

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL RENAL ABLASYON MODELİNDE  
DOKSİSİKLİNİN GLOMERULOSKLEROZA  
ETKİSİ**

**DR.DEVRİM TAYFUR**

**UZMANLIK TEZİ**

**İZMİR-2008**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PATOLOJİ  
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL RENAL ABLASYON MODELİNDE  
DOKSİSİKLİNİN GLOMERULOSKLEROZA  
ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr.DEVRİM TAYFUR**

Danışman Öğretim Üyesi. Prof.Dr.Sülen Sarıoğlu

## İÇİNDEKİLER

I.Tablo listesi.....	i
II.Şekil listesi .....	ii
III.Resim listesi .....	iii
IV.Kısaltmalar.....	iv
V.Teşekkür.....	v
VI.ÖZET .....	2
VII.İNGİLİZCE ÖZET.....	2
VIII.GİRİŞ .....	3
1.GENEL BİLGİLER.....	5
i.Glomerüloskleroz Patogenezi .....	5
ii.Renal Ablasyon Nefropatisinde Hasarlanma Mekanizmaları.....	9
iii.Matriks Metalloproteinazlar .....	11
iv.Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri .....	13
v.İnflamatuvar-dışı Glomerular Hastalıklarda Matriks Metalloproteinazların Yeri .....	14
vi.Doksisiklin ve Etki Mekanizması .....	15
IX.GEREÇ VE YÖNTEM .....	17
1.Deneysel yöntem .....	17
2.Patolojik İnceleme Yöntemi .....	18
i.Glomerulosklerozun Değerlendirme Yöntemi .....	18
ii.İmmünohistokimyasal Değerlendirme Yöntemi .....	18
iii.İmmüno Floresan İle Değerlendirme Yöntemi .....	19
3.Biyokimyasal Yöntem .....	19
i.Jelatinazlar için dokuların hazırlanması .....	19
ii.Protein Analizi .....	19
iii.Jelatin Zimografisi .....	20
iv.Jelatin Zimografisi Yönteminin Uygulama Aşamaları .....	20
v.TIMP-2 ELISA Analizi .....	23
vi.TIMP-1 ELISA analizi .....	23
vii.Doku homojenatlarında protein düzeyleri .....	24
viii.TIMP-2 Düzeyleri .....	24
ix.TIMP-1 Standart Kalibrasyon Eğrisi.....	25
4.İstatistiksel Yöntem .....	26
X.BULGULAR .....	27

1.Glomeruloskleroz Bulguları .....	29
2.Kollajen Tip IV Ekspresyon Bulguları .....	34
3.MMP 9 Ekspresyon Bulguları .....	38
4.TIMP-2 Ekspresyon Bulguları .....	42
5.Biyokimyasal Bulgularının Değerlendirilmesi .....	46
i.TIMP-1 .....	46
ii.TIMP-2 .....	46
iii.proMMP-9 .....	46
iv.aktifMMP-9 .....	48
v.proMMP-2 .....	48
VI.aktifMMP-2 .....	50
XI.TARTIŞMA .....	52
XII.SONUÇ VE ÖNERİLER .....	62
XIII.KAYNAKLAR .....	63

## TABLO LİSTESİ

1.FSGS 'in etyolojik faktörlere göre sınıflandırılması .....	6
2.Fokal segmental sklerozun morfolojik tipleri .....	8
3.Matriks Metallo proteinazlar ve ana substratları .....	12
4.Jelatin Zimografi yönteminde poliakrilamid jellerin hazırlanması .....	21
5.Jelatin Zimografi yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması .....	22
6.Çalışmadaki parametrelerin ortalama ve standart sapmaları .....	28
7.Glomeruloskleroz için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark .....	29
8.Tip IV kollajen için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark .....	34
9.MMP 9 için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark .....	38
10.TIMP II ekspresyonu için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark .....	42
11.MMP-9 ekspresyonu için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark .....	46
12.Pro MMP2 ekspresyonu için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark .....	48
13.Aktif MMP-2 ekspresyonu için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark .....	50

## ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ

1.Renal kitlede kayba bağlı glomerüloskleroz gelişim patogenezi .....	9
2.MMP Regülasyon basamakları .....	13
3.BSA standart kalibrasyon eğrisi .....	24
4.TIMP-2 standart kalibrasyon eğrisi .....	25
5.TIMP-1 standart kalibrasyon eğrisi .....	25
6.Gruplar arasında glomeruloskleroz gelişimi açısından farkın değerlendirilmesi ..	30
7.Gruplar arasında TipIV kollajen birikimi açısından farkın değerlendirilmesi .....	35
8.Gruplar arasında MMP-9 ekspresyonu açısından farkın değerlendirilmesi .....	39
9.Gruplar arasında TIMP II ekspresyonu açısından farkın değerlendirilmesi .....	43

## RESİM LİSTESİ

1.Grup 1'e ait glomeruloskleroz alanı .....	31
2.Grup 2'e ait glomeruloskleroz alanı .....	32
3. Grup 3'e ait glomeruloskleroz alanı .....	33
4.Grup 1 Tip IV kollajen ekspresyonu .....	36
5.Grup 2 Tip IV kollajen ekspresyonu .....	36
6.Grup 3 Tip IV kollajen ekspresyonu .....	37
7.Grup 4 Tip IV kollajen ekspresyonu .....	37
8. Grup 1 MMP-9 ekspresyonu .....	40
9. Grup 2 MMP-9 ekspresyonu .....	40
10. Grup 3 MMP-9 ekspresyonu .....	41
11.Grup 4 MMP-9 ekspresyonu .....	41
12.Grup 1 TIMP-2 ekspresyonu .....	44
13.Grup 2 TIMP-2 ekspresyonu .....	44
14.Grup 3 TIMP-2 ekspresyonu .....	45

## **KISALTMALAR**

ESM: Ekstra selüler matriks

MMP: Matriks Metalloproteinaz

TIMP: Tissue İnhibitor of Matriks Metalloproteaz

FSGS: Fokal Segmental Glomeruloskleroz

HE: Hematoksilen Eozin

PAMS: Periodic Acid Methenamin Silver

PBS: Phosphate Buffered Saline Solüsyonu

EIA: Enzim İmmunoassay

TMB: Tetrametilbenzidin

HIV: Human Immunodeficiency Virus



## TEŞEKKÜR

Öncelikle uzmanlık tezimin konusunun belirlenmesi, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde uzun süren sağlık problemlerime rağmen yılmadan yıllarca bana önderlik eden, destekleyen, moral veren, mesleki ve özel yaşantısıyla daima bana örnek olmuş değerli hocam Prof.Dr. Sülen Sarıoğlu'na teşekkür ederim.

Patoloji uzmanlık eğitimim sırasında bir patolog ve bir insan olarak olgunlaşmamda sonsuz emeği geçen, kendilerinden eğitim almış olmanın bir patolog için ayrıcalık olduğuna inandığım değerli öğretim üyeleri; Anabilim Dalı Başkanı Erdener Özer, Prof.Dr. Şerafettin Canda, Prof. Dr. Tülay Canda, Prof. Dr. Uğur Papuççuoğlu, Prof.Dr. Aydanur Kargı, Prof.Dr. Ali Küpeliolu, Prof. Dr. Kutsal Yörükoğlu, Prof. Dr. Meral Koyuncuoğlu, Prof.Dr. Özgül Sağol, Doç.Dr. Banu Lebe, Doç.Dr. Sermin Özkal, Doç.Dr. Burçin Tuna, Uzm. Dr. Duygu Gürel ve Uzm.Dr.Merih Güray'a teşekkür ederim.

