



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

DEĞİŞİK KALSİYUM KONSANTRASYONU OLAN PERİTON DİYALİZ SOLÜSYONLARININ U937 MONOSİTİK HÜCRE DİZİSİ ÜZERİNE OLAN APOPTOTİK ETKİSİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uz.Dr. H. Asuman YAVUZ

Tez Danışmanı : Prof.Dr. F. Fevzi ERSOY

(Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir)

ANTALYA, 2005

TEŞEKKÜR

Gerek bu tezin hazırlanışı sırasındaki katkı ve yardımları, gerekse uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve yol göstericiliği ile yetişmemde emeği olan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. F. Fevzi Ersoy'a,

Engin bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her konuda sürekli desteğini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Gülşen Yakupoğlu'na teşekkürü borç bilirim.

Dr. H. Asuman YAVUZ
Antalya, 2005

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGELER KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
1-GİRİŞ	1 - 2
2-GENEL BİLGİLER	3 - 7
2.1-Periton membranı ve diyaliz	3
2.2-Peritoneal kalınlaşma	3
2.3-Apoptozis	4
2.4-Apoptozis ölçümü	5
2.5-Kalsiyum ve apoptozis	6
2.6-Böbrek hastalıklarında apoptozis	6
2.7-Periton diyalizinde apoptozis	7
3-AMAÇ	8
4-MATERYAL VE METOD	9
4.1-U937 Hücre Kültürü	9
4.2-Apoptozis Ölçümü	9
4.3-İstatistiksel Analiz	9
5-SONUÇLAR	10 - 14
6-TARTIŞMA	15 - 17
7-ÖZET	18
8-KAYNAKLAR	19 - 25

KISALTMALAR DİZİNİ

SAPD	Sürekli ayaktan periton diyalizi
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
PDS	Periton diyaliz solüsyonu

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 5.1: Değişik Ca^{+2} konsantrasyonuna sahip PD solüsyonlarının apoptozis oranları

Çizelge 5.2: Değişik periton diyaliz solüsyonu Ca^{+2} ve saatlere göre apoptozis p değerleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 5.1: Periton diyaliz solüsyonu Ca^{+2} 1.000 mmol/L U937 monositik hücre apoptozis düzeyi

Şekil 5.2: Periton diyaliz solüsyonu Ca^{+2} 1.250 mmol/L U937 monositik hücre apoptozis düzeyi

Şekil 5.3: Periton diyaliz solüsyonu Ca^{+2} 1.500 mmol/L U937 monositik hücre apoptozis düzeyi

Şekil 5.4: Periton diyaliz solüsyonu Ca^{+2} 1.750 mmol/L U937 monositik hücre apoptozis düzeyi

Şekil 5.5: Kontrol grubu apoptozis düzeyi

1-GİRİŞ

Hiperfosfatemi son dönem böbrek yetmezliği nedeniyle diyaliz tedavisi uygulanan hastalar için sık karşılaşılan bir problemdir (1). Daha önce sıklıkla kullanılan alüminyum içeren fosfor bağlayıcıların yerini kalsiyum içeren fosfor bağlayıcılar almıştır. Çünkü alüminyum içeren fosfor bağlayıcıları osteomalazi, diyaliz ensefalopatisi, Alzheimer hastalığı, nörotoksisite, infeksiyonlara yatkınlık ve alüminyum ilişkili anemiye neden olabilmektedir (2-4). Diğer yandan, kalsiyum tuzları ile sık karşılaşılan sorun, hiperkalsemi ve metastatik kalsifikasyon riskinde olan artıştır (5-8). Bu nedenle periton diyalizi hastalarında periton diyaliz solüsyonlarının kalsiyum konsantrasyonunun azaltılması daha avantajlı düşünülmektedir (9-11). Düşük kalsiyumlu periton diyaliz solüsyonlarında bulunan kalsiyum miktarı 1.000 veya 1.250 mmol/L dir. Bunlar serum iyonize kalsiyum düzeyine yakın değerlerdir. Bu solüsyonların ana avantajı hiperkalsemi riskini azaltmaları (12,13) ve daha yüksek dozda kalsiyum içeren fosfor bağlayıcı kullanılmasına olanak vermeleridir.

Sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) güvenli ve yaygın kullanım alanı olan renal replasman tedavi metodudur ve hastaları hemodiyaliz merkezlerine devamlı bağımlılıktan kurtarmaktadır (14). Periton diyaliz pratiğinde iki temel sorun bulunmaktadır: peritonit ve halihazırda uygulanan periton diyaliz solüsyonlarının biyouyumlu olmaması (15).

Bu faktörlerin ikisi de periton membranının uzun süreli bir diyaliz membranı olarak kullanılmasını engelleyen peritoneal fibrozdan sorumludur. Peritoneal fibroz veya peritoneal yapısal değişiklikler ile apoptozis birlikteliği konusunda henüz bir bilgi yoktur. Bu nedenlerle araştırmalar peritonit sıklığının azaltılması ve daha uyumlu periton diyaliz solüsyonlarının üretilmesi konusunda yoğunlaşmıştır (15-18).

Periton boşluğunda bulunan lokal konakçı savunma mekanizmaları peritoneal infeksiyon gelişimini önlemek için önemli bir rol oynamaktadır (14). Sağlıklı bireylerde, normal periton sistemi bakteriyel bulaşım üstesinden peritonit olmadan gelebilmektedir (örneğin cerrahi işlem sırasında), periton diyaliz hastaları ise bunun tam tersi olarak en ufak kontaminasyonla peritonit olabilmektedir (19). Periton diyalizi solüsyonlarının monositlerin savunma mekanizmaları üzerine olan negatif etkileri bilinmektedir (20-22).

Hemopoetik hücreler vücuttaki diğer hücreler gibi nekroz veya apoptozis ile ölmektedir. Nekroz bir hasar sonrası ortaya çıkan ölüm şeklidir, ancak apoptozis ise hücrelerin bir çeşit intihar etmesidir (23). Apoptozis normal doku homeostazının bir parçasıdır, ancak fizyolojik oranlarının dışına çıkınca hastalıklara neden olabilmektedir (24,25). Apoptozis kromatin yoğunlaşması, hücre zarının bölünmesi, nüklear ve sitoplazmik yoğunlaşma, inflamatuvar yanıt olmadan da endojen endonükleaz üretimi sonucu DNA parçalarının ortaya çıkması ile karakterizedir. Bu nekrozdan farklıdır. Hücre nekrozunda lokal inflamatuvar yanıt sonucu aktif hale geçen hücre lizisi vardır (26). Periton diyaliz solüsyonunda bulunan çeşitli faktörler örneğin kalsiyum, magnezyum, dekstroza konsantrasyonları, pH, osmolalite mezotel hücre apoptozisine neden olmaktadır (27). Mezotel hücre apoptozisi ve diyalizat kalsiyumu ile yapılan *in vivo* bir çalışmada düşük kalsiyumlu diyalizatta (1,250 µmol/L) apoptozis oranının yüksek kalsiyumlu diyalizata (1,750 µmol/L) göre daha az olduğu bulunmuştur (28). Ayrıca diyalizat kalsiyumunun arttırılması ile periton hücrelerinde sitoplazmik kalsiyum oranlarının arttığı gösterilmiştir (28). Hücre içi kalsiyumu hücre hasarı ve hücre ölümünde önemli bir rol oynamaktadır (29). Hücre içi kalsiyumunda olan artış nüklear endonükleaz aktivasyonuna ve ayrıca apoptozis ilişkili genlerin örneğin *c-fos*, *c-jun*, ve *c-myc* aktivasyonuna neden olmaktadır (29). Kalsiyum bağımlı endonükleazın apoptoziste etkili olduğu kalsiyum şelasyonu yapıldıktan sonra apoptozisin azalması ile kanıtlanmıştır (30).

Dünyada ilk kez yapılan bu çalışma ile diyalizat kalsiyumunun peritonit gelişimine karşı konakçı ana savunma hücrelerinden olan monosit hücre apoptozisine olan etkisinin olup olmadığı U937 monosit hücre kültüründe araştırılacaktır.

