

60266

T.C
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı
Gastroenteroloji Bilim Dalı

**DENEYSEL HEPATORENAL SENDROM MODELİNDE
ENDOTELİN-1 DÜZEYLERİ VE ENDOTELİN-1
RESEPTÖR ANTAGONİSTİ BOSENTAN'IN ETKİSİ**

T 60266

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANİSTON

Yan Dal Uzmanlık Tezi
Dr.Osman Cavit Özdoğan
İSTANBUL-1997.

Tez projemin planlanmasında, gerçekleştirilmesinde ve yazılmasında her türlü desteği aldığım, tez danışmanım sayın Prof.Dr. Nurdan TÖZÜN'e, ihtisas ve üst ihtisas dönemim boyunca bilgilerinden her zaman faydalandığım değerli hocalarım sayın Prof.Dr.Nefise BARLAS ULUSOY ve Prof.Dr.Cem KALAYCI'ya,

Tez çalışmasında büyük yardımlarını gördüğüm, sayın Dr.Zafer GÖREN, Hadi MOUNİ, Prof.Dr.Kemal BERKMAN, Doç.Dr.Serpil BİRSEL, Dr. Yasemin BUDAK, MÜTF hayvan laboratuvarı çalışanları, ve bosentan'ın temin edilmesinde büyük katkıları olan sayın Nurgün ÖREN ve ROCHE ilaç şirketine,

Üst ihtisas dönemim boyunca beraber çalışmaktan ve yardımlaşmaktan zevk aldığım sayın Doç.Dr.Necip AYTUĞ, Dr.Erol AVŞAR, Dr.Neşe İMERYÜZ, Dr.Hikmet ÇEVİK, Dr.Hülya ÖVER HAMZAOĞLU ve endoskopi hemşire ve çalışanlarına,

en içten duygularımla teşekkür ederim.

Dr.Osman Cavit Özdoğan

*Bu proje Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1-2
GİRİŞ ve AMAÇ.....	3-5
GENEL BİLGİLER.....	6-28
YÖNTEM.....	29-37
BULGULAR.....	38-51
TARTIŞMA.....	52-58
SONUÇ.....	59
İNGİLİZCE ÖZET.....	60-61
KAYNAKLAR.....	62-75

ÖZET

Hepatorenal sendrom patogenezi, günümüzde halen tam olarak açıklanamamıştır. İnsan çalışmalarında endotelin-1'in plazma düzeylerinin HRS ve ilerlemiş asitli sirozda yüksek olduğu gösterilmiştir. Ancak bu yüksekliğin olayı başlatan bir faktör olup olmadığı konusunda belirgin bir açıklık yoktur. Sirozda endotelin-1 artışına yol açan faktörlerin başında endotoksinemi gelmektedir. Ayrıca endotoksineminin sirozun ileri aşamasında görülen periferik vazodilatasyondan sorumlu olduğu ve bunda nitrik oksitin mediatör olarak yer aldığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada CCL4 ile siroz oluşturulmuş sıçanlarda akut endotoksineminin böbrek fonksiyonlarına, endotelin-1, nitrik oksit ve ANP düzeylerine etkisinin incelenmesi amaç edinilmiştir. Diğer bir amaç da endotelin-1 reseptör antagonisti bosentanın, böbrek fonksiyonlarına etkisinin araştırılmasıdır. Dört grup (n=5) sıçan çalışmaya alınmıştır. Grup I; sağlıklı kontrol, Grup II; sirotik asitli kontrol, Grup III; sirotik asitli, akut endotoksinemi oluşturulan grup ve Grup IV; sirotik asitli, akut endotoksinemiden önce endotelin-1 reseptör antagonisti bosentan alan grup olarak belirlenmiştir. Sıçanların akut endotoksinemiden sonra 1.saat idrar miktarları, 3 saatlik

toplam idrar miktarları, kreatinin klirensleri, 3 saatlik Na atımları belirlenmiştir. Ayrıca deney sonunda kan alınarak, plazma endotelin-1 (RIA), nitrit/nitrat (spektrofotometrik yöntem) ve ANP (RIA) düzeyleri belirlenmiştir.

Akut endotoksinemi oluşturulan grupta idrar miktarları, kreatinin klirensi ve Na atılımı belirgin olarak azalmıştır. Endotoksinemiden önce bosentan alan grupta ise idrar miktarlarında ve kreatinin klirenslerinde belirgin düzelme olmuş, Na atılımı ise değişmemiştir. Endotelin-1 düzeyleri endotoksin ve bosentan gruplarında belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Nitrik oksit metabolitleri endotoksin grubunda belirgin olarak yüksektir. ANP ise endotoksin grubunda diğer gruplara göre artmış olmakla beraber, istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.

Sonuç olarak; Sirotik sıçanlarda akut endotoksinemi endotelin-1 ve nitrik oksit metabolitlerinde anlamlı bir artışa yol açarken, böbrek fonksiyonlarını belirgin olarak bozmaktadır. Endotelin-1 reseptör antagonizması, serbest su atılımını arttırarak böbrek yetmezliğini kısmen engellemektedir. Bu bulgu, sirotik sıçanlarda endotoksine bağlı böbrek yetmezliğinde endotelin-1'in önemli bir yer aldığının göstergesidir.

GİRİŞ ve AMAÇ

Siroz morbitide ve mortalitesi yüksek bir hastalıktır. Komplikasyonların mortaliteyi arttırması nedeni ile birçok hasta karaciğer transplantasyonu şansını kullanamamaktadır. Bu nedenle transplantasyon için beklenen sürede gelişen komplikasyonların tedavisi, yaşam süresini uzatmakla beraber transplantasyon şansını gündemde tutması açısından çok önemlidir.

Sirozun oluşturduğu komplikasyonlardan, ölüme en sık yol açanı hepatorenal sendromdur (HRS). HRS ilerlemiş, asit ve portal hipertansiyonlu olguların ölüm nedenleri arasında birinci sırada yer alır. HRS patogenezinde çok çeşitli faktörler sorumlu tutulmakta ve bu faktörlerin etkisini ortadan kaldırmaya yönelik tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır.

HRS'da en önemli hemodinamik bozukluk, şiddetli periferik vazodilatasyon ile beraber gerçekleşen renal vazokonstriksiyondur. Renal vazokonstriksiyona yol açan faktörler içinde renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi, antidiüretik hormon, sempatik aktivasyon ve endotelin-1 sorumlu tutulmaktadır.

İlerlemiş asiti olan siroz veya HRS olgularda plazma endotelin düzeylerinin yüksek saptanması, ve endotelin

yüksekliği ile renal fonksiyonu gösteren parametrelerin negatif korelasyon göstermesi, endotelinlerin patogeneizde yer aldığını düşündürmektedir. Çalışmaların bir kısmında ise asitli siroz olgularında, endotelin-1 düzeyleri yüksek bulunmamıştır. Çelişkili çalışmalar olmakla beraber HRS'da endotelin düzeylerinin yükselmiş olduğunu gösteren çalışmalar daha fazla sayıdadır.

Burada önemli bir nokta, endotelindeki bu artışın "bir sebep mi yoksa bir sonuç mu" olduğu şeklindedir. İkinci önemli nokta ise "eğer bu bir sebep ise endotelin-1'in etkisinin antagonize edilmesi ile tablonun önlenip önlenemeyeceği yada en azından kısmi bir düzelmenin sağlanıp sağlanamayacağı" konusudur.

İlerlemiş siroz olgularında endotelin düzeylerinin artmasına yol açan faktörler arasında en önemlisi endotoksindir. Siroz olgularında endotoksineminin olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca HRS olgularının büyük çoğunluğunda, başlangıçta olaya eşlik eden bir enfeksiyon mevcuttur. Hücre kültürlerinde endotoksinin, endotelin sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca septik şok çalışmalarında da akut endotoksineminin endotelin düzeylerinde yükselmeye yol açtığı, ve endotelinin parakrin hormon olarak etki ederek akut böbrek

yetmezliğine yol açtığı gösterilmiştir. Dolayısı ile sirozda akut endotoksineminin endotelin düzeylerine ve renal fonksiyonlar üzerine etkisi merak konusu olmaktadır.

Endotoksinin bir diğer etkisi de nitrik oksit sentezini arttırmasıdır. Nitrik oksit en kuvvetli vazodilatatör endojen ajandır. HRS'da şiddetli periferik vazodilatasyon patogenezinde nitrik oksit, birinci derecede sorumlu ajan olabilir. Sirozda görülen nitrik oksit yüksekliği de akut endotoksinemiye bağlı bir durum olabilir.

Sonuç olarak Marmara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Gastroenteroloji Bilim Dalı, Farmakoloji ve Biyokimya Ana Bilim Dallarınca gerçekleştirilen bu projede 3 konuyu araştırmak amaç edinilmiştir.

I. Karbon tetra klorür ile siroz ve asit oluşturulmuş sıçanlarda akut endotoksineminin renal fonksiyonlar ile endotelin-1, nitrik oksit ve atrial natriüretik peptid düzeylerine etkisini araştırmak.

II. Endotelin-1'in antagonizmasının, endotoksin etkisi ile oluşan böbrek yetmezliğine etkisini araştırmak.

III. Deneysel olarak oluşturulan bu modelin, insanlarda oluşan HRS'a uygunluğunu araştırmak.

GENEL BİLGİLER:

A.Hepatorenal Sendrom Genel Bilgiler:

İlerlemiş karaciğer yetmezliği olan hastalarda klinik, laboratuvar ve morfolojik yöntemlerle nedeni açıklanamayan böbrek yetmezliği tablosu hepatorenal sendrom olarak (HRS) tanımlanmaktadır¹.

Literatürde ilk defa 19. Yüzyılda Fredrichs tarafından bildirilmiştir. 1863 yılında Austin Flint, siroz hastalarında oluşan akut böbrek yetmezliğine bağlı ölümlerin otopsi incelemelerinde böbreklerde histolojik bir bozukluk olmadığını belirtmiştir². Bundan 93 sene sonra Hecker ve Sherlock HRS olgularında idrar sodyumunun düşük olduğu ve idrarda proteinüri saptanmadığını açıklamışlardır². 1980 ve 1990'lı yıllarda araştırmaya yönelik tekniklerin ilerlemesi ile sirozda oluşan hemodinamik ve renal fonksiyon bozukluklarının mekanizmalarını açıklamaya yönelik birçok çalışma yayınlanmıştır.

Hepatorenal sendrom ilerlemiş siroz ve asiti olan hastalarda sık olarak görülen bir komplikasyondur. Asit tedavisi amacı ile hastaneye başvuran hastalarda 2 yıl içinde görülme olasılığı % 32, beş yıl içinde görülme

olasılığı ise % 42'dir³ . Son derece ölümcül seyirli bu tabloda azoteminin yerleşmesinden itibaren ölüm olasılığı % 95'dir¹.

Hepatorenal Sendrom Tanımı:

Portal hipertansiyon ile beraber ilerlemiş kronik karaciğer hastalığı olan olgularda renal fonksiyonların bozulması ile karakterize bir sendromdur² . Böbrek arteriollerinde önemli miktarda vazokonstriksiyon, buna bağlı olarak glomerular filtrasyonda düşme, böbrek dışı dolaşımda ise arterial vazodilatasyon, ve buna bağlı olarak total sistemik dirençte azalma mevcuttur.

Son zamanlarda HRS'un iki ayrı klinik formu tanımlanmaktadır;

(1) Tip I HRS, çok hızlı gelişen akut böbrek yetmezliğidir. Kreatininde kısa süre içinde yükselme ve kreatinin klirensinde % 50 azalma meydana gelir. Böbrek fonksiyonlarındaki bozulma 1-2 haftalık bir süre içinde ilerleyerek, kreatinin klirensi 20 ml/dk'nın altına iner.

(2) Tip II HRS, bu tabloda böbrek yetmezliği çok daha yavaş olarak gelişmekte ve ağır renal yetmezliğin gelişmesi haftalar içinde oluşmaktadır.

Tanı kriterleri:

Uluslar arası asit klubu HRS tanısına yönelik olarak 1994 yılında yayınladığı bildiride 5 major ve 5 minör kriteri belirlemiştir²;

Major Kriterler:

- (1) İlerlemiş karaciğer yetmezliği ve portal hipertansiyona yol açan akut veya kronik karaciğer hastalığı olması,
- (2) Serum kreatinin değeri 1.5 mg/dL üzerinde veya kreatinin klirensi 40 ml/dk'nın altında olacak şekilde azalmış glomerüler filtrasyon oranı olması,
- (3) Şok, devam eden bakteriyel enfeksiyon, renal ve gastrointestinal sıvı kaybı ve yakın dönemde nefrotoksik ilaç kullanımı gibi faktörlerin olmaması,
- (4) Diüretiklerin kesilmesi ve sıvı yüklenmesine (1.5 litre serum fizyolojik) rağmen renal fonksiyonlarda düzelme olmaması,
- (5) Proteinüri ve renal ultrasonografi ile obstrüktif üropati ve renal parenkimal hasara yönelik bulgu olmaması.

Minör Kriterler:

- (1) İdrar miktarının < 500 ml/gün'ün altına inmesi,
- (2) İdrar Na'nun < 10 mEq/litre'nin altında olması,

- (3) İdrar ozmolalitesinin plazma ozmolalitesinden fazla olması,
- (4) İdrarda eritrosit sayısının büyük büyütmede 50'nin altında olması,
- (5) Serum Na konsantrasyonunun <130 mEq/litre'nin altında olması.

Hepatorenal sendrom tanısı konabilmesi için böbrek yetmezliğine yol açacak diğer faktörlerin bulunmadığının gösterilmesi gerekmektedir.

Ayrıca siroz hastalarında renal fonksiyonların doğru olarak değerlendirilmesi çok önemlidir. Bu hastalarda yapım azlığına bağlı olarak kreatinin ve kan üre değerleri beklenenden daha düşük olarak ölçülebilir. Bu durum glomerular filtrasyon oranının doğru olarak değerlendirilememesine yol açabilir.

Serum kreatinin ve kreatinin klirensi spesifikiteleri çok yüksek değerlerdir, ancak sensitiviteleri düşüktür. Major kriterler içinde olmaması belirtilen (3) no'lu şartların hastaların büyük kısmında görüldüğü bilinmektedir. Özellikle tip I HRS'de hızlı gelişen böbrek yetmezliğinde sıklıkla araya giren bir faktör olduğu görülmektedir. Bu hastaların büyük kısmında enfeksiyon, spontan bakteriyel

peritonit, sepsis ve gastrointestinal kanama gibi faktörler olayı başlatmaktadır. Ayrıca spontan bakteriyel peritoniti olan hastaların 1/3'ünde geriye dönüşümlü böbrek yetmezliği gelişmektedir⁴. Burada özellikle bilinmesi gereken bir nokta, araya giren enfeksiyonun HRS oluşumuna yol açabileceğidir. Bununla beraber sıvı kaybına bağlı prerenal azotemi kesinlikle HRS'dan ayırtedilmelidir.

Dört ve (5) no'lu kriterler prerenal ve post renal faktörlerin ayırıcı tanısının yapılması açısından çok önemlidir. Çünkü her iki klinik tablo aynı etkenler ile ortaya çıkmakta ancak tedavileri çok farklılık göstermektedir.

