

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

BRADİKİNİNİN PERİTONEAL FİBROZİS ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Necdet Fatih YAŞAR

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2011
T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

BRADİKİNİNİN PERİTONEAL FİBROZİS ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Necdet Fatih YAŞAR

Genel Cerrahi Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Enver İHTİYAR

ESKİŞEHİR
2011
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T. C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Necdet Fatih YAŞAR'a ait "bradikininin peritoneal fibrosis üzerine etkisi" adlı
çalışma jürimiz tarafından Genel Cerrahi Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi
olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:/...../2011

Jüri Başkanı Prof .Dr. Enver İHTİYAR
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye Prof .Dr. Haluk KİPER
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Üye Prof .Dr. Ercüment PAŐAOĐLU
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun/...../.....
Tarih veSayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Necmi ATA
Dekan

TEŐEKKÖR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Genel Cerrahi Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan sayın hocam Prof. Dr. Enver İHTİYAR'a ve değerli hocalarıma, tezimin hazırlanmasında katkıları olan Histoloji Embriyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Erinç ARAL'a ve Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Onur UYSAL'a, istatistiklerin hazırlanmasında bana yardımcı olan Biyoistatistik Anabilim dalından Arş. Gör. Ahmet MUSMUL'a yardımları için teşekkür ederim.

ÖZET

Yaşar, F. Bradikininin peritoneal fibrozis üzerine etkisi. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi , Eskişehir, 2011. Peritoneal fibrozis oluşturulmuş ratlarda proinflamatuvar bir hormon olan ve aynı zamanda bazı dokularda antifibrotik etkilerinin olduğu bilinen bradikininin etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Cinsiyet farkı gözetilmeden ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen Sprague-Dawley cinsi 24 adet rat kullanıldı. 8'er adet rattan oluşan kontrol grubu, klorheksidin glukonat+serum fizyolojik grubu ve klorheksidin glukonat+bradikinin grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna sadece 10 ml/kg dozunda intraperitoneal serum fizyolojik verildi. Klorheksidin glukonat+serum fizyolojik grubuna salınım hızı 0.25µL/saat olan intradermal ozmotik mini pompalar 0.2 ml serum fizyolojik ile doldurularak cilt altına yerleştirildi. Klorheksidin glukonat+bradikinin grubunda da aynı tip mini pompalar salınım hızı 100ng/kg/dak olacak şekilde, 7.2mg/mL dozunda bradikinin ile dolduruldu ve cilt altına yerleştirildi. Mini pompa yerleştirilen bu iki gruba günlük, serum fizyolojik içinde çözülmüş %15 etanol + %0.1 klorheksidin glukonat, 10ml/kg dozunda intraperitoneal olarak verildi. 3 haftanın sonunda alınan peritoneal doku örnekleri H-E ve PAS yöntemleri dışında immünohistokimyasal olarak MMP-2, TGF-β1, PAI-1 ve Bradikinin-B2 boyaları ile boyandı. Yapılan değerlendirmede bradikinin verilen grupta submezotelyal kompakt zonda kalınlaşmanın, neovaskülarizasyonun, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte, bradikinin verilen grupta MMP-2, TGF-β1 düzeyleri arttığı, PAI-1 seviyesinin azaldığı, bradikinin B2 reseptör miktarında ise bir değişiklik olmadığı tespit edildi. Peritoneal fibroziste bradikininin net etkisine bakıldığında, H-E ve PAS boyamalarında fibrozisi artırıcı etkisi olduğu sonucuna varıldı. Bradikininin bu net etkisini, inflamasyon, MMP-2 ve TGF-β1 düzeylerini artırması ile sağladığı, PAI-1 düzeyindeki sağladığı azalmanın ise fibrozisi engellemeye yetmediği düşünüldü. Bradikinin üzerinde yapılan bu araştırma ile peritoneal fibrozisin fizyopatolojisinde rol oynayan etkenlerin daha açık ortaya konulması amaçlanmış olup, birbirini etkileyen çok sayıda faktörün araştırılması ve bradikinin reseptörlerinin spesifik agonist ve antagonistler ile daha fazla araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Peritoneal fibrozis, bradikinin, B2 reseptörü

ABSTRACT

Yaşar, F. The effects of bradykinin on peritoneal fibrosis. Eskişehir Osmangazi University, School of Medicine, Department of General Surgery, thesis for specialization in medicine, Eskişehir 2011. The effects of bradykinin, a proinflammatory hormone, which has antifibrotic properties in various tissues, on peritoneal fibrosis are studied. For this reason, 24 Sprague-Dawley rats of either sex, weighing 200-250 g, were used in the present study. Rats were divided evenly into 3 groups, which were control group, chlorhexidine gluconate+saline administered group and chlorhexidine gluconate+bradykinin treatment group. In the control group, 10ml/kg of saline was administered intraperitoneally. In the chlorhexidine gluconate+saline administered group, rats were infused with saline (25µL/hr) through a subcutaneous osmotic minipump. Similarly, in the chlorhexidine gluconate+bradykinin treatment group, rats were infused with bradykinin at 100ng/kg/min through a subcutaneous osmotic minipump. Peritoneal fibrosis was induced by intraperitoneal injection of 0.1% chlorhexidine gluconate in 15% ethanol dissolved in saline at a volume of 10mL/kg in the rats which were infused subcutaneously with either saline or bradykinin. Following 3 weeks of treatment, peritoneal tissue samples were obtained to study histologically by H-E and PAS staining as well as MMP-2, TGF-β1, PAI-1 and Bradykinin-B2 which were localized by immunohistochemistry. The increased levels of thickening, neovascularization and PMNL infiltration as well as the increased levels of MMP-2 and TGF-β1 were observed while PAI-1 level was decreased in the bradykinin treatment group. There was no significant difference between the levels of bradykinin B2 receptors in both peritoneal fibrosis induced groups. As a result, peritoneal fibrosis was increased in the bradykinin treatment group and we concluded that this was a result of increase in the levels of inflammation, MMP-2 and TGF-β1, however the decreased level of PAI-1 was not sufficient to attenuate the fibrotic effects. In this study, we aimed to clarify the factors which played important roles in the pathophysiology of peritoneal fibrosis and we believe that more research should be done with bradykinin receptor agonists and antagonists to understand the multifactorial pathophysiology.

Key Words: Peritoneal fibrosis, bradykinin, B2 receptors

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Periton Anatomisi ve Histolojisi	2
2.2. Peritonun Nöral İnnervasyonu	4
2.3. Hasara Karşı Verilen Peritoneal İmmün Cevap	5
2.3.1. Diyafragmatik Pompa	6
2.3.2. Doğal İmmün Sistem	6
2.3.3. Spesifik İmmün Sistem	8
2.3.4. Hümorale Cevap	10
2.4. Hasar Sonrası Peritonda Meydana Gelen Değişiklikler	15
2.5. Devamlı Yapılan Periton Diyalizinde Peritoneal Hasar	18
2.6. Enkapsüle Peritoneal Sklerozisin Deneysel Hayvan Modeli	20
2.7. Kininlerin Sentezi ve Metabolizması	21
2.8. Kallikrein-Kinin ve Renin-Anjiotensin Sistemleri Tarafından Üretilen Aktif 21 Peptidlerin Sentezi ve Reseptör Etkileşimleri	
2.9. Kallikreinler	22
2.10. Kininojenler	22
2.11. Bradikinin	23
2.12. Bradikinin Reseptörleri	24
2.13. Kallikrein ve Kininlerin Fonksiyonları	24
2.13.1. Ağrı	24

	Sayfa
2.13.2. Respiratuar Hastalık	25
2.13.3. Kardiyovasküler Sistem	25
2.13.4. Böbrek	26
2.13.5. İnflamasyon	26
2.14. Bradikinin'in Çeşitli Dokularda Antifibrinojenik Etkileri	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Deney Hayvanları	30
3.2.Çalışma Grupları	30
3.3. Histopatolojik Değerlendirme	33
3.4. İstatiksel Değerlendirme	34
4. BULGULAR	35
4.1. Hematoksilin-Eozin (H-E) Boyama Bulguları	35
4.2. PAS Yöntemi ile Boyama Bulguları	38
4.3. MMP-2 İmmünohistokimyasal Bulguları	40
4.4. TGF- β 1 İmmünohistokimyasal Bulguları	42
4.5. PAI-1 İmmünohistokimyasal Bulguları	44
4.6. Bradikinin-B2 İmmünohistokimyasal Bulguları	46
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE	Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
Ang	Anjiotensin
BK	Bradikinin
ECM	Ekstraselüler Matriks
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
GALT	Sindirim Sistemiyle İlişkili Lenf Dokusu
HMW	Yüksek Moleküler Ağırlıklı
ICAM	İntraselüler Adezyon Molekülü
IFN	İnterferon
Ig	İmmünglogulin
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL	İnterlökin
iNOS	Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
LMW	Düşük Moleküler Ağırlıklı
LPS	Lipopolisakkarit
LTB4	Lökotrien B4
MCP	Makrofaj Kemoatraktan Protein
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
MMP	Matriks Metalloproteinaz
NK	Doğal Katil Hücre
NO	Nitrik Oksit
PAF	Platelet Aktive Edici Faktör
PAI	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
PALT	Peritonla İlişkili Lenfoid Dokusu
PAS	Peryodik Asit Şift
PCAM	Platelet Hücre Adezyon Molekülü
PDGF	Platelet Büyüme Faktörü
PLA	Fosfolipaz A
PLC	Fosfolipaz C
PMN	Polimorfonükleer

SMA	Düz Kas Aktini
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TIMP	Doku Metalloproteinaz İnhibitörü
TNF	Tümör Nekroz Faktör
tPA	Doku Plazminojen Aktivatörü
uPA	Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü
VCAM	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

	Sayfa
3.1. Ozmotik mini pompaların doldurulması.	31
3.2. Ozmotik mini pompanın deneklerin sırtlarında cilt altına yerleştirilmesi.	32
3.3. Cildin kapatılması.	32
3.4. Peritondan örnek alınması.	33
4.1. Mezotelyal hücrelerdeki değişiklikler.	35
4.2. Submezotelyal kompakt zondaki değişiklikler	36
4.3. H-E boyama bulguları	38
4.4. Peritoneal membrandaki histolojik değişiklikler	39
4.5. PAS yöntemi ile boyama bulguları	40
4.6. Submezotelyal kompakt zonda MMP-2 immünohistokimyasal bulguları	41
4.7. MMP-2 immünohistokimyasal bulguları	42
4.8. Submezotelyal kompakt zonda TGF- β 1 immünohistokimyasal bulguları	43
4.9. TGF- β 1 immünohistokimyasal bulguları	44
4.10. Submezotelyal kompakt zonda PAI-1 immünohistokimyasal bulguları	45
4.11. PAI-1 immünohistokimyasal bulguları.	46
4.12. Submezotelyal kompakt zonda Bradikinin immünohistokimyasal bulguları	47
4.13 Bradikinin-B2 immünohistokimyasal bulguları	48

TABLÖLAR

	Sayfa
4.1. Mezotelial hücrelerdeki değişiklikler (H-E).	35
4.2. Submezotelial kompakt zondaki değişiklikler (H-E).	35
4.3. Peritoneal membrandaki histolojik değişiklikler.	38
4.4. MMP-2 immünhistokimyasal bulguları.	40
4.5. TGF- β 1 immünhistokimyasal bulguları.	42
4.6. PAI-1 immünhistokimyasal bulguları.	44
4.7. Bradikinin-B2 immünhistokimyasal bulguları.	46

1. GİRİŞ

Son evre böbrek hastalıklarında sıklıkla kullanılan peritoneal diyalizde rastlanılan en önemli problemlerden biri de enkapsüle peritoneal sklerozisdir (1). Enkapsüle peritoneal sklerozisin en karakteristik bulgularından biri peritoneal inflamasyonu takiben gelişen fibrozistir (2). Patofizyolojisi tam olarak ortaya konamamış olan bu sürecin engellenmesine yönelik araştırmalar halen devam etmektedir. Bu araştırmalar esnasında sıklıkla kullanılan modellerden biri de klorheksidin glukonat verilerek oluşturulan enkapsüle peritoneal sklerozis modelidir (6). Bu modelde periton diyalizinde meydana gelen sklerozisteki gibi submezotelyal alan belirgin olarak kalınlaşmakta ve bu alanda damar sayısında, kollajen birikiminde ve fibroblast sayısında belirgin artış ile fibrozis gelişmektedir (2).

Bradikinin ise vazodilatasyona neden olan, vasküler permeabiliteyi artıran inflamatuvar bir hormondur (3). Bu hormon etkilerini bradikinin-1 (B1) ve bradikinin-2 (B2) adı verilen reseptörler aracılığı ile farklı dokularda farklı şekillerde gösterirler (4). Antifibrotik etki de bu farklı etkilerden biridir. Yapılan araştırmalarda fibrozis geliştirilmiş olan böbrek ve karaciğer dokularında bradikininin antifibrotik etkiler de gösterdiği bildirilmiştir (5,6,7,8).

Peritoneal kavitede kininler ve bradikinin etkileri üzerine yapılmış bir takım çalışmalar da bulunmaktadır. Bu araştırmalardan birinde bradikininin mezotelyal hücrelerde intraselüler $[Ca^{2+}]$ 'u artırdığı ve bu etkisinin selektif B2 reseptör antagonisti olan HOE-140 ile inhibe edildiği gösterilmiştir (1). Böylece periton üzerinde bradikinin reseptörlerinin var olduğu ve bu reseptörler vasıtasıyla peritoneal hücrelerde bir takım etkileşimlere neden olabileceği ortaya çıkarılmıştır. Bu araştırmanın dışında peritoneal kavitede bradikinin peritoneal diyaliz işlemini hızlandırdığı (9), peritoneal inflamasyon gelişiminde rol oynadığı ve permeabiliteyi artırdığı (10) ve bu etkilerini bradikininin B2 reseptörler aracılığı ile peritoneal makrofajları aktiveleştirerek meydana getirdikleri gösterilmiştir (11,12,13).

Bu tez çalışmasında, klorheksidin glukonat verilerek oluşturulmuş enkapsüle peritoneal skleroziste bradikininin başka dokularda olduğu gibi antifibrotik etki mi, yoksa inflamatuvar süreci artırarak fibrozisi artırıcı etki mi göstereceği araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Periton Anatomisi ve Histolojisi

Periton vücuttaki en geniş seröz membrandır. Yüzey alanı 2 m² olup cilt ile hemen hemen aynı büyüklüktedir ve viseral organlar (viseral periton) ile abdominal kaviteyi (paryetal periton) kaplar. İkisinin arasındaki potansiyel boşlukta ince bir tabaka halinde, plazma ultrafiltratı olan seröz sıvı vardır (<100ml) (14). Paryetal kavitenin seröz membranları plevral ve perikardiyal kavitede bulunan membranlar ile aynı embriyolojik kökenden kaynaklanır.

Paryetal membran, mezenkimal kökenden gelen mezotelyal hücrelerin oluşturduğu tek kat bir tabakadır ve submezotelyum tarafından desteklenen, devamlılık gösteren bir bazal membranın üzerinde bulunur (15) ve üzerinde hiyaluronik asitten zengin glikoproteinden oluşmuş bir film tabakası vardır (glikokaliks) (16).

Submezotelyal tabaka farklı türlerde kollajen, glikoproteinler, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlardan oluşan matriksten meydana gelmiştir. Vasküler yapılar ve lenfatikler subserözal alanda bulunur. Sıvı difüzyon ve rezorpsiyonu mezotelyum ve submezotelyal stromadan serbestçe olur. Mezotelyal hücreler bazal membrana gevşek şekilde tutunmuşlardır ve hafif bir travmada rahatlıkla kopabilirler (17).

Periton, gastrointestinal sistemin, mesanenin normal fonksiyonlarını sağlayan ve kadın genital traktında fallopiyan tüplerin motilitesinde ve oositlerin yakalanmasında önemli bir rol oynayan peritoneal sıvı ile yakın ilişki halindedir. Peritoneal sıvı abdominal kavite içerisinde sirkülasyon halindedir ve lenfatik sistem aracılığı ile torasik kavitedeki plevral sıvı ve vasküler sistem ile devamlılık halindedir. Moleküller transüstasyon, eksüstasyon veya lenfatik sistem aracılığı ile peritoneal kaviteye girebilir veya peritoneal kaviteden çıkabilir. Mezotelyal hücreler, hacimleri yaklaşık 25 ml olup, yassı, uzamış, skuamöz veya küboidal görünümde olabilirler. Küboidal görünümdeki mezotelyal hücreler daha çok karaciğer ve dalak gibi parankimal organlara yakın mesafede, diyafram üzerinde ve lenfatik lakünleri kaplayan peritoneal kavitede bulunur (18-20)

Küboidal mezotelyal hücreler hasarlı veya uyarılmış mezotelyumda da görülebilir. Ultrastruktural çalışmalar skuamöz ve küboidal mezotelyal hücreler arasındaki belirgin farkları ortaya koymuşlardır. Skuamöz mezotelyal hücrelerin organelleri santral yerleşimli

olup yuvarlak veya oval çekirdeklere yakın mesafededirler. Az sayıda mitokondrileri, az gelişmiş Golgi cisimciği ve seyrek granüllü endoplazmik retikulumları vardır (21). Buna karşın, küboidal mezotelyal hücrelerin, üzerinde belirgin çekirdekçikleri olan çekirdekleri, belirgin granüllü endoplazmik retikulumları, Golgi cisimcikleri ve çok sayıda düzgün yüzeyleli vezikülleri vardır ve bu da dinamik biyosentez özelliklerini ve aktif transmembran transport yaptıklarını gösterir (22). Bu organellerden zengin hücreler arasında iletişim ağı vardır ve göreceli olarak da daha yoğun mikrovillus tabakaları bulunur (23). Bu hücrelerin peritoneal kavitedeki sıvı akışını sağlayarak patojenik kontaminasyondan arındırdıklarına inanılmaktadır (23).

Mezotelyal hücrelerin luminal yüzeylerinde çok sayıda mikrovilluslar bulunur ve bunlar fonksiyonel mezotelyal yüzeyi yaklaşık 40 m²'ye kadar genişleterek, mezotelyal hücreler ile peritoneal kavite arasındaki alışverişini artırır. Ancak bu mikrovilluslar labil yapılardır ve her hücre üzerinde bulunan mikrovillus sayısı farklı fizyolojik ve patolojik durumlarda değişkenlik gösterir (24). Su ve seröz eksudayı tutarak, hücreler için lubrikan gibi davranır ve böylelikle hassas mezotelyal yüzeyi sürtünme hasarından korur (15, 24-26).

Mezotelyal hücrelerin ayrıca apikal yüzeylerinde komşu mikrovilluslardan beş kat daha uzun olan silileri vardır. Sililer artmış detirozine ve asetile a-tübülün içeren mikrotübüllerden oluşmuştur. Golgi cisimciği ve hücre çekirdeği arasında yerleşmiş tek parental sentriolden uzanım gösterirler. Prolifere olan mezotelyal hücrelerde mikrovilluslar gözlenirken, sililer bulunmaz (27). Mezotelyal yüzeydeki sililerin miktarı artan hücre yoğunluğu ile birlikte artar. Bu da mezotelyal hücre polaritesinde ve hücreler arası adezyonda rol oynadığına işaret eder.

Dahası transdiferansiyasyon mezotelyal hücrelerde bulunan sililerin mezenkimal hücrelerdekine benzer şekilde matris proteinlerinin sentezini yönettiği ve koordine ettiği öne sürülmüştür. Epiteloid morfolojisi olan mezotelyal hücrelerde, sililer sürfaktan sekresyonunu regüle edebilme yetenekleriyle mezotelyal yüzeyi korur; ve peritoneal hasar veya peritonit esnasında peritoneal kavite içerisindeki humoral maddeleri veya mikrobiyal ürünleri tanıyabilen hücre koruma sistemine katkıda bulunabilir (27).

Tüm peritoneal kavite, immünohumoral faktörlerin peritoneal sıvı içerisinde yayılmasından dolayı sadece hasarlı olan bölgede değil jeneralize bir cevap sergiler (28, 29). Peritoneal hasar sonrasında peritoneal sıvı içerisinde plazmaya kıyasla çok daha fazla konsantrasyonda sitokin bulunur (29-31). Dahası peritoneal sitokinler kan akımı ile

tamamen abzorbe olmazlar ve abzorbe olan miktar ise karaciğer tarafından yıkılır ve plazmada dilüe olur (30). Aynı sitokinlere verilen peritoneal cevap plazmadakinden farklıdır ve bu da peritoneal cevabın bağımsızlığını gösterir (31). Bu sitokinlerin lokal etkileri küçümsenmemelidir çünkü periton ile beyin arasında direkt nöral iletişim ve bu iletişimi etkileyen lokal inflamatuvar medyatörler bulunmaktadır (32).

2.2. Peritonun Nöral İnnervasyonu

Paryetal periton segmental olarak üstte bulunan kaslara giden spinal sinirler ile innerve olurlar (16). Bundan dolayı diyafragmatik periton frenik ve interkostal sinirler ile, geri kalan kısımlar ise o bölgeye denk gelen interkostal, lumbar ve obturator sinirler ile innerve olur (33). Geleneksel olarak, ağrı lifleri kesin bir şekilde gösterilemediğinden visceral peritonun afferent siniri olmadığı düşünülmekteydi. Bundan dolayı, visceral ağrının visceral düz kasların spazmına veya mezenterik katlantıların üzerindeki gerilime bağlı olduğu düşünülmekteydi (16).

Son zamanlarda, afferent sinir uçlarında lokal sitokinlerin parakrin etkilerini ortaya koyan ayrı bir nöro-immüno-hümorale aks ortaya konuldu (34, 35). İki farklı tipte afferent uç bulunmaktadır: vagal afferentler ve gastrointestinal sistemden santral sinir sistemine ileti götüren spinal afferentler (36). Vagal afferentler intramüsküler veya intraganglioniktirler. Öte yandan, spinal afferentler serozada, submukoza ve gastrointestinal sistem mezenterinde yerleşmişlerdir. Barsak duvarına gelen sempatik ve parasempatik efferentlerin yollarını takip ederler (36).

Sistemik aktivasyonun aksine, postoperatif strese ve açlıktaki peritoneal yolların rolü halen tam olarak anlaşılamamıştır. Her iki sistemin de etkisinin olduğu düşünülmektedir (37). Sıçanlarda, subdiyafragmatik vagotomi intraperitoneal olarak verilen interleukin (IL)-1 β etkilerini bloke ederek vücut ısısındaki artışı engeller ve beyin ve plazma katekolaminleri artışı azaltır (38, 39). Fleshner ve arkadaşları da, abdominal kaviteye lipopolisakkarit verildikten sonra vagotominin ratların beyinde tümör nekroz faktörün (TNF)- α mRNA ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (40). Bundan dolayı da vagotominin intraperitoneal stimulusa verilen tepkiyi azalttığı, böylelikle vagusun cerrahi strese verilen yanıtta önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür (41).

Nöro-immüno-hümorale aksın klinik ile ilgisi geniş kapsamlı ve çok yönlüdür. Nöro-immüno-hümorale aksın aktiveşme derecesi cerrahinin büyüklüğü ve süresine bağılı olduğu düşünölmektedir. Peritoneal hasar sonrasında proinflatuar sitokin kaskadı, vagusun direkt etkisiyle birlikte postoperatif ağırı, halsizlik ve ileus ile yakından alakalıdır. Peritoneal sitokinlerin seviyeleri postoperatif komplikasyonlar ve halsizlik ile direkt ilişkilidir (42, 43, 44). Zargar-Shoshtari ve ark. (45) preoperatif tek doz deksametazon verilmesinin kolonik cerrahi sonrasında lokal peritoneal cevabın azaltılmasında etkili olduğunu lokal sitokinlerin konsantrasyonlarını ölçerek göstermişlerdir. Bu çift kör, randomize çalışma postoperatif halsizliğin, ağırının, bulantı ve kusmanın tedavi grubunda azaldığını göstermiştir. Gözlenen etkilerin lokal veya sistemik düzeylerde olup olmadığı net değildir ancak peritoneal inflamatuvar sitokinlerde gözlenen azalmanın lokal cevabın majör etken olduğunu düşündörmektedir.

İntraperitoneal kaviteye verilen lokal anestezi ajanlarının nöro-immüno-hümorale aksı bloke edip etmediği de araştırılmaktadır. Bugüne kadar, intraperitoneal lokal anesteziklerin postoperatif ağırıyı azalttıklarına dair sağlam kanıtlar gösterilmiştir, ancak lokal anestezikler ile nöro-immüno-hümorale aktivasyonunun blokajının diğer faydaları pek gösterilememiştir. Barsak motilitesinin iyileştiğine ve abdominal cerrahi sonrasında metabolik cevabın azaldığına dair bir takım klinik yayınlar bulunmaktadır (46-49). Rusya'dan bildirilen daha eski bir literatürde lokal anesteziklerle oluşturulan blokajın adezyon oluşumunu azaltabileceği bildirilmiştir (50). Vagal nöro-immüno-hümorale aks blokajının rolünün daha iyi ortaya konulabilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

2.3. Hasara Karşı Verilen Peritoneal İmmün Cevap

Periton insan immün sisteminin tamamlayıcı bir parçasıdır. Peritoneal lenfoid doku (peritoneum-associated lymphoid tissue (PALT)) ile doğal immün mekanizma ve sindirim sistemi lenfoid doku (gut-associated lymphoid tissue (GALT)) arasında ilginç bir ilişki olduğu açıktır (51). Periton enfeksiyonla 4 ana yoldan mücadele eder. Bunlar diyafragmatik pompa, doğal immün sistem, spesifik immün sistem ve hümorale cevaptır.

2.3.1 Diyafragmatik Pompa

Peritoneal kavite içersine enjekte edilen bakteri, enjeksiyondan 6 dakika sonra lenfatiklerde, fagositlerin bile bölgeye ulaşmasından önce, tespit edilebilir (52). Abzorpsiyon diyafragmatik peritonda bulunan gözeneklerden olur. Bazal membranın bu bölgede olmayışından dolayı bu gözenekler alttaki terminal lenfatik lakunalar ile direkt olarak ilişkilidir ve bunlar da diyafragmanın kas lifleriyle paralel olarak uzanarak ana torasik lenfatiklere dökülür (53). Ekshalasyon esnasında diyafragmatik hareketler lakunalara hızlı doluşu sağlarken inhalasyon esnasında ise kontraksiyonlar lakuna içeriğini efferent sisteme doğru ilerletir ve tersine akım torasik lenfatiklerdeki valvler aracılığı ile engellenir (53). Bu süreç bir takım faktörlerden etkilenir. Solunumu etkileyen genel anestezi veya abdominal yara ağrısı peritoneal kleransı azaltırken, pozitif basınçlı ventilasyon akımı hızlandırır (54, 55).