2-GENEL BİLGİLER

2.1-Periton membranı ve diyaliz

Periton membranı semipermeabl bir membrandır. Periton membranında bazal lamina üzerine yerleşmiş tek katlı mezotel hücreleri bulunur. Bunların altında kompakt bir tabaka vardır. Bu tabakanın dış yüzünde membrana elastisitesini veren elastin lifleri bulunur. Kompakt tabakanın içinde konnektif doku stroması içine gömülmüş çok sayıda kollajen lifi bulunur. Bu alandaki intertisyumun büyük oranda glikoprotein ve proteoglikanlardan oluştuğu, fibroblastlar, mast hücreleri ve lenfatikleri içerdiği görülmüştür. Kompakt tabakanın altında kılcal damarlar bulunur (31).

Diyaliz sisteminin esası su ve solütlerin periton membranındaki kılcal damarlar ve periton boşluğundaki diyaliz sıvısı arasındaki geçişi prensibine dayanır (15). Diyaliz genellikle 2 litrelik diyalizatların periton boşluğuna günde 4 kez verilmesi ile yapılır. Batın içindeki kateterin sürekli bir irritasyona yol açması ve günde dört kez değiştirilen diyalizatın bakteriyel ve/veya fungal kontaminasyona yol açması peritonda değişik derecelerde enflamatuvar yanıtı yol açabilir. Bu nedenle diyaliz yapılanlarda, zaman içinde periton membranında yapısal ve fonksiyonel değişiklikler gelişmesi sürpriz olmayacaktır.

2.2-Peritoneal kalınlaşma

Henüz geniş çaplı ve uzun süreli araştırmalarla kanıtlanmamış olsa da tekrarlayıcı peritonit ataklarının (16,17) ve yüksek konsantrasyonlu glukoz ile yapılan diyalizin (18) periton membranında yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir. Diyaliz yapılan hastalarda zaman içinde iki temel yapısal değişiklik görülür:

1. Artmış kollajen depolanmasına bağlı submezotelyal kompakt alandaki belirgin kalınlaşma (32). Bu olay sıklıkla yüzeydeki mezotel hücrelerinin kaybı ile birlikte görülür.
2. Tıpkı diyabetik mikroanjyopatide görüldüğü şekilde submezotelyal intertisyumdaki kan damarlarının sayıca artışı ve yapısal (düz kas hipertrofisi, subendotelyal kalınlaşma ve kollajen birikimi) değişiklikleri (33).

Peritonit ataklarının küçük solüt transportunu artırıp, ultrafiltrasyonu azalttığı bilinmekle birlikte, ciddi peritonit öyküsü olmayan hastalarda da zamanla ultrafiltrasyon kaybı görülmesi periton membranının yapısal ve fonksiyonel değişikliklerinde uzun süreli periton diyaliz sıvısına maruz kalma gibi diğer faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmüştür. Henüz klinikte uygulanan hiçbir periton diyaliz solüsyonu biyouyumlu değildir ve hücre

fonksiyonlarında değişikliklere neden olur (34). Piyasadaki SAPD solüsyonları Na^{+2} (132-134 mmol/L), Ca^{+2} (1.250-1.750 mmol/L), Mg^{+2} (0.25-0.75 mmol/L), Cl^- (95-106 mmol/L), laktat (35-40 mmol/L) ve glukoz % 1.5, % 2.5 ve % 4.25 içermektedir. Özellikle ısı sterilizasyonu sırasında glukozun karamelizasyonunu engellemek için pH'nın düşük tutulması (5.2-5.5), tamponlama için laktat (40 mM) kullanımı, ultrafiltrasyon için gerekli ozmotik gradienti sağlamak amacıyla glukoz (75-214 nM) ve buna bağlı hiperozmolarite (350-500 mOsm/kg) insan vücudu için fizyolojik konsantrasyonların dışındadır. Bir hasta bu fizyolojik olmayan periton diyaliz solüsyonundan ortalama yılda 3000 L kadar kullanmaktadır.

Sonuç olarak iki faktör periton membranına zarar verir görünmektedir: enflamasyon ve diyalizat.

Enflamasyonun engellenmesi için peritonit gelişiminin önlenmesi ve bu bağlamda Y-set kullanımı ve çıkış yerine düzenli aralıklarla mupirocin uygulanımı yararlı gözükmemektedir.

Periton diyalizi ile vücuttan sıvı çekilmesi temel olarak diyalizatın tonisitesine bağlıdır (35). Tonisite ne kadar yüksek ise ultrafiltrasyonda o kadar yüksek olacaktır. Glukoz piyasada mevcut diyaliz solüsyonlarında en sık kullanılan ozmotik ajandır (36). Diyalizattaki temel zararlı madde glukoz ve/veya bunun yıkım ürünleridir. Bunların zararlı etkilerini bertaraf etmek için 3.86% diyalizatın daha az kullanımı, icodextrin kullanımı, amino asitli diyalizat, nötral periton diyaliz sıvıları kullanımı tedavi seçenekleridir.

Günlük periton diyalizi pratiğinde kullanılan diyaliz solüsyonları yukarıdaki dezavantajının yanı sıra fizyolojiye uygun olmayan düşük pH, yüksek ozmolalite ve kalsiyum düzeyleri ihtiva ederler (37). Mezotel hücre apoptozisi ve diyalizat kalsiyumu ile yapılan *in vivo* bir çalışmada düşük kalsiyumlu diyalizatta (1.250 mmol/L) apoptozis oranının yüksek kalsiyumlu diyalizatta (1.750 mmol/L) görülen apoptozis oranına göre daha az olduğu gösterilmiştir(29). Ayrıca diyalizat kalsiyumunun arttırılması ile periton hücrelerinde sitoplazmik kalsiyum oranlarının arttığı gösterilmiştir. Hücre içi kalsiyumu hücre hasarı ve hücre ölümünde önemli bir rol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyumunda olan artış nükleer endonükleaz aktivasyonuna ve ayrıca apoptozis ilişkili genlerin örneğın *c-fos*, *c-jun*, ve *c-myc* aktivasyonuna neden olmaktadır. Kalsiyum bağımlı endonükleazın apoptoziste etkili olduğu kalsiyum şelasyonu yapıldıktan sonra apoptozisin azalması ile kanıtlanmıştır(30).

2.3-Apoptozis

Latince "yaprak dökümü" anlamına gelen apoptozis, fizyolojik veya programlanmış hücre ölümü olarak kabul edilmektedir. Nekrozla birlikte hücre ölümüne yol açan iki mekanizmadan biri olan apoptozis organizmada fizyolojik koşullarda pek çok sistemin

homeostazını sağlayan önemli bir mekanizmadır. Hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri programlı, aktif RNA-protein sentezine ve enerjiye gereksinim gösteren bu fizyolojik ölüm formu ekstraselüler çevreden etkilenen bir biyokimyasal ve genetik olaylar dizisi olarak tanımlanabilir ve patolojik bir hücre ölümü olan nekrozdan tamamen farklıdır (23). Apoptozisin böbrekleri de içine alan bir çok hastalıkta artmasının veya azalmasının patolojik bir rolü olabilir (38). Apoptotik işlemde asparate proteaz enzim ailesi içinde yer alan kaspazlar (caspase) önemli bir rol oynamaktadır. Birbirinden bağımsız iki kaspaz aktivasyon yolu, reseptör aracılı kaspaz 8 ve mitokondri-sitokrom c aracılı kaspaz 9 aktivasyonu sonuçta birleşerek anahtar madde kırılmasına ve apoptozise neden olurlar.

Apoptozis erken evrede kromatin ağının yoğunlaşması ve marginasyonu, sitoplazmanın kondensasyonu ve nükleer parçalanma ile kendini gösterir ve DNA'nın parçalanması ile karakterize olur (25). Bu da hücre iskelet yapısının bozulmasına, hücrenin büzüşmesine ve apoptotik cisimciklerin oluşmasına neden olur. Apoptoziste görülen morfolojik değişiklikler, plazma membran bütünlüğünün bozulması, nükleer DNA'nın kırılması apoptotik hücre ölümünün çeşitli mekanizmalarla tanınmasına imkan vermektedir.

