

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI

118707

**RATLARDA PERİTON FİBROZİSİ GELİŞİMİNİ
ÖNLEMEDE İRBESARTAN VE
SPİRONOLAKTONUN ETKİLERİ**

**DR. İ. RIFKI ERSOY
NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. TANER ÇAMSARI**

**İZMİR
EKİM 2002**

ÖNSÖZ

Nefroloji uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve birikimleri ile yetişmemi sağlayan Nefroloji Bilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof.Dr. Taner Çamsarı'ya, Nefroloji Bilim Dalı Öğretim üyeleri Yard.Doç.Dr. Ali ÇELİK, Yard.Doç.Dr. Caner ÇAVDAR ve Yard.Doç.Dr. Aykut SİFİL'e, tez çalışmamdaki katkıları için Prof.Dr. Sülen SARIOĞLU, Doç.Dr. Osman YILMAZ, Yard.Doç.Dr. Pınar AKAN, Uz.Dr. Banu SİS, Uz.Dr. Tuğba ATAY, Uz.Dr. Dilek ÇIMRIN ve Uz.Dr. Yavuz YENİÇERİOĞLU'na, ayrıca manevi destekleri için kıymetli eşime teşekkür ederim.

Dr. İ. Rıfkı ERSOY

İÇİNDEKİLER

I) GENEL BİLGİLER.....	1
1) Peritonun yapısı ve özellikleri.....	1
2) SAPD tedavisinde zamanla oluşan yapısal ve fonksiyonel değişiklikler.....	2
3) Periton fibrozisinin mekanizmaları.....	4
4) Fibrotik hastalıklarda AT II reseptör antagonistlerinin etkileri	4
5) AT II ve TGF- β nın biyolojik etkileşimleri	5
6) Fibrozis gelişmesinde aldosteronun rolü.....	9
7) Aldosteronun ekstrarenal etkileri	9
8) Aldosteron reseptör blokajının fibrozisteki etkileri	10
9) Aldosteron reseptör blokajının renal koruyucu etkisi	10
10) Periton fibrozisinin belirleyicileri	12
II) AMAÇ.....	14
III) GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
1) Bakteri hazırlama ve peritonit oluşturma.....	15
2) Deneysel tasarı	15
3) Peritonun morfolojik ve histopatolojik incelemesi	17
4) Biyokimyasal incelemeler.....	18
5) İstatistik.....	18
IV) BULGULAR	19
V) TARTIŞMA.....	34
VI) SONUÇ.....	36
VII) ÖZET.....	37
VIII).İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	39
IX) KAYNAKLAR.....	41

I - GENEL BİLGİLER

Sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) tedavisinde başarılı şekilde uygulanmaktadır (1,2). SAPD tedavisi ile ilişkili en önemli kısıtlayıcı faktörlerden birisi periton membranının diyaliz etkinliğinde zamanla ilerleyici bir azalmanın oluşmasıdır (1,2,3). SAPD hastalarında zamanla oluşan ultrafiltrasyon (UF) yetmezliği de fonksiyonel transport anormalliğinin önemli bir sonucudur. Bu durum sıklıkla hastaların SAPD tedavisinden çıkarılmalarına sebep olur (4,5). Bu olumsuz gelişmelerden sorumlu önemli nedenin peritoneal fibrozis olduğu çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir (6,7,8). Bu nedenle bir çok yeni araştırma uzun süreli SAPD tedavisi sonrasında gelişebilecek periton fibrozisinin önlenmesi üzerine odaklanmaktadır (9,10,11,12,13).

1) Peritonun yapısı ve özellikleri

Periton bazal lamina üzerindeki tek tabaka mezotelyumdan ibaret seröz bir membrandır. Bunun altında membrana normal elastisitesini veren kesintili elastin fibriler bantlardan oluşmuş kompakt bir tabaka vardır. Bu kompakt tabaka içine çok sayıda kollagen fibril desteleri serpilmiştir. Bu submezotelyal interstisyumun yapısı kesin olarak tanımlanmamış olmasına rağmen yoğun olarak glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşur. İnterstisyum içinde bazen fibroblastlar ve mast hücreleri görülebilir. Peritonun küçük kan damarlarının çoğunluğu kompakt tabaka kenarında yer alır (1).

Mezotelyum diğer doku hücreleri ile birlikte, periton homeostazisinde ve enfeksiyona karşı savunmada önemli rol oynar (14,15,16). Periton mezotel hücreleri geniş biyosentez kapasitesine sahiptirler. İnflamatuar mediatörler (prostoglandinler, sitokinler, kemokinler, nitrik oksid), fibrinoliz mediatörleri (doku plazminojen aktivatörü-TPA, onun inhibitörü ve doku aktivatörü), growth faktörler, fosfolipidler ve proteoglikan türlerinin mezotelyum tarafından sentezlendiği belirlenmiştir. Mezotelyum tarafından sekrete ve ekspresse edilen maddelerin listesi giderek artmaktadır (1). Ayrıca peritondaki fibroblastların da önemli biyosentez kapasitesine sahip oldukları ve inflamatuvar cevaba katıldıkları gösterilmiştir (17).

Submezotelyal interstisyum içinde yer alan kapillerler solut ve su hareketini sağlarlar. SAPD süresince kapillerlerin yapı ve sayısının her ikisinde de değişiklikler oluştuğunu gösteren kanıtlar vardır (18,19). Kapiller sayısında artış ve yapısındaki değişiklikler (düz kas hiperplazisi, subendotelyal kalınlaşma, kollagen depolanması) diyabetik mikroanjiyopatiye

benzemektedir (20). Tarif edilen vaskülopatinin oluşumu ve şiddeti SAPD tedavisinde kalış süresine bağlıdır (21).

2) SAPD tedavisinde zamanla oluşan yapısal ve fonksiyonel değişiklikler

Mevcut gözlemlerin tümü peritondaki değişikliklerin özellikle mezotelyum (soyulma, mikrovillus kaybı), interstisyum (değişik derecelerde fibrozis ve lökosit infiltrasyonu) ve vasküler yatakta oluştuğunu göstermektedir. Ancak sistematik olarak tanımlanmadıkları için bu gözlemlerin periton fibrozisi gelişiminin doğal seyrini belirlemedeki değerleri sınırlıdır(1). Peritonit, membran boyunca osmotik gradientin hızla yok olması ile ilgili olarak reversibl bir UF kaybına sebep olur (22). Hangi şiddette bir periton inflamasyonunun UF yetmezliği ve periton sklerozu oluşumuna yol açtığı sorusunu cevaplamak zordur. İki prospektif çalışmada düşük molekül ağırlıklı solutlerin yüksek diyalizat/plazma (D/P) oranları ile birlikte olan UF yetmezliği gelişmesi özellikle çok sayıda infeksiyon atakları olan hastalarda belirgin bulunmuştur (23,24). UF yetmezliğinin, inflamatuvar reaksiyonun şiddeti (24), periton inflamasyonunun yoğun olduğu gün sayısı (23) ya da mikroorganizmanın cinsi (24,25) ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca periton sklerozlu hastaların çoğunluğunun SAPD tedavisinin son birkaç ayında inatçı veya tekrarlayıcı peritonite sahip oldukları belirlenmiştir (26). Bu ataklardaki etken mikroorganizmaların sıklıkla Candida, Pseudomonas ve S. aureus olduğu gösterilmiştir. Bu mikroorganizmaların özellikle hasarlı peritonda şiddetli peritonite sebep oldukları ve böylece periton sklerozuna ilerleme olasılığının arttığı bildirilmiştir (22). SAPD uygulanmış hastalarda yapılmış bir otopsi çalışmasında; kalınlaşma, inflamasyon ve yapışıklık gibi periton membranı değişikliklerinin geçirilmiş peritonit sayısı ile anlamlı şekilde korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (8). Periton membranındaki bu kronik değişiklikler fibroblastik aktivitenin derecesi, serozal kalınlaşmanın ölçüsü ve kronik inflamasyonun yoğunluğu ile belirlenmiştir. Bu verilerden, şiddetli ve çok sayıdaki peritonit ataklarının membran yetmezliği gelişmesine yol açabileceği sonucu çıkmaktadır. Ancak UF yetmezliğinin tek nedeni bu değildir (22). Çünkü peritonit geçirmemiş veya çok az sayıda peritonit atağı geçirmiş uzun süreli SAPD hastalarında da periton membran yetmezliği gelişmesi bu düşüncüyü desteklemektedir (27).

SAPD süresi ve membran yetmezliğinin oluşumu arasındaki ilişki fizyolojik olmayan diyaliz sıvılarına devamlı temasın önemli bir faktör olduğunu düşündürür (22). Bir hayvan modelinde

peritonun glikozla uzun süreli temasının mezotel hücrelerine düşük pH, laktat ve hiperosmolariteden daha fazla toksik etki yaptığı gösterilmiştir (28). Glikoz mezotelyumu kolayca geçtiği için tüm periton dokuları son derece yüksek yoğunluktaki glikoza maruz kalır. Öyle ki bu yoğunluklar diabetes mellituslu hastaların plazmasındaki seviyelerden çok daha yüksektir. Bu durum peritonun mikrovasküler yapısındaki diyabet benzeri değişiklikleri açıklayabilir (22). Bir rat modelinde 20 hafta süreli %3,86 glikoz infüzyonu ile peritonda fibrotik ve vasküler değişikliklerin olduğu gösterilmiştir, halbuki ringer laktat infüzyonu periton anormalliği oluşturmamıştır (29). Sonuçta yüksek glikoz yoğunlukları ile tekrarlayan temas zamanla membran yapı ve fonksiyon değişikliklerine yol açabilir .

UF yetmezlikli hastalarda periton yapısındaki değişiklikler ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (18). Işık mikroskopisinde peritonda yoğun interstisiyel fibrozis, mezotelyum kaybı ve vasküler değişiklikler (venüllerin mediasında şiddetli fibrozis ve hiyalinizasyon, vasküler duvarda yoğun tip IV kollagen ve laminin depolanması ve medyada düz kas hücrelerinin dejenerasyonu) gösterilmiştir. Hiperosmolar diyaliz sıvıları ve glikozla uzun süreli temasın bu değişikliklerden sorumlu olabileceği bildirilmiştir (1).

Ayrıca UF yetmezlikli hastalarda periton damarlarındaki değişiklikler ve ileri glikozilasyon son ürünlerinin (AGE) birikimi arasında korelasyon olduğu rapor edilmiştir (19).

Paryetal periton örneklerinden yapılan morfolojik kantitatif bir analizde submezoteliyal kompakt tabakanın ortalama kalınlıkları araştırılmıştır (21). SAPD hastalarında diyaliz öncesi dönemde bu tabakanın kalınlığı 130 µm iken, SAPD nin birinci yılında 180 µm, 2-5 yılında 220 µm, 5 yıldan uzun süreli SAPD hastalarında ise 460 µm olarak rapor edilmiştir. Bu gruplarda görülen vasküler değişikliklerin sıklığı ise sırası ile; %15, %10, %33 ve %50 olarak bildirilmiştir.

Sonuç olarak, SAPD süresince peritonda gelişen yapısal değişikliklerin iki önemli elementi olduğu görülür. Birincisi submezoteliyal kompakt tabakanın kalınlığında önemli bir artış olup, artmış kollagen depolanmasından kaynaklanır. Bazı çalışmalarda peritonda gözlenen bu değişiklikler peritonit insidansı ve şiddeti ile ilişkili bulunmuştur. İkinci önemli yapısal değişiklik ise peritonun vasküler yatağında görülen diyabetik mikroangiopatiye benzer değişikliklerdir (1).

3) Periton fibrozisinin mekanizmaları

Peritonda “fibrozis” ve “sklerozis” denilen değişiklikleri başlatan hücresel seviyedeki kesin mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Diğer organlardaki fibrozis gelişmesi üzerindeki çalışmalar (böbrek, karaciğer, akciğer ve cilt) fibrozisin art arda gelişen bir dizi aşamaları içerdiğini düşündürmektedir (30). Fibrozis doku interstisyumunda tamir edilemeyen bir hasara götürerek organ yetmezliğine neden olan ortak bir yoldur (1). Başlangıç aşaması genellikle inflamasyon gelişmesi ile ilgili olup, bu olayda makrofajlar önemli bir rol oynar (30). İnflamasyonun erken evresinde aktive olmuş makrofajların infiltrasyonu ve onların sitokinler ve growth faktörleri salması anahtar bir işlevdir. Başlangıç aktivasyonunu ekstrasellüler matriks (ECM) döngüsünde artış ile birlikte kollagen depolanması takip eder ve sonuçta doku fibrozisi gelişir (1).

Periton fibrozisi oluşumuna katılan hücresel mekanizmalar periton interstisyel fibroblastları üzerinde yapılan invitro araştırmalardan elde edilmiştir. Bu hücreler mezotelyumla birlikte önemli biyosentez kapasitesine sahiptirler (17,31). Hücre kültürü sistemlerinde, periton fibroblastlarının tekrarlayan aktivasyonunun hücre proliferasyonu ve ECM (kollagen ve fibronektin) sentezi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (32).

4) Fibrotik hastalıklarda angiotensin II reseptör antagonistlerinin etkileri

Renin angiotensin sistemi (RAS), endokrin ve otokrin/parakrin yolların her ikisi ile büyüme, gelişme ve doku tamirini içeren organ ve doku homeostazisinde önemli rol oynar (33). Doku hasarına cevap olarak lokal RAS aktivasyonu meydana gelir. Hasar verici uyarılar dokuda lokal olarak angiotensin II (AT II) artışı oluşturur. AT II, TGF- β aracılığı ile oluşturulan ve doku tamiriyle sonuçlanan bir işlev başlatır. Bu tamir işlevini sonlandırma başarısızlığı TGF- β 'nın aşırı üretiminin devam etmesi ve ekstrasellüler matriksin (ECM) patolojik birikimi ile karakterizedir. Bu durum tüm fibrotik hastalıkların ortak özelliğidir (30). Bu yüzden AT II end-organ patolojisinde sık rastlanan bir ortak yol olan fibrozisin moleküler mekanizmasında önemlidir.