2.3.2. Doğal İmmün Sistem

Kompleman

Majör bir kontaminasyona karşı abdominal kavitedeki savunma, bakteri ürünleri ve inflamasyon nedeniyle aktive olan C3a ve C5a ile tetiklenir. Bu da nötrofillerin kemotaksisini, bazofillerin ve mast hücrelerinin yıkımını stimüle ederler.

Nötrofiller

Peritonda genellikle 300/mm'den az hücre bulunur. Bu hücrelerin arasında çoğunlukla makrofajlar ile bir miktar deskuame mezotelyal hücreler ve lenfositler bulunur. Batın cerrahisi, kontaminasyon veya enfeksiyon nedeniyle nötrofillerin sayıları 3000 hücre/mm'nin üzerine çıkabilir (56, 57). Interferon gamma (IFN- γ) inflamatuvar yanıt esnasında infiltre olan lökositlerin kontrolünde, kısmen buradaki hücrelerin kemokin sentezini regüle ederek rol oynuyor olabilir (58). Nötrofillerin peritona migrasyonu adezyon moleküllerine bağlıdır. Bu moleküller nötrofillerin damar duvarına bağlanmalarından ve sonucunda da ekstrasvazyonundan sorumludurlar (59, 60). Bu süreç P-selektin'e (ve bir ihtimal de L-selektin) bağlı gerçekleşmektedir. Ancak E-selektin'den bağımsızdır (59).

Peritoneal mezotelyal hücrelerde ve mikrovilluslarda intraselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve platelet endotelyal hücre adezyon molekülü-1 (PCAM-1) bulunmaktadır. Bunlar inflamasyon sonrası veya sitokin stimülasyon sonrası upregüle olurlar (ICAM-1 ekspresyonu stimülasyondan 24 saat sonra yaklaşık 8 kat artar) ve lökosit adezyonunda ve mezotelyumdan migrasyonunda rol oynadığı tahmin edilmektedir. TNF- α ve C5a gibi sitokinlerce aktive olmuş olan mezotelyal ve peritoneal endotelyal hücreler tarafından üretilen lökotrien B4 (LTB4) ve IL-8 gibi kemokinlerin de lökosit toplanmasında önemli bir rolü vardır (61, 62). Mezotelyumda kemotaktik gradien oluşturulması hücre trafiğinin derecesini ve yönünü tayin eden en önemli faktördür (63).

Makrofajlar

Peritoneal makrofajlar kemotaksis ile bakterilere doğru çekilirler (64). IFN- γ , IL-2 ve IL-12 ile aktive olur ve Leishmania ve Candida gibi patojenlere karşı etkindirler (65). IFN- γ aynı zamanda makrofaj ve mezotelyal hücrelerin yüzeylerinde majör histokompatibilite kompleks (MHC) klas II molekül ekspresyonunu da artırır. Bu moleküllerin antijen sunucu fonksiyonları vardır (66). Bu anlamda periton efektör hücre fonksiyonunu artıran bir lenfoid organ gibi görev alır (65).

Mast Hücreler

Peritoneal mast hücrelerinin degranülasyonu ile vazoaktif maddeler (bunlar da vasküler permeabiliteyi artırır), komplemanlar ve bakteri dış yüzeyini kaplayıp fagositoza hazırlayan opsinler salınır.

Monositler

Tek kat endotelyal tabakadan monosit migrasyonu daha çok nötrofil transmigrasyonu şeklinde olur ancak bu daha çok geç dönemde gerçekleşir (24 saat içerisinde).

2.3.3. Spesifik İmmün Sistem

T Hücreleri

Spesifik immün sistemin peritoneal etkileri T-hücre lenfopoezis'in ilk aşamalarına kadar izlenebilmektedir (67). Erişkin insan peritonu, T-lenfositlerinin timustan bağımsız diferansiyasyonu sağlayacak bir ortam sağlamaktadır (68). Bu T hücreler, timusta değişikliğe uğramış T hücrelerinden farklı özelliklere sahiptirler ve bu hücreler mezotelyal hücreler üzerinde bulunan VCAM-1 molekülleriyle ligand adezyonu yaparak periton içine göç ederler (69).

T hücreleri sekresyon paternlerine göre yardımcı T hücre alt gruplarına kategorize olur. IL-2 , IFN- γ ve TNF- α salgılayanlar Th1 olarak adlandırılır ve hücrel immüneyi yönetir. Diğer interlökinleri (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, and IL-13) salgılayan T hücreler ise Th2 olarak adlandırılır ve humoral immün cevabı regüle ederler. Sonuç olarak, Th1 ve Th2 hücreleri birbirlerinden farklı efektör fonksiyonları yönetirler ve bazılarının inhibitör etkileriyle inflamasyon ile anti-inflamasyon arasında denge oluşturulur (70). Süpresyon aktivite ihtiyacı ve iyi bir denge kommensal enterik bakterilere olan ihtiyaç için gerekirken aynı zamanda patojenik suşlara karşı direnç de olmalıdır (71).

Abdominal sepsis oluşturulan murine modelinde yapılan çalışmalarda farelerin çıkan kolonlarına ucu açık stent yerleştirilip bakteriyel floranın peritoneal kavite içerisine transmigrasyonu sağlanmış ve böylece endotoksemi oluşturulmuş (72). Süpresif aktivitenin enterik bakterilere karşı Th hücrelerinin cevabını kontrol ettiği gösterilmiş (73). Spesifik T-hücre alt tiplerinin (CD4+) ortadan kaldırılmasının farelerin sağ kalımlarını %25'ten %75'e çıkarmış ve bariz lokal bakteriyel klirens iyileşmiş (74). Bu azalmış peritoneal T hücre cevabının diğer organ kompartmanlarına kıyasla peritoneal sepsisin aşırı şekilde ortaya çıkmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüş.

B Hücreleri

İnsan fetal omentumunda, pre-B hücre öncüleri gestasyonun 8. ve 23. haftaları arasında bulunuyor olması bu B hücrelerinin transituar gelişimini destekler. B hücreleri erişkin peritonundaki lenfositlerin çok küçük bir kısmını oluşturur (<5%). İnsan B lenfositleri en az üç farklı B-lenfosit alt grubundan oluşur: (1) B1a hücreleri omentumdaki öncülerden

köken alırlar ve doğal olarak kendilerini yenilerler; (2) B1b hücrelerinin öncüleri splanknik alanda ve kemik iliğinde bulunur ve (3) B2 hücreleri fetal karaciğerinde ortaya çıkar ve erişkinlerde kemiklerdeki öncülerce yenilenirler (75).

Peritonda ve dalakta eşit sayıda B1a hücresi bulunmaktadır ancak bu hücreler dalak B hücrelerinin oldukça küçük bir bölümünü oluşturur. Dalak ve periton arasında az miktarda değişim gözlenmiş ancak splenektomi peritoneal B1 hücrelerinin sayı ve çeşitliliğini ciddi şekilde düşürmektedir (76). B2 hücreler dolaşımdan peritona iki yolla geçer. Direkt yolda spesifik integrinler (a4B1) B2 hücrelerinin peritoneal kaviteye geçmesini ve orada retansiyonunu sağlar. İkinci yol ise omental milky spotlar aracılığı ile gerçekleşir ve farklı bir integrin (a4B7) grubunu içerir. Omentumun cerrahi olarak rezeksiyonu dolaşımdan peritona migrasyonunu %40 oranında azaltırken ilginç bir şekilde bu kompartmandan B hücre çıkışını engellemez (77).

Geleneksel olarak peritoneal B hücrelerin ağırlıklı olarak immünglobulin (Ig) M salgıladıkları düşünülmektedir (78). Yeni yapılan araştırmalarda özelleşmiş CD8+ T hücrelerin normal insan peritonunda yoğun olarak bulunduğunu ve bunların daha az sitolitik aktivite gösterdikleri ve IgG ve IgA sentezi için yardımcı B hücre fonksiyonları gösterdikleri tespit edilmiştir (70).

Doğal Katil Hücreler

Doğal katil (NK) hücreler, viral olarak enfekte olan veya tümöral hücreleri ekstraselüler olarak apoptozise ve programlı hücre ölümüne sokarak yok edebilen büyük granüler lenfositlerdir (79). Bu hücreler peritonda da bulunurlar ve sayıları sitokin stimülasyonu ile artabilir (80).

Apse Formasyonu

Peritoneal kavitedeki apse formasyonu, peritoneal inflamasyon sırasında salgılanan vazoaktif ve prokoagülan maddelerin aktivitesi sonucunda ortaya çıkan fibrinin bir sonucudur. Normal fibrinolitik yollar peritonit esnasında süprese olur ve sonuçta ortaya çıkan fibrin pıhtıları bakterileri hapseder ve ortasında likefaksiyona uğramış merkezi çekirdek meydana gelir. Eksternal kısmı ise fagositlerle çevrelenerek güçlendirilir ve klasik

apse formasyonu ortaya çıkar (81). Bu süreç peritoneal sepsisin yayılmasını engeller ancak apse bir kez oluştuktan sonra genellikle ancak drenaj sonrası yok olur.

2.3.4. Hümmoral Cevap

Mezotelyal hücreler ve lokal peritoneal immünhücreler peritoneal hasara bir takım medyatörler salgılayarak cevap verirler. Bu lokal cevap lokal ve sistemik inflamatuvar ve onarım süreçlerinden sorumludur ve bu süreçler de hasara yanıtı ve klinik uygulamalarını tanımlar (42).

Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) peritoneal damarların endotelyumunda endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) aracılığı ile üretilen bir gazdır. eNOS olmadığında NO üretimi olmaz ve bu da inflamasyonun vasküler etkilerine yol açar (vazokonstriksiyon, düz kas hücre proliferasyonu ve koagülasyon elemanlarının aktivasyonu) (82). Sitokinler ve lipopolisakkarit (LPS) gibi bakteriyel ürünlerin eNOS seviyesini azalttığı bilinmektedir (82, 83). NO aynı zamanda enterik sinir sisteminde bulunan yapısal nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesi ile oluşturulur ve intestinal motilite regülasyonunda ana inhibitör nörotransmitterdir (84). iNOS ekspresyonu, cerrahi esnasında intestinal manipülasyon nedeniyle artar (84).

Kemokinler (İnterlökin-8 ve Lökotrien-B4)

Mezotelyal hücrelerin C5a ve TNF- α ile stimülasyonu sonucu önemli miktarda IL-8 ve LTB4 salgılanmaktadır ve bu ikisi nötrofillerin transmigrasyonunu yönetir (62). IL-8 büyük ihtimalle abdominal cerrahide rezeksiyon anastomoz alanında önemli bir rol oynamaktadır. İnsan çalışmaları rektal cerrahi uygulanan hastaların anastomoz alanlarında IL-8 seviyesinin koloni cerrahisi uygulananlardakilerden çok daha yüksek olduğunu göstermiştir (42). Bunun anastomoz kaçaklarının ve lokal nüks oranlarının daha yüksek olmasıyla bir alakası olup olmadığı kesin değildir. İnterlökin-8 tümör gelişimiyle ilişkilidir, reseptörlerine bağlandıktan sonra kolon kanserinde tümör hücre gelişimini artırır (85).

Monosit Kemo-Atraktan Protein-1 (MCP-1)

MCP-1 cerrahiye yanıt olarak peritoneal hücreler tarafından üretilir ve isminden de anlaşılacağı gibi bir monosit kemotaktik faktördür. İlginç olarak sepsis ile stimülasyonuna cevap olarak peritonun MCP-1 üretme kapasitesi peritonitli hastalarda büyük ölçüde azalmıştır (31). MCP-1'in geçici olarak üretiminin artışı kemokin sentezini azaltan endojen inhibitörlerin salgılanmasına bağlanabilir. Ancak, peritonitli hastaların kanlarında MCP-1 üretimi azalmaz. Bu da inflame dokulara aktive olmuş lökositlerin migrasyonunu sınırlar ve peritoneal kavitede kemotaktik gradienti azaltır ve hatta tersine çevirir (31). Bu kompartmanlaşmanın önemi bilinmemektedir.

Sitokinler

Peritoneal hasardan sonra sıralı, yüksek konsantrasyonlu peritoneal sitokin cevap ortaya çıkar (30). Bu sitokinler akut faz cevaplarında önemli rol oynar ve üretim miktarları cerrahinin süresi ve şiddetine bağlı olarak artar (42).

Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

TNF- α hasardan sonra peritonda üretilen ilk sitokinlerden biridir. Yarı ömrü 20 dakikadan az olsa da, TNF- α seviyesindeki az bir artış metabolik değişikliklere yol açmaya ve distalde sitokin kaskadını başlatmaya yeterlidir (86). Literatürde, septik hastalarda plazma TNF- α seviyesindeki artışın yıkıcı etkileri, bu sitokine karşı yapılan pasif immünizasyonla letalitenin düştüğü gösterilerek ispatlanmıştır (87). Ancak peritonit sırasında abdominal kavitedeki TNF- α 'nın lokal üretiminin koruyucu etkileri olabilir. Anti- TNF- α 'nın CASP farelerinde subletal durumu letal duruma çevirdiği görülmüştür. Dahası, rekombinant TNF- α ile tedavinin aynı modelde ratları koruduğu bildirilmiştir (88).

Yapılan çalışmalarda majör abdominal cerrahi uygulanan insanlarda takiplerinde kayda değer bir postoperatif durum olmazsa TNF- α seviyelerinin azaldığı ancak postoperatif komplikasyonu olan hastaların hepsinde komplikasyonun gelişimine paralel peritoneal TNF- α seviyeleri arttığı gösterilmiştir (89). Buna dayanarak peritoneal TNF- α seviyesinin aralıklı olarak ölçülmesinin, postoperatif komplikasyon ortaya çıkacak hastaların erken tespit edilmesinde faydası olabileceği düşünülmektedir. TNF- α 'nın aynı zamanda hücre kültüründe

vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) artırmak gibi bir takım anjiojenik özellikleri vardır (90).

İnterlökin-1

IL-1'in bilinen iki türü vardır: IL-1 α ve IL-1 β . IL-1 α ağırlıklı olarak hücre membranlarında bulunur, IL-1 β ise daha çok dolaşımda bulunur ve TNF- α 'nın fizyolojik ve metabolik etkilerine benzer etkiler sergilerler (86). Aslında, IL-1 β TNF- α 'dan hemen sonra üretilir ve salınır. Peritoneal makrofajlar IL-1 β 'nin kaynağıdır, buradan akciğere plazma veya direkt transüstasyon yoluyla ulaşarak bu bölgede hasar mekanizmalarında spesifik rol oynar. Bundan dolayı akut pankreatite bağlı akciğer hasarında önemli rol oynar. IL-1 β aynı zamanda in vivo ve in vitro olarak tümör growth faktör'ün (TGF- β) artmasını sağlayarak ciddi fibrojenik (ve aynı zamanda anjiojenik) özellikler gösterir (90).

İnsan mezotelyumun IL-1 β veya TNF- α ile deneysel tedavisinde, zaman ve doza bağımlı olarak hücre morfolojisinde hızlı değişiklik ve bariyer bütünlüğünde bozulma gözlenmiştir. Bu fenomen inflamatuvar ve neoplastik peritoneal hastalık süreçlerinin başlangıcında ve progresyonunda kritik rol oynuyor olabilir (91).

İnterlökin-6

IL-1 β artışını daha belirgin IL-6 cevabı izler — IL-1 β 'nin IL-6'yı indüklediğini gösteren tutarlı bir zaman çizelgesi vardır (92). IL-6'nın hasar sonrası akut faz cevabında majör bir medyator olduğu düşünülmektedir. Diğer sitokinlerle karşılaştırıldığında, IL-6 konsantrasyonu hastaların dolaşımında en istikrarlı bir şekilde artan sitokin olduğu bildirilmiştir, ve düzeyleri doku hasarının büyüklüğüne orantılı olarak artmaktadır (86). IL-6'yı üreten temel hücreler peritoneal kapillerlerdeki endotelial hücrelerdir. Peritoneal IL-6 üretimi cerrahinin ilk saatinde olur ve 4 saat sonra belirgin olarak artar ve 6 saat sonra da serumda belirgin artışı tespit edilebilir hale gelir, ve 10 gün boyunca da serumda kalmaya devam eder (86). Postoperatif erken dönemde, aşırı derecede artan IL-6 seviyesinden 12 ile 48 saat sonra majör komplikasyonları klinik olarak ortaya çıkar ve TNF- α 'ya benzer şekilde lokal ve/veya plazmada IL-6 seviyesinin rutin olarak ölçülmesi postoperatif sıkı takip

gereken hastaların tespitinde önemli bir rol oynayabilir (89, 92). Deneysel hayvan çalışmalarında, sistemik olarak verilen IL-6'nın, kolonik anastomozun iyileşmesinde direkt olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir (93).

İnterlökin-10

IL-10'un proinflamatuvar sitokinlerin bir kısmının üretimini inhibe edebildiği ve immünkompetan hücrelerin fonksiyonel özelliklerini azaltabildiği düşünülmektedir. Bu inflamatuvar sürecin dengede kalmasını sağlar. Anti IL-10 tedavisi peritonit oluşturulmuş bir modelde mortaliteyi arttırmaktadır (94). İntraperitoneal IL-10 seviyesinin rektum cerrahisinden sonra majör komplikasyonların klinik gelişimleriyle birlikte arttığı gösterilmiştir (89).

Antiinflamatuvar süreç IL-10'un bu etkilerinin yanı sıra mezotelyal hücrelerin glukokortikoid reseptörlerinden ve endojen TNF- α /IL-1 antagonistlerinden de etkilenmektedir (90).

Büyüme Faktörleri

Fasyal/peritoneal hasarının tamiri birkaç koordineli fazdan oluşur. TGF- α , TGF- β gibi büyüme faktörlerinin ve platelet büyüme faktörünün (PDGF) normal peritoneal iyileşmede önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (95). Mezotelyal hücreler normal homeostazda sınırlı bir hızda proliferasyon olurlar (herhangi bir anda mezotelyal hücrelerin %0.5'inden azı). Periton hasarı olduğunda (örneğin cerrahi esnasında), bölgedeki mezotelyal hücrelerin çoğunluğu dökülür. Buna yanıt olarak da hücrelerin %30'u ile 60'ı arasında değişen kısmı, büyüme faktörleri ile stimüle olarak mitozu uğrar (96).

Hasardan sonra büyüme faktörleri, TGF- β ve IL-10'un bazal mRNA seviyelerini önemli seviyelerde artırır ve peritoneal fibroblastlar üzerinde mitojenik etki gösterirler (97). Bunların etkisiyle interstisyel kollajen birikimi ve adezyon formasyonu meydana gelir (98). Peritoneal adezyonlar organlar arasında veya organlar ve karın duvarı arasında oluşmuş makroskopik fibröz bantlardır. Viseral periton lezyonlarından sonra adezyon

oluşma ihtimali paryetal periton lezyonlarından sonra oluşmasından daha fazladır (99). Mikroskopik olarak bu bantlar remodellinge uğrayan dinamik yapılardır. Adezyonlar total kollajen içerikleri arttığında ve kollajen tip I/III oranı daha yüksek olduğunda daha yoğun görünürler ve hipoksiyle daha da artar (100). Eski olgunlaşmış adezyonlar hücre açısından zengindirler, mononükleer hücre, fibroblast ve vasküler endotelial hücre infiltratları içerirler (101). Yeni adezyonlardan daha az kollajen ve göreceli olarak daha fazla adipoz dokuya sahiptirler (102).

Koagülasyon Kaskadı

İnsan peritonunda koagülasyon kaskadının önemi büyük oranda fibrinolitik aktivitesine bağlıdır, adezyonları oluşturan fibrinöz birikimlerin lizisi için önemlidir (113). Fibrinolizis makrofajlar ve mezotelial hücrelerden üretilen plazmin adlı enzimle meydana gelir (104). Plazmin, inaktif substrat olan plazminojenden, doku plazminojen aktivatörü (tPA) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (uPA) aracılığı ile üretilir. Buna karşılık da tPA, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) tarafından dengenin oluşturulması için inhibe edilir.

Hasarsız mezotelial hücrelerin fibrinolitik aktiviteleri cerrahi sonrası adezyonların önlenmesinde önemli olabilir (105). Eğer yetersiz fibrinolitik aktivite olursa, fibrin matrisin organizasyonu ve adipoz dokunun yerini alan ekstraselüler matris ve hücrel ve vasküler gelişme adezyona yol açar (96, 106). İnflame veya hasarlı peritonda fibrinolitik aktivite normal dokudan önemli ölçüde daha azdır. TNF- α ile stimüle olan mezotelial ve endotelial hücrelerinden üretimi artan PAI-1'in azalan fibrinolitik aktiviteden kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir (107). Ancak, deneysel çalışmalar peritoneal sıvıda plazmadakinden daha yüksek intraoperatif tPA düzeyleri olduğunu ancak PAI-1 ve uPA seviyelerinin benzer seviyelerde olduğunu göstermiştir ve bu da spesifik lokal yanıtın olduğunu düşündürmektedir (108).

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılmış olan araştırmalarda adezyon regülasyonunda peritoneal fibrinolitik sistemin önemi gösterilmiştir. İnsanlarda hem azalmış postoperatif tPA aktivitesi hem de artmış PAI-1 seviyesi peritoneal kavitede gösterilmiştir ve adezyonlarla paralellik göstermiştir (109, 110). Hayvan modellerinde intraperitoneal olarak verilen aktif tPA'nın postoperatif peritoneal fibrinolitik aktiviteyi arttırdığı ve PAI-1'in spesifik bir antikor ile bloke edilmesinin adezyon formasyonunu azalttığı yapılan

çalışmalarda gözlenmiştir (111, 112). Dahası tPA geninden arındırılmış farelerde batın operasyonlarından sonra kontrol gruplarına kıyasla daha fazla adezyon oluşmaktadır (113). Benzer şekilde periton hasarı sonrasında ratlarda insan tPA geni kodlayan adenovirusların verilmesinin PAI-1, TIMP-1, TGF- β 1 ve fibrinojen seviyelerini anlamlı olarak azalttığı gözlemlenmiştir (114).

Matriks Metalloproteinazlar

Matriks metalloproteinazlar (MMPLer) ekstraselüler matriksin yeniden yapılanmasından sorumlu olan primer enzimlerdir. MMPLer ekstraselüler matriks (ECM)'in tüm komponentlerini yıkabilen, çok sıkı kontrol edilen, çinko bağımlı 28 üyesi olan bir endopeptidaz ailesidir. Zimojen formunda salgılanırlar ve aktivasyonları için propeptidin bir kısmının klivajı gerekir. MMPLer, doku metalloproteinaz inhibitörü (TIMP) adı verilen 4 spesifik inhibitör tarafından inhibe edilir (TIMP1-4). TIMPLer ile aktive olmuş olan MMPLer arasındaki denge, toplamdaki MMP aktivitesini tanımlar. Normal dokularda MMP ekspresyonu minimaldir. Ancak inflamatuvar durumlarda meydana gelen doku onarımlarında olduğu gibi aşırı derecede yeniden biçimlenme olursa, MMP ekspresyonu belirgin artar (115).

2.4. Hasar Sonrası Peritonda Meydana Gelen Değişiklikler

Mezotelyal hücreler normal hemostazda belli bir hızda proliferere olurlar (herhangi bir anda sadece mezotelyal hücrelerin %0.16 ile %0.5'i mitoz halindedir). Bu oran periton hasarı ile birlikte %30-60'a kadar yükselir ve genellikle de artan büyüme faktörleri ve sitokinlerden kaynaklanır (116). Periton hasarı ister cerrahi, inflamatuvar veya iskemik kökenli olsun, hasar gören mezotelyal hücrelerin deskuame olmalarına ve çıplak bir alan kalmasına neden olurlar. Sonuçta seroanjiöz eksuda meydana gelir ve mezotelyal hücrelerin büyüme cevabı vermelerine neden olur (117). Bu bölgedeki yerleşik hücreler, hasar görmüş mezotelyal hücreler ve yeni gelen inflamatuvar hücreler, vasküler permeabilitenin artmasına ve polimorfonüleer (PMN) granüositlerin, monositlerin ve lökositlerin inflamasyon bölgesine migrasyonuna yol açan hücresel medyatörler üretirler. Akut faz cevabında rol

oynayan bu medyatörler arasında kemoatraktanlar (IL-8, MCP-1), sitokinler (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) ve büyüme faktörleri (TGF- β , IGF-1 and PDGF) bulunur. Hasarlı alanda ilk beliren hücreler PMN hücrelerdir ve hasarlı alanda 1-2 gün kalırlar. Bunları monositler takip ederler, makrofajlara dönüşerek yaralı alana tutunurlar. Ayrıca hücrel medyatörlerin artmış üretimiyle, makrofajların ve mezotelyal hücrelerin doku faktör (TF) ekspresyonları artar. Bu da koagülasyon kaskadının ekstrensek yolağının aktivasyonuna ve sonucunda da geçici fibrinöz matriks oluşumuna yol açar. Fibrin matriks sonuçta organize olur ve fibroblastlar, makrofajlar ve dev hücreler içeren bir dokuya dönüşürler. Bu hasarlı iki peritoneal yüzeyi bir araya getirerek fibrin bantlar oluşturur ve normal şartlar altında fibrinolizis ile daha küçük yapılar olan fibrin yıkım ürünlerine parçalanırlar.

Fibrinolizis proçesi, makrofajlar ve peritoneal kaviteyi saran mezotelyal hücreler tarafından üretilen plazmin isimli enzim tarafından yürütülür (118). Plazmin, inaktif substrat plazminojenden doku tipi plazminojen aktivatör (tPA) ve ürokinaz benzeri plazminojen aktivatör tarafından oluşturulur. Buna karşılık tPA, PAI-1 ile dengenin korunabilmesi için inhibe edilir. Abdominal kavitede, tPA plazminojen dönüşümünün %95'inden sorumludur (119). Ancak, intra-abdominal cerrahi tPA ve PAI-1 arasındaki dengeyi bozar ve fibrinolitik aktivitenin azalmasına, fibrin eksudanın artmasına ve sonuçta adezyon formasyonunun artmasına neden olur (120).

Periton hafifçe hasarlandığında ve mezotelyal hücrelerin çoğunluğu intakt olduğunda, fibrinogenez ve fibrinolizis arasında dinamik bir denge olacak ve adezyon olmaksızın oluşacak iyileşme meydana gelecektir. Operasyon esnasında daha şiddetli bir travma olduğunda, mezotelyal bütünlüğün bozulması alttaki bağ dokusunu ortaya çıkaracak ve normal fibrinolitik aktivite travma sonrasında en az 48 saat içerisinde sona erecektir (121). Fibrinöz adezyonlar çoğalan fibroblastlar ve endotelial hücrelere bağlı olarak organize olacak, sitokinler ve büyüme faktörleri ile stimüle edilen kapiller formasyonun ve kollajenin de eklenmesiyle fibröz adezyonlar meydana gelecektir (4 ile 10. günler arasında) (121). Ancak, küçük veya şiddetli travmalarda, re-epitelizasyon travma sonrasında 5 ile 8. günler arasında tamamlanır.