Minör kriterler ise tanıya yardımcıdır ve klinik durumun ayırıcı tanısının yapılmasını sağlamaktadırlar.

B. Hepatorenal Sendrom Patogenezi:

Hepatorenal sendrom, böbreğin fonksiyonel olarak iş yapamaz hale gelmesidir. HRS'li hastaların böbrekleri nakledildiğinde normal fonksiyonlarını gösterebilmesi ve HRS tablosu içindeyken karaciğer nakli olan hastalarda böbreklerin tekrar normal fonksiyonlarını yapabilir hale gelmesi⁵, böbreklerde histolojik bir bozukluktan çok işlevsel bir bozukluk olduğunun göstergesidir.

Son dönemdeki kronik karaciğer hastalığı zemininde değişen hormonal ve hemodinamik dengeler araya giren diğer faktörlerin de etkisi ile böbrek yetmezliği tablosunu oluşturmaktadır. İşte bu noktada araştırılmakta olan konu; hormonal ve hemodinamik değişikliklerin böbrek fonksiyonlarına olan etkileri ve bunları önlemek için neler yapılabileceğidir.

HRS'da böbrek arteriollerinde şiddetli bir vazokonstriksiyon mevcuttur^{1,2}. Vazokonstriksiyona bağlı olarak renal kortikal kan akımında azalma ve glomerüler filtrasyon oranında düşme meydana gelir. Bu, idrar sodyumunda azalma, kan kreatininde yükselme ve kreatinin klirensinde düşmeye yol açar. Bu tablo kronik karaciğer hastalığı sürecinde meydana gelen hemodinamik ve hormonal değişikliklerin bir sonucudur.

Bu döneme gelene kadar kronik karaciğer hastalığı süreci iki önemli devreden geçmektedir; bunlar preasitik dönem (kompanse siroz) ve asitik dönem (dekompanse siroz) dönemleridir. Şekil 1'de kompanse siroz döneminden dekompanse siroz dönemine geçişte görülen hemodinamik ve hormonal değişiklikler özetlenmiştir.

Preasitik dönemde portal hipertansiyonun başlaması ile organizmada kanın önemli bir kısmı splanknik ve kollateral

dolaşımlarda göllenmeye başlar, ayrıca venöz alanda basıncın artmasına bağlı olarak arteriovenöz şantlar açılır^{6,7}. Kanın periferde göllenmesi, nitrik oksit, endotoksin ve sitokinler gibi bazı endojen faktörlerin etkisi ile periferde vazodilatasyon meydana gelir^{8,9,10}. Tüm bunlara bağlı olarak efektif arterial plazma volümü düşer, ancak total plazma volümü değişmemiştir. İşte bu dönemde organizma efektif plazma volümünü sağlamak ve böbrek kan akımını devam ettirmek amacıyla, böbreklerden su ve sodyum tutulumunu arttırır. Bu kompensasyonun yıllar boyunca devam etmesi, total plazma volümünün genişlemesi ve kardiyak outputun artması ile karakterize olan hiperdinamik dolaşımın meydana gelmesine yol açar. Plazma hacminin artması, albumin sentezinin azalması sonucu yeterli plazma onkotik basıncının sağlanamaması, ve portal basıncın artması ile lenfatiklerden periton içine sıvı geçmesi gibi faktörlerin etkisiyle asit meydana gelir. Şekil 2'de asit oluşumunu etkileyen faktörler görülmektedir.

Renin-Anjiotensin-Aldosteron-Sisteminin (RAAS) etkisi: Asitin oluşması ile total plazma volümü düşmeye başlar ve organizma efektif plazma volümünü dengede tutmakta zorlanır. Bu dönemde dekompanseasyon başlamıştır. Dekompanse dönemde arterial hipotansiyon ile beraber sempatik

aktivasyon (periferik rezistansı arttırmak için), renin-anjiotensin-aldosteron (RAAS) sisteminin aktivasyonu, antidiüretik hormonun (ADH) artması, atrial natriüretik peptidde (ANP) artma meydana gelir². İşte burada organizma bir kısır döngü içine girmiştir; efektif plazma hacmini ve arterial kan basıncını korumak için kompensatuar mekanizmaları işleve geçirmekte, ancak bu mekanizmaların istenmeyen etkilerine maruz kalmaktadır. Bunlardan özellikle RAAS, oluşturduğu vazokonstriksiyon ile böbrek kan akımının azalmasına, sodyum ve su tutulumuna yol açar^{1,2}. Renin-anjiotensin sistemini inhibe ederek böbrek kan akımını arttırmaya yönelik çalışmalar, böbrek fonksiyonlarının daha çok bozulması nedeni ile başarılı olmamıştır^{1,2}.

Sempatik sinir sisteminin (SSS) etkisi: Dekompanse sirozu olan hastalarda ve HRS'da plazma norepinefrin konsantrasyonu ve sempatik sinir sistemi aktivite indexi belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Bu durum böbrek fonksiyonlardaki bozulma ile doğru orantılıdır^{11,12,13}. Aktivite indexinin fazla olduğu oranda böbrek fonksiyonları bozukluk göstermektedir. Ancak bu durumun bir kompensasyon mekanizması olması nedeni ile sempatik aktivitenin

azaltılması, böbrek fonksiyonlarında belirgin düzelme yapmamaktadır^{11,13}.

Antidiüretik hormon (ADH) etkisi: ADH potent bir vazokonstriktör ajandır. Etketif plazma volümünün azalması baroreseptörlerin uyarılmasına neden olarak santral sinir sisteminden ADH salımını arttırmaktadır. Hepatorenal sendrom olgularında ise ADH'nın plazma düzeyinin çok daha fazla oranda yüksek olduğu bulunmuştur. Dolayısı ile böbrek arteriollerinde vazokonstriksiyon yapan bu ajanın antagonize edilmesiyle böbrek fonksiyonlarında düzelme olacağı düşünölmüştür. Ancak antagonist verilerek ADH'nın etkisinin önlendiği sıçan deneylerinde, arteriyel hipotansiyon oluştđu gibi böbrek fonksiyonlarında da belirgin bir düzelme gözlenmemiştir¹⁴.

ADH'nın organizmada iki reseptörü bulunmaktadır; V1 reseptörleri karaciğerde, düz kasta, trombositler üzerinde bulunur ve vazokonstriksiyondan sorumludur. V2 reseptörleri ise böbrek distal tübüllerinde bulunur ve su tutulumunu sağlar. Sirotik sıçanlara V2 reseptörlerini spesifik olarak antagonize eden OPC-31260 (Aquaretik ajan) verildiğinde, su atılımının arttığı görölmüştür¹⁵.

Prostaglandinlerin (PG) etkisi: Hepatorenal sendrom patogenezinde yer aldığı düşünölen bir faktör de arasıdonik

asit deriveleridir. Asitli sirotik hastalarda idrarda prostaglandin (PG)E₂ , 6-keto-PGF_{1a} ve PGF_{2a} 'nın yüksek bulunması tüm PG sisteminde bir aktivasyon olduğunu düşündürmektedir¹⁶. Bu artış, organizmada artmış olan endojen vazokonstriktör ve sodyum tutucu ortamda renal fonksiyonları ve hemodinamiği devam ettiren önemli bir denge unsurudur. Nitekim PG sentezini bozan anti-inflamatuar ilaçlar verildiğinde renal kan akımında belirgin azalma, glomerular filtrasyon oranında belirgin düşme ve sodyum exresyonunda belirgin azalma saptanmıştır¹⁷. Hepatorenal sendromda ise renal PG sentezinde çok belirgin düşme olduğu, bunun ise renal medullada bulunan endoperoxid (PGH) sentataz aktivitesinde düşmeye bağlı olduğu belirlenmiştir^{16,18}.

Tromboxanların etkisi: HRS patogeneğinde yer aldığı düşünülen bir grup ajan da tromboxan'lardır. Çalışmalarda renal tromboxan A₂ sentezinin ve idrarda metaboliti olan tromboxan B₂'nin arttığı saptanmıştır¹⁶. Tromboxan A₂ potent bir vazokonstriktör ajandır. Ancak tromboxane A₂'nin artışının PG-tromboxan dengesindeki bozulmaya bağlı olduğu, tromboxan sentezini inhibe eden ajanlar verildiğinde ise renal fonksiyonlarda bir düzelme olmadığı gösterilmiştir^{19,20}.

Atrial Natriüretik Peptid Etkisi (ANP): Atrial natriüretik peptid sirozun ileri evrelerinde artmaktadır. Bu, preasitik dönemde Na ve su tutulumuna bağlı ikincil bir durumdur. Asitik dönemde ise ANP düzeyleri artmış olmakla beraber, ANP'ye karşı bir duyarsızlık mevcuttur^{21,22}. Bu etki nedeni ile Na tutulumu daha fazla olmaktadır.

Yukarıda belirtilen faktörlerin yanında HRS patogenezinde önemle tartışılmakta olan bir konu da endotoksin, nitrik oksit ve endotelinlerin rolüdür¹. Patogeneizde endotoksin, endotelin-1 ve nitrik oksitin rolünü araştıran, bu teoriyi destekleyen ve desteklemeyen çalışmalar alt başlık altında belirtilecektir.

HRS Patogenezinde Endotoksin, Endotelin-1 ve Nitrik Oksit:

Endotoksin: Endotoksin gram (-) bakterilerin hücre duvarının bir komponentidir. Sıçan çalışmaları ile endotoksinin kolon epitelinden emilerek portal dolaşıma girdiği ve portal sistemde bir endotoksinemi oluşturduğu saptanmıştır^{23,24}. Daha sonraki çalışmalarda portal dolaşıma giren endotoksinin sağlıklı karaciğerde kupffer hücreleri tarafından temizlendiği, hasarlı karaciğerde ise endotoksinin bir kısmının sistemik dolaşıma katıldığı

gösterilmiştir²⁵. Bunun nedeni sirozda retiküloendotelyal sistemin yeteri kadar çalışmaması, portosistemik şantlardan kanın direkt sistemik dolaşıma katılması ve/veya lenfatik sistemden geçiş olabilir¹. Ayrıca sirozda barsakta bakteriyel aşırı birikim ve normal florada değişiklikler olduğu gösterilmiştir²³.

İnsan çalışmalarının önemli bir kısmında özellikle dekompanse sirozu olan hastalarda sistemik dolaşımda endotoksin (Lipopolisakkarit) düzeyi yüksek bulunmuştur^{10,27-31}. Dekompense sirozda meydana gelen hiperdinamik sirkulasyon ve periferik vazodilatasyonda endotoksin indükleyici bir faktör olabilir. Klinik gözlemlerde renal yetmezliğin sepsis, spontan peritonit, pnömoni gibi enfeksiyonlar esnasında görülmesi önemli bir bulgudur. Bir insan çalışmasında endotoksinin hepatorenal sendromda başlatıcı faktör olabileceği üzerinde durulmuştur³².

Endotoksin iki mekanizma ile renal yetmezliğe yol açabilir. Birincisi; sistemik vazodilatasyon, vasküler geçirgenlikte artma, koagulasyonda artma, myokardiyal depresyon, hipotansiyon ve endotoksik şok tablosu ile akut tübüler nekroz gelişebilir. Sirozik sıçanlarda yapılan çalışmalarda endotoksinin böbrekte toplanarak akut tübüler nekroz (ATN) tablosu oluşturduğu gösterilmiştir^{33,34}. Ancak

endotoksinin oluşturduğu ATN tablosu endotoksine bağlı hemodinamik değişikliler ile beraber olan bir durumdur ve çok hafif histolojik değişiklikler göstermesi nedeni ile ihmal edilebilir. Ayrıca HRS'de de ATN benzeri tubüler değişiklikler olduğu rapor edilmiştir^{1,35}.

Endotoksinin asıl önemli etkisini böbrek arteriollerinde şiddetli vazokonstriksiyon ile gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Bu etki sağlam sıçanlarda yapılan endotoksik şok modellerinde gsterilmiřtir³⁶. Septik şok modellerinde endotoksin verilmesinin ardından oluşan şiddetli renal vazokonstriksiyon, endotoksinin salgıladığı bazı hormon veya sitokinlerin renal arterioller üzerine olan direkt etkilerine bağlı olabilir. Endotoksinin salgıladığı renal vazokonstriksiyon yapıcı hormonlar içinde en potent olanı endotelinlerdir. Septik şok modellerinde endotoksineminin akut böbrek yetmezliği ile beraber plazma endotelinlerinde belirgin artışa yol açtığı gsterilmiştir^{37,38}. Bu etki endotoksinin oluşturduğu hemodinamik değişikliklere sekonder renal kan akımının azalması ile olabileceği gibi, endotoksinin endotel hücrelerine direkt etkisi ile veya her ikisi ile birlikte olabilir. Nitekim hücre kültürü çalışmalarında, endotoksinin çeşitli organların endotelyumuna direkt etki

ile endotelin-1 salgılattırdığı gösterilmiştir^{39,40}. Endotoksin renal vasküler yatağa direkt etkisinde endotelinleri mediatör olarak kullanıyor olabilir⁴¹. Sirozda ise akut endotoksineminin endotelinler üzerine direkt etkisi bilinmemektedir. Ancak sirotik köpeklerde yapılan deneysel bir çalışmada endotoksinin renal etkisinin sağlıklı köpeklere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir⁴². Dolayısı ile sirozun endotoksinin etkisini arttıran bir faktör olabileceği üzerinde durulmuştur. Sirozda endotoksin ve endotelin ilişkisinin araştırılmaya değer bir alan olduğu düşünülmektedir.

Endotelinler (ET): Endotelinler ilk defa 1988 yılında Yanagisawa ve arkadaşları tarafından endotel hücre kültürlerinden izole edilerek tanımlandılar⁴³.

Endotelinler endotelden preproendotelin (203 aa) olarak salgılandıktan sonra endopeptidazlar ile "Big" endoteline (39 aa) ve daha sonra endotelin dönüştürücü enzim aracılığı ile 21 amino asit peptid olan endotelin-1'e dönüşürler.

Amino asit dizilimindeki farklılığa göre endothelin-1, endothelin-2 ve endotelin-3 olarak üç tipi izole edilmiştir. Endotelin-1 canlılarda bilinen en potent vazokonstriktör ajan olup, anjiotensinden 10 kat daha güçlü

bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir⁴³. Endotelin-1'in kalp, akciğer, bronş, barsak ve karaciğer vasküler endotelinden salgılandığı bilinmektedir. Endotelin-3 ise kesin veriler olmamakla beraber sinir sisteminden, karaciğer ve böbreklerden salgılandığı belirtilmektedir. Endotelin-3 daha zayıf bir vazokonstriktör ajandır. Endotelin-2 ile ilgili bilgilerimiz yetersizdir ve plazmada bulunmamaktadır.

Endotelin-1'in etkileri ve hastalıklarla ilişkisi: Hayvan çalışmalarında (sıçan, köpek ve domuz) endotelin infüzyonu ile kan basıncında belirgin ve kalıcı bir yükselme meydana gelir⁴³. Bu etkinin arter ve venlerin duvarlarında bulunan düz kaslardaki artmış kasılmadan meydana geldiği ve gastrointestinal, renal ve çizgili kaslardaki damar yataklarında daha belirgin olduğu bilinmektedir⁴³.

