

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI

RATLARDA KLOORHEXİDİN GLUKONAT İLE OLUŞTURULAN
PERİTON FİBROZİSİNE PARİKALSİTOL, N-ASETİL SİSTEİN VE
KARVEDİLOLÜN ETKİSİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ
Dr. Kürşad Öneç

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Kadriye Altok

ANKARA
ARALIK- 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İçindekiler	i
Teşekkürler	iii
Kısaltmalar Dizini	iv
Tablolar, Şekiller, Resimler	vi

1.	GİRİŞ	1	
2.	GENEL BİLGİLER	3	
	2.1. Kronik Böbrek Hastalığı	3	
	2.2. Kronik Böbrek Hastalığı Epidemiyoloji ve İnsidansı	4	
	2.3. Periton Diyalizi	7	
	2.4. Periton Diyalizi ve Hemodiyaliz Arasında Seçim	9	
	2.5. Periton Diyalizinin Kontraindikasyonları	10	
	2.6. Periton Zarı	11	
	2.7. Ultrafiltrasyon Yetersizliği	13	
	2.8. Periton Fibrozisi	14	
	2.9. Transforming Growth Faktör Beta 1 Ve Fibrozis	17	2.10.
	Karvedilol	18	
	2.11. N-Asetil-L-Sistein	19	
	2.12. Parikalsitol	20	
	3. GEREÇ VE YÖNTEM	22	
	3.1. Çalışmaya Alınan Hayvanlar	22	
	3.2. Çalışma Planı	22	
	3.3. Peritonun Histopatolojik İncelenmesi	24	
	3.4. İstatistiksel Analiz	25	
	4. BULGULAR	26	

5. TARTIŞMA	35
6. KAYNAKLAR	42
7. ÖZET	51
8. ABSTRACT	53

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimimin zorlu sürecinde bana yol gösteren,
hoşgörü ve sabır ile bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan,
başta tez danışmanım Prof. Dr. Kadriye Altok olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr.
Turgay Arınsoy, Prof. Dr. Şükrü Sindel, Prof. Dr. Musa Bali, Prof. Dr. Galip Güz, Prof. Dr.
Yasemin Erten ve Prof. Dr. Ülver Derici'ye,
birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli uzman arkadaşlarıma,
verdikleri koşulsuz destek için tüm hemşire ve personel iş arkadaşlarıma,
sevgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim eşime ve aileme,
Teşekkür Ederim.

KISALTMALAR DİZİNİ

AGE : İleri Glikolizasyon Yıkım Ürünleri

APD : Aletli Periton Diyalizi

Ca : Kalsiyum

eNOS : Endoteliyal Nitrik Oksit Sentetaz

FGF 2 : Fibroblast Growth Faktör 2

GFR : Glomerül Filtrasyon Hızı

GAPD : Gece Aralıklı Periton Diyalizi

HD : Hemodiyaliz

HE : Hemotoksilen Eozin

IL-1 β : İnterlökin 1 Beta

IL-6 : İnterlökin 6

KH : Klorhexidin Glukonat

KBH : Kronik Böbrek Hastalığı

NAC :N-Asetil-L Sistein

MT : Masson Trikrom

P : Fosfor

PD : Periton Diyalizi

PET : Periton Eşitleme Testi

PTH : Parathormon

RRT : Renal Replasman Tedavisi

SAPD : Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi

SC : Subkutan

SDBY : Son Dönem Böbrek Yetmezliği

SF : Serum Fizyolojik

TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TGF- β : Transforming Growth Faktör Beta

UF : Ultrafiltrasyon

VEGF : Vasküler Endoteliyal Growth Faktör

VDR : Vitamin D Reseptörü

α -SMA: Alfa Smooth Muscle Antibody

ŞEKİLLER

Şekil 1: Periton fibrozisinin şematik olarak gösterilmesi

Şekil 2: Çalışma planının şematik gösterimi

Şekil 3: Serum TGF- β 1 düzeyleri açısından grupların karşılaştırılması

Şekil 4: Periton zar kalınlığı açısından grupların karşılaştırılması

RESİMLER

Resim 1: Ratların pariyetal peritonunun makroskopik görünümü

Resim 2: Morfometrik olarak periton tabakasının kalınlığını gösteren ölçüm

Resim 3: Klorhexidin grubundan bir ratta belirgin inflamasyon, kalınlaşmış periton tabakası

Resim 4: Klorhexidin grubu bir rat peritonunda belirgin damarlanma artışı

Resim 5 : Klorhexidin grubu bir ratta periton tabakasının ötesine, diyafragmatik çizgili kasa kadar uzanan yoğun ve aktif kronik inflamasyon

TABLÖLER

Tablo 1: NKF-K/DOQI sınıflandırmasına göre KBH evreleri

Tablo 2: 31 Aralık 2010 itibarıyla kronik HD/PD programında izlenmekte olan veya fonksiyone greftle izlenmekte olan tüm hastaların RRT tipine göre dağılımı

Tablo 3: Grupların TGF- β 1, periton kalınlığı, fibrozis, inflamasyon ve vaskülarizasyon skorlarının ortalama değerleri

Tablo 4 : Gruplar arasında TGF ve periton kalınlığının karşılaştırılması

Tablo 5: Gruplar arasında fibrozis, inflamasyon ve vaskularizasyon skorlarının karşılaştırılması

Tablo 6: Grupların fibrozis, inflamasyon ve vaskularizasyon skorları

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) son yıllarda sıklığı giderek artmakta olan mortalitesi ve morbiditesi oldukça yüksek bir hastalıktır. Bu hastalarda önerilen altın standart tedavi şekli renal transplantasyon olmasına rağmen yeterli donör sayısına ulaşılabilmesi nedeniyle hastalar zorunlu olarak diyaliz tedavi yöntemlerinden biri ile tedavi edilmektedirler. Hemodiyaliz (HD) ve periton diyalizi (PD) günümüzde uygulanmakta olan diyaliz yöntemleridir. Her iki tedavi modelinin de kendilerine özgü avantajları ve komplikasyonları mevcuttur.

Periton diyaliz son dönem böbrek yetmezliğinde başarı ile uygulanan bir tedavi yöntemidir. Periton diyalizinin erken döneminde sıklıkla karşılaşılan komplikasyonlar, mekanik komplikasyonlar ve enfeksiyonlara bağlı olarak ortaya çıkan komplikasyonlardır. Uzun süre periton diyalizi yapan hastalarda ise, kullanılan yüksek glukoz konsantrasyonuna sahip solüsyonlar, sık peritonit atakları ve diğer bir çok sebebe bağlı olarak periton yapısının bozulması başlıca sorun olarak karşımıza çıkar. İlerleyen dönemde periton zarında gelişen değişiklikler periton diyaliz etkinliğinin azalmasına neden olmakta ve periton diyalizinin sonlandırılmasını gerektirebilmektedir. Periton zarında ortaya çıkan ve diyaliz yetersizliğine neden olan en önemli değişiklik periton zarında gelişen fibrozisdir.

Periton zarı, periton boşluğunu sınırlayan seröz bir zardır. Periton zarı; mikrovillüsleri olan ve üzerinde ince ve kaygan bir sıvı tabakası bulunan mezotel hücrelerine sahiptir. Mezotelyal dokunun altında peritonun kılcal damarları, lenfatikleri, kollajeni ve diğer lifleri içeren matriksten oluşan interstisyum bulunur. Periton zarında, mezotelyal hücreler ve alttaki stromal tabakada, diyaliz sırasında çeşitli etkenler sonucu (bakteriyel, kimyasal) hasarlanma oluşur ve zarda yapısal değişiklikler gelişir. Bu değişiklikler; periton fibrozisi nedeniyle

oluşan periton kalınlığından, ciddi ve yaşamı tehdit eden enkapüle peritonite kadar farklılıklar gösterir.

Periton zarındaki inflamasyon reaksiyonu, diyaliz solüsyonlarında bulunan yüksek glukoz içeriği, yüksek osmotik yapı, düşük pH, laktat içeriği, ileri glikozilasyon son ürünleri, tekrarlayan peritonit atakları ve üreminin neden olduğu karbonil strese bağlı olarak başlamaktadır. Bu etkenler; mezotelyal hücreler, fibroblast, makrofaj, monosit, nötrofilleri etkileyerek ve bunlardan salınan sitokinler aracılığıyla ile periton fibrozisinin gelişmesine neden olur. Periton fibrozisinin gelişiminde asıl mekanizma periton mezotelyal hücrelerinin ve periton fibroblastlarının aşırı üretimi ve hücre dışı matriksin aşırı birikimidir.

Peritoneal fibrozis gelişimini önceden kestirmek mümkün olmamakla birlikte klinik bulgular (ultrafiltrasyon yetersizliği, periton diyaliz süresi, uzun süreli yüksek konsantrasyonda glukoz kullanımı) periton zarındaki değişiklikler konusunda uyarıcı bulgular olabilir. Bir hastada peritoneal fibrozis geliştikten sonra fibrozisi geriletecek medikal tedavi henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle özellikle periton diyalizi uygulaması esnasında kullanılabilecek fibrozisi engelleyici ilaçlar konusunda ileri deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada; SDBY'li hastaların, kemik mineral metabolizma hastalıkları nedeniyle kullanmakta olduğu bir vitamin D analogu olan parikalsitolün, koroner arter hastalığı ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan karvedilolün, kuvvetli antioksidan etkinliği nedeniyle birçok hastalıkta araştırılmış ve düşük yan etki profiliyle kullanılmış olan N - asetil sistein (NAC) molekülünün periton fibrozisi gelişimi üzerindeki önleyici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kronik Böbrek Hastalığı

Kronik böbrek hastalığı (KBH); böbrek işlevlerinin ilerleyici ve geri dönüşümsüz kaybı olarak tanımlanır. ABD'nin Ulusal Böbrek Vakfının (NKF) Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) alt grubu, 2002 yılında KBH tanımı için 2 kriter belirlemiştir (1). Bunlar:

1. Glomerüler filtrasyon hızı (GFR) azalsın ya da azalmasın, 3 ay ve daha uzun süre devam eden böbreğin yapısal veya işlevsel bozukluğuna bağlı kan ve idrar kompozisyonunda anormallik, görüntüleme testlerinde anormallik, böbrek biyopsisinde anormallik bulgularından bir veya daha fazlasının olması.
2. Böbrek hasarı olsun veya olmasın GFR'nin 3 ay ve daha uzun süre ile 60 ml/dk/1,73m²'den az olması.

K/DOQI rehberleri kronik böbrek hastalıklarını, kronik böbrek yetmezliği kavramını da ekleyerek beş evrede sınıflandırmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1: NKF-K/DOQI sınıflandırmasına göre KBH evreleri.

0	≥ 90	Artmış risk
1	≥ 90	Normal veya artmış GFR; *
2	60-89	GFR’de hafif azalma ile böbrek hasarı
3 A	45-59	GFR’de orta azalma ile böbrek hasarı
3 B	30-44	
4	15-29	GFR’de şiddetli azalma ile böbrek hasarı
5	< 15	Kronik böbrek yetmezliği **

* Böbrek hasarının bazı özelliklerinin (mikroalbüminüri / proteinüri, hematüri veya histolojik değişiklik) bulunması

** Yaşamın sürdürülebilmesi için renal replasman tedavisi (diyaliz veya transplantasyon) ihtiyacı bulunmaktadır

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (K-DIGO) grubu, bu sınıflandırmaya böbrek nakli olmuş hastalar için; T ve diyaliz tedavisi gören hastalar için evre 5 D alt gruplarının kullanımını önermiştir (2).

2.2 Kronik böbrek hastalığı epidemiyoloji ve insidansı:

Hastaların çoğu erken veya orta derecede KBH’ı olup da asemptomatik iken, KBH’nın toplum içindeki gerçek insidansı ve prevalansının doğruluğundan emin olmak güçtür.

ABD’de 3. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III 1999-2004) çalışma grubu nüfusun yaklaşık % 13.1’inde çeşitli evrelerde KBH olduğun saptamıştır (3).

Birleşik Krallık’ta Renal Replasman Tedavisi (RRT) alan SDBY hastası insidansı her yıl milyon nüfus başına 107 yeni hasta olarak bulunmuştur (4). Bu son 10 yılda iki katına çıkmıştır ve % 6-8 oranında bir artış devam etmektedir. Avrupa’daki ortalama (129 hasta/yıl) ile ABD’deki rakamların (333 hasta/yıl) altında kalmaktadır (5).

Türkiye’de 2010 yılında RRT gerektiren SDBY nokta prevalansı milyon nüfus başına 853 olarak saptanmıştır ve 2010 yılında Türkiye’de RRT insidansı 264 olarak hesaplanmıştır (bu sayıya çocuk hastalar dahildir) (6). Türkiye’deki hemodiyaliz, periton diyalizi ve transplantasyon hasta sayıları tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2: 31 Aralık 2010 itibarıyla kronik HD/PD programında izlenmekte olan veya fonksiyone greftle izlenmekte olan tüm hastaların (çocuk hastalar dahil) RRT tipine göre dağılımı.