Ayrıca Tez çalışmam sırasında her daim desteğini esirgemeyen, insanlığı ve ekip ruhuyla bana örnek olan Nefroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın hocam Doç. Dr. Ali Çelik'e teşekkür ederim. Yine bu süre içerisinde bilgisi, arkadaşlığı ve desteğiyle Dr. Funda Sağlam'a emeği ve katkıları için teşekkür ederim. Ayrıca deneysel çalışmam sırasında bilgi ve emeğiyle katkıları büyük olan Prof. Dr. Osman Yılmaz'a ve Araştırma görevlisi arkadaşım Efsun Kolatan'a teşekkür ederim. Ayrıca katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı'ndan sayın Prof. Dr. Gülgün Oktay'a ve Araş. Gör. Zahide Çavdar'a teşekkür ederim.

Son olarak uzmanlık eğitimim boyunca göstermiş oldukları içten arkadaşlık ve destek için tüm teknisyen arkadaşlarıma ve sekreteryaya görevlilerine teşekkür ederim. Tezimin laboratuvar aşamasında yapmış oldukları katkılardan dolayı Ayşen Çayan, Yahya T. Orhan, Nalan Öğüt, Nurullah Özdemir ve Salih Öztürk'e tezime olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

## **Deneysel Renal Ablasyon Modelinde Doksisisiklinin Glomeruloskleroza Etkisi**

Dr.Devrim Tayfur. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD

[devrimtayfur@yahoo.com](mailto:devrimtayfur@yahoo.com)

Matriks metalloproteinazlar (MMP) ve doğal doku inhibitörleri (TIMP) ekstrasellüler matriksin yapısının korunmasında önemli rol oynarlar. Pek çok hastalık sonucu skarlanma ekstrasellüler matriksin sentezi ile yıkımı arasındaki dengesizlikle ilişkilidir. MMP inhibitörlerinin renal hastalıklarda iyileştirici ya da hasarlanmayı azaltıcı etkisi bildirilmiştir. Oysa segmental skleroz durumundaki etkileri bilinmemektedir. Doksisisiklin bir antibiyotiktir ve MMP inhibitörüdür. Bu çalışmada, renal ablasyon nefropatisi modelinde doksisisiklin uygulamasının glomeruloskleroz üzerindeki etkisinin araştırılması ve MMP2, MMP 9, TIMP I ve II ve Kollajen TipIV düzeyleri değerlendirilmesi ile mekanizmaya ışık tutulması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 28 adet dişi Wistar albino sıçanın 14'üne 5/6 nefrektomi uygulanmış bunların ve nefrektomi uygulanmayanların yarısına oral doksisisiklin verilmiştir (40mg/kg/gün-toplam 28gün). Sakrifikasyon sonrası Hematoksilen&Eozin ve 'periodic acid methenamin silver' (PAMS) histokimyasal boyaları ile glomerüllerdeki sklerotik değişiklikler yanı sıra, immünfloresans ile MMP-9 düzeyleri ve immünhistokimyasal olarak TIMP-2 ekspresyonu değerlendirilmiştir. Ayrıca ELİSA ile, TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyleri; jelatin zimografiyle pro ve aktifMMP-2 ve MMP-9 ölçülmüştür.

Araştırma sonucunda 5/6 nefrektomi modelinde doksisisiklinin glomeruloskleroza azaltıcı etkisi saptanmıştır. Glomeruloskleroz artan gruplarda kollajen tip IV azalmıştır. Kontrol grubuna göre doksisisiklin alanlarda MMP-9 doksisisiklin ile artmış, oysa proMMP9 ve 2 azalmıştır. 5/6 nefrektomi olup Doksisisiklin alan ve almayanlar karşılaştırıldığında Doksisisiklinle glomeruloskleroz, TIMP-2 ekspresyonu azalmış, aktif ve pro MMP-2 belirgin şekilde artmış, proMMP-9 ve MMP-9'da değişiklik olmamıştır. TipIV kollajen daha fazla düzeyde saptanmıştır.

Bu bulgular Doksisisiklinin glomeruloskleroz üzerine azaltıcı etkisini vurgulamakta, ancak bunun MMP-2 ve 9 inhibisyonuyla ilişkisi açıklanamamaktadır. Mekanizma açıklanamadığı için diğer MMP, TIMP ve kollajenlerin de doksisisiklin ilişkili azalan glomerulosklerozla ilişkisi araştırılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Matriks metalloproteinazlar, Matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri, Doksisisiklin, Renal Ablasyon Nefropatisi, Glomeruloskleroz

## SUMMARY

### **The effect of doxycycline on glomerulosclerosis in Renal Ablation Model**

Dr.Devrim Tayfur.

Dokuz Eylul University Medical School Department of Pathology  
[devrimtayfur@yahoo.com](mailto:devrimtayfur@yahoo.com)

Matrix metalloproteinases (MMP) and their tissue inhibitors (TIMP) are important in the maintenance of extra cellular matrix. Beneficial effects of MMP inhibitors in renal diseases were reported, but their effect on segmental sclerosis is unknown. The aim of this study is to investigate the effect of doxycycline; a tetracycline group antibiotic and an inhibitor of MMP; in renal ablation nephropathy and to evaluate the levels of MMP-2, 9, TIMP I and II, and collagen type IV which might enlighten the mechanism.

Fourteen of the 28 female Wistar albino were 5/6 nephrectomised. Doxycycline were given to seven of the 14 nephroctomised and non nephroctomised animals (40 mg/kg/day total 28 days). After sacrifice morphological changes in the glomeruli were evaluated by light microscopy; MMP-9 expression with immunofluorescence; TIMP-2 expression with immunohistochemistry. TIMP-1 and TIMP-2 levels were measured with ELISA; pro and activeMMP-2 and MMP-9 were evaluated with zymography.

Glomerulosclerosis scores were decreased in 5/6 nephrectomised rats receiving Doxycycline. Collagen type IV was decreased with increased glomerulosclerosis. Compared with the control group MMP-9 was increased in doxycycline administered group, but proMMP-2 and 9 were decreased. When 5/6 nephrectomised groups were compared, Doxycycline administered group had lower glomerulosclerosis scores and TIMP-2 expression; significantly higher pro and activeMMP-2 levels; and similar levels of proMMP-9 and MMP-9; higher amount of type IV collagen.

Doxycycline was found to decrease glomerulosclerosis in ablation nephropathy. It is hard to explain the mechanism by MMP-2 and 9, TIMP-1 and TIMP-2 expression. Investigation of collagen III and other MMP's may clarify the mechanism.

**Key Words:** Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, doxycycline, renal ablation nephropathy, glomerulosclerosis

## GİRİŞ

Böbreğin filtrasyon işlevini gerçekleştiren primer anatomik yapı glomerüldür. Glomerül kapiller bir yumak ve bu yumağın merkezinde yer alan mezangiumdan oluşmaktadır. Mezangium bazal membran benzeri bir materyal ve bunun içerisinde yer alan mezangial hücreleri içeren mezangial matriksten oluşur. Glomerül içerisindeki kan akımının kontrolü ve filtrasyonu yanısıra fagositoz işlevi de görür (1) .