Periton şu şekilde iyileşir: Periton travmatize olduktan 4-7 gün sonra, peritoneal yüzeyde baskın hücreler mezotelyal hücrelerdir ve bu hücreler yara tabanı boyunca proliferasyon olarak hücre adacıkları meydana getirirler. Bu adaların oluşmasından dolayı, peritoneal yüzeyde meydana gelen geniş hasarlar daha ufak alanlarda oluşan hasarlar ile

aynı sürede iyileşirler. Peritoneal hasarın, yara tabanında damarların yetersiz oranda gelişiminden dolayı veya yeterli oranda gelişse bile yetersiz kan akımı olacağından dolayı iskemiye yol açacağı öne sürülmektedir (17).

İskeminin fibrinolitik aktiviteyi azaltacağı ve bundan dolayı da fibrin bandların kalıcı olacağına inanılmaktadır. İlk kez Porter ve ark. insan peritonunda plazminojen aktivatör aktivitesini ortaya koymuşlardır daha sonra araştırmalarını mezotelyumda plazminojen aktive edici etkisi üzerinde odaklamışlardır (122). Fibrinolitik aktivite hem insanlarda hem de hayvan modellerde peritoneal sıvı içerisinde tespit edilmiştir. PAI aktivitesi insan peritoneal hücrelerinde saptanmıştır (119). İnflame peritoneal dokuda peritoneal plazminojen aktivatörlerin aktivitesi önemli oranda azalmıştır. Bunun nedeni kısmen PAI konsantrasyonunun artmasıdır ve sonucunda da fibrinolitik kapasite azalmasına yol açarak adezyon formasyonunu ortaya çıkar.

Plazmin, PA ve PAI'nin yanı sıra, TGF- β , MMP ve sitokinler gibi başka bir takım faktörler de birbirlerini etkileyerek peritoneal iyileşmede rol oynar. TGF- β , plateletler, makrofajlar ve yara sıvısında bulunur ve yaralanmanın inflamatuvar yanıtın akut fazında plazmin tarafından aktive edilir. Kollajen ve fibronektinin fibroblastik üretiminin stimüle edilmesi ile ekstraselüler matriks yapımında ve aynı zamanda doku fibrozisinde de rol oynar. TGF- β 'nın overekspresyonu artmış adezyon formasyonu ile ilişkilidir (123).

Matriks metalloproteinazlar ve inhibitörleri (MMP doku inhibitörleri, TIMP) paryetal peritonda ve bazı intraperitoneal organlarda bulunur. Özellikle de mezotelyal hücreler ve bölgeye gelen PMN'ler bu enzimleri salgılar. Plazmin tarafından aktive edilen MMP'ler hasarlı ECM'nin tüm bileşenlerini yıkma kapasitesine sahiptir ve böylece yara iyileşmesi sürecine katkıda bulunurlar. Ancak, hasardan dolayı MMP ve TIMP arasındaki denge değişir ve adezyon formasyonuna yol açan bir başka faktör haline gelir.

Daha önceden de belirtildiği gibi, travma yanıt olan peritondaki akut inflamasyonun bir sonucu olarak, kemotaktik mekanizmalar ile esas olarak makrofajlardan oluşan bir hücre göçü meydana gelir. Bu makrofajlar plazmin ile aktiflenerek, yara iyileşmesinde önemli faktörler olan IL-1 ve TNF- α 'yı üretirler (124). IL-1 sonuçta IL-6'nin ekspresyonunu artırır ve TNF- α ile birlikte fibrinolitik sisteme etki ederler ve tPA aktivitesini azaltırlar (125). Böylece tPA/PAI arasında dengesizliğe yol açarak daha az fibrinolitik aktiviteye neden olur ve sonuçta da adezyon gelişiminde rol oynar.

Özetlenecek olursa, periton abdominal kavite içerisindeki koruyucu etkisi olan bir organ gibi değerlendirilmelidir.

Peritoneal sıvının üretilmesini ve molekül alışverişine olanak sağlayarak hemostazi sağlar ve böylece intra-abdominal organların fonksiyonlarının düzgün işlemesi için uygun ortam sağlar. Cerrahi veya inflamatuvar bir süreçle ilgili olarak travmatize olduğunda, peritonun hasarlı alanında rejenerasyon amaçlı bir seri yanıt ortaya çıkar. İnflamatuvar hücrelerin gelmesine ve aynı zamanda mezotelyal hücrelerin aktive olmasına neden olan primer inflamatuvar reaksiyon meydana gelir ve sonuçta bu da fibrinöz eksuda oluşturur. Travmanın şiddetine göre, fibrinolizise bağlı olarak bu eksuda geçicidir veya fibroblastların kalıcı hale gelmelerine bağlı olarak daha yoğun bir hal alarak fibrinöz adezyonlara yol açar. Bu alana gelen hücreler ve hali hazırda bulunan yerleşik hücreler tarafından salgılanan sitokinler ve proteinazlar da rejenerasyon sürecinde rol oynar. Plazmin ile inhibitörleri ve indükleyicileri asıl düzenleyici rolü oynarlar. Esas olarak tPA/PAI oranı fibrinolizis miktarında ve dolayısıyla da adezyon formasyonunda etkili olur.

Sonuç olarak, hasarın oranı hasara verilen inflamatuvar yanıtın miktarı ve yaygınlığını etkileyen faktördür, inflamatuvar reaksiyon da sonuçta adezyon oluşumunun yaygınlığını etkiler. Bu intraabdominal cerrahi sırasında dikkat edilmesi gereken önemli bir unsurdur.

2.5. Devamlı Yapılan Periton Diyalizinde Peritoneal Hasar

Devamlı yapılan periton diyalizi peritoneal fibrozise yol açan bir başka klinik durumdur. Periton diyaliz hastalarında, peritoneal membran ultrafiltrasyon difüzyonun gerçekleştiği geçirgen bir bariyer görevi görür. Ancak, diyaliz solüsyonlarına uzun süreli maruziyet, sürekli artış gösteren fibrozise ve sonunda da ultrafiltrasyonun meydana gelememesine neden olur (126). Ancak, fibrozis peritoneal membranda meydana gelen tek yapısal değişiklik değildir; fibrozise paralel olarak, peritonda submezotelyal kollajen birikimi ve mezotelyal hücrelerde kayıp meydana gelir ve progresif olarak kapiler damar sayısı artar (anjiojenез) ve vaskülopati meydana gelir (127). Peritoneal inflamasyonu takiben gelişen bu fibrozis, enkapsüle peritoneal sklerozisin (EPS) en karakteristik bulgularından biridir (6). İnflamatuvar süreçte mezotelyal hücreler granülositlerden, makrofajlardan ve endotelial hücrelerden salgılanan medyatörler ile stimüle olurlar (128). Bu yapısal ve fonksiyonel

değişikliklerde TGF- β , interlökinler, tPA, PAI-1 ve MMP'lerin rolleri klorheksidin glukonat ile meydana getirilen peritoneal fibrozis modellerinde gösterilmiştir (113, 129).

EPS'nin klinik olarak genellikle sessiz ve yavaş bir biçimde intermittan veya kısmi barsak tıkanıklıkları ve değişik derecelerde sindirim sistemi yetmezliğine neden olur (130). Majör semptomları bulantı, kusma ve karında distansiyon ve ağrı ile diyare, konstipasyon, ateş, anoreksiya, halsizlik, kilo kaybı ve malnütrisyonudur (131). Peritoneal adezyonların bulguları arasında asit, kanlı diyalizat, karın ağrısı ve palpabl abdominal kitle vardır (130). Bu bulgular ince barsak tıkanıklığı ile uyumlu olsa da tanısız değildir. Düz grafilerde ve ultrason görüntülemelerinde dilate barsak segmentleri ve hava-sıvı seviyeleri tanı için destekleyicidir ancak tomografi en kesin tanıya yaklaşım metodudur. Tomografide kalınlaşmış periton ve ince barsak duvarları, aderan barsak lupları ve loküle sıvı koleksiyonları ile barsak tıkanıklığı görüntülenebilir (132). Kesin tanı peritonun patolojik görüntüsünün laparotomi veya laparoskopi ile ortaya konulması ve peritoneal biyopsi ile konulur (131). Yapılan klinik araştırmalarda EPS prevalansının uzun yıllar boyunca periton diyalizi kullanan son evre renal hastalığı olan hastalarda, hemodiyalize geçen hastalarda ve trasplantasyon yapılmış olan hastalarda arttığı gösterilmiştir (133, 134). Posttransplant erken evrede hızla EPS geliştiğini bildiren seriler nedeniyle hastalığın başlamasında ve progresyonunda inflamasyonun ve immün sistemin rolü sorgulanmaya başlanmıştır (134). Daha önce geçirilmiş olan bakteriyel peritonit ve konsantre dekstroza, icodekstrin gibi diyalizat solüsyonlarının içerdiği maddeler ve dezenfektanların da rol oynadığı bildirilmiştir (133, 135).

Transgenik fareler üzerinde yapılan araştırmalarda, fibroblast-spesifik protein kontrolü altındaki herpes simplex virus-timidin kinaz ekspresyonu olan fibroblastlar, fibroblastların ve sitokinlerin, monosit kemoatraktan protein-1, heat shock protein-47 (HSP-47) ve vasküler endotelial büyüme faktörünün EPS gelişiminde önemli rol oynadığını göstermiştir (136).

İnflamasyondan fibrozise geçişte anahtar medyatörler olan MMP'ler klorheksidin glukonat sıçan modellerinde araştırılmıştır ve peritoneal hasarla birlikte aktive oldukları gösterilmiştir (137). Klorheksidin glukonat verilen sıçanlarda MMP-2 inhibisyonu ve metalloproteinaz doku inhibitörlerinin submezotelyal kalınlaşmayı, tip 1 kollajen, TGF- β ve α -SMA'yı (alpha-smooth muscle actin) azalttığı gösterilmiştir (138). Bir başka araştırmada ise klorheksidin kullanılarak yapılmış olan EPS modelinde, hepatosit büyüme faktörü üretmek üzere modifiye edilmiş olan rekombinant sıçan mezotelyal hücreler intraperitoneal

aralığa yerleştirildiğinde TGF- β 'yi azaltmış ve angiogenezi, submezotelyal kalınlaşmayı, fibroblastik proliferasyonu ve ultrafiltrasyondaki azaltmayı parsiyel olarak düzelttiği gözlenmiştir (139). Yazarlar hepatosit büyüme faktörünün az üretilmesinin sklerozise katkıda bulunabileceği yorumunda bulunmuşlardır.

Moleküler biyoloji ve hücre kültürü tekniklerinin beraber kullanılması ile periton diyaliz hastalarında ve buna paralel olarak hayvan deneylerinde TGF- β 'yi daha fazla üretmek üzere değişen mezotelyumun, aslında epitelyal fenotipteki mezotelyumun mezenkimal hücre tipine (fibroblast ve miyofibroblast) dönüşmesinin EPS gelişiminde önemli bir basamak olduğunu düşündürmektedir (140,141). Son yapılan araştırmalarda miyofibroblastların peritoneal diyaliz hastalarının çoğunluğunda geliştiği görülmüştür ancak bu hücrelerin peritonit, ultrafiltrasyon kaybı veya submezotelyumun kalınlaşması ile korelasyonu gösterilememiştir (142).

2.6. Enkapsüle Peritoneal Sklerozisin Deneysel Hayvan Modeli

EPS'nin deneysel hayvan modelleri patogenezin aydınlatılmasında önemli rol oynamışlardır (143). Yapılan araştırmalar daha çok klorheksidin glukonat ve povidon iyodin üzerinde odaklanmıştır (144, 145). Klorheksidin glukonat ve alkolün EPS patogenezinde oynadığı rol ilk olarak 1985 yılında Junor ve ark. tarafından belirtilmiştir (146). Kateter değiştirirken kullanılan alkol içerisindeki klorheksidin glukonatın klinik EPS'nin patogenezinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. Meydana gelen kimyasal irritasyon, steril peritonit, kronik inflamasyon ve peritoneal fibrozisin tümü, peritoneal sklerozis oluşmasında rol oynayan faktörlerdir. Günlük intraperitoneal klorheksidin glukonat enjeksiyonu ile oluşturulan fare modelinde benzer özellikler izlenmiştir. Bunlar 3. gün hafif ödem ve hafif monosit infiltrasyonu; 7. günde ödeme bağlı submezotelyal kalınlaşma, 3. haftada kalınlaşma, fibrozis, artan monosit infiltrasyonu ve 8. haftada kollajen birikimiyle inflamatuvar süreç oluşumu ile beraber fibrotik skar, adezyon ve enkapsülasyondur (147, 148).

2.7. Kininlerin Sentezi ve Metabolizması

Bradikinin (BK) bir nonapeptiddir. Kallidin'de ise N- terminal ucunda ilave bir lizin kalıntısı vardır ve bu nedenle bazen lizil-bradikinin olarak adlandırılır. Her iki peptid de kininojen adı verilen ve sirkülasyonda bulunan α_2 globulinlerden üretilir. İki kininojen vardır. Bunlar yüksek moleküler ağırlıklı (High molecular weight – HMW) ve düşük moleküler ağırlıklı (low molecular weight – LMW) kininojendir. Kininleri bir takım serin proteazları oluşturur. Ancak kininojenlerden kallidin ve bradikinin oluşturan yüksek özgülüğü olan proteazlar kallikrein olarak adlandırılır.

2.8. Kallikrein-Kinin ve Renin-Anjiotensin Sistemleri Tarafından Üretilen Aktif Peptidlerin Sentezi ve Reseptör Etkileşimleri

Bradikinin (BK) plazma kallikrein'i tarafından yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) kininojen'den, kallidin ise düşük moleküler ağırlıklı (LMW) kininojenden doku kallikrein'i tarafından hidrolize uğrayarak oluşturulur. Kallidin ve BK B2 reseptörlerin doğal ligandlarıdır ancak B1 reseptörlerinin agonistleri olabilmeleri için C-terminal uçtan arjinin'in kininaz I-tip enzimleri tarafından kopartılması gerekir. Bu enzimler plazma membranına bağlı karboksipeptidaz M ve çözülebilir plazma karboksipeptidaz N'dir. Benzer şekilde inaktif decapeptid anjiotensin I (Ang I), renin tarafından substratı olan plazma anjiotensin'den oluşturulur. C-terminal uçtaki His-Leu dipeptidi'nin ayrılması ile anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE), aktif peptid olan anjiotensin II'yi ortaya çıkarır. Bu iki sistem birbirinin karşıtı etkilere sahiptir. Anjiotensin II bir vazokonstriktör ajandır ve aynı zamanda aldosteron salgılanmasını sağlar ve AT1 reseptör aktivasyonu ile sodyum retansiyonuna neden olur. Öte yandan, BK ise vazodilatör etkili ajandır, B2 reseptörünü aktive ederek sodyum atılımını artırır. Anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE), aktif anjiotensin II oluşturur ve aynı zamanda BK ve kallidin'i inaktive eder. Bundan dolayı prohipertansif etkileri vardır ve ACE inhibitörleri etkin antihipertansif ajanlardır. B2 reseptörleri normal şartlarda BK'nin çoğu etkisini ortaya çıkarır. B1 reseptörlerin sentezi ise inflamatuvar medyatörler ile indüklenir ve kronik inflamatuvar hadiselerde majör rolü oynar. B1 ve B2 reseptörleri bağlı oldukları G_q proteinleri aracılığı ile PLC'yi aktive eder ve intraselüler Ca^{2+} u artırır. Verilen fizyolojik yanıt belli hücre tiplerinde reseptör dağılımına ve agonist peptidlerin miktarına bağlıdır. Örneğin, endotelial hücrelerde B2 reseptör aktivasyonu Ca^{2+} -calmodulin'e bağımlı eNOS aktivasyonuna ve NO

üretimine neden olur. Bu da cGMP birikimine ve komşu düz kas hücrelerinde relaksasyona neden olur. Düz kas hücrelerinde, aynı şekilde etkileşim gösteren kinin reseptör aktivasyonu intraselüler Ca^{2+} 'u artırır ve kontraksiyona neden olur. B1 ve B2 reseptörleri bağlı oldukları G_i aracılığı ile PLA_2 araşidonik asit, prostanooid ve diğer metabolitlerin salgılanmasına neden olur (149).

2.9. Kallikreinler

Bradikinin ve kallidin yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) ve düşük moleküler ağırlıklı (LMW) kininojenlerden plazma veya doku kallikrein ile oluşturulur. Plazma kallikrein ve doku kallikrein farklı mekanizmalar ile aktive olan farklı enzimlerdir (149). Plazma prekallikrein inaktif bir proteindir ve substratı HMW kininojendir. Proteolitik kaskad plazmada bulunan proteaz inhibitörleri ile kontrol edilir. Bunların arasında en önemlileri aktive olan kompleman sisteminin ilk komponentinin inhibitörü (C1-INH) ve α_2 -makroglobulin'dir. Yapılan deneysel çalışmalarda, kallikrein-kinin sistemi faktör-XII'nin (Hageman faktörü) negatif yüklü yüzeylere bağlanması ile aktive olur. Faktör XII hem de intrinsik koagülasyon kaskadlarında proteaz olarak görev alır ve kallikrein'i aktive eder. Dahası kallikrein faktör XII'yi daha da aktive eder ve böylece sistem üzerinde pozitif bir feedback oluşturur. In vivo olarak HMW kininojen-prekallikrein kompleksinin endotelial hücreler üzerindeki multiprotein reseptör kompleksine bağlanması ile lizozomal bir enzim olan proilkarboksipeptidaz tarafından prekallikrein aktive edilir(150). Kallikrein faktör XII'yi aktive eder, HMW kininojeni parçalar ve proürokinaz'ı aktive eder (150).

2.10. Kininojenler

Kallikreinlerin iki substratı olan HMW kininojen ve LMW kininojen tek bir gen tarafından kodlanır, farklı ayrışmalar sonucunda farklı moleküller haline gelirler. HMW kininojen ve LMW kininojen fonksiyonel alanlara ayrılmışlardır (151). HMW kininogen plazma ve doku kallikreini tarafından parçalanarak bradikinin veya kallidin oluşurken, LMW sadece doku kallikrein'i tarafından parçalanır ve sonucunda da sadece kallidin ortaya çıkar. Kininojenler aynı zamanda sistein

proteinazları ve trombin bağlanmasını inhibe eder ve antiadeziv ve profibrinolitik özellikler gösterirler.

2.11. Bradikinin

Dekapeptid kallidin bradikinine dönüşmeden önce hemen hemen nonapeptid bradikinin kadar aktiftir. Bradikinine dönüşümü N-terminal uçtaki lizin kalıntısının plazma aminopeptidazları tarafından kopartılması ile oluşur. B2 reseptörü üzerinde klasik yanıtların alınması için minimal efektif yapı nonapeptiddir.

Kininlerin yıkım süresi çok kısadır, plazmadaki yarı ömürleri yaklaşık sadece 15 saniyedir ve kininlerin %80 ile %90 pulmoner vasküler yataktan tek geçişte yıkılırlar. Bradikininin plazma konsantrasyonlarının ölçümü güçtür çünkü kandaki kininojenazların veya kininazların yetersiz inhibisyonu hatalı formasyonlara veya kan alınırken bradikininin yıkımına neden olurlar. Bundan dolayı bradikininin bildirilen fizyolojik konsantrasyonları pikomolar ile femtomolar arasında değişmektedir.

Kandaki ve diğer vasküler yataklardaki katabolizmayı sağlayan temel enzim kininaz II veya ACE'dir. C-terminal uçtaki dipeptidin kaldırılması kinin benzeri aktiviteyi ortadan kaldırır. Nötral endopeptidaz 24.11 veya neprilisin de C-terminal uçtaki dipeptidin kaldırılmasıyla kininleri inaktive eder (149). Daha yavaş etkili bir enzim olan karboksipeptidaz N (lizin karboksipeptidaz, kininaz I), C-terminal uçtaki arjinin kalıntısını serbestleyerek B1 kinin reseptör agonisti olan [des-Arg⁹]bradikinin ve [des-Arg¹⁰]kallidin ortaya çıkarır (149). Karboksipeptidaz N plazmada sabit olarak 10^{-7} M konsantrasyonunda bulunur. Karboksipeptidaz M de temel C-terminal uçtaki amino asitleri ayırır ve yaygın olarak bulunan plazma membranına bağlı bir enzimdir (149). Son olarak da aminopeptidaz P, N-terminal uçta bulunan N-terminal arjinini ayırarak bradikininini inaktive eder ve bradikininini dipeptidil peptidaz IV tarafından daha da fazla yıkılmaya uygun hale getirir.

2.12. Bradikinin Reseptörleri

Kininlere spesifik en az iki tane reseptör olduğu tespit edilmiştir. Bu reseptörler B1 ve B2 reseptörleridir (149). Bradikinin B2 reseptörü normal dokuların çoğunda bulunur ve selektif olarak bradikinin ve kallidine bağlanır ve etkilerinin çoğu bu reseptör aracılığı ile ortaya çıkmaktadır. B1 reseptörü selektif olarak karboksipeptidaz N ve M tarafından oluşturulan bradikinin'in ve kallidin'in C-terminal ucundaki des-Arg metabolitlerine bağlanır. B1 reseptörü çoğu dokuda ya yoktur veya çok az düzeyde bulunur. B1 reseptörünün ekspresyonu, inflamasyon, sitokinler, endotoksinler ve büyüme faktörlerince artar (149). Bu gibi durumlarda, B1 reseptör etkileri baskın hale gelebilir.

B2 reseptörleri, G proteinleri aracılığı ile PLA₂'yi ve PLC'yi aktive eder. Kinin ile G_q yoluyla uyarılan PLC, IP₃-Ca²⁺ yolunu aktif hale getirir ve aynı zamanda NO sentez ve salınımını artırır. Bradikinin, proinflamatuvar transkripsiyon faktör NF- κ B'yi G α_q ve $\beta\gamma$ subuniteleri aracılığı ile artırır ve aynı zamanda MAP kinaz yolunu da aktive eder (152). G_i'ye bağlı olan B2 reseptörleri aktive olarak PLA₂ aktivasyonuna ve membrana bağlı olan araşidonik asitten inflamatuvar medyatörler ve vazodilatör prostasiklin oluşmasına neden olur. B2 reseptörüne bağlanan bradikinin agonist-reseptör kompleksinin internalizasyonuna ve böylece desensitizasyona yol açar. Öte yandan, B1 reseptörü ligandı olan [des-Arg]kinin'e bağlandıktan sonra B1 reseptörünün C-terminal ucunda Ser/Thr açısından zengin alan olmadığı için internalize olamaz (152).

2.13. Kallikrein ve Kininlerin Fonksiyonları

2.13.1. Ağrı

Kininler bir bölün tabanına verildiklerinde, yanıcı tarzda şiddetli ağrı yapabilen güçlü aljezik ajanlardır. Bradikinin primer sensöryel nöronları uyarır ve substance P, nörokinin A ve calcitonin gene-related peptide gibi nöropeptidlerin salgılanmasını uyarır (153). B2 reseptörler akut aljezi oluştururken kronik inflamasyon ağrısı ise B1 reseptörlerinin sayısının artışı ile ilişkili gözükmektedir.

2.13.2. Respiratuar Hastalık

Kininlerin astım ve rinit gibi allerjik havayolu hastalıklarının patofizyolojisinde rol oynadığı bildirilmiştir. Astım hastalarında kininlerin inhalasyonu veya intravenöz injeksiyonları bronkospazma neden olmakla birlikte normal kişilerde herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Bu bradikinin yoluyla oluşan bronkokonstriksiyon antikolinerjik ajanlar ile bloke edilebilmekle birlikte antihistaminikler ve siklooksijenaz inhibitörlerin faydası olmamaktadır. Benzer şekilde allerjik rinitli hastalarda bradikininin nazal yolla verilmesi sonrasında burun akıntısı ve şiddetli glandüler sekresyonlar oluşmaktadır. Şiddetli astım hastalarında bradikinin B2 reseptör antagonisti pulmoner fonksiyonları düzeltmektedir (149).

2.13.3. Kardiyovasküler Sistem

Yüksek kan basıncı olan kişilerde üriner kallikrein konsantrasyonları azalmıştır. İnsan ve hayvan deneylerinde, bradikinin infüzyonu vazodilatasyona yol açar ve kan basıncını düşürür (154). Bradikinin endotelial hücrelerdeki B2 reseptörleri aktive ederek vazodilatasyona neden olur. Bu vazodilatasyon NO, prostosiklin ve arasıdonik asit metaboliti olan hiperpolarizan epoksieikosatrienoik asit aracılığı ile meydana gelir(155).

Bazal kan basıncı, B2 reseptörü antagonisti verilmiş hayvanlarda ve B2 reseptörü negatif transgenik farelerde normal düzeydedir. Ancak bu hayvanlara tuz yüklemesi yapıldığında veya renin-anjiyotensin sistemi aktive edildiğinde kan basıncında aşırı bir yükselme meydana gelmektedir. Bu veriler endojen kallikrein-kinin sisteminin normal şartlar altında kan basıncı regülasyonunda minör bir rol oynarken hipertansif durumlarda önemli hale gelebileceğini göstermektedir (149).

Kallikrein-kinin sistemi kardioprotektif gibi gözükmektedir. Sıkça kullanılmakta olan ACE inhibitörlerinin aktivitelerinin bir kısmı bradikininin etkilerini artırmalarına bağlanmaktadır. Aynı zamanda kalbin iskemi ve reperfüzyona karşı prekonsiyonunda faydalı etkileri bulunmaktadır. Bradikinin, vasküler endotelial doku plazminojen aktivatör (tPA) salınımını stimüle eder (156). Böylelikle bradikinin miyokardiyal enfarktüs ve strok gibi kardiyovasküler olaylarda endojen korunma sistemlerine katkıda bulunur.

Kininler aynı zamanda santral ve periferik sinir sistemlerinden sempatik akımı artırabilir.

2.13.4. Böbrek

Renal kinin parakrin olarak idrar miktarının ve kompozisyonunun regülasyonunda etkilidir (157). Kallikrein, distal nefronun bağ hücrelerinden sentezlenir ve salınır. Doku kininojen ve kinin reseptörleri toplayıcı kanal hücrelerinde bulunmaktadır. Diğer vazodilatörler gibi, kininler de renal kan akımını artırır. Bradikinin aynı zamanda kortikal toplayıcı kanalda sodyum reabsorpsiyonunu inhibe ederek natriürece neden olur. Renal kallikreinler mineralokortikoidler, ACE inhibitörleri ve nötral endopeptidaz inhibitörleri tarafından artırılırlar.