Endotelin-1'in ayrıca kalp kası üzerinde direkt etki ile pozitif inotropik ve kronotropik etki gösterdiği saptanmıştır⁴³. Akciğerlerde bronş düz kasını kasarak bronkospazma yol açtığı gösterilmiştir. Renal etkileri ise diğer organlara göre 10 kat daha fazladır. Endotelin-1 infüzyonu ile glomerular filtrasyon oranında ve idrar volümünde belirgin azalma meydana gelir. Glomerular filtrasyon oranındaki azalma böbreğin afferent

arteriollerindeki vazokonstriksiyon ile beraber böbrek medullasındaki mezanşial hücrelerdeki kasılmaya bağlıdır^{44,45}.

Çalışmalarda canlılarda 2 tip endotelin reseptörünün bulunduğu gösterilmiştir. Bunlar Endotelin-A (ET_A) ve Endotelin-B (ET_B) reseptörleridir. ET_A reseptörü endotelin-1 ve endotelin-2'ye yüksek afinite, ET_B reseptörü ise tüm endotelinlere eşit oranda afinite göstermektedir. Sıçan renal kortexinde iki reseptör eşit oranda bulunurken, renal medullada ET_B daha fazla oranda bulunmaktadır. İnsan böbreğinde ise kortex ve medullanın her ikisinde de ET_B reseptörü daha fazla oranda bulunmaktadır⁴⁶. Bu reseptörlerin organizmanın fizyolojisinde aldıkları roller henüz bilinmemektedir. Ancak çalışmalarda ET_A reseptörünün vasküler düz kasda direnci arttıran mekanizmada rol aldığı, ET_B reseptörünün ise endotelyumdan nitrik oksit sentezini indüklediği belirtilmektedir⁴⁷. Bosentan (RO 47-0203) her iki endotelin reseptörünün non-spesifik olarak antagonizmasını yapan bir kimyasal maddedir. BQ-123 ise spesifik olarak ET_A reseptörünü antagonize eder.

Endotelinlerin fizyolojik anlamda renal fonksiyonlar üzerinde olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir. Endojen endotelin fizyolojik düzeyde preglomerullar arteriollerde

vazodilatasyona yol açar⁴⁸ ve tubullere etki ederek sodyum ve su diürezini arttırır⁴⁹.

Birçok renal hastalıkta endotelin-1'in yer aldığı gösterilmiştir. Bunlar iskemiye bağlı akut böbrek yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği, radyokontrast maddeye ve siklosporine bağlı nefrotoksisite, endotoksik şokta akut böbrek yetmezliği gibi durumlardır. Bu durumlarda anti-endotelin antikorlarının veya endotelin-1 reseptör antagonistlerinin verilmesinin renal fonksiyonlarda düzelme sağladığı gösterilmiştir⁴⁶. Renal hastalıkların dışında kardiyovasküler hastalıklarda, myokard enfarktüsünde, esansiyel hipertansiyonda, pulmoner hipertansiyonda ve bronşiyel astımda endotelin düzeyleri yüksek bulunmuştur⁴³. Hepatorenal sendromda ve dekompanse sirozda ise endotelinlerin rolü halen tartışılmaktadır.

Hepatorenal Sendromda Endotelinlerin Rolü:

Zamanımıza kadar yapılan insan çalışmalarının büyük kısmında ilerlemiş asitli siroz hastalarında plazma endotelin düzeyleri kontrollere göre belirgin olarak yüksek saptanmıştır⁵⁰⁻⁵⁶. Bir çalışmada ise siroz hastalarında kontrollere göre belirgin bir fark saptanmamış⁵⁷, bir diğer çalışmada ise düşük bulunmuştur⁵⁸.

İlerlemiş siroz vakalarında endotelinlerin plazma düzeylerinin yüksek bulunmasının nedeni yapım fazlalığı veya yıkım azlığına bağlı olabilir. Yapım fazlalığına yol açan faktörler arasında hemodinamik değişiklikler, örneğin efektif plazma volümünün düşmesi ile baroreseptör mekanizmasının uyarılarak endotelden yapımın artması sayılabilir. Ancak bir insan çalışmasında hemodinamik değişikliklerin endotelin düzeylerinde önemli değişiklikler yapmadığı gösterilmiştir⁵⁶. Karaciğer ve böbreklerden yapımın direkt olarak artması ikinci bir olasılıktır. Biri insan⁵⁹ ve diğeri sıçan⁶⁰ çalışması olan iki önemli çalışmada sirotik karaciğer dokusunda endotelin-1 düzeyi ve endotelin-1 mRNA düzeyi yüksek bulunmuştur. Böbreklerde endotelin reseptörlerinin varlığı, renal fizyolojinin düzenlenmesinde endotelinlerin rolü olması ve direkt nefrotoksik ajanların etkisi ile endotelinlerin artması böbreklerin önemli bir yapım yeri olduğunu göstermektedir.

Sirozun ilerlemesi, asit gelişimi ve böbrek fonksiyonlarının bozulması ile yükselmiş endotelin-1 düzeyleri arasında doğru orantılı bir ilişkinin olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmalarda potent bir vazokonstriktör ajan olan endotelin-1'in böbrek

arteriollerine ve mezansial hücrelere direkt etkisi ile GFR'yi azalttığı öne sürülmüştür^{50,51,54-56}.

Burada böbreklerden ve diğer dokulardan endotelin yapımını arttıran en önemli faktörün endotoksin olduğu üzerinde durulmaktadır⁵¹. Endotoksinin sıçan ve hücre kültürü çalışmalarında endotelin-1 yapımını arttırdığının gösterilmesi bu teoriyi desteklemektedir³⁶⁻⁴⁰. Siroz hastalarında ise endotoksinemi bilinen bir olgudur. Özellikle enfeksiyonla beraber gelişen akut endotoksinemi endotelin düzeylerinde ani yükselmelere yol açarak HRS gelişimine yol açabilir.

Karaciğerden yıkımın azlığı ile endotelin düzeylerinin yükselmiş olduğunu destekleyen tek bir çalışma dışında başka bir çalışmaya rastlanılmamıştır⁶¹. Ayrıca endotelinlerin yıkımında en önemli organ akciğer olup, karaciğerin rolü çok azdır⁴³.

Nitrik Oksit (NO): Nitrik Oksit, endotel hücreleri tarafından L-arjinin'den sentezlenen ve çok kuvvetli olarak vazodilatasyona yol açan bir ajandır. Salgılandığı anda hızla metabolitleri olan nitrit (NO₂) ve nitrat'a (NO₃) dönüşür. Nitrik oksitin ilerlemiş sirozda görülen periferik vazodilatasyonun en önemli nedenlerden biri olduğu düşünülmektedir⁶².

İnsan ve hayvan çalışmalarında NO'nun hiperdinamik sirkülasyon benzeri hemodinamik değişikliklere yol açtığı ve ilerlemiş sirozda plazmada metabolitlerinin artmış olduğu gösterilmiştir^{8,62}.

İlerlemiş sirozda NO'nun artmasına yol açan faktörün de endotoksin olduğu düşünülmektedir. Bunu destekleyen çalışmalarda damar dokusu in vitro ortamda endotoksin ile karşılaştırıldığında, nitrik oksit sentezinin arttığı gösterilmiştir⁶².

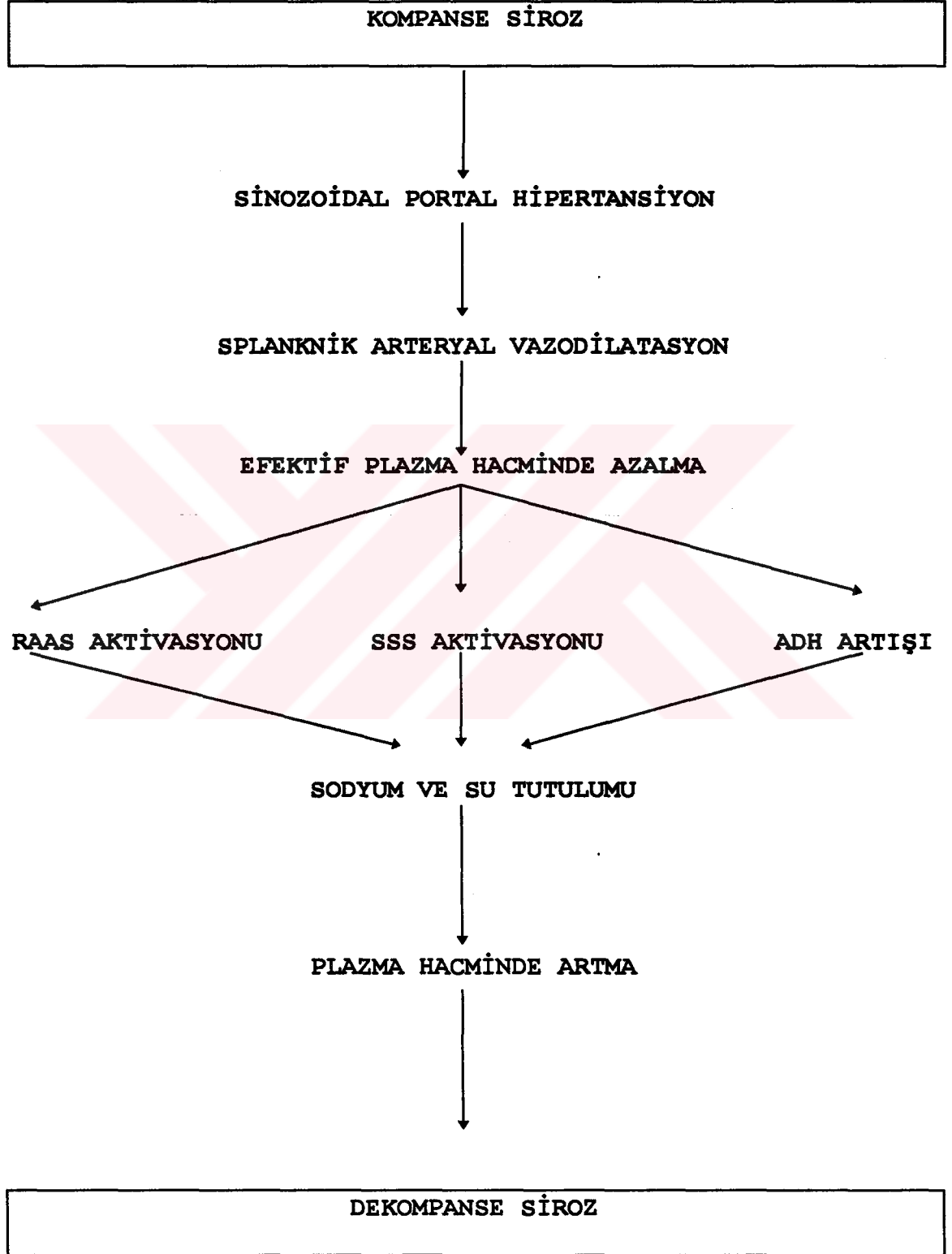
Hepatorenal sendromda şiddetli bir periferik dilatasyon ile beraber renal vazokonstriksiyon mevcuttur. Vazodilatasyona yol açan faktörün endotoksinin etkisi ile artmış olan NO olduğu, artmış NO nedeni ile de sistemik vazokonstriktör ajanlara karşı bir yanıtsızlığın olduğu düşünülmektedir⁶³. Dolayısı ile artmış nitrik oksit'in HRS'da tedaviye yanıtı zorlaştıran önemli bir faktör olduğu ve patogeneizde endotelinler ile birlikte yer aldığı söylenebilir.

Sonuç olarak HRS patogenezi henüz tam olarak açıklanamamış bir çok faktörün yer aldığı, karmaşık hormonal ve hemodinamik bozuklukların bir sonucudur. Bu faktörlerin antagonize edilmesine yönelik insan ve hayvan çalışmalarında başarılı sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle

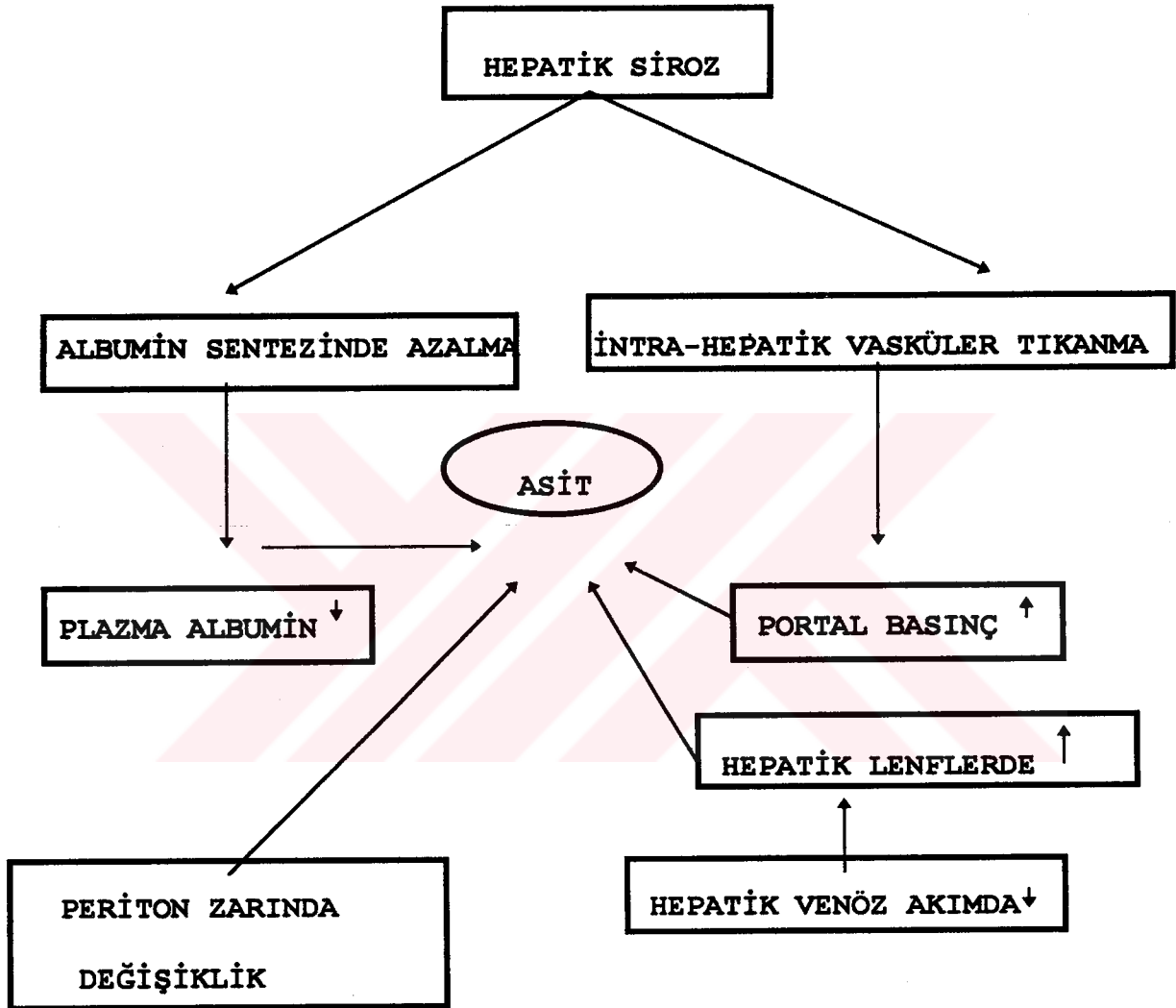
yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi için HRS patogenezinin daha iyi aydınlatılması gerekmektedir.