Glomerüllerin incitici etkenlerle karşılaşmaları sonucu son aşama bulgusu glomeruloskleroz ortaya çıkar ve bu özel olarak global skleroz olarak tanımlanabilir. Glomerulosklerozun ön planda izlendiği bir grup hastalık ise glomerulosklerotik hastalıklar olarak tanımlanmaktadır. Diabetik nefropati, fokal segmental glomeruloskleroz (FSGS) ve bazen hafif zincir depozisyon hastalığı bu gruptadır.

Matriks metalloproteinazlar (MMP) hücre dışı matrikste yer alır ve kollajen yıkımında rol oynarlar. Birçok fizyolojik ve patolojik durumda rol alan bu enzimlerin doğal inhibitörleri vardır [tissue inhibitor of matriks metalloproteaz (TIMP)]. Pek çok hastalık ekstraselüler matriksin sentezindeki ya da yıkımındaki bozukluktan kaynaklanır. Bu ekstraselüler matriksin birikimi ile sonuçlanır. Böbrekte bu durumun önde gelen lezyonları intertisyel fibrozis ve glomerulosklerozdur. MMP'nin downregülasyonunun hipertansif glomeruloskleroz ve diyabetik nefropati gibi böbreğin inflamatuvar olmayan hastalıklarıyla ilişkili olduğu saptanmıştır (2-8). Daha önce pek çok çalışmada kollajen miktarının arttığı durumlarda ve glomerüler hasarla seyreden patolojik durumlarda MMP düzeylerinin yükseldiği tespit edilmiştir (5,7,9).

Doksisiklin, tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir ayrıca MMP aktivitesini baskılayıcı özelliği vardır. Doksisiklin MMP inhibisyonunu bu enzimlerin çinko içeren katalitik bölümüne bağlanarak gerçekleştirir, geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Roach ve arkadaşları (10) sıçanlarda yapmış oldukları deneysel çalışmada; ağızdan doksisiklin uygulamasının iskelet kasındaki MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini baskılayarak iskemi-reperfüzyon hasarında azalmaya yol açtığını göstermişlerdir. Ayrıca MMP inhibitörlerinin kresentik

nefritte proteinüriyi azattığına dair yayın vardır (11). Oysa doksisisiklinin sklerozan glomerulonefritteki etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada amacımız segmental skleroz oluşturulmuş ratlarda Doksisisiklinin etkisini, MMP-9, TIMP-2 aktiviteleri ile tip 4 kollajen düzeyleri üzerine etkisini inceleyerek saptamaktır.

## GENEL BİLGİLER

### *i. Glomerüloskleroz patogenezi*

Normal işlev gören bir glomerülde filtrasyonda görevli 3 temel komponent (endotelial hücreler, podositler ve glomerüler bazal membran) korunmuştur (12). Podositlerin birbirleriyle ilişkili ayaklı çıkıntıları proteinlerin tübüllere geçişini engelleyici bir bariyer oluşturur (13). Çeşitli faktörlerle bu doğal yapı değişikliğe uğrayabilir ve son dönem böbrek yetmezliğine gidebilecek boyutta hasar görülebilir.

Fokal Segmental Glomeruloskleroz son dönem böbrek yetmezliği sebepleri arasında sık görülen bir antitedir. Birçok etyolojik faktör bu duruma sebep olabilir (Tablo 1).

Primer fokal segmental glomerulosklerozda glomerülosklerozun patogenezi tam olarak bilinmese de lenfotoksin benzeri bir maddenin neden olduğu visseral epitelyal hücre (Podosit) hasarının temel rol oynadığı düşünülmektedir (14). Bu hasar sonrası glomerüllerde hücrel proliferasyon ile fibrozis ve skar dokusu oluşmaktadır.

Ailesel formlarda podosit membran proteinlerinde mutasyonlar vardır. Bu mutasyonlar çoğunlukla podosin,  $\alpha$ -actinin 4, CD ile ilişkili protein ve nefrin proteinlerini kodlayan genlerde görülür (15).

**Tablo 1. FSGS ‘in etyolojik faktörlere göre sınıflandırılması: (16)**

---

**Primer (idyopatik) FSGS**

---

**Sekonder FSGS**

**1. Ailesel/genetik**

**A.  $\alpha$ -aktinin 4 Mutasyonları**

**B. Podocin Mutasyonları**

**C. WT-1 Mutasyonları**

**D.  $\beta$ -integrin Mutasyonları**

**2. Virus-ilişkili**

**A. HIV-1 (HIV-ilişkili nefropati)**

**B. Parvovirus B19**

**3. İlaçla indüklenmiş durumlar**

**A. Eroin (Eroin nefropatisi)**

**B. Interferon  $\alpha$**

**C. Lithium**

**D. Pamidronate**

**4. Adaptasyon için meydana gelen fonksiyonel ve yapısal değişiklikler**

**A. Böbrek kitlesinde azalma**

**Oligomeganefronni**

**Unilateral renal agenezi**

**Renal displazi**

**Reflu nefropatisi**

**Kortikal nekroza bağlı sekel**

**Cerrahi renal ablasyon**

**Kronik allograft nefropatisi**

**Nefronların fonksiyonlarında azalmaya neden olan böbrek hastalıkları**

**B- Doğal renal kitle varlığı zemininde gelişenler**

**Hipertansyon**

**Arter embolisi ya da diğer akut vazo-okluzif durumlar**

**Obezite**

**Siyanotik konjenital kalp hastalıkları**

**Orak hücreli anemi**

---

Sekonder FSGS gelişiminde glomerüler kapiller duvarda meydana gelen hasar glomerüllerde adaptif değişiklikler yaratır ve bu değişiklikler skleroz gelişimine neden olur. Özellikle Transforming growth faktör  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) glomerüler proliferasyon yanısıra ekstraselüler matriksin progresif birikiminden de sorumludur. Yapılan bir deneysel çalışmada TGF  $\beta$ 'nin ekstraselüler matriks (ESM) sentezini arttırdığı ve yıkımını da azalttığı tespit edilmiştir (17).

Glomerüllerde hasar meydana getirecek pek çok mekanizma vardır. Bu hasar immüno kompleksler ile ilişkili olabilir, anormal proteinlerin glomerüllerde birikimiyle gerçekleşebilir, trombüs kaynaklı olabilir, hemodinamik sebeplerden meydana gelebilir, ya da özellikle podositlere karşı gelişmiş direkt toksik hücre hasarlanma ile olabilir. FSGS'in kliniğinde meydana gelen karakteristik bulgu olan proteinüri podositlerin hasarıyla meydana gelen protein bariyerinin bozulmasından kaynaklanır (18,19). Hasar yaratıcı stresin sürmesiyle epitelde ve hatta altında bulunan bazal membranda da zaman içinde hasar meydana gelerek tübüllerin içerisinde bulunan spesifik olmayan proteinler de idrara geçmeye başlar (13). Bu hasar sonucu ortaya çıkacak durum glomerülde hasarlanmayla tetiklenen profibrotik sürece ve glomerülün rejenerasyon kapasitesine bağlı olarak değişir (20).