2.4-Apoptozis ölçümü

Akış sitometrisi ve lazer tarama sitometrisi kültür ortamlarında ve klinik örneklerde (örn. solid tümörler, kemik iliği aspirasyon materyali, periferik kan..vs) hızlı ve kesin apoptozis ölçümü sağlamaktadır (63). Elektron mikroskopisi hücre ölüm tipini belirlemek amacına yönelik en kesin verileri sağlayan metoddur. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) yöntemi de klinikte apoptozisi saptamak amacıyla kullanılan en sık yöntemlerden birisidir. Bu yöntem ile apoptotik DNA'nın yanı sıra nekrozun geç dönemlerinde oluşan parçalanmış DNA'da saptanabileceğinden TUNEL yönteminin klasik hematoxylin ve eosin boyası gibi nükleer morfolojinin birlikte değerlendirilebileceği başka bir yöntemle kombine edilmesi gerekmektedir (39). Diğer metodlar apoptozis sonucu hücre membranında olan yapısal ve fonksiyonel değişikliklerden yararlanmaktadır. Apoptotik olmayan hücrelerde membran fosfolipidleri asimetric olarak yerleşmişlerdir. Fosfotidil serin (FS) daha çok membranın iç yüzeyinde lokalizedir. Apoptozis sırasında FS yer değiştirir ve membranın dış yüzeyinde yer alır. Anneksin V, Ca bağımlı antikoagulan protein, negatif yüklü FS için yüksek afinitesi vardır, ve flurokrom ile konjuge edildiğinde apoptotik hücreyi belirtir (DNA boyanması için propidium iyod (PI) ile kombinasyonu gereklidir). Apoptotik olmayan hücreler Anneksin V ve PI negatiftirler (kırmızı ve yeşil floresan negatif) , erken apoptotik hücreler Anneksin V ve

PI pozitifler. Geç apoptotik hücreler ise yüksek oranda PI (sadece kırmızı floresan renk) pozitifler(63).

Dokudaki hücre sayısı, mitozla hücrenin bölünme hızı ile apoptoz ile hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır (40). Apoptozis hızındaki değişiklikler hücrelerin birikimine veya kaybına yol açabilir.

2.5-Kalsiyum ve apoptozis

Hücre içi kalsiyum düzeyi ($[Ca^{+2}]_i$) hücre hasarında ve hücre ölümünde önemli bir rol oynamaktadır. $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi hücre hasarından hemen sonra veya hücre ölümünden önce saniyeler veya dakikalar içinde artmaktadır(29). Bu dönemde çeşitli sinyal mekanizmaları $[Ca^{+2}]_i$ tarafından aktif hale getirilmektedir. Bunlar fosfolipazlar, endonükleazlar, proteazlar ve kinazlardır. $[Ca^{+2}]_i$ artışı ve bununla ilişkili erken gen ekspresyonu dikkat çekmektedir. Bu gen ürünleri gerçekte diğer genlerin transkripsiyonunda rol almaktadır. Bu genlerden bazıları örn. *c-fos* $[Ca^{+2}]_i$ bağımlı kinazlar tarafından aktif hale getirilmektedir. Diğerleri örn. *p-53* ise $[Ca^{+2}]_i$ bağımlı endonükleazlarla oluşturulan DNA kırıkları ile aktif hale getirilmektedir. Sonuçta $[Ca^{+2}]_i$ değişiklikleri hasar veya apoptozis nedeni ile gerçekleşen hücre ölümünde ana rol oynamaktadır.

Normal şartlarda $[Ca^{+2}]_i$ düzeyi 100 nM 'dur ve plazmalemma, mitokondri, ve endoplazmik retikulum arasında bulunan transport sistemleri ile kontrol edilmektedir(29).

2.6-Böbrek hastalıklarında apoptozis

Böbrek hastalıklarında apoptozis ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Apoptozis deneysel hidronefroz modelinde hücre kaybına neden olarak tübüler atrofi ve renal iskemi ve sonrasında reperfüzyon hasarında tübül harabiyetinden sorumlu tutulmuştur (41). Baker (42) ve Shimizu (43) apoptozisin glomerulonefritteki glomerular hipersellüleritenin rezolüsyonundaki temel mekanizma olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu yazarlar ayrıca apoptozisin aşırı çoğalmış mezangial hücrelerin temizlenmesinde de rol aldığını belirtmişlerdir. Bu olumlu etkilerinin yanı sıra apoptozisin deneysel IgA nefropatisi ve lupus nefriti hayvan modellerinde progresif glomeruler skleroz sırasında glomerul kaybına yol açan patolojik mekanizmalardan biri olduğunun gösterilmesi zararlı etkilerini de kanıtlamaktadır (44). Normal ekstraselüler mezangial matriksin mezangial hücreleri korurken mezangial matriksteki artışın integrinler vasıtası ile mezangial hücrelerin kaybını ve apoptozisini doğurduğu gösterilmiştir (44).

Yüksek seviyelerde glukozun vasküler endotel hücrelerinde DNA parçalanmasını artırdığı gösterilmiştir. Ratlarda yüksek seviyede glukoz verilimi sonrası proksimal tübül hücrelerinde DNA parçalanması gözlenmiştir (45). Ortiz db/db farelerde non-diabetik kontrollere oranla tubulointerstisyel bölgede önemli ölçüde apoptozis artışı olduğunu göstermiştir (46). İlerlemiş glikasyon son ürünleri de ekstraselüler matriks proteinlerinin organizasyonunu bozarak diabetik nefropatinin ilerlemesinde rol alabilir (47). Platelet-derived growth factor-B ve TGF- β , mezangial proliferasyonu ve mezangial matriks ekspansiyonunu artırıcı pro-apoptotik faktörler olarak görülmektedir (48). Periton fibrozisinde de yukarıda sayılan faktörlerin submezotelyal alanda birikimi dikkat çekicidir.

2.7-Periton diyalizinde apoptozis

Literatürde periton diyalizinde apoptozis ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Prediyalitik üremik, hemodiyaliz, SAPD ve normal kontrollerin mononükleer hücre apoptozisi yönünden karşılaştırıldığı bir çalışmada apoptozis oranı şu şekilde sıralanmıştır:

Hemodiyaliz>SAPD>prediyalitik üremik hastalar>normal kontroller (49).

Kimi araştırmacılar periton diyaliz solüsyonlarının monosit apoptozisi üzerine herhangi bir etkisi olmadığını öne sürerken (50), kimileri de özellikle glukoz bazlı diyaliz solüsyonlarının periferik kanda fagosit apoptozisini artırdığını belirtmişlerdir (51). Bir çalışmada glukozdan bağımsız olarak yüksek ozmolalitenin yüksek oranda polimorf nüveli hücrelerin apoptozisinden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (52). Mezotel hücrelerindeki apoptozisin araştırıldığı tek çalışmada ise mezotel hücre kültürlerinde düşük kalsiyumlu diyalizatın apoptozisi daha az uyardığı, diğer solüsyon tipleri arasında ise apoptozis oranı yönünden bir fark olmadığı ileri sürülmüştür (53).

Periton membranı transportu, lokal savunma mekanizmalarının etkileri, yeni ozmotik ajanların biouyumlulukları ve yan etkileri gibi konular in vitro modellerde değerlendirilemeyeceğinden, periton diyalizinin bazı konularının uygun hayvan modelleri geliştirilerek araştırılması önem arz etmektedir.

3-AMAÇ

Bu çalışma, kronik böbrek yetmezliği ve sabit glukoz bazlı periton diyaliz solüsyonlarının değişik kalsiyum konsantrasyonlarının U937 monositik hücre hücre apoptozisine olan etkilerini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

4-MATERYAL VE METOD

4.1-U937 Hücre Kültürü

U937 histiositik lenfomadan oluşan monositik hücre dizisidir (54). U937 hücreleri, RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich), %10 inek fetusu serumu (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamin (Seromed, Biochrom KG, Berlin, Almanya), 100 IU/mL penisilin (Seromed, Biochrom KG), 100 mg/mL streptomisin (Seromed, Biochrom KG) ile kültür ortamında üretilmektedir. Kontrollü %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde saklanmaktadır. Hücre canlılığı %99'dur ve tripan mavisi ile değerlendirilmektedir.