AT II'nin fibrozisdeki rolü kan basıncı üzerine olan etkilerinden bağımsızdır (34,35,36). Ayrıca deneysel ve klinik kanıtların her ikisi de AT II'nin bloke edilmesinin fibrotik hastalıkların ilerlemesini önlediğini veya yavaşlattığını göstermektedir (37,38).

5) Angiotensin II (AT II) ve TGF- β 'nın biyolojik etkileşimleri:

A) TGF- β 'nın normal biyolojisi

Doku homeostazisi hücre büyümesi ve çoğalması yanı sıra ECM in üretim ve döngüsünün düzenlenmesi ile sürdürülür. Hücreler sitokinler (veya growth faktörler) denilen polipeptidler aracılığı ile kendilerini (otokrin aktivite) ve diğerlerini (parakrin aktivite) devamlı uyarmak suretiyle bu düzenlemeyi sağlarlar. Sitokinler dokuların yeniden yapılanmasını ya planlanmış (embriyogenez ve büyüme) veya planlanmamış (karsinogenez ve hasar sonrası doku tamiri) şekilde her yönden düzenlerler (30).

Doku hasarı homeostazisi bozduğu zaman lokal RAS aktive olur ve böylece lokal (parakrin) şekilde oluşmuş ve aktive olmuş AT II de artış meydana gelir. AT II artışı TGF- β ekspresyonunu uyarır (37).

TGF- β prototipik, çok işlevli bir sitokin olup, trombositlerden izole edilmiştir. Memelilerde bu sitokin biyolojik özellikleri hemen hemen benzer olan 5 izoform halinde bulunur . TGF- β 1 fibroze en çok katılan izoform olup, TGF- β 1 geni doku hasarına cevapta yüksek seviyede ayarlanır (upregulation). TGF- β 1, 391 aminoasitli bir öncül molekül olarak sentezlenir, daha sonra proteoliz ile peptid parçalarını ve 112 aminoasitli bir subüniti oluşturur. Aktive TGF- β 1 25 kd olup, bir disülfid zincir tarafından bağlanmış iki subünit halindeki dimerik protein yapısındadır. TGF- β 1 inaktif (latent) bir formda sekrete edilir ve biyolojik etki oluşturabilmesi için aktive olması gerekir. Latent TGF- β 1 hücre yüzeyinde ve ECM de depolanır ve bilinmeyen bir mekanizma ile bu yerlerdeki aktive TGF- β 1'e dönüştürülür. TGF- β 1 ECM'in depolanmasını arttırmada en fazla etkiye sahip olup, diğer sitokinlerin; platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (FGF), tumor necrosis factor(TNF) ve interleucin (IL) etkilerini düzenlemek veya baskılamak suretiyle tamir işlevinin kuvvetli bir düzenleyicisi olarak etki eder (30).

B) Doku tamirinde TGF- β 1'in biyolojik etkileri:

İnaktive (latent) TGF- β 1 ECM'e lokal olarak bağılı olup, doku hasarından sonra aktive olur. TGF- β 1 nötrofiller, T hücreleri, monositler ve fibroblastlar için kuvvetli kemotaksi oluşturur. Hasar bölgesine göç eden bu hücreler TGF- β 1'in daha yüksek yoğunlukları ile karşılaşarak aktif hale gelirler. Monositler FGF, TNF ve IL-1 salgılamaya başlarlar ve fibroblastlar ECM proteinlerinin sentezini arttırmırlar. TGF- β 1 bölgede bulunan ve yeni göç etmiş hücelere etki ile kendisinin daha fazla üretilmesine sebep olur. Bu otoindüksiyon hasar bölgesinde TGF- β 1 in biyolojik etkilerini arttırır ve böylece kronik fibroziste temel bir rol oynar (30).

TGF- β 1 ECM depolanmasını arttırmak üzere hücelere sürekli olarak etki eder. ECM integrinler denilen yüzey reseptörleri aracılığı ile hücelere bağlanan fibronektin, kollagenler ve proteoglikanlar gibi büyük moleküllerin oluşturduğu dinamik bir yapıdır. Hüceleri çevreleyen bu matriks aynı zamanda sürekli olarak proteazlar tarafından parçalanırlar. Ayrıca TGF- β 1; (1)matriks proteinlerinin sentezini arttırmak üzere hüceleri uyarmak, (2)matriks parçalayan proteazların yapımını azaltmak, (3)bu proteazların inhibitörlerinin üretimini arttırmak ve (4)matrikse hücrel yapışmayı arttıran integrinlerin artışını düzenlemek suretiyle ECM depolanmasına sebep olur. ECM üzerindeki bu geniş etkiler TGF- β oluşumunu normal şekilde düzenleyen negatif feedback mekanizmasının da bir kısmını oluşturabilir (30).

C) Fibroziste TGF- β 1'in anormal biyolojisi ve AT II ile TGF- β 1 arasındaki etkileşimler

Fibrozisin patofizyolojisi, tamir işlevini sonlandırmada yetersiz olan normal doku tamiri mekanizmalarının anormal artışı olarak açıklanmaktadır (30,33). Normal doku tamiri sırasında hasar oluşturan uyarının ortadan kalkması ile TGF- β 1 aşırı birikimi sonlanır ve TGF- β 1 normal seviyelerine geriler. Bunun tersine fibrogenesis TGF- β 1 in uzun süreli aşırı artışı ile karakterizedir ve TGF- β 1 oluşumunu sona erdirmeye başarısızlığı fibrotik hastalıkların değişmez moleküler özelliğidir (30,39,40). Bir çok çalışma fibrozisin hayvan modellerinde ve insan fibrotik hastalıklarında TGF- β 1 in daimi şekilde aşırı biriktiğini göstermiştir (30). Fibroziste TGF- β 1'in azalmadan devam etmesinin nedeni bilinmemektedir. Tekrarlayan veya devam eden hasar verici etkenler normal doku tamiri sonlandırma sinyallerini etkisiz hale getiriyor olabilir (30,33). Bu durum TGF- β 1'in devam eden otoindüksiyonu ve ECM aşırı depolanması ile sonuçlanır (30,33,37).

AT II'nin plasminojen/plasmin sisteminde bir dengesizlik oluşturmak suretiyle matriks proteinlerinin parçalanmasını baskıladığına inanılır (34). Plasmin hücre dışı proteinleri

doğrudan parçalar ve metalloproteazları aktive eder, böylece kollagen döngüsüne daha fazla hizmet eder. Plasminojen aktivatörleri plazminojeni uyarır. Plasminojen aktivatör inhibitörleri 1 ve 2 (PAI-1 ve PAI-2) aracılığı ile plasminin aktivasyon ve inhibisyonu arasında oluşan denge bu sistemin aktivitesini düzenler. Plasminojen-plasmin sistemi ile ilgili invitro çalışmalar AT II'nin kendisinin kan basıncından bağımsız olarak fibrojenik olduğunu göstermiştir. Mesangial hücre kültürünün AT II ile teması PAI-1 gen transkripsiyonunu ve PAI-1'in ekspresyonunu arttırmıştır. Çalışmadaki veriler AT II tarafından oluşturulan plasminojen / plasmin sistemindeki değişikliklerden TGF- β 'nın sorumlu olduğunu düşündürmektedir (34). Homeostatik mekanizmanın temel fakat tam açık olmayan komponenti; RAS (esasen AT II ve aynı zamanda aldosteron) ve TGF- β 1 arasındaki karşılıklı fizyolojik etkileşimdir. Bu etkileşimler yoluyla sistemik veya lokal RAS'ın her ikisi ve TGF- β 1 birbirlerini karşılıklı olarak düzenlerler (40,41).

TGF- β 1 in aşırı birikimi böbrek, kalp, akciğer, karaciğer, yanı sıra periton gibi vücudun çeşitli bölgelerinde fibrozis patogeneze katıldığı gerek deneysel çalışmalarda gerekse insan çalışmalarında gösterilmiştir (30).

İnvivo ve invitro çalışmalar AT II'nin böbrekte TGF- β 1 geni ve proteininin ekspresyonunu uyardığını gösterir. Böylece AT II böbreği de kapsayan çeşitli organların trofik ve fibrotik cevapları ile ilişkili bulunmaktadır. Bu durum sadece hemodinamik etkilerle ilgili değildir, aynı zamanda doku spesifik growth faktörlerin AT II tarafından uyarılması ile de ilişkilidir (42).

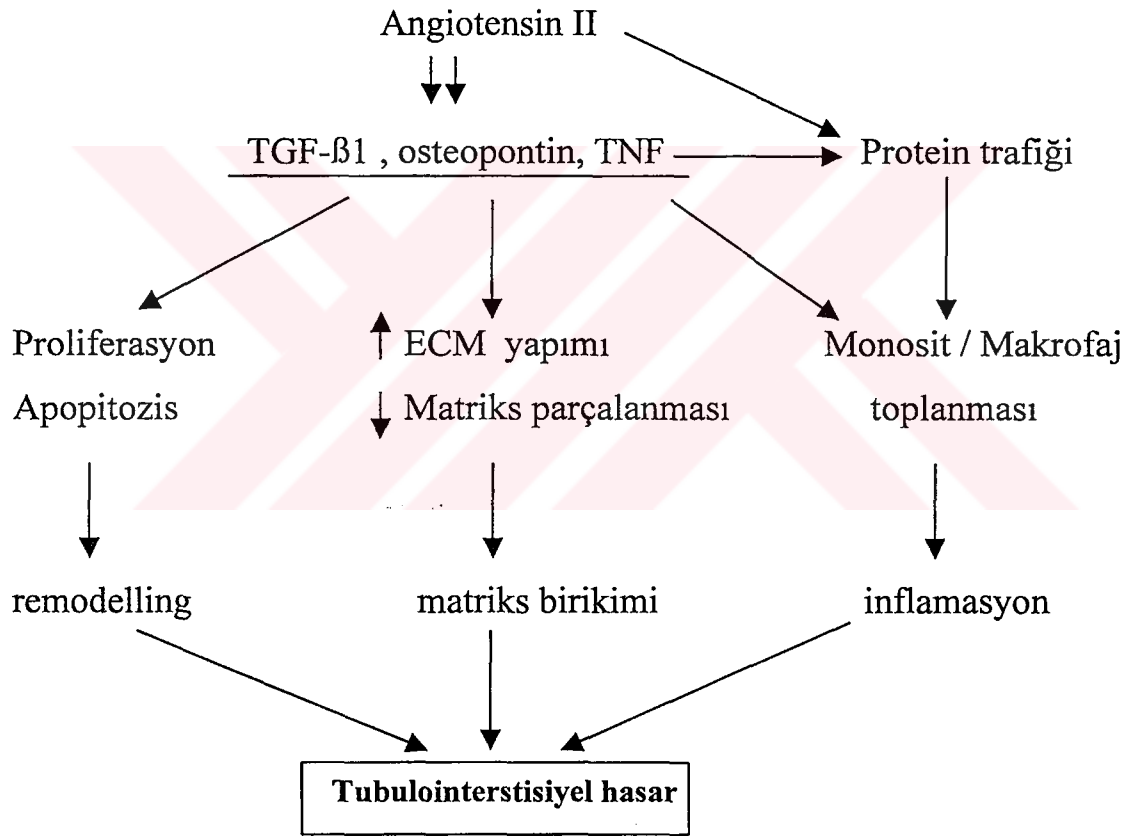
Düşük doz AT II verilerek yapılmış bir çalışmada kan basıncı ve plazma aldosteron seviyeleri etkilenmeksizin, glomerüllerde ve tübüllerde TGF- β 1 gen ekspresyonu belirgin olarak artmıştır (43). İlerleyici renal hasarın oluşturulduğu bir subtotal nefrektomi modelinde glomerüloskleroz ve tubulointerstisiyel fibrozisin TGF- β 1 ve kollagen ekspresyonunda artışın yanı sıra bir çok sitokinin aşırı birikimi ile birlikte olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu modelde lokal intrarenal RAS'ın böbrek hastalığının ilerlemesinde önemli bir sebep olabileceği ileri sürülmüştür (44).

Bir angiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü (ADE-I) veya bir AT II reseptör antagonisti ile RAS blokajı yapılan modelde TGF- β 1 ve tip IV kollagen ekspresyonunun azalması ile birlikte tubulointerstisiyel hasarın gerilemesi AT II ve TGF- β 1 arasındaki bağlantıyı daha fazla belirlemektedir (45,46). Ayrıca AT II ve TGF- β 1 bağımlı yollar kronik üreter obstrüksiyonu ile birlikte olan tubulointerstisiyel değişikliklerin patogenezi ile ilişkili bulunmuştur (47).

Başka çalışmalarda obstrüksiyon oluşturulmuş böbrekte TGF- β 1 gen ekspresyonundaki artış ve tubulointerstisiyel fibrozis ya bir ADE-I (48) veya bir AT II reseptör antagonisti (49)

verilmek suretiyle azaltılmıştır. Bu bulgular renal hasarın obstrüktif nefropati modelindeki fibrojenizde muhtemelen TGF- β 1 aracılığı ile oluşan AT II'nin patolojik rolünü desteklemektedir (42).

Sonuç olarak AT II ve birçok sitokinler ve kemokinler arasındaki etkileşimler renal tübüllerde ve interstisyumda inflamasyon ve fibrozis oluşumunda merkezi bir rol oynar. AT II oluşumunun ADE-I veya AT II reseptör antagonisti tarafından blokajı tubulointerstisyel hasarı azaltır. Renal hasarın klinik ve patolojik heterojenitesi düşünüldüğünde bir çok hücrel ve hücreler arası patojenik yolların AT II ilişkili inflamasyon ve fibroze hizmet etmesi muhtemeldir (42). AT II'nin tubulointerstisyel hasar oluşumundaki rolüne ait olası yollar şekil 1 de gösterilmiştir.