2.13.5. İnflamasyon

Bradikinin vazodilatasyona neden olan, vasküler permeabilityyi artıran inflamatuvar bir hormondur (149). Sentetik bradikinin enjekte edilen insan ve hayvan dokularında inflamasyonun 4 kardinal bulgusu olan kızarıklık, lokal ısı artışı, şişlik ve ağrı meydana gelir (158). Proteinden zengin sıvı eksudasyonunda temeldeki belirleyici faktör özellikle postkapiller venüller seviyesinde meydana gelen endotelial hücreler arasındaki ayrılımdır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar Rho ve Rac isimli küçük G proteinlerinin endotelial bariyer fonksiyonunu antagonist olarak regüle ettiklerini göstermiştir. Bradikinin veya bir başka inflamatuvar ajan tarafından stimüle edilen Rho proteini interselüler junctionların yıkımını sağlarken, Rac proteini ise stabilizasyonunu sağlar (159). Kininler tarafından oluşturulan lokal vazodilatasyon ve inflamatuvar hiperemi daha sonrasında eksudasyon meydana gelmesine neden olur. Kinin reseptör alt tiplerinin regülatuar paternlerine uygun olarak, kininler normal dokulara enjekte edildiğinde B2 reseptörlerini stimüle ederler. Bundan dolayı, belli B2 reseptör antagonistleri ve B2 reseptörleri olmayan transgenik farelerde, doku ödemi, peptidoglikan ile artrit oluşturulmuş Lewis sıçanlarında inflamasyonun sistemik bulguları gibi inflamatuvar cevabın belli yönlerinin ortaya çıkması ve Arthus reaksiyonunda plazma ekstravazasyonu gibi inflamatuvar cevap engellenmiştir (160, 161). B2 reseptör antagonizması, kafa travması sonrasında gelişen beyin ödemi ve herediter

anjioödem gibi vazojenik ödemin belli çeşitlerinde dikkatleri çekmektedir. İlk durumda nonpeptid antagonist LF-16-0687 hayvan modellerinde umut vaadeden sonuçlar vermiştir ve kan beyin bariyerinin hızlı açılmasını sağlayan B2 reseptör agonisti labradimil'inkine benzer bir fizyolojik durum sergilemektedir (162, 163). Herediter anjioödem oluşturulmuş C1 inhibitör gen delesyonu yapılmış olan farelerde, artmış olan vasküler permeabilitenin B2 reseptör antagonisti icatibant ile veya B2 reseptör geninin genetik ablasyonu ile engellendiği gösterilmiştir (164). Shigematsu ve ark. (165)'nin yapmış olduğu araştırmada ise yüksek konsantrasyonlarda bradikininin, B2 reseptörlerinin aktivasyonu ve platelet aktive edici faktör (PAF) ve PAF benzeri lipidlerin oluşumu aracılığı ile platelet lökosit agregasyonlarını ve lökosit adezyonunu artırdığını göstermişlerdir.

Bunların yanı sıra persistan inflamasyon modellerinde özellikle sitokin veya mikrobiyal ürünlerin verilmesiyle oluşturulanlarda B1 reseptörlerinin ön plana çıkması şaşırtıcı değildir. Ateş, sepsisin sistemik komplikasyonları ve sistemik inflamatuvar markerların hepatik ekspresyonlarındaki değişikliklerde bu özellikler araştırılmıştır (166). Son yayınlar sıçan pençesine uygulanan IL-1 β enjeksiyonunun ödem oluşturan des-Arg9-BK'ye karşı hayvanların pençelerini sensitize ettiklerini göstermiştir (167). Bu sistemin analizi, bu cevapta platelet aktivasyon faktörü, lokal TNF- α üretimi ve nötrofil ekstravazasyonu ve sonraki sürecin B1 reseptör ekspresyonundaki rolü gösterilmiştir. Sıçan pençesinde LPS ile oluşturulmuş B1 reseptör ekspresyonu da aynı yolları takip eder ve lokal NF- κ B aktivasyonu, IL-1 β ile TNF- α formasyonunun rolleri için kanıtlar sunar (168). Alerjik rinit, psöriatrik cilt gibi kronik inflamatuvar dokuların klinik örneklerinde B2 reseptörlerinde herhangi bir azalma olmadan B1 reseptörlerinin arttığı gösterilmiştir (169).

Her kinin reseptör alt tipinin inflamatuvar cevabın başka yönlerine sebep olup olmadığı merak uyandıran bir konudur. B1 reseptör antagonistleri, antijen ile pulmoner inflamasyon oluşturulmuş farelerde eozinofillerin sayısını azaltırken karbakole karşı olan havayolu hiperreaktivitesini azaltmamaktadır (170). B2 reseptör antagonisti icatibant ise daha yaygın etki göstererek hem eozinofil, hem mononükleer hücrelerin artışını engellemiş hem de havayollarının hipersensitivitesini azaltmıştır. Her ne kadar alerjen nedeniyle ortaya çıkan bronşial hiperreaktivite B1 reseptör mRNA artışı arasında bir paralellik ve des-Arg10-Hoe 140'ın belli bir takım tedavi edici etkileri gözlenmiş olsa da (171), klinik çalışmalar hastalarda aerosol halindeki bradikinine karşı havayolu hipersensitivitesi gözlenirken Lys-des-Arg9-BK'in böyle bir etkisi gözlenmemiştir (172). Icatibant klinik araştırmalarda astım

hastalarında bazı anti-inflamatuar özellikler göstermiştir (173). Ancak ovalbumin'e karşı sensitize edilmiş ve ovalbumin verilmiş farelerden alınan bronkoalveolar lavaj hücreleri arasında eozinofiller bulunmaktadır ve bu eozinofillerdeki B1 reseptörlerine bağlı des-Arg9-BK'e karşı verilen cevap (174), B1 reseptörlerinin akciğer inflamasyonundaki belli bazı etkileri olduğunu desteklemektedir.

B1 reseptörleri olmayan transgenik olarak farelerin dokularda nötrofil birikimi gibi inflamasyonun bir takım sonuçlarına karşı dirençli oldukları daha önceden yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir (175) ancak halen altta yatan mekanizma tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. İntravital mikroskopi kullanılarak fare mezenterinde, des-Arg9-BK lökositler üzerinde herhangi bir etkisi olmamakla birlikte IL-1 β verilmiş olan mezenterlerde nötrofil rolling, adezyon ve emigrasyonuna neden olmaktadır (176). Bu etki capsaicin, nörokinin antagonistleri, histamin H1 reseptör antagonistleri ve mast hücre degranülasyonu ile inhibe olur ve bu da akson refleksi ile ortaya çıkmış olan mast hücrelerinin sonuç olarak lökosit emigrasyonuna neden olduğunu düşündürmektedir (muhtemelen salınan medyatörlerin vasküler yatağa etkileriyle). Bundan dolayı inflamasyonun nörohümorale formu bu sistemde yer alıyor olabilir.

2.14. Bradikinin'in Çeşitli Dokularda Antifibrojenik Etkileri

Schanstra ve ark. (5)'nin yapmış olduğu araştırmada unilateral üreteral obstrüksiyon oluşturulmuş B2 reseptörü olmayan transgenik (B^{-/-}) farelerde (B2^{+/+}) farelere kıyasla renal tübülointerstisyel fibrozis anlamlı derecede fazladır. Doku kallikrein geninin ekspresyonu artırılarak endojen bradikinin ekspresyonu da artırılmış ve bu farelerde de tübülointerstisyel fibrozis azalmaktadır. (B2^{-/-}) farelerde daha az plazminojen aktivatör (PA) aktivitesinin olduğu, beraberinde MMP-2 aktivitesinin de azaldığı gözlenmiş ve bu sayede üreteral obstrüksiyon oluşturulmuş B2 reseptörü olmayan transgenik (B^{-/-}) farelerde tübülointerstisyel fibrozisin azaldığı düşünülmüştür. Tübüler hücelere önceden verilen TNF- α ve IFN- γ proinflamatuar faktörler bradikinin aracılığıyla PA aktivitesini artırmış ve spesifik B2 reseptör antagonisti olan HOE-140 verilerek artan PA aktivitesi inhibe edilmiştir. Benzer şekilde transgenik olarak, doku kallikrein geninin ekspresyonu artırılarak

endojen bradikinin ekspresyonu artırılmış olan ratlarda da B2 reseptör antagonisti verilerek elde edilmiş olan antifibrotik etkiler inhibe edilmiştir.

Okada ve ark. (6)'nın yapmış olduğu bir başka araştırmada ise siklosporin A nefropatisi oluşturulmuş ratlarda yine bradikinin'in renal tübülointerstisyumunda genel bir kollajenolize neden olduğu ancak bu etkinin tPA'yı etkilemeden B2 reseptörü aracılığı ile PAI-I ekspresyonunu azaltıp, plazminin ve MMP-9'un aktivitesini artırması ile olduğunu bildirilmiştir.

Zhang ve ark. (7)'nin tuz yüklemesi ile renal fibrozis meydana getirdikleri ratlarda verilen doku kallikreininin NO ve cGMP seviyelerini artırırken, tuz nedeniyle ortaya çıkan nikotinamid adenin dinükleotid/nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADH/NADPH) oksidaz aktivitesini, süperoksit üretimini, TGF- β 1 mRNA and TGF- β 1 immün boyanma oranlarını azalttığını göstermişlerdir.

Karaciğerde hepataselüler hasar ve fibrozis üzerine yapılan bir araştırmada, Sancho-Bru ve ark. (8) fibrotik karaciğerlerde BK reseptör sayısının arttığını göstermişler ve bradikinin'in fibrojenik hepatik stellat hücrelerinde geçici olarak $[Ca^{2+}]$ 'u arttırdığını, prokollajen- α 1, TGF- β gen ekspresyonunu azalttığını ve MMP-2 aktivasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 13.10.2010 tarih ve 140 sayılı onayı alınarak, ESOĞÜ Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi (TİCAM) laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışmada, ağırlıkları 200-250 gr. arasında değişen Sprague-Dawley cinsi 24 adet rat kullanıldı. Deney hayvanları standart laboratuvar koşullarında, rat yemi ve çeşme suyuyla beslendiler. Cinsiyet farkı gözletilmedi.

3.2. Çalışma Grupları

Deney hayvanları randomize olarak;

Grup A : (Kontrol grubu) serum fizyolojik (n:8)

Grup B : klorheksidin glukonat + serum fizyolojik (n:8)

Grup C : klorheksidin glukonat + bradikinin (n:8)

olmak üzere üzere 3 gruba ayrıldı.

Grup A : 8 denekten oluşan kontrol grubu olarak planlandı. Deneklere 3 hafta boyunca, günlük 10ml/kg dozunda serum fizyolojik intraperitoneal olarak verildi. Peritona tekrarlayan enjeksiyon nedeniyle oluşabilecek direk hasarı önlemek için, enjeksiyonlar batın alt kadrana yapıldı. Denekler, 22-25 °C olan ortamda, tahıldan zengin ve çeşme suyundan oluşan diyetle ayrı kafeslerde beslendiler. Denekler, 3 haftanın sonunda, intramüsküler ketamin anestezisi altında dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Denekler sakrifiye edildikten sonra peritonun üst kısımlarından dört farklı alandan örnekler alındı, örnekler içinde formol bulunan kaplara konuldu.

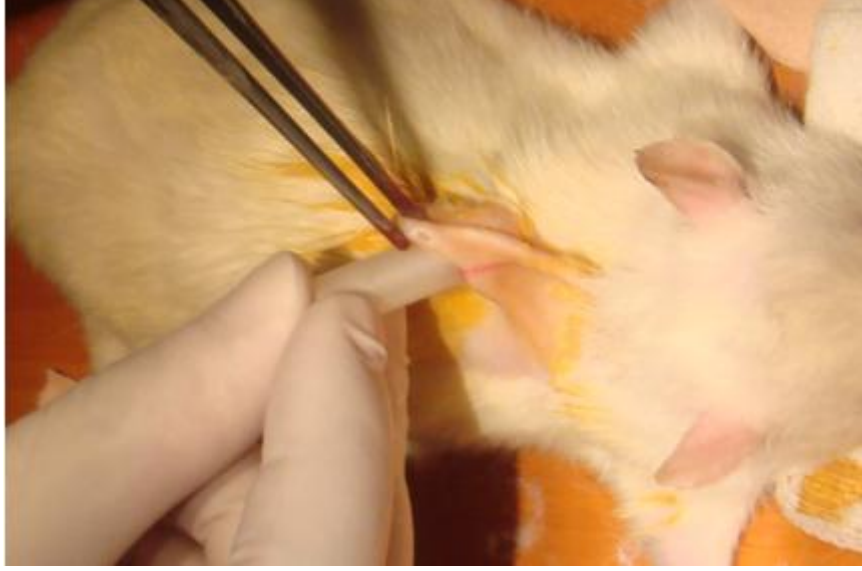
Grup B : 8 denekten oluşmaktadır. İçinde 0.2 ml haznesi olan ve salınım hızı 0.25 µL/saat olan intradermal ozmotik mini pompalar (Alzet Corp.) serum fizyolojik ile dolduruldu. İnamüsküler ketamin anestezisi uygulandıktan sonra deneklerin

sırtlarına cilt altına yerleştirildi. Ozmotik pompalar yerleştirildikten sonra, deneklere 3 hafta boyunca, serum fizyolojik içinde çözülmüş %15 ethanol + %0.1 klorheksidin glukonat, intraperitoneal olarak günlük 10ml/kg dozunda verildi. Aynı nedenlerle enjeksiyonlar batın alt kadranslara yapıldı. Denekler, 22-25 °C olan ortamda, tahıldan zengin ve çeşme suyundan oluşan diyetle ayrı kafeslerde beslendiler. Denekler, 3 haftanın sonunda, intramüsküler ketamin anestezisi altında dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Denekler sakrifiye edildikten sonra, peritonun üst kısımlarından dört farklı alandan örnekler alındı, örnekler içinde formol bulunan kaplara konuldu.

Grup C : 8 denekten oluşmaktadır. İçinde 0.2 ml haznesi olan ve salınım hızı 0.25 µL/saat olan intradermal ozmotik mini pompalar (Alzet Corp.) 0.1 mol asetik asit içinde çözülmüş, 7.2mg/mL dozunda bradikinin ile dolduruldu. İntramüsküler ketamin anestezisi uygulandıktan sonra deneklerin sırtlarına cilt altına yerleştirildi. Ozmotik pompadan salınan bradikinin dozu 100ng/kg/dak idi. Ozmotik pompalar yerleştirildikten sonra, deneklere 3 hafta boyunca, serum fizyolojik içinde çözülmüş %15 ethanol + %0.1 klorheksidin glukonat, intraperitoneal olarak günlük 10ml/kg dozunda verildi. Aynı nedenlerle enjeksiyonlar batın alt kadranslara yapıldı. Denekler, 22-25 °C olan ortamda, tahıldan zengin ve çeşme suyundan oluşan diyetle ayrı kafeslerde beslendiler. Denekler, 3 haftanın sonunda, intramüsküler ketamin anestezisi altında dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Denekler sakrifiye edildikten sonra, peritonun üst kısımlarından dört farklı alandan örnekler alındı, örnekler içinde formol bulunan kaplara konuldu.



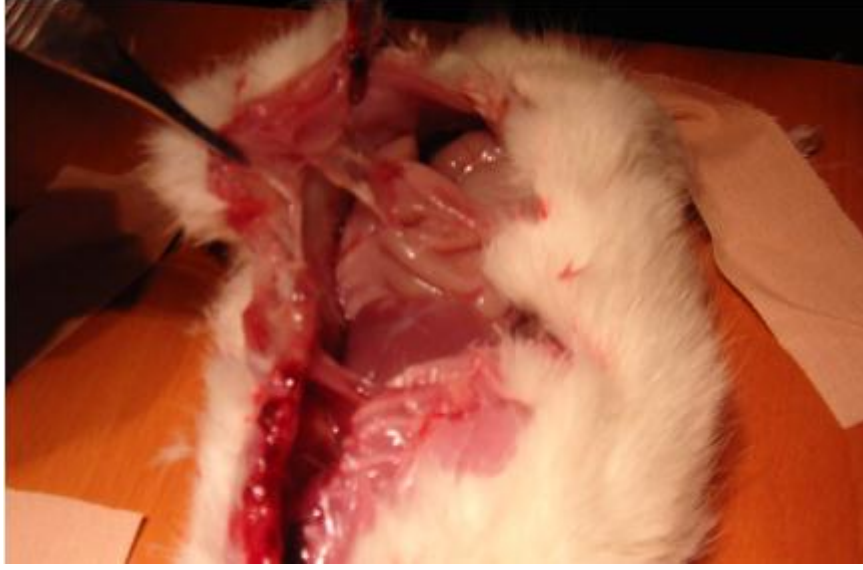
Şekil 3.1. Ozmotik mini pompaların doldurulması.



Şekil 3.2. Ozmotik mini pompanın deneklerin sırtlarında cilt altına yerleştirilmesi.



Şekil 3.3. Cildin kapatılması.



Şekil 3.4. Peritondan örnek alınması.

3.3. Histopatolojik Değerlendirme

Doku örnekleri nötral formoldeki fiksasyonunun ardından, dehidratasyon işleminden geçirildikten sonra, parafin bloklara gömüldü. Her bloktan mikrotom yardımı ile 4 µm kalınlığında seri kesitleri alındı.

Peritoneal membrandaki histolojik değişiklikler için dokular Hematoksilin-Eosin yöntemi ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Yapılan değerlendirmede peritoneal membrandaki histolojik değişiklikler sırasıyla; Normal (N), Yok (0), Hafif (1), Orta (2), Şiddetli (3) olarak derecelendirildi. Histopatolojik derecelendirme yapılırken peritoneal membranda mezotelial hücrelerdeki değişiklikler ve submezotelial kompakt zondaki değişiklikler karşılaştırıldı. Mezotelial hücreler normal yassı şekilli, hücre sayısında artış ve reaktif kübik şekilli olmaları açısından değerlendirildi. Submezotelial kompakt zonda ise kalınlaşma, neovaskülarizasyon, interstisyel ödem, fibrozis, PMNL ve monosit/makrofaj hücre infiltrasyonları incelendi.

Bazal membran kalınlığı, fibrozis ve fibrin varlığının belirlenmesi için dokular PAS yöntemi ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Yapılan değerlendirmede histolojik değişiklikler sırasıyla; Normal (N), Yok (0), Hafif (1), Orta (2), Şiddetli (3) olarak derecelendirildi. Histopatolojik derecelendirme yapılırken bazal membranların normal veya kalın oluşları, fibrozis ve fibrin içeriği karşılaştırıldı.

İmmunhistokimyasal olarak dokuda sırasıyla MMP-2, TGF- β 1, PAI-1 ve Bradikinin-B2 boyaları yapılarak ışık mikroskopunda incelendi. Yapılan değerlendirmede boyanma şiddeti sırasıyla; negatif (0), zayıf (1), orta (2), şiddetli (3) olarak değerlendirildi. Değerlendirme yapılırken yassı ve kúbik mezotelial hücrelerde, submezotelial kompakt zondaki fibroblastlarda, endotelial hücre yüzeyinde ve monosit/makrofajlardaki boyanma şiddetleri karşılaştırıldı.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz için SPSS for Windows 10.0 kullanıldı. Elde edilen veriler ki kare testi kullanılmak suretiyle analiz edildi. Sonuçların değerlendirilmesinde $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

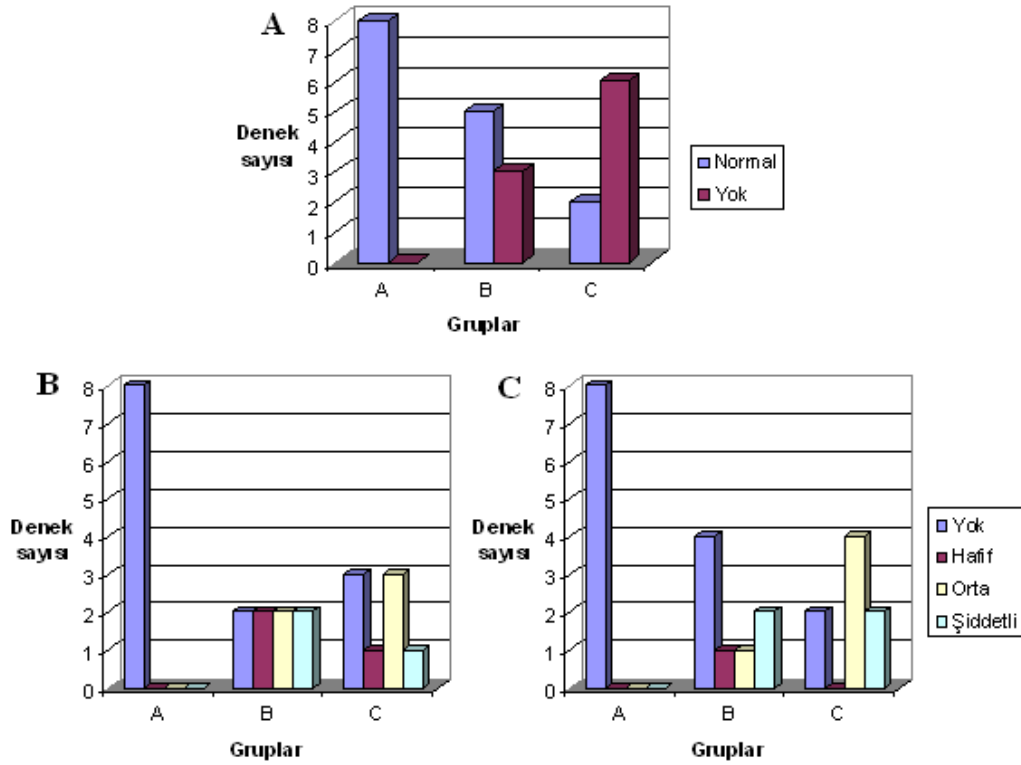
4. BULGULAR

4.1. Hematoksilin-Eozin (H-E) Boyama Bulguları

Tablo 4.1. Mezotelial hücrelerdeki değişiklikler (H-E).

Gruplar	Normal Yassı Şekli	Hücre Sayısı Artmış	Reaktif Kübik Şekli
A	N	0	0
B	N	2	1
C	0	0	2

N: Normal 0: yok 1: hafif 2: orta 3: şiddetli

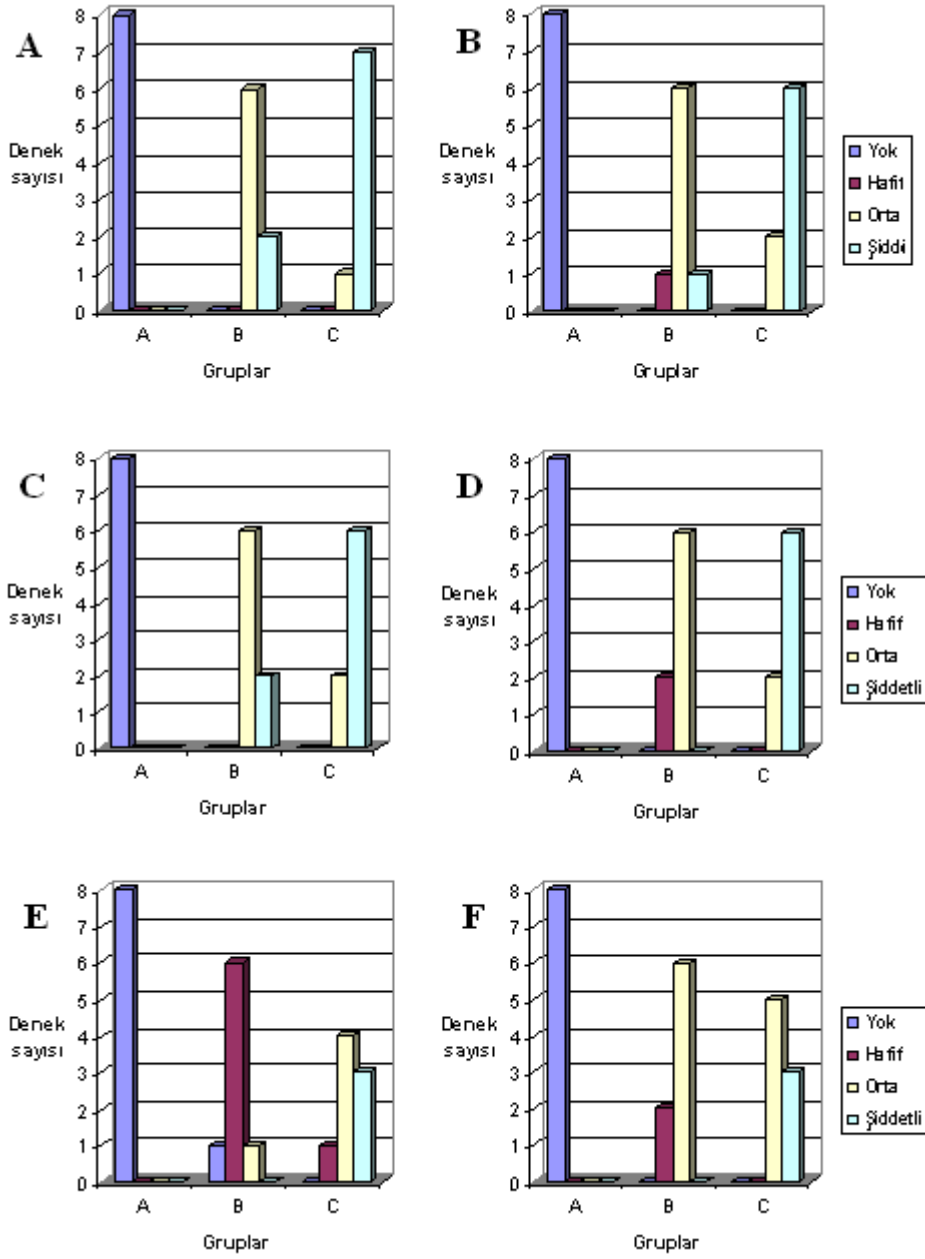


Şekil 4.1. Mezotelial hücrelerdeki değişiklikler. **A.** Normal yassı hücreler. **B.** Hücre sayısında artış. **C.** Reaktif kübik şekilli hücreler.

Tablo 4.2. Submezotelial kompakt zondaki değişiklikler (H-E).