U937 hücreleri 1 mL RPMI solüsyonu ve 1 mL 1,000 µmol/L Ca⁺² içeren periton diyaliz solüsyonuna (Fresenius Medical Care) 1.250, 1.500 ve 1.750 mmol/L Ca⁺² periton diyaliz solüsyonu Ca⁺² konsantrasyonlarına ulaşacak şekilde % 0.9 Ca⁺² (10 ml flakon) eklenerek elde edilen solüsyonların her biri ile farklı inkübe edildi. Kontrol grubu ise sadece 2 mL RPMI solüsyonu ile inkübe edildi. Apoptozis değerlendirmesi aşağıda tanımlanan metodlar kullanılarak 1.saat, 5.saat, 24.saat, 48.saat, 72. saat ve 96.saatlerde yapıldı. Her deney 8 defa tekrar edildi.

4.2-Apoptozis Ölçümü

Her hücrede apoptozis sonucu oluşan DNA parçacıkları, DNA'ya özel Hoechst 33342 (0.5 µg/ml, molecular probes) boyası ile boyandıktan sonra floresan mikroskopunda tesadüfen seçilmiş en az 10 sahada toplam 300 hücre sayıldı ve bu hücrelere oranı yüzde cinsinden hesaplanarak değerlendirildi. Ayrıca U-937 hücreleri 5 µl FITC-Anneksin V (FITC-Annexin V kit, Immunotech, Beckman-Coulter) eklenip, 10 dakikalık inkübasyon sonrasında EPIC XL akış-sitometri analiz cihazı ile değerlendirildi. İşlem sırasında apoptozis nedeniyle oluşan DNA parçacıklarının boyanması için propidyum iyot kullanıldı. Apoptotik olmayan hücreler Anneksin V ve propidyum iyot negatif, apoptozisin erken döneminde olan hücreler Anneksin V pozitif ancak propidyum iyot negatif, geç apoptotik hücrelerde ise hem Anneksin V hem de propidyum iyot negatif olarak gözlemlendi.

4.3-İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS sürüm 10.1 programı kullanılarak yapıldı. Sürekli değişkenler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde ifade edildi. İstatistiki analizlerde paired Student's t-testi kullanıldı.

5-SONUÇLAR

Sonuçlarımıza göre ilk 24 saatte apoptozis oranları hem kontrol grubunda hem de değişik kalsiyum miktarları içeren PD solüsyonları benzer olarak artış göstermektedir ve gruplar arası istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamaktadır. İlginç olarak, 24 saatten 96 saate kadar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında apoptozis oranında PD solüsyonları grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış olmaktadır ($p<0.03$) (Çizelge 5.1) .

Çizelge 5.1: Değişik Ca^{2+} konsantrasyonuna sahip PD solüsyonlarında apoptozis oranları

Ca^{2+} (mmol/L)	1 saat	5 saat	24 saat	48 saat	72 saat	96 saat
1.0	2%	5%	6%	14%	22%	32%
1.25	1%	5%	6%	15%	22%	29%
1.5	2%	5%	7%	15%	27%	34%
1.75	1%	4%	6%	14%	22%	30%
Kontrol	1%	4%	5%	7%	11%	12%

Daha da fazlası, 72 saatten sonra 1,500 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{+2} içeren grubun apoptozis oranı 1.000, 1.250, 1.750 mmol/L Ca^{+2} içeren grupların apoptozis oranlarına göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Çizelge 5.2). Diğer periton diyaliz solüsyonları gruplarının apoptozis oranları arasında fark yoktur ($p>0.05$) (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2:Değişik periton diyaliz solüsyonu (PDS) [Ca⁺²] (mmol/L) ve saatlere göre apoptozis *p* değerleri (*p*<0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir)

	1.0 1	1.0 5	1.0 24	1.0 48	1.0 72	1.0 96	1.25 1	1.25 5	1.25 24	1.25 48	1.25 72	1.25 96	1.5 1	1.5 5	1.5 24	1.5 48	1.5 72	1.5 96	1.75 1	1.75 5	1.75 24	1.75 48	1.75 72	1.75 96
1.25/1	0.351	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000																		
1.25/5	0.001	0.763	0.017	0.000	0.000	0.012																		
1.25/24	0.000	0.040	0.275	0.000	0.000	0.029																		
1.25/48	0.000	0.000	0.000	0.133	0.006	0.233																		
1.25/72	0.000	0.000	0.000	0.000	0.326	0.930																		
1.25/96	0.005	0.010	0.310	0.180	0.875	0.861																		
1.5/1	1.000	0.001	0.001	0.000	0.000	0.005	0.351	0.001	0.000	0.000	0.000	0.005												
1.5/5	0.000	0.844	0.170	0.000	0.000	0.015	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.015												
1.5/24	0.000	0.014	0.504	0.001	0.000	0.039	0.000	0.190	0.111	0.000	0.000	0.038												
1.5/48	0.000	0.000	0.000	0.160	0.089	0.345	0.000	0.000	0.000	0.374	0.039	0.373												
1.5/72	0.000	0.000	0.000	0.000	0.038	0.349	0.000	0.000	0.000	0.001	0.092	0.313												
1.5/96	0.004	0.007	0.019	0.088	0.415	0.050	0.003	0.008	0.018	0.108	0.553	0.052												
1.75/1	0.351	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005		0.000	0.000	0.000	0.005	0.005	0.351	0.000	0.000	0.000	0.000	0.030						
1.75/5	0.000	1.000	0.068	0.001	0.000	0.013	0.000	0.862	0.069	0.000	0.000	0.013	0.000	0.815	0.024	0.000	0.000	0.080						
1.75/24	0.000	0.054	0.654	0.003	0.001	0.023	0.000	0.052	1.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.017	0.380	0.000	0.000	0.013						
1.75/48	0.000	0.000	0.001	0.531	0.025	0.162	0.000	0.000	0.000	0.577	0.007	0.176	0.000	0.000	0.001	0.267	0.000	0.066						
1.75/72	0.000	0.000	0.000	0.000	0.200	0.925	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.869	0.000	0.000	0.000	0.004	0.033	0.538						
1.75/96	0.004	0.009	0.029	0.166	0.787	0.853	0.004	0.011	0.026	0.200	0.983	0.785	0.004	0.014	0.034	0.288	0.404	0.096						
K/1	0.351	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005		0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.351	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003		0.000	0.000	0.000	0.000	0.004
K/5	0.001	0.111	0.001	0.000	0.000	0.011	0.000	0.050	0.001	0.000	0.000	0.011	0.001	0.104	0.001	0.000	0.000	0.007	0.000	0.262	0.004	0.000	0.000	0.009
K/24	0.000	0.871	0.015	0.000	0.000	0.017	0.000	1.000	0.002	0.000	0.000	0.019	0.000	1.000	0.003	0.000	0.000	0.011	0.000	0.862	0.013	0.000	0.000	0.015
K/48	0.000	0.002	0.732	0.000	0.000	0.018	0.000	0.002	0.749	0.000	0.000	0.019	0.000	0.033	0.521	0.001	0.000	0.012	0.000	0.053	0.794	0.000	0.000	0.017
K/72	0.000	0.000	0.010	0.128	0.003	0.058	0.000	0.000	0.002	0.010	0.001	0.064	0.000	0.000	0.013	0.010	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.049
K/96	0.003	0.041	0.406	0.200	0.011	0.010	0.003	0.052	0.304	0.049	0.020	0.110	0.030	0.072	0.485	0.041	0.000	0.005	0.030	0.040	0.200	0.014	0.001	0.007