	Merkez sayısı		n	%
	Erişkin	Çocuk		
HD	670	22	41296	79.2
PD	87	35	4393	8.4
Tx	37	19	6422	12.3
Toplam	794	76	52111	100.0

Türk Nefroloji Derneği’nin 2010 yılında tamamlanmış olan CREDİT çalışması sonuçlarına göre de Türkiye’de erişkin popülasyonda KBH prevalansı %15,7 olarak saptanmıştır(7).

Diyaliz yarı geçirgen bir zar aracılığı ile hastanın kanı ve uygun diyaliz solüsyonu arasında sıvı-solüt değişimini temel alan bir tedavi şeklidir. Sıvı solüt hareketi genellikle hastanın kanından diyalizata doğru olur. Diyaliz işleminde diffüzyon ve ultrafiltrasyon kuralları işler (8).

Diyaliz tedavisi hemodiyaliz ve periton diyalizi olarak iki şekilde yapılabilir.

2.3 Periton Diyalizi

Periton diyalizi, sıvı içeren iki bölüm arasında bir zar aracılığı ile su ve solütlerin geçişi işlemidir. Su ve solütlerin taşınması, yarı geçirgen periton zarındaki kan ve diyaliz solüsyonu arasındaki hidrostatik ve ozmotik basınç farklarıyla sağlanır. Bu nedenle periton zarının fiziksel özellikleri (yüzey alanı ve geçirgenlik) solut ve su taşınmasında en önemli belirleyicilerdir (9).

Periton diyalizi; sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) ve aletli periton diyalizi (APD) diye ikiye ayrılır. SAPD’ de günde dört veya beş kez, hastanın karın içi hacmine ve sıvıyı tahammül edebilirliğine göre 1,5- 3 litre sıvı verilir. Karın içi periton sıvısı 4- 6 saatlik bekleme süreleri sonrasında boşaltılır ve yerine yeni sıvı konulur. Bu işlem hasta tarafından elle yapılır ve yer çekimi kurallarından yararlanır. APD’ de ise sıvıyı hastanın karnına veren ve daha sonrada boşaltımını sağlayan bir cihaz kullanılır.

APD uygulamaları da kendi içinde sürekli devinimli periton diyalizi (SSPD: hastanın gündüz karnında sıvı vardır, gece cihaza bağlanmadan önce bu sıvıyı boşaltır ve otomatik periton diyalizi aletiyle sabaha kadar 5-6 değişimin yapılır. En sık uygulanan APD şeklidir) ve gece aralıklı periton diyalizi (GAPD: sadece geceleri tedavi yapılır, gündüzleri periton boş bırakılır) olarak ikiye ayrılır. Ayrıca SAPD ve APD’nin ortak kullanıldığı melez tedavi seçenekleri de vardır (10, 11).

Hem hemodiyaliz hem de periton diyalizinde amaç birikmiş atık ürünlerin ve/veya aşırı sıvının uzaklaştırılmasıdır. Diyaliz yeterliliğini de bu iki göstergenin değerlendirilmesi belirler. Uzun dönemde periton diyaliz tedavisi uygulanan hastalarda periton zarının geçirgenliği azalır ve yeterli diyaliz sağlanamaz. Bu olay kliniğe ultrafiltrasyon ve solüt geçirgenliğinde azalma olarak yansımakta ve hastanın periton diyalizinin sonlandırılmasına neden olmaktadır (12,13). Periton diyalizi yeterliliğine geriye kalan (rezidüel) böbrek

işlevleri, hastanın tedaviye uyumu, peritonun yüzey alanı ve geçirgenlik özellikleri, lenfatik emilim, kullanılan diyaliz sıvısının hacmi, yoğunluğu, bekleme süresi gibi bir takım faktörlerin de katkısı mevcuttur.

Periton diyalizi tedavisinin komplikasyonları; mekanik, solunumsal, metabolik, enfeksiyöz ve katetere bağlı yan etkiler olarak birkaç başlık altında toplanır. Özetlenecek olursa:

a) Mekanik komplikasyonlar (karın içi basınç artışına bağlı); fitik, herni oluşumu, karın duvarı ve kateter çevresi sızıntısı, genital ödem, abdominal ödem, sırt ağrısı, diyalizatın yaptığı gerilime ve asit pH'a bağlı karın ağrısı, gastrointestinal sorunlar

b) Solunumsal komplikasyonlar (hidrotoraks, solunum fonksiyonlarında değişiklik) (14, 15),

c) Metabolik komplikasyonlar; beslenme bozukluğu, glukoz emilimi, lipid bozuklukları, protein kaybı, sodyum düşüklüğü/fazlalığı, potasyum düşüklüğü/fazlalığı, kalsiyum düşüklüğü/fazlalığı, fosfor düşüklüğü/fazlalığı, düşük ve yüksek döngülü kemik hastalığı ve kardiovasküler hastalık gelişiminde artış (14, 15),

d) Enfeksiyöz komplikasyonlar; kateter giriş yeri enfeksiyonu, tünel enfeksiyonu ve peritonitler (15, 16),

e) Katetere bağlı komplikasyonlar; kateterin fibrin ile tıkanması, kateter etrafına omentum ve barsak anslarının sarılması, kateterin karın içinde yukarı dönmesi (kötü pozisyonu) ya da kıvrılması, dış keçenin çıkmasıdır (15).

2.4 Periton diyalizi ve hemodiyaliz arasında seçim:

Son dönem böbrek yetmezlikli hastaların çoğu periton diyalizi veya hemodiyaliz için uygundur. Hastaların rastgele, ikisinin karşılaştırılması gereken farklı diyaliz yöntemlerine

ayrıldığı etik olarak kabul edilebilir bir denemeyi planlamak zordur. Çok sayıda retrospektif karşılaştırmalı çalışma komorbid durumlarla düzeltme yapıldığında her hangi bir yöntemin sağkalım avantajı sağladığını göstermemektedir. USRDS veri tabanının son analizi serum albümini < 3.2 gr/dl olup periton diyalizine ayrılan hastaların, izleyen iki yılda benzeri hemodiyaliz hastalarıyla karşılaştırıldığında % 16 daha yüksek düzeltilmiş mortalite risklerini göstermiştir (p<0.0005). Serum albümini >3.2 gr/dl olanların sağkalımı iki yöntemde benzer bulunmuştur. Bu nedenle hipoalbuminemi hastalarda periton diyalizinden çok hemodiyaliz tedavisinin tercih edilmesi uygun olabilir.

2.5 Periton diyalizinin kontrendikasyonları (17)

Periton diyalizinin kontrendike olduğu, üzerinde uzlaşma olan pek az durum vardır. Bunlar Kidney Foundation Dialysis Outcomes Quality Initiative (K-DOQI) periton diyaliz klavuzunda tanımlanmıştır.

- 1) Diffüz olarak enfekte abdominal duvar
- 2) Enfeksiyon veya maligniteye bağlı diffüz intraabdominal yapışıklıklar
- 3) Diafragmanın açık olması

Ayrıca periton diyalizinin kısmen sakıncalı olduğu durumlarda söz konusudur.

1) Son zamanda abdominal ve retroperitoneal operasyon geçirilmiş ve abdominal drenlerin varlığı

2) Aort anevrizması

3) İleus

4) Solunum yetersizliği

5) Kanama diyatezi

Periton diyalizinin göreceli kontrendikasyonları şunlardır:

1) Yeni intra-abdominal yabancı cisim

2) Vücut ölçülerinin sınırlamaları ve intra-abdominal sıvı hacmini kaldıramama

3) Barsak hastalığı ve diğer enfeksiyon kaynakları

4) Ciddi Malnütrisyon ve morbit obezite

2.6 Periton Zarı

Periton; barsakları ve diğer iç organları örten visseral periton ve karın duvarını örten paryetal peritondan oluşan seröz bir zardır. Bu seröz zarın anatomik yüzey alanı vücut yüzey alanına eşittir ve yaklaşık 1,7-2 m² olarak hesaplanmıştır. Visseral periton üzerinde bulunan ve mikrovillus içeren anatomik yapı periton yüzey alanındaki bu artıştan sorumludur.

Visseral periton; peritonun %80'nini oluşturur, süperior mezenterik arterden beslenir ve venöz dönüşü portal sisteme olur. Paryetal periton lomber, interkostal ve epigastrik arterlerden kanlanır ve venöz dönüşü inferior vena kavaya olur. Toplam periton kan akımının 50- 100 ml/dk arasında olduğu tahmin edilmektedir. Periton ve periton boşluğunun ana lenfatik drenajı, diyafragmatik peritonda bulunan açık ağızlar, visseral ve paryetal peritondaki lenfatik kanallar yoluyla olmaktadır (8). Periton boşluğunun lenfatikleri periton boşluğuna

konulan diyaliz solüsyonunun bir kısmını genel dolaşıma döndürecek, dolayısı ile ultrafiltrasyonu azaltacak yönde etki edecektir. Erişkin bir insanda, ölçümde kullanılan metoda göre bulunan değer değişmekle birlikte peritoneal lenfatik absorpsiyon hızı saatte kg başına 1.02-2.40 ml arasında bulunmaktadır. Peritoneal lenfatikler diyafram altındaki stomata denilen açıklıklardan ve karın duvarından başlarlar, ductus thoracicus ve sağ ductus lymphaticus aracılığı ile vena subclaviaya dökülürler. Molekül ağırlığı 20000 daltonun üzerindeki maddelerin periton boşluğunu terk etmeleri sadece lenfatik absorpsiyon yolu ile olabilmektedir (18, 19)

Normal parietal membran yüzeyi devamlılık gösteren ince, kaygan bir sıvı tabakası oluşturan ve üzerinde mikrovilluslar bulunduran tek katlı mezotel hücreleri ile örtülüdür (8). Mezotel hücreleri periton boşluğu içindeki organların kayma hareketleri sırasındaki sürtünmesini ve yüzey gerilimini en aza indiren fosfatidilkolin gibi bazı maddeler salgırlar. Mezotel hücreleri tip 4 kollajenden oluşan bazal membran üzerine yerleşmiştir. Mezotel tabakasının altında bağ dokusu ve kapiller ağ bulunmaktadır. Membranın mezotel altı sıkı bağ dokusu elastik fibrillerle sarılmış kollajen lifleri içerir. Makrofajlar, fibroblastlar ve dendrositlerle bu sıkı dokudan geçer. Vasküler yatak, sıkı doku ve altındaki adipoz dokuda maksimumdur (19).

Periton zarı, küçük molekülü maddelere ve sıvılara karşı yarı geçirgen bir zar olarak görev alır. Bunun dışında fizyolojik koşullarda, diyafram bölgesinde belli alanlarda büyük molekülü maddelerin ve bakterilerin kana geçişlerini engellerler. Böyle büyük moleküller mezotel hücreleri arasında bulunan bazı açıklıklardan emilebilirler. Mezotel hücreleri arasındaki açıklıklar elastiktir ve çapı 10 μ ' a kadar olan moleküllerin geçişine izin verirler (19, 20).

Periton diyalizinde sıvı ve solut taşınmasında periton zarının etkin yüzey alanı önemlidir. Etkin peritoneal yüzey alanı, solut ve sıvı taşınmasına katkıda bulunan, diyaliz solüsyonu ile temas eden ve kapillerler tarafından perfüze olan periton yüzey alanı olarak tanımlanır. Periton zarının geçirgenliği, kapiller duvar, intersitisyum ve mezotelyum tarafından yaratılan dirençle belirlenir (19, 20, 21).

2.7 Ultrafiltrasyon Yetersizliği

Ultrafiltrasyon (UF) yetersizliğinin tanısı genellikle klinik temele dayanır. Bir günde yüksek yoğunluklu glukoz solüsyonlarından 3 ya da daha fazla sayıda kullanılmasına rağmen sıvı yüklenmesi bulguları varsa bu tanı akla gelmelidir. Ancak bu tanım sıvı yüklenmesinin diğer nedenleri (aşırı sıvı alımı, rezidüel renal fonksiyon kaybı vb.) sebebiyle yanıltıcı olabileceğinden, uluslararası olarak, glukoz temelli %4.25'lik ya da 3.86'lık solüsyonlardan iki litre karın içine konulduğu ve dört saat beklendiği zaman 2400ml'den daha az boşaltım hacmi elde edilmesi UF yetersizliğinin tanımı olarak kabul edilmiştir. Sıvı dengesini korumak için günde ikiden fazla hipertonic diyalizat kullanılması gereken olgularda UF yetersizliğinden şüphelenilmelidir. UF yetersizliği PD hastalarının %10-40'ında görülür (22). Çoğu zaman bu problem yüksek osmolaritedeki periton sıvılarının kullanımıyla düzeltilmeye çalışılır. UF yetersizliği PD hastalarının periton diyalizi sonlandırma nedenlerinin %10-18'ini oluşturur (22,23). UF'de azalma peritoneal membranda meydana gelen değişikliklere bağlı olarak meydana gelir. UF yetersizliği, kapillerler arası UF hızı ile lenfatik emilim hızı arasındaki denge değiştiği zaman ortaya çıkar. Klinik olarak bu durum, sıvı yüklenmesi bulgularını ortadan kaldırmak için daha hipertonic değişimlere gereksinim olması ile tanımlanır (24). Periton diyalizi hastalarında başlıca dört tip UF yetersizliği görülür. Bunlar;

a) daha fazla glukoz Emilimi ve osmolar gradientin daha hızlı yok olmasına yol açan yüzey alanı geçirgenlik artışına (tip I UF yetersizliği), b) su ve solut taşınmasını önemli derecede kısıtlayan etkin peritoneal yüzey alanı geçirgenliğinde ciddi azalmaya (tip II UF yetersizliği), c) lenfatik emilim artışına (tip III UF yetersizliği), ve d) peritoneal membran su kanallarının (aquaporinler) kaybı. Peritoneal eşitleme testi (PET) hem su hem de solüt taşınmasının önemli bir değerlendirme yoludur. UF yetersizliğinin belirlenmesine yardımcı olur (24, 25).