Gruplar	Kalınlaşma	Neovaskülarizasyon	İnterstisyel Ödem	Fibrozis	İnflamatuvar Hücre İnfilyasyonu	
					PMNL	Monosit/Makrofaj
A	0	0	0	0	0	0
B	2	2	2	2	1	2
C	3	3	3	3	2	2

N: Normal 0: yok 1: hafif 2: orta 3: şiddetli



Şekil 4.2. Submezotelyal kompakt zondaki değişiklikler **A.** Kalınlaşma

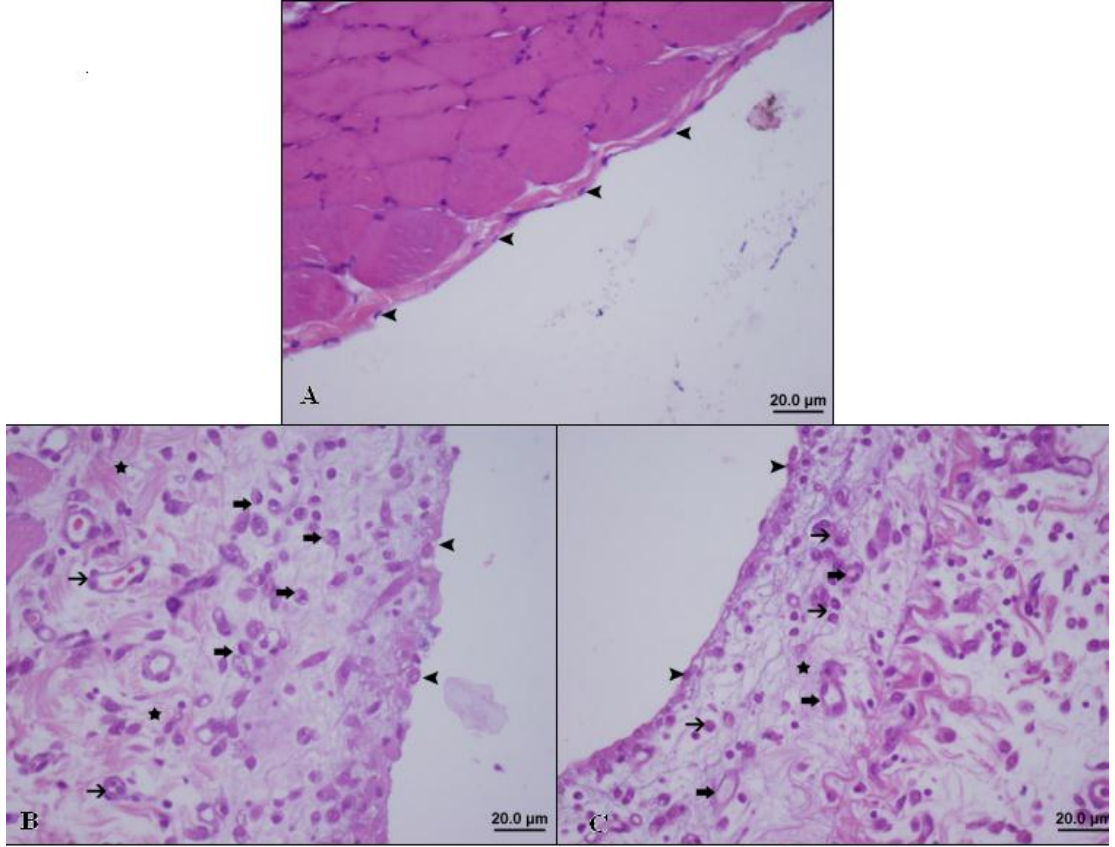
B. Neovaskülarizasyon **C.** İnterstisyel ödem **D.** Fibrozis **E.** PMNL infiltrasyonu

F. Monosit/Makrofaj infiltrasyonu.

Kontrol grubuna ait kesitlerde (serum fizyolojik i.p.); mezotelial hücreler normal yassı şekilli idi. Submezotelial kompakt zonda kalınlaşma, neovaskülarizasyon, fibrozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmedi.

B grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 0.25 µL/saat intradermal SF); mezotelial hücreler genelde normal yassı şekilli idi ve kontrol grubuna göre bir fark (p=0.200) olmamakla birlikte, reaktif kübik şekilli hücreler az miktarda gözlendi ancak istatistiksel olarak kontrol grubu ile arasında fark yoktu (p=0.073). Submezotelial kompakt zonda kalınlaşma, neovaskülarizasyon, interstisyel ödem ve fibrozis orta derecede gözlendi (tüm parametreler için p=0.001). İnflamatuvar hücre infiltrasyonları açısından yapılan incelemede PMNL hücre infiltrasyonu hafif (p=0.002), monosit/makrofaj infiltrasyonu orta derecede gözlendi (p=0.001). Submezotelial kompakt zondaki bu parametrelerde, A grubuna kıyasla fark ileri derecede anlamlıydı.

C grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 100 ng/kg/dk intradermal bradykinin); mezotelial hücreler reaktif kübik şekilli hücreler olarak orta derecede gözlendi, kontrol grubuna göre fazla olmakla birlikte (p=0.008 P), B grubuyla arasında bir fark saptanmadı (p=0.360). Normal yassı şekilli hücre görünümü kaybolmuştu ve kontrol grubu ile arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (p=0.007). Submezotelial kompakt zonda kalınlaşma, neovaskülarizasyon, interstisyel ödem ve fibrozis şiddetli derecede gözlendi ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak belirgin fark vardı (tüm parametreler için p=0.000). Aynı parametreler açısından B grubu ile karşılaştırıldığında kalınlaşma, neovaskülarizasyon ve fibrozis daha fazla iken (sırasıyla p=0.041, p=0.041, p=0.007), interstisyel ödem açısından fark saptanmadı (p=0.132). İnflamatuvar hücre infiltrasyonları açısından yapılan incelemede, B grubuna göre PMNL hücre infiltrasyonu daha fazla (p= 0.015) ve monosit/makrofaj infiltrasyonu açısından ise fark yoktu (p=0.098).



Şekil 4.3. H-E boyama bulguları **(A)** Kontrol grubuna ait periton kesitinde normal yassı şekilli mezotelyal hücreler ve normal kalınlıkta submezotelyal kompakt zon (ok başı). Bar 20 µm.

(B) B grubuna ait periton kesitinde reaktif kübik şekilli mezotelyal hücreler (ok başı), submezotelyal kompakt zonda orta derecede kalınlaşma, neovaskülarizasyon (ince ok), interstisyel ödem, fibrozis (yıldız) ve monosit/makrofaj infiltrasyonu (kalın ok). Bar 20 µm.

(C) C grubuna ait periton kesitinde reaktif kübik şekilli mezotelyal hücreler (ok başı), submezotelyal kompakt zonda şiddetli derecede kalınlaşma, neovaskülarizasyon (kalın ok), interstisyel ödem, fibrozis (yıldız) ve monosit/makrofaj infiltrasyonu (ince ok). Bar 20 µm.

4.2. PAS Yöntemi ile Boyama Bulguları

Tablo 4.3. Peritoneal membrandaki histolojik değişiklikler (PAS).

Gruplar	Bazal Membran		Fibrozis	Fibrin
	Normal	Kalın		
A	N	0	0	0
B	0	3	2	1
C	0	3	3	0

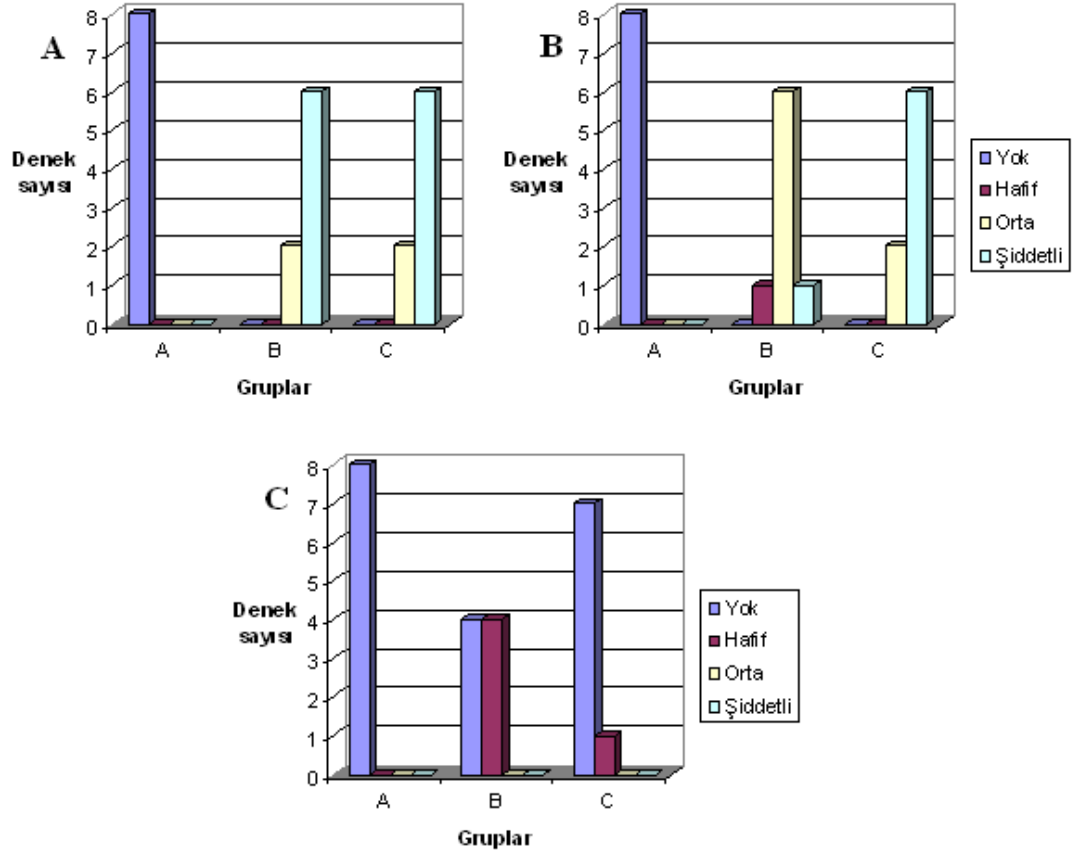
N: Normal

0: yok

1: hafif

2: orta

3: şiddetli

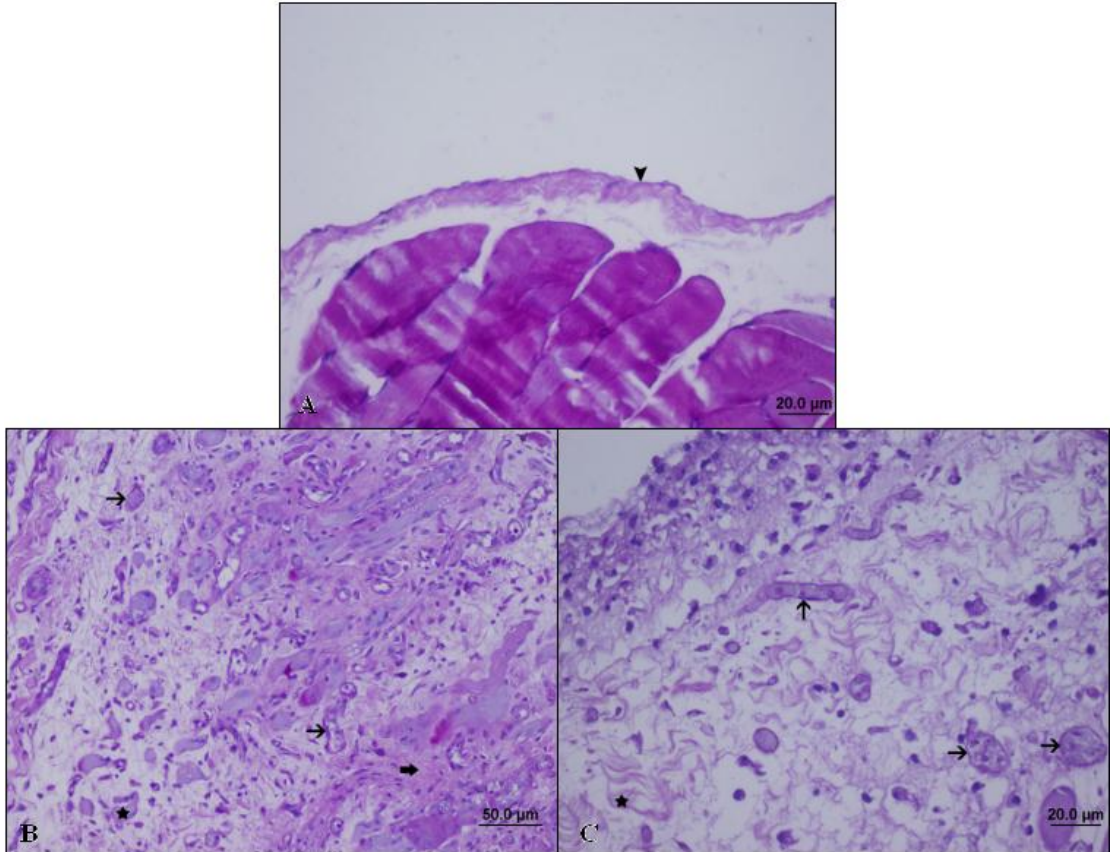


Şekil 4.4. Peritoneal membrandaki histolojik değişiklikler **A.** Bazal membran kalınlığı **B.** Fibrozis **C.** Fibrin.

Kontrol grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.); bazal membranlar normal görünümdeydi. Fibrozis ve fibrin yapılarına rastlanmadı.

B grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 0.25 µL/saat intradermal SF); bazal membran kalınlıkları artmıştı (p=0.000) ve şiddetli derecede skorlandı. Fibrozis orta derecede gözlemlendi (p=0.001) ve hafif derecede fibrine rastlandı ancak kontrol grubuyla arasında istatistiksel olarak fark yoktu (p=1.000).

C grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 100 ng/kg/dk intradermal bradykinin); bazal membran kalınlığı B grubundaki gibi şiddetli derecede gözlenirken (p>0.05), fibrozis B grubuna göre biraz artışla şiddetli derecede skorlandı (p=0.041). Fibrine ise rastlanmadı, istatistiksel olarak kontrol grubu ve B grubu arasında herhangi bir fark saptanmadı (p>0.005).



Şekil 4.5. PAS yöntemi ile boyama bulguları **(A)** Kontrol grubuna ait periton kesitinde normal kalınlıkta bazal membran ve yassı mezotelial hücreler (ok başı). Bar 20 µm. **(B)** B grubuna ait periton kesitinde şiddetli derecede kalınlaşmış endotelial bazal membran (ince

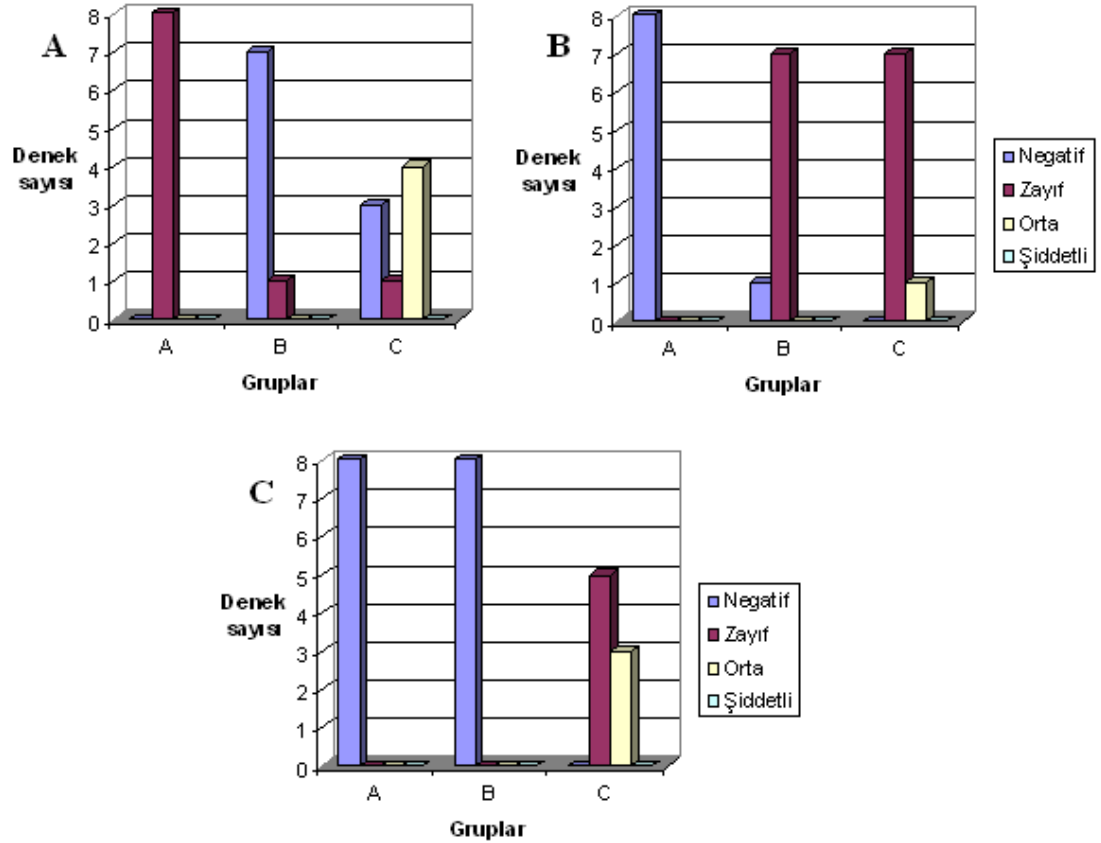
ok), hafif derecede fibrin (yıldız) ve orta derecede fibrozis (kalın ok). Bar 50 µm. **(C)** C grubuna ait periton kesitinde şiddetli derecede kalınlaşmış endotelial bazal membran (ince ok), şiddetli derecede fibrozis (yıldız). Bar 20 µm.

4.3. MMP-2 İmmünohistokimyasal Bulguları

Tablo 4.4. MMP-2 immünohistokimyasal bulguları.

Gruplar	Mezotelial Hücreler		Submezotelial Kompakt Zon		
	Yassı	Kübik	Fibroblast	Endotelial Hücre Yüzeyi	Monosit/Makrofaj
A	0	0	1	0	0
B	0	0	0	1	0
C	0	0	1	1	1

0: Negatif 1: Zayıf 2: Orta 3: Şiddetli



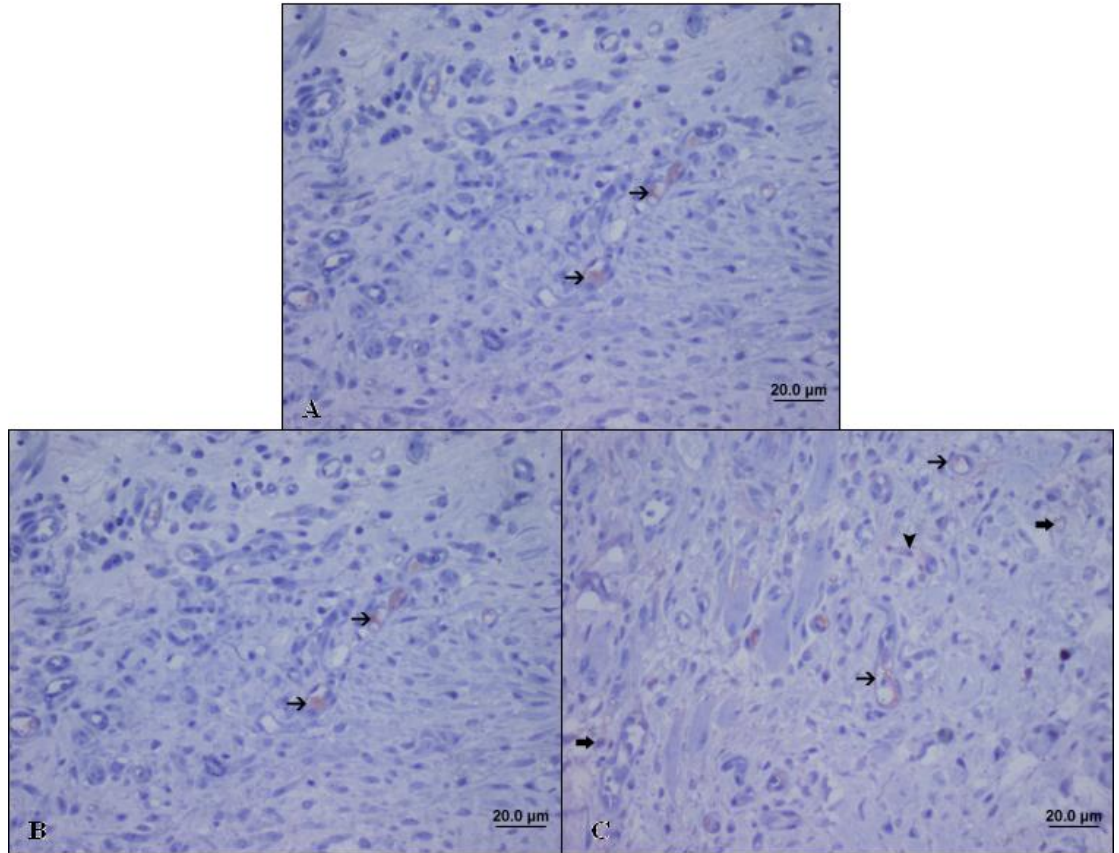
Şekil 4.6. Submezotelial kompakt zonda MMP-2 immünohistokimyasal bulguları

(A) Fibroblastlar **(B)** Endotelial hücrelerin yüzeyleri **(C)** Monosit/Makrofajlar.

Kontrol grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.); sadece submezotelial kompakt zondaki fibroblastlarda zayıf boyanma gözlemlendi.

B grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 0.25 µL/saat intradermal SF); kontrol grubundan farklı olarak sadece submezotelial kompakt zondaki endotel hücre yüzeyinde zayıf boyanma (p=0.001) varken, mezotelial hücreler, fibroblastlar ve monosit/makrofajlarda boyanma yoktu.

C grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 100 ng/kg/dk intradermal bradykinin); B grubundan farklı olarak fibroblast, endotelial hücre yüzeyi ve monosit/makrofajlarda zayıf bir boyanma gözlemlendi ancak bu parametrelerden fibroblastlardaki ve monosit/makrofajlardaki boyanma B grubuna göre daha fazlaydı (sırasıyla p=0.001 ve p=0.000), endotelial hücre yüzeyinde istatistiksel fark gözlemlenmedi (p=1.000). Mezotelial hücrelerde boyanma yoktu.



Şekil 4.7. MMP-2 immünohistokimyasal bulguları **(A)** Kontrol grubuna ait periton kesitinde negatif boyanma. Bar 20 µm. **(B)** B grubuna ait periton kesitinde zayıf derecede endotelial

hücre yüzeyinde boyanma (ince ok). Bar 20 µm. **(C)** C grubuna ait periton kesitinde zayıf derecede fibroblast (ok başı), monosit/makrofaj (kalın ok) ve endotelial hücre yüzeyinde boyanma (ince ok). Bar 20 µm.

4.4. TGF-β1 İmmünohistokimyasal Bulguları

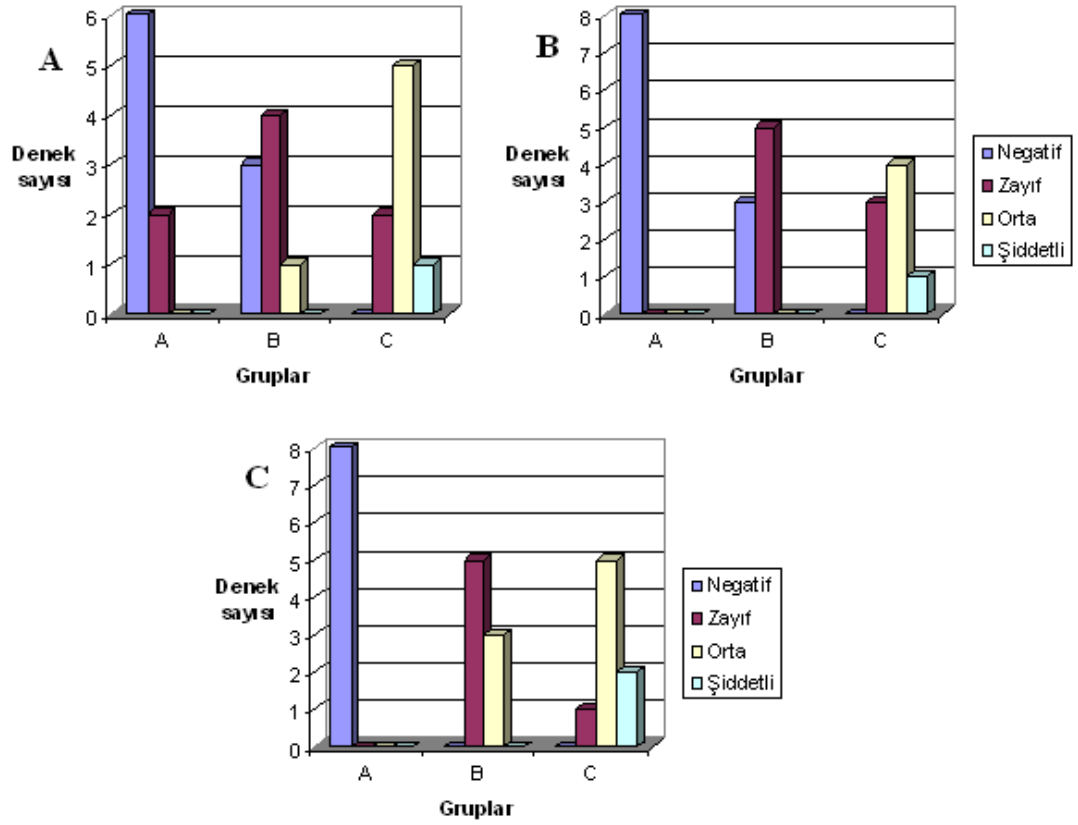
Tablo 4.5. TGF-β1 immünohistokimyasal bulguları.

Gruplar	Mezotelial Hücreler		Submezotelial Kompakt Zon		
	Yassı	Kübik	Fibroblast	Endotelial Hücre Yüzeyi	Monosit/Makrofaj
A	0	0	0	0	0
B	1	0	1	1	2
C	0	0	2	2	2

0: Negatif

1: Zayıf 2: Orta

3: Şiddetli



Şekil 4.8. Submezotelial kompakt zonda TGF- β 1 immünohistokimyasal bulguları

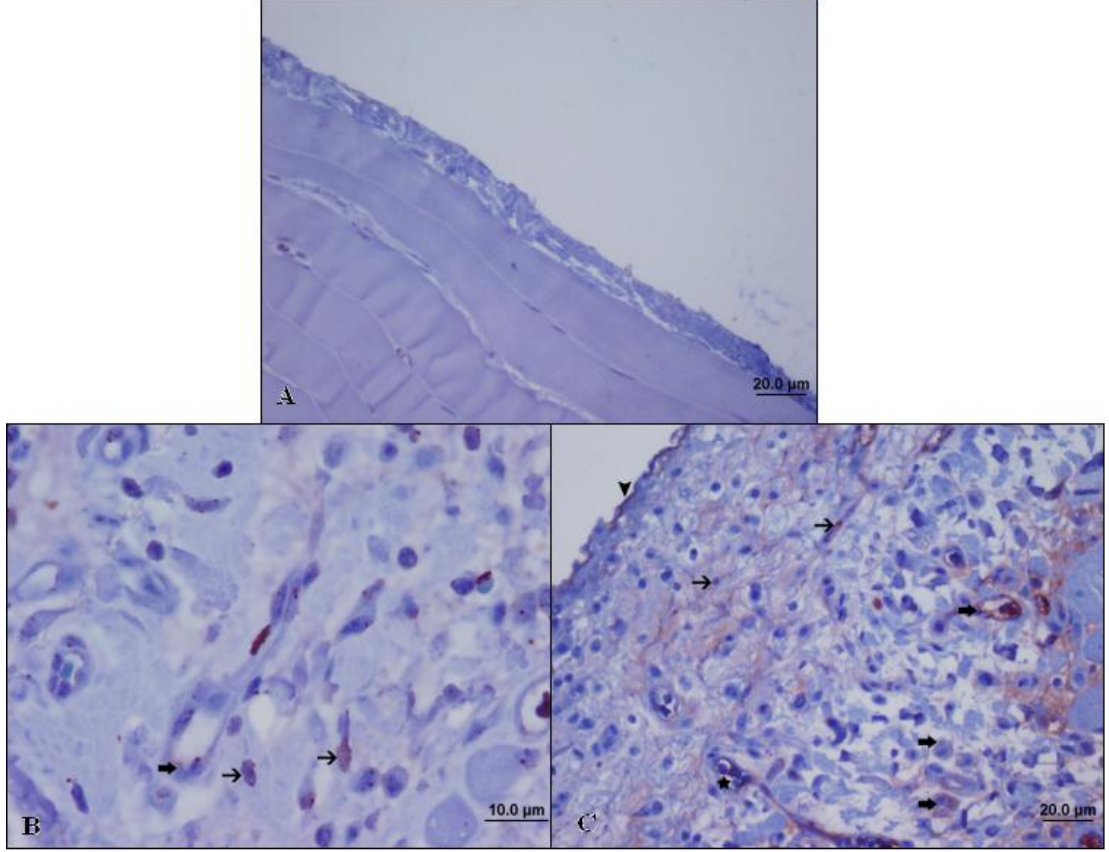
(A) Fibroblastlar **(B)** Endotelial hücrelerin yüzeyleri **(C)** Monosit/Makrofajlar.