K:Kontrol

1.0:PDS Ca⁺² 1.000 mmol/L

1.25:PDS Ca⁺² 1.250 mmol/L

1.5:PDS Ca⁺² 1.500 mmol/L

1.75:PDS Ca⁺² 1.750 mmol/L

1:1.saat

5:5.saat

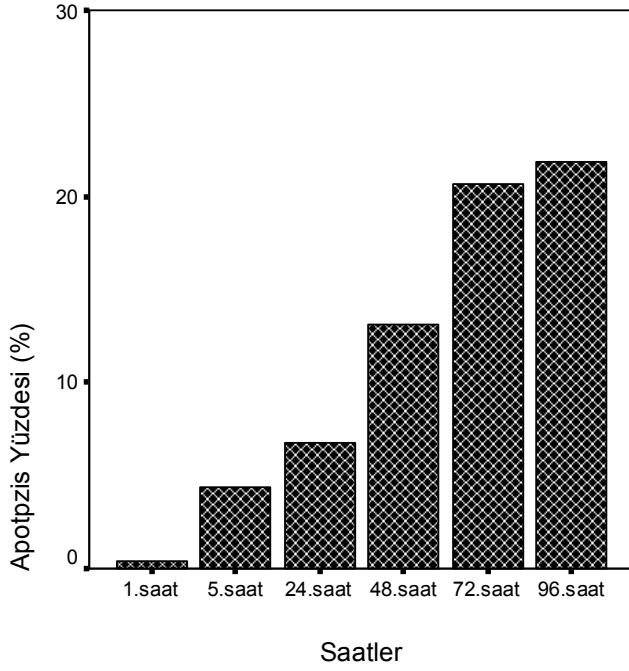
24:24.saat

48:48.saat

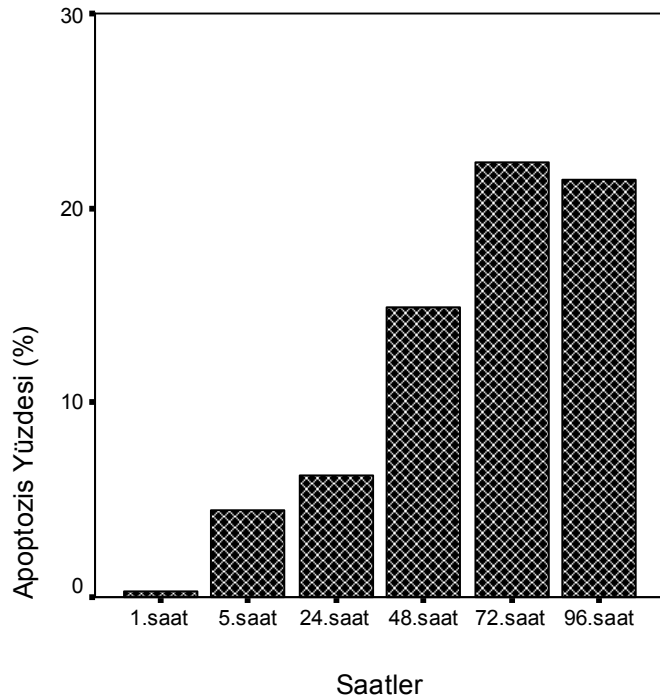
72:72.saat

96:96.saat

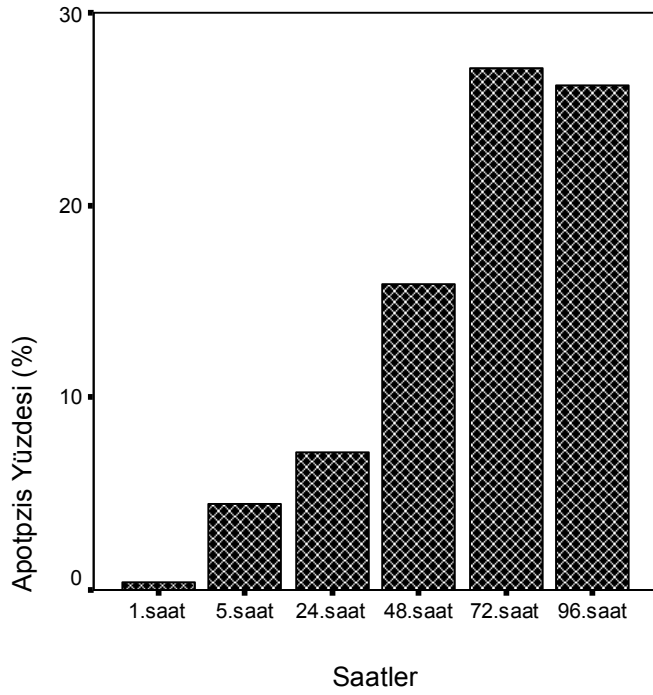
Aşağıdaki grafiklerde her bir periton diyaliz solüsyonu ile inkübe edilmiş U937 monositik hücrelerin apoptozis oranları görülmektedir (Şekil 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5).



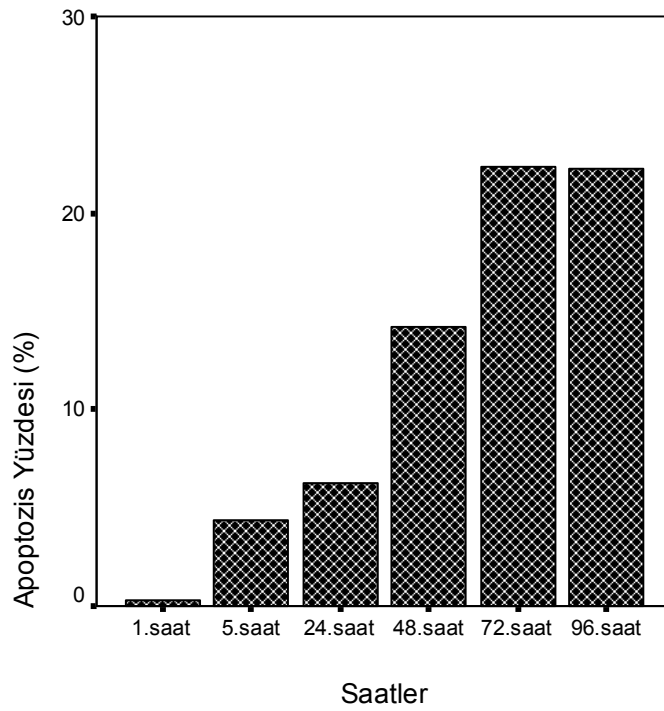
Şekil 5.1: Periton diyaliz solüsyonu Ca^{+2} 1.000 mmol/L U937 monositik hücre apoptozis düzeyi



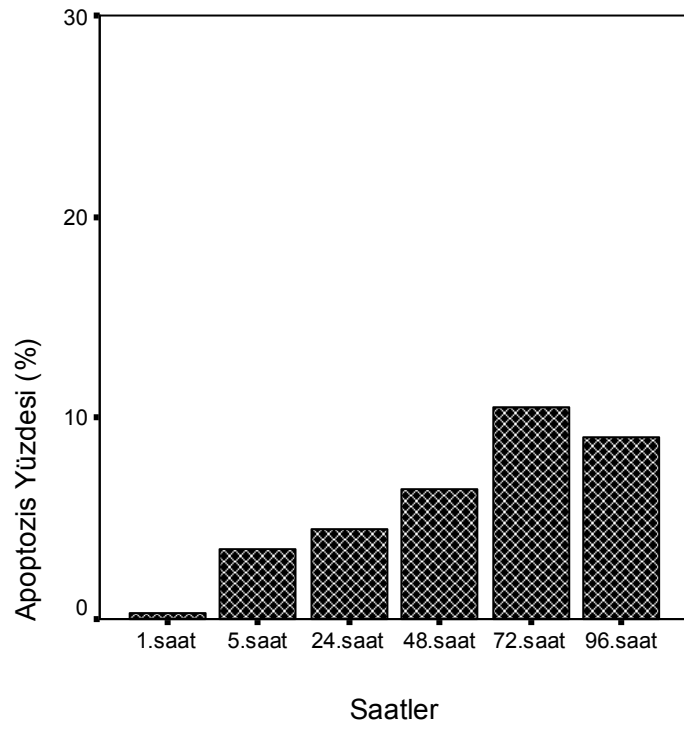
Şekil 5.2: Periton Diyaliz Solüsyonu Ca^{+2} 1.250 mmol/L U937 Monositik Hücre Apoptozis düzeyi



Şekil 5.3: Periton Diyaliz Solüsyonu Ca^{+2} 1.500 mmol/L U937 Monositik Hücre Apoptosis düzeyi.



Şekil 5.4: Periton Diyaliz Solüsyonu Ca^{+2} 1.750 mmol/L U937 Monositik Hücre Apoptosis düzeyi.