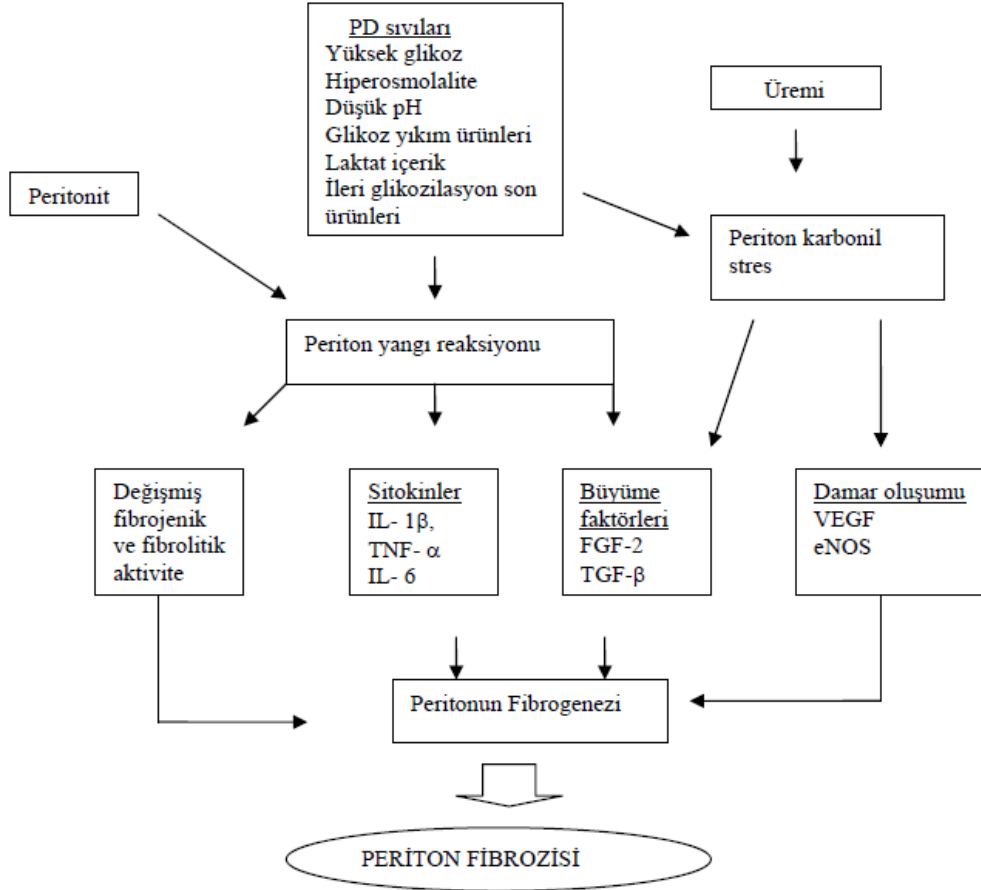
2.8 Periton Fibrozisi:

Fibrozis doku hasarlanmasına verilen olağan bir yanıttır ve yara iyileşmesi, glomerülo nefrit, siroz, akciğer fibrozisi gibi farklı klinik durumlarda görülür.

Yara iyileşmesi dışındaki durumlarda görülen fibroziste, fibröz doku normal dokunun yerini almakta ve organ işlev bozuklukları gelişmektedir. Periton fibrozisi düzenli periton diyalizi yapan hastaların periton biyopsilerinde yaygın bir bulgudur. Büyük kohort çalışmalarında periton diyalizi yapan hastalarda periton membran değişiklikleri periton biyopsileri ile gösterilmiştir (26). Periton membranında oluşan değişiklikler özellikle mezotel altında görülen inflamasyon, fibrozis ve damarlanmaya neden olmakta ve sonuçta ultrafiltrasyon yetmezliği gelişmektedir (27). Üremik hastaların periton zarı kalınlığının normal bireylere göre artmış olduğu bilinmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda periton zarının PD tedavisi uygulanan hastalarda üremik ancak diyalizsiz izlenen hastalara göre periton zarı kalınlığının belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (28, 29). Yapılan çalışmalarda periton diyaliz süresi ile pariyetal peritondaki submezotelyal bölge yoğunluğunda artış gözlenmiştir. Üremi tek başına submezotelyal kalınlaşma ile ilişkili iken özellikle sekiz yıldan fazla süredir periton diyalizi yapan hastalarda bu kalınlaşma çok daha belirgin olup, periton membranının yetmezliğinden dolayı kateterin çıkartılmasına neden olmaktadır (30). Periton

diyalizi ile ilişkili olan periton fibrozisi periton parlaklık kaybından, sklerozan enkapsüle peritonite kadar olan çeşitli görünümelerde kendini gösterir. Sklerozan enkapsüle peritonit; periton diyalizinin sonlandırılması, kilo kaybı, ultrafiltrasyon yetmezliği, barsak tıkanması hatta ölüme kadar giden durumlara yol açabilir (31). Periton fibrozisi, periton diyalizi yapan hastalarda çeşitli hasarlanmalara karşı yanıt olarak gelişir. Bu hasarlanmalar arasında biyouyumsuz diyaliz solüsyonları, peritonitler, üremi ve kronik inflamasyon sayılabilir (32). Geleneksel solüsyonların kapsadığı yüksek miktarda glukoz, çevre dokularda proteinlerin yapılarına girmekte ve tıpkı diyabette olduğu gibi damar duvarı ve doku değişiklikleri yaratmaktadır. Bunun dışında ısı sterilizasyonu sırasında açığa çıkan toksik glukoz yıkım ürünleri, düşük pH, yüksek osmolalite ve glukozun çevre dokulardaki protein ve lipidlerle birleşerek oluşturduğu ileri glikolizasyon son ürünleri (AGE-advanced glycolysation end products) gibi zararlı maddeler peritoneal doku hasarını artırmaktadır. Ayrıca üre yüksekliği kendi başına peritoneal doku hasarına sebep olduğu gibi, ileri glikozilasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumunu hızlandırarak periton zarının hasarlanmasına neden olur (33). Peritonit atakları ve periton diyaliz solüsyonları ile peritondaki inflamasyon sürekli uyarılır. Bu bileşenlerin birlikteliği ile periton mezotel hücreleri, diğer periton hücre toplulukları (periton makrofaj, fibroblast, monosit ve nötrofiller) ve onlardan salınan çeşitli sitokinler aracılığıyla periton fibrozisi gelişir (Şekil-1). Periton fibrozisi gelişiminde ana mekanizma peritonun mezotelyal hücrelerinin ve fibroblastlarının aşırı üretimi sonucu hücre dışı matriks birikimidir (32, 34).

Periton fibrozisi gelişiminde mezotel hücrelerinin fibroblastlara dönüşümü ve çoğalmaları gösterilmiştir (35). Fibrozisin başlaması ve devam etmesinde kollajenazlar ve onların durdurucuları rol almaktadır (32).



Şekil 1. Periton fibrozisinin şematik olarak gösterilmesi

(IL-1β: İnterlökin-1β, TNF-α: Tümör nekrozis faktör-α, IL-6: İnterlökin -6, FGF2: Fibroblast büyüme faktörü-2, TGF-β: Tümör büyüme faktörü-β, VEGF: Damar endotel büyüme faktörü eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz)

2.9 Transforming Growth Faktör Beta 1 ve Fibrozis

Transforming growth faktör (TGF) β süperaillesinin üyeleri hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunda, apoptozis, embriyogenez dönemindeki organogenez ile immünregülasyonunda rol almaktadırlar (36). TGF-β1 bir profibrotik sitokindir ve aşırı ekspresyonu α smooth-muscle antibody (α-SMA), vasküler endotelial growth faktör (VEGF)

artışı ve fibrozis ile sonuçlanır (37, 38). TGF- β 1 sentezlendikten sonra latency-associated peptide (LAP) ile etkileşime girer, latent TGF- β 1 formunda bulunur. Bu aktif olmayan TGF- β 1 kompleksi doku hasralanması meydana geldiğinde tromboplastin ve integrinler tarafından aktive edilir ve hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır. Aktive olan TGF- β 1 tip I reseptörü hücre sitoplazmasında bulunan smad (smad2/3) proteinlerini fosforile ederek bağlı bulundukları smad anchor receptor activation (SARA) kompleksinden ayrılmasına sebep olur. Serbest hale geçen smad2/3 sitoplazmada smad 4 ile birleşerek hücre çekirdeğine taşınır. Hücre çekirdeğinde smad kompleksi kollejen üretiminin aktivasyonu ve fibrozis ile sonuçlanan transkripsiyon artışına neden olur (39).

TGF- β 1 peritoneal fibroziste önemli bir rol oynamaktadır. Yüksek glukoz konsantrasyonlu solüsyonlar, periton hücrelerinde protein kinaz C aracılığıyla TGF- β 1 sentezine neden olmaktadır (40). TGF- β 1 vücutta tüm doku ve organlarda epitelial hücrelerin mezankimal hücrelere değişimini indükler (41). TGF- β 1'in sürekli üretimi intertisyumda α smooth-muscle antibody-pozitif miyofibroblastların artışı ile sonuçlanır (42). Glukoz yıkım ürünleri de mezoteliyal hücrelerde proliferasyona, kollejen sentezinde artışa ve TGF- β 1 ekspresyonuna katkıda bulunur (43).

2.10 Karvedilol

Karvedilol , β 1 ve β 2 adrenoreseptör ile α -adrenoreseptör blokajı yapan bir moleküldür. Klinikte β ve α -adrenoreseptör blokajının kardiyoprotektif etkisi nedeniyle aterosklerotik kalp hastalarında mortalite ve morbiditede azalma sağladığından dolayı yaygın olarak kullanılır. Daha önce yapılan çalışmalarda karvedilolün antioksidan etkinliği de gösterilmiştir (44). Fibrotik süreci engellediğine dair deneysel çalışmalar da mevcuttur. Myokardiyal fibrozisi yavaşlattığı (45) , asetaminofene bağlı oksidatif karaciğer toksisitesini

azalttığı (46), anjiotensin II' ye bağı gelişen kalp, karaciğer ve böbrek hasarlarına karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (47). Hipertansif rat modelinde karvedilolün antihipertansif dozlardan daha düşük dozlarda bile renal fibrozisi engellediği ve bunun, antioksidan etki ve TGF β düzeylerinde sağlamış olduğu düşüş aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (48).

2.11 N-Asetil-L-Sistein (NAC)

NAC hücre içi glutatyonun (GSH) sentetik bir prekürsörü olan non-toksik aminotiyol bileşigidir. Klinik uygulamalarda mukolitik ajan olarak kullanılan NAC'ın antioksidan etkinliğinin de olduğu daha önce yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir. Asetoaminofen zehirlenmesinde tedavi amaçlı (49), kontrast nefropatisi gelişimini engellemek amacıyla profilaktik olarak kullanımı mevcuttur (50). Farmakolojik etkileri arasında hücre içi GSH'ın düzeyini dolgunluk sınırında tutmak, toksik oksijen radikallerinin uzaklaştırılması, tümör nekroz faktör- α üretiminin baskılanması, catepsin-B aracılı trombosit faktör tip-b reseptör uyarılması sayılabilir (51, 52). İnvitro karaciğer hücre kültürleriyle yapılan deneysel araştırmada NAC'ın TGF β 1 aracılığı ile oluşan ve fibrozise, sinyal yolağındaki smad2 ve smad3 proteinlerinin fosforilasyonunu inhibe ederek engel olduğu gösterilmiştir (53). Yine aynı çalışmada NAC'ın ileri glikolizasyon son ürünlerine karşı oluşan reseptörleri üzerinde

baskılayıcı etkisi gösterilmiştir. Dimetil-nitrozamin ile hepatik fibrozis oluşturulmuş ratlarda, fibrotik süreç üzerindeki inhibitör etkinin daha çok L-sisteinden kaynaklandığı gösterilmiştir (54).