Şekil 1: Tubulointerstisyel hasar oluşumunda AT II'nin etkisi

Birçok klinik çalışmada AT II blokajının fibrozisin ilerlemesini etkili bir şekilde yavaşlattığı gösterilmiştir. Ancak TGF- β 1 seviyelerinde önemli azalmalar saptanmış olmasına rağmen nadiren normal seviyelere gelmiştir (37). Genellikle bu çalışmalarda kullanılmış AT II reseptör antagonistlerinin dozları hipertansiyonda etkin olan dozlarda seçilmişlerdir. AT II blokajı deneysel olarak daha yüksek ilaç dozları ile yapıldığı zaman TGF- β 1 ve ECM

birikiminin her ikisinde de daha fazla azalma oluşmuştur (38). Bu durum optimum derecede antifibrotik tedavinin sağlanabilmesi için AT II'yi baskılayan daha yüksek dozların gerekliliğini desteklemektedir. Artmış AT II blokajı da fibrozisin ilerlemesini tam olarak önlemek için yeterli olmayabilir. AT II blokajının etkinliğini tamamlamak ve antifibrotik tedavinin etkisini arttırmak için, TGF- β 1 antagonisti ilaçların kullanımı gerekli olabilir (33). Birçok deneysel modelde TGF- β 1 biyoaktivitesinin doğrudan inhibisyonu ECM birikimini ve fibrozis oluşumunu ortadan kaldırmıştır (12). Bu tedavi stratejileri şunlardır; (1)TGF- β 1 proteini üzerine etkiyi amaçlayanlar; inhibitör antikorlar, doğal TGF- β 1 inhibitörleri (decorin core protein), latency associated peptide (LAP), soluble TGF- β 1 reseptörleri (2)TGF- β 1 mRNA üzerine (TGF- β 1 sentezine) etki etmeyi amaçlayan tedavi; spesifik antisense oligonucleotidler. Bu maddelerin böbrek ve diğer organ modellerinde fibrozisi önlemede etkili olduğu ve uygulandığı hayvanlarda yan etki oluşturmadığı rapor edilmiştir. Ancak bu inhibe edici maddeler sadece kısa süreli çalışmalarda denenmiştir ve bu yaklaşımların uzun süreli kullanımdaki olası yan etkileri bilinmemektedir (12). Bu nedenle TGF- β 1 antagonizması ile ilgili tedavi uygulanabilir hale gelinceye kadar yüksek dozlarda AT II reseptör antagonistleri ile yapılacak tedavi fibrozisi yavaşlatmak maksadı ile uygulanabilir (33).

6) Fibrozis gelişmesinde aldosteronun rolü

Deneysel hayvan modellerinde RAS'nin bloke edilmesinin kan basıncı (KB) üzerine etkilerinden bağımsız olarak glomerulosklerozis ve interstitiyel fibrozis gelişmesini azalttığı gösterilmiştir (50). Böbrek hastalığı oluşumunda AT II'nin rolü konusunda çok sayıda kanıtın varlığı yanı sıra, aldosteronun da indirekt volüm homeostazisi ve hemodinamik etkilerinden bağımsız olarak vasküler toksisite ve fibroziste doğrudan rol oynadığına dair önemli kanıtlar vardır (51,52,53). Aldosteron çeşitli hayvan modellerinde miyokardiyal ve aortik fibrozis ve nefrosklerozis gelişimine neden olurken, aldosteron reseptör antagonizması ise bu olayları geri çevirmektedir (54).

7) Aldosteronun ekstrarenal etkileri

Aldosteronun farmakolojik etkisinin esas yeri distal nefron, kolon ve rektum epitelyumundaki mineralokortikoid reseptörler olduğu halde, bu reseptörler; kan damarları, beyin ve kalpteki nonepitelyal hücreler üzerinde de yer almaktadırlar (55). Ayrıca insan endotelial hücreleri

ve vasküler düz kas hücreleri (56) ile hayvan miyokard hücrelerinin (57) adrenal gland dışındaki aldosteron oluşum yerleri olduğu gösterilmiştir.

Aldosteronun vasküler düz kas hücrelerine (VDKH) ve miyokard hücrelerine doğrudan etki ederek fibrozis ve hipertrofi oluşturduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (58,59,60). Aldosteronun fibrozis ve kollagen oluşumundaki olası potansiyel mekanizmaları şunlardır (55); 1) AT II reseptörlerinin upregülasyonu 2) AT II nin pressor cevabının artması 3) VDKH'e sodyum girişinin artması 4) VDKH ve miyokard hücrelerinde norepinefrin tutulmasının inhibisyonu 5) VDKH hipertrofisine katılım

Çeşitli çalışmalar mineralokortikoidler ile miyokardiyal fibrozis arasında ilişki olduğunu göstermiştir (61,62). Ayrıca vasküler fibroblastlarda bulunan düşük kapasiteli, yüksek affiniteli kortikoid reseptörleri ile bu steroid hormonun direkt etkileşiminin vasküler fibrozis oluşturabileceği ileri sürülmüştür (55).

8) Aldosteron reseptör blokajının fibrozis üzerine olan etkileri

Hayvan modellerinde, düşük kan basıncı varlığında bile, aldosteron reseptör blokajının vasküler ve miyokardiyal fibrozisin ilerlemesini önlediği gösterilmiştir (63,64,65).

Goldblatt hipertansif fare modelinde miyokartta tip I ve tip III kollagenin patolojik birikimini tersine çevirmek için aldosteron blokajı ve AT II antogonizmasının etkilerini karşılaştırmıştır (66). AT1 reseptör antagonisti losartanın, tip I kollagen fiber içeriğini azalttığı, spironolakton tedavisinin ise tip III kollagen içeriğini azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar miyokardiyal fibrozisin stimülasyonunda aldosteronun humoral etkisini desteklemektedir (55).

ADE inhibitörleri ile tedavi edilen konjestif kalp yetmezlikli hastalarda tedaviye spironolakton ilavesinin miyokardiyal kollagen döngüsünü anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir (66). Bu deney ADE inhibitor tedavisine rağmen endojen aldosteronun insan kalp yetmezliğinde miyokardiyal fibrozisi stimüle etmedeki yeteneğini göstermektedir(55).

9)Aldosteron reseptör blokajının renal koruyucu etkisi

Bazı klinik çalışmalarda artmış aldosteron seviyeleri ile renal bozulma arasında ilişkinin varlığı gösterilmiştir (67,68). Henne ve arkadaşları kreatinin klirensi normalin %50 sinden düşük olan 28 hastada serum potasyum ve plazma renin aktivitesi normal olmasına rağmen plazma aldosteron seviyelerinin yüksek olduğunu göstermişlerdir (68). Böbrek yetmezliğinde

artmış olan potasyum ve AT II'nin aldosteron artışını iletmede sinerjistik etki yapmaları mümkündür (69).

Bir dizi deneysel model aldosteronun böbrek hasarı oluşturmada patogenetik bir role sahip olabileceği düşüncesi ile uyumludur; Rocha ve arkadaşları "stroke prone" hipertansif ratlarda (SHRSPs) (Bu modelde şiddetli HT ve malign nefrosklerozda görülen mikroangiopatinin karakteristik vasküler ve glomeruler lezyonları oluşur) yavaş salınan spironolakton pelletleri ile yapılan aldosteron reseptör blokajının proteinüriyi belirgin şekilde azalttığını göstermişlerdir (70). Kan basıncı iki grupta da aynı olmasına karşın histopatolojik tetkikte spironolakton grubunda placebo grubundan daha az nefrosklerotik ve serebrovasküler lezyonlar görülmüştür. Aynı araştırmacılar SHRSPs ratlarda yaptıkları başka bir çalışmada kaptopril tedavisinin oluşturduğu renal koruyucu etkinin aldosteron infüzyonu ile tersine çevrildiğini ve sonuçta proteinüri ile birlikte renal vasküler ve glomeruler lezyonların görüldüğünü bildirmişlerdir (71). Araştırmacılar aldosteron tarafından oluşturulmuş bu renal hasarın kan basıncı artışlarından bağımsız olduğunu ve bu durumun aldosteronun direkt doku etkisine bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Greene ve arkadaşları remnant böbrek modeli çalışmalarında aldosteronun renal hastalığın ilerlemesindeki relatif rolünün AT II'nin rolünden farklı olduğunu göstermişlerdir (72). Yalancı opere ratlarla karşılaştırıldığında, remnant ratların aldosteron seviyelerinde 10 kat artış olmuştur. Losartan ve enalapril ile tedavi aldosteron seviyelerini baskılamıştır. Böylece proteinüri, HT ve glomerulosklerozda azalma gözlenmiştir. Losartan ve enalapril tedavisinden sonra uygulanan aldosteron infüzyonu proteinüri, HT ve glomeruloskleroz derecelerini tedavisiz ratlarla benzer hale getirmiştir.

Miric ve arkadaşları streptozocin-diabetik ratlarda spironolakton ve pirfenidon verilmesinin kardiyak, renal ve aortik fibrozisi azaltabildiğini veya geriletebildiğini açık şekilde göstermişlerdir (73).

Brown ve arkadaşları ratlarda radyasyon hasarına bağlı nefrosklerozis modelinde renal plasminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) (major fizyolojik plasminojen aktivasyon inhibitörü) üzerine ve sklerozis gelişimine aldosteron antagonizmasının etkisini araştırmışlardır (54). Spironolaktonun sklerozis gelişmesini anlamlı bir şekilde azalttığını ve AT-1 reseptör antagonizmasının ise sklerozisi ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. Böylece aldosteronun PAI-1 ekspresyonunu regule ettiği ve PAI-1 ekspresyonuna etki ederek renal hasar oluşturduğu hipotezini desteklemişlerdir.

Bu sonuçlar aldosteronun ilerleyici renal hastalığın bir mediatörü olarak patogenezdaki bağımsız rolünü daha fazla desteklemektedir. Ayrıca son araştırmalar dolaşımdaki aldosteron

düşüklüğünün aldosteron reseptör blokajının tedavideki faydasını azaltmadığını düşündürmektedir (55).

Minerolokortikoid oluşum yerinin sadece adrenal korteks olduğuna inanılmasına rağmen son çalışmalar aldosteron sentezinin endotelyum ve VDKH dahil ekstraadrenal bölgelerde de oluştuğunu göstermektedir. Bu durum vasküler hücrelerin kendilerinin aldosteronogenik olduğunun direkt kanıtını oluşturabilir (56,57).

Dupez ve arkadaşları vasküler endotel hücrelerinde lokal olarak oluşmuş aldosteronun reseptöre bağlanma yoluyla VDKH üzerine etki edebildiğini ve böylece parakrin tarzda etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir (74). Ayrıca Horiuchi ve arkadaşları SHRSPs ratların bir alt türünde böbrekte mineralokortikoid reseptörlerinin artmış konsantrasyonunu göstermişlerdir (75). Tüm bu gözlemler dolaşımdaki aldosteron seviyelerinde bir artış olmaksızın mineralokortikoid cevaplılığında artış oluşabileceğini düşündürmektedir (Aldosteron cevaplılığında artış) (76).

10) Periton fibrozisinin belirleyicileri; tip I ve tip III prokollagenler

Kollagen proteinleri ailesi vücudun en yaygın proteinlerini temsil eder. Grubun en hakim üyeleri fibriler tip I ve tip III kollagenleri olup parankimin düzenlenmesini sağlayan üç boyutlu bir yapıdan oluşurlar. Normal ve hasta dokularda kollagen döngüsü dinamik bir yapıdadır, devamlı olarak yapım ve yıkım vardır . Doku hasarı sonrasında kollagen yapım ve yıkımı önemli artış gösterir (77).

Tip I ve tip III kollagenler, prokollagenler olarak sentezlenirler ve interstisyuma salınırlar. Bu büyük prekürsör moleküller hem aminoterminal (N) ve hemde karboksiterminal (C) sonlarında propeptid sıralar içerirler. Her bir propeptid , fiberleri oluşturmadan önce kollagen molekülünden kırılırlar. Kırılma sonrasında sirkülasyona ulaşan propeptid miktarı , oluşturulan fibriler kollagenin miktarı ile orantılıdır ve kollagen depolanmasının serolojik belirleyicileri olarak değerlendirilirler (77).

Tip I prokollagenin karboksiterminal propeptidi (PICP) ve tip III prokollagenin aminoterminal propeptidi (PIINP) periton diyalizi çalışmalarında serumda ve diyalizat sıvılarında saptanabilen periton fibrozisinin faydalı belirleyicileri olarak bildirilmiştir (78-81).

Uzun süreli SAPD hastalarında gelişen peritoneal fibrozisinin etyolojisinde bakteriyel peritonitin önemi iyi bilinir (1). Çeşitli çalışmalarda SAPD peritonitine en sık sebep olan organizmalardan birisinin Staphylococcus aureus olduğu gösterilmiştir(1). Literatürde

deneysel bakteriyel peritonit modelleri *Staphylococcus aureus* (82) ve *Escherichia coli* (83) ile oluşturulmuş, ancak yeterli düzeyde periton fibrozisi elde edilememiştir. Bu nedenle peritona bakteri yanı sıra Cytodex (Dekstran sulfat) verilmiştir. Cytodex ratlarda lokal apse oluşumunu başlatmak için bir yabancı madde olarak kullanılmıştır (84). Hung ve arkadaşları ratlara intraperitoneal olarak *Staphylococcus aureus* ile birlikte Cytodex vererek SAPD hastalarındaki peritonit sonucu gelişen periton fibrozisine benzer deneysel periton fibrozisi modeli oluşturmuşlardır (10). Bu çalışmadaki periton fibrozisi rat modeli SAPD hastalarındaki klinik durumlarla tamamen aynı olmasa da, bu modelle yapılan çalışmalardan elde edilecek sonuçlar kliniğe uyarlanabilir. Bizde bu nedenle çalışmamızda Hung ve arkadaşlarının deneysel peritonit modelini uyguladık.



II - AMAÇ

Angiotensin II ve aldosteronun miyokard, vasküler yapılar ve böbrek gibi çeşitli dokularda fibrozis gelişmesinde rol aldığı düşüncesinin periton fibrozisi gelişmesine de uyarlanabileceğini ve böylece angiotensin II ve/veya aldosteron antagonizmasının periton fibrozisi gelişiminde azaltıcı bir etki oluşturacağını hipotez ettik.