Glomerüllerde tamir kapasitesi vardır. Hatta hasar sonucu skleroza giden bir glomerülde bile sürekli bir hücre turn-over'ı mevcuttur. Glomerülde en yüksek tamir kapasitesine sahip hücre podositlerdir. Bununla beraber ESM birikimiyle skleroz gelişirse yeniden yapılanma profibrotik ve antifibrotik süreç tabii ki kollajen sentezi ve yıkımı arasındaki dengeye bağlı olacaktır. Bu denge hücre rejenerasyonu ile uyumlu bir şekilde çalışırsa glomerül doğal yapısını koruyabilir ya da minimal bir hasarlanma ile fonksiyonunu sürdürebilir. Veya hasarın devamı ya da rejenerasyon kapasitesindeki yetersizlikler böbrek kronik böbrek yetmezliğine neden olur (20).

Histolojik olarak, FSGS da glomeruler kapiller lümeni oblitere olmuş ve birlikte ESM'de artış bulunan glomerüler yumak izlenir. Bu sklerotik lezyonlar fokaldır ve sadece glomerülün bazı segmentlerinde görülür. Ayrıca bu lezyonlar tipik olarak immün-kompleks birikimiyle ilişkili değildir (16). FSGS'deki bu sklerotik lezyonların lokalizasyonları FSGS'in



farklı morfolojik tiplerini oluşturur (Tablo 2). Bu varyantlar önemlidir, çünkü aralarında prognostik ve hatta etyolojik farklar vardır. Bu değişik lokalizasyondaki lezyonlar farklı mekanizmalarla meydana gelmiş olabilir ve her bir mekanizma o varyantın patogenezini oluşturuyor olabilir (18,21).

**Tablo 2 . FSGS'in Morfolojik Tipleri (16)**

---

FSGS perihiler varyant
FSGS selüler varyant
FSGS tip varyant
FSGS kollabe varyant

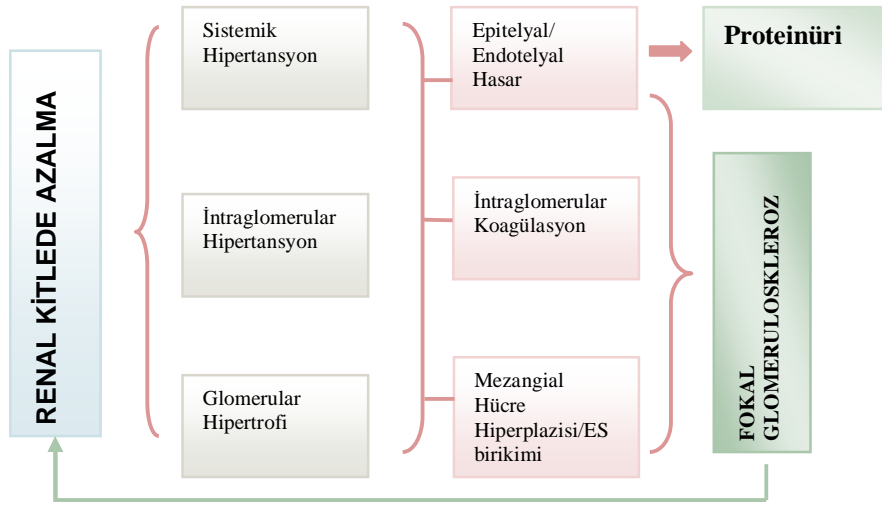
---

Perihiral varyantta skleroz vasküler polde görülür. Selüler varyantta kapiller yumakta selülarite artmıştır. Tip (uç) türde glomerülün proksimal tübüle yakın ucu tutulmuştur. Kollabe (çökmüş) türde bir veya daha fazla glomerülde global ya da segmental kollaps görülür.

Klinik olarak da bu lezyonlar birbirlerinden farklı seyir izlerler. Örneğin; kollabe tür son dönem böbrek yetmezliğine daha hızlı bir gidiş gösterir ve HIV'li olgularda daha sık görülür (16) .

ii. Renal ablasyon nefropatisinde hasarlanma mekanizmaları

Renal ablasyon nefropatisinde; glomeruloskleroz hastalıktan etkilenmemiş böbrekte adaptasyon sonucu gelişir. Renal kitle kaybı olan böbrekte gelişen hasar sonucu karşı böbrekte kompensatuar hipertrofi gelişir. Daha sonra proteinüri ve glomeruloskleroz oluşur. Son aşama olarak total glomeruloskleroz ve üremi meydana gelir. Meydana gelen glomerular hipertrofi hemodinamik değişikliklerle ilişkilidir. Bu değişiklikler artmış glomerular kan akımı, artmış glomerular filtrasyon, kapiller hipertansiyon ve sistemik hipertansiyon olabilir( Şekil 1 ). Yapılan bazı çalışmalara göre renal kitle azaltılması hemen her zaman için sistemik ve / ya da glomerüler hipertansiyon gelişimine yol açar (22,23).



Şekil 1. Renal kitlede kayıba bağlı glomeruloskleroz gelişimi

Temel olarak endotelial/epitelial hasar sonrası artan glomerular geçirgenlik sebebiyle serum proteinleri mezangial matriks içine geçmektedir, ardından gelişen mezangial hücre proliferasyonu ve makrofaj infiltrasyonu sonucu meydana gelen ekstraselüler matriks artışı segmental ve globuler skleroz gelişimine neden olmaktadır. Daha önce de belirtildiği gibi skleroz sürecinde en önemli role sahip olan mediyatör TGF  $\beta$ 'dir. Ancak; renal kitle azaltımını takiben gelişen progresif glomerulosklerozdan sorumlu kompleks patogenetik mekanizmalar henüz çok iyi anlaşılabilmiştir (23,24).