2.12 Parikalsitol

Parikalsitol, 19-nor-1,25-hidroksi-vitamin D2 molekül yapısında olan sentetik bir D vitamini analogudur. Parikalsitol 3. jenerasyon bir ilaç olup dokuya bağlı olarak seçici vitamin D reseptör (VDR) aktivasyonu yapmaktadır (55). Deneysel çalışmalarda parathormon (PTH) sekresyonunu baskımlarken kalsiyum ve fosfor düzeyleri üzerine minimal değışiklikler yaptığı gösterilmiştir (56, 57, 58). Bu özelliğinden dolayı HD/PD hastalarında Ca-P metabolizma bozukluklarında son yıllarda daha sık kullanım alanı bulmaktadır. Parikalsitolün Ca-P metabolizması dışında dokularda farklı otokrin ve parakrin etkileri olduğı deneysel modellerde gösterilmiştir. Hayvan deney modellerinde parikalsitol tedavisinin vasküler düz kas hücrelerinde kalsifikasyonu önleyici etkisi gösterilmiştir. Parikalsitolün vasküler kalsifikasyondan koruyucu etkisi, serum kalsiyum ve fosfor düzeyinden bağımsız gibi görünmektedir (59, 60). Adriamisin ile oluşturulmuş deneysel nefropatide podosit hasarı, proteinüri ve renal fibrozis gelişimi üzerindeki önleyici etkisi gösterilmiştir (61). Parikalsitol, proinflamatuvar sitokin salınım inhibisyonu, monosit/makrofaj infiltrasyonunun inhibisyonu, myofibroblast aktivasyonunu engellemesi, TGF- β 1, fibronectin, tip I ve III kollojen

ekspresyonunu baskılanması gibi etkileriyle renal hasar gelişimi üzerinde olumlu etkiler sağlamaktadır. Obstüriktif üropati deneysel modelinde parikalsitolün renal intertisiyel fibrozisi azalttığı gösterilmiştir (62). Parikalsitolün renal TGF- β 1 ve TGF- β 1'in tip 1 reseptörünün ekspresyonunu baskıladığı, böylelikle E-cadherin süpresyonu ve α -SMA ile fibronektinin tübüler hücrelerde üretimini baskıladığı gösterilmiştir (61). Aynı deneysel çalışmada epitelial hücrelerin mezankimal transformasyonunu da inhibe ettiği saptanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hayvanlar

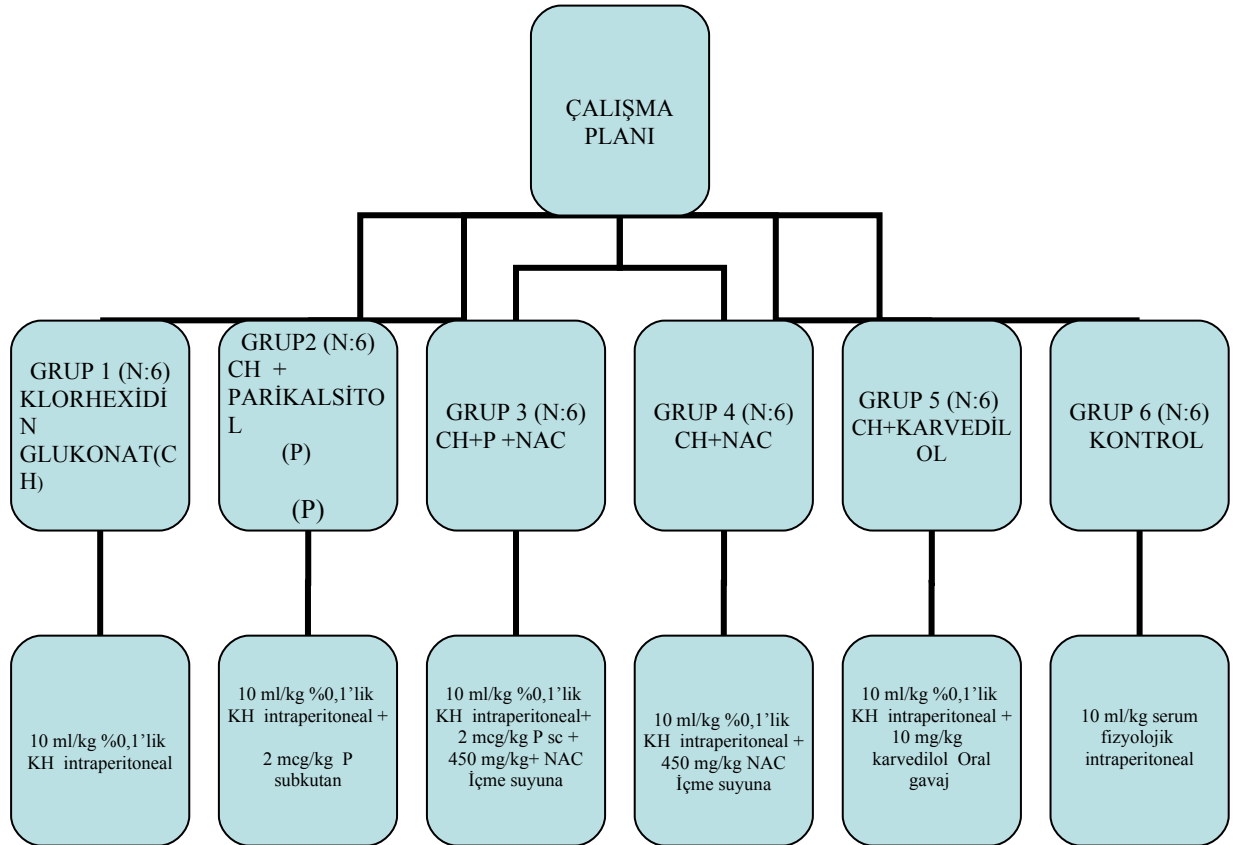
Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde yetiştirilen 36 adet Wistar-albino dişi rat (6 haftalık, ortalama 240 ± 13 gr) çalışmaya alındı. Ratlar çalışma süresince polikarbonat kafeslerde barındırıldı. Oda ısısı 22-25 derece ve 12 saat aydınlık / 12 saat karanlık siklusları içeren ortam sağlandı. Ratlara su ve besin kısıtlaması uygulanmadı. Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan çalışma için onay alındı. (Proje numarası:12081 Tarih: 25/09/2012 Onay kodu:141-18973)

3.2 Çalışma planı

Çalışmaya alınan ratlar çalışma öncesi tartıldı ve her grupta altı rat olacak şekilde altı gruba ayrıldı. Çalışma süresi 21 gün olarak belirlendi. Periton fibrozisi oluşturmak için Ishii ve arkadaşlarının modeli; 10 ml/kg/gün %0,1'lik klorhexidin glukonat (CH) (Drogsan İlaçları AŞ. Balgat, Ankara) + %15 etanol + serum fizyolojik (SF) karışımı aseptik olarak hazırlanıp kullanıldı (62). Parikalsitol grubuna CH intraperitoneal enjeksiyonla beraber 0,2 mcg/kg/gün parikalsitol (P) (Zemplar® 2 mcg amp Abbott) 21 gün boyunca ratın ense bölgesine subkutan olarak enjekte edildi. N-asetil sistein grubuna CH intraperitoneal enjeksiyonla beraber 450 mg/kg/gün NAC içme suyuna katılarak 21 gün boyunca verildi ve günlük olarak ratların suyu yenilendi. Karvedilol (K) grubuna, CH intraperitoneal olarak uygulandı ve beraberinde oral gavaj ile 10 mg/kg/gün karvedilol 21 gün boyunca verildi. Çalışma grupları şekil 2'de gösterilmiştir. Karın içi enjeksiyonların tümünde 21 G iğne kullanıldı. Enjeksiyonlar günlük olarak peritoneal boşluğun alt kısımlarına yapılırken

patolojik incelemelerde karın sol üst kadrındaki pariyetal periton kullanıldı. Böylece tekrarlayan enjeksiyonların peritona oluşturduğu direkt hasarın etkileri ortadan kaldırıldı. Ratlar çalışmanın 21. gününde ketamin ve xylazine anestezisi altında, kalpten kan alımı suretiyle (en az 3 ml) sakrifiye edildi. Bunu takiben, orta hattın insizyonu ile pariyetal peritonun üst kısmı izole edildi ve %10 formalin solüsyonunda saklanarak histopatolojik değerlendirmeye alındı. Alınan kan örneklerinden TGF- β 1 düzeyi çalışılmak için serum ayrıştırılarak -20 C°de saklandı. TGF- β 1 rat eliza kiti olarak eBioscience marka ve BMS632/2 katalog numaralı kit kullanıldı. TGF- β 1 düzeyi 'ng/ml' olarak ifade edildi.

Şekil 2: Çalışma planının şematik gösterimi



3.3 Peritonun Histopatolojik İncelenmesi

Ratların periton zarından alınan örnekler %10'luk tamponlu formol ile 48 saat tespit edildi. Daha sonra her bir periton örneğinden üç farklı odaktan yaklaşık 2 mm genişliğinde

makroskopik parça örnekleme yapıldı; bu parçalar kasetlenerek rutin doku takibine sokuldu. Elde edilen dokular parafine gömülerek 4 mikrometre kalınlığında kesitler Hematoksilen ve Eozin ve ikinci bir kesit de trikrom boyası ile boyandı.

Işık mikroskopik değerlendirme tek bir patoloji uzmanı tarafından ve kör olarak yapıldı. Değerlendirilen parametreler ve ilgili semi-kantitatif skorlar için ölçütler şunlardı (63).

İnflamasyon skoru: İnflamasyonun olmadığı deneklere 0, hafif düzeyde olanlara 1, orta şiddette olanlara 2 ve yoğun inflamasyon olanlara 3 skoru verildi.

Fibrozis skoru: Trikrom boyalı kesitlerde fibrotik kollajenize bağ doku birikim olmayan örneklerle 0, hafif düzeyde olanlara 1, orta şiddette olanlara 2 ve yoğun olanlara 3 skoru verildi.

Damarlanma skoru: Damarlanma artışının olmadığı deneklere 0, hafif düzeyde olanlara 1, orta şiddette olanlara 2 ve yoğun damarlanma artışı olanlara 3 skoru verildi.

Periton kalınlığı, Morfometrik analiz Olympus BX51 mikroskopu, Olympus DP72 kamera sistemi ve DP2-BSW yazılımı kullanılarak yapıldı (Copyright Olympus Corporation). Her örnekte mezotel tabakasının en üst sınırı ile diyafragmatik çizgili kas dokusu arasındaki mesafe ölçüldü ve mikrometre biriminde kaydedildi.

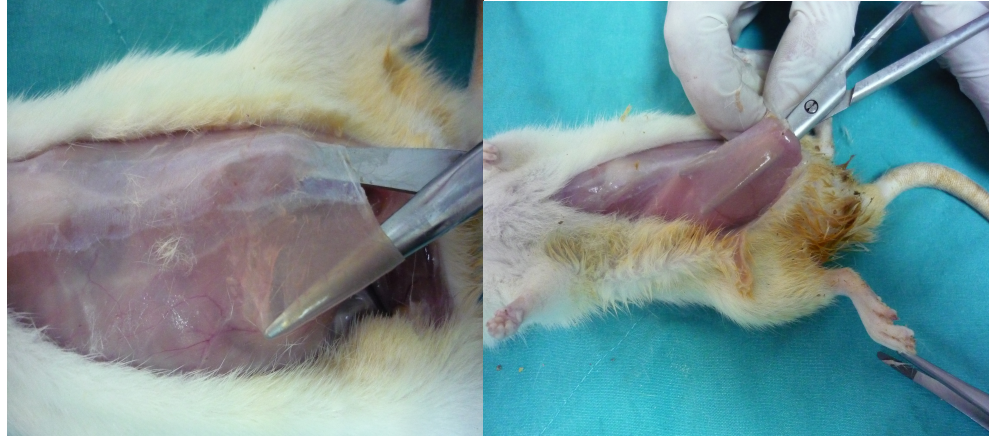
3.4 İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel incelemeler SPSS for Windows, Version 18.0 (Chicago, USA) programı kullanılarak yapıldı. Sayısal veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilirken, $p < 0.05$ anlamlılık sınırı kabul edildi. Kolmogorov-Smirnov testi ile verilerin tüm havuzda normal dağılıma uyup uymadığı test edilip, gruplar arası farkın anlamlılığı test edilirken normal dağılan veriler için parametrik testler kullanıldı. Gruplar arası normal dağılan verilerin

karşılaştırılması için analysis of variance (ANOVA) testi kullanılırken, post hoc değerlendirme için varyansların homojen dağıldığı durumlarda Tukey's testi, diğer durumlarda ise Tamhane's T2 testi uygulandı. Gruplar arası normal dağılmayan verilerin karşılaştırılması için ise, Kruskal Wallis testi uygulandı ve gruplar arası ikili değerlendirmeler için Mann Whitney-U testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan ratların bazal vücut ağırlıkları gruplar arasında benzer olarak saptandı ve grup içindeki dağılımı homojendi. Çalışmanın sonunda kontrol grubu dışındaki ratlarda vücut ağırlığında azalma saptandı ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Çalışma boyunca rat kaybı yaşanmadı. Çalışmanın 21. gününde ratlar anestezi uygulanarak kurban edildi. CH+P+NAC grubundaki dördüncü ratta intraabdominal kanama olduğu tespit edildi ve enjeksiyona sekonder olduğu düşünüldü. Kontrol grubu dışındaki tüm ratların pariyetal periton zarlarında makroskopik olarak kalınlaşma ve mat görünüm saptandı. KH ve SF grubunda pariyetal peritonun makroskopik görünümü Resim 1'de gösterildi.