HRS patogenezinde endotelin-1, nitrik oksit ve endotoksinin yer aldığına dair bazı önemli bilgiler olmakla beraber, bu faktörlerin etkileri yeterli miktarda bilinmemektedir. Endotelin-1'in HRS patogenezinde önemli bir yeri olduğu, daha önceki çalışmalarda elde edilen bilgilere dayanılarak söylenebilir. Endotelin-1 antagonistizmasının ise gelecekte bir tedavi yaklaşımı olarak kullanılabilmesi için deneysel çalışmalara gereksinim vardır. Bu nedenle, bu çalışmada insanda HRS'a benzeyen bir sıçan HRS modeli oluşturularak, endotelin-1 reseptör antagonistizmasının böbrek fonksiyonları ve diğer hormonlar üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Şekil 1. Kompanse sirozdan dekompanse siroza geçişte görülen hormonal ve hemodinamik değişiklikler.



Şekil 2. Asit patogenezi.



GEREÇLER VE YÖNTEM

DENEY HAYVANLARI

Çalışmamızda uyanık, erişkin, erkek, 200-250 gr ağırlığında Wistar-Kyoto sıçanlar kullanıldı. Denekler oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık dönemleri sağlanan, standart hayvan laboratuvarı ortamında muhafaza edildi. Denekler yeterli miktarda besin ve su ile beslendi ve "deney hayvanları bakım ve kullanım ilkelerine" uygun koşullarda deneyler gerçekleştirildi.

SİROZ İNDÜKSİYONU

Sıçanlarda siroz indüksiyonu literatürde belirtildiği şekilde 0.5 mL/kg'a sıvı karbon tetraklorür (CCL₄), haftada iki kez periton içine enjeksiyon yöntemi ile verilerek gerçekleştirildi^{64,65}. Karaciğerde mikrozomal enzim indüksiyonu yaparak CCL₄'ün etkisini arttırmak amacı ile, enjeksiyonlardan 2 hafta öncesinden başlanarak içme sularına toz 0.30 g/L fenobarbital kondu.

12-16 haftalık enjeksiyon dönemi sonrasında siroz gelişimi, asit oluşması ve sıçanların ağırlık kazanması ile tesbit edildi. Asit oluşumunu takiben 2 haftalık bekleme süresi sonunda deneyler gerçekleştirildi.

DENEY DÜZENİ

Deneyler her grupta 5 adet sıçan bulunan, dört grupta gerçekleştirildi;

Gup I: Sağlıklı kontrol gurubu,

Grup II: Asitli sirotik kontrol gurubu,

Grup III: Asitli sirotik, deney düzeninde sadece endotoksin alan gurup,

Grup IV: Asitli sirotik, deney düzeninde endotoksin öncesinde, non-selektif endotelin-1 reseptör antagonisti bosentan alan gurup.

Deneyin Gerçekleştirilmesi:

Tüm gruplardaki sıçanlar 12 satlık açlığı takiben deneylere alındılar. Sıçanların ketamin 50 mg/kg intraperitoneal injeksiyon (İP) ile uyutulmasının ardından, femoral ven ve arter içine polietilen kanül (PE-50) ile birleştirilmiş, PE-10 kanülleri (Cly-Adams, USA) yerleştirildi.

Femoral artere yerleştirilen kanül basınç ölçeri (Grass, USA) ve taşograf'a (Grass, Model 7044D, USA) bağlanarak deney boyunca kan basıncı ve kalp hızı moniterize edildi (Poligraf, Grass, Model 7, USA). Femoral vene yerleştirilen

kanul sonradan damar yolu olarak kullanılmak üzere heparinlenerek kapatıldı.

Kanulasyon işleminin bitmesinin ardından sıçanlar her biri bir metabolik kafeste olacak şekilde metabolik kafeslere alındılar. Metabolik kafesler, aslına uygun olarak (Metabolic metabolism cage, model MC-PC; Sugiyamen co, Tokyo) Paşabahçe cam fabrikasında oluşturuldular. Metabolik kafeslerde sıçanların saatlik idrarlarının toplanması mümkün olmaktadır (Resim.1).

Metabolik kafeslere alınmalarını takiben 30 dakika süre ile sıçanların ortama uyum sağlanması için beklenildi. Bu süre içinde tüm guruplara 20 mL/kg olacak şekilde serum fizyolojik infüzyonu yapıldı. Takiben aşağıda belirtildiği şekilde maddeler femoral venden verilerek 3 saat boyunca saatlik idrarları toplandı.

Grup I ve II serum fizyolojik dışında herhangi bir madde verilmedi. Gurup III'e literatürde belirtildiği şekilde endotoksin (E.Coli., serotip 0111:B4, Difco Lab. Inc, Detroit, USA) 1.5 mg/kg'a beş dakikalık süre içinde yavaş olarak femoral venden verildi³⁷. Gurup IV'e endotoksinden beş dakika önce Bosentan 10 mg/kg'a (RO 47-0203/29, Roche, İsviçre) iki dakika içinde femoral venden verildi. Bosentan henüz ilaç aşamasına gelmemiş bir madde olup, non-selektif

olarak endotelin A ve B reseptörlerini bloke etmektedir. Deneyde kullanılan 10 mg/kg dozu, literatürde belirtilen, tam reseptör blokajı yapan miktardır^{66,67}.

Sıçanlar, 3 saat boyunca saatlik idrarların toplanmasının ardından metabolik kafeslerden alındılar ve tekrar ketamin 50 mg/kg İP verilerek uyutuldu. Takiben kalbe direkt olarak enjektörle girildi ve 5-10 cc kan alınarak öldürüldüler. Kanlar etilendiamin tetraasetik asit (EDTA, 1.5 mg/ml kan) ve aprotinin (500 ünite/ml kan) içeren tüplere kondu. Bu tüpler +4°C'da soğuk santrifüjde 5000 devir/dk çevrilerek plazmalar ayrıldı ve -70°C'da derin dondurucuda saklandı. Daha sonra bu plazmalardan endotelin-1, nitrik oksit metabolitleri ve atrial natriüretik peptid düzeyleri çalışıldı.

Deney sonunda öldürülen sıçanların böbrek ve karaciğerleri çıkartılarak formollü tüplere kondu ve patolojik inceleme için kaldırıldı.

BIYOKİMYASAL İNCELEMELER

İdrarda sodyum, potasyum ve kreatinin, plazmada kreatinin, aspartat aminotransferaz (AST) ve alanin amino transferaz (ALT) düzeyleri standart biyokimyasal yöntemlerle belirlendi.

Kreatinin Klirens (mL/dk) = $\frac{\text{idrar Kreatinin} \times \text{idrar hacmi}}{\text{Plazma Kreatinin} \times 180}$
(üç saatlik)
formülü ile belirlendi.

Birinci saatlik ve toplam idrar hacimleri kaydedildi.

ENDOTELİN-1 TAYİNİ

Endotelin-1 düzeyi, endotelin-1 saf olarak plazmadan ayrıştırılarak radyoimmünoassey (RIA) kiti ile belirlendi (Amersham International Plc, Amersham, UK).

Yöntem: Plazmadan ayrıştırılan endotelin-1 belirli miktarda anti-endotelin-1 antikoru ve I^{125} ile işaretlenmiş endotelin-1 ile inkübe edilir. Anti-endotelin-1 ile oluşan komplekslerin ayrılması ile ortamda kalmış olan serbest I^{125} işaretli endotelin-1 içeren radyoaktivitenin ölçülmesi ile endotelin-1 düzeyi hesaplanır.

Endotelin-1'in ayrıştırılması için plazma kolonlardan (Amprep™ 500mg C₂, Kod RPN 1913, Amersham, USA) geçirildi ve azot banyosundan geçirilerek toz şeklinde endotelin-1 elde edildi. Daha sonra bu materyal 100 mL deiyonize su içinde tekrar çözeltildi ve assay buffer ile inkübe edildi. Assay buffer 0.02M borik asit PH 7.4 ve %0.1 sodyum azide

içermekte olup diğer materyalleri çözmek için kullanılmaktadır. Bu çözeltiye 100 mikrolitre anti-endotelin-1 serumu konarak 2-8°C'da 4 saat süre ile inkübe edildi. Takiben 100 mikrolitre I¹²⁵ ile işaretlenmiş endotelin-1 konarak 2-8°C'da 16-24 saat süre ile tekrar inkübe edildi. Inkubasyonda sonra 250 mikrolitre Amerlex-M ikinci bir antikor reagent konarak 10 dakika inkübe edildi. Antikor ile bağlanmış ağır moleküller santrifüj ile çöktürülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Kalan sıvıdaki radyoaktivite gama kamera ile ölçüldü. Ölçülen radyoaktivitenin formüle konması ile endotelin-1 düzeyi hesaplandı.

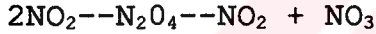
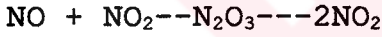
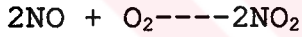
ATRIAL NATRIÜRETİK PEPTİD TAYİNİ

Plazma ANP tayini RIA yöntemi ile yapıldı (Peninsula Lab. INC, Belmont, CA). Buradaki yöntem de spesifik kolonlardan (C₁₈ SEP-COLUMN, Peninsula Lab. Inc, Belmont, CA) plazmanın geçirilmesi ile ANP'nin ayrıştırılmasının, ardından tavşan anti-ANP serumu ve I¹²⁵ ile işaretlenmiş ANP ile inkübe edilerek serbest kalan radyoaktivitenin gama kamera ile ölçülerek hesaplanması prensibine dayanmaktadır. Denek ANP ve işaretlenmiş ANP belirli miktarda antikora bağlanmak için yarış etmekte, denek

ANP'si arttıkça ortamda bulunan serbest radyoaktivite azalmaktadır.

NİTRİK OKSİT TAYİNİ

Yöntem: Nitrik oksit son derece kararsız bir bileşiktir. Oksijenin ortamda olması ile hızla oksitlenerek nitrit (NO_2) ve nitrat (NO_3) oluşturur. Nitrit Griess reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülür. Nitratın ölçülmesi için ise nitrat redüktaz enzimi ile nitrit'e dönüştürülmesi gerekmektedir.



Griess reaktifi eşit miktarda %0.1 naftilendiamin dihidroklorid ve %1 sulfanilamid içermektedir. Bunun 60°C 'da su banyosunda inkubasyonunu takiben 546 nm'de spektrofotometrede absorbansı değerlendirilmektedir. Nitrit 5 ve 50 nmol/mL içeren griess reaktifi ile değerlendirilen standartları bulunmaktadır.

Plazma örnekleri %35 sulfosalisilik asit ile deproteine edildi. 210 mikrolitre plazma, 60mU nitrat reduktaz ve 25 mikrolitre NADPH ile 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 250 mikrolitre Griess reaktifi konarak spektrofotometre ile

546 nm'de köre karşı okundu. Nitrit ve nitrat değerleri bilinen standart grafikte yerine konarak hesaplandı.

PARAMETRELER

Dört gruptaki deneklerin böbrek fonksiyonları, birinci saatlik idrar miktarı, 3 saatlik idrar miktarı, 3 saatlik idrarda Na atılımı, kreatinin klirensi ile değerlendirildi. Diğer parametreler endotelin-1, atrial natriüretik peptid ve nitrik oksit metabolitleri olarak incelendi.

İSTATİSTİK

İstatistik olarak her grupta az sayıda denek olması nedeni ile non-parametrik varyans analizi (ANOVA) olan Kruskal-Wallis kullanıldı. P değeri < 0.05 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel olarak anlamlı çıkan testlerde farklı çıkan grupların belirlenmesi amacı ile Dunn's test yapıldı. Ayrıca endotoksin ve bosentan grupları da kendi aralarında non-parametrik T test olan Man-Whitney-U testi ile karşılaştırıldı.

Ayrıca endotelin-1, ANP ve NO düzeyleri ile böbrek fonksiyonları arasında korelasyonu araştırmak amacı ile Spearman korelasyon analizleri yapıldı.



Resim 1. Resimde metabolik kafes gör÷lmektedir.

BULGULAR

BÖBREK FONKSİYONLARI

İdrar miktarları; toplam (UV, 3 saatlik) ve ilk bir saatlik (UV1) olarak incelendi. Toplam idrar miktarları, sağlıklı kontrol (Grup I) ve sirotik kontrol (Grup II) gruplarında sırası ile 4.4 ± 3.4 mL, 3.7 ± 1.4 mL'iken endotoksin grubu (Grup III) ve bosentan gruplarında (Grup IV) sırası ile 0.8 ± 0.7 ve 1.5 ± 0.5 mL olarak bulundu. Endotoksin grubundaki fark, sağlıklı ve sirotik kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlıydı ($P < 0.01$). Bosentan grubundaki toplam idrar miktarı ise anlamlı oranda artmıştı ($p < 0.05$). (Grafik 1a ve tablo 1)

Birinci saatlik idrar miktarları, grup I, II, III, IV'de sırası ile 2.6 ± 1.5 mL, 2.0 ± 0.8 mL, 0.09 ± 0.06 mL, 0.8 ± 0.6 mL olarak bulundu. Endotoksin grubunda UV1'de azalma istatistiksel olarak çok anlamlı bulundu ($p < 0.001$). Endotoksin ve bosentan gruplarının kendi aralarında karşılaştırmada ise, bosentan grubundaki idrar miktarı istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artmış bulundu ($P < 0.05$). (Grafik 1b ve tablo 1)

Kreatinin Klirensi;3 saatlik idrar ile hesaplanan kreatinin klirensleri tablo.1'de görülmektedir. Dört gruptaki değerler sırası ile 2.2 ± 3.4 mL/dk, 1.7 ± 0.7 mL/dk, 0.6 ± 0.6 mL/dk ve 0.9 ± 0.5 mL/dk bulunmuştur. Endotoksin grubundaki kreatinin klirensi sağlıklı ve sirotik kontrol gruplarına göre azalmış olarak bulunmuştur ($P<0.05$). Bosentan grubu ile endotoksin gruplarının kendi aralarında karşılaştırmasında ise istatistiksel farklılık görülmemiştir. Ancak bosentan grubunda kreatinin klirensi belirgin artmış olarak bulunmuştur (Tablo.1 ve grafik.2).

Na atılımı; toplam 3 saatlik olarak hesaplanmıştır. Grupların sırasına göre 357 ± 208.6 mEq, 346 ± 95.3 mEq, 61.6 ± 66.6 mEq ve 46.6 ± 25.5 mEq olarak bulunmuştur. Endotoksin ve bosentan gruplarında sağlıklı ve sirotik kontrol guruplarına göre belirgin azalma saptanmıştır ($P<0.05$). Bosentan grubunda Na atılımının biraz daha azalmış olduğu görülmüş ancak bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grafik.3 ve Tablo.1'de bu sonuçlar görülmektedir.

