. Braz J Med Biol Res, 2013. **46**(9): p. 789-96.
156. Kurtoglu, T., et al., *Ozone preconditioning attenuates contrast-induced nephropathy in rats*. J Surg Res, 2015. **195**(2): p. 604-11.
157. Wang, N., et al., *Renal Protective Effect of Probucol in Rats with Contrast-Induced Nephropathy and its Underlying Mechanism*. Med Sci Monit, 2015. **21**: p. 2886-92.
158. Boa, I.S., et al., *Resin from Virola oleifera Protects Against Radiocontrast-Induced Nephropathy in Mice*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144329.
159. Ahn, K.S., et al., *Inhibitory activity of lignan components from the flower buds of Magnoliae fargesii on the expression of cell adhesion molecules*. Biol Pharm Bull, 2001. **24**(9): p. 1085-7.
160. Kim, J.S., et al., *Suppression of inducible nitric oxide synthase expression by furfuran lignans from flower buds of Magnolia fargesii in BV-2 microglial cells*. Phytother Res, 2010. **24**(5): p. 748-53.
161. Wang, F., et al., *Magnolol protects against contrast-induced nephropathy in rats via antioxidation and antiapoptosis*. Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 203458.
162. Zhao, B., et al., *Renalase protects against contrast-induced nephropathy in Sprague-Dawley rats*. PLoS One, 2015. **10**(1): p. e0116583.
163. Ozbek, K., et al., *The protective effect of single dose tadalafil in contrast-induced nephropathy: an experimental study*. Anatol J Cardiol, 2015. **15**(4): p. 306-10.
164. de Almeida, L.S., et al., *Sildenafil prevents renal dysfunction in contrast media-induced nephropathy in Wistar rats*. Hum Exp Toxicol, 2016.
165. Janaszewska, A. and G. Bartosz, *Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma*. Scand J Clin Lab Invest, 2002. **62**(3): p. 231-6.
166. Keles, M.S., et al., *Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis*. Can J Neurol Sci, 2001. **28**(2): p. 141-3.
167. Patsoukis, N., et al., *Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure*. Neurosci Lett, 2004. **357**(2): p. 83-6.
168. Aebi, H., *Catalase in vitro*. Methods Enzymol, 1984. **105**: p. 121-6.
169. Garofalo, A.S., et al., *Reactive oxygen species independent cytotoxicity induced by radiocontrast agents in tubular cells (LLC-PK1 and MDCK)*. Ren Fail, 2007. **29**(2): p. 121-31.