Bu nedenle çalışmamızda; bakteriyel peritonite bağlı periton fibrozisi rat modelinde, daha önce araştırılmamış olan, angiotensin II reseptör antagonisti (irbesartan) ve/veya aldosteron antagonisti (spironolakton) tedavisinin periton morfolojisindeki değişiklikler üzerine etkisinin olup olmadığını göstermeyi amaçladık.



III - GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma nonüremik, 180-240 gr ağırlığında, cinsiyet ayırımı yapılmaksızın Wistar ratlarda yapıldı. Çalışmada Wistar suşu %87 homojen ratlar kullanıldı. Ratlar DEÜTF deneysel araştırma bölümünden temin edildi ve ratlara standart laboratuvar şartlarında, standart diyet ve serbest su alımı sağlanarak bakıldı. Çalışma için DEÜTF hayvan çalışmaları etik kurulundan izin alındı.

1) Bakteri hazırlama ve peritonit oluşturma

Çalışmada Hung ve arkadaşlarının deneysel modeli uygulandı (10). Bu modele göre; peritonit oluşturmak için S.aureus ATCC25923 suşu (American Type and Culture Collection, MD, USA) kullanıldı. Deneyden önce beyin-kalp infüzyon et suyunda (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) 6-9 saatlik taze kültür yapıldı ve kullanılacak inokulum ölçüsünü sağlamak için seri bakteri dilusyonları hazırlandı.

Rat periton boşluğunda lokal bakteriyel enfeksiyon oluşturmak ve inokülasyonu sağlamak için bakteriyel suspansiyona dextran beads (Cytodex ; Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) eklendi. Dextran beads, 50 ml fizyolojik Buffer solusyonda (PBS) 1 gramlık suspansiyon halinde bir stok solüsyon olarak hazırlandı ve kullanımdan önce otoklavda sterilize edildi. İki ayrı Cytodex suspansiyonu dilusyonuna bakterili (3×10^9 CFU) ve bakterisiz et suyu eklendi. Böylece; 1 ml'sinde 8 mg Cytodex ve (3×10^9 CFU) bakteri içeren suspansiyon ve ayrıca 1ml'sinde 8 mg Cytodex içeren bakterisiz suspansiyon elde edildi.

2) Deneysel tasarı

Ratlar istatistiksel anlamlılık açısından her grupta 8 adet olmak üzere toplam 5 gruba ayrıldı ve toplam 40 adet rat çalışmaya alındı.

Çalışma sırasında ratlarda istenilen periton enfeksiyonu dışında bir enfeksiyon ve sistemik reaksiyon gelişmesi veya başka bir sebepten dolayı yaşayamayacak hale gelmesi çalışmadan çıkarılma kriteri olarak kabul edildi.

Her grupta 8 rat olmak üzere I., II., III. ve IV. grupları oluşturacak 32 rata önceden hazırlanmış Cytodex (8mg/1ml) içeren bakteri (3×10^9 CFU) suspansiyonundan tüberkülin enjektörü ile intraperitoneal olarak 1ml verildi. V. gruba ise sadece Cytodex (8mg/1ml) intraperitoneal olarak 1ml verildi.

Bakteri-Cytodex karışımı verilmiş 32 rat 8'er adetlik dört gruba ayrıldı:

I.Grup; (B) “Bakteri” grubu ratlara başka bir ilaç verilmeden bırakıldılar.

II.Grup: (Bİ) “Bakteri + İrbesartan” grubu intraperitoneal stafilocok uygulaması ile aynı gün başlanmak üzere ve 7 gün süreyle irbesartan (100 mg/ kg/gün) dozunda 0.5cc distile suda çözülerek PO gastrik sonda ile verildi. Ratlarda yapılmış bir deneysel çalışmada maksimal AT 1 reseptör inhibisyonunun bu doz ile sağlanması nedeniyle irbesartan 100mg/kg /gün dozunda verildi (85).

III.Grup: (BS) “Bakteri + Spironolakton” grubu intraperitoneal stafilocok uygulaması ile aynı gün başlanmak üzere ve 7 gün süreyle spironolakton 50 mg/kg/gün dozda 0.5cc distile suda çözülerek PO gastrik sonda ile verildi. Ratlardaki deneysel bir çalışmada kullanılan oral spironolakton dozu 50mg/kg/gün olduğundan bu doz seçildi (86).

IV.Grup: (BİS) “Bakteri+İrbesartan+Spironolakton” grubu İntraperitoneal stafilocok uygulaması ile aynı gün başlanmak üzere ve 7 gün süreyle spironolakton ve irbesartan birlikte, aynı dozlarda ve aynı yolla verildi.

V.Grup: (K) “Kontrol” grubu 1 ml'sinde sadece 8mg Cytodex olan suspansiyon tüberkülin enjektörü ile intraperitoneal olarak 1ml verildi.

Ayrıca I.veV. gruplara gastrik sonda ile aynı hacim su 7 gün süreyle verildi.

Çalışma 8. günde tamamlandı. Klasik fibrozis sürecinin insanda yaklaşık iki hafta olmasına karşın, ratlarda kısa yaşam süresi ve fizyopatolojik mekanizmaların daha hızlı olması nedeniyle biz çalışmamızda fibrotik sürecin daha erken sürede tamamlanmasını bekledik. Bu nedenle literatürdekine benzer olarak 8. günü sakrifikasyon zamanı olarak seçtik.

Tüm hayvanlara 80mg/kg intraperitoneal ketamin ile anestezi yapıldıktan sonra batin açıldı.

Periton kavitesindeki yapışıklıklara objektif bir gözlemci tarafından daha sonra ayrıntılı olarak belirtildiği gibi modifiye Mullarniemi “kaba görsel yapışıklık skorlaması” yapıldı (10).

Tüm ratlara 1cc %0.9 salin intraperitoneal olarak verildi. Sıvının dışarı sızmasına dikkat edilerek 1 dakika karın masajı yapıldıktan sonra periton sıvısı geri alındı. Alınan periton lavaj sıvıları; +4C de 10 dk 4000 rpm soğuk santrifüj uygulanarak hücrelerinden ayrılıp supernatant oluşturuldu. Elde edilen supernatantlar biyokimya incelemeleri yapılmaya kadar -70C de saklandı.

Periton lavaj sıvılarında prokollagen tip I karboksiterminal propeptid (PICP), prokollagen tip III aminoterminal propeptid (PIIINP), transforming growth faktör-β1 (TGF-β1) ve protein düzeyleri ölçüldü.

Çalışma sonunda tüm gruplardaki ratlardan serum PICP, PIIINP ve TGF-β1 düzeyleri bakılmak üzere V.cava caudalisten 2,5-3 cc kan örnekleri alındı ve serumları hemen ayrılarak

-70 C de saklandı.

Alınan 2,5-3cc kan örneği nedeniyle hipovolemiye giren tüm hayvanlar sakrifiye oldular.

Sakrifikasyon sonrasında karaciğer yüzeyinden, ince bağırsaktan ve karın ön duvarından periton doku örnekleri alındı. Örnekler formalin ile tespit edildi.

3) Peritonun morfolojik ve histopatolojik incelemesi

A) Kaba görsel yapışıklık skorlaması

Anestezi sonrasında rat abdomeni, yapışıklıkları değerlendirmek üzere objektif bir gözlemci ile tamamen açıldı. Bu maksatla Hung ve arkadaşları tarafından tarif edilen modifiye Mullarniemi skalası kullanıldı (10). Buna göre;

- 0 skoru ; yapışıklık olmadığını
- 1 skoru ; 1-3 adet bölgesel yapışıklıkları
- 2 skoru ; 3 den fazla bölgesel yapışıklıkları
- 3 skoru ; diffüz, tabaka halinde yapışıklıkları belirtmek için kullanıldı.

Daha önceden Hung ve arkadaşlarının (10) pilot çalışmalarındaki sonuçlara göre yapışıklıkların en sık görüldüğü 4 bölge ayrı ayrı kontrol edildi Bu yerler karaciğer ile omentum, omentum ile barsak, barsak ile karın duvarı ve barsak ile mide arasındaki bölgelerdi. Her bir bölge için en fazla 3 olmak üzere olası en yüksek toplam skor 12 idi . Her bir sıçanın total yapışıklık skorları istatistiksel analiz için kaydedildi.

B) Histopatolojik inceleme

Sakrifikasyondan sonra histolojik tetkik için karaciğer yüzeyinden, barsaktan ve karın ön duvarından periton içeren doku örnekleri alındı ve hemen formalinle tespit edildiler. Karın duvarından alınan dokular vertikal olarak, barsak dokusu lümene vertikal olarak ve karaciğer dokusu karaciğer kapsülüne vertikal olarak kesildi. Hazırlanan dokular parafinle bloklama sonrasında 5 mmicron kalınlıkta kesilerek standart Hematoksilen-Eozin ve modifiye Masson's Trichrome boyası ile boyandı. Histolojik incelemeler aynı patolog tarafından ve deney grupları bilinmeden yapıldı. Her bir rata ait karın duvarı peritonu, karaciğer yüzeyi peritonu ve barsak yüzeyi peritonu örneklerinin 3'er ayrı random bölgesindeki (toplam 9 bölge) inflamasyon ve fibrozis değerlendirmeleri ışık mikroskopisi ile ve yarı kantitatif olarak yapıldı. Bu değerlendirmede 0:hiç , 1:hafif , 2:orta , 3:şiddetli olarak belirtildi. Random olarak seçilmiş bu periton bölgelerinden bir ışık mikroskopisi ile (Nikon, Labophot-2, Japan) X10

büyütmede görüntüler elde edildi. Görüntüler digital video kamera ile (Hitachi, WK-C220E, Japan) bir görüntü analiz software (Bs200D Image Analysis Software, BAB Müh. Müş. San Tic.Ltd Şti. Ankara-Turkey) kullanılarak bilgisayara (Vestel, Manisa, Turkey) kaydedildi. Periton doku kalınlıkları için üç ayrı periton bölgesinde (karaciğer, barsak, karın duvarı) ve her bir periton bölgesinin üç ayrı random yerinden ölçümler uygulandı(μm). Ortalama değerler istatistiksel analiz için kaydedildi.

4) Biyokimyasal İncelemeler

Serum ve periton lavaj sıvısında TGF- β 1 ölçümü

Çalışma sonunda alınan periton lavaj sıvılarında ve sakrifikasyon sırasında alınan serum örneklerinde TGF- β 1 seviyeleri ticari kit kullanılarak (Promega, Madison, WI, U.S.A) ve enzyme-linked immunassay (ELİSA) metodu ile ölçüldü.

Serum ve periton lavaj sıvısında prokollagen ölçümü

Çalışma sonunda alınan periton lavajı sıvılarında ve sakrifikasyon sırasında alınan serum örneklerinde prokollagen tip I karboksiterminal propeptid (PICP) ve prokollagen tip III aminoterminal propeptid (PIIINP) seviyeleri ticari kitlerle (Orion Diagnostika, Oulunsalo. Finland)ve radioimmunoassay yöntemi ile ölçüldü.

Periton lavaj sıvısında protein ölçümü

Hitachi-912 otomatik analizöründe ticari kit kullanılarak (Roche diagnostik U/CSF protein kiti) ölçümler yapıldı.

5) İstatistik

Verilerin ortalama $\pm$ standart sapma(SS) ve median (%25 ; %75 quartil) değerleri hesaplandı. Gruplar arasındaki farkların analizi Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İkili karşılaştırmalarda Mann-Whitney U testi kullanıldı. Parametreler arasındaki ilişkinin saptanmasında Pearson korelasyon analizi kullanıldı. $p<0.05$ anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

IV – BULGULAR

Bakteri grubundan bir rat intraperitoneal inokülasyon sıvısının cilt altı bölgesine kaçması ve cilt altı apsesi gelişmesi üzerine çalışmadan çıkarıldı. Bakteri-İrbesartan ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton grubunda bulunan ratlardan birer tanesi çalışma sürerken ve ayrıca kontrol grubundan bir rat çalışma başında eter anestezisi sırasında kaybedildi.

A) Ratlarda peritonun morfolojik ve histopatolojik incelemelerinin sonuçları

1. Total yapışıklık skorları

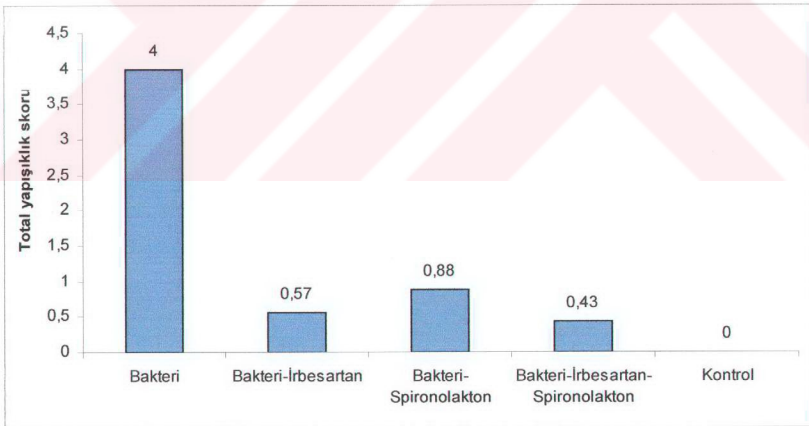
Periton morfolojisinin değerlendirilmesi için yapılan modifiye Mullarniemi skorlamasından elde edilen periton total yapışıklık skorları tablo 1 ve şekil 2 de gösterilmiştir. Bakteri grubu ratlarda peritonda bakılan total yapışıklık skoru Kontrol grubunundan oldukça yüksek bulundu ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.01$). Buna karşın Bakteri grubu ile Bakteri-İrbesartan ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton gruplarının total yapışıklık skorları karşılaştırıldığında tedavi gruplarında belirgin olarak daha düşük bulundu. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (sırasıyla 4.00 ± 0.72 vs 0.57 ± 0.30 ; 4.00 ± 0.72 vs 0.43 ± 0.30 , $p<0.01$). Ancak Bakteri-Spironolakton grubunun total yapışıklık skoru Bakteri grubundan belirgin olarak daha düşük olmasına karşın (4.00 ± 0.72 vs 0.88 ± 0.30), aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0.06$). İlaç verilen gruplar total yapışıklık skorları bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında (Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS) gruplar aralarında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 1:Çalışma gruplarında periton total yapışıklık skorları ve dağılım özellikleri

Gruplar	Total Yapışıklık skorları	
	ortalama ± standart sapma	median (%25;%75)
Bakteri (B)	4.00 ± 0.72	4.00 (2.00;6.00)
Bakteri – İrbesartan (Bİ)	0.57 ± 0.30	0.00 (0.00;1.00)
Bakteri – Spironolakton (BS)	0.88 ± 0.30	1.00 (0.00;1.75)
Bakteri – İrbesartan – Spironolakton (BİS)	0.43 ± 0.30	0.00 (0.00;1.00)
Kontrol (K)	0.00 ± 0.00	0.00 (0.00;0.00)

B vs K, B vs Bİ, B vs BİS; p<0.01, B vs BS; p=0.06,

Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; p>0.05



B vs K, B vs Bİ, B vs BİS; p<0.01, B vs BS; p=0.06,

Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; p>0.05

Şekil 2: Gruplara göre total yapışıklık skoru ortalamaları

2. Histopatolojik inceleme sonuçları

Histopatolojik incelemeler üç farklı periton bölgesinde yapıldı (karaciğer, barsak ve karın duvarı peritonu). Bu üç farklı periton örneğinin her birinin 3 ayrı yerinden toplam 9 ölçüm yapılarak ortalama değerleri hesaplandı. İncelenen periton bölgelerinden inflamasyon, fibrozis ve periton kalınlığı değerlendirmeleri yapıldı. Bulunan ortalama inflamasyon, ortalama fibrozis ve ortalama periton kalınlık değerleri ve dağılımları tablo 2’de verilmiştir. Ayrıca grupların ortalama periton kalınlıkları şekil 3’de gösterilmiştir.