ENDOTELİN-1 DÜZEYLERİ

Endotelin-1 düzeyleri grup I, II, III, IV'de sırası ile 3.8 ± 0.9 fmol/ml, 6.9 ± 4.0 fmol/ml, 14.7 ± 6.9 fmol/ml, ve

9.9 $\pm$ 1.6 fmol/ml olarak bulunmuştur. Endotoksin ve bosentan gruplarında endotelin-1 düzeyleri, sağlıklı ve sirotik kontrol gruplarına göre belirgin olarak yüksek görülmektedir. P değeri istatistiksel anlamlılığa çok yaklaşmıştır (P=0.07). Endotoksin ve bosentan gruplarında ise kendi aralarında istatistiksel olarak bir farklılık saptanmamıştır. Endotelin-1 düzeyleri tablo.2 ve grafik.4'de görülmektedir.

NİTRİK OKSİT DÜZEYLERİ

Nitrit ve nitrat düzeyleri (NO₂/NO₃) grup I, II, III, IV'de sırası ile 22.7 $\pm$ 6.9 mmol/mL, 34.1 $\pm$ 4.0 mmol/mL, 56.3 $\pm$ 6.2 mmol/mL ve 31.2 $\pm$ 8.9 mmol/mL olarak bulunmuştur. Endotoksin grubunda NO₂/NO₃ düzeyleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış olarak bulunmuştur (P<0.05). Bu değerler tablo.2 ve grafik.5'de görülmektedir.

ATRIAL NATRİÜRETİK PEPTİD DÜZEYLERİ

ANP düzeyleri grupların sırasına göre, 83.7 $\pm$ 15.7 pgr/mL, 91.8 $\pm$ 12.7 pgr/mL, 128.0 $\pm$ 16.3 pgr/mL ve 107.1 $\pm$ 12.9 pg/mL olarak bulunmuştur. Endotoksin grubunda ANP düzeyi artmış olarak görülmekte, ancak bu artış istatistiksel

farklılığa ulaşmamaktadır ($P<0.05$). Tablo.2 ve grafik.6'da ANP değerleri görülmektedir.

AST DEĞERLERİ

Plazma AST değerleri grup I, II, III, IV'de sırası ile 107.5 ± 43.1 IU/L, 189.4 ± 78.0 IU/L, 384.5 ± 250.8 IU/L, 758.2 ± 311.5 IU/L'dir. Bosentan ve endotoksin gruplarında, diğer iki gruba göre yüksek bulunmuştur. Bosentan grubundaki farklılık anlamlıdır ($P<0.05$) (Grafik.7).

KORELASYON ANALİZLERİ

Böbrek fonksiyonunu gösteren parametreler ile endotelin-1, nitrik oksit ve ANP değerleri arasında korelasyon aranmıştır. Endotelin-1 düzeyleri ile birinci saat idrar miktarı ve kreatinin klirensi arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Sırası ile $r=-0.94$ ve $r=-0.87$ ($P<0.05$). Nitrik oksit değerleri ile Na atılımı ve kreatinin klirensleri arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Sırası ile $r=-1$ ve $r=-0.97$ ($p<0.05$).

HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Deney sonunda sıçanlardan alınan böbrek ve karaciğerler hematoxilen eozin ile incelenmiştir. Karaciğerlerde mikronodüler siroz geliştiği görülmüştür. Böbreklerde ise az miktarda kanama dışında ek bir patolojik bulgu saptanmamıştır.



Tablo 1. Sağlık, sirotik kontrol, endotoksin ve bosentan gruplarında böbrek fonksiyon parametreleri

	Sağlıklı kontrol	Sirotik kontrol	Endotoksin grubu	Bosentan grubu
İdrar Hacmi 3 saatlik (ml)	4.4 ± 3.4	3.7 ± 1.4	0.8 ± 0.7**	1.5 ± 0.5
İdrar Hacmi 1.saat (mL)	2.7 ± 1.5	2.0 ± 0.8	0.09 ± 0.8***	0.8 ± 0.6
Kr Klirensi (mL/min)	2.2 ± 1.2	1.7 ± 0.7	0.6 ± 0.6*	0.9 ± 0.5
Na atılımı 3 saatlik(mEq)	357.0 ± 208.6	346 ± 95.3	61.6 ± 66.6*	46.6 ± 25.5*

Sonuçlar ortalama ± Standart deviasyon olarak verildi.

* p <0.05;Sağlıklı ve sirotik kontrollere göre

** p< 0.01;Sağlıklı ve sirotik kontrol grupları ve bosentan grubuna göre

*** p<0.001;Sağlıklı ve sirotik kontrol ve bosentan gruplarına göre

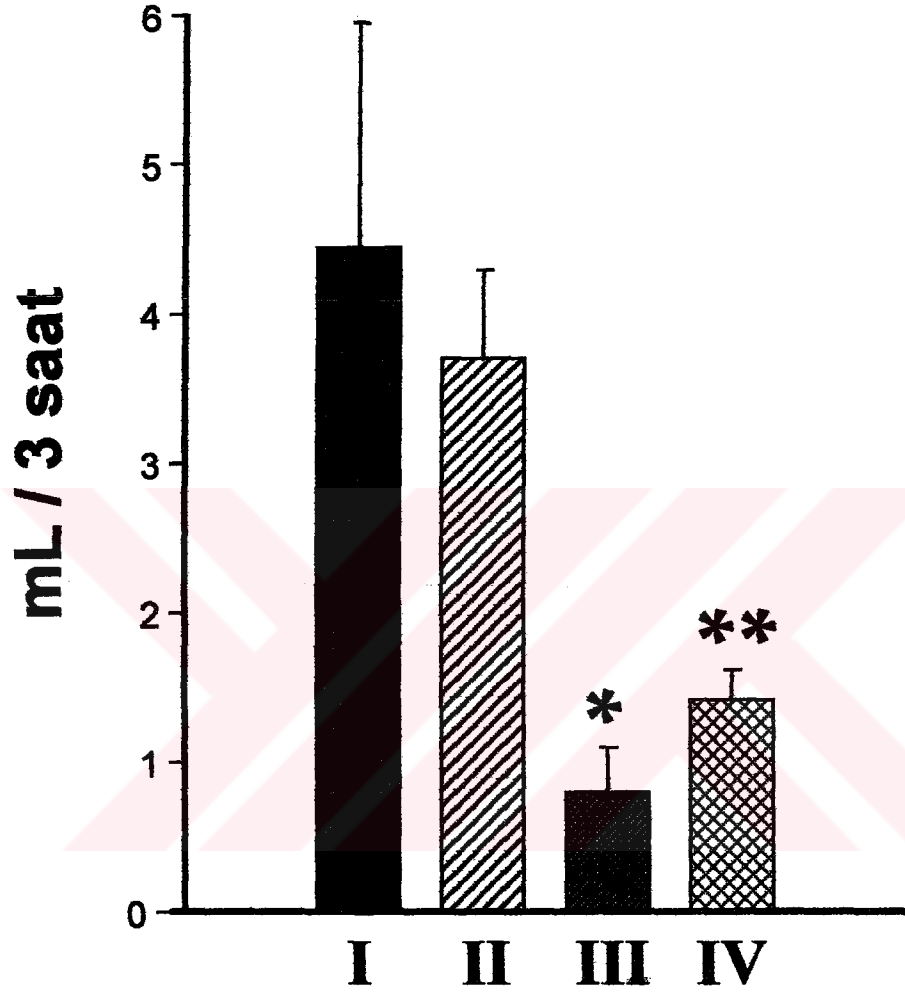
Tablo 2.Dört grupta plazma endotelin-1, atrial natriüretik peptid ve nitrik oksit düzeyleri

	Sağlıklı kontrol	Sirotik kontrol	Endotoksin grubu	Bosentan grubu
Endotelin-1 fmol/mL	3.8 ± 0.9	6.9 ± 4.0	14.7 ± 6.9**	9.9 ± 1.6
Nitric Oksit nmol/mL	22.7 ± 6.9	34.1 ± 4.0	56.3 ± 6.2*	31.2 ± 8.9
ANP pg/mL	83.7 ± 15.7	91.8 ± 12.7	128.0 ± 16.3	107.1 ± 12.9

Sonuçlar ortalama ± Standart deviasyon olarak verildi.

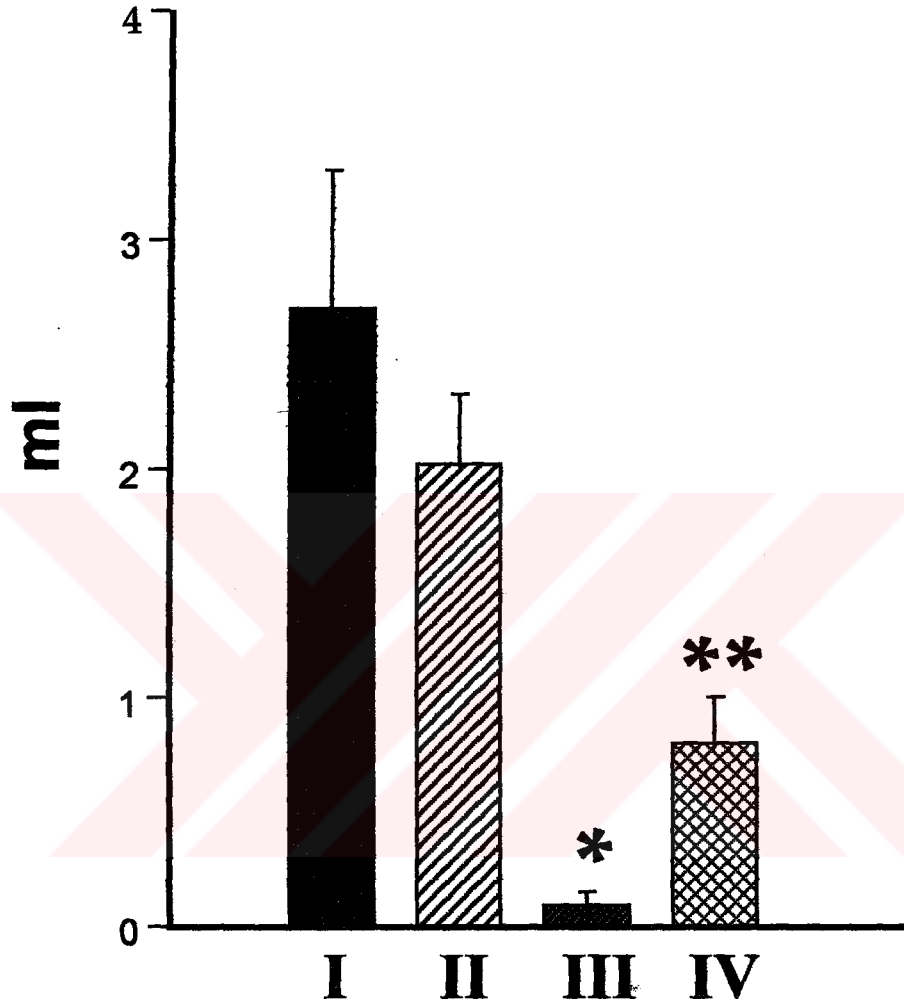
*p<0.05;Sağlıklı ve sirotik kontrol ve bosentan gruplarına göre

**p=0.07



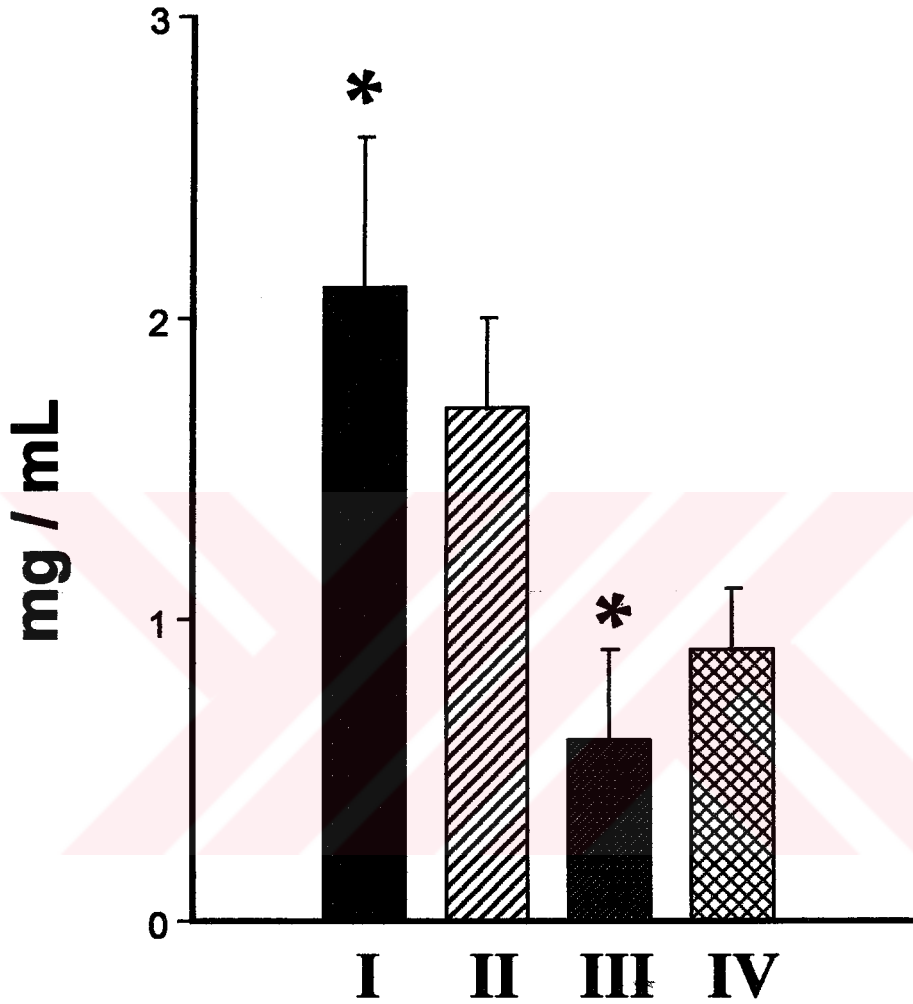
Grafik 1a. Üç saatlik İdrar Miktarı (UV). *UV endotoksin grubunda belirgin olarak azalmıştır ($p < 0.01$).