Şekil 5.5: Kontrol grubu apoptozis düzeyi

6-TARTIŞMA

Periton boşluğu eski mısırlılar tarafından 3000 BC’de tanımlanmasına rağmen, periton diyalizi oldukça yeni bir konudur. Alman araştırmacı Wegner tarafından 19. yüzyılın son dönemlerinde periton solüsyonları hayvanlarda kullanılmış ve hipertonic solüsyon verildiği zaman periton kavitesindeki volümün arttığı gözlenmiştir (<http://www.uptodate.com>). SAPD 1978’de Moncrief, Nolph ve Popovich tarafından tanımlanmış ve tüm dünyada sık kullanılan intrakorporeal diyaliz yöntemi haline gelmiştir (55). SAPD hastaların hemodiyaliz merkezlerine devamlı bağlılığını engelleyerek belirli bir özgürlük sağlayan ve tercih edilme sıklığı artan bir renal replasman tedavi şeklidir. Türk Nefroloji Derneğinin kayıtlarına göre 2003 yılı sonu göz önüne alındığında toplam 52 merkezde 1374 hastada, diğer bir deyişle tüm diyaliz popülasyonunun %10’unda periton diyaliz tedavisi uygulanmaktadır (56). Kısa dönem sonuçları gözönüne alındığında (3-5 yıl) hasta sağkalımı hemodiyaliz ile benzerdir (15,57).

Periton diyaliz pratiğinde iki temel sorun bulunmaktadır: peritonit ve halihazırda uygulanan periton diyaliz solüsyonlarının biyouyumlu olmaması (15).

Bu faktörlerin ikisi de periton membranının uzun süreli bir diyaliz membranı olarak kullanılmasını engelleyen peritoneal fibrozdan sorumludur. Peritoneal fibroz veya peritoneal yapısal değişiklikler ile apoptozis birlikteliği konusunda henüz bir bilgi yoktur. Bu nedenlerle araştırmalar peritonit sıklığının azaltılması ve daha uyumlu periton diyaliz solüsyonlarının üretilmesi konusunda yoğunlaşmıştır (15-18). Fakat belli bir süre sonra, periton membranında oluşan yapısal değişiklikler hastalarda ultrafiltrasyon problemlerine neden olmaktadır. Biouyumlu olmayan periton diyaliz solüsyonlarının kullanımı ve peritoneal infeksiyonlar periton membranında olan yapısal değişikliklerin nedenlerindendir (58). Geleneksel PD solüsyonlarında ozmotik ultrafiltrasyon için bulunan dektroz, glukoz karamelizasyonunu engellemek için düşük pH, metabolik asidozu düzeltmek için laktat..vs hepsi periton membranında yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmakta ve uzun dönem periton diyalizinin yetersizliğine yol açmaktadır (66). Ayrıca, peritonit ölümle sonuçlanabilen en önemli komplikasyondur. Böyle bir durumda akla “ SAPD işlemi intraperitoneal lokal immün sisteme hasar mı vermektedir?” sorusu gelmektedir. Hepsinden önemlisi yabancı bir solüsyonun intraperitoneal verilmesi, bu solüsyonla karşılaşan hücrelerin, fonksiyonlarında veya yaşam sürelerinde değişikliklere neden olabilmektedir (59). Periton kavitesi içindeki lokal koruyucu mekanizmalar infeksiyon oluşumunu önlemektedir. Sağlıklı bireylerde, normal periton sistemi bakteriyel bulaşın üstesinden peritonit olmadan gelebilmektedir

(örneğin cerrahi işlem sırasında), PD hastaları ise bunun tam tersi olarak en ufak kontaminasyonla peritonit olabilmektedir (19). PD sıvılarının konakçı koruyucu mekanizmalarından olan monositler üzerine negatif etkileri iyi bilinmektedir. Laktat tampon madde olarak, düşük pH ve yüksek ozmolarite hücre fonksiyonunu ve canlılığını bozmaktadır (örneğin fagosit aktivitesi, hücresel ATP miktarı veya LDH salınımı) (20-22). Benzer sonuçlar sitokin ağında inflamatuvar interleukinlerin salınımında da görülebilir (31,20,22). Periton boşluğunda taze diyalizat ve kan kompartmanı ile denge pH açısından difüzyon ile 15-30 dakika içinde olmakta ancak ozmotik aktif maddeler ve peptidler/proteinler için bu denge birkaç saatte kurulabilmektedir. Ancak, periton diyaliz solüsyonu ilk verilmiş anında henüz dilüe olmaması nedeniyle en zararlı durumundadır (16).

Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) fosfat sekresyonunda azalmaya ve vücutta fosfat birikiminde artmaya neden olmaktadır. Hiperfosfatemide sadece sekonder hiperparatiroidizm ve renal osteodistrofi gelişmesine neden olmakla kalmaz, ayrıca diyaliz hastalarında bağımsız bir faktör olarak ölüm riskinde artmaya neden olmaktadır (60,61). Son yıllarda yapılan retrospektif bir analize göre 6407 uzun dönem hemodiyaliz hastasında, %70 hastanın serum fosforu 5.0 mg/dL'den (1.6 mmol/L), bu hastaların yaklaşık yarısının serum fosforu 5.9 mg/dL (>1.9 mmol/L) 'den fazla ve %39'unda ise 6.5 mg/dL'den (2.1 mmol/L) fazla bulunmuştur. Bu SDBY popülasyonunda hiperfosfatemide prevalansının ne kadar yüksek olduğunu göstermektedir. Tek geniş periton diyaliz hasta popülasyonunda yapılan çalışmaya göre ise hiperfosfatemide periton diyalizi hastaları içinde özellikle anurik hastalar için sık karşılaşılan bir sorundur. Bu çalışmada ortalama serum fosfor düzeyi 5.2 ± 1.5 mg/dL, anurik hastalarında %44'ünde serum fosfor düzeyi 5.6 mg/dL (>1.8 mmol/L)'den fazla bulunmuştur. Diyaliz hastalarında serum fosforunda her 1 mg/dL artış (0.3 mmol/L), mortalite riskinde %6 artışa neden olmaktadır. Serum fosfor düzeyinin 6.5-7.7 mg/dL (2.1 to 2.5 mmol/L) olduğu hastalarda mortalite riskinde %18 artışa neden olurken, 8.1-17.0 mg/dL (2.6-5.5 mmol/L) olanlarda %39 mortalite riskinde artış olmaktadır.

Hiperfosfateminin mortalite riskini hangi mekanizma ile arttırdığı henüz tartışmalı olmakla birlikte, kardiyovasküler kalsifikasyonu arttırdığı düşünülmektedir. SDBY hastalarında kardiyovasküler hastalık ölümlerin %50'sinden sorumludur. Bu oran genel popülasyondaki kardiyovasküler ölüm oranından yüksektir. Hemodiyaliz veya periton diyalizi tedavisi alan hastalarda koroner arter hastalık oranı %40, sol ventrikül hipertrofisi oranı ise yaklaşık %75'ir.

Amarika Birleşik Devletleri Ulusal Böbrek Kurumu (The National Kidney Foundation [NKF]) Böbrek Hastalıkları Kalite Sonuçları (Kidney Disease Quality Outcome Initiative [K/DOQI]) Kemik Metabolizması ve Hastalıkları önerilerine göre serum fosforu 3.5-5.5 mg/dL, serum kalsiyumu 8.4-9.5 mg/dL arasında, $\text{Ca} \times \text{PO}_4$ çarpımı $55 \text{ mg}^2/\text{dL}^2$ ve bozulmamış PTH 150-300 pg/mL, serum total CO_2 22 mmol/L den fazla olmalıdır (67).

Daha önceden sıklıkla fosfat bağlayıcı olarak kullanılan alüminyum içeren fosfat bağlayıcıları günümüzde kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıları ile yer değiştirmiştir. Alüminyum güçlü fosfor bağlayıcı olmasına rağmen osteomalazi ve ensefalopati yapma riski bulunmaktadır. Kalsiyum içeren fosfat bağlayıcıların bu riski olmamakla birlikte $\text{Ca} \times \text{PO}_4$ çarpımını artırarak metastatik kalsifikasyona ve potansiyel olarak kardiyovasküler hastalık oranını arttırabilmektedirler.