Deneysel çalışmalara bakıldığında bir böbrek çıkarıldıktan ve diğer böbreğe parsiyel nefrektomi uygulandıktan sonra glomerüler kapiller basınçta bir artış meydana gelmektedir (25). Bu durum kronik hiperfiltrasyona karşı gelişmiş bir adaptasyondur. Bidani ve Mitchell KD (23) yaptıkları deneysel araştırmada sıçanlara 5/6 nefrektomi uygulamışlardır. Operasyondan 12–16 hafta sonra geri kalan glomerüllerin % 25-50'sinde glomerüloskleroz izlenmiştir. Daha önce Güray ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada siklosporin-A toksisitesinin renal kitle ile ilişkisi araştırılmış ve bu amaçla ratların bir kısmına 5/6 nefrektomi uygulanmıştır. Opere edilen ratların hepsinde segmental skleroz olduğu tespit edilmiştir (26). Glomerüler zedelenme, kompensatuar hiperfiltrasyona yol açan glomerüler kapillerde basınç artışına bağlanabilirken, bazı araştırmacılar progresif glomerülosklerozun, glomerüler hipertrofinin istenmeyen bir sonucu olduğunu öne sürmektedirler (23). Bidani ve Mitchell KD (23)'nin çalışmasında 5/6 nefrektomi sonrasında normotansif sıçanlarda, renal yapı dikkat çekecek derecede korunmuştur. Bu araştırmaya göre şu sonuca varılabilir; 5/6 nefrektomi sonrası hem hipertansiyon gelişen hem de normotansif olarak kalan sıçanlarda da belirgin glomerüler hipertrofi ve hiperfiltrasyon gelişmekte ancak bu adaptif değişiklikler sistemik hipertansiyon yokluğunda zedeleyici olmamaktadır. Ancak Griffin KA ve arkadaşlarının (27) yapmış oldukları bir deneysel çalışmada normotansif sıçanlarda uzun dönemde yavaş da olsa glomerülosklerozun gelişeceği gösterilmiştir. Fujihara ve ark. (28) 'nin yapmış oldukları bir çalışmada ise 5/6 nefrektomi yapılan sıçanlara mikofenolat mofetil(MMF) verilmiştir. Amaç allograft rejeksiyonunu önlemek amacıyla kullanılan ve lenfosit proliferasyon inhibitörü olan bu ilacın renal ablasyon sonrası böbrek üzerine olan etkilerini görmektir. Araştırma sırasında sıçanlarda 5/6 nefrektomi sonrası 30 gün içerisinde sistemik hipertansiyon, glomerüler kapiller hipertansiyon, tek nefron hiperfiltrasyon ve hiperperfüzyonu yanısıra glomerüler büyüme olduğu görülmüş, 60 gün sonra ise glomerüloskleroz gelişmiştir. Santos ve arkadaşlarının yapmış oldukları deneysel çalışmada (25) rezeke edilen böbrek miktarı arttıkça glomerüloskleroz gelişiminin o kadar yoğun olduğu saptanmıştır. Özet olarak renal ablasyon nefropatisi glomerüllerde fokal-segmental skleroz (29) meydana getirmektedir. Progresif nefron yıkımı esas olarak, postglomerüler hipertansiyon, peritübüler kapillerlerde azalmış plazma akımı ve proksimal tübüler hücrelerin masif protein yüküne maruz kalması gibi postglomerüler fiziksel değişikliklerle ilişkili olabilir (30). Ayrıca, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, bölgesel hücrelerin aktivasyonu yanı

sıra serbest radikal üretimi de renal ablasyon nefropatisi patogenezinde rol alıyor olabilir (22,30). Çıkarılan renal kitlenin büyüklüğü de skleroz oranını etkilemektedir.

### *iii. Matriks metalloproteinazlar*

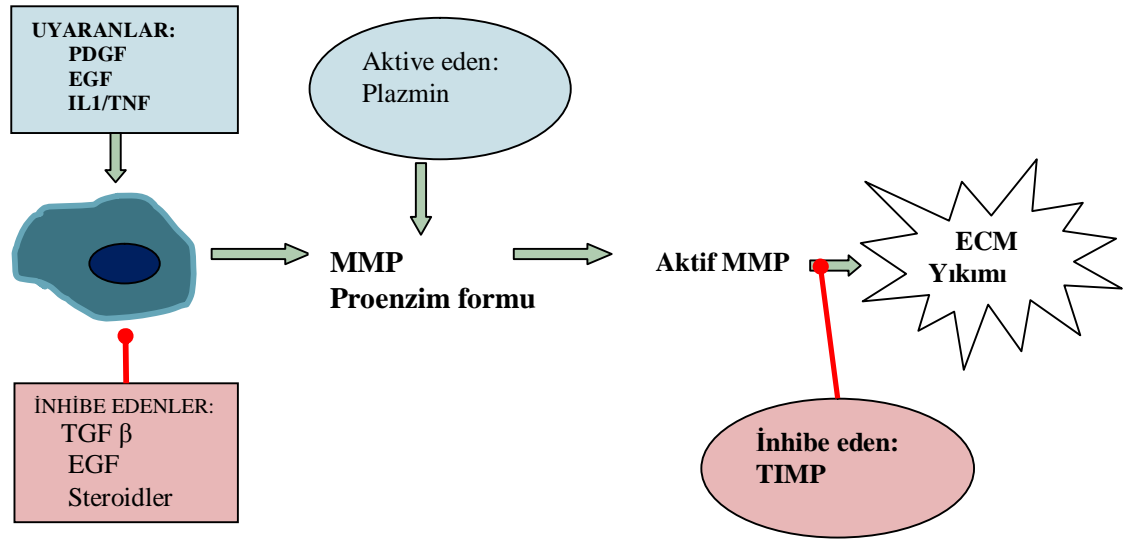
MMP'lar matriks yıkımını yapan enzimlerdir. Fibroblastlar, makrofajlar, nötrofiller, synovial hücreler ve bazı epitel hücreleri gibi pek çok hücre tarafından sentez edilirler. MMP ailesi çok sayıda enzimi içerir ( Tablo 3 ). Bu ailenin üyeleri endometrial siklus (31), morfogenez (32), anjiogenez (33) , apoptoz (34), kemik uzaması (35), üreme (36), ülser (37), dokunun yeniden yapılandırılması (38), multiple skleroz (39), malign gliomlar (40), sistemik lupus eritematozis, artritler (41) ,periodontid (42,43), ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıklar (44-46), doku ülserasyonu, kanser hücresi invazyonu (47-51), gibi pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte görev alır (52). MMP'nin renal hastalıklar üzerinde de önemli bir rolü vardır (4,53,54,55).

MMP'lar preproenzimler olarak sentez edilirler. Lökosit ve plazmin gibi proteinazlar tarafından üretilen serbest radikaller tarafından aktive edilirler. Bu enzimlerin çinko içeren kısımları onların katalitik aktivitesinden sorumludur (38,56).

**Tablo 3. Matriks Metallo proteinaz ailesi ve substratları**

MMP AİLESİ		ANA SUBSTRATLAR
İntertisyel kollajenaz ( MMP 1)	KOLLAJENAZLAR	Fibriller kollajenler :
Nötrofil kollajenaz ( MMP 8)		Tip I
Kollajenaz-3 ( MMP 13 )		Tip II
Xenopus Kollajenaz ( MMP 18)		Tip III
Gelatinaz A ( MMP 2 )	GELATİNAZLAR	Fibriler olmayan kollajenler:
Gelatinaz B ( MMP 9 )		Tip IV
		Tip V
Stromelizin-1 ( MMP 3 )	STROMELİZİNLER	Proteoglikanlar
Stromelizin-2 ( MMP 10 )		Laminin
Matrilizin ( MMP 7 )		Fibronektin
		Fibriler olmayan kollajenler
Stromelizin-3 ( MMP 11 )		Serin proteaz inhibitörleri
Metalloelastaz ( MMP 12 )	ELASTAZLAR	Elastin
		Fibriler olmayan kollajenler
MT1-MMP ( MMP 14 )	MEMBRAN TİP	Progelatinaz A
MT2-MMP ( MMP 15 )		
MT3-MMP ( MMP 16 )		
MT4-MMP ( MMP 17 )		
MT5-MMP ( MMP 21 )		
Enamelizin ( MMP 20 )	SINIFLANDIRILAMAMIŞ	BİLİNMIYOR
MMP 19		
MMP 23		
MMP 24		

MMP ekspresyonunun regülasyonu büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler, fagositoz, fiziksel stress, selüler transformasyon ile kontrol edilirken; MMP proteolitik aktivitesinin inhibisyonu TGF  $\beta$ , steroidler ve TIMPs ile yapılır. Doku inhibitörleri olan TIMP'ler pek çok mezankimal hücre tarafından sentez edilir ve MMP'ların kontrolsüz yıkım yapmalarını engeller (38,56,57) ( Şekil 2).