**Bosentan grubunda ise UV'da belirgin düzelme gözlenmiştir ($p < 0.05$). Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

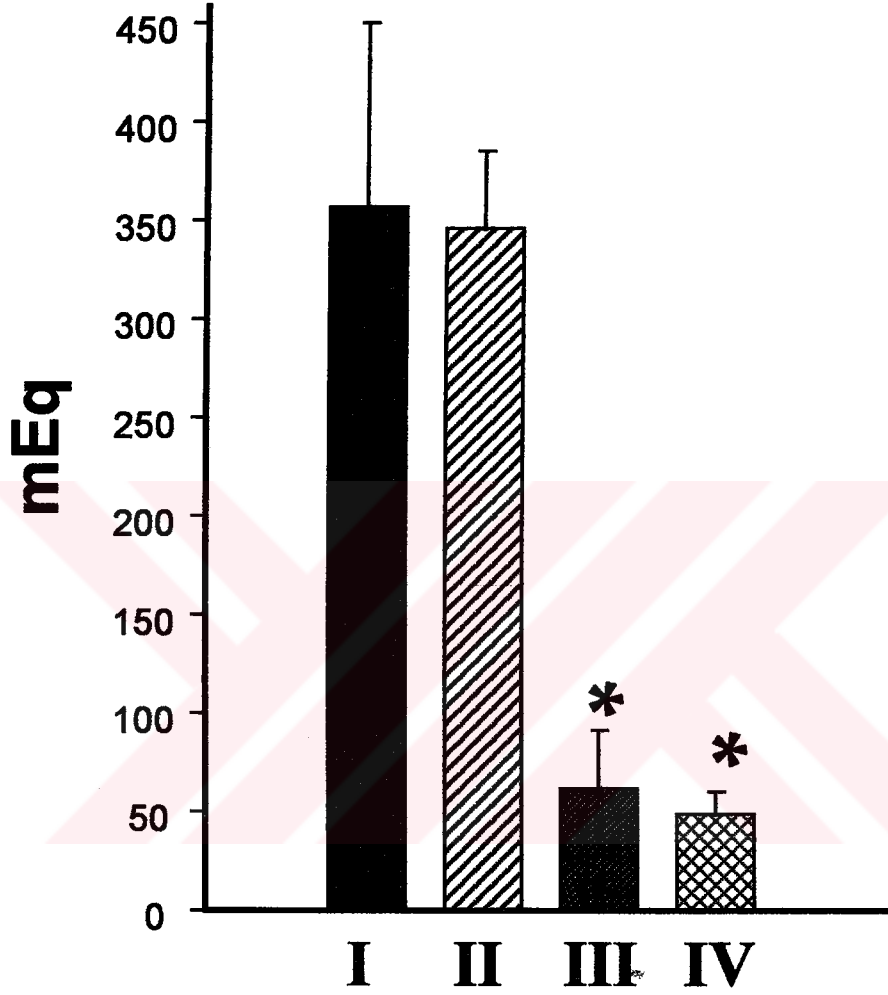


Grafik 1b. Birinci saatte idrar miktarı (UV1).
*UV1 endotoksin grubunda çok belirgin olarak azalmıştır ($p < 0.001$).

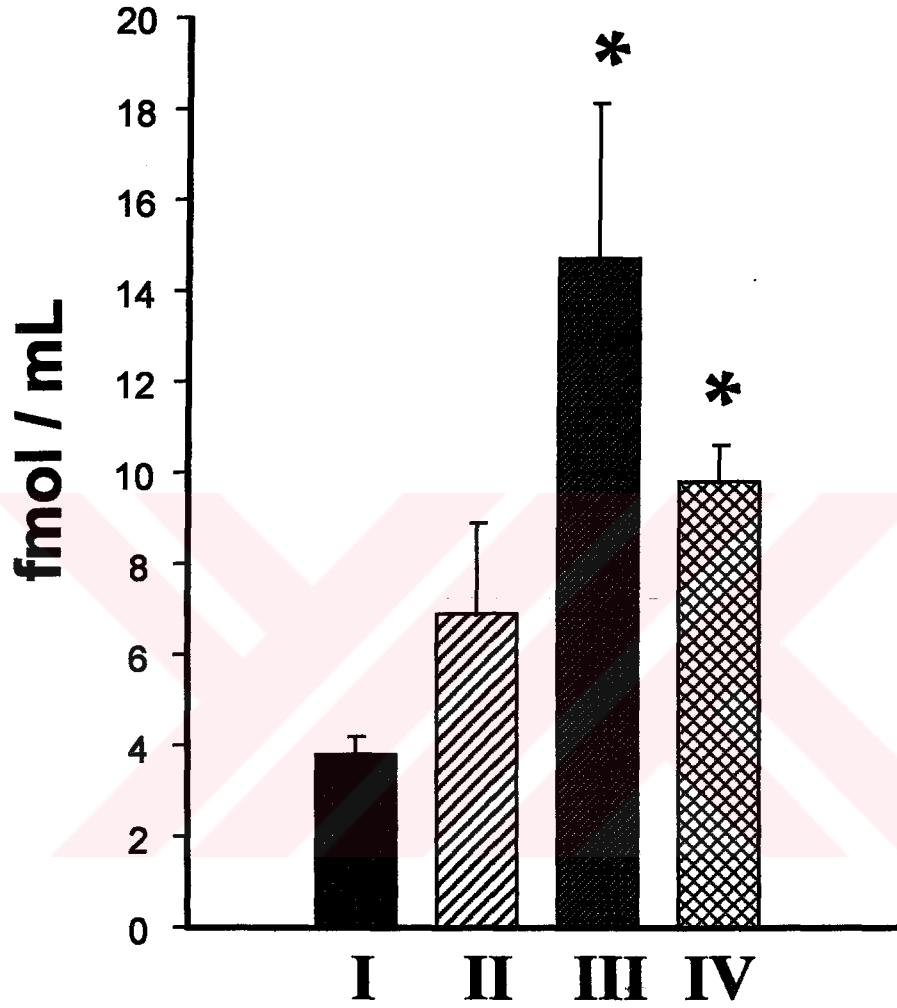
**Bosentan grubunda ise anlamlı düzelme görüldü ($p < 0.05$). Değerler ortalama $\pm$ SEM. olarak verildi.



Grafik 2. Kreatinin Klirensi (Ccr). *Ccr endotoksin grubunda belirgin olarak azaldı ($p < 0.05$). Bosentan grubunda ise düzelme görüldü ($p > 0.05$). Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

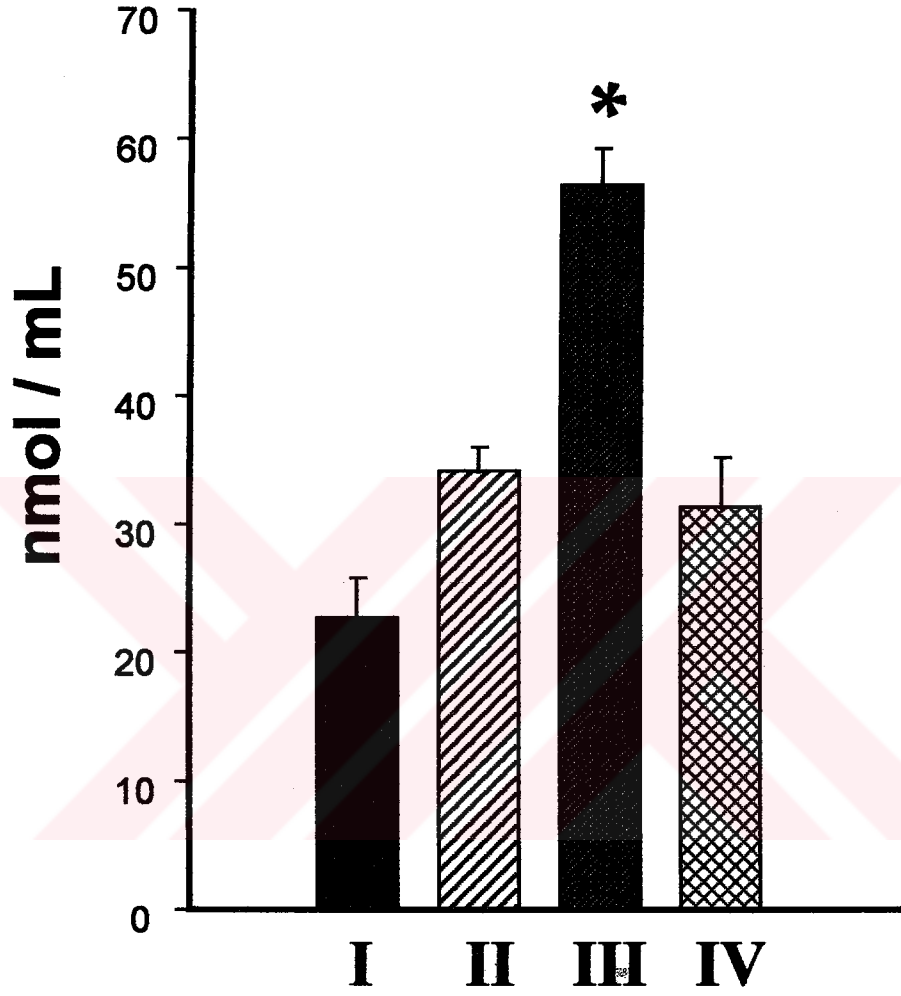


Grafik 3. İdrarda Na atılımı (UNa). *Bozentan ve endotoksin guruplarında UNa belirgin olarak azalmıştır ($p<0.05$). Bosentan verilmesinin UNa üzerine etkisi olmamıştır. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.

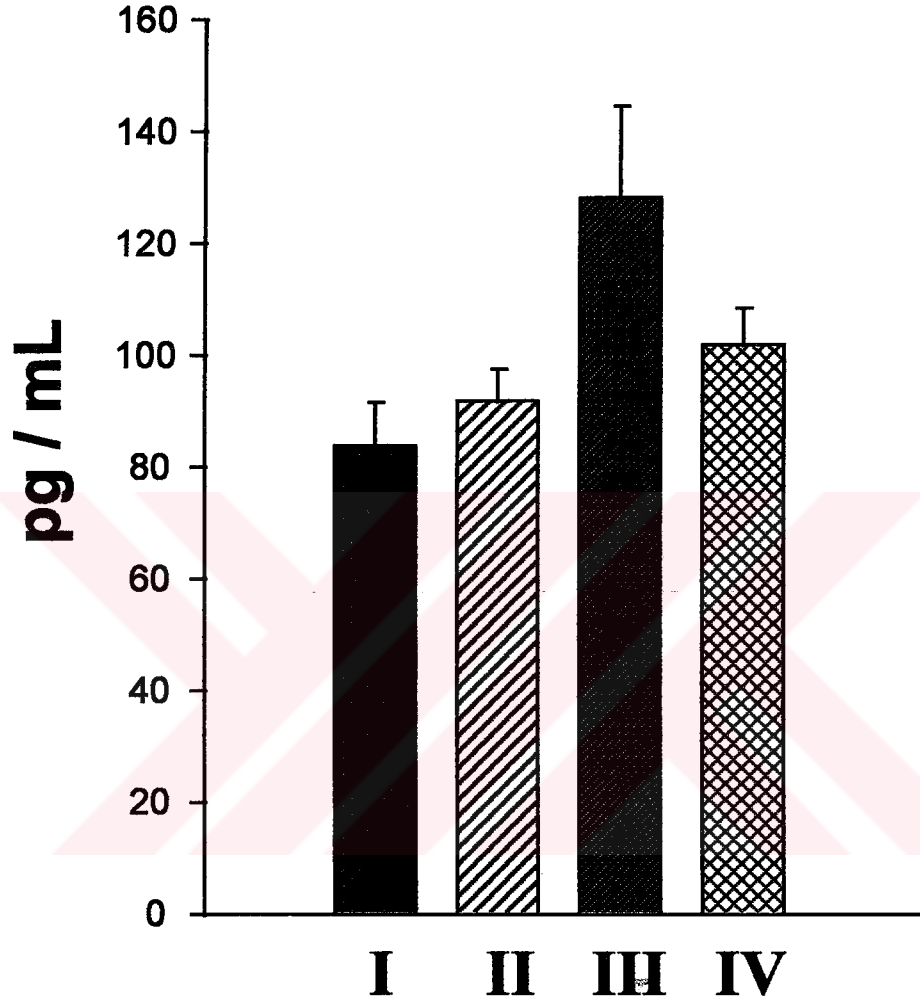


Grafik 4. Plazma endotelin-1 düzeyi (ET-1).

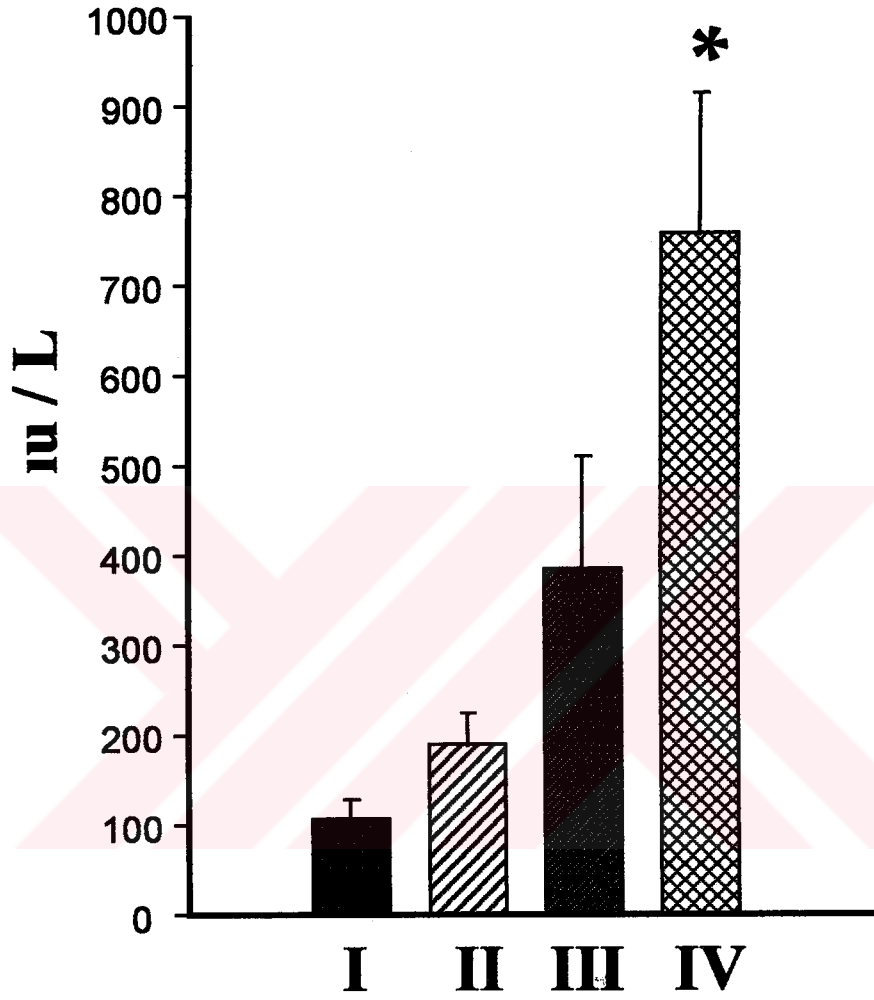
ET-1 düzeyleri Bosentan ve endotoksin gruplarında belirgin olarak yükseldi, ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı ($p=0.07$). Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak verildi.



Grafik 5. Plazma NO₂/NO₃ düzeyleri. *NO₂/NO₃ düzeyleri endotoksin gurubunda sağlıklı, sirotik kontrol ve bosentan gruplarna göre anlamlı yükselme göstermektedir (p<0.05).



Grafik 6. Plazma Atrial natriüretik peptid (ANP). ANP düzeyleri sirotik kontrol, endotoksin ve Bosentan guruplarında yükselmiş, ancak istatiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p>0.05$).



Grafik 7. Plazma AST değerleri. Bosentan grubunda belirgin olarak yükselmiştir ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Asit gelişmiş siroz hastalarında yapılan çalışmaların çoğunda endotelin-1 ve endotelin-3 düzeyleri sağlıklı kontrol gruplarına göre yüksek saptanmıştır^{50-56,78}. Özellikle HRS'da endotelin-1 düzeylerinde bu artış daha belirgindir⁵⁰. Endotelin-1'in böbrek yetmezliğini başlatan önemli bir faktör olup olmadığı konusu açık değildir.