Bakteri grubunun ortalama inflamasyon, ortalama fibrozis ve ortalama periton kalınlığı değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulundu (sırasıyla 1.19 ± 0.34 vs $0.23 \pm 0.06\mu\text{m}$; 1.47 ± 0.32 vs $0.85 \pm 0.06\mu\text{m}$; 465.58 ± 119.14 vs $16.8 \pm 0.02 \mu\text{m}$; $p<0.05$). Gruplar ortalama periton kalınlıkları bakımından karşılaştırıldığında ise; Bakteri-İrbesartan, Bakteri-Spironolakton, ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton gruplarının ortalama periton kalınlıkları Bakteri grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulundu (sırasıyla 31.52 ± 4.59 vs $465.58 \pm 119.14\mu\text{m}$; 114.72 ± 92.66 vs $465.58 \pm 119.14\mu\text{m}$; 46.79 ± 8.86 vs $465.58 \pm 119.14 \mu\text{m}$; $p<0.05$).

İlaç verilen gruplar ortalama periton kalınlıkları bakımından birbirleri ile karşılaştırıldığında sadece BS ve BİS grupları arasında anlamlı fark görüldü (114.72 ± 92.66 vs $46.79 \pm 8.86 \mu\text{m}$; $p<0.05$), diğer gruplar arasında (Bİ vs BS, Bİ vs BİS) ise anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$).

Diğer taraftan ortalama inflamasyon ve ortalama fibrozis değerleri bakımından Bakteri grubu ile Bakteri-İrbesartan, Bakteri-Spironolakton, ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Ayrıca ilaç verilen gruplar arasında da (Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS) ortalama inflamasyon ve ortalama fibrozis değerleri bakımından anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 2. Ortalama periton kalınlığı, ortalama fibrozis ve ortalama inflamasyon değerleri

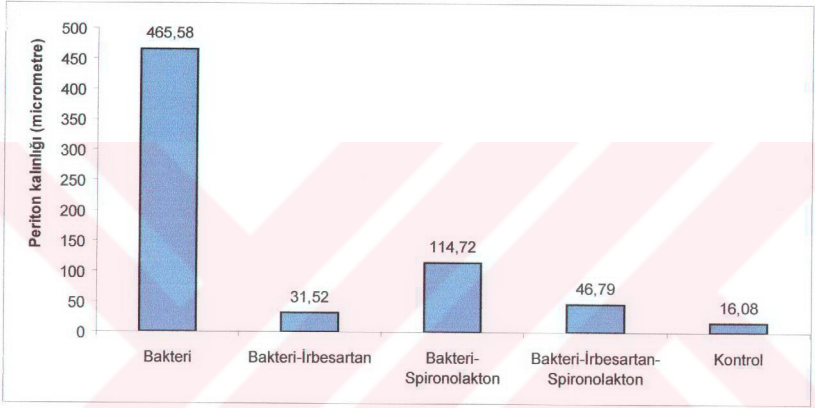
Gruplar	Dağılımlar	İNFLAMASYON ^a	FİBROZİS ^b	PERİTON ^c KALINLIĞI(μm)
Bakteri (B)	Ort. ^d	1.19 ± 0.34	1.47 ± 0.32	465.58 ± 119.14
	Med. ^e :	1.00 (0.33;2.00)	1.66 (0.33;2.33)	630.76 (44.45;693.07)
Bakteri – İrbesartan (Bİ)	Ort.:	0.66 ± 0.19	1.28 ± 0.15	31.52 ± 4.59
	Med.:	0.66 (0.33;0.66)	1.33 (1.00;1.66)	34.97 (19.21;39.89)
Bakteri – Spironolakton (BS)	Ort.:	0.79 ± 0.22	1.12 ± 0.20	114.72 ± 92.66
	Med.:	0.83 (0.08;1.33)	1.00 (0.75;1.33)	20.50 (17.94;29.77)
Bakteri – İrbesartan – Spironolakton (BİS)	Ort.:	0.95 ± 0.13	1.42 ± 0.11	46.79 ± 8.86
	Med.:	1.00 (0.66;1.00)	1.33 (1.33;1.66)	38.06 (30.14;77.37)
Kontrol (K)	Ort.:	0.23 ± 0.06	0.85 ± 0.06	16.08 ± 0.02
	Med.:	0.33 (0.00;0.33)	1.00 (0.66;1.00)	16.33 (11.50;18.52)

a: B vs K, p<0.05, B vs Bİ, B vs BS, B vs BİS, Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; p>0.05

b: B vs K; p<0.05, B vs Bİ, B vs BS, B vs BİS, Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; p>0.05

c: B vs K, B vs Bİ, B vs BS, B vs BİS, BS vs BİS; p<0.05, Bİ vs BS, Bİ vs BİS; p>0.05,

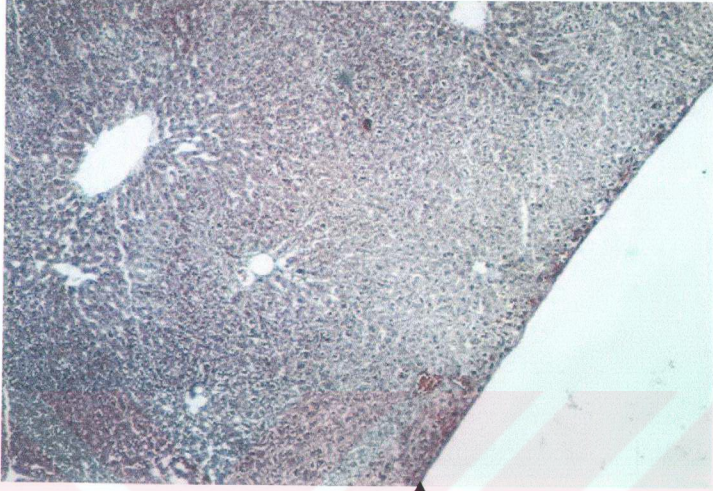
^dOrt: ortalama ± standart sapma, ^eMed: median (%25; %75)



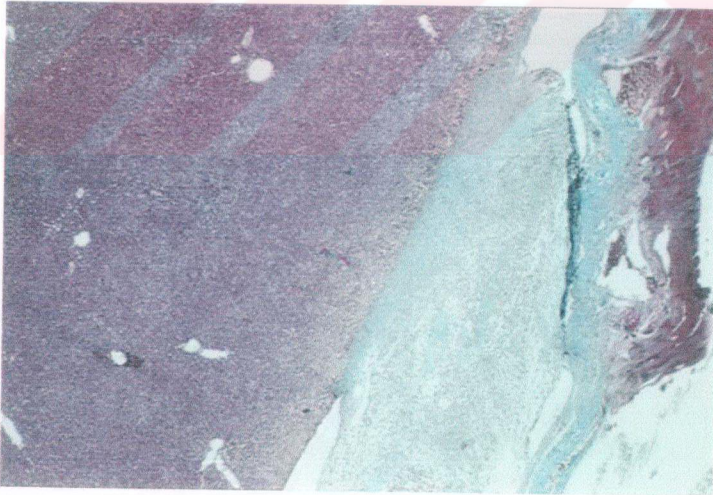
B vs K, B vs Bİ, B vs BS, B vs BİS, BS vs BİS; $p < 0.05$, Bİ vs BS, Bİ vs BİS; $p > 0.05$

Şekil 3: Gruplara göre ortalama periton kalınlıkları

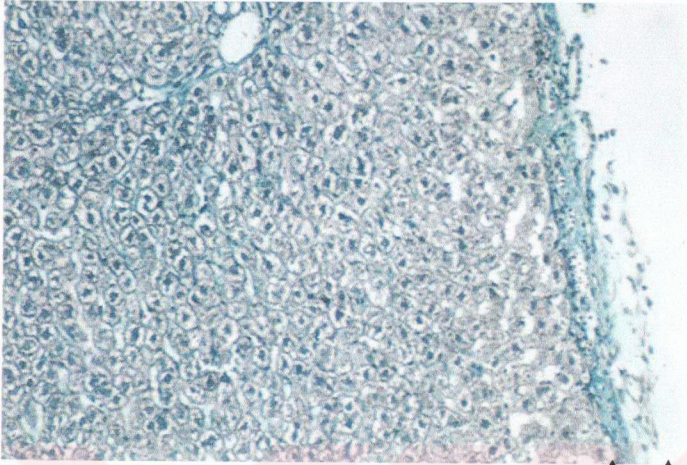
Çalışmaya alınan ratlarda periton kalınlıklarına ait görüntüler şekil 4-8’de gösterilmiştir.



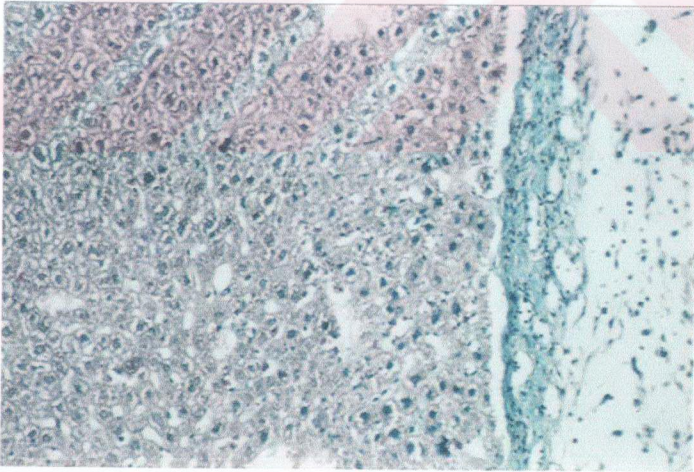
← Karaciğer → Periton
Şekil 4: Kontrol grubu (33 nolu rat). Karaciğer yüzeyi peritonunda hiç kalınlaşma olmadığı izlenmektedir. (Masson's Trichrome, x40)



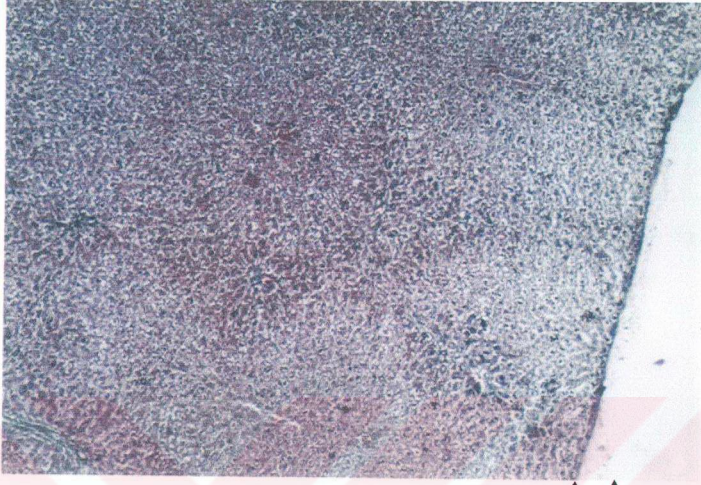
← Karaciğer → Periton →
Şekil 5: Bakteri grubu (7 nolu rat) Karaciğer yüzeyi peritonunda belirgin kalınlaşma izlenmektedir. (Masson's Trichrome, x20)



Şekil 6: Bakteri-İrbesartan grubu (21 nolu rat). Karaciğer yüzeyi peritonunda bakteri grubuna göre daha az kalınlaşma izlenmektedir. (Masson's Trichrome, x100)



Şekil 7: Bakteri-Spirolakton grubu (13 nolu rat) Karaciğer yüzeyi peritonunda bakteri grubuna göre daha az kalınlaşma izlenmektedir. (Masson's Trichrome, x100)



Şekil 8: Bakteri-İrbesartan-Spironolakton grubu (28 nolu rat) Karaciğer yüzeyi peritonunda bakteri grubuna göre daha az kalınlaşma görülmektedir. (Masson's Trichrome, x40)

Total yapışıklık skoru ile ortalama inflamasyon ($r:0.657$, $p<0.01$), total yapışıklık skoru ile ortalama fibrozis ($r:0.508$, $p<0.01$) ve total yapışıklık skoru ile ortalama periton kalınlığı ($r:0.831$, $p<0.01$) değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon bulundu. Yine ortalama periton kalınlığı ile ortalama inflamasyon ($r:0.667$, $p<0.01$) ve ortalama periton kalınlığı ile ortalama fibrozis değerleri arasında da anlamlı pozitif korelasyon olduğu görüldü ($r:0.597$, $p<0.01$). Ayrıca ortalama inflamasyon ile ortalama fibrozis değerleri arasında da anlamlı pozitif korelasyon saptandı ($r:0.741$, $p<0.01$).