(A)

(B)

Resim 1: Ratların pariyetal peritonunun makroskopik görünümü. (A) Kontrol grubu (B) CH grubu

Çalışmanın 21. gününde sakrifikasyon sırasında alınan serum örneklerinde TGF- β 1 düzeyleri çalışıldı. Periton doku örnekleri histopatolojik olarak incelendi ve periton kalınlığı, fibrozis skoru, inflamasyon skoru, vaskülarizasyon skoru semi-kantitatif olarak hesaplandı. Ortalama TGF- β 1 düzeyi $54,60 \pm 85,64$ ng/ml olarak saptandı. Ortalama periton kalınlığı $158,58 \pm 79,92$ μ m olarak ölçüldü. Ortalama fibrozis skoru $1,22 \pm 0,79$, inflamasyon skoru $1,25 \pm 0,79$, vaskülarizasyon skoru $1,42 \pm 0,80$ saptandı. Tüm grupların TGF- β 1 düzeyi, periton kalınlığı ölçüm sonuçları ve fibrozis, vaskülarizasyon, inflamasyon skorları tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3: Grupların TGF- β 1, periton kalınlığı, fibrozis, inflamasyon ve vaskülarizasyon skorlarının ortalama değerleri

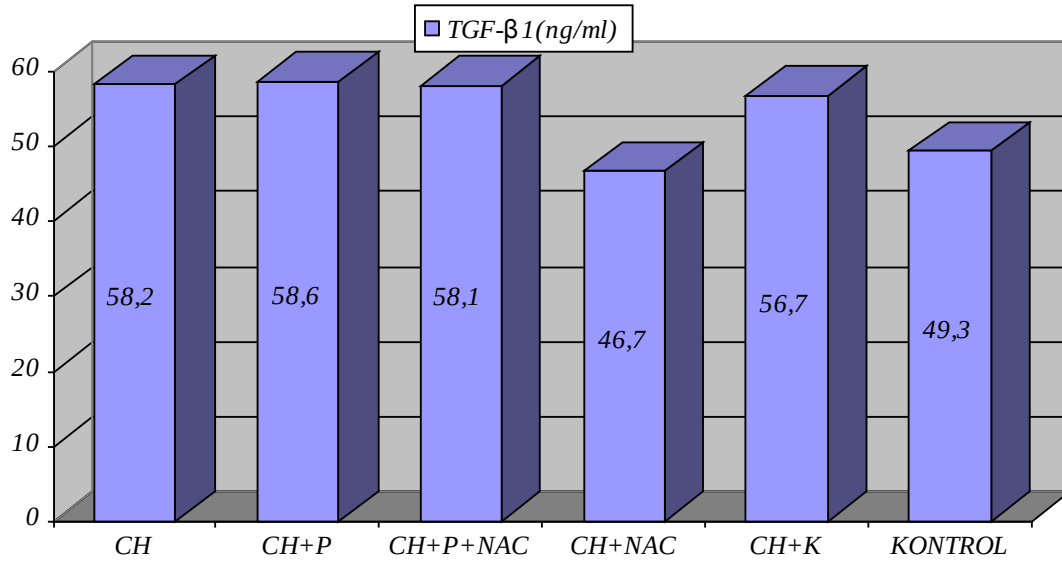
	Kontrol	CH	CH+P	CH+P+NA	CH+NAC	CH+K
C						
TGF-β 1 (ng/ml)	49,06 $\pm$ 2,35	58,29 $\pm$ 4,4	58,65 $\pm$ 12,4	58,12 $\pm$ 10,48	46,76 $\pm$ 4,79	56,73 $\pm$ 5,86
Periton kalınlığı (μm)	22,3 $\pm$ 2,58	245 $\pm$ 27,35	191,3 $\pm$ 60,4	176,5 $\pm$ 65,2	169,8 $\pm$ 30,82	146,5 $\pm$ 43,05
Periton fibrozis	0	2,17 $\pm$ 0,75	1,33 $\pm$ 0,51	1,33 $\pm$ 0,51	1,33 $\pm$ 0,51	1,17 $\pm$ 0,40

skoru						
Periton						
inflamasyon	0	2,00±0,63	1,83±0,75	1,33±0,51	0,83±0,40	1,50±0,54
skoru						
Periton						
vaskülarizasyon	0	2,00±0,00	2,00±0,632	1,67±0,51	1,33±0,51	1,50±0,54
skoru						

CH: Klorhexidin glukonat grubu, CH+P: Klorhexidin glukonat+ parikalsitol grubu CH+P+NAC: Klorhexidin glukonat+ parikalsitol+ N-asetil sistein grubu CH+NAC: Klorhexidin glukonat+ N-asetil sistein grubu CH+K: CH+Karvedilol grubu. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verildi

Kontrol grubu ve CH+ NAC gruplarında ortalama TGF-β 1 düzeyleri sırasıyla 49,06±2,35 ve 46,76±4,79 olarak ölçüldü ve CH gurubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak düşük saptadı (p<0,05). Diğer gruplarda TGF-β 1 düzeyleri CH grubundaki ölçümlerle benzer olarak saptandı (p>0,05).

Şekil 3: Serum TGF-β 1düzeyleri açısından grupların karşılaştırılması (p>0.05)



Morfometrik analiz mikroskopisi ile yapılan periton kalınlığı ölçümlerinde kontrol grubu ile CH verilen diğer gruplar arasında belirgin ölçüm farkı izlendi. CH'nin

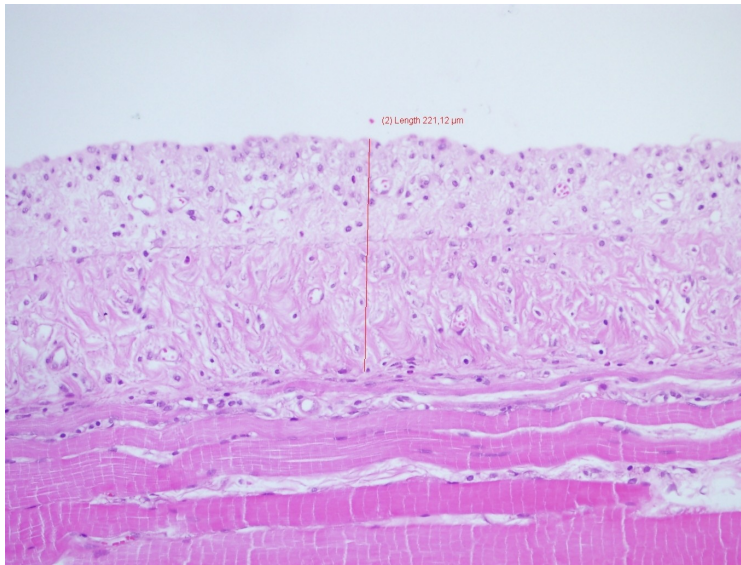
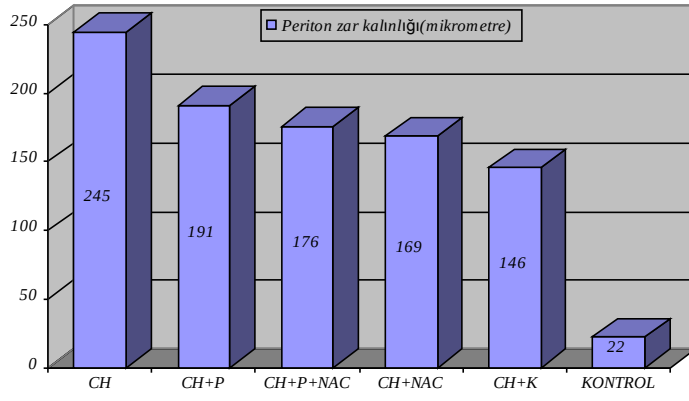
intraperitoneal uygulandığı tüm gruplarda periton kalınlığı kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak artmış olarak ölçüldü ($p<0,01$). Tek başına CH'nin intraperitoneal uygulandığı grupta periton kalınlığı diğer tüm gruplardan daha yüksek saptandı. Periton kalınlıkları arasındaki fark sadece CH+NAC ve CH+K verilen grupta CH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı ($p<0,01$). CH+P ve CH+P+NAC gruplarında periton kalınlığı CH grubuna göre azalmış olarak saptansa da bu istatistiksel analizde anlamlı düzeye ulaşmamıştır ($p>0,05$). TGF- β 1 düzeyi ve periton kalınlıklarının gruplar arası karşılaştırmaları tablo 4'de ve şekil 4'de özetlenmiştir. CH grubunda bir ratın periton kalınlığının mikroskop ile ölçümü resim 2'de gösterilmiştir.

Tablo 4 : Gruplar arasında TGF ve periton kalınlığının karşılaştırılması

	Kontrol	CH	CH+P	CH+P+NAC	CH+NAC	CH+K	P
TGF-β 1 (ng/ml)	49,35 $\pm$ 2,36 ^a	58,29 $\pm$ 4,4	58,6 $\pm$ 12,4	58,12 $\pm$ 10,48	46,76 $\pm$ 4,79 ^a	56,73 $\pm$ 5,86	<0,05
Periton kalınlığı (μm)	22,3 $\pm$ 2,5 ^a	245 $\pm$ 27,3 ^{ab}	191,3 $\pm$ 60,4 ^a	176,5 $\pm$ 65,2 ^a	169,8 $\pm$ 30,8 ^{ab}	146,5 $\pm$ 43,0 ^{a b}	<0,01

CH: Klorhexidin glukonat grubu, CH+P: Klorhexidin glukonat+ parikalsitol grubu CH+P+NAC: Klorhexidin glukonat+ parikalsitol+ N-asetil sistein grubu CH+NAC: Klorhexidin glukonat+ N-asetil sistein grubu CH+K: CH+Karvedilol grubu. TGF- β 1 ve periton kalınlığı deperleri için one-way ANOVA testi, post hoc değerlendirme için Tamhane testi uygulandı. Aynı harfle işaretlenen gruplar arasındaki fark anlamlıdır (a: $p<0,05$, b: $p<0,019$). Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi

Şekil 4: Periton zar kalınlığı açısından grupların karşılaştırılması ($p<0.05$)



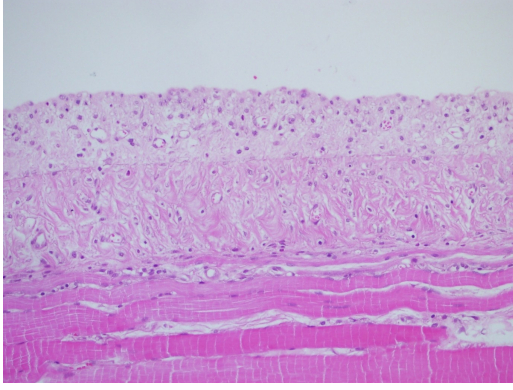
Resim 2: Morfometrik olarak periton tabakasının kalınlığını gösteren ölçüm resmin ortasında görülüyor (Hematoksilen-Eozin, mikroskopik büyütme x 200).

Histopatolojik inceleme ile belirlenen fibrozis, inflamasyon ve vaskülarizasyon skorları ve gruplar arası değerlendirmeler tablo 5’de özetlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm gruplarda fibrozis, inflamasyon ve vaskülarizasyon skorlar istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olarak bulundu. CH grubu ile karşılaştırıldığında, CH+K grubunda fibrozis skoru istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük saptandı. CH+P, CH+P+NAC ve CH+NAC gruplarında CH grubuna kıyasla fibrozis skorlarında düşüklük saptanmasına rağmen bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır.

İnflamasyon skorları açısından bakıldığında CH+NAC grubunda CH grubuna göre istatistiksel düzeyde anlamlı düşüklük olduğu gözlemlendi. CH+K ve CH+P+NAC gruplarında CH grubuna kıyasla inflamasyon skorları düşük olmasına rağmen istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0,057$). Ayrıca CH+NAC grubunda inflamasyon skorları, CH+K ve CH+P gruplarına göre de düşük saptanmıştır ($p<0,05$). CH grubundaki bir ratın peritondaki inflamasyon ve artmış periton kalınlığı resim 3 ve resim 4’de gösterilmiştir.

Vaskülarizasyon skorlarının değerlendirilmesinde sadece CH+NAC grubunun skorları CH grubuna göre anlamlı düzeyde düşüş izlenmiştir ($p<0,05$).

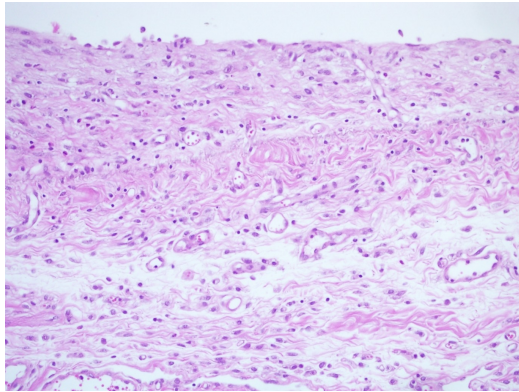
CH+K grubunda da CH grubuna göre vaskülarizasyon skorları daha düşük olmasına rağmen istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p=0,056$). CH grubundan bir ratın periton zarındaki vaskülarizasyon artışı resim 5’de gösterilmiştir.