İlerlemiş sirozda endotelinlerin artmasına yol açan çeşitli nedenler üzerinde durulmaktadır. Bunlar; hemodinamik değişiklikler, arterial hipotansiyon, direkt karaciğer ve böbreklerden yapımın artması, splanknik alanda yapımın artması, hipoksi ve endotoksinemi gibi faktörlerdir^{50,59,60}. Bunlar arasında en çok tartışılanı ise endotoksinemidir. Endotoksinin hücre kültürlerinde endotelin yapımını arttırdığı gösterilmiştir^{39,68}. Endotoksinin ilerlemiş siroz ve HRS'da endotelin-1 artışının sebebi olabileceği hep söylenmesine rağmen, bunu direkt olarak gösteren deneysel bir çalışma yoktur.

Bu amaçla, bu çalışmada sıçanlarda akut endotoksinemi ile böbrek yetmezliği oluşturularak, endotelin-1 düzeylerinin artıp artmadığı araştırıldı. Ayrıca endotelin-1'in HRS fizyopatolojisindeki yerini irdelemek amacı ile endotelin-1

reseptör antagonisti bosentan verilerek, böbrek fonksiyonları üzerine etkisi incelendi.

Deneylerimizin sonuçlarında aşağıdaki bilgiler elde edildi; a-Sağlıklı sıçanlar ile asitli kontrol sıçanlarda böbrek fonksiyonları açısından bir fark olmamasına rağmen, endotelin-1 düzeyleri asitli sıçanlarda sağlıklı sıçanlara göre yüksektir.

b-Akut endotoksinemi böbrek fonksiyonlarında belirgin bozulma yapmakta ve endotelin-1 düzeylerini arttırmaktadır.

c-Endotoksin öncesinde bosentan alan grupta ise kreatinin klirensi ve serbest su atılımında azalma daha az olmaktadır. Bosentan grubunda su atılımı, endotoksin grubuna göre belirgin olarak fazladır.

d-Sodyum atılımında, endotoksin ve bosentan gruplarında belirgin fark yoktur, her iki grupta kontrollere göre azalmıştır. Hatta bosentan Na atılımını daha fazla azaltmaktadır.

Endotelin-1, asitli kontrol grubunda sağlıklı kontrollere göre yüksek olmasına rağmen, bu iki grupta böbrek fonksiyonlarında farklılık yoktur. Bu bulgu literatürde belirtilen asitli sirozda endotelin-1 düzeylerinde yükselme olduğunu belirten yayınlarla uyumludur^{50-56,78}. Endotoksin grubunda ise endotelin-1

düzeylerinin daha fazla artması ile birlikte kreatinin klirensi, su ve Na atılımı da belirgin olarak azalmaktadır. Bu ilişki negatif korelasyon ile de gösterilmiştir. Endotelin reseptör antagonizması yapıldığında ise böbrek fonksiyonlarında bozulma daha az olmakta, ancak Na atılımı değişmemektedir.

Endotelin-1 antagonizmasının böbrek fonksiyonlarında anlamlı düzelme yapması, endotelin-1'in sirotik sıçanda endotoksin ile oluşturulmuş akut böbrek yetmezliği patogenezinde önemli bir yer aldığı düşüncesini doğrulamaktadır. Endotelin-1'in bu etkisi, renal kortekste preglomerular arteriollerde oluşturduğu vazokonstrüksiyona bağlıdır. Vazokonstrüksiyon sonucu nefronda glomerular filtrasyon oranı azalmakta, Na ve su tutulumu olmaktadır.

Bu etki büyük olasılıkla, endotelin-1'in renal kortekste yoğun olarak bulunan ET_A reseptörleri üzerinden olmaktadır. Çalışmalarda, sıçanda ET_A reseptörlerinin renal kortekste fazla olduğu ve kasılmadan sorumlu oldukları, ET_B reseptörlerinin ise renal medullada daha fazla olup tübüler fonksiyonlar ve nitrik oksit yapımında rol aldıkları gösterilmiştir⁴⁷⁻⁴⁹.

Bosentan ile antagonizma yapıldığında ise Na atılımı değişmemiş, hatta azalma göstermiştir. Sodyum atılımının

kontrolü böbrek tübüllerinde olmaktadır. Endojen endotelin'in normal fizyolojide böbrek tübülleri üzerine etkisi, Na atılımını arttırmak şeklindedir. Bunu da renal medullada daha fazla bulunan ET_B reseptörleri üzerinden yapmaktadır^{46,48,69}. Bosentan ile oluşturulan antagonizma, böbrek tubullerinde bulunan ET_B reseptörlerine etki ederek Na atılımına olumsuz etki yapmış olabilir. Bu fikri destekleyen bir çalışmada; sirotik sıçanlarda renal medullada ET_B reseptörlerinin upregulasyona uğradığı ve bosentan verilmesi ile Na atılımının azaldığı gösterilmiştir⁷⁰. Ayrıca endotoksin ile oluşturulmuş akut böbrek yetmezliğinde Na atılımı, endotelin-1 dışındaki diğer faktörlerden de etkileniyor olabilir.

Bosentan'ın bir etkisi de kalp hızı, kan basıncı gibi hemodinamik faktörlere etki etmeden kalp kan atımını ve splanknik alanda kan akımını arttırmasıdır⁷¹. Bu etkisi ile renal kan akımını arttırarak GFR'de olumlu etki yapabilir. Bizim çalışmamızda da kalp hızı ve kan basıncı üzerine olumsuz etki saptanmamıştır.

HRS tedavisinde yeni yaklaşımlar uygulanmasına rağmen, GFR'nin azalmasından sonra idrar miktarını arttırmak çok zor olmaktadır. Tedavide diüretikler etkisiz kalmakta, yüksek dozda verilmeleri ise ensefalopati riskini

arttırmaktadır. Çalışmamızda bosentan'ın serbest su atılımını arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuç bosentan'ın ilerde HRS tedavisinde kullanılabileceği fikrini oluşturmuştur. Tek bir deneysel çalışma ile kesin bir kanı oluşturmak doğru değildir. Bu yaklaşımın tekrarlanan deneysel ve klinik çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızın ikinci bölümünü oluşturan nitrik oksit ve ANP'nin HRS ile olan ilişkisidir. İnsan çalışmalarında asitli sirozda NO metabolitleri (nitrit/nitrat) yüksek bulunmuştur^{28,62,72-74}. Nitrik oksitin, sirozda görülen periferik vazodilatasyon ve hiperdinamik sirkulasyondan sorumlu olduğu düşünülmektedir^{62,73,74}. Endotoksinin hücre kültürlerinde NO salımını arttırdığı bilinmektedir. Sirozda da endotoksineminin NO salımını uyardığı üzerinde durulmaktadır^{62,72}. Ancak bunun tam aksi görüşler olan insan çalışmaları da mevcuttur⁷⁴. Çalışmamızın bu bölümünde akut endotoksineminin nitrik oksit metabolitleri üzerine etkisi incelenmiştir. Sağlıklı kontrollere göre, asiti olan sıçanlarda NO metaboliti olan nitrit düzeyleri belirgin olarak artmış bulunmuştur. Bu bulgu yukarıdaki literatür bulguları ile uyumludur. Endotoksin verilmesinin ardından ise NO metabolitleri daha belirgin olarak yükselmiştir.

Bosentan ise NO metabolitlerinin sirotik kontroller ile eşit düzeye inmesini sağlamıştır. Endotoksinin NO salınımını hücre kültürlerinde direkt olarak arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca endotelin-1, ET_B reseptörleri üzerinden etki ederek NO salınımını arttırmaktadır^{47,75}. Endotelin-B reseptörlerinin bosentan ile kapatılması, NO salınımının azalmasını yol açmış olabilir. Ancak bosentan ve sirotik kontrol gruplarında, sağlıklı kontrollere göre halen NO miktarının yüksek olması sirozda başka etkenlerin de etkili olduğunu düşündürmektedir. Endotoksin infüzyonundan önce NO sentezini inhibe eden N-monometil-L-Arjinin (L-NAME) verilmesinin böbrek fonksiyonları üzerine etkisinin araştırılması, ilginç olmakla beraber bu çalışmanın amacı olmadığı için yapılmamıştır. Atrial natriüretik peptid sirozda normal, yüksek, hatta düşük bulunabilir. Sirozda ANP artışı, preasitik dönemde Na ve su tutulumuna bağlı ikincil bir durumdur. Asitik dönemde ise ANP'ye karşı bir duyarsızlık mevcuttur. Bunun artmış vazokonstrüktör ajanlara, özellikle endotelin-1'e bağlı olduğu düşünülmektedir^{21,22}. Bu duyarsızlık nedeni ile Na tutulumu daha fazla olmaktadır. Ancak ilerlemiş sirozda ANP'nin artmasının böbrek fonksiyonları üzerinde olumlu etkisi olduğunu belirten yayınlar da mevcuttur⁷⁶.

Çalışmamızda ANP düzeyleri, sağlıklı kontrollere göre sirotik kontrollerde ve bosentan gruplarında farklı bulunmamış, endotoksin grubunda ise bir miktar artmış olmakla beraber istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Literatürde, asitli sıçanlarda ANP düzeyleri kontrollere göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur⁷⁷. Bizim sonuçlarımızda sirotik kontrollerde ANP düzeylerinin belirgin olarak yüksek çıkmamasının nedeni denek sayımızın az olmasına bağlı olabileceği gibi, tamamen tesadüfi bir sonuç da olabilir. Ancak sonuçlarımıza göre akut endotoksinemi ANP salgılanmasını arttırmaktadır. Bu direkt bir etki olabileceği gibi, endotelin-1'in etkisi ile Na tutulumuna bağlı ikincil bir etki de olabilir.

Oluşturduğumuz bu model sirotik sıçanlarda akut endotoksineminin böbrek fonksiyonlarına ve diğer endojen faktörlere yaptığı etkiyi araştıran bir modeldir. İnsanda oluşan HRS'un tamamıyla benzeri olması mümkün değildir. Ancak modelimizde bulunan endotoksinemi, endotelin-1, nitrik oksit ve ANP yüksekliği gibi faktörlerin HRS'da da bulunması, bu modelin insanda görülen HRS'a uygun bir model olabileceğini göstermektedir. HRS patogenezi ve tedavisine yönelik deneysel çalışmalarda bu modelin uygun bir model olarak kullanılabileceği düşüncesindeyiz.

SONUÇLAR

1-Akut endotoksinemi sirotik sıçanda endotelin-1'i mediatör olarak kullanarak böbrek yetmezliği oluşturmaktadır.

2-Endotelin-1 antagonizması özellikle serbest su klirensini arttırarak böbrek fonksiyonlarında düzelme yapmaktadır.

3-Endotelin-1 reseptör antagonisti bosentan'ın böbrek fonksiyonları üzerine olumlu etkisi, tedavide yeni yaklaşımların denenmesi açısından ileri bir adım olabilir.

4-Nitrik oksit sirotik sıçanda akut endotoksinemide artmaktadır.Bu artışın endotelin-1 antagonizması ile azalması, endotelin-1'in NO artışında etkili olduğunu göstermektedir.

5-İnsanda görülen bir çok faktörle (endotelin-1, nitrik oksit ve endotoksinemi) uyumluluk göstermesi nedeni ile sıçanda oluşturduğumuz bu modelin, HRS modeli olarak diğer hayvan çalışmalarına da uygun olacağı kanaatindeyiz.

SUMMARY

Elevated levels of endothelin-1 and nitric oxide in cirrhotic patients with ascites and/or hepatorenal syndrome (HRS) have been reported in previous studies.

1) Determination of endothelin-1, atrial natriuretic peptide (ANP), and nitric oxide (NO) levels in cirrhotic rats with ascites and endotoxin induced acute renal failure; 2) Assessment of the effect of the non selective endothelin-1 receptor antagonist bosentan on renal function. Methods: Four groups of rats (n=5) were included in the study. Cirrhosis was induced by CC14(2 x 0.5 ml/kg/week, i.p,12-16 weeks).Group I: Sham, Group II:cirrhotic rats with ascites, group III: cirrhotic rats with ascites and renal failure induced by endotoxin (1.5 mg/kg) (E.Coli., serotype 0111:B4), and the group IV:cirrhotic rats with ascites recieved bosentan (10 mg/kg) (RO 47-0203) prior to endotoxin injection. The rats in all groups were injected with 20 ml/kg of saline intravenously in order to measure free water clearance. Urine was collected in metabolic cages for three hours post endotoxin injection. The rats were then sacrificed, and blood samples

were stored at -70° C. Endothelin-1, ANP levels were measured by RIA. NO was measured by spectrophotometry.

Results were as follows for the groups of sham, cirrhotic control, endotoxin and bosentan respectively.

Urine output: 4.4 ± 3.4 mL, 3.7 ± 1.4 mL, 0.8 ± 0.7 mL, 1.5 ± 0.5 (p<0.01). GFR: 2.2 ± 1.2 mL/min, 1.7 ± 0.7 mL/min, 0.6 ± 0.6 mL/min, 0.9 ± 0.5 mL/min (p<0.05). Na excretion: 357.0 ± 208.6 mEq, 346 ± 95.3 mEq, 61.6 ± 66.6 mEq, 46.6 ± 255 mEq (p<0.05). Endothelin-1: 3.8 ± 0.9 fmol/mL, 6.9 ± 4.0 fmol/mL, 14.7 ± 6.9 fmol/mL, 9.9 ± 1.6 fmol/mL (p=0.07). NO: 22.7 ± 6.9 nmol/mL, 34.1 ± 4.0 nmol/mL, 56.3 ± 6.2 nmol/mL, 31.2 ± 8.9 nmol/mL (P<0.05). ANP: 83.7 ± 15.7 pg/mL, 91.8 ± 12.7 pg/mL, 128.0 ± 16.3 pg/mL ve 107.1 ± 12.9 pg/mL (p>0.05).

In conclusion, endothelin-1 and NO levels were markedly elevated in cirrhotic rats with ascites and renal failure. Bosentan improved renal function by increasing water clearance but had no effect on Na excretion.

KAYNAKLAR

1-Laffi G, La Villa G, Gentillini P: Pathogenesis and management of the hepatorenal syndrome. Seminars in liver Disease 1994;14, 71-81

2-Arroyo V, Gines P, Gerbes A.L, Dudley J.F, Gentillini P, Laffi G, Reynolds B.T, Ring-Larsen H, Scholmerich J: Definition and diagnostic criteria of refractory ascites and hepatorenal syndrome in cirrhosis. Hepatology 1996; 23, 164-176.

3-Llach J, Gines P, Arroyo V: Prognostic value of arterial pressure, endogenous vasoactive systems and renal function in cirrhosis with ascites. Gastroenterology 1988; 94, 482-487.

4-Folla A, Llovet JM, Navasa M: Renal impairment following spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis. Incidence, clinical course, predictive factors and prognosis. Hepatology 1994;20,1495-1501.

5-Iwatsuki S, Popovtzer MM, Corman JL: Recovery from hepatorenal syndrome after orthotopic liver transplantation. N Eng J Med 1973; 288, 1155-1159.

6-Schrier RW, Arroyo W, Bernardi M, et al: Periferal arterial vasodilation hypotheses: A proposal for the

initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8, 1151-1157.

7-Levy M: Pathophysiology of ascites formation. In: Epstein M (Ed): *The kidney in liver disease*, 3rd ed. Baltimore, Williams & Wilkins 1988, 209-243.