B) Biyokimyasal incelemeler

1. Periton lavajında ve serumda TGF- β 1 sonuçları

Periton lavajında TGF- β 1 değerleri tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermedi. Ancak Bakteri grubu ile karşılaştırıldığında; Bakteri-İrbesartan, Bakteri-Spironolakton ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton gruplarında periton lavajı TGF- β 1 değerleri daha yüksek bulundu.

Buna karşılık serum TGF- β 1 değerleri karşılaştırıldığında; Bakteri grubu ile; Kontrol, Bakteri-İrbesartan ve Bakteri-Spironolakton grupları arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla $p<0.01$; $p<0.01$; $p<0.05$). Ancak Bakteri grubu ile Bakteri-İrbesartan-Spironolakton grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Ayrıca ilaç verilen gruplar arasında da (Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS) periton lavaj sıvısında ve serumda TGF- β 1 değerleri bakımından anlamlı fark bulunmadı.

Periton lavaj sıvısı ve serumda bakılan TGF- β 1 sonuçları tablo 3’de verilmiştir.

Tablo:3. Periton lavaj sıvısı ve serumda TGF- β 1 sonuçları ve dağılım özellikleri

Gruplar	Dağılımlar	Periton lavajı TGF- β 1 ^a (ng/mL)	Serum TGF- β 1 ^b (ng/mL)
Bakteri (B)	Ort ^c :	2.84 $\pm$ 0.72	53.87 $\pm$ 6.50
	Med ^d :	2.20 (1.80;2.80)	64.50 (44.10;66.00)
Bakteri – İrbesartan (Bİ)	Ort:	4.99 $\pm$ 1.07	20.72 $\pm$ 1.11
	Med:	5.48 (1.80;6.98)	20.70 (18.00;24.00)
Bakteri – Spironolakton (BS)	Ort:	5.47 $\pm$ 1.08	34.88 $\pm$ 6.11
	Med:	5.30 (2.20;8.70)	33.90 (19.95;45.82)
Bakteri – İrbesartan – Spironolakton (BİS)	Ort:	3.15 $\pm$ 0.99	38.46 $\pm$ 7.42
	Med:	2.60 (1.00;5.25)	45.00 (22.50;51.00)
Kontrol (K)	Ort:	2.30 $\pm$ 0.43	17.15 $\pm$ 2.04
	Med:	2.25 (2.10;3.10)	15.90 (13.80;22.00)

a: B vs K, B vs Bİ, B vs BS, B vs BİS, Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; p>0.05,

b: B vs K, B vs Bİ; p<0.01, B vs BS; p<0.05, B vs BİS, Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; p>0.05

c:Ort: ortalama $\pm$ standart sapma, **d:**Med: median (%25; %75)

Serum ve periton TGF- β 1 değerleri, total yapışıklık skorları, ortalama inflamasyon, ortalama fibrozis ve ortalama periton kalınlığı değerleri aralarındaki korelasyonlar incelendiğinde; sadece serum TGF- β 1 değerleri ile total yapışıklık skorları arasında anlamlı pozitif korelasyon bulundu ($r:0.421$; $p<0.05$). Diğer parametreler birbirleri ile anlamlı korelasyon göstermedi ($p>0.05$).

2. Periton lavajında ve serumda PICP ve PIIINP sonuçları

Periton lavajı PICP değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında; Kontrol grubu, Bakteri-İrbesartan, Bakteri-Spironolakton ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton gruplarında Bakteri grubuna göre daha düşük bulundu, ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Periton lavajı PIIINP değerleri ise tüm gruplarda benzer bulundu. Ayrıca ilaç verilen gruplar arasında da (Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS) periton lavaj sıvısında PICP ve PIIINP değerleri bakımından fark bulunmadı.

Periton lavaj sıvısında prokollagen tip I C-propeptid (PICP) ve prokollagen tip III N-propeptid (PIIINP) değerleri tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4 : Periton lavaj sıvısında PICP ve PIIINP değerleri ve dağılım zellikleri

Gruplar	Dağılımlar	Periton lavajı PICP ^a μg/L	Periton lavajı PIIINP ^b μg/L
Bakteri (B)	Ort. ^c :	17.66 ± 4.02	0.97 ± 0.19
	Med. ^d :	15.79(12.90;28.25)	1.01(0.50;1.15)
Bakteri – İrbesartan (Bİ)	Ort.:	13.92 ± 4.05	0.72 ± 0.11
	Med.:	11.97(6.20;17.22)	0.69(0.55;1.01)
Bakteri – Spironolakton (BS)	Ort.:	13.09 ± 4.32	0.77 ± 0.13
	Med.:	9.65(2.47;19.73)	0.86(0.36;1.13)
Bakteri – İrbesartan – Spironolakton (BİS)	Ort.:	7.78 ± 1.53	0.98 ± 0.17
	Med:	7.66(4.66;10.37)	1.08(0.78;1.09)
Kontrol (K)	Ort.:	15.09 ± 5.58	0.65 ± 0.06
	Med:	8.65(6.57;33.45)	0.74(0.50;0.77)

PICP: prokollagen tipI C-propeptid, PIIINP: prokollagen tipIII N-propeptid

a: B vs K, B vs Bİ, B vs BS, B vs BİS, Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; p>0.05

b: B vs K, B vs Bİ, B vs BS, B vs BİS, Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; p>0.05

c: Ort. ortalama ± standart sapma, **d:** Med.: median (%25; %75)

Serum PICP değerleri Bakteri ve Bakteri-İrbesartan grupları arasında, ayrıca Bakteri ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton grupları arasında anlamlı fark gösterdi ($p<0.05$). Bakteri grubu ile Kontrol grubu ve Bakteri-Spironolakton grupları arasındaki fark ise anlamlı değildi ($p>0.05$). İlaç verilen gruplar arasında da (Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS) anlamlı fark bulunmadı. Serum PIIINP değerlerine bakıldığında ise tüm gruplarda sonuçlar benzerdi.

Serum ve periton lavaj sıvısı PICP ve PIIINP değerleri ile total yapışıklık skoru, ortalama inflamasyon, ortalama fibrozis ve ortalama periton kalınlığı değerleri arasında anlamlı korelasyon bulunmadı. Ayrıca bu parametrelerle periton ve serum TGF- β 1 değerleri arasında da anlamlı korelasyon bulunmadı.

Serum PICP ve PIIINP değerleri ise tablo 5’de verilmiştir



Tablo 5 : Serumda PICP ve PIIINP değerleri ve dağılım zellikleri

Gruplar	Dağılımlar	Serum PICP ^a (µg/L)	Serum PIIINP ^b (µg/L)
Bakteri (B)	Ort. ^c :	31.94 ± 3.00	0.57 ± 0.13
	Med. ^d :	28.42(26.58;37.7)	0.55(0.33;0.92)
Bakteri – İrbesartan (Bİ)	Ort.:	19.49 ± 3.51	0.27 ± 0.17
	Med:	19.39(11.46;27.25)	0.10(0.08;0.15)
Bakteri – Spironolakton(BS)	Ort:	23.83 ± 3.51	0.41 ± 0.21
	Med.:	23.76(13.74;32.41)	0.09(0.01;1.10)
Bakteri – İrbesartan – spironolakton (BİS)	Ort.:	38.75 ± 6.92	0.20 ± 0.09
	Med:	34.28(27.91;47.17)	0.10(0.09;0.16)
Kontrol (K)	Ort:	20.23 ± 6.00	0.87 ± 0.19
	Med:	21.81(4.46;29.35)	0.79(0.44;1.08)

PICP: prokollagen tipI C-propeptid, PIIINP: prokollagen tipIII N-propeptid

a: B vs Bİ, B vs BİS; p<0.05, B vs K, B vs BS, Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS p>0.05

b: B vs K, B vs Bİ, B vs BS, B vs BİS, Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; p>0.05

c: ortalama ± standart sapma, d: median (%25; %75)

3. Periton lavaj sıvısı protein değerleri

Periton sıvısı proteinleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında; Bakteri grubu ile Kontrol grubu, Bakteri-İrbesartan, Bakteri-Spironolakton ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton grupları arasında anlamlı fark bulundu (sırasıyla 235.30 ± 19.44 vs 127.44 ± 34.31 ; 235.30 ± 19.44 vs 179.87 ± 30.51 ; 235.30 ± 19.44 vs 178.93 ± 68.77 ; 235.30 ± 19.44 vs 146.83 ± 36.97 , $p < 0.05$). İlaç verilen grupların periton lavajı protein sonuçları ise benzerdi. Gruplara ait periton lavaj sıvısı protein değerleri tablo 6 da verilmiştir.

Tablo 6: Periton lavaj sıvısında protein değerleri ve dağılım özellikleri

Gruplar	Periton lavaj sıvısında protein (mg/dL)	
	ortalama $\pm$ standart sapma	median (%25;%75)
Bakteri (B)	235.30 ± 19.44	230.50 (225.00;243.80)
Bakteri – İrbesartan (Bİ)	179.87 ± 30.51	182.40 (160.50;206.00)
Bakteri – Spironolakton(BS)	178.93 ± 68.77	211.45 (118.15;226.62)
Bakteri – İrbesartan – Spironolakton (BİS)	146.83 ± 36.97	144.35 (117.92;181.35)
Kontrol (K)	127.44 ± 34.31	119.50 (98.75;160.10)

B vs K, B vs Bİ $p < 0.01$, B vs BS; $p < 0.05$, B vs BİS; $p < 0.01$, Bİ vs BS, Bİ vs BİS, BS vs BİS; $p > 0.05$

V - TARTIŞMA

Son zamanlarda SAPD hastalarında çeşitli etkenlerle oluştuğu ileri sürülen ve peritonda önemli işlevsel bozukluklara neden olan periton fibrozisinin önlenmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır (9-13). SAPD tedavisinde periton fibrozisinin önemli nedenlerinden birisi tekrarlayan bakteriyel peritonit atakları olup, burada en sık saptanan etkenin *Staphylococcus aureus* olduğu gösterilmiştir (1). Diğer önemli nedenler ise periton diyaliz sıvısının fizyolojik olmayan yapısı (yüksek glikoz yoğunluğu, hipertonsite, laktat ve düşük pH), içerdiği plastisizerler ve ileri glikozilasyon son ürünleri olarak bildirilmektedir (1,2,3,19,22,28).

Deneysel bakteriyel peritonit modelleri *Staphylococcus aureus* (82) ve *Escherichia coli* (83) ile oluşturulmuş, ancak yeterli düzeyde periton fibrozisi elde edilememiştir. Hung ve arkadaşları ratlara intraperitoneal olarak *Staphylococcus aureus* ile birlikte Cytodex vererek peritoneal fibrosis modeli oluşturmuşlardır (10). Bizde bu nedenle çalışmamızda Hung ve arkadaşlarının deneysel peritonit modelini uyguladık.

Daha önceki araştırmacılar deneysel çalışmalarda periton fibrozisini değerlendirmede, kaba görsel yapışıklık dereceleme sistemini peritonda fibrosis oluşumunun yarı kantitatif bir ölçüsü olması nedeniyle kullanmışlardır (10,87,88). Yine, periton kalınlığının kantitatif olarak ölçülmesi de periton fibrozisinin değerlendirilmesinde sık kullanılan bir yöntem olarak bildirilmektedir (9,10,13,87). Ayrıca peritondaki inflamasyon ve fibrosis derecelerinin yarı kantitatif ölçümleri de periton fibrozisinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (13).

Çalışmamızda Bakteri grubu ratların; periton yapışıklık skoru, periton kalınlığı, fibrosis ve inflamasyon yönünden kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek değerlere sahip olduğunu gösterdik. Bu bulgular uyguladığımız modelin periton fibrozisi oluşturmak için yeterli olduğunu düşündürmektedir. Aynı zamanda sonuçlarımız literatürde tanımlanan deneysel modeldeki bulgularla benzerlik göstermektedir (10). Diğer yandan; bizim çalışmamızda Bakteri-İrbesartan, Bakteri-Spironolakton ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton gruplarının periton yapışıklığı ve periton kalınlığı değerleri Bakteri grubundan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar kullandığımız ilaçların ratlarda peritonit sonucu gelişen periton hasarlanmasını azaltmada etkili olduklarını göstermektedir.

Daha önce Duman ve arkadaşları Enalapril ve Valsartanın ratlara hipertonic glikozlu periton diyaliz sıvıları uygulaması sonrasında gelişen periton hasarlanmasını azalttığını ve periton fonksiyonlarını koruduğunu göstermişlerdir (13,89). Ancak literatürde deneysel bakteriyel

peritonit modellerinde İrbesartan ve Spironolaktonun periton fibrozisi üzerine olan etkilerini araştıran çalışma bulunamamıştır.

Diğer yandan çalışmamız peritondaki inflamasyon ve fibrozis skorları açısından değerlendirildiğinde, Bakteri grubu ile İrbesartan ve/veya Spironolakton grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak İrbesartan ve Spironolakton gruplarında inflamasyon ve fibrozis değerleri daha düşük olarak saptanmıştır. Ayrıca total yapışıklık skoru, ortalama periton kalınlığı, ortalama fibrozis ve ortalama inflamasyon değerlerinin birbirleriyle anlamlı pozitif korelasyon göstermesi İrbesartan ve Spironolaktonun periton hasarlanmasını azaltmada etkili olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Çalışma sonunda aldığımız periton lavaj sıvısında TGF- β 1 değerleri Bakteri grubunda Kontrol grubuna göre anlamlı bir yükselme göstermedi. Ancak Bakteri-İrbesartan, Bakteri-Spironolakton ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton gruplarında periton lavaj sıvısında TGF- β 1 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmasada Bakteri grubundan daha yüksek bulundu. Serum TGF- β 1 düzeylerine baktığımızda ise; Bakteri-İrbesartan ve Bakteri-Spironolakton gruplarında Bakteri grubuna göre oldukça düşük değerler saptadık. Bu sonuçlar peritonit esnasında artan periton membranı moleküler geçirgenliğinin İrbesartan ve Spironolakton kullanımı ile azaldığını düşündürmektedir. Bu nedenle de peritonit esnasında peritonda lokal olarak sentezlenen TGF- β 1 düzeylerinin, Bakteri-İrbesartan ve Bakteri-Spironolakton gruplarında Bakteri grubuna göre periton lavaj sıvısında daha yüksek, serumda ise daha düşük bulunduğunu düşünmekteyiz. Bu düşüncemizi destekleyen diğer bir bulgu ise, periton membranının moleküler geçirgenliğindeki değişikliğin bir göstergesi olarak kullanabileceğimiz periton lavaj sıvısındaki protein düzeyleridir. Çünkü çalışmamızda Bakteri grubunun periton lavaj sıvısında total protein düzeyi yüksek, İrbesartan ve Spironolakton gruplarında ise düşük olarak bulundu ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi. Bu sonuçlar bize İrbesartan ve Spironolaktonun peritonit sırasında serum proteinlerinin peritona geçişini azalttığını düşündürmektedir.