**Şekil 2. MMP Regülasyonu**

#### *iv. Matriks metalloproteinaz inhibitörleri*

MMP'ların proteolitik aktiviteleri, prekürsörleri üzerinden ve endojen inhibitörler ile sağlanır. Bu endojen inhibitörler metalloproteinazların doku inhibitörleridir; TIMP (56,57).

MMP regülasyonunun, MMP prekürsörleri üzerinden kontrolü, MMP genlerinin gen ekspresyonunun azaltılması ya da artırılması ile yapılır. Bu kontrol mekanizmasına etki eden faktörlerin bazıları; büyüme faktörleri, sitokinler, forbol esterleri gibi kimyasal ajanlar, fiziksel stres, onkojenik selüler transformasyon, transforming growth faktör, retinoik asit ve

glukokortikoidlerdir. Sadece eriyebilen maddeler değil hücre-matriks ilişkisi ve hücreler arasındaki ilişki de bu genlerin ekspresyonlarını etkileyen faktörlerdir (57).

MMP'ların doku düzeyindeki inaktivasyonu ise TIMP'ler tarafından sağlanır. TIMP'lar MMP'ların dokulardaki endojen inhibitörleridir. Tanımlandıkları zamanlara bağlı olmak üzere TIMP1'den TIMP4'e kadar 4 tip doku inhibitörü bulunmaktadır. TIMP'ler tümörigenezde, metastazda ve anjiogenezde hücre invazyonunu engellerler. Yalnızca doku düzeyinde değil hücre düzeyinde de etkinlikleri tespit edilmiştir. Apoptoz, mitoz ve hücre büyümesi üzerine de TIMP'lerin etkinliği mevcuttur. TIMP içerisinde bulunan sistin terminali MMP'ın katalitik çinko ucuna bağlanır ve onu etkisiz hale getirir (38,52).

#### *v. Non-İnflamatuvar glomeruler hastalıklarda matriks metalloproteinazların yeri*

Glomeruler hastalıkların çoğu selüleritede meydana gelen değişikliklerle karakterizedir. Bu durum ESM kompozisyonunu da yakından etkilemektedir. Glomerullerde ekstraselüler matriks yıkımının temel düzenleyicileri MMP'lardır (38). Normal şartlar altında ekstraselüler matriks sentezi ve yıkımı arasında bir denge mevcuttur. Çeşitli nedenlerle meydana gelen MMP ekspresyonundaki değişiklikler ekstraselüler matriksin değişimine ve glomeruler hasarlanma yanısıra glomerüler skar oluşumuna ve renal yetmezliğe sebep olur (55).

Non-inflamatuvar glomerular hastalıklarda MMP'nin rolü çeşitli deneysel çalışmalarla değerlendirilmiştir. Genel olarak hipertansif glomeruloskleroz, hidronefroz, eroin nefropatisi, siklosporin nefropatisi gibi non-inflamatuvar glomerüler hastalıklarda MMP'ların down regülasyonu görülmüştür (55). Streptozosin verilmiş diabetik sıçanlar ile yapılan bir çalışmada diyabetik nefropati gelişen sıçan böbreklerinde MMP azalma (6) yanısıra TIMP-1 düzeylerinde artış (8) tespit edilmiştir .

Progresif glomeruloskleroz pek çok hastalıkta ortaya çıkabilir. Progresif glomeruloskleroz, Ekstraselüler matriks yapım ve/veya yıkımındaki bozukluk nedeniyle gelişen matriks birikimi ve bunun sonucunda glomerülün mezangial matriksinde meydana gelen artış ile karakterlidir.

Steinmann-Niggli K ve ark.'larının (58) 63 sıçan üzerinde yaptıkları bir çalışmada anti-Thy1.1 akut mezangial proliferatif nefrit modelinde nefrotik hayvanlara verilen sentetik MMP inhibitörü ile mezangial hücre proliferasyonunda, ESM birikiminde, glomerular hipertrofi ve proteinüride azalma tespit edilmiştir. Kollajen IV ve fibronektin gibi ESM komponentleri, MMP ve TIMP ekspresyon farklılıkları diyabetik ve diğer nefropatilerde incelenmiştir (3,54, 59,60). Tübüllerin çevresinde ve glomerüllerde ESM'in artması diyabet için tipiktir (61,62). Ahuja ve ark.'larının (63) yayınladıkları bir olguda kresentrik glomerülonefriti olan bir hastanın akne tedavisi nedeniyle doksisisiklin alması sonucu proteinürisinde %70 azalma tespit edilmiştir. Doksisisiklinin kesilmesi ile proteinüri hızla artmıştır.

#### *vi. Doksisisiklin ve etki mekanizması*

Tetrasiklinler geniş-spektrumlu ilk antibiyotiklerdir. Değişik mikroorganizmalara karşı etkin olduklarından çoğunlukla herhangi bir ayırım gözetilmeden kullanılırlar. Tetrasiklinler Mycoplasma pneumoniae, klamidy, riketsiyalarla bazı spiroketler tarafından oluşturulan enfeksiyonlar için seçilmesi gereken ilaçlardır (64). Bakteri ribozomlarında protein sentezini baskılayarak bakteriyostatik etki oluştururlar, bakteri hücresi içerisine girerek ribozomların 30S alt-birimine bağlanırlar ve bunun sonucunda 50S alt birimin akseptör noktasına aminoasil transfer RNA'nın bağlanmasını bloke ederler ve böylece peptid zincirine aminoasit eklenmesini olanaksız duruma getirirler (65).

Dört halkalı hidronaftasen çekirdeğine eklenen yan grupların oluşturduğu değişik farmakolojik özelliklere göre üç gruba ayrılırlar;

- 1) Kısa etkili tetrasiklinler: klortetrasiklin, oksitetrasiklin, tetrasiklin
- 2) Orta etkili tetrasiklinler: demoksiklin, metasiklin
- 3) Uzun etkili tetrasiklinler: doksisisiklin, minosiklin

Tedavi dozlarında bakteriyostatik olan bu antibiyotiklerin, antimikrobiyal spektrumları benzerdir.



Minosiklin ve doksisisiklin en lipofilik olan gruplar olup, tüm vücut dokuları ve sıvılarına dağılımları iyidir. Doksisisiklin tetrasiklin ailesinin bir üyesidir. Antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Aynı zamanda MMP inhibitörüdür. Doksisisiklin MMP'lerin inhibisyonunu bu enzimlerin çinko içeren katalitik bölümüne bağlanarak gerçekleştirir, geniş bir etki spektrumuna sahiptir (66). Roach ve arkadaşları, sıçanlarda yapmış oldukları deneysel bir çalışmada, ağızdan doksisisiklin uygulamasının iskelet kasındaki MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini inhibe ederek iskemi reperfüzyon hasarında azalmaya yol açtığını göstermişlerdir (10). Ayrıca Afsoon ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir pilot çalışmada diyabetik proteinürili hastalara non-selektif MMP inhibitörü olan doksisisiklin verilmiştir ve yaklaşık 4 ay sonra proteinüride anlamlı miktarda azalma tespit edilmiştir(53).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Deneysel Yöntem

Bu çalışmada, ağırlıkları 200–400 gr arasında değişen 28 adet dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Kullanılan deney hayvanları, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvar'ından sağlanmış olup %87 homojenitesi vardı. Deneysel çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan etik kurul onayı alınmıştır.