8-Le Moine O, Soupison T, Sogni P, Marchand A, Moreau R, Hadengue A, Goldman M, Deviere J, Lebrec D: Plasma endotoxin and tumour necrosis factor- α in the hyperkinetic state of cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 23, 391-395.

9-Hunt NCA, Goldin RD: Nitric oxide production by monocytes in alcoholic liver disease. *J Hepatol* 1992; 14, 146-150.

10-Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nölchen B, Junmaier G, Huber C: Serum levels of cytokins in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103, 264-274.

11-Bichet DG, Van Putten VJ, Schrier RW: Potential role of increased sympathetic activity in impaired sodium and water excretion in cirrhosis. *N Eng J Med* 1982;307,1552-1557.

12-Henriksen JH, Ring-Larsen H, Kanstrup IL, Christensen NJ: Splanchnic and renal elimination and release of catecholamines in cirrhosis. Evidence of enhanced sympathetic nervous activity in patients with decompensated cirrhosis. *Gut* 1984; 25, 1034-1043.

- 13-Bendsen F, Henriksen JH, Sorensen TIA, Christensen NJ: Effect of oral propranolol on circulating catecholamines in cirrhosis: Relationship to severity of liver disease and splanchnic haemodynamics. J Hepatol 1990;10, 198-204.
- 14-Claria J, Jimenez W, Arroyo W: Effect of V₁-vasopressin receptor blockade on arterial pressure in conscious rats with cirrhosis and ascites. Gastroenterology 1991; 100, 494-501.
- 15-Claria J, Jimenez W, Arroyo V, Guarner F, Lopez C, La Villa G, Asbert M, Rivera F, Rodes J: Blockade of the hydroosmotic effect of vasopressin normalizes water excretion in cirrhotic rats. Gastroenterology 1989; 97, 1294-1299.
- 16-Rimola A, Gines P, Arroyo V: Urinary excretion of 6-keto-PGF_{1α}, tromboxane B₂ and PGE₂ in cirrhosis with ascites: Relationship to functional renal failure (hepatorenal failure). J Hepatol 1986;3: 111-117.
- 17-Laffi G, Daskalopulos G, Kronborg I, et al: Effect of sulindac and ibuprofen in patients with cirrhosis and ascites: An explanation for the renal sparing effect of sulindac. Gastroenterology 1990; 90, 182-187.
- 18-Govindarajan S, Nast C.C, Smith W.L, Koyle M.A, Daskalopulos G, Zipser R.D al: Immunohistochemical

distribution of renal prostaglandin endoperoxide synthase and prostacyclin synthase: Diminished endoperoxide synthase in the hepatorenal syndrome. *Hepatology* 1987; 7, 654-659.

19-Zipser R.D, Radvan G.H, Kronborg J.I, Duke R, Little T.E: Urinary thromboxane B₂ and prostoglandine E₂ in the hepatorenal syndrome: Evidence for increased vasoconstrictor and decreased vasodilator factors. *Gastroenterology* 1983; 84, 697-703.

20-Zipser R.D, Kronborg J.I, Rector W, Reynolds T, Daskalopoulos G: Therapeutic trial of thromboxane synthesis inhibition in the hepatorenal syndrome. *Gastroenterology* 1984; 87, 1228-1232.

21-Wong F, Blendis L: Pathophysiology of sodium retention and ascites formation in cirrhosis: Role of atrial natriuretic factor. *Seminars in Liver Disease* 1994; 14, 59-70.

22-Laffi G, Pinzanni M, Meacci E: Renal hemodynamic and natriuretic effect of human atrial natriuretic factor infusion in cirrhosis with ascites. *Gastroenterology* 1989; 96, 167-177.

23-Ravin HA, Ronley D, Jenkins C: On the absorption of bacterial endotoxin from the gastrointestinal tract of the normal and shocked animal. *J Exp Med* 1960; 112, 783-792.

- 24-Nolan JP: The role of endotoxin in liver injury. Gastroenterology 1975; 69, 1346-1356.
- 25-Wolter J, Liehr H, Grun M: Hepatic clearance of endotoxins: differences in arterial and portal perfusion. J Ret Soc 1978; 3, 145-152.
- 26-Morencos F.C, Castano De Las H, Ramos L.M, Arias M.J.L, Ledesma F, Romero F.P: Small bowel bacterial overgrowth in patients with alcoholic cirrhosis. Dig Dis Sci 1995; 40, 1252-1256.
- 27-Lumbsden AB, Henderson JM, Kutner MH: Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and periferal venous blood in patients with cirrhosis. Hepatology 1986; 8, 232-236.
- 28-Guarner C, Sorino G, Tomas A, Bulbena O, Novella T.M, Balanzo J, Vilardel F, Mourelle M, Moncada S: Increased serum nitrate levels in patients with cirrhosis: Relationship to endotoxemia. Hepatology 1993; 18, 1139-1143.
- 29-Deviere J, Content J, Denys C, Vandenbussche P, Schandenne L, Wybran J, Dupont E: Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide induced production of monokines in cirrhosis. Hepatology 1990; 11, 628-634.

30-Bigatello LM, Broitman SA, Fattori L, Di Paoli M, Pontello B.S.M, Bevilacqua G, Nespoli A: Endotoxemia, encephalopathy and mortality in cirrhotic patients. Am J Gastroenterology 1987; 82, 11-15.

31-Fukuki H, Brauner B, Bode JC: Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with improved chromogenic assay. J Hepatol 1991; 12, 162-169.

32-Wilkinson SP, Moodie H, Stamakis JD: Endotoxemia and renal failure in cirrhosis and obstructive jaundice. B M J 1976; 2, 1415-1418.

33-Ideura T, Yoshimura A, Shirai M, Taira T, Koshikawa S: Endotoxin-induced acute tubular necrosis in cirrhotic rats. Scand J Urol Nephrol 1993; 27, 433-439.

34-Yoshimura A, Ideura T, Shirai M, Taira T, Iwasaki S, Kitaoka T, Koshikawa S: The distribution of H^3 -labeled endotoxin in the kidney of liver cirrhotic rats. Scand J Urol Nephrol 1993; 27, 295-299.

35-Wilkinson SP, Hirst D, Day DW: Spectrum of renal tubular damage in renal failure secondary to cirrhosis and fulminant hepatic failure. J Clin Pathol 1978; Vol 31, 101-107.

- 36-Kikeri D, Pennel JP, Hwang KH: Endotoxemic acute renal failure in awake rats. *Am J Physiol* 1986; 250, F1098-F1106.
- 37-Morise Z, Ueda M, Aiura K, Endo M, Kitajima M: Pathophysiologic role of endothelin-1 in renal function in rats with endotoxin shock. *Surgery* 1994; 115, 199-204.
- 38-Nakamura T, Kasai K, Sekiguchi Y: Elavation of plasma endothelin concentration during endotoxin shock in dogs. *Eur J of Pharmacol* 1993; 205 (3), 277-282.
- 39-Ninomiya H, Uchida Y, Ishii Y, Nomura A, Kameyama M, Sotema M, Endo T, Hasegawa S: Endotoxin stimulates endothelin release from cultured epithelial cells of guinea-pig trachea. *Eur J Pharmacol* 1991; 203 (2), 299-302.
- 40- Maeda K, Abello PA, Abraham MR,: Endotoxin induces organ-specific endothelial cell injury. *Shock* 1995; 1, P 46-50.
- 41-Weitzberg E, Lundberg JM, Rudehill A: Inhibitory effects of diclofenac on the endotoxin shock response in relation to endothelin turnover in the pig. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995; 39, 50-59.
- 42-Levy M, Wexler MJ: Subacute endotoxemia in dogs with experimental cirrhosis and ascites: Effect on kidney function. *Can J Physiol Pharmacol* 1984; 62, 673-679.

- 43-Erik E. Anggard, Renia M Botting, Jhon R. Vane: Endothelins. Blood Vessels 1990; 27, 269-281.
- 44-Kon V, Yoshioka T, Fogo A, Ichikawa I: Glomerular actions of endothelin in vivo. J Clin Invest 1989; 83, 1762-1767.
- 45-Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC : Mesangial cell glomerular and renal vascular responses to endothelin in the rat kidney. J Clin Invest 1989; 83, 336-342.
- 46-Nambi P: Endothelin receptors in normal and diseased kidneys. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 1996; 23, 326-330.
- 47- Fujitani Y, Unda H, Okada T: A selective agonist of endothelin type reseptor, IRL 1620 stimulates cyclic GMP increase via nitric oxide formation. J Pharm. Exp. Ther 1993; 267, 683-689.
- 48-Qui C, Samsell L, Baylis C: Actions of endogenous endothelin on glomerular hemodynamics in the rat. Am J Physiol 1995; 269, R469-R473.
- 49-David P Brooks: Role of endothelin in renal function and dysfunction; Symposium Experimental Biology 1995. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 1996; 23, 345-348.

- 50-Moore K, Wendon J, Frazer M, Karani J, Williams R, Badr K: Plasma endothelin immunoreactivity in liver disease and the hepatorenal syndrome. *N Eng J Med* 1992; 327, 1774-1778.
- 51-Uchihara M, Izumi N, Sato C, Maruma F: Clinical significance of elevated plasma endothelin concentration in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1992; 16, 95-99.
- 52-Asbert M, Gines A, Gines P, Jimenez W, Claria J, Salo J, Arroyo V, Rivera F, Rodes J: Circulating levels of endothelin in cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 104, 1485-1491.
- 53-Gerbes A.L, Moller S, Gulberg V, Henriksen H: Endothelin-1 and -3 plasma concentrations in patients with cirrhosis: Role of splanchnic and renal passage and liver function. *Hepatology* 1995; 21, 735-739.
- 54-Tsai Y, Lin H, Yang M, Lee F, Hou C.M, Chen L.S, Lee S.D: Plasma endothelin levels in patients with cirrhosis and their relationships to the severity of cirrhosis and renal function. *J Hepatol* 1995; 23, 681-688.
- 55-Salo J, Francitoro A, Follo A, Navasa M, Gines A, Jimenez W, Gines P, Arroyo V, Rivera F, Rodes J: Increased plasma endothelin in cirrhosis. Relationship with systemic endotoxemia and response to changes in effective blood volume. *J Hepatol* 1995; 22 , 389-398.

56-Bernardi M, Gülberg V, Colantoni A, Trevasani F, Gasbarrani A, Gerbes L.A: Plasma endothelin-1 and -3 in cirrhosis: relationship with systemic hemodynamics, renal function and neurohumoral systems. *J Hepatol* 1996; 24, 161-168.

57-Lerman A, Clicl RL, Narr BJ, Wiesner RH, Krom RAF, Textor SC, Burnet JC: Elevation of plasma endothelin associated with systemic hipertension in humans following orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; 51, 646-650.

58-Veglio F, Pinna G, Melchio R, Rabbia F, Panarelli M, Gagliardi B, Chiandussi L: Plasma endothelin level in cirrhotic subjects. *J Hepatol* 1992; 15, 85-87.

59-Pinzanni M, Milani S, Franco R, Grappone C, Caliguri A, Gentillini A, Tosti-Guera C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentillini P: Endothelin-1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110, 534-548.

60-Leivas A, Jimenez W, Lamas S, Bosch-Marse M, Oriola J, Claria J, Arroyo V, Rivera F, Rodes J: Endothelin 1 does not play a major role in the homestasis of arterial

pressure in cirrhotic rats with ascites. Gastroenterology 1995; 108, 1842-1848.

61-Uchida Y: The mechanism of elevated plasma endothelin-1 levels in CCL4 treated rats. Acta Hepatol Jpn 1993; 34, 328-334.

62-Stark ME, Szurszewski HJ: Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. Gastroenterology 1992; 103, 1928-1949.

63-Hartleb M, Moreau R, Cailmail S, Gaudin C, Lebrec D: Vascular hyporeponsives to endothelin-1 in rats with cirrhosis. Gastroenterology 1994; 107, 1085-1093.

64-Moreiras GV, Aperte EA, Rubio M: Carbon tetrachloride-induced hepatic injury is associated with global DNA hypomethylation and homocysteinemia: Effect of S-Adenosylmethionine treatment. Hepatology 1995; 22, 1310-1315.

65-Nakata Y, Iwai M, Kimura S, Shimazu T: Prolonged decrease in hepatic connexin32 in chronic liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. J Hepatol 1996; 25, 529-537.

66-Filep GJ, Fournier A, Filep FA: Effects of the ET_A/ET_B receptor antagonist, bosentan on endothelin-1 induced

myocardial ischemia and oedema in the rat. British Journal of Pharmacology 1995;116, 1745-1750.

67-Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T: Effects of bosentan, an ET_A/ET_B receptor antagonist, on regional haemodynamic responses to endothelins in conscious rats. British Journal of Pharmacology 1994; 112, 823-830.

68-Sugiura M, Inagami T, Kon V: Endotoxin stimulates endothelin release in vivo and in vitro as determined by radioimmunoassay. Biochem Biophys Res Commun 1989; 161: 1220-1227.

69-Kohan D.E: Endothelins: Renal tubular synthesis and actions. Symposium, Experimental Biology 1995. Endothelin receptors: Role in renal function and dysfunction. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 1996; 23, 337-344.

70-Hocher B, Zart R, Diekmann F, Gross P, Distler A, Bauer C: Renal endothelin systems in rats with liver cirrhosis. Journal of Cardiovascular Pharmacology 1995; 26 (Suppl.3), S434-S435.

71-Weitzberg E, Hemsén A, Rudehill A, Modin A, Wanecek M, Lundberg J.M: Bosentan improved cardiopulmonary vascular performance and increased plasma levels of endothelin-1 in

porchine endotoxin shock. British J Pharmacology 1996; 118, 617-626.

72-Tajiri K, Miyakawa H, Izumi N, Marumo F, Sato C: Systemic hypotension and diuresis by L-Arginine in cirrhotic patients with ascites: Role of nitric oxide. Hepatology 1995; 1430-1435.

73-Vallance P, Moncada S: Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? Lancet 1991; 337: 776-778.

74-Campillo B, Bories N.P, Benvenuti C, Dupeyron C: Serum and urinary nitrate levels in liver cirrhosis: endotoxemia, renal function and hyperdynamic circulation. J Hepatol 1996; 24, 707-714.

75-Hirata Y, Emori T, Kanno K, Imai T, Ohta K, Maruma F: Endothelin-1 receptor subtype mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. J clin Invest 1993; 91, 1367-1371.

76-Angeli P, Jimenez W, Arroyo V, Mackenzie H.S, Zhang P.L, Claria J, Rivera F, Brenner M.B, Rodes J: Renal effects of natriuretic peptide receptor blockade in cirrhotic rats with ascites. Hepatology 1994; 20, 948-954.

77-Poulos J.E, Gower W.R, Fontanet H.L, Kalmus G.W, Vesely D.L: Cirrhosis with ascites: Increased atrial natriuretic

peptide mesenger RNA expression in rat ventricle.

Gastroenterology 1995; 108, 1496-1503.

78-Trevisani F, Colantoni A, Gerbes L.A, Gülberg V, Sica G, Caraceni P, De Notaris S, Morselli-Labate M.A, Ligabue A, Gasbarrini G, Bernardi M: Daily profile of endothelin-1 and -3 in pre-ascitic cirrhosis: relationship with arterial pressure and renal function. J Hepatol 1997; 26, 808-815.



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMAN TABLOSU