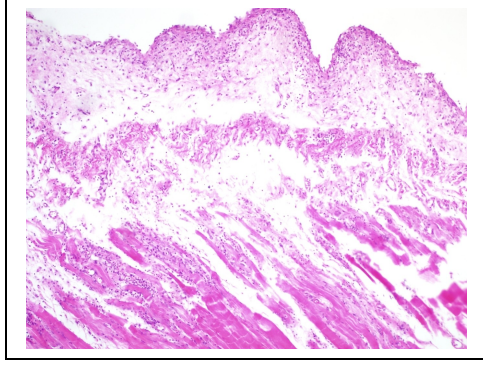


Resim 3: (solda) CH grubudan bir ratta belirgin inflamasyon, kalınlaşmış periton tabakası izleniyor .

(Hematoksilen-Eozin, mikroskopik büyütme: 200).

Resim 4: (sağda) CH grubu bir rat peritonunda belirgin damarlanma artışı görülüyor (Hematoksilen-Eozin, mikroskopik büyütme: 200).





Resim 5 : CH grubu bir ratta periton tabakasının ötesine, diyafragmatik çizgili kasa kadar uzanan yoğun ve aktif kronik inflamasyon görülüyor. (Hematoksilen-Eozin,

Tablo 5: Gruplar arasında fibrozis, inflamasyon ve vaskülarizasyon skorlarının karşılaştırılması

	Periton fibrozis skoru	Periton inflamasyon skoru	Periton vaskülarizasyon skoru
Kontrol	0 ^a	0 ^a	0 ^a
CH	2,17±0,75 ^{ab}	2,00±0,63 ^{ab}	2,00±0,00 ^{ab}
CH+P	1,33±0,51 ^a	1,83±0,75 ^{ac}	2,00±0,63 ^a
CH+P+NAC	1,33±0,51 ^a	1,33±0,51 ^a	1,67±0,51 ^a
CH+NAC	1,33±0,51 ^a	0,83±0,40 ^{abc}	1,33±0,51 ^{ab}
CH+K	1,17±0,40 ^{ab}	1,50±0,54 ^{ac}	1,50±0,54 ^a
P	<0.01	<0.01	<0.01

CH: Klorhexidin glukonat grubu, CH+P: Klorhexidin glukonat+ parikalsitol grubu CH+P+NAC: Klorhexidin glukonat+ parikalsitol+ N-asetil sistein grubu CH+NAC: Klorhexidin glukonat+ N-asetil sistein grubu CH+K: CH+Karvedilol grubu. Histopatolojik skorlar normal dağılmadığından, Kruskal Wallis testi ve gruplar arası ikili değerlendirmeler için Mann Whitney-U testi kullanıldı. Aynı harfle işaretlenen gruplar arasındaki fark anlamlıdır (a: $p < 0,01$ b, c $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi). Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

Çalışmaya alınan ratların fibrozis skoruna göre hayvan sayılarının dağılımı tablo 6’da gösterilmiştir.

Tablo 6: Grupların fibrozis,inflamasyon ve vaskülarizasyon skorları

	FİBROZİS SKORU				İNFLAMASYON				VASKÜLARİZASYON			
	SKORU				SKORU				SKORU			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
	-	(+)	(++)	(+++)	-	(+)	(++)	(+++)	-	(+)	(++)	(+++)
CH (N:6)	0	1	3	2	0	1	4	1	0	0	6	0
CH+P(N:6)	0	4	2	0	0	2	3	1	0	1	4	1
CH+P+NAC(N:6)	0	4	2	0	0	4	2	0	0	2	4	0
CH+NAC(N:6)	0	4	2	0	1	5	0	0	0	4	2	0
CH+K(N:6)	0	5	1	0	0	5	1	0	0	3	3	0
KONTROL(N:6)	6	0	0	0	6	0	0	0	6	0	0	0

CH: Klorhexidin glukonat grubu, CH+P: Klorhexidin glukonat+ parikalsitol grubu CH+P+NAC: Klorhexidin glukonat+ parikalsitol+ N-asetil sistein grubu CH+NAC: Klorhexidin glukonat+ N-asetil sistein grubu CH+K: CH+Karvedilol grubu

5.TARTIŞMA

Periton diyalizi yapan SDBY hastalarının tedavilerinin sonlandırılmasında en önemli nedenlerden biri diyaliz ve ultrafiltrasyon yetersizliğidir. Diyaliz ve ultrafiltrasyondaki yetersizliğin temel nedeni, periton zarında sürekli devam eden inflamasyonun neden olduğu morfolojik değişikliklerdir (5). Periton diyalizi hastalarında görülen sürekli inflamasyonun sebepleri arasında, yüksek glukoz konsantrasyonlu, yüksek osmolaliteli ve düşük pH'lı biyouyumsuz solüsyonların kullanımı yanında, tekrarlayan peritonit atakları, AGE ürünleri, üremik toksinler ve non-spesifik inflamatuvar faktörlerden IL-6 ve TGF- β sayılabilir (64). İnflamasyona bağlı ortaya çıkan morfolojik değişikliklerden en belirgin olanı periton fibrozisidir ve düzenli periton diyalizi yapan hastaların periton biyopsilerinde saptanan yaygın bir bulgudur (4). Periton fibrozisi gelişiminde ana patogenetik mekanizma peritonun mezotelyal hücrelerinin ve fibroblastlarının aşırı üretimi sonucu hücre dışı matriksin artışıdır (32, 34).

Periton diyaliz hastalarında, periton diyaliz süresi ile ilişkili olarak ilerleyen dönemlerde ortaya çıkan periton fibrozisinin önlenmesi veya ortaya çıkmış olan fibrozisin geriletebilmesi için birçok deneysel çalışma yapılmıştır. Fibrozis gelişiminin fizyopatolojisinin karmaşıklığı ve etkenlerin çokluğu göz önüne alınarak farklı grup ilaç ve moleküller bu deneysel araştırmalarda kullanılmıştır. Anjiotensin konverting enzim inhibitörleri (lisinopril, enalapril) ve anjiotensin reseptör blokörlerinin (valsartan) TGF- β 1 ile birlikte VEGF inhibisyonu yaparak ve AGE oluşumunu azaltarak periton fibrozisini yavaşlattığı gösterilmiştir (65,66). Aminoguanidinin periton mikrosirkülasyonu ve remodelingi üzerindeki olumlu etkileri yanında, antioksidan etkinliği ile de fibrozisi

engellediği hayvan modellerinde gösterilmiştir (67, 68). Bir vitamin B6 derivesi olan pridoksinin peritonda AGE birikimini engelleyerek ve anjiojenik sitokin salınımını inhibe ederek periton zarının fonksiyonu ve yapısında olumlu değişiklere neden olduğu deneysel modellerde ortaya konmuştur (69). Pentoksifilin, diltiazem, dipridamol gibi farklı etki mekanizmaları olan moleküller TGF- β 1 sinyal yolağında sağladıkları inhibisyon nedeniyle deneysel modellerde kullanılmışlardır (70, 71, 72). Enkapsüle sklerozan peritonit modellerinde, fibrozisin geriletilebilmesi amacıyla roziglitazon, kolşisin, thalidomide everolimus denenmiş ve peritonu dinlendirme yöntemine göre fibrozisi geriletmede daha başarılı bulunmuşlardır(73,74,75,76). Bu moleküller ciddi yan etki profilleri nedeniyle periton fibrozisini önleyici tedavide klinik pratikte kullanılamamaktadır.

Çalışmamızda Ishii ve ark. tarafından geliştirilmiş olan klorhexidin glukonat ile kimyasal peritoneal fibrozis modeli uygulanarak ratlarda periton fibrozisi geliştirilmesi planlanmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan ratlara intraperitoneal SF verilmiştir. Kontrol grubu ile histopatolojik olarak karşılaştırıldığında periton kalınlığı, fibrozis, inflamasyon ve vaskülarizasyon bulgularının, CH grubunda anlamlı derecede yüksek olduğu gösterildi. Bu sonuçlarla modelin uygun şekilde uygulandığı ve ratlarda periton fibrozisinin geliştiği ortaya konmuştur. Periton fibrozisinin fizyopatolojisinde anahtar rol oynadığı gösterilmiş olan TGF- β 1'in düzeyi, tüm gruplarda serum örneklerinde çalışıldı. Kontrol grubu ve CH+NAC grubunda TGF- β 1 düzeyinin CH grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. CH+K grubunda, histopatolojik olarak fibrozisin belirgin olarak gerilediğinin gösterilmesine rağmen TGF- β 1'in düzeyi CH grubu ile benzer düzeylerde saptanmıştır. Bu bulgu, çalışmamızda karvedilol grubunda, fibrozis üzerine serum TGF- β 1 düzeyinin tek başına belirleyici olmadığını dşndrmştir. Ancak TGF- β 1 sinyal yolağının sitimlasyonu ile fibrozis oluştuğu ve bu yolağın inhibisyonu ile fibrozisin engellenebildiğini gösteren yayınlar ışığında,

karvedilolün TGF- β 1 serum düzeylerini değiştirmemesine rağmen TGF- β 1 reseptör ve hücre içi sinyal yolağı üzerindeki muhtemel inhibitör etkisiyle, fibrozis gelişimini azaltmış olabileceği düşünölmüştür (48,53,77,78). Daha önce invitro karaciğer hücre költürleriyle yapılan deneysel araştırmada NAC'nin TGF- β 1 aracılığı ile oluşan fibrozise, sinyal yolağındaki smad2 ve smad3 proteinlerinin fosforilasyonunu inhibe ederek engel olduğu gösterilmiştir (53). Ayrıca NAC'nin kuvvetli anti-oksidan etkinliği ile de fibrozis sürecinde rol oynayan ROS üzerindeki baskılayıcı etkisinin, fibrozis gelişimini yavaşlattığı bilinmektedir (79). Çalışmamızda NAC alan iki grupta da periton kalınlığında anlamlı azalma izlenirken, fibrozis skoru üzerindeki azalma anlamlılık düzeyine ulaşmamıştır. İnflamasyon skoru, vaskölarizasyon skoru ve periton kalınlığındaki anlamlı düzeydeki düzelme ile birlikte değerlendirildiğinde denek sayısının artırılması ile fibrotik skorlarda da istatistiksel anlamlılığa ulaşılabilieceği düşünölmüştür. Çalışmamızda oksidatif stres parametreleri bakılmadığından NAC'nin peritoneal fibrozis gelişim sürecindeki oksidatif stres parametreleri üzerindeki etkisi biyokimyasal parametrelerle dökümante edilememiştir. Ancak TGF- β 1 sinyal yolağı üzerinde gösterilmiş olan inhibitör etkinliği ve kanıtlanmış olan antioksidan aktivitesinin, periton fibrozisi üzerinde önleyici etki oluşturduğu düşünölmüştür.

Wong ve arkadaşları, karvedilolün renoprotektif etkinliklerini araştırdıkları bir çalışmada, karvedilol alan ratlarda TGF- β mRNA ekspresyonunun azaldığını, bu grup ratlarda TGF- β mRNA düzeylerinin kronik nefron kaybı ve total aktif renal hasar düzeyi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (48). Karvedilolün ayrıca fibronektin, kollejen I ve kollejen III mRNA düzeylerini azalttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada da araştırmacılar daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan karvedilolün güçlü antioksidan etkinliğinin fibrozis ile sonuçlanan renal hasarı engellemede rolü olabileceğini düşünmüşlerdir. Karvedilolün karaciğer fibrozisi modeli üzerindeki antifibrotik etkilerini incelendiği bir çalışmada, karbon

tetra klorür kaynaklı GSH depleksyonu ve karaciğer peroksit düzeyindeki artışın karvedilol eklenmesi ile önleildiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada karvedilol tedavisinin antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve glutatyon düzeylerini arttırdığı, lipid peroksidasyonunu azalttığı ve bu antioksidan etkinliği ile karvedilolün karaciğerde gelişen fibrozisi önleyici etkileri olduğunu histopatolojik olarak gösterilmiştir (80). Bizim çalışmamızda karvedilol grubundan yapılan histopatolojik değerlendirmelerde periton zar kalınlığı, fibrozis skoru ve inflamasyon skorunda anlamlı düşüşler saptanmıştır. Bu bulgular ışığında klorhexidin glukonat aracılığı ile gelişen periton fibrozisi ve inflamasyonun karvedilol ile baskılanabileceği kanısına varılmıştır. Çalışmamızdaki karvedilol grubunda TGF- β 1'in düzeyinin değişmemesine rağmen periton fibrozisinde anlamlı gerilemenin saptanması karvedilolün etkinliğinin daha çok antioksidan etkinliğinden kaynaklandığını düşündürmüştür.