Kontrol grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.); yapıların hiçbirinde boyanma gözlenmedi.

B grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 0.25 μ L/saat intradermal SF); yassı mezotelial hücrelerde zayıf boyanma gözlenirken, kübik mezotelial hücrelerde boyanma yoktu ve her iki hücre grubunda da kontrol grubuna kıyasla aralarında anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Submezotelial kompakt zonda fibroblast, endotelial hücre yüzeyi hafif (sırasıyla $p=0.319$ ve $p=0.026$) ve monosit/makrofajlarda orta derecede boyanma gözlendi ($p=0.001$).

C grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 100 ng/kg/dk intradermal bradykinin); B grubundan farklı olarak mezotelial hücrelerde boyanma yoktu ancak istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı fark iki grup arasında bulunamadı ($p>0.05$). Submezotelial kompakt zonda ise fibroblast ve endotelial hücre yüzeyindeki

boyanma B grubuna göre artmış (sırasıyla $p=0.042$ ve $p=0.020$) ve orta derecede idi. Monosit/makrofajlarda ise B grubuyla aynı şekilde orta derecede boyanma gözlemlendi ($p=0.066$).



Şekil 4.9. TGF- β 1 immünohistokimyasal bulguları **(A)** Kontrol grubuna ait periton kesitinde negatif boyanma. Bar 20 μ m. **(B)** B grubuna ait periton kesitinde fibroblast (ince ok) ve endotelial hücre yüzeyinde (kalın ok) zayıf boyanma. Bar 10 μ m. **(C)** C grubuna ait periton kesitinde yassı mezotelial hücrelerde (ok başı) zayıf derecede, fibroblast (ince ok), monosit/makrofaj (kalın ok) ve endotelial hücre yüzeyinde (yıldız) orta derecede boyanma. Bar 20 μ m.

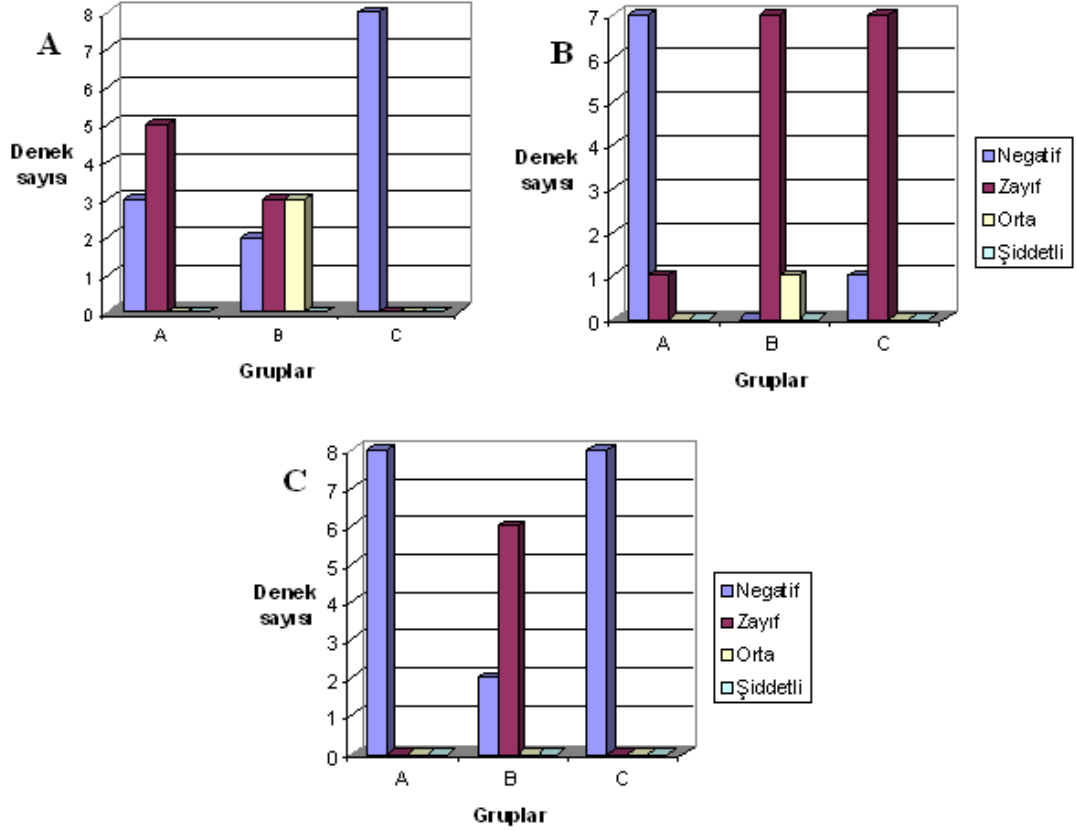
4.5. PAI-1 İmmünohistokimyasal Bulguları

Tablo 4.6. PAI-1 immünohistokimyasal bulguları.

Gruplar	Mezotelial Hücreler	Submezotelial Kompakt Zon
---------	---------------------	---------------------------

	Yassı	Kübik	Fibroblast	Endotelial Hücre Yüzeyi	Monosit/Makrofaj
A	0	0	1	0	0
B	0	0	1	1	1
C	0	0	0	1	0

0: Negatif 1: Zayıf 2: Orta 3: Şiddetli



Şekil 4.10. Submezotelyal kompakt zonda PAI-1 immünohistokimyasal bulguları

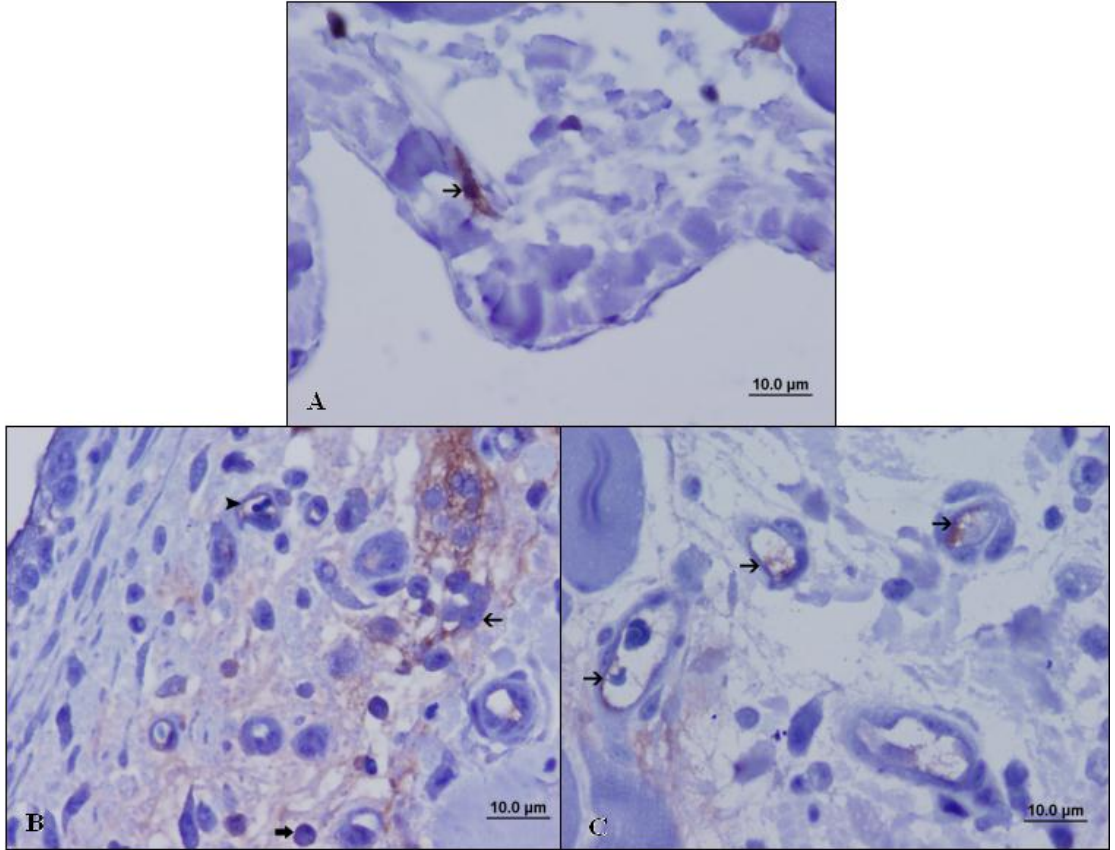
(A) Fibroblastlar **(B)** Endotelial hücrelerin yüzeyleri **(C)** Monosit/Makrofajlar.

Kontrol grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.); sadece fibroblastlarda zayıf boyanma gözlenirken, diğer yapılarda boyanma yoktu.

B grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 0.25 µL/saat intradermal SF); C grubundan farklı olarak submezotelial kompakt zondaki,

fibroblastlarda ve monosit/makrofajlarda boyanma gözlenmekte ($p=0.026$), endotelial hücrelerde ise fark yoktu ($p=1.000$).

C grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 100 ng/kg/dk intradermal bradykinin); sadece submezotelyal kompakt zondaki endotelial hücre yüzeyinde zayıf boyanma gözlenirken, diğer yapılarda boyanma yoktu.



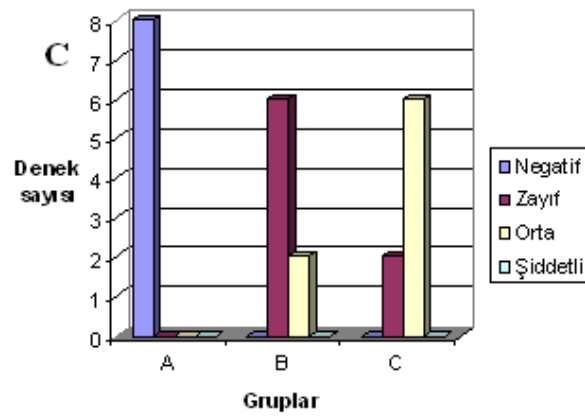
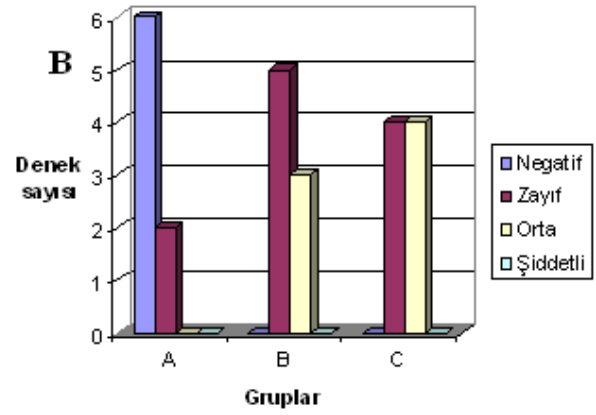
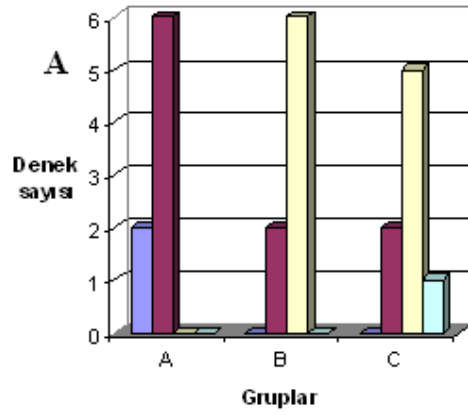
Şekil 4.11. PAI-1 immünohistokimyasal bulguları **(A)** Kontrol grubuna ait periton kesitinde fibroblastlarda (ince ok) zayıf derecede boyanma. Bar 10 µm. **(B)** B grubuna ait periton kesitinde fibroblast (ince ok), monosit/makrofaj (kalın ok) ve endotelial hücre yüzeyinde (ok başı) orta derecede boyanma. Bar 10 µm. **(C)** C grubuna ait periton kesitinde endotelial hücre yüzeyinde (ince ok) zayıf derecede boyanma. Bar 10 µm.

4.6. Bradikinin-B2 İmmünohistokimyasal Bulguları

Tablo 4.7 Bradikinin-B2 immünohistokimyasal bulguları.

Gruplar	Mezotelial Hücreler		Submezotelial Kompakt Zon		
	Yassı	Kübik	Fibroblast	Endotelial Hücre Yüzevi	Monosit/Makrofaj
A	1	0	1	0	0
B	0	0	2	1	1
C	0	0	2	1	2

0: Negatif 1: Zayıf 2: Orta 3: Şiddetli



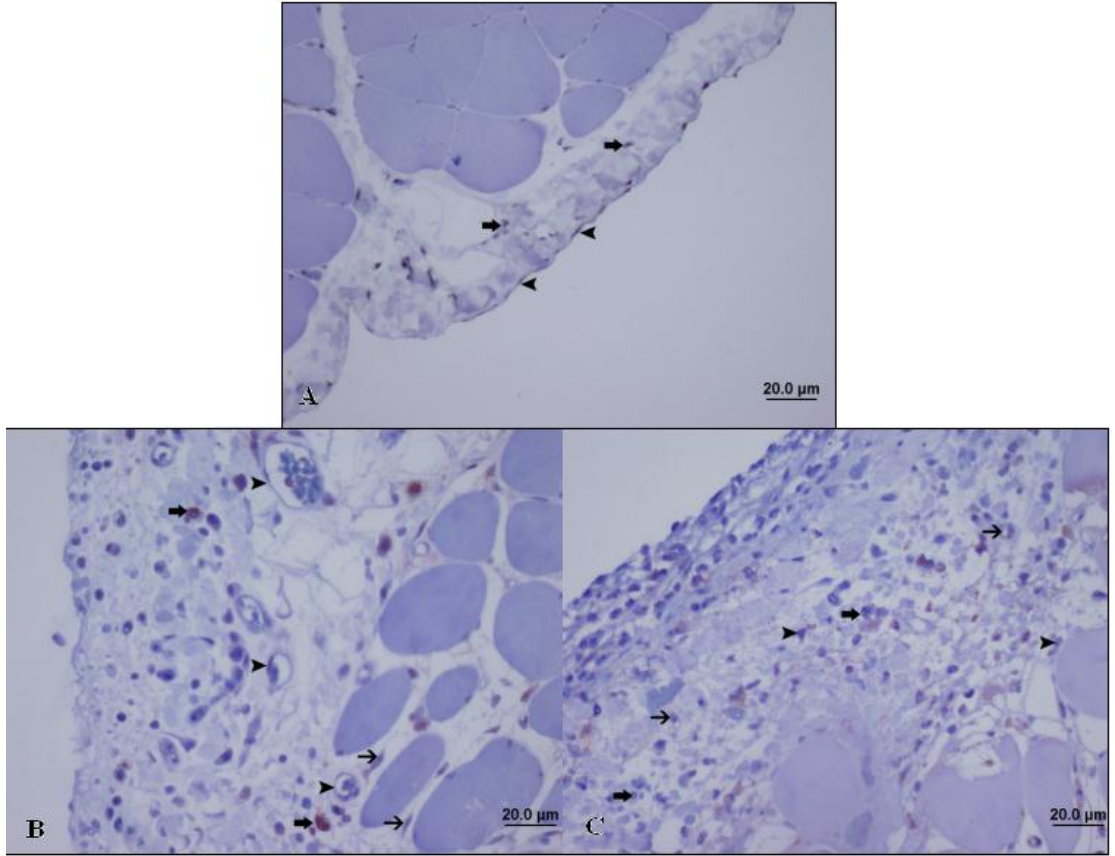
Şekil 4.12. Submezotelial kompakt zonda Bradikinin-B2 immünohistokimyasal bulguları **(A)**
Fibroblastlar **(B)** Endotelial hücrelerin yüzeyleri

(C) Monosit/Makrofajlar

Kontrol grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.); yassı mezotelial hücrelerde zayıf boyanma vardı. Submezotelial kompakt zonda sadece fibroblastlarda zayıf bir boyanma gözlenirken, diğer yapılarda boyanma yoktu.

B grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 0.25 µL/saat intradermal SF); mezotelial hücrelerde boyanma gözlenmedi. Submezotelial kompakt zonda fibroblastlarda orta derecede, endotelial hücre yüzeyi ve monosit/makrofajlarda zayıf derecede boyanma vardı. Bu parametrelerde A grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı boyanma artışı saptandı (sırasıyla, p =0.008, p =0.005, p=0.007).

C grubuna ait kesitlerde (%15 etanol i.p.+ %0.1 klorheksidin glukonat i.p. + 100 ng/kg/dk intradermal bradykinin); B grubundaki gibi mezotelial hücrelerde boyanma gözlenmedi. Submezotelial kompakt zonda ise B grubundaki gibi fibroblastlarda orta ve endotel hücre yüzeyinde hafif derecede boyanma vardı (her iki parametre için de p=1.000). Monosit/makrofajlarda ise B grubundan farklı olarak boyanma orta derecede olup, artmıştı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.185).



Şekil 4.13. Bradikinin-B2 immünohistokimyasal bulguları **(A)** Kontrol grubuna ait periton kesitinde yassı mezotelial hücreler (ok başı) ve fibroblastlarda (kalın ok) zayıf derecede boyanma. Bar 20 µm. **(B)** B grubuna ait periton kesitinde fibroblastlarda (ince ok) orta, endotelial hücre yüzeyi (ok başı) ve monosit/makrofajlarda (kalın ok) zayıf derecede boyanma. Bar 20 µm. **(C)** C grubuna ait periton kesitinde endotelial hücre yüzeyinde (ince ok) zayıf, fibroblast (ok başı) ve monosit/makrofajlarda (kalın ok) orta derecede boyanma. Bar 20 µm.

5.TARTIŞMA

Son evre böbrek hastalıklarında sıklıkla kullanılan peritoneal diyalizde (CAPD) rastlanılan en önemli problemlerden biri de enkapsüle peritoneal sklerozisdir (1). Enkapsüle peritoneal sklerozisin en karakteristik bulgularından biri peritoneal inflamasyonu takiben gelişen fibrozistir (2). CAPD'nin majör bir komplikasyonu olan peritonit durumunda mezotelyal hücreler inflamatuvar süreç nedeniyle hasara uğramaktadır (128). Mezotelyal hücrelerin uğradığı şiddetli hasarın bahsedilen bu peritoneal fibrozisi başlatan olay olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucunda da ultrafiltrasyon kaybı ve dolayısıyla da verilen tedavinin başarısız olması durumu ortaya çıkmaktadır (1). Peritoneal inflamasyonu takiben gelişen bu fibrozis, enkapsüle peritoneal sklerozisin en karakteristik bulgularından biridir (2). Yapılan araştırmalarda CAPD ve komplikasyonlarına, mezotelyal hücrelerin sitokinler, prostaglandinler ve fibrinolizis kaskadında bulunan enzimleri salgılayarak aktif bir rol oynadıkları gösterilmiştir. İnflamatuvar süreçte mezotelyal hücreler granüositlerden, makrofajlardan ve endotelyal hücrelerden salgılanan medyatörler ile stimüle olurlar (128). Mezotelyal hücrelerin hücre fonksiyonlarını düzenleyen inflamatuvar hormonların rolleri hakkında halen bilgilerimiz kısıtlıdır.

Araştırmamızda daha önceki araştırmalarda da enkapsüle peritoneal fibrozis modeli olarak Mishima ve ark., Nishino ve ark., ve Mondello ve ark.'larının (129) kullanmış olduğu klorheksidin glukonat enjeksiyonu ile yapılan model benimsendi. Submezotelial kompakt zonda kalınlaşma, neovaskülarizasyon, interstisyel ödem ve fibrozis; inflamatuvar hücre infiltrasyonları, PAS ve MMP-2, TGF- β düzeyleri klorheksidin glukonat ile yapılmış olan enkapsüle peritoneal fibrozis modellerinde inflamasyonu ve fibrozisi göstermek amacıyla kullanılmış olan parametrelerdir (2, 177). Klorheksidin glukonat verilmesiyle bu parametrelerin tümünde artış gözlemlenmiş ve inflamasyon ile fibrozis oluşturduğu bu şekilde gösterilmiştir (2, 177). Biz de araştırmamızda inflamasyon ve sonucunda peritoneal hasar ile beraber gelişen fibrozisi göstermek amacıyla bu parametreleri çalıştık.

Çalışmamızda, Ro ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırmalarında gösterdiklerine benzer şekilde klorheksidin glukonat verilen B grubunda hayvanların peritonunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında submezotelial kompakt zonda kalınlaşma, neovaskülarizasyon, interstisyel ödem, fibrozis ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptandı.

Bradikinin vazodilatasyona neden olan, vasküler permeabilityyi artıran inflamatuvar bir hormondur (3). Sentetik bradikinin enjekte edilen insan ve hayvan dokularında inflamasyonun 4 kardinal bulgusu olan kızarıklık, lokal ısı artışı, şişlik ve ağrı meydana gelir

(158). Kininler tarafından oluşturulan lokal vazodilatasyon ve inflamatuvar hiperemi daha sonrasında da eksudasyon meydana gelmesine neden olur (159). Kinin reseptör alt tiplerinin regülatuar paternlerine uygun olarak, kininler normal dokulara enjekte edildiğinde B2 reseptörleri stimüle ederler. Bundan dolayı, belli B2 reseptör antagonistleri ve B2 reseptörleri olmayan transgenik farelerde, doku ödemi, peptidoglikan ile artrit oluşturulmuş Lewis sıçanlarında inflamasyonun sistemik bulguları gibi inflamatuvar cevabın belli yönlerinin ortaya çıkması engellenebilir (160). Ayrıca, Arthus reaksiyonunda plazma ekstravazasyonu (161) gibi inflamatuvar cevabın belli yönleri önlenebilmiştir. B2 reseptör antagonizması, kafa travması sonrasında gelişen beyin ödemi ve herediter anjioödem gibi vazojenik ödemin belli çeşitlerinde de etkili olmaktadır. Herediter anjioödem oluşturulmuş C1 inhibitör gen delesyonu yapılmış olan farelerde, artmış olan vasküler permeabilitenin B2 reseptör antagonisti icatibant ile veya B2 reseptör geninin genetik ablasyonu ile engellendiği gösterilmiştir (164). Shigematsu ve ark. yapmış oldukları araştırmada yüksek konsantrasyonlarda bradikinin'in, rat mezenterinde B2 reseptörlerinin aktivasyonu ve platelet aktive edici faktör (PAF) ve PAF benzeri lipidlerin oluşumu aracılığı ile platelet lökosit agregasyonlarını ve lökosit adezyonunu artırdığını göstermişlerdir (165).

Bunların yanı sıra persistan inflamasyon modellerinde özellikle sitokin veya mikrobiyal ürünlerin verilmesiyle oluşturulanlarda B1 reseptörlerinin ön plana çıkması şaşırtıcı değildir. Ateşte, sepsisin sistemik komplikasyonları ve sistemik inflamatuvar markerların hepatik ekspresyonlarındaki değişikliklerde bu özellikler araştırılmıştır (166). Son yayınlar sıçan pençesine uygulanan IL-1 β enjeksiyonunun ödem oluşturan des-Arg9-BK'ye karşı hayvanların pençelerini sensitize ettiklerini göstermiştir (167). Bu durum incelendiğinde, platelet aktivasyon faktörünün, lokal TNF- α üretiminin ve nötrofil ekstravazasyonunun B1 reseptör ekspresyonundaki rolü gösterilmiştir. Benzer şekilde sıçan pençesinde LPS ile oluşturulmuş B1 reseptör ekspresyonu da aynı yolları takip eder ve lokal NF- κ B aktivasyonu, IL-1 β ile TNF- α formasyonunun rolleri için kanıtlar sunar (168). Alerjik rinit, psöriatrik cilt gibi kronik inflamatuvar dokuların klinik örneklerinde B2 reseptörlerinde herhangi bir azalma olmadan B1 reseptörlerinin arttığı gösterilmiştir (169).

Her kinin reseptör alt tipinin inflamatuvar cevabın başka yönlerine sebep olup olmadığı merak uyandıran bir konudur. B1 reseptör antagonistleri, antijen ile pulmoner inflamasyon oluşturulmuş farelerde eozinofilleri sayısını azaltırken karbakole karşı olan havayolu hiperreaktivitesini azaltmamaktadır (170). B2 reseptör antagonisti icatibant ise daha yaygın etki göstererek hem eozinofil hem de mononükleer hücrelerin artışını

engellemiş hem de havayollarının hipersensitivitesini azaltmıştır. Her ne kadar allerjen nedeniyle ortaya çıkan bronşial hiperreaktivite ile B1 reseptör mRNA artışı arasında bir paralellik ve des-Arg10-Hoe 140'ın belli bir takım tedavi edici etkileri gözlenmiş olsa da (171), klinik çalışmalar hastalarda aerosol halindeki bradikinine karşı havayolu hipersensitivitesi gözlenirken Lys-des-Arg9-BK'in böyle bir etkisi gözlenmemiştir (172). Icatibant klinik araştırmalarda astım hastalarında bazı anti-inflamatuar özellikler göstermiştir (173). Ancak ovalbumin'e karşı sensitize edilmiş ve ovalbumin verilmiş farelerden alınan bronkoalveolar lavaj hücreleri arasında eozinofiller bulunmaktadır ve bu eozinofillerdeki B1 reseptörlerine bağlı des-Arg9-BK'e karşı verilen cevap, B1 reseptörlerinin akciğer inflamasyonundaki belli bazı etkileri olduğunu desteklemektedir (174). B1 reseptörleri olmayan transgenik farelerin dokularında nötrofil birikimi gibi inflamasyonun bir takım sonuçlarına karşı dirençli oldukları daha önceden yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir (175). Ancak halen altta yatan mekanizma tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. İntravital mikroskopi kullanılarak fare mezenterinde, des-Arg9-BK'nin lökositler üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ancak birlikte IL-1 β verilmiş olan mezenterlerde ise nötrofil rolling, adezyon ve emigrasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (176).