Sonuçta periton diyalizi hastalarında periton diyalizi solüsyonlarında kalsiyum konsantrasyonunu azaltmak avantajlı düşünülmektedir (62). Periton diyaliz solüsyonları değişik kalsiyum konsantrasyonları içermektedir, örneğin: 1.000, 1.250, 1.500, 1.750 mmol calcium/L. 1.000 ve 1.250 düşük kalsiyum içeren PD solüsyonlarıdır. Düşük kalsiyum içeren solüsyonun esas avantajı fosfat bağlayıcı ajan olarak kalsiyum tuzu kullanan hastalarda hiperkalsemi riskinin az olmasıdır (12,13). Konvansiyonel PD solüsyonlarında suprafizyolojik seviyelerde olan PD solüsyonu kalsiyum düzeyi apoptosis için en çok suçlanan faktördür. Yang (27) çalışmasının sonuçları düşük kalsiyumlu diyalizatla, 1.250 mmol /liter) inkübe edilen mezotel hücrelerinin apoptozis oranı konvansiyonel PD solüsyonu (Ca^{2+} 1.750 mmol/liter) ile inkübe edilen mezotel hücrelerinin apoptozis oranından daha düşüktür. Monositler/makrofajlar başlangıçta, gelişmede ve immün yanıtın sonuçlanmasında merkezi önemi bulunmaktadır (64). Programlı hücre ölümü veya apoptozis fizyolojik bir mekanizmadır, ve diğer hücrelerden gelen sinyallerle olmaktadır. Apoptozis tipik hücre morfoloji ile karakterizedir, makrofajlar veya komşu hücreler tarafından ölmüş ya da istenmeyen hücreler inflamatuvar bir reaksiyona neden olmamak için temizlenmektedir (65). Bu çalışmada, değişik kalsiyum konsantrasyonu içeren periton diyaliz solüsyonlarının U937 monositik hücre dizisi üzerindeki apoptotik etkisi incelenmiştir. Monositler makrofajların öncü hücresi olmaları ve peritonun konakçı savunması açısından önemli hücreler olması nedeniyle seçilmiştir.

Sonuç olarak, 1.500 mmol/L Ca^{+2} içeren PDF solüsyonları hem kontrol grubuna hem de diğer oranlarda Ca^{+2} içeren PDF solüsyonlarına göre daha fazla apoptozis oranına sahiptir. Bunun sebep olabileceği klinik durumları irdelleyen daha detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

7- ÖZET

Sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) güvenli ve yaygın kullanım alanı olan renal replasman tedavi metodudur ve hastaları hemodiyaliz merkezlerine devamlı bağımlılıktan kurtarmaktadır. Periton diyaliz pratiğinde iki temel sorun bulunmaktadır: peritonit ve halihazırda uygulanan periton diyaliz solüsyonlarının biyouyumlu olmaması. Bu faktörlerin ikisi de periton membranının uzun süreli bir diyaliz membranı olarak kullanılmasını engelleyen peritoneal fibrozdan sorumludur. Araştırmalar peritonit sıklığının azaltılması ve daha uyumlu periton diyaliz solüsyonlarının üretilmesi konusunda yoğunlaşmıştır.

Periton boşluğunda bulunan lokal konakçı savunma mekanizmaları peritoneal infeksiyon gelişimini önlemek için önemli bir rol oynamaktadır. Periton diyalizi solüsyonlarının monositlerin savunma mekanizmaları üzerine olan negatif etkileri bilinmektedir.

Apoptosis normal doku homeostazının bir parçasıdır, ancak fizyolojik oranlarının dışına çıkınca hastalıklara neden olabilmektedir. Periton diyaliz solüsyonunda bulunan çeşitli faktörler örneğin kalsiyum, magnezyum, dekstroz konsantrasyonları, pH, osmolalite mezotel hücre apoptozisine neden olmaktadır. Mezotel hücre apoptozisi ve diyalizat kalsiyumu ile yapılan *in vivo* bir çalışmada düşük kalsiyumlu diyalizatta (1.250 mmol/L) apoptozis oranının yüksek kalsiyumlu diyalizata (1.750 mmol/L) göre daha az olduğu bulunmuştur.

Bu çalışmada, değişik kalsiyum konsantrasyonu içeren periton diyaliz solüsyonlarının U937 monositik hücre dizisi üzerindeki apoptotik etkisi incelenmiştir. Monositler makrofajların öncü hücresi olmaları ve peritonun konakçı savunması açısından önemli hücreler olması nedeniyle seçilmiştir.

Sonuç olarak, 1.500 mmol/L Ca^{+2} içeren PDF solüsyonları hem kontrol grubuna hem de diğer oranlarda Ca^{+2} içeren periton diyaliz solüsyonlarına göre daha fazla apoptosis oranına sahiptir. Bunun sebep olabileceği klinik durumları irdeleyen daha detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

8-KAYNAKLAR

1. **Friedman EA.** Consequences and management of hyperphosphatemia in patients with renal insufficiency. *Kidney Int.* 2005;67: Suppl 95, s1-s7.
2. **Cannata JB, Ruiz Alegria P, Cuesta MV, Herrera J, Peral V.** Influence of aluminium hydroxide intake on haemoglobin concentrations and blood transfusion requirements in haemodialysis patients. *Proc Eur Dial Transplant Assoc.* 1983;20:719-724.
3. **Hewitt CD, Savory J, Wills MR.** Aspects of aluminum toxicity. *Clin Lab Med* 1990;10:403-422.
4. **Cannata-Andia JB, Fernandez-Martin JL.** The clinical impact of aluminium overload in renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 2:9-12. Review.
5. **Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F.** Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(7):1014-1021.
6. **Maher ER, Young G, Smyth-Walsh B, Pugh S, Curtis JR.** Aortic and mitral valve calcification in patients with end-stage renal disease. *Lancet.* 1987;17(8564):875-877.
7. **London GM, Pannier B, Marchais SJ, Guerin AP.** Calcification of the aortic valve in the dialyzed patient. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(4):778-783. Review.
8. **Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM.** Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension.* 2001;38(4):938-942.
9. **Weinreich T, Rambašek M, Ritz E.** Is control of secondary hyperparathyroidism optimal with the currently used calcium concentration in the CAPD fluid? *Nephrol Dial Transplant.* 1991;6(11):843-845. Review

- 10. Slingeneyer A, Laroche B, Loupi E, Petitot A, Mion C:** Calcium concentration in PD dialysate must be lowered. Exclusive use of CaCO_3 as a phosphate binder. *Perit Dial Int.* 1992;12: 161 (suppl 1) (abstr)
- 11. Hutchinson J, Gokal R:** Improved solutions for peritoneal dialysis: Physiological calcium solutions, osmotic agents and buffers. *Kidney Int.* 1992;42(Suppl):s153-s159.
- 12. Cunningham J, Beer J, Coldwell RD, Noonan K, Sawyer N, Makin HL.** Dialysate calcium reduction in CAPD patients treated with calcium carbonate and alfacalcidol. *Nephrol Dial Transplant.* 1992;7(1):63-68.
- 13. Piraino B, Perlmuter JA, Holley JL, Johnston JR, Bernardini J.** The use of dialysate containing 2.5 mEq/L calcium in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 1992;12(1):75-76.
- 14. Prichard SS:** Peritoneal dialysis and hemodialysis: Are they comparable? *Nephrol Dial Transplant.* 1997;12 (suppl):65-67.
- 15. Maiorca R, Vonesh E, Cavalli PL et al.** A multi-centre, selection adjusted comparison of patient and technique survivals on CAPD and hemodialysis. *Perit Dial Int.* 1990; 11: 118-127.
- 16. Davies SJ, Bryan J, Phillips L, Russell GI.** Longitudinal changes in peritoneal kinetics: the effects of peritoneal dialysis and peritonitis. *Nephrol Dial Transplant.* 1996; 11: 498-506.
- 17. Selgas R, Fernandez-Reyes MJ, Bosque E et al.** Functional longevity of the human peritoneum: how long is continuous peritoneal dialysis possible ? Results of a prospective medium long-term study. *Am J Kidney Dis.* 1994; 23: 64-73.
- 18. Honda K, Nitta K, Horita S et al.** Accumulation of advanced glycation end products in the peritoneal vasculature of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with low ultrafiltration. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14: 1541-1549.
- 19. Cameron JS.** Host defences in continuous ambulatory peritoneal dialysis and the genesis of peritonitis. *Pediatr Nephrol.* 1995;9(5):647-662. Review.