Weichun ve arkadaşları, ratlarda adriamisin enjeksiyonu sonrası oluşan renal fibrotik lezyonlar üzerine parikalsitolün inhibitör etkisini göstermişlerdir. Fibrojenik sitokinlerden TGF- β 1 ve konnektif doku büyüme faktörünün (CTGF) mRNA ekspersyonlarının parikalsitol tarafından inhibisyonu sonucu fibronektin, tip I ve tip III kollajenin intertisyel matrixte birikimlerinin engellenmesiyle, renal fibrotik lezyonların geriletildiği sonucu elde edilmiştir (61). Aynı çalışmada parikalsitolün α -SMA düzeylerini ve miyofibroblast aktivasyonunu azalttığı saptanmıştır. Xiaoyue ve arkadaşları obstüriktif nefropati deneysel modelinde parikalsitolün fibronektin, tip I ve tip III kollajen birikimini ve epiteliyal hücrelerin mezankimal transformasyonunu engellediğini ortaya koymuşlardır (81). Periton fibrozisinin fizyopatolojisinde de TGF- β 1 aracılığı ile oluşan ve periton zarında tip I ve tip III kollajen birikimi miyofibroblast aktivasyonu ile epiteliyal hücrelerin mezankimal transformasyonu izlendiğinden, parikalsitolün bu süreci yavaşlatıcı etkisi olabileceği düşünülmüştür. Ancak

bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarda, tek başına parikalsitol verilen grupta fibrotik skorlarda gerileme izlenmesine karşın, bu sonuç istatistiksel anlamlılığı ulaşmamıştır. Vaskülarizasyon skorlarında belirgin fark olmamasına karşın, inflamasyon skoru CH grubuna göre az da olsa düşük olarak saptanmıştır. Periton zar kalınlığında bir azalma elde edilmesine rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Fibrozis ve periton zar kalınlığındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmaması denek sayısının az olması ile açıklanmıştır. Aktif D vitamini ve analoglarının, klinik çalışmalarla hemodiyaliz hastalarında, in vitro olarak da periferik mononükleer hücrelerde ve kanser patogeneğinde immünmodülatör etkileri gösterilmiştir (82,83). Vitamin D reseptör aktivasyonunun tüm vücuttaki farklı fizyolojik özelliklere sahip hücreler üzerindeki immünmodülatör etkinliği göz önüne alındığında, parikalsitolün uygulamasının periton fibrozisi ve UF yetersizliği üzerinde olumlu sonuçlar doğurabileceği öngörülmüştür.

Bu çalışmanın kısıtlılıkları arasında denek sayısının azlığı ve deneklere verilen ilaçların antioksidan etkinliğinin değerlendirilebileceği oksidatif stres belirteçlerinin bakılmaması sayılabilir. Periton fibrozisi sürecinde rol oynayan oksidatif stres ile fibrozis önlenmesi üzerine etki eden NAC ve karvedilolün oksidatif stres parametreleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi, bu ilaçların uygulanması sonucu gözlenen antifibrotik etkinin fizyolojik mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Bizim çalışmamız, NAC, karvedilol ve parikalsitolün deneysel model üzerinde periton fibrozisini yavaşlatıcı etkisinin histopatolojik olarak gösterildiği ilk çalışmadır.

Sonuç olarak, günümüzde periton diyaliz uygulaması sürecinde ortaya çıkan periton fibrozisi ve bununla ilişkili olarak hastalarda gelişen UF yetersizliği halen bir problem olarak devam etmektedir. Birçok deneysel araştırmada bu sürecin önlenmesi için kullanılan moleküllerin antifibrotik etkinliği gösterilmiş olmasına rağmen bu moleküllerin bir çoğunun

klirik pratikte uygulama imkanı olmamıştır. Ayrıca deneysel araştırmaların çoğu, ortaya çıkmış olan fibrozisin geriletilebilmesi amacıyla tasarlanmıştır. Bizim alışmamızda klinik pratiğimizde sıkça kullandığımız parikalsitol, NAC ve karvedilolün fibrozisi tedavi etkinliğinden ziyade, fibrozis gelişim sürecinin önlenmesi veya yavaşlatılması değerlendirilmiştir. Histopatolojik inceleme sonuçlarına göre NAC ve karvedilolün fibrozis sürecini anlamlı düzeyde yavaşlattığı, parikalsitolün ise kısmen faydalı olduğu saptanmıştır. Periton diyalizi uygulayan hastalarda farklı endikasyonlar nedeniyle günümüzde zaten kullanılmakta olan bu ilaçların periton fibrozisini de yavaşlatıcı etkilerinin ortaya konması ile ilaç seçimi sırasında NAC, karvedilol ve parikalsitol için olumlu yönde bir tercih dayanağı olacağını düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Nahas M. Progression of chronic renal failure. In: Johnson R, Feehally J, eds. Comprehensive clinical nephrology 2nd ed. Mosby; 2003; Section 14 p.843.
2. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int. 2005;67(6):2089-100
3. Castro AF, Coresh J. CKD surveillance using laboratory data from the population-based National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). Am J Kidney Dis. 2009;53(3 Suppl 3):S46-55.
4. Steenkamp R, Castledine C, Feest T, Fogarty D. UK Renal Registry 13th Annual Report (December 2010): Chapter 2: UK RRT prevalence in 2009: national and centre-specific analyses. Nephron Clin Pract. 2011;119 Suppl 2:c27-52.
5. U.S Renal Data System (USRDS):2004 Annual Data Report: Atlas of End Stage Renal Disease in the United States. Bethesda, Md, National Institutes of Health, National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. 2004. Available at www.usrds.org
6. National Hemodialysis, Transplantation and Nephrology Registry Report of Turkey, 2010. Available at www.tsn.org
7. Gültekin Süleymanlar, Cengiz Utaş, Turgay Arinsoy. A population-based survey of Chronic RENal Disease In Turkey —the CREDIT study Nephrol Dial Transplant. 2011; 26: 1862–1871
8. John T. Daugirdas. Handbook of Dialysis. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins 2003; Chapter 2 p .15.
9. Rippe B, Venturoli D, Simonsen O, de Arteaga J Fluid and electrolyte transport across the peritoneal membrane during CAPD according to the three-pore model. Perit Dial Int. 2004;24(1):10-27.
10. Dombros N, Dratwa M, Feriani M, Gokal R, Heimbürger O, Krediet R, Plum J, Rodrigues A, Selgas R, Struijk D, Verger C; EBPG Expert Group on Peritoneal Dialysis. European best practice guidelines for peritoneal dialysis. 4 Continuous

- ambulatory peritoneal dialysis delivery systems. Nephrol Dial Transplant. 2005;20 Suppl 9:ix13-ix15
11. Dombros N, Dratwa M, Feriani M, Gokal R, Heimbürger O, Krediet R, Plum J, Rodrigues A, Selgas R, Struijk D, Verger C; EBPG Expert Group on Peritoneal Dialysis. [European best practice guidelines for peritoneal dialysis. 6 Automated peritoneal dialysis](#). Nephrol Dial Transplant. 2005;20 Suppl 9:ix21-ix23.
 12. Planas JT. Fluid transport and homeostasis in peritoneal dialysis. Contrib Nephrol. 2012;178:169-73.
 13. Aguirre AR, Abensur H. Protective measures against ultrafiltration failure in peritoneal dialysis patients. Clinics (Sao Paulo). 2011;66(12):2151-7.
 14. Lew SQ. Hydrothorax: pleural effusion associated with peritoneal dialysis. Perit Dial Int. 2010;30(1):13-8.
 15. Davies SJ, Williams JD. Complications of peritoneal Dialysis. In Johnson RJ, Feehally J, Floege J. Comprehensive Clinical Nephrology, 3rd Edition, Philadelphia, 2007; pp:991-999
 16. Piraino B, Bailie GR, Bernardini J et al; ISPD Ad Hoc Advisory Committee. Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2005 update. Perit Dial Int. 2005;25(2):107-31
 17. NKFK/DOQI Clinical Practice Guidelines for Peritoneal Dialysis Adequacy: update 2000. Am J Kidney Dis. 2001;37(1 Suppl 1):S65-S136.
 18. Kazancioglu R. Peritoneal defense mechanisms--the effects of new peritoneal dialysis solutions. Perit Dial Int. 2009;29 Suppl 2:S198-201.
 19. Margetts PJ, Brimble KS. Peritoneal dialysis, membranes and beyond. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2006;15(6):571-6.
 20. Reyes MJ, Bajo MA, Hevíá C, del Peso G, Ros S, de Miguel AG, et al. Inherent high peritoneal transport and ultrafiltration deficiency: their mid-term clinical relevance. Nephrol Dial Transplant. 2007; 22:218–23.

21. Davies SJ. Longitudinal relationship between solute transport and ultrafiltration capacity in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* 2004; 66:2437–45.
22. Honda K, Hamada C, Nakayama M, Miyazaki M, Sherif AM, Harada T, et al. Peritoneal Biopsy Study Group of the Japanese Society for Peritoneal Dialysis. Impact of uremia, diabetes, and peritoneal dialysis itself on the pathogenesis of peritoneal sclerosis: a quantitative study of peritoneal membrane morphology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3:720–8.
23. Churchill DN, Thorpe KE, Nolph KD, Keshaviah PR, Oreopoulos DG, Pagé D. Increased peritoneal membrane transport is associated with decreased patient and technique survival for continuous peritoneal dialysis patients. The Canada–U.S.A. (CANUSA) Peritoneal Dialysis Study Group. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9:1285–92.
24. Davies SJ. Longitudinal relationship between solute transport and ultrafiltration capacity in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int.* 2004; 66:2437–45.
25. La Milia V, Di Filippo S, Crepaldi M, Del Vecchio L, Dell'Oro C, Andrulli S, Locatelli F. Mini-peritoneal equilibration test: A simple and fast method to assess free water and small solute transport across the peritoneal membrane. *Kidney Int.* 2005;68(2):840-6.
26. Hung K, Huan J, Tsai T, Hsieh B. Peritoneal fibrosing syndrome: pathogenetic mechanism and current therapeutic strategies *J Chin Med Assoc.* 2005 ;68(9):401-5.
27. Flessner MF. The effect of fibrosis on periton transport. *Contrib Nephrol* 2006; 150: 174-80.
28. Peng YM, Shu ZJ, Xiao L, Sun L, Tang WB, Huang Y, Liu YH, Li J, Ling GH, Xu XQ, Halmurat U, Liu FY. A new non-uremic rat model of long-term peritoneal dialysis. *Physiol Res.* 2011;60(1):157-64
29. Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, Mackenzie RK, Williams GT; Peritoneal Biopsy Study Group Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(2):470-9.
30. Williams JD, CAraig KJ, Topley N, Von Ruhland C et al. Morphologic changes in the periton membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13:470-9.
31. Mactier RA. The spectrum of periton fibrosing syndromes in periton dialysis. *Adv Perit Dial.* 2000; 16: 23-8

32. Peter J, Bounniaud M. Basic mechanisms and clinical implications of periton fibrosis. *Perit Dial Internatioal*. 2003 ;23 (6); 530-541
33. Miyata T, Devusyst O, Kurukowa K, Van Ypersele de Strihou C. Toward beter dialysis compatibility advances in the biochemistry and pathophysiology of the periton membranes. *Kidney Int*. 2002; 61: 375-86.
34. Hung KY, Tsai TJ, Chen WY. Periton fibrosis and its prevention. *Nephrology*. 2002; (7) 227-232.
35. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R. Periton dialysis and epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med*. 2003; 348: 403–13.
36. Shi Y, Massague' J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003; 113:685–700.
37. Faull RJ. Bad and good growth factors in the peritoneal cavity. *Nephrology*. 2005;10:234–9.
38. Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gauldie J. Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2029–39
39. Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, et al. Human Smad3 and Smad4 are sequencespecific transcription activators. *Mol Cell*. 1998; 1:611–617.
40. Naiki Y, Maeda Y, Matsuo K, Yonekawa S, Sakaguchi M, Iwamoto I, et al. Involvement of TGF-b signal for peritoneal sclerosing in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Nephrol*. 2003; 16:95–102.
41. Xu J, Lamouille S, Derynck R: TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res*. 2009;19: 156–172.
42. Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gauldie J. Gene transfer of transforming growth factor-b1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12:2029–39.
43. Kim YS, Kim BC, Song CY, Hong HK, Moon KC, Lee HS. Advanced glycosylation end products stimulate collagen mRNA synthesis in mesangial cells mediated by protein kinase C and transforming growth factor-b. *J Lab Clin Med*. 2001; 138:59–68.
44. Dandona P, Ghanim H, Brooks DP. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. J Hypertens. 2007;25(4):731-41.