Sıçanlar apex kafeslerde, 7'şer rattan oluşan 4 grup halinde izlendi. Hayvanların standart pellet yemlerinde ve içme sularında kısıtlama yapılmadı. Deney süresince, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma birimi laboratuvarında optimal koşullarda ( ısı:  $22\pm 2$  C, nem:  $\%55\pm 5$  ) tutulan sıçanlardan, I ve II. gruplara unilateral nefrektomi uygulanımı ardından geriye kalan böbreğe subtotal ( 2/3 ) nefrektomi uygulandı. Sıçanlara bu işlem sırasında eter ile anestezi uygulandı.

Bu gruplardan, birinci ve ikinci gruba sağ nefrektomi yapıldıktan sonra, sol böbreğin yaklaşık 2/3'lük bölümünde, sol renal arterin extrarenal dallarının 3 ya da 4'ünün 2 ya da 3'ünde selektif ligasyon ile infarkt oluşturuldu (67,68). Subtotal (5/6) nefrektomi uygulanan ikinci gruba ayrıca doksisisiklin verildi. Üçüncü grubu oluşturan sıçanlara yalnızca doksisisiklin verildi, subtotal (5/6) nefrektomi uygulanmadı. Dördüncü grubu oluşturan sıçanlar kontrol grubu olarak kabul edildi; subtotal (5/6) nefrektomi uygulanmadı ve doksisisiklin verilmedi. Doksisisiklin sıçanların günlük sularına katıldı. Günlük doz 40mg/kg/gün olarak belirlendi. (69) 28. günde sıçanlar toksik doz eter ile sakrifiye edildi. Sıçanların böbreklerinin 1/3'ü disseke edilerek zymografi, ELISA ve Western blot analiz işlemi için ayrıldı. Geriye kalan böbrek dokusu ( böbreğin 2/3'ü ) patolojik inceleme için alındı.

## 2. Patolojik İnceleme Yöntemi

Histopatolojik inceleme: Patolojik inceleme için alınan böbrek dokusunun 1/3'ü formaldehit içerisinde fikse edildi. Formaldehit ile fikse edilmiş dokular doku takibi işlemlerinden sonra parafin içerisinde gömülerek bloklandı. Daha sonra 2 mikron kalınlığında doku kesitleri alınarak hematoksilin eosin ve PAMS boyaları ile boyandı.

### *i. Glomerulosklerozun değerlendirme yöntemi*

Segmental skleroz oranı Hematoksilin Eozin ( H&E) ve periodic acid methenamin silver (PAMS) ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopi düzeyinde değerlendirildi. Artmış mezangial matriks ve kapiller kollaps içeren alanlar glomeruloskleroz olarak değerlendirildi (70,71). Her sıçana ait kesitlerde Gürayve arkadaşları (26) nın yapmış oldukları çalışmadaki gibi 100 glomerül değerlendirildi. Normal (0), hafif skleroz (1+, lezyon glomerüler yapılanmanın %50'sinden daha azında ise ), yaygın skleroz (2+, lezyon, glomerüler yapılanmanın %50'sinden daha fazlasında ise) ya da global sklerotik (3+, lezyon glomerüler yapılanmanın %100'ünü tutuyor ise) olarak skorlandı.

### *ii. İmmünohistokimyasal değerlendirme yöntemi*

Formaldehit ile fikse dokulardan poly-/ lizinli lamlara alınan kesitler ksilol'de 20 dakika inkübe edildi. Ardından, toplam 30 dakika süren ve birbirini takip eden %96, %90, %80 and %70 alkol serisinden geçirildi. Kesitler musluk suyunda yıkandıktan sonra sitrat tampon içerisinde 15 dakika süre kaynatıldı. İmmünohistokimyasal boyama Lab Vision Autostainer 360 ile gerçekleştirildi. Daha sonra 5 dakika süre tris solüsyonu içerisinde bekletilen kesitler %3 'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak 15 dk. bekletilmiştir; ardından tekrar 10 dakika süre ile tris solüsyonu içerisinde bekletildi. Large Volume Ultra V Block damlatılarak 5 dk. protein bloklaması yapılmış ve TIMP-2 (1/50, Neomarker) ve tip IV kollajen (prediluted, Neomarker) primer antikorları uygulandı. 1 saat süren primer antikor uygulamasının ardından kesitler tris solüsyonu ile yıkandı. Ardından Biotinylated Goat Anti-polyvalent ile 20 dk süreyle yıkanmıştır ve onu izleyen tris yıkamasından sonra kesitler Large Volume Streptavidin Peroxidase ile 20 dk süreyle yıkanmıştır. DAB Kromojen damlatılarak 7 dk

süreyle bekletilmiştir.(DAB Kromojen solüsyonu 10 ml Tris içinde DAB kromojen tabletin eritilip 3 damla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenmesiyle elde edilmiştir.)Daha sonra distile su ile yıkanmış ve Mayer's hematoksilen ile boyanarak birbirini takip eden %70, %80, %90 ve % 96 alkol serilerinden geçirildi. Son olarak 20 dakika ksilol'de bekletilen dokular kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi

Glomerular ekspresyon semikantitatif olarak (0:negatif, 1:hafif 2:orta derece, 3:yaygın) her antikor için değerlendirildi. (72)

### *iii. İmmünofloresan ile değerlendirme yöntemi*

Böbrek dokusunun 1/3'ü -50 C'de CO<sub>2</sub> jet ile donduruldu. Kesitler aseton ile fikse edildikten sonra 5 dakika phosphate buffered saline solüsyonu (PBS) ile yıkandı ve MMP9 (1/50, Santa Cruz Biotechnology) primer antikorunu 20 dakika uygulandı. PBS ile yıkanan kesitlere floresan izotiyosiyanat işaretli sekonder antikor (1/50, Eugene, Oregon, USA) uygulandı. Tekrar PBS ile yıkanan kesitler glysergel ile kapatılarak immünofloresan mikroskobunda incelendi. Glomeruler boyanma semikantitatif olarak (0:negatif, 1:hafif, 2:orta derece, 3:yaygın) değerlendirildi (73).

## **3. Biyokimyasal Yöntem**

### *i. Jelatinazlar (MMP-2, MMP-9) ve TIMP-1, TIMP-2 için dokuların hazırlanması*

Sıçanlardan alınan örneklerinden 100 mg doku tartıldı. Doku örneklerine ağırlıklarının 10 katı hacminde (1 ml) ekstraksiyon ortamı (0.15 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub> ve % 0.05 Brij 35 içeren 50 mM Tris-HCl pH 7,0 ) ilave edildi. Sonics marka (Sonics&Materials Inc, Danbury Conneticut USA) sonikatör ile buz üzerinde homojenize edildi. 10 000xg de 10 dak. santrifüj edildikten sonra supernatantlar alındı ve analiz süresine kadar -80 °C de saklandı.