20. **Plum J, Schoenicke G, Grabensee B.** Osmotic agents and buffers in peritoneal dialysis solution: Monocyte cytokine release and in vitro cytotoxicity. *Am J Kidney Dis.* 1997;30(3):413-422.
21. **Liberek T, Topley N, Jorres A, Coles GA, Gahl GM, Williams JD.** Peritoneal dialysis fluid inhibition of phagocyte function: effects of osmolality and glucose concentration. *J Am Soc Nephrol.* 1993;3(8):1508-1515.
22. **Jorres A, Gahl GM, Topley N, Neubauer A, Ludat K, Muller C, Passlick-Deetjen J.** In-vitro biocompatibility of alternative CAPD fluids; comparison of bicarbonate-buffered and glucose-polymer-based solutions. *Nephrol Dial Transplant.* 1994;9(7):785-790.
23. **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR:** Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239-257.
24. **Ortiz A.** Apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Kidney Int.* 2000;58: 467-485.
25. **Catalan MP, Reyero A, Egido J, Ortiz A.** Acceleration of neutrophil apoptosis by glucose containing peritoneal dialysis solutions: Role of caspases. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12: 2442-2449.
26. **Martin SJ, Green DR.** Protease activation during apoptosis: Death by thousand cuts? *Cell* 1995; 82: 349-352.
27. **Jorres A, Gahl GM, Frei U:** Peritoneal dialysis fluid biocompatibility: Does it really matter? *Kidney Int.* 1994; 46 (Suppl 48): S79-S86.
28. **Carozzi S, Nasini MG.** Ca^{2+} concentration in the peritoneal dialysis solution regulates peritoneal fibroblast proliferation and peritoneal macrophage and lymphocyte cytokine release. *Perit Dial Int.* 1993;13(Suppl 2):S41-S44.
29. **Trump BF, Berezesky IK.** Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* 1995;9(2):219-228. Review.

- 30. Perotti M, Toddei F, Mirabelli F, Vairetti M, Bellomo G, McConkey DJ, Orrenius S.** Calcium-dependent DNA fragmentation in human synovial cells exposed to cold shock. *FEBS Lett.* 1990;259(2):331-334.
- 31. Coles GA, Williams JD, Topley N.** Peritoneal inflammation and long-term changes in peritoneal structure and function. In: Gokal R, Khanna R, Krediet R, Nolph K, eds. *Textbook of Peritoneal Dialysis.* Dordrecht; Kluwer Academic Publishers, 2000; 565-583.
- 32. Topley N, Craig JJ, Fallon M et al.** Morphological changes in the peritoneal membrane of patients on peritoneal dialysis (PD) are related to time on treatment. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10: 324A.
- 33. Mateijsen MAM, van der Wal AC, Hendriks PMEM et al.** Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 268-269.
- 34. Gotloib L, Waisbrut V, Shostak A, Kushnier R.** Acute and long-term changes observed in imprints of mouse mesothelium exposed to glucose-enriched, lactated, buffered dialysis solutions. *Nephron* 1995; 70: 466-477.
- 35. Boeschoten EW.** Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis. In: Gokal R, Khanna R, Krediet R, Nolph K, eds. *Textbook of Peritoneal Dialysis.* : Dordrecht, Kluwer, 2000, pp. 387-417.
- 36. Twardowski ZJ, Khanna R, Nolph KD.** Osmotic agents and ultrafiltration in peritoneal dialysis. *Nephron.* 1986; 42: 93-101.
- 37. Wilkie ME, Plant MJ, Edwards L et al.** Icodextrin 7.5% dialysate solution (glucose polymer) in patients with ultrafiltration failure: extension of CAPD technique survival. *Perit Dial Int.* 1997; 17: 84-87.
- 38. Savill J.** Apoptosis and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 12-21.
- 39. Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, Lassmann H.** Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the

combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab Invest.* 1994; 71: 219-225.

40. **Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267: 1456-1462.
41. **Gobe GC, Axelsen RA, Searle JW.** Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest.* 1990; 63: 770-779.
42. **Baker AJ, Mooney A, Hughes J, Lombardi D, Johnson RJ, Savill J.** Mesangial cell apoptosis: The major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 1994; 94: 2105-2116.
43. **Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N.** Apoptosis in the repair process of experimental proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1995; 47: 114-121.
44. **Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z.** Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int.* 1996; 49: 103-111.
45. **Ishii N, Ogawa Z, Suzuki K, Numakami K, Saruta T, Itoh H.** Glucose loading induces DNA fragmentation in rat proximal tubular cells. *Metabolism* 1996; 45: 1348-1353.
46. **Ortiz A, Ziyadeh FN, Neilson EG.** Expression of apoptosis-regulatory genes in renal tubular epithelial cells exposed to high ambient glucose and in diabetic kidneys. *J Invest Med* 1997; 45: 50-56.
47. **Makino H, Kashihara N, Sugiyama H, Kanao K, Sekikawa T, Okamoto K, Maeshima Y, Ota Z, Nagai R.** Phenotypic modulation of the mesangium reflected by contractile proteins in diabetes. *Diabetes.* 1996; 45: 488-495.
48. **Johnson R, Lowett D.** In vivo gene transfer, Koch's postulates, and renal disease. *J Clin Invest.* 1993; 92: 2568.

49. **Martin-Malo A, Carracedo J, Ramirez R, Rodriguez-Benot A, Soriano S, Rodriguez M, Aljama P.** Effect of uremia and dialysis modality on mononuclear cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol.* 2000; 11(5): 936-942.
50. **Plum J, Lordnejad MR, Grabensee B.** Effect of alternative peritoneal dialysis solutions on cell viability, apoptosis/necrosis and cytokine expression in human monocytes. *Kidney Int.* 1998; 54(1): 224-235.
51. **Jin HM, Di YD, Xu QJ.** Effects of commercial glucose-based peritoneal dialysates on peripheral blood phagocytes apoptosis. *Perit Dial Int* 1999; 19 (Suppl 2): S388-393.
52. **Cendoroglo M, Sundaram S, Groves C, Ucci AA, Jaber BL, Pereira BJ.** Necrosis and apoptosis of polymorphonuclear cells exposed to peritoneal dialysis fluids in vitro. *Kidney Int.* 1997; 52(6): 1626-1634.
53. **Yang AH, Chen JY, Lin YP, Huang TP, Wu CW.** Peritoneal dialysis solution induces apoptosis of mesothelial cells. *Kidney Int.* 1997; 51(4): 1280-1288.
54. **Sundstrom C, Nilsson K.** Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 1976; 17: 565
55. **Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD, Ghods AJ, Twardowski Z, Pyle WK.** Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med.* 1978; 88: 449-456.
56. **Türk Nefroloji Derneği Merkez Bilgileri, 2003 sonu raporları**
57. **Fenton SSA, Schaubel DE, Desmeules M et al.** Hemodialysis versus peritoneal dialysis : a comparison of adjusted mortality rates. *Am J Kidney Dis.* 1997; 30: 334-342.
58. **Topley N.** Membrane longevity in peritoneal dialysis: impact of infection and bio-incompatible solutions. *Adv Ren Replace Ther.* 1998 ;5(3):179-84. Review.
59. **Cohen J.J.** *Kidney International.* Editorial. 1998;54:283-284.
60. **Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK.** Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis.* 1998;31(4):607-617.

- 61. Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK.** Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(10):2131-2138.
- 62. Kiefer T, Schenk U, Hübel E, Weber J, Mettang T, Passlick-Deetjen J, Kuhlman U.** In vitro effects of low-calcium peritoneal dialysis solutions on peritoneal macrophage functions. *Am J Kid Dis.* 1995;25(5):751-760.
- 63. Gorczyca W.** Cytometric analyses to distinguish death processes. *Endocr Relat Cancer.* 1999 Mar;6(1):17-9. Review.
- 64. Janeway CA, Bottomly K:** Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell.* 1994; 76:275.
- 65. Thomson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995; 267:1456.
- 66. Chan TM, Leung JK, Sun Y, Lai KN, Tsang RC, Yung S.** Different effects of amino acid-based and glucose-based dialysate from peritoneal dialysis patients on mesothelial cell ultrastructure and function. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(6):1086-1094.
- 67. Sugarman JR, Frederick PR, Frankenfield DL, Owen WF Jr, McClellan WM;** Dialysis Outcomes Quality Initiative Clinical Practice Guidelines: process, outcomes and implications. *Am J Kidney Dis.* 2003 Oct;42(4):806-812.