45. Chua S, Sheu J.J, Chang L.T, Lee F.Y, Mu C.J, Sun C.K, Yip H.K. Comparison of losartan and carvedilol on attenuating inflammatory and oxidative response and preserving energy transcription factors and left ventricular function in dilated cardiomyopathy rats. *Int. Heart J.* 2008;49 (5), 605–619.
46. Ronsein G.F, Guidi D.B, Benassi J.C, Filho D.W, Pedrosa R. Cytoprotective effect of carvedilol against oxygen free radical generation in rat liver. *Redox Rep.* 2005 ;10 (3), 131–137.
47. Vialati Mdo C, Rocha NS, Matsubara LS, Padovani CR, Schwartz DS, Matsubara BB. Protective effects of carvedilol on systemic vascular damage induced by angiotensin II: organ-specific effects independent of antihypertensive effects. *Med Sci.* 2010; 16 (1), BR6–BR10.
48. Wong VY, Laping NJ, Nelson AH, Contino LC, Olson BA, Gygielko E, et al. Renoprotective effects of carvedilol in hypertensive-stroke prone rats may involve inhibition of TGF beta expression. *Br J Pharmacol.* 2001;134(5):977-84.
49. Dargan PI, Jones AL. Management of paracetamol poisoning. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:154–7.
50. Guru V, Fremes SE. The role of N-acetylcysteine in preventing radiographic contrast-induced nephropathy. *Clin Nephrol.* 2004;62:77–83.
51. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Ciccolo A, Centorrino T, et al. Protective effects of n-acetylcysteine on lung injury and red blood cell modification induced by carrageenan in the rat. *FASEB J.* 2001;15:1187–200.
52. Okuyama H, Shimahara Y, Kawada N, Seki S, Kristensen DB, Yoshizato K, et al. Regulation of cell growth by redox-mediated extracellular proteolysis of platelet-derived growth factor receptor b. *J Biol Chem.* 2001;276:28274–80.
53. Meurer SK, Lahme B, Tihaa L, Weiskirchen R, Gressner AM. N-acetyl-L-cysteine suppresses TGF-beta signaling at distinct molecular steps: the biochemical and biological efficacy of a multifunctional, antifibrotic drug. *Biochem Pharmacol.* 2005;70(7):1026-34.
54. Horie T, Sakaida I, Yokoya F, Nakajo M, Sonaka I, Okita K. L-Cysteine administration prevents liver fibrosis by suppressing hepatic stellate cell proliferation and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:94–100

55. Goldenberg MM. Paricalcitol, a new agent for the management of secondary hyperparathyroidism in patients undergoing chronic renal dialysis. *Clin Ther.* 1999;21:432-41.
56. Cozzolino M, Brancaccio D. Emerging role for the vitamin D receptor activator (VDRA), paricalcitol, in the treatment of secondary hyperparathyroidism. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9:947-54.
57. Lindberg J, Martin KJ, Gonzalez EA, Acchiardo SR, Valdin JR, Soltanek C. A long-term, multicenter study of the efficacy and safety of paricalcitol in end-stage renal disease. *Clin Nephrol.* 2001;56:315-23.
58. Martin KJ, González EA, Gellens M, Hamm LL, Abboud H, Lindberg J. 19-Nor-1- α -25-dihydroxyvitamin D₂ (Paricalcitol) safely and effectively reduces the levels of intact parathyroid hormone in patients on hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9:1427-32.
59. Cardús A, Panizo S, Parisi E, Fernández E, Valdivielso JM. Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res.* 2007;22:860-6.
60. Mizobuchi M, Finch JL, Martin DR, Slatopolsky E. Differential effects of vitamin D receptor activators on vascular calcification in uremic rats. *Kidney Int.* 2007;72:709-15.
61. He W, Kang YS, Dai C, Liu Y. Blockade of Wnt/ β -catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(1):90-103
62. Tan X, Li Y, Liu Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(12):3382-93.
63. Ishii Y, Sawada T, Shimizu A, Tojimbara T, Nakajima I, Fuchinoue S, Teraoka S. An experimental sclerosing encapsulating peritonitis model in mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(6):1262-6.
64. Tomino Y. Mechanisms and interventions in peritoneal fibrosis. *Clin Exp Nephrol.* 2012;16(1):109-14.
65. Duman S, Gunal AI, Sen S, Asci G, Ozkahya M, Terzioglu E, et al. Does enalapril prevent peritoneal fibrosis induced by hypertonic (3.86%) peritoneal dialysis solution? *Perit Dial Int.* 2001;21:219–24.

66. Duman S, Sen S, Duman C, Oreopoulos DG. Effect of valsartan versus lisinopril on peritoneal sclerosis in rats. *Int J Artif Organs*. 2005;28:156–63.
67. Giri SN, Biring I, Nguyen T, Wang O, Hyde DM. Abrogation of bleomycin-induced lung fibrosis by nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine in mice. *Nitric Oxide*. 2002;7:109–18.
68. Zareie M, Tangelder GJ, ter Wee PM, Hekking LH, van Lambalgen AA, Keuning ED, et al. Beneficial effects of aminoguanidine on peritoneal microcirculation and tissue remodelling in a rat model of PD. *Nephrol Dial Transpl*. 2005;20:2783–92
69. Kakuta T, Tanaka R, Satoh Y, Izuhara Y, Inagi R, Nangaku M, et al. Pyridoxamine improves functional, structural, and biochemical alterations of peritoneal membranes in uremic peritoneal dialysis rats. *Kidney Int*. 2005;68:1326–36.
70. Hung KY, Huang JW, Chen CT, Lee PH, Tsai TJ. Pentoxifylline modulates intracellular signalling of TGF- β in cultured human peritoneal mesothelial cells: implications for prevention of encapsulating peritoneal sclerosis. *Nephrol Dial Transpl*. 2003;18:670–6.
71. Fang CC, Yen CJ, Chen YM, Chu TS, Lin MT, Yang JY, et al. Diltiazem suppresses collagen synthesis and IL-1 β -induced TGF β 1 production on human peritoneal mesothelial cells. *Nephrol Dial Transpl*. 2006;21:1340–7.
72. Hung KY, Chen CT, Huang JW, Lee PH, Tsai TJ, Hsieh BS. Dipyridamole inhibits TGF- β -induced collagen gene expression in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*. 2001;60:1249–57
73. Zhang YF, Yang X, Zhang YJ, Sun YL, Zou XL, Kong QY, Dong XQ, Ye XQ, Yu XG Peroxisome proliferator- activated receptor- γ is expressed by rat peritoneal mesothelial cells: its potential role in peritoneal cavity local defence. *Am J Nephrol*. 2006;26(6):602–611
74. Tzortzaki EG, Antoniou MK, Zervou MI, Lambiri I, Koutsopoulos A, Tzanakis N, Plataki M, Maltezas G, Bouros D, Siafakis NM Effects of antifibrotic agents on TGF- β 1, CTGF and IFN- γ expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2007; 101(8):1821–1829
75. Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G Thalidomide exerts its inhibitory action on tumour necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med*. 1993;177:1675–1680

76. Duman S, Bozkurt D, Sipahi S, Sezak M, Ozkan S, Ertlav M, Sen S, Ok E Effects of everolimus as an antiproliferative agent on regression of encapsulating peritoneal sclerosis in a rat model. *Adv Perit Dial.* 2008;24:104–110
77. Kaneko K, Hamada C, Tomino Y. Peritoneal fibrosis intervention. *Perit Dial Int.* 2007;27 Suppl 2:S82-6.
78. Subeq YM, Ke CY, Lin NT, Lee CJ, Chiu YH, Hsu BG. Valsartan decreases TGF- β 1 production and protects against chlorhexidine digluconate-induced liver peritoneal fibrosis in rats. *Cytokine.* 2011;53(2):223-30.
79. Efrati S, Berman S, Siman-Tov Y, Lotan R, Averbukh Z, Weissgarten J, Golik A N-acetylcysteine attenuates NSAID-induced rat renal failure by restoring intrarenal prostaglandin synthesis. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(7):1873-81
80. Hamdy N, El-Demerdash E.New therapeutic aspect for carvedilol: antifibrotic effects of carvedilol in chronic carbon tetrachloride-induced liver damage. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012;261(3):292-9.
81. Tan X, He W, Liu Y. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2009;76(12):1248-57.
82. Seibert E, Levin NW, Kuhlmann MK. Immunomodulating effects of vitamin D analogs in hemodialysis patients. *Hemodial Int.* 2005;9 Suppl 1:S25-9.
83. Eleftheriadis T, Antoniadi G, Liakopoulos V, Kartsios C, Stefanidis I, Galaktidou G. Paricalcitol reduces basal and lipopolysaccharide-induced (LPS) TNF-alpha and IL-8 production by human peripheral blood mononuclear cells. *Int Urol Nephrol.* 2010;42(1):181-5.

8.ÖZET

Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) son yıllarda sıklığı giderek artmakta olan mortalitesi ve morbiditesi oldukça yüksek bir hastalıktır. Bu hastalarda önerilen altın standart tedavi şekli renal transplantasyon olmasına rağmen yeterli donör sayısına ulaşılamaması nedeniyle hastalar zorunlu olarak diyaliz tedavi yöntemlerinden biri ile tedavi edilmektedirler. Periton diyaliz son dönem böbrek yetmezliğinde sıklıkla ve başarı ile

uygulanan bir tedavi yöntemidir. Uzun süre periton diyalizi yapan hastalarda ise kullanılan yüksek glukoz konsantrasyonuna sahip solüsyonlar, sık peritonit atakları ve diğer bir çok sebebe bağlı olarak periton yapısı bozulmaktadır. Periton zarında ortaya çıkan ve diyaliz yetersizliğine neden olan en önemli değişiklik periton zarında gelişen fibrozisdir. Bu çalışmada parikalsitol, karvedilol, N - asetil sisteinin periton fibrozisi gelişimi üzerindeki önleyici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya her grupta altışar rat olmak üzere 36 rat alındı. Çalışma süresi 21 gün olarak belirlendi. Periton fibrozisi oluşturmak için 10 ml/kg/gün %0,1'lik klorhexidin glukonat (CH) (Drogsan İlaçları AŞ. Balgat, Ankara) + %15 etanol + serum fizyolojik (SF) karışımı aseptik olarak hazırlanıp kullanıldı. Parikalsitol grubuna CH intraperitoneal enjeksiyonla beraber 0,2 mcg/kg/gün parikalsitol (P) (Zemplar® 2 mcg amp Abbott) 21 gün boyunca ratın ense bölgesine subkutan olarak enjekte edildi. N-asetil sistein grubuna CH intraperitoneal enjeksiyonla beraber 450 mg/kg/gün NAC içme suyuna katılarak 21 gün boyunca verildi ve günlük olarak ratların suyu yenilendi. Karvedilol (K) grubunda, CH intraperitoneal olarak uygulandı ve beraberinde oral gavaj ile 10 mg/kg/gün karvedilol 21 gün boyunca verildi. Çalışma sonunda ratların periyetal peritonları histopatolojik olarak incelendi ve ratların serumundan TGF- β 1 düzeyi çalışıldı.

Çalışma sonuçlarında NAC'nin TGF- β 1 düzeyini anlamlı şekilde düşürdüğü saptandı ($p<0.05$). NAC ve karvedilolün periton kalınlığı, periton fibrozis, inflamasyon ve vaskülarizasyon skorlarında anlamlı olarak iyileşme sağladığı belirlendi. Parikalsitolün periton zar kalınlığında koruyucu etki sağlamasına rağmen histopatolojik skorlarda belirgin düzelme sağlamadığı izlendi.

Bu çalışmanın sonuçları, NAC ve Karvedilol uygulamasının deneysel modelde geliştirilen periton fibrozisini önleme yönünde olumlu etkileri olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu bulgular, klinik çalışmalarla desteklenmesiyle birlikte periton diyalizi hastalarında, fibrozis gelişme sürecini yavaşlatıcı etkilerinde dolayı NAC ve karvedilolün daha sık kullanım alanı bulacağını düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Periton fibrozisi , karvedilol, NAC, parikalsitol

9. ABSTRACT

THE PROTECTIVE EFFECT OF PARICALCITOL, NAC AND CARVEDILOL THERAPIES ON PERITONEAL FIBROSIS: A COMPERATIVE EXPERIMENTAL STUDY

End stage renal disease (ESRD) is an increasing global health problem accompanied with high annual rates of mortality and cardiovascular morbidity. Although, renal transplantation is recommended as a gold standard therapy, lack of the sufficient greft donor for renal transplantation may cause dialysis modalities as a mandatory renal replacement therapies for these certain patient population. Peritoneal dialysis is succesfull treatment modality for ESRD patients. But peritoneal membrane structure may be diminished due to the long term use of high glucose concentrate peritoneal dialysis fluids due to the peritonitis attacks and other pathologies. Peritoneal fibrosis is the most important cause for the

development of diminished peritoneal filtration barrier. Here in this study, we aimed to examine to compare the protective effect of paricalcitol, carvedilol and N-acetyl cysteine (NAC) therapies against to the peritoneal fibrosis.

A total of 36 rats were included this experimental protocol in a follow up period of 21 days by dividing six groups which included six rats in each subgroups. The mixed of 10 ml/kg/day %0,1 clorhexidin gluconate (CH) (Drogsan Drugs, Balgat, Ankara) + %15 ethanol + % 0.09 NACL solution were administered to develop peritoneal fibrosis in each rats. During 21 days of study period, 0,2 mcg/kg/day paricalcitol were injected to the nape of the rats in paricalcitol group every day. 450 mg/kg/day NAC were administered via oral way by mixing drinking water in NAC subgroup and also 10 mg/kg/day carvedilol were administered orally in carvedilol group every day. At the end of the study period, serum samples were obtained to study TGF- β 1 levels. Also parietal peritoneal membrane samples were assessed histopathologically to demonstrate the magnitude of peritoneal fibrosis.

Results; TGF- β 1 levels were significantly lower in NAC group compared the other subgroups ($p < 0.05$). When we analysed the peritoneal samples as histopathologically, NAC and carvedilol subgroups showed significantly lower scores of peritoneal fibrosis, peritoneal thickness and vascularisation accompanied with lower inflammation. Although, lower levels of peritoneal thickness were observed in paricalcitol group, no distinctive protective effect were seen on other histopathologic structure.

Here in this study, we have identified NAC and carvedilol therapies have favorable effects for the protection of peritoneal fibrosis. Further clinical studies are necessary to better understand the protective effects of NAC and carvedilol therapies on peritoneal fibrosis whether these certain agents may take place in routine clinical practice as slowen therapies for peritoneal fibrosis in peritoneal dialysis patients.

Key words: Peritoneal fibrosis, paricalcitol, NAC, carvedilol