Diğer yandan bizim periton lavaj sıvısı ve serum TGF- β 1 düzeylerine ilişkin sonuçlarımız daha önce bildirilen bazı çalışma sonuçları ile uyumludur. Çünkü Ghellai ve arkadaşları tarafından oluşturulan başka bir deneysel bakteriyel peritonit modelinde, çalışma bitiminde peritonit grubunda periton lavaj sıvısı TGF- β 1 düzeyleri kontrol grubundan daha düşük bulunmuştur. Buna karşın aynı çalışmacılar serum TGF- β 1 düzeylerini peritonit grubunda kontrol grubundan daha yüksek bulmuşlardır (88).

Yine Lin ve arkadaşlarının çalışma sonuçları da bizim bulgularımızı desteklemektedir (90). Bu araştırmacılar az sayıda peritonit geçirmiş SAPD hastalarında peritonit atağı sonrası

TGF- β 1 gen ekspresyonunun ve TGF- β 1 üretiminin kısa süreli olduğunu ve iki hafta sonra yapılan ölçümlerde periton drenaj sıvısında TGF- β 1'in saptanamadığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da sekizinci günde ölçülen periton lavajı TGF- β 1 düzeylerinin Bakteri grubunda Kontrol grubuna göre yüksek bulunamamasının nedeni belki de peritonit oluşumunun sekizinci gününden daha önceki günlerde TGF- β 1 sentezinin sona ermesi olabilir.

Çalışmamızda periton fibrozisinin diğer biyokimyasal göstergesi olan periton lavajı ve serum PICP ve PIIINP düzeyleri Bakteri grubu ile İrbesartan ve/veya Spironolakton verilmiş gruplar arasında farklı bulunmamıştır. Ancak İrbesartan ve Spironolakton gruplarında periton lavajında ve serumda PICP ve PIIINP düzeyleri Bakteri grubuna göre daha düşüktür. Bu sonuçlar verilen ilaçların kollagen yapımını ve dolayısıyla yapım sırasında oluşan propeptidlerin oluşumunu da azalttığını düşündürmektedir. Ancak TGF- β 1 sentezinde düşündüğümüz gibi kollagen sentezi de peritonit oluşumunun sekizinci günden daha erken bir sürede artmış ve sonlanmış olabilir.

Bakteri-İrbesartan, Bakteri-Spironolakton ve Bakteri-İrbesartan-Spironolakton grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında total yapışıklık skoru, periton kalınlığı, fibrozis ve inflamasyon değerleri arasında fark olmaması bu ilaçların peritonit esnasında oluşan periton hasarlanmasını önlemede birbirlerine üstünlüğü olmadığını ve ayrıca bu ilaçların birlikte verilmesinin ilave bir fayda sağlamadığını düşündürmektedir.

VI - SONUÇ

Bizim çalışmamız da her ne kadar biyokimyasal veriler istatistiksel olarak anlam kazanmasa da, histopatolojik veriler İrbesartan ve Spironolaktonun bakteriyel peritonite bağlı periton hasarlanmasını azalttığını, ayrıca İrbesartan ve Spironolaktonun periton hasarlanmasını azaltmada birbirlerine üstünlüğü olmadığını ve birlikte verilmelerinin ek yarar getirmediğini göstermektedir. Diğer yandan bakteriyel peritonite bağlı periton hasarlanmasında angiotensin II'ye bağımlı mekanizmaların da etkin rol oynadığını, bu nedenle periton hasarlanmasının önlenmesinde İrbesartan ve Spironolaktonun kullanılabileceğini düşündürmektedir.

VII - ÖZET

Sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) sırasında tedavinin etkinliğini azaltan periton fibrozisi gelişmesinin önlenmesi ile ilgili araştırmalar yapılmaktadır. Son zamanlarda renin angiotensin aldosteron sisteminin hemodinamik etkilerden bağımsız olarak miyokard, böbrek ve vasküler yapılarda fibrozis oluşumu ile ilişkisini gösteren çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. Biz bu deneysel çalışmada angiotensin II reseptör antagonisti (İrbesartan) ve aldosteron antagonistinin (Spironolakton) periton fibrozisini önlemedeki etkilerini araştırmayı amaçladık.

40 adet wistar rat 5 gruba randomize edildi. I)Bakteri(B) II)Bakteri-İrbesartan(Bİ) III)Bakteri-Spironolakton(BS) IV)Bakteri-İrbesartan-Spironolakton(BİS) V)Kontrol(K). İlk 4 gruba önce intraperitoneal (İP) olarak bakteri-Cytodex suspansiyonu verildi. V.gruba ise İP olarak sadece Cytodex suspansiyonu verildi. I.grup tedavisiz bırakıldı. II.gruba İrbesartan (100mg/kg), III.gruba Spironolakton(50mg/kg), IV.gruba iki ilaç aynı dozlarda enteral gavaj yoluyla verildi. 8.günde ratların batınları açılarak peritonda yapışıklık skorlaması yapıldı. Ratlar kurban edilirken periton lavajı, kan ve periton dokusu örnekleri alındı. Üç ayrı periton bölgesinden (karaciğer, barsak, karın ön duvarı) alınan doku örnekleri H&E ve Masson's Trichrome ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Her periton örneğinin 3 ayrı random bölgesinde inceleme yapıldı. Periton doku kalınlıkları ölçüldü. Ayrıca inflamasyon ve fibrozis yarı kantitatif olarak derecelendirildi. Ortalama değerler saptandı. Periton lavajı ve serum örneklerinde transforming growth faktör-β1 (TGF-β1), prokollagen tip I C-propeptid (PICP), prokollagen tip III N-propeptid (PIIINP) düzeyleri ölçüldü. Periton total yapışıklık skorları B grubunda K grubuna göre anlamlı artış gösterdi ($p<0.01$). Ortalama periton kalınlığı, ortalama inflamasyon ve ortalama fibrozis skorları B grubunda K grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Sonuçta deneysel modelimizde yeterli periton fibrozisi oluştu. Bİ ve BİS gruplarında total yapışıklık skorları B grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulundu ($p<0.01$). BS grubunda yapışıklık skoru B grubuna göre azaldı, ancak anlamlılık sınır değerde idi ($p=0.06$). Tüm tedavi gruplarının (Bİ,BS,BİS) ortalama periton kalınlığı değerleri Bakteri grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulundu, ancak ortalama inflamasyon ve ortalama fibrozis skorları anlamlı azalma göstermedi. Total yapışıklık skoru, ortalama periton kalınlığı, ortalama inflamasyon ve ortalama fibrozis değerleri birbirleri ile anlamlı pozitif korelasyon gösterdi. Periton lavajında TGF-β1 düzeyi tüm gruplarda benzer bulundu. Serum TGF-β1 düzeyleri B grubunda K grubuna göre anlamlı artış gösterdi. Bİ ve BS gruplarının serum TGF-β1 düzeyleri B grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulundu. Periton lavajı PICP ve

PIIINP düzeyleri ile serum PIIINP düzeyleri tüm gruplarda benzerdi. Serum PICP düzeyleri Bİ ve BİS gruplarında B grubuna göre anlamlı olarak farklı bulundu.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda her ne kadar biyokimyasal veriler istatistiksel olarak anlam kazanmasa da, histopatolojik veriler İrbesartan ve Spironolaktonun bakteriyel peritonite bağlı periton hasarlanmasını azalttığını, ayrıca İrbesartan ve Spironolaktonun periton hasarlanmasını azaltmada birbirlerine üstünlüğü olmadığını ve birlikte verilmelerinin ek yarar getirmediğini göstermektedir. Diğer yandan bakteriyel peritonite bağlı periton hasarlanmasında angiotensin II'ye bağımlı mekanizmaların da etkin rol oynadığını, bu nedenle periton hasarlanmasının önlenmesinde İrbesartan ve Spironolaktonun kullanılabileceğini düşündürmektedir.



VIII - SUMMARY

There are increasing efforts on prevention of peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis patients, which may lead to treatment failure. Recently it has been realised that renin angiotension and aldosterone system has antifibrotic effects on myocardium, kidney and vascular structures independent from its hemodynamic effects. In the present experimental study, we aimed to research the effects of an angiotensin II receptor antagonist (irbesartan) and an aldosterone antagonist (spironolactone) in prevention of peritoneal fibrosis.

Forty wistar rats were randomised into 5 groups. I: Bacteria-Cytodex (B), II: Bacteria-Irbesartan (BI), III: Bacteria-Spironolactone (BS) IV: Bacteria-Irbesartan-Spironolactone (BIS) and V: Control(K). All groups except the control group were given bacteria-Cytodex suspension intraperitoneally (IP). First group was not given any medication. Irbesartan (100mg/kg, orally) and spironolactone (50mg/kg, orally) were administered to BI and BS groups respectively. Both medication were given simultaneously to BIS group at the same doses and by the same routes, whereas only Cytodex was administered to group K. At 8th day rats were undergone laparotomy and the degree of peritoneal adhesion was scored. Before sacrifice, peritoneal washing fluid, blood and peritoneal tissue samples were obtained. Peritoneal tissue samples taken from three standard regions (liver, intestine and anterior abdominal wall) were stained with H&E and Masson's-Trichrome and examined under light microscopy. Three areas from each peritoneal regions were assessed. Peritoneal thickness was measured and inflammation, fibrosis were assessed semi-quantitatively. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), procollagen type I C-propeptide (PICP), procollagen type III N-propeptide (PIIINP) levels were measured in serum and peritoneal washing fluid samples.

Peritoneal total adhesion score was significantly higher in group B than that of the group K. ($p < 0.01$). Whereas it was lower in BI and BIS groups than group B ($p < 0.01$). And it was lower in BS group than B group; however p was at the borderline ($p = 0.06$). Mean peritoneal thickness, mean inflammation and mean fibrosis scores were significantly higher in group B in comparison to group K. Mean peritoneal thickness score of all treatment groups (BI, BS, BIS) were significantly lower when compared to that of group B. However, mean inflammation and mean fibrosis scores did not differ significantly. Total adhesion score, mean peritoneal thickness, mean inflammation and mean fibrosis scores were found to be positively correlated with each other. Peritoneal washing fluid TGF- β 1 levels were similar in all groups. However serum TGF- β 1 levels were significantly higher in group B than they were in group K. On the other hand, serum TGF- β 1 levels were significantly lower in groups BI and BS

when compared to that of the group B. Peritoneal lavage fluid PICP and PIIINP levels and serum PIIINP levels were similar in all groups. Serum PICP levels in BI and BIS groups were significantly different than group B.

In a conclusion, although biochemical data are not statistically significant in our study, histopathological data demonstrates that irbesartan and spironolactone decrease the peritoneal injury due to bacterial peritonitis. But, neither irbesartan nor spironolactone is superior to each other in decreasing peritoneal injury and the concomitant administration of them does not have additive effect. On the other hand, we put forward that angiotensin II related mechanisms also play an important role in peritoneal injury related with bacterial peritonitis. Therefore, irbesartan and spironolactone can be used for the prevention of peritoneal injury.



IX - KAYNAKLAR

- 1) Coles GA, Williams JD, Topley N. Peritoneal inflammation and long-term changes in peritoneal structure and function. Gokal R, Khanna R, Krediet RT, Nolph KD. Textbook of Peritoneal Dialysis. 2nd ed. Kluwier Academic Publishers. 2000; 566-83.
- 2) Chaimovitz C. Peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1994; 45:1226-40.
- 3) Plum J, Hermann S, Fusshöller A. Peritoneal sclerosis in peritoneal dialysis patients related to dialysis settings and peritoneal transport properties. *Kidney Int* 2001; 59 (Suppl.78)42-7.
- 4) Davies SJ, Brryan J, Philips L. Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effect of peritoneal dialysis and peritonitis. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:448-56.
- 5) Heimbürger O, Waniewski J, Werynski A. Peritoneal transport in chronic ambulatory patients with permanent loss of ultrafiltration capacity. *Kidney Int* 1990; 38:495-506
- 6) Dobbie JW, Lloyd JK, Gall CA. Categorisation of ultrastructural changes in peritoneal mesothelium, stroma and blood vessels in uremia and CAPD patients. *Adv Perit Dial* 1990; 6:3-12.
- 7) Rossi P, Bernini M, Paucci AM, Ibba L, Sabatelli P. Morphology of the peritoneal membrane during CAPD. *Nephron* 1986; 44:204-11.
- 8) Rubin J, Herrera GE, Collins D. An autopsy study of the peritoneal cavity from patients on CAPD. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:97-102.
- 9) Francasso A, Baggio B, Ossi E, Prete DD, Bonfante L, Bazzato G. Glycosaminoglycans prevent the functional and morphological peritoneal derangement in an experimental model of peritoneal fibrosis. *Am J Kidney Dis* 1999; 33:105-10.
- 10) Hung KY, Shyu RS, Fang CC. Dipyridamole inhibits human peritoneal mesothelial cell proliferation in vitro and attenuates rat peritoneal fibrosis in vivo. *Kidney Int* 2001; 59:2316-24.
- 11) Fang CC, Yen CJ, Chen YM, Shyu RS. Pentoxifilline inhibits human peritoneal mesothelial cell growth and collagen synthesis: effects on TGF- β . *Kidney Int* 2000; 57:2626-33
- 12) Gambaro G, Weigert C, Ceol Monica, Schleicher ED. Inhibition of transforming growth factor- β 1 gene overexpression as a strategy to prevent fibrosis . *Contrib Nephrol* 2001; 131:107-13.