Peritoneal kavitede kininler ve bradikinin etkileri üzerine yapılmış sınırlı sayıda da olsa bir takım çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan ikisinde peritoneal kavitede bradikininin peritoneal diyaliz temizlenmesini hızlandırdığı (9) ve peritoneal inflamasyon gelişiminde rol oynadığı ve permeabiliteyi artırdığı bildirilmiştir (10). Bu bilgilerden yola çıkarak Andre ve arkadaşlarının yapmış oldukları araştırmada bradikinin insan mezotelyal hücrelerinde konsantrasyona bağımlı olarak intraselüler [Ca²⁺]’u artırdığı ve bu etkisinin de selektif B2 reseptör antagonisti olan HOE-140 verilerek reversibl olarak inhibe edildiğini göstermişlerdir. Sonuçta da bradikininin B2 reseptörleri aracılığı ile intraselüler [Ca²⁺] seviyesinde artışa neden olduğu sonucuna ulaşmışlardır (1). Böylece bradikininin, B2 reseptörleri aracılığı ile peritonda hücre düzeyinde etkileri olduğu gösterilmiştir.

Damas ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırmada carrageenin ile oluşturulan peritonit halinde oluşan eksudada immünreaktif kinin seviyeleri ilk iki saat içerisinde tek bir pik yapmış sonrasında azalmış, kinin seviyeleri ise yüksekliğini korumuş ve I-125 ile işaretli albumin eksudasyonuna eşlik etmiştir. Yapmış oldukları kromatografide ise mevcut olan kininlerin bradikinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak da kinin sisteminin carrageenin ile oluşturulan inflamatuvar reaksiyonların gelişmesinde sorumlu temel faktör olduğunu belirtmişlerdir (178).

Böckmann ve arkadaşları tarafından guinea domuzunda peritoneal makrofajlarında bradikinin reseptör varlığı "binding studies" ve fosfolipaz C aktivasyonu ve intraselüler kalsiyum konsantrasyonları üzerindeki etkileri ile gösterilmiştir. "Binding" araştırmaları spesifik, [3H]bradikinin'in çözülebilir binding'i HOE-140 ile inhibe olurken bradikinin B1 reseptör antagonisti (des-Arg9[Leu8]bradykinin) tarafından inhibe olmadığı bildirilmiştir (11). Yazar daha sonraki araştırmasında bradikinin verilerek artan sitozolik serbest kalsiyum konsantrasyonlarının ve respiratuar patlama aktivasyonunun, bradikinin ile stimülasyondan 24 saat önce verilen makrofaj kültürlerinde IL-1 β ile daha da arttığını göstermiştir (12). Yine aynı yazar bir başka makalesinde ise bradikinin'in süperoksit radikali, arasıdonik asit ve prostaglandin E2 (PGE)'nin sekresyonunun, bradikinin B2 reseptörlerinin alt tipi aracılığı ile stimüle edildiğini ve bradikinin'in bu etkisinin HOE 140 ile tamamen inhibe olduğunu bildirmiştir (13). Araştırmacı bu araştırmalarını makrofaj kültürleri üzerinde yapmış olup, bradikininin peritoneal makrofajlar üzerindeki sistemik etkisini in vivo olarak çalışmamıştır.

Damas ve Böckmann tarafından ortaya konan bradikininin periton üzerindeki inflamatuvar etkilerine paralel bir biçimde bizim araştırmamızda da klorheksidin glukonat verilerek oluşturulan inflamasyon halinin, bradikinin verilen C grubunda daha da arttığı gösterilmiştir. Özellikle neovaskülarizasyon ve PMNL hücre infiltrasyonundaki artış dikkat çekiciydi. İnflamatuvar süreçte mezotelyal hücreler granülositlerden, makrofajlardan ve endotelial hücrelerden salgılanan medyatörler ile stimüle olurlar (128) ve bu medyatörler aracılığı ile fibrozis mekanizması stimüle olur. Bu nedenle PMNL hücre infiltrasyonundaki artışın çalıştığımız peritoneal fibrozis modelinde fibrozisi artırabileceğini düşündürdü.

Öte yandan yapılan bir takım araştırmalarda bradikininin inflamatuvar etkilerinin yanı sıra çeşitli dokularda antifibrotik etkilerinin de olduğu gösterilmiştir. Schanstra ve ark. (5)'nin yapmış olduğu araştırmada unilateral üreteral obstrüksiyon oluşturulmuş B2 reseptörü olmayan transgenik (B $^{-/-}$) farelerde (B2 $+/+$) farelere kıyasla renal tübülointerstisyel fibrozisin anlamlı derecede fazla olduğu gösterilmiştir. (B2 $^{-/-}$) farelerde daha az plazminojen aktivatör (PA) aktivitesinin olduğu, beraberinde MMP-2 aktivitesinin de azaldığı gözlenmiş ve üreteral obstrüksiyon oluşturulmuş B2 reseptörü olmayan transgenik (B $^{-/-}$) farelerde tübülointerstisyel fibrozisinin azalmasının buna bağlı olduğu düşünülmüştür. Tübüler hücrelere önceden verilen TNF- α ve IFN- γ gibi proinflamatuvar faktörler bradikinin aracılığıyla PA aktivitesini artırmış ve spesifik B2 reseptör antagonisti olan HOE-140 verilerek artan PA aktivitesi inhibe edilmiştir. Bir başka grup hayvanın doku

kallikrein geninin ekspresyonu artırılarak endojen bradikinin ekspresyonu artırılmıştır. Transgenik bu ratlarda, B2 reseptör antagonisti verilerek ortaya çıkan antifibrotik etkiler inhibe edilmiştir.

Okada ve ark. (6)'nın yapmış olduğu bir başka araştırmada ise siklosporin A nefropatisi oluşturulmuş ratlarda yine bradikinin'in renal tübülointerstisyumunda genel bir kollajenolize neden olduğu ancak bu etkinin tPA'yı etkilemeden B2 reseptörü aracılığı ile PAI-I ekspresyonunu azaltıp, plazminin ve MMP-9'un aktivitesini artırması ile olduğunu bildirilmiştir.

Zhang ve ark. (7)'nin tuz yüklemesi ile renal fibrozis meydana getirdikleri ratlarda verilen doku kallikreininin NO ve cGMP seviyelerini artırırken, tuz nedeniyle ortaya çıkan nikotinamid adenin dinükleotid/nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADH/NADPH) oksidaz aktivitesini, süperoksit üretimini, TGF- β 1 mRNA ve TGF- β 1 immün boyanma oranlarını azalttığını göstermişlerdir.

Karaciğerde hepataselüler hasar ve fibrozis üzerine yapılan bir araştırmada, Sancho-Bru ve ark. (8) fibrotik karaciğerlerde BK reseptör sayısının arttığını göstermişler ve bradikinin'in fibrojenik hepatik stellat hücrelerinde geçici olarak $[Ca^{2+}]$ 'u arttırdığını, prokollajen- α 1, TGF- β gen ekspresyonunu azalttığını ve MMP-2 aktivasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir.

Bradikininin antifibrotik etkilerini araştıran bu çalışmalarda kullanılan TGF- β , PAI-1 ve MMP'lerin enkapsüle peritoneal fibrozisin yapısal ve fonksiyonel değişikliklerindeki rolü daha önce yapılmış olan klorheksidin glukonat ile meydana getirilen peritoneal fibrozis modellerinde gösterilmiştir (2,129,177,179). Yukarıda bahsedildiği üzere, bradikininin antifibrotik etkisinin araştırılmış olduğu çalışmalarda, bradikininin fibrozisi önleyici etkisini bu parametreler üzerinden meydana getirdiği gösterilmiştir. Bu nedenlerden dolayı bu parametreleri, bradikininin inflamatuvar etkisinin yanında ayrıca peritoneal fibrozis modelinde antifibrotik bir etkinliğinin olup olmadığını araştırmak amacıyla çalıştık.

Bu parametrelerden TGF- β peritoneal fibrozisin direkt göstergelerinden birisidir (177). Klorheksidin glukonat oluşturulmuş peritoneal fibrozis modellerinde TGF- β 'nın seviyesinin peritoneal dokularda artış gösterdiği tespit edilmiştir (2, 129, 177, 179). Dahası, TGF- β gen transferinin peritonda kalınlaşmaya ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna ve submezotelyal kompakt zonda neovaskülarizasyona neden olduğu gösterilmiştir (180). Bizim araştırmamızda da B grubunda subepitelyal kompakt zonda endotelyal hücrelerin,

fibroblastların ve monositler ile makrofajların yüzeylerinde TGF- β boyanma miktarı kontrol grubuna kıyasla artış gösterdi. Zhang ve ark.'nın renal fibroziste, Sancho-Bru ve ark.'nın hepatik fibroziste gösterdiklerinin aksine, özellikle endotel hücrelerde ve fibroblastlardaki TGF- β immünohistokimyasal boyanma miktarı sistemik olarak bradikinin verilen hayvanlarda daha da artış gösterdi. Bununla birlikte hemotoksilen-eozin boyamalarında gösterilen submezotelyal kompakt zondaki neovaskülarizasyon ve PMNL infiltrasyonu da TGF- β artışıyla örtüşmekteydi.

İnflamasyondan fibrozise geçişte anahtar medyatörler olan MMP'ler klorheksidin glukonat sıçan modellerinde araştırılmıştır ve peritoneal hasarla birlikte aktive oldukları gösterilmiştir (137). Klorheksidin glukonat verilen sıçanlarda MMP-2 inhibisyonunun ve metalloproteinaz doku inhibitörlerinin submezotelyal kalınlaşmayı, tip 1 kollajen, TGF- β ve α -SMA'yı (alpha-smooth muscle actin) azalttığı gösterilmiştir (138). Çalışmamızda incelenen örneklerde kontrol grubunda sadece fibroblastlarda, B grubunda submezotelyal kompakt zonda endotel hücre yüzeyinde zayıf olarak boyanma gösterirken, bradikinin verilen grupta farklı olarak sadece endotel hücre yüzeyinde değil aynı zamanda fibroblastlar ve makrofajlarda da boyanma gözlemlendi. Bu iki hücre çeşidinde sadece bradikinin verilen grupta boyanma görülmesi, artan inflamatuvar yanıtı sekonder olarak peritoneal dokuda MMP-2 düzeyinde artış geliştiği şeklinde yorumlandı. Sancho-Bru ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada sistemik olarak verilen bradikininin MMP-2 miktarını artırarak hepatik stellat hücrelerin fibrinolitik etkilerini artırabileceğini savunmuşlardır. Halbuki, yapılan çalışmalarda artan peritoneal MMP-2 seviyesinin fibrozisi artırdığını gösterilmiştir (177, 138). Araştırmamızda bradikininin peritonda MMP-2 seviyesini doğrudan artırıcı etkisi olduğunu söylemek mümkün olmamakla birlikte artırması durumunda bile bunun fibrozisi artıracağı aşıkardır.

Fibrinolizis süreci, makrofajlar ve peritoneal kaviteyi saran mezotelyal hücreler tarafından üretilen plazmin isimli enzim tarafından yürütülür (31). Plazmin, inaktif substrat plazminojenden doku tipi plazminojen aktivatör ve ürokinaz benzeri plazminojen aktivatör tarafından oluşturulur. Buna karşılık tPA, PAI-1 ile dengenin korunabilmesi için inhibe edilir. Ancak inflamme peritoneal dokuda peritoneal plazminojen aktivatörlerin aktivitesi önemli oranda azalmıştır. Bunun nedeni kısmen PAI konsantrasyonunun artmasıdır ve sonucunda da fibrinolitik kapasite azalmasına yol açarak adezyon formasyonu ortaya çıkar. Sulaiman ve ark. (113) plazminojen aktivatörü olmayan transgenik farelerde, kronik inflamatuvar hadiselerin daha fazla adezyon oluşumuna sebep olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca periton

diyaliz hastalarının serumlarında düşük tPA ile artmış PAI-1 seviyeleri gösterilmiştir (181). Dahası, in vitro yapılmış bir araştırmada TGF- β stimülasyonu ile mezotelyal hücrelerin PAI-1 ürettikleri gösterilmiştir (182). Çalışmamızda B grubunda submezotelyal kompakt zondaki endotelial hücre yüzeyinde, fibroblastlarda, monosit ve makrofajlarda boyanma gözlenirken, C grubunda sadece endotelial hücrelerde zayıf boyanma gözlemlendi. Sonuç olarak, bradikinin verilen grupta PAI-1 seviyesinde azalma gözlemlendi. Böylelikle, Okada ve ark.'nın renal fibrozis üzerinde yapmış olduğu araştırmada bulduklarına benzer şekilde bradikininin inflame peritonda PAI-1'i azalttığını gösterdik.

Önceden bahsedildiği gibi Böckmann ve arkadaşları tarafından guinea domuzunda peritoneal makrofajlarında bradikinin reseptör varlığı ve hücresel düzeyde etkileri ve yine aynı araştırmacı tarafından bradikininin B2 reseptörleri aracılığı ile süperoksit radikali, araşidonik asit ve prostaglandin E2 sekresyonunu stimüle edildiği gösterilmiştir. Ancak yazar bu araştırmalarını makrofaj kültürleri üzerinde yapmış olup, bradikininin peritoneal makrofajlar üzerindeki sistemik etkisini in vivo olarak çalışmamıştır. Öte yandan böbrekte ve karaciğerde bradikininin antifibrotik etkilerini gösteren araştırmalar bu etkinin B2 reseptörleri aracılığı ile olduğunu bildirmektedir (5, 6, 8). Yaptığımız araştırmalarda klorheksidin glukonat verilerek peritoneal inflamasyon ve sonucunda da fibrozis geliştirilen modellerde peritonda in vivo olarak B2 reseptörlerinin gösterilmediğini saptadık. Bu nedenlerden dolayı sistemik olarak verilen bradikininin etkisinin, peritonda var olan B2 reseptörleri nedeniyle gelişip gelişmediğinin gösterilmesi önem taşımaktaydı. Klorheksidin glukonat ile gelişen inflamasyonla birlikte subendotelial kompakt zonda fibroblastlar, endotelial hücrelerde bradikinin reseptörlerinin arttığı ve sonucunda da sistemik olarak verilecek bradikinine olan duyarlılığın da arttığı gösterildi. C grubu ile B grubu arasında ise bradikinin reseptörlerinin oranları arasında fark olmaması nedeniyle devamlı infüzyon şeklinde verilen bradikininin, reseptörlerinin düzenleyici sistemler ile sayılarının azalmayıp fizyolojik olarak etkilerini devamlı gösterdiği anlaşıldı.

Son olarak araştırmamıza proinflamatuvar ve bazı dokularda antifibrotik etkileri olduğu bilinen bradikininin, klorheksidin glukonat verilerek peritoneal inflamasyon oluşturulan hayvanlarda peritoneal fibrozis açısından net etkisi değerlendirdik. B grubuna kıyasla C grubunda, hemotoksilin-eozin boyamalarında gözlenen submezotelyal kompakt zondaki kalınlaşma, neovaskülarizasyon ve PMNL infiltrasyonunda artışın yanı sıra fibrozisin de anlamlı derecede artış gösterdiğini saptadık. Fibrozisin daha iyi gözleyebilmek için yapılan PAS boyamalarında da benzer şekilde fibroziste artış olduğu teyit edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızda klorheksidin glukonat ile enkapsüle peritoneal sklerozis oluşturulan ratlarda gelişen peritoneal fibrozis üzerine bradikininin etkisini araştırdık. Bu amaçla, peritoneal doku örnekleri hematoksilien-eozin ve PAS boyalarının yanı sıra bradikinin B2, TGF- β 1 ve MMP-2 immünohistokimyasal boyaları ile histopatolojik değerlendirme yaptık.

Sonuç olarak;

- 1) Mezotelyal hücrelerin sayı ve şekilleri açısından B ve C grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı.
- 2) Submezotelyal kompakt zonda kalınlaşma, neovaskülarizasyon ve fibrozis C grubunda B grubuna göre daha fazla iken, interstisyel ödem açısından fark saptanmadı.
- 3) Submezotelyal kompakt zonda inflamatuvar hücre infiltrasyonları açısından yapılan incelemede, B grubuna göre C grubunda PMNL hücre infiltrasyonu daha fazla iken monosit/makrofaj infiltrasyonu açısından ise fark yoktu.
- 4) PAS boyamalarında da C grubunda fibrozis B grubuna kıyasla daha şiddetli iken fibrin ve bazal membran kalınlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.
- 5) MMP-2 immünohistokimyasal boyamalarda C grubunda B grubuna kıyasla fibroblastlardaki ve monosit/makrofajlardaki boyanma B grubuna göre daha fazlayken endotelial hücre yüzeyinde istatistiksel fark gözlenmedi.
- 6) TGF- β 1 immünohistokimyasal boyamalarda, C grubunda submezotelial kompakt zonda fibroblast ve endotelial hücre yüzeyindeki boyanma, B grubuna göre artmış iken monosit/makrofajlarda ise fark gözlenmedi.
- 7) PAI-1 immünohistokimyasal boyamalarda C grubunda B grubundan farklı olarak submezotelial kompakt zondaki fibroblast ve monosit/makrofajlarda daha az boyanma gözlenirken, mezotelial hücrelerde ve endotelial hücre yüzeylerinde ise fark gözlenmedi.

8) Bradikinin B2 immünohistokimyasal boyamalarda, B ve C gruplarında kontrol grubuna, submezotelial kompakt zonda fibroblastlar, endotelial hücre yüzeyi ve monosit/makrofajlarda daha fazla boyanma gözlenirken, bu iki grup arasında herhangi bir fark gözlenmedi.

Sonuç olarak, bradikinin enkapsüle peritoneal fibrozis oluşturulmuş olan sıçanlarda, proinflamatuar ve aynı zamanda da antifibrotik etkileri bir arada göstermiştir. Ancak daha önce de gösterildiği gibi B2 reseptörleri ve muhtemelen de B1 reseptörleri aracılığı ile oluşturduğu proinflamatuar etkileri B2 reseptörleri aracılığı ile oluşturduğu antifibrotik etkilere kıyasla daha fazla olup net verilere bakıldığında fibrozisi artırıcı bir etkisi olduğu gözlemlendi. Bradikinin reseptörlerinin peritoneal fibrozis üzerindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için reseptörlere spesifik bradikinin agonist ve antagonistleri ile daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. [Andre M](#), [Rahimi S](#), [Schollmeyer P](#), [Pavenstädt H](#). Bradykinin stimulates the intracellular calcium activity in human mesothelial cells. [Nephrol Dial Transplant](#). 1998;13(8):2047-52.
2. [Miyazaki M](#), [Yuzawa Y](#). The role of peritoneal fibrosis in encapsulating peritoneal sclerosis. [Perit Dial Int](#). 2005;25(4):48-56.
3. Griesbacher T, Lembeck F. Effect of bradykinin antagonists on bradykinin-induced plasma extravasation, vasoconstriction, prostoglandin E2 release, nociceptor stimulation and contraction of the iris sphincter muscle in the rabbit. *Br J Pharmacol*. 1987;92:333-40.
4. [Leeb-Lundberg LM](#), [Marceau F](#), [Müller-Esterl W](#), [Pettibone DJ](#), [Zuraw BL](#). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. [Pharmacol Rev](#). 2005;57(1):27-77.
5. [Schanstra JP](#), [Neau E](#), [Drogoz P](#), [Arevalo Gomez MA](#), [Lopez Novoa JM](#), [Calise D](#), [Pecher C](#), [Bader M](#), [Girolami JP](#), [Bascands JL](#). In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. [J Clin Invest](#). 2002;110(3):371-9.

6. [Okada H](#), [Watanabe Y](#), [Kikuta T](#), [Kobayashi T](#), [Kanno Y](#), [Sugaya T](#), [Suzuki H](#). Bradykinin decreases plasminogen activator inhibitor-1 expression and facilitates matrix degradation in the renal tubulointerstitium under angiotensin-converting enzyme blockade. [J Am Soc Nephrol](#), 2004.15(9):2404-13.
7. [Zhang JJ](#), [Bledsoe G](#), [Kato K](#), [Chao L](#), [Chao J](#). Tissue kallikrein attenuates salt-induced renal fibrosis by inhibition of oxidative stress. [Kidney Int](#). 2004;66(2):722-32.
8. [Sancho-Bru P](#), [Bataller R](#), [Fernandez-Varo G](#), [Moreno M](#), [Ramalho LN](#), [Colmenero J](#), [Marí M](#), [Clària J](#), [Jiménez W](#), [Arroyo V](#), [Brenner DA](#), [Ginès P](#). Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury. [Gastroenterology](#). 2007;133(6):2019-28.
9. Brown EA, Kliger AS, Goffinet J, Finkelstein FO. Effect of hypertonic dialysate and vasodilators on peritoneal dialysis clearances in the rat. [Kidney Int](#). 1978;13:271-77.
10. Miller FN, Joshua IG, Anderson GL. Quantitation of vasodilator-induced macromolecular leakage by in vivo fluorescent microscopy. [Microvasc Res](#) 1982;24:56-67
11. [Böckmann S](#), [Paegelow I](#). Bradykinin receptors in signal transduction pathways in peritoneal guinea pigs macrophages. [Eur J Pharmacol](#). 1995;291(2):159-65.
12. [Böckmann S](#), [Mohrdieck K](#), [Paegelow I](#). Influence of interleukin-1 beta on bradykinin-induced responses in guinea pig peritoneal macrophages. [Inflamm Res](#). 1999;48(1):56-62.
13. [Böckmann S](#), [Mohrdieck K](#), [Schmidt H](#), [Zündorf G](#), [Paegelow I](#). Differential sensitivity of macrophages to bradykinin. [Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol](#). 1998;357(2):151-8.
14. Hills B. Graphite-like lubrication of mesothelium by oligolamellar pleural surfactant. [J Appl Physiol](#). 1992;73:1034–1039.
15. Dobbie J. Ultrastructure and pathology of the peritoneum in peritoneal dialysis. In: Textbook of peritoneal dialysis, Gokal NK, editor. Dordrecht: Kluwer Academic;1994.p. 38–106.
16. McMinn, R. Last's anatomy. regional and applied.9th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994.

17. Raftery AT. Regeneration of parietal and visceral peritoneum: an electron microscopical study. *J Anat.* 1973;115:375–92.
18. Tsilibary EC, Wissig SL. Absorption from the peritoneal cavity: SEM study of the mesothelium covering the peritoneal surface of the muscular portion of the diaphragm. *Am J Anat.* 1977;149: 127–33.
19. Mironov VA, Gusev SA, Baradi AF: Mesothelial stomata overlying omental milky spots: scanning electron microscopic study. *Cell Tissue Res*, 1979;201: 327–30.
20. Michailova K, Wassilev W, Wedel T. Scanning and transmission electron microscopic study of visceral and parietal peritoneal regions in the rat. *Ann Anat.* 1999;181: 253–60.
21. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36: 9–16.
22. Dobbie JW. Morphology of the peritoneum in CAPD. *Blood Purif.* 1989;7: 74–85.
23. Yao V, Platell C, Hall JC. Role of peritoneal mesothelial cells in peritonitis. *Br J Surg.* 2003;90:1187–1194.
24. Mutsaers SE, Whitaker D, Papadimitriou JM. Changes in the concentration of microvilli on the free surface of healing mesothelium are associated with alterations in surface membrane charge. *J Pathol.* 1996;180:333–9.
25. Andrews PM, Porter KR. The ultrastructural morphology and possible functional significance of mesothelial microvilli. *Anat Rec.* 1973;177: 409–26.
26. Madison LD, Bergstrom-Porter B, Torres AR, Shelton E. Regulation of surface topography of mouse peritoneal cells. Formation of microvilli and vesiculated pits on omental mesothelial cells by serum and other proteins. *J Cell Biol.* 1979;82:783–97.
27. Bird SD. Mesothelial primary cilia of peritoneal and other serosal surfaces. *Cell Biol Int.* 2004;28:151–9.
28. van den Tol P, van Rossen E, van Eijck C, Bonthuis F, Marquet R, Jeekel H. Reduction of peritoneal trauma by using nonsurgical gauze leads to less implantation metastasis of spilled tumor cells. *Ann Surg.* 1998;227:242–248.
29. Coffey J, Smith M, Wang J, Bouchier-Hayes D, Cotter T, Redmond H. Cancer surgery: risks and opportunities. *Bio Essays.* 2006;28:433–437.

30. Badia JM, Whawell SA, Scott-Coombes DM, Abel PD, Williamson RC, Thompson JN. Peritoneal and systemic cytokine response to laparotomy. *Br J Surg.* 1996;83:347–348.
31. Riese J, Schoolmann S, Denzel C, Herrmann O, Hohenberger W, Haupt W. Effect of abdominal infections on peritoneal and systemic production of interleukin 6 and monocyte chemoattractant protein-1. *Shock.* 2002;17:361–364.
32. [Sammour T](#), [Kahokehr A](#), [Soop M](#), [Hill AG](#). Peritoneal damage: the inflammatory response and clinical implications of the neuro-immuno-humoral axis. [World J Surg.](#) 2010;34(4):704-20.
33. di Zerega GS. The peritoneum and its response to surgical injury. *Prog Clin Biol Res.* 1990;358:1–11.
34. Goehler L, Gaykema R, Hammack S, Maier S, Watkins L. Interleukin-1 induces c-fos immunoreactivity in primary afferent neurons of the vagus nerve. *Brain Res.* 1998;804:306–310.
35. Maier SF, Goehler LE, Fleshner M, Watkins LR. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Ann NY Acad Sci.* 1998;840:289–300.
36. Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Tache Y. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology.* 2006;130:1391–1411.
37. Sendt W, Amberg R, Schoffel U, Hassan A, von Specht BU, Farthmann EH. Local inflammatory peritoneal response to operative trauma: studies on cell activity, cytokine expression, and adhesion molecules. *Eur J Surg.* 1999;165:1024–1030.
38. Wiczorek M, Dunn AJ. Effect of subdiaphragmatic vagotomy on the noradrenergic and HPA axis activation induced by intraperitoneal interleukin-1 administration in rats. *Brain Res.* 2006;1101:73–84.
39. Marquette C, Linard C, Galonnier M, Van Uye A, Mathieu J, Gourmelon P. IL-1 β , TNF- α and IL-6 induction in the rat brain after partial-body irradiation: role of vagal afferents. *Int J Radiat Biol.* 2003;79:777–785.
40. Fleshner M, Goehler L, Schwartz B. Thermogenic and corticosterone responses (IL-1 β and TNF- α) are attenuated by subdiaphragmatic vagotomy. *J Neuroimmunol.* 1998;86:134–141.