-
- 13) Duman S, Günal AI, Sen S, Asci G. Does enalapril prevent peritoneal fibrosis induced by hypertonic (3,86%) peritoneal dialysis solution? *Perit Dial Int* 2000; 21:219-24
 - 14) Stylianou E, Jenner LA, Davies M, Coles GA, Williams JD. Isolation, culture and characterisation of human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 1990; 37:1463-70
 - 15) Topley N, Brown Z, Jörres A. Human peritoneal mesothelial cells synthesise IL-8: Synergistic induction by interleukin-1 β and tumor necrosis factor. *Am J Pathol* 1993; 142:1876-86.
 - 16) Douvdevani A, Rappoport J, Konforty A, et al. Human peritoneal mesothelial cells synthesize IL-1 α and β . *Kidney Int* 1994; 46:993-1001.
 - 17) Beavis MJ, Williams JD, Hoppe J, Topley N. Human peritoneal fibroblast proliferation in 3-dimensional culture: modulation by cytokines, growth factors and peritoneal dialysis effluent. *Kidney Int* 1997; 51: 205-15.
 - 18) Honda K, Nitta K, Horita H, Yumura W, Nihei H. Morphological changes in the peritoneal vasculature of patients on CAPD with ultrafiltration failure. *Nephron* 1996; 72:171-6
 - 19) Honda K, Nitta K, Horita H, et al. Accumulation of advanced glycation end products in the peritoneal vasculature of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with low ultrafiltration. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:1541-9.
 - 20) Mateijsen MAM, Wal AC, Hendriks PMEM, et al. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *J Am Nephrol* 1997;8: 268-9.
 - 21) Topley N, Craig JJ, Fallon M, et al. Morphological changes in the peritoneal membrane of patients on peritoneal dialysis (PD) are related to time on treatment. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:324A.
 - 22) Krediet RT, Lindholm B, Rippe B. Pathophysiology of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int* 2000; 20(Suppl 4): 22-42.
 - 23) Selgas R, Fernandez-Reyes MJ, Bosque E, Bajo MA, et al. Functional longevity of the human peritoneum: how long is continuous peritoneal dialysis possible? Results of a prospective medium long term study. *Am J Kidney Dis* 1994; 23:64-73.
 - 24) Davies SJ, Bryan J, Philips L, Russell GI. Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effects of peritoneal dialysis and peritonitis. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11:498-506
 - 25) Andreoli SP, Langefeld CD, Stadler S, Smith P, Sears A, West K. Risks of peritoneal membrane failure in children undergoing long-term peritoneal dialysis. *Pediatr Nephrol* 1993; 7: 543-7.

-
- 26) Hendriks PMEM, Ho-dac-Pannekeet MM, van Gulik TM, et al. Peritoneal sclerosis in chronic peritoneal dialysis patients: analysis of clinical presentation, risk factors and peritoneal transport kinetics. *Perit Dial Int* 1997; 17: 136-43.
 - 27) Krediet RT. Preserving the integrity of the peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55:341-56.
 - 28) Gotlloebe L, Shostak A, Waysbrot V. Detrimental effects of peritoneal dialysis solutions upon in vivo and in situ exposed mesothelium. *Perit Dial Int* 1997; 17(Suppl 2):S13-6.
 - 29) Zweers MM, Mulder JB, Krediet RT, Struijk DG. Vascular and interstitial changes in a continuous peritoneal infusion model in the rat. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:195A.
 - 30) Border WA, Noble NA: Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331:1286-92.
 - 31) Jörres A, Ludat K, Lang J, et al. Establishment and functional characterisation of human peritoneal fibroblasts in culture: regulation of interleukin-6 by proinflammatory cytokines. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7:2192-2201.
 - 32) Beavis MJ, Williams JD, Topley N. Repeated activation of human peritoneal fibroblasts results in sustained cell proliferation and collagen III mRNA expression. *J Am Soc Nephrol*.1997; 8:512.
 - 33) Border WA, Noble N. Maximizing hemodynamic-independent effects of angiotensin II antagonists in fibrotic diseases. *Semin Nephrol* 2001; 21(6):563-72
 - 34) Kagami S, Kuhara T, Okada K et al: Dual effects of angiotensin II on the plasminogen/plasmin system in rat mesangial cells. *Kidney Int* 1997; 51 664-71.
 - 35) Weber KT. Fibrosis, a common pathway to organ failure: angiotensin II and tissue repair. *Semin Nephrol* 1997; 17:467-91
 - 36) Oikawa T, Freeman M, Lo W, et al: Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin-angiotensin inhibition. *Kidney Int* 1997; 51:164-72.
 - 37) Noble NA, Border WA. Angiotensin II in renal fibrosis: should TGF rather than blood pressure be the therapeutic target? *Semin Nephrol* 1997; 17:455-66.
 - 38) Peters H, Border WA, Noble NA. Targetting TGF- β overexpression in renal disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int* 1998; 54:1570-80.
 - 39) Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF- β 1 underlines development of progressive kidney fibrosis . *Kidney Int* 1994;45:916-27.

-
- 40) Border WA, Noble NA. Evidence that TGF- β should be a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1998; 54:1390-91
 - 41) Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor- β and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1998; 31:181-8.
 - 42) Cao Z, Cooper ME. Role of angiotensin II in tubulointerstitial injury. *Semin Nephrol* 2001; 21(6):554-62.
 - 43) Yoo KH, Thornhill BA, Wolstenholme JT, et al. Tissue specific regulation of growth factors and clusterin by angiotensin II. *Am J Hypertens* 1998;11:715-22.
 - 44) Wu LL, Cox A, Roe CJ, et al. Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int* 1997; 51:1553-67.
 - 45) Ots M, Mackenzie HS, Troy JL, et al. Effects of combination therapy with enalapril and losartan on the rate of progression of renal injury in rats with 5/6 renal mass ablation. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9:224-30.
 - 46) Cao Z, Cooper M, Wu L, et al. Blockade of the renin angiotensin and endothelin systems on progressive renal injury. *Hypertension* 2000; 36:561-8.
 - 47) Klahr S, Ishidoya S, Morrissey J. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1995; 26:141-6.
 - 48) Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF- β 1 messenger RNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ligation. *Kidney Int* 1993; 44:313-21.
 - 49) Pimentel JL, Sundell CL, Wang SS, et al. Role of angiotensin II in the expression and regulation of transforming growth factor-beta in obstructive nephropathy. *Kidney Int* 1995; 48:1233-46.
 - 50) Tanaka R, Sugihara K, Tatematsu A. Internephron heterogeneity of growth factors and sclerosis-modulation of platelet derived growth factor by angiotensin II. *Kidney Int* 1995; 47:131-9.
 - 51) Ibrahim HN, Rosenberg ME, Greene EL, Kren S. Aldosterone is a major factor in the progression of renal disease. *Kidney Int* 1997; 52(Suppl 63):115-9.
 - 52) Greene EL, Kren S, Hostetter TH. Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 1996; 98:1063-8.
 - 53) Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CTJ. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31:451-8.
 - 54) Brown NJ, Nakamura S, Ma LJ, et al. Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo. *Kidney Int* 2000; 58:1219-27.

-
- 55) Epstein M. Aldosterone as a mediator of progressive renal disease: Pathogenetic and clinical implications. *Am J Kidney Dis* 2001; 37-4 :677-88.
 - 56) Hatakeyama H, Miyamori L, Fujita T, et al. Vascular aldosterone; biosynthesis and a link to angiotensin II induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; 269:24318-20.
 - 57) Silvestre JS, Robert V, Heymes C, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat. Physiological regulation. *J Biol Chem* 1998; 273:4883-91.
 - 58) Ullian ME, Schelling JR, Linas SL . Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension* 1992; 20:67-73.
 - 59) Barr CS, Lang CC, Hanson J, Arnott M, Kennedy N, Struthers AD. Effect of adding spironolactone to an ACE inhibitory in congestive heart failure secondary to coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995; 76:1259-65.
 - 60) Stier CT, Chander PN, Zuckerman A, Rocha R. Nonepithelial effects of aldosterone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes* 1998; 5:211-6.
 - 61) Brilla CG, Weber KT. Mineralocorticoid excess, dietary medium and myocardial fibrosis. *J Lab Clin Med* 1992; 120:893-901.
 - 62) Young M, Fullerton M, Dilley R, Funder J. Mineralocorticoids, hypertension and cardiac fibrosis. *J Clin Invest* 1994; 93:2578-83.
 - 63) Benetos A, Lacolley P, Safar ME. Prevention of aortic fibrosis by spironolactone in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1152-6.
 - 64) Brilla CG, Matsubara LS, Weber KT. Antifibrotic effects of spironolactone in preventing myocardial fibrosis in systemic arterial hypertension. *Am J Cardiol* 1993; 71:12A-16A.
 - 65) Nicoletti A, Heudes D, Hinglias N, et al. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertensive rats. Effect of losartan and spironolactone. *Hypertension* 1995; 26:101-11.
 - 66) Mc Fayden RJ, Barr CS, Struthers AD. Aldosterone blockade reduces vascular collagen turnover, improves heart rate variability and reduces early morning rise in heart rate in heart failure patients. *Cardiovasc Res* 1997; 35:30-4.
 - 67) Berl T, Katz FH, Henrich WL, de Torrete A, Schrier RW. Role of aldosterone in the control of sodium excretion in patients with advanced chronic renal failure. *Kidney Int* 1978; 14:228-35.
 - 68) Hene RJ, Boer P, Koomans HA, Dorhout Mees EJ. Plasma aldosterone concentrations in chronic renal disease. *Kidney Int* 1982; 21:98-101.
 - 69) Ibrahim HN, Rosenberg ME, Hostett TH. Role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of renal disease. A critical review. *Semin Nephrol* 1997; 17:431-40.

-
- 70) Rocha R, Chander PN, Khanna K, Zuckerman A, Stier CT. Mineralocorticoid blockade reduces vascular injury in stroke-prone hypertensive rats. *Hypertension* 1998; 31:451-8.
 - 71) Rocha R, Chander PN, Zuckerman A, Stier CT: Role of aldosterone in renal vascular injury in stroke prone hypertensive rats. *Hypertension* 1999; 33:232-7.
 - 72) Grene E, Kren S, Hostetter TH . Role of aldosterone in the remnant kidney model in the rat. *J Clin Invest* 1996; 98:1063-8.
 - 73) Ritz E, Orth S, Wienreich T, Wagner J. Systemic hypertension versus intraglomerular hypertension in progression. *Kidney Int* 1994; 45:438-42.
 - 74) Duprez D, De Buyzere M, Rietzchel ER, Clement DL. Aldosterone and vascular damage. *Curr Hypertens Rep* 2000; 2:327-34.
 - 75) Horiuchi M, Nishiyama H, Hama J, et al. Characterization of renal aldosterone receptors in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol* 1993; 264:F286-91
 - 76) Takeda Y, Miyamori I, Inaba S, et al. Vascular aldosterone in genetically hypertensive rats. *Hypertension* 1997;29:45-8.
 - 77) Weber TK. Monitoring tissue repair and fibrosis from a distance . *Circulation* 1997; 96:2488-92
 - 78) Graff J, Joffe P, Fugleberg S. Collagen markers in peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 1995; 11:24-7.
 - 79) Joffe P, Jensen LT. Type I and III procollagens in CAPD: markers of peritoneal fibrosis. *Adv Perit Dial* 1991;7:158-60.
 - 80) Digenis GE, Dombros NV, Christophoraki M. Procollagen type-1 in the serum and dialysate of CAPD patients. *Perit Dial Int.*1993; 13(Suppl 2): 480-3
 - 81) Pannekeet M, Zemel D, Koomen GC. Dialysate markers of peritoneal tissue during peritonitis and in stable CAPD . *Perit Dial Int* 1995; 15(6) :217-25.
 - 82) Calame W, Afram C, Blijleven N, et al. Establishing an experimental infection model for peritoneal dialysis : effect of inoculum and volume. *Perit Dial Int* 1993; 13(Suppl 2):S79-S80
 - 83) Wiczorowski K, Khanna R, Moore HL, et al. Rat model of peritoneal fibrosis. Preliminary observations. *Adv Perit Dial* 1995; 11:48-51.
 - 84) Ford CW, Hamel JC, Stapert D, Yancey RJ. Establishment of an experimental model of a *Staphylococcus aureus* abscess in mice by use of dextran and gelatin microcarriers. *J med Microbiol* 1988; 28: 259-266.

- 85) Fabiani ME, Dinh DT, Nassis L, Casley DJ, Johnston CI. Comparative in vivo effects of irbesartan and losartan on angiotensin II receptor binding in the rat kidney following oral administration. Clin Sci 2000; 99(4):331-41.
- 86) Shiga T, Fujimura A, Ebihara A. Administration time-dependent change in the effect of spironolactone in rats. Jpn J Pharmacol 1994; 65(3):179-81
- 87) Frazier-Jessen MR, Covacs. Abdominal wall thickness as a means of assessing peritoneal fibrosis in mice. J Immunol Method 1993; 162:115-21
- 88) Ghellai AM, Stucchi AF, Chegini N, et al. Role of transforming growth factor beta-1 in peritonitis-induced adhesions. J Gastrointest Surg 2000; 4:316-23
- 89) Duman S, Sen S, Asci G, Basci A, Akcicek F. Effect of lisinopril versus valsartan on peritoneal alterations in rats (Abstract). Perit Dial Int 2002; 22(1):157.
- 90) Lin CY, Chen WP, Yang LY, Chen A, Huang TP. Persistent transforming growth factor beta 1 expression may predict peritoneal fibrosis in CAPD patients with frequent peritonitis occurrence. Adv Perit Dial 1997; 13:64-71.



**TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON BİRİMİ**