41. Wieczorek M, Swiergiel AH, Pournajafi-Nazarloo H, Dunn AJ. Physiological and behavioral responses to interleukin-1beta and LPS in vagotomized mice. *Physiol Behav.* 2005;85:500–511.
42. Chuang D, Paddison J, Booth R, Hill A. Differential production of cytokines following colorectal surgery. *ANZ J Surg.* 2006;76:821–824.
43. van Berge Henegouwen MI, van der Poll T, van Deventer SJ, Gouma DJ. Peritoneal cytokine release after elective gastrointestinal surgery and postoperative complications. *Am J Surg.* 1998;175:311–316.
44. Paddison JS, Booth RJ, Fuchs D, Hill AG. Peritoneal inflammation and fatigue experiences following colorectal surgery: a pilot study. *Psychoneuroendocrinology.* 2008;33:446–454.
45. Zargar-Shoshtari K, Sammour T, Kahokehr A, Connolly A, Hill A. Double-blind randomised controlled trial of the influence of dexamethasone on post-operative recovery following colectomy. *Br J Surg.* 2009;96:1253–1261.
46. Lepner U, Goroshina J, Samarutel J. Postoperative pain relief after laparoscopic cholecystectomy: a randomised prospective double-blind clinical trial. *Scand J Surg.* 2003;92:121–124.
47. Palmes D, Rottgermann S, Classen C, Haier J, Horstmann R. Randomized clinical trial of the influence of intraperitoneal local anaesthesia on pain after laparoscopic surgery. *Br J Surg.* 2007;94:824–832.
48. Rimback G, Cassuto J, Faxen A, Hogstrom S, Wallin G, Tollesson PO. Effect of intra-abdominal bupivacaine instillation on postoperative colonic motility. *Gut.* 1986;27:170–175.
49. Pasqualucci A, Contardo R, Da Broi U, Colo F, Terrosu G, Donini A. The effects of intraperitoneal local anesthetic on analgesic requirements and endocrine response after laparoscopic cholecystectomy: a randomized double-blind controlled study. *J Laparoendosc Surg.* 1997;4:405–412.
50. Zhitniuk RI, Kataeva GA. Intraperitoneal infusions of novocaine after laparotomies for the prevention of intraperitoneal adhesions. *Khirurgiia.* 1974;67–69.

51. Michailova KN, Usunoff KG. Serosal membranes (pleura, pericardium, peritoneum). Normal structure, development and experimental pathology. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2006;183:1–144.
52. Hau T, Hoffman R, Simmons RL. Mechanisms of the adjuvant effect of hemoglobin in experimental peritonitis. I. In vivo inhibition of peritoneal leukocytosis. *Surgery.* 1978;83:223–229.
53. Allen L. The peritoneal stomata. *Anat Rec.* 1936;67:89.
54. Higgins J, Beaver M, Lemon W. Phrenic neurectomy and peritoneal absorption. *Am J Anat.* 1990;45:137.
55. Florey H. Reactions of, and absorption by, lymphatics, with special reference to those of the diaphragm. *Br J Ex Pathol.* 1927;8:479.
56. Fukatsu K, Saito H, Han I, Inoue T, Furukawa S, Matsuda T. Concomitant increase in neutrophil adhesion to inflammatory peritoneum and remote organs during peritonitis. *J Surg Res.* 1999;81:156–163.
57. Mizgerd JP, Kubo H, Kutkoski GJ, Bhagwan SD, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL. Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. *J Exp Med.* 1997;186:1357–1364.
58. Robson RL, McLoughlin RM, Witowski J, Loetscher P, Wilkinson TS, Jones SA. Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2001;167:1028–1038.
59. Bosse R, Vestweber D. Only simultaneous blocking of the L- and P-selectin completely inhibits neutrophil migration into mouse peritoneum. *Eur J Immunol.* 1994;24:3019–3024.
60. Jongstra-Bilen J, Misener VL, Wang C, Ginzberg H, Auerbach A, Joyner AL. LSP1 modulates leukocyte populations in resting and inflamed peritoneum. *Blood.* 2000;96:1827–1835.
61. Scott MJ, Cheadle WG, Hoth JJ, Peyton JC, Subbarao K, Shao WH. Leukotriene B4 receptor (BLT-1) modulates neutrophil influx into the peritoneum but not the lung and liver during surgically induced bacterial peritonitis in mice. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:936–941.

62. Sendt W, Wolff-Vorbeck G, Leipziger J, von Specht BU, Schoffel U. In vitro peritonitis: basic inflammatory reactions in a two-chamber coculture model of human peritoneum. *Int J Colorectal Dis.* 2000;15:229–235.
63. Sasaki K. Abdominal peritoneum as a defense organ: analysis of ICAM-1 expression in the LPS-stimulated rat. *Clin Anat.* 1999;12:20–26.
64. Paulson J, Mellinger J, Baguley W. The use of intraperitoneal bupivacaine to decrease the length of stay in elective laparoscopic cholecystectomy patients. *Am Surg.* 2003;69:275–279.
65. Mitra R, Dharajiya N, Kumari L, Varalakshmi C, Khar A. Migration of antigen presenting cells from periphery to the peritoneum during an inflammatory response: role of chemokines and cytokines. *FASEB J.* 2004;18:1764–1766.
66. Valle MT, Degl'Innocenti ML, Bertelli R, Facchetti P, Perfumo F, Fenoglio D. Antigen-presenting function of human peritoneum mesothelial cells. *Clin Exp Immunol.* 1995;101:172–176.
67. Glik A, Douvdevani A. T lymphocytes: the “cellular” arm of acquired immunity in the peritoneum. *Perit Dial Int.* 2006;26:438–448.
68. Hartmann J, MaaBen V, Rieber P, Fricke H. T lymphocytes from normal human peritoneum are phenotypically different from their counterparts in peripheral blood and CD3-lymphocyte subsets contain mRNA for the recombination activating gene RAG-1. *Eur J Immunol.* 1995;25:2626–2631.
69. Cannistra SA, Ottensmeier C, Tidy J, DeFranzo B. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by peritoneal mesothelium partly mediates the binding of activated human T lymphocytes. *Exp Hematol.* 1994;22:996–1002.
70. Birkhofer A, Rehbock J, Fricke H. T lymphocytes from the normal human peritoneum contain high frequencies of Th2-type CD8⁺ T cells. *Eur J Immunol.* 1996;26:957–960.
71. Cong Y, Weaver C, Lazenby A. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J Immunol.* 2002;169:6112–6119.
72. Zantl N, Uebe A, Neumann B. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun.* 1998;66:2300–2309.

73. Xia M, Gasser J, Feige U. Dexamethasone enhances CTLA-4 expression during T cell activation. *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:1649–1656.
74. Busse M, Traeger T, Pötschke C. Detrimental role for CD4⁺ T lymphocytes in murine diffuse peritonitis due to inhibition of local bacterial elimination. *Gut.* 2008;57:188–195.
75. Heel KA, Hall JC. Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue. *Br J Surg.* 1996;83:1031–1036.
76. Stoermann B, Kretschmer K, Duber S, Weiss S. B-1a cells are imprinted by the microenvironment in spleen and peritoneum. *Eur J Immunol.* 2007;37:1613–20.
77. Berberich S, Dahne S, Schippers A, Peters T, Müller W, Kremmer E. Differential molecular and anatomical basis for B cell migration into the peritoneal cavity and omental milky spots. *J Immunol.* 2008;180:2196–2203.
78. Mercolino TJ, Arnold LW, Hawkins LA, Haughton G. Normal mouse peritoneum contains a large population of Ly-1⁺ (CD5) B cells that recognize phosphatidyl choline. Relationship to cells that secrete hemolytic antibody specific for autologous erythrocytes. *J Exp Med.* 1988;168:687–698.
79. Rabson A, Roitt I, Delves P. Really essential medical immunology (essentials). 2nd ed. Oxford:Wiley Blackwell;2004
80. Sayers T, Mason L, Wiltout T. Trafficking and activation of murine natural killer cells: differing roles for IFN- γ and IL-2. *Cell Immunol.* 1990;127:311–316.
81. Hau T. Bacteria, toxins, and the peritoneum. *World J Surg.* 1990;14:167–175
82. Alonso J, Miguel LSD, Monton M. Endothelial cytosolic proteins bind to the 3'-untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol.* 1997;17:5719–26.
83. Arriero MM, Rodriguez-Feo JA, Celdran A, Sanchez de Miguel L, Gonzalez-Fernandez F, Fortes J. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human peritoneal tissue: regulation by *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:1848–1856.
84. Sido B, Teklote JR, Hartel M, Friess H, Buchler MW. Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004;18:439–454.

85. Itoh Y, Joh T, Tanida S. IL-8 promotes cell proliferation and migration through metalloproteinase-cleavage proHB-EGF in human colon carcinoma cells. *Cytokine*. 2005;29:275–282.
86. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*. 2000;127:117–126
87. Tracey K, Fong Y, Hesse D. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987;330:662–664.
88. Eskandari M, Bolgos G, Miller C. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol*. 1992;148:2724–2730.
89. Matthiessen P, Strand I, Jansson K, Tornquist C, Andersson M, Rutegard J. Is early detection of anastomotic leakage possible by intraperitoneal microdialysis and intraperitoneal cytokines after anterior resection of the rectum for cancer? *Dis Colon Rectum*. 2007;50:1918–1927.
90. Margetts PJ, Kolb M, Yu L, Hoff CM, Holmes CJ, Anthony DC. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum. *Am J Pathol*. 2002;160:2285–2294.
91. Stadlmann S, Pollheimer J, Renner K, Zeimet AG, Offner FA, Amberger A. Response of human peritoneal mesothelial cells to inflammatory injury is regulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Wound Repair Regen*. 2006;14:187–194.
92. Baigrie R, Lamont P, Kwiatkowski D. Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg*. 1992;19:757–760.
93. Greca FH, Souza Filho ZA, Giovanini A, Camargo Junior CA, Rubin MR, Silva RF. Interleukin-6 (IL-6) influence on colonic anastomosis healing in rats. *Acta Cir Bras*. 2007;22:110–114.
94. van der Poll T, Marchant A, Buurman W. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol*. 1995;155:5397–5401.
95. Holmdahl L, Kotseos K, Bergstrom M, Falk P, Ivarsson ML, Chegini N. Overproduction of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) is associated with adhesion formation and peritoneal fibrinolytic impairment. *Surgery*. 2001;129:626–632.
96. van der Wal JB, Jeekel J. Biology of the peritoneum in normal homeostasis and after surgical trauma. *Colorectal Dis*. 2007;9(2):9–13.

97. Saed GM, Zhang W, Diamond MP. Molecular characterization of fibroblasts isolated from human peritoneum and adhesions. *Fertil Steril*. 2007;75:763–768.
98. Fukasawa M, Yanagihara DL, Rodgers KE, DiZerega GS. The mitogenic activity of peritoneal tissue repair cells: control by growth factors. *J Surg Res*. 1989;47:45–51.
99. Wallwiener D, Meyer A, Bastert G. Adhesion formation of the parietal and visceral peritoneum: an explanation for the controversy on the use of autologous and alloplastic barriers? *Fertil Steril*. 1998;69:132–137.
100. Muller SA, Treutner KH, Tietze L, Anurov M, Titkova S, Polivoda M et al. Influence of intraperitoneal phospholipid dosage on adhesion formation and wound healing at different intervals after surgery. *Langenbecks Arch Surg*. 2001;386:278–284.
101. de Jonge W, van Den Wijngaard R, The F. Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology*. 2003;125:1137–1147.
102. DeCherney AH, di Zerega GS. Clinical problem of intraperitoneal postsurgical adhesion formation following general surgery and the use of adhesion prevention barriers. *Surg Clin North Am*. 1997;77:671–688.
103. Thompson, J. Peritoneal fibrinolysis and adhesion formation. New York:Springer;2000.
104. Jones P, Werb Z. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. II. Influence of matrix composition on proteolysis of glycoproteins, elastin, and collagen by macrophages in culture. *J Exp Med*. 1980;152:1527–36.
105. Merlo G, Fausone G, Castagna B. Fibrinolytic activity of mesothelial lining of the displaced peritoneum. *Am J Med Sci*. 1983;286:12–14.
106. Wilkosz S, Epstein J, de Giorgio-Miller A, McLean W, Ireland G, Herrick S. Remodelling of adipose tissue during experimental omental adhesion formation. *Br J Surg*. 2008;95:387–396.
107. Vipond MN, Whawell SA, Thompson JN, Dudley HA. Peritoneal fibrinolytic activity and intra-abdominal adhesions. *Lancet* 1990;335:1120–1122.
108. Ivarsson ML, Falk P, Holmdahl L. Response of visceral peritoneum to abdominal surgery. *Br J Surg*. 2001;88:148–151.

109. Holmdahl, L. The role of fibrinolysis in adhesion formation. *Eur. J. Surg.* 1997;24–31.
110. Holmdahl, L. [Holmdahl L](#), [Eriksson E](#), [Eriksson BI](#), [Risberg B](#). Depression of peritoneal fibrinolysis during operation is a local response to trauma. *Surgery.* 1998;123: 539–544.
111. Doody, K.J. [Dunn RC](#), [Buttram VC Jr](#). Recombinant tissue plasminogen activator reduces adhesion formation in a rabbit uterine horn model. *Fertil. Steril.* 1989;51: 509–512.
112. Falk, K. [Björquist P](#), [Strömqvist M](#), [Holmdahl L](#). Reduction of experimental adhesion formation by inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1. *Br. J. Surg.* 2001;88: 286–289.
113. Sulaiman, H. [Dawson L](#), [Laurent GJ](#), [Bellingan GJ](#), [Herrick SE](#). Role of plasminogen activators in peritoneal adhesion formation. *Biochem. Soc. Trans.* 2002;30: 126–131.
114. [Atta HM](#), [Al-Hendy A](#), [El-Rehany MA](#), [Dewerchin M](#), [Abdel Raheim SR](#), [Abdel Ghany H](#), [Fouad R](#). Adenovirus-mediated overexpression of human tissue plasminogen activator prevents peritoneal adhesion formation/reformation in rats. [Surgery.](#) 2009;146(1):12-7.
115. Cohen PA, Gower AC, Stucchi AF, Leeman SE, Becker JM, Reed KL (2007) A neurokinin-1 receptor antagonist that reduces intraabdominal adhesion formation increases peritoneal matrix metalloproteinase activity. *Wound Repair Regen* 15:800–808
116. Mutsaers SE, Whitaker D, Papadimitriou JM. Stimulation of mesothelial cell proliferation by exudate macrophages enhances serosal wound healing in a murine model. *Am J Pathol* 2002; 160: 681–92.
117. Thompson JN, Whawell SA. Pathogenesis and prevention of adhesion formation. *Br J Surg* 1995;82: 3–5.
118. Jones PA, Werb Z. Degradation of connective tissue matrices by macrophages. II. Influence of matrix composition on proteolysis of glycoproteins, elastin, and collagen by macrophages in culture. *J Exp Med* 1980; 152: 1527–36.
119. Holmdahl L, Falkenberg M, Ivarsson ML, Risberg B. Plasminogen activators and inhibitors in peritoneal tissue. *APMIS* 1997;105: 25–30.

120. Scott-Coombes D, Whawell S, Vipond MN, Thompson J. Human intraperitoneal fibrinolytic response to elective surgery. *Br J Surg* 1995;82: 414–17.
121. Raftery AT. Effect of peritoneal trauma on peritoneal fibrinolytic activity and intraperitoneal adhesion formation. An experimental study in the rat. *Eur Surg Res* 1981;13:397–401.
122. Porter JM, McGregor FH Jr, Mullen DC, Silver D. Fibrinolytic activity of mesothelial surfaces. *Surg Forum*. 1969;20: 80–2.
123. Williams RS, Rossi AM, Chegini N, Schultz G. Effect of transforming growth factor beta on postoperative adhesion formation and intact peritoneum. *J Surg Res* 1992;52:65–70.
124. Halme J. Release of tumour necrosis factor-alpha by human peritoneal macrophages in vivo and in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1986;61:1718–25.
125. Sitter T. Intraperitoneal coagulation and fibrinolysis during inflammation: in vivo and in vitro observations. *Fibrinolysis* 1996;10:99–104.
126. Margetts, P.J., Bonniaud, P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit. Dial. Int.* 2003;23, 530–541.
127. Williams, J.D., Craig, K.J., Topley, N., Von Ruhland, C., Fallon, M., Newman, G.R., Mackenzie, R.K., Williams, G.T. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002;13, 470–479.
128. Chaimovitz C. Peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 1994;45:1226-40
129. [Mondello S](#), [Mazzon E](#), [Di Paola R](#), [Crisafulli C](#), [Italiano D](#), [Buemi M](#), [Aloisi C](#), [Cuzzocrea S](#). Erythropoietin suppresses peritoneal fibrosis in rat experimental model. [Eur J Pharmacol.](#) 2009;14;604(1-3):138-49.
130. Duman S, Ozbek S, Gunay E, Bozkurt D, Asci G, Sipahi S, et al. What does peritoneal thickness in peritoneal dialysis patients tell us? *Adv Perit Dial* 2007; 23:28–33.
131. Nakamoto H. Encapsulating peritoneal sclerosis—a clinician’s approach to diagnosis and medical treatment. *Perit Dial Int* 2005; 25(Suppl 4):S30–8.
132. Kawaguchi Y, Saito A, Kawanishi H, Nakayama M, Miyazaki M, Nakamoto H, et al. Recommendations on the management of encapsulating peritoneal sclerosis in Japan,

2005: diagnosis, predictive markers, treatment, and preventive measures. *Perit Dial Int* 2005; 25(Suppl 4):S83–95.

133. Nakamoto H, Kawaguchi Y, Suzuki H. Encapsulating peritoneal sclerosis in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis in Japan. *Adv Perit Dial* 2002;18:119–23.
134. Korte MR, Yo M, Betjes MGH, Fieren MW, van Saase JC, Boer WH, et al. Increasing incidence of severe encapsulating peritoneal sclerosis after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:2412–14.
135. Moriishi M, Kawanishi H, Tsuchiya S. Impact on peritoneal membrane of use of icodextrin-based dialysis solution in peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2006;22:24–8.
136. Okada H, Inoue T, Kanno Y, Kobayashi T, Watanabe Y, Ban S, et al. Selective depletion of fibroblasts preserves morphology and the functional integrity of peritoneum in transgenic mice with peritoneal fibrosing syndrome. *Kidney Int* 2003; 64:1722–32.
137. Hirahara I, Inoue M, Okuda K, Ando Y, Muto S, Kusano E. The potential of matrix metalloproteinase-2 as a marker of peritoneal injury, increased solute transport, or progression to encapsulating peritoneal sclerosis during peritoneal dialysis—a multicentre study in Japan. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22:560–7.
138. Hirahara I, Umeyama K, Urakami K, Kusano E, Masunaga Y, Asano Y. Serial analysis of matrix metalloproteinase-2 in dialysate of rat sclerosing peritonitis models. *Clin Exp Nephrol* 2001; 5:103–8.
139. Matsuoka T, Maeda Y, Matsuo K, Naiki Y, Tamai Y, Sakaguchi M, et al. Hepatocyte growth factor prevents peritoneal fibrosis in an animal model of encapsulating peritoneal sclerosis. *J Nephrol* 2008; 21:64–73.
140. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348:403–13.
141. Margetts P, Kolb M, Galt T, Hoff C, Shockley T, Gauldi J. Gene transfer of transforming growth factor-beta 1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2029–39.

142. Del Peso G, Jimenez-Heffernan J, Bajo M, Hevia C, Aguilera A, Castro M, et al. Myofibroblastic differentiation in simple peritoneal sclerosis. *Int J Artif Organs* 2005; 28:135–40.
143. Hoff C. Experimental animal models of encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int* 2005; 25(Suppl 4):S57–66.
144. Mackow R, Winchester J, Argy W, Andrews P, Fields P, Bates S, et al. Sclerosing encapsulating peritonitis in rats: an experimental study with intraperitoneal antiseptics. *Contrib Nephrol* 1987; 57:213–18.
145. Mackow R, Argy W, Winchester J, Rakowski T, Fields P, Rotellar C, et al. Sclerosing encapsulating peritonitis in rats induced by long-term intraperitoneal administration of antiseptics. *Lab Clin Med* 1988; 112:363–71.
146. Kishimoto C, Kitazawa M, Hitoshi T. Interstitial fibrin-fibronectin deposition with T cell infiltrates precedes fibrosis in murine viral myocarditis. *Int J Exp Pathol* 1998;79:417-23
147. Sawada T, Ishii Y, Tojimbara T, Nakajima I, Fuchinoue S, Teraoka S. The ACE inhibitor, quinapril, ameliorates peritoneal fibrosis in an encapsulating peritoneal sclerosis model in mice. *Pharmacol Res* 2002; 46:505–10.
148. [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 Jun;16(6):1262-6.
149. Skidgel RA, Erdös EG. Goodman and Gilman’s the pharmacological basis of therapeutics,11th edition[eBook]. New York:McGraw-Hill;2005.
150. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. [Recombinant prolylcarboxypeptidase activates plasma prekallikrein](#). *Blood*. 2004;15;103(12):4554-61.
151. Takagaki Y, Kitamura N, Nakanishi S. [Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. Primary structures of two human prekininogens](#). *J Biol Chem*. 1985;15;260(14):8601-9.
152. Blaukat A. [Structure and signalling pathways of kinin receptors](#). *Andrologia*. 2003 Feb;35(1):17-23.
153. Geppetti P. [Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications](#). *Regul Pept*. 1993;13;47(1):1-23.

154. Margolius HS. Diabetes. [Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses.](#) 1996;45 Suppl 1:S14-9.
155. Vanhoutte PM, Auch-Schwelk W, Biondi ML, Lorenz RR, Schini VB, Vidal MJ. [Why are converting enzyme inhibitors vasodilators?](#) Br J Clin Pharmacol. 1989;28 Suppl 2:95S-103S; discussion 103S-104S.
156. Brown NJ, Gainer JV, Stein CM, Vaughan DE. [Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature.](#) Hypertension. 1999 Jun;33(6):1431-5.
157. Saitoh S, Scicli AG, Peterson E, Carretero OA. [Effect of inhibiting renal kallikrein on prostaglandin E2, water, and sodium excretion.](#) Hypertension. 1995;25(5):1008-13.
158. Elliott DF, Horton EW, Lewis GP. Actions of pure bradykinin. J Physiol (Lond). 1960;153:473-480.
159. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. Vascul Pharmacol. 2002;39:187-199.
160. Uknis AB, DeLa Cadena RA, Janardham R, Sartor RB, Whalley ET, Colman RW. Bradykinin receptor antagonists type 2 attenuate the inflammatory changes in peptidoglycan-induced acute arthritis in the Lewis rat. Inflamm Res. 2001;50:149-155.
161. Samadfam R, Teixeira C, Bkaily G, Sirois P, de Brum-Fernandez A, D'Orléans-Juste P. Contribution of B2 receptors for bradykinin in arthus reaction-induced plasma extravasation in wild-type or B2 transgenic knockout mice. Br J Pharmacol. 2000;129:1732-1738.
162. Kaplanski J, Pruneau D, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, Rudich Z, Shapira Y. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces brain edema and improves long-term neurological function recovery after closed head trauma in rats. J Neurotrauma. 2002;19:953-964.
163. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. Brain Res. 2002;950:268-278.

164. Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Investig.* 2002;109:1057–1063.
165. [Shigematsu S](#), [Ishida S](#), [Gute DC](#), [Korthuis RJ](#). Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery. [Am J Physiol.](#) 1999 J;277:H152-60.
166. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2001;429:161–176.
167. Campos MM, de Souza GEP, Ricci ND, Pesquero JL, Teixeira MM, Calixto JB. The role of migrating leukocytes in IL-1 induced up-regulation of kinin B1 receptors in rats. *Br J Pharmacol.* 2002;135:1107–1114.
168. Passos GF, Fernandez ES, Campos MM, Araujo JGVC, Pesquero JL, Souza GEP, Avellar MCW, Teixeira MM, and Calixto JB. Kinin B1 receptor upregulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *J Immunol.* 2004;172:1839–1847.
169. Christiansen SC, Eddleston J, Woessner KM, Chambers SS, Ye R, Pan ZK, Zuraw BL. Up-regulation of functional kinin B1 receptors in allergic airway inflammation. *J Immunol.* 2002;169:2054–2060.
170. Eric J, Gabra BH, and Sirois P. Implication of the bradykinin receptors in antigen-induced pulmonary inflammation in mice. *Br J Pharmacol.* 2003;138:1589– 1597.
171. Huang TJ, Haddad E, Fox AJ, Salmon M, Jones C, Burgess G, Chung KF. Contribution of bradykinin B1 and B2 receptors in allergen-induced bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:1717–1723.
172. Reynolds CJ, Togias A, Proud D. Airway neural responses to kinin. Tachyphylaxis and role of receptor subtypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:431–438.
173. Akbary A, Wirth KJ, Schölkens BA. Efficacy and tolerability of icatibant (Hoe 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma. *Immunopharmacology.* 1996;33:238–242.
174. Eric J, Bkaily G, Bkaily GB, Volkov L, Gabra BH, Sirois P. Des-Arg9-bradykinin increases intracellular Ca²⁺ in bronchoalveolar eosinophils from ovalbumin-sensitized and -challenged mice. *Eur J Pharmacol.* 2003;475:129–137.

175. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:8140–8145.
176. McLean PG, Ahluwalia A, and Perretti M. Association between kinin B1 receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J Exp Med*. 2000;192:367–380.
177. [Ro Y](#), [Hamada C](#), [Inaba M](#), [Io H](#), [Kaneko K](#), [Tomino Y](#). Inhibitory effects of matrix metalloproteinase inhibitor ONO-4817 on morphological alterations in chlorhexidine gluconate-induced peritoneal sclerosis rats. [Nephrol Dial Transplant](#). 2007;22(10):2838-48.
178. [Damas J](#), [Bourdon V](#), [Remacle-Volon G](#), [Adam A](#). Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. [Br J Pharmacol](#). 1990;101(2):418-22.
179. [Mondello S](#), [Mazzon E](#), [Di Paola R](#), [Crisafulli C](#), [Mondello P](#), [Buemi M](#), [Aloisi C](#), [Cuzzocrea S](#). Thalidomide suppresses sclerosing encapsulating peritonitis in a rat experimental model. [Shock](#). 2009;32(3):332-9.
180. Margetts PJ, Kolb M, Galt T et al. Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:2029–2039
181. Opatrny K Jr, Opatrna S, Vit L, Opatrny K. Tissue-type plasminogen activator (tPA) and its inhibitor (PAI-1) in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Nephrol* 1998; 18:186–92.
182. Rougier JP, Guia S, Hagege J, Nguyen G, Ronco PM. PAI-1 secretion and matrix deposition in human peritoneal mesothelial cell cultures: transcriptional regulation by TGF-β1. *Kidney Int* 1998; 54:87–98.