### *ii. Protein Analizi*

Protein düzeyleri Bicinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile belirlendi. Yöntemin temeli alkali ortamda Cu<sup>+2</sup>-protein kompleksi oluşumuna ve Cu<sup>+2</sup> nin Cu<sup>+1</sup> indirgenmesine

dayanmaktadır. Örneklerde var olan protein miktarı indirgenmiş  $\text{Cu}^{+1}$  miktarı ile doğru orantılıdır. Oluşan renk oluşumu 562 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA) proteini kullanıldı. 7 farklı konsantrasyonda (25, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) hazırlanan standart ile oluşturulan standart ölçümleme eğrisinden yararlanılarak örneklerdeki protein miktarı hesaplandı. (74)

### *iii. Jelatin Zimografi*

Jelatin Zimografi yöntemi jelatinazlar olarak adlandırılan MMP-2 ve MMP-9'un hem zimojen (pro), hem de aktif formlarının aynı jel üzerinde saptanmasına izin veren elektroforetik bir yöntemdir. Yöntem, substrat (jelatin) içeren sodyum dodesil sülfat (SDS) jelin (SDS-PAGE) inkübasyonu sırasında açığa çıkan proteazlar tarafından yıkıma uğratılmasına dayanır. Proteolizisin gerçekleştiği bölgeler, jelin coomassie mavisini ile boyanması sonucunda koyu mavi zemin üzerinde beyaz bantlar olarak ortaya çıkan alanlar olarak belirlendi.(75)

### *iv. Jelatin Zimografi Yönteminin Uygulama Aşamaları*

Doku örneklerinden elde edilen homojenatlarda mevcut jelatinazların aktivitelerini ölçmek için %1 Tip I jelatin ve %10 SDS içeren % 7,5'lük poliakrilamid jeller kullanıldı:

- Ü Laemmli'nin tanımladığı gibi SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez) jel hazırlandı (75). Önce ayırıcı jel % 7,5 oranında hazırlandı (Tablo 6) ve önceden kurulmuş olan elektroforez düzeneğinde yer alan iki cam arasına döküldü ve 1 saat jelin polimerize olması için beklendi. Jel-hava temasını engellemek için yüzey üzerine n-propanol eklendi.
- Ü Jelleşme gerçekleştikten sonra % 4 oranındaki paketleyici jel hazırlandı (Tablo 6) ve ayırıcı jel üzerine döküldü. Örneklerin uygulanacağı kuyucukların oluşturulması amacıyla jel üzerine 12 dişli tarak yerleştirilerek jelleşme beklendi. Jelleşme oluştuktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkarıldı.

**Tablo 4. Jelatin Zimografi yönteminde poliakrilamid jellerin hazırlanması**

REAKTİF	% 7.5 AYIRICI JEL	% 4.0 PAKETLEYİCİ JEL
Bidistile su	7.7 ml	6.10 ml
10 mg/ml Jelatin substratı	2.0 ml	---
% 30 Akrilamid	5.0 ml	1.3 ml
1.5 M Tris-HCl, pH:8.8	5.0 ml	---
0.5 M Tris-HCl, pH; 6.8	---	2.5 ml
% 10'luk SDS	200 µl	100 µl
% 10'luk APS	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl

- Ü Hazırlanan jeller, elektroforez tankına yerleştirildi.
- Ü Eşit hacimde doku homojenatları, indirgeyici-olmayan örnek tamponu (Tablo 7) ile karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara 50 µg protein olacak şekilde uygun hacimde yüklendi.
- Ü Sisteme “Elektroforez Yürütme Tamponu” (Tablo 7) eklendi.
- Ü Elektroforez +4<sup>0</sup>C soğuk oda koşullarında gerçekleştirildi. Karşılıklı iki jel için 125 sabit voltaj, 40-60 mA/jel 4.5 saat uygulanarak elektroforez yapıldı.
- Ü Elektroforezden sonra jellerden SDS’i uzaklaştırmak için jeller iki kez 15’şer dakika % 2.5’lik Triton X-100 “Renatürasyon Tamponu” ile yıkandı.
- Ü Daha sonra jeller, enzimlerin (MMP-2 ve MMP-9) jel içindeki substratlarını (jelatin) tüketmelerini sağlamak için 18 saat 37 <sup>0</sup>C’de “Aktivasyon Tamponu” ile inkübe edildi.
- Ü Jeller, % 0.5’lik Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandı ve % 40 metanol-% 10 asetik asit içeren tampon ile jel zeminindeki fazla boya uzaklaştırıldı.

- Ü Jellerin, jel dökümantasyon sistemi ile (UVP Marka Jel Dökümantasyon Sistemi) densitometrik analizi yapıldı. Her bir bantın (pro ve aktif) alan/mm<sup>2</sup> ve optik densitesi (OD) saptandı. Substrat jelin lizis miktarı “Alan x OD /µg protein” formülünden yararlanılarak hesaplandı.
- Ü Pozitif kontrol olarak MMP-2 ve MMP-9 un hem pro hem de aktif formlarını içeren ticari olarak üretilmiş MMP marker kullanıldı.
- Ü Kullanılan çözeltilerin içerikleri Tablo 7’de açıklanmaktadır.

**Tablo 5. Jelatin Zimografi yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması**

ÇÖZELTİLER	İÇERİK
Aktivasyon Tamponu	50 mM Tris-HCl, pH:7.6 10 mM CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, 50 mM NaCl, % 0.05 Brij 35
5x Yürütme Tamponu	125 mM Tris-HCl, pH:8.3 1.23 M Glisin % 0.5 SDS
Renatürasyon Tamponu Triton X-100	% 2.5’lik Triton X-100
2x İndirgeyici Olmayan Tampon	1.0 ml 0.5 M Tris-HCL, pH:6.8 0.8 ml Gliserol 3.2 ml %10’luk SDS 0.2 ml % 0.2’lik Bromfenol 2.8 ml d H <sub>2</sub> O
% 30’luk Akrilamid Çözeltisi	29.2 g Akrilamid 0.8 g N’N’-bisakrilamid % 0.5’lik Coomassie Brilliant Blue R-250
Boya Çözeltisi	% 40 metanol % 10 asetik asid
Jel Zeminindeki Boyayı Uzaklaştıran Çözelti	% 40 metanol % 10 asetik asid

#### *v. TIMP-2 ELISA Analizi*

Hazırlanan doku homojenatlarında TIMP-2 analizi, ELISA temelli Amersham marka (Kat No: RPN 2618) kit ile yapıldı. Bu ölçüm yöntemi, TIMP-2 düzeylerinin kantitatif olarak ölçümü için hazırlanmış “sandwich tip enzim immünoassay” tekniğine dayanır. Ölçüm gereçleri (standartlar, örnekler) daha önceden TIMP-2 için özel olan anti TIMP-2 ile kaplanmış olan kuyucuklara uygulanır ve inkübasyona bırakılır. Örnekler içinde bulunan TIMP-2 kuyucuklara bağlanır, kuyucuklara bağlı ilk antikor tarafından tanınan TIMP-2 at radish peroksidaz enzimi ile işaretli monoklonal anti TIMP-2 tarafından tanınır. Kuyucuklara bağlanmayan maddeler ve/veya antikor-enzim reaktifi yıkama işlemleri ile uzaklaştırılır. Her kuyucuktaki peroksidaz miktarı, TMB substratı (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin(TMB)/Hidrojen Peroksit) eklenerek belirlenir. Oluşan renkli çözeltinin absorbansı 650 nm de okunur. Beş adet farklı TIMP-2 standartı (8, 16, 32, 64, 128 ng/ml) kullanılarak standart kalibrasyon eğrisi hazırlanır ve bu standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak örneklerdeki bilinmeyen TIMP-2 konsantrasyonları belirlenir. Sonuçlar mg protein başına ng TIMP-2 olarak ifade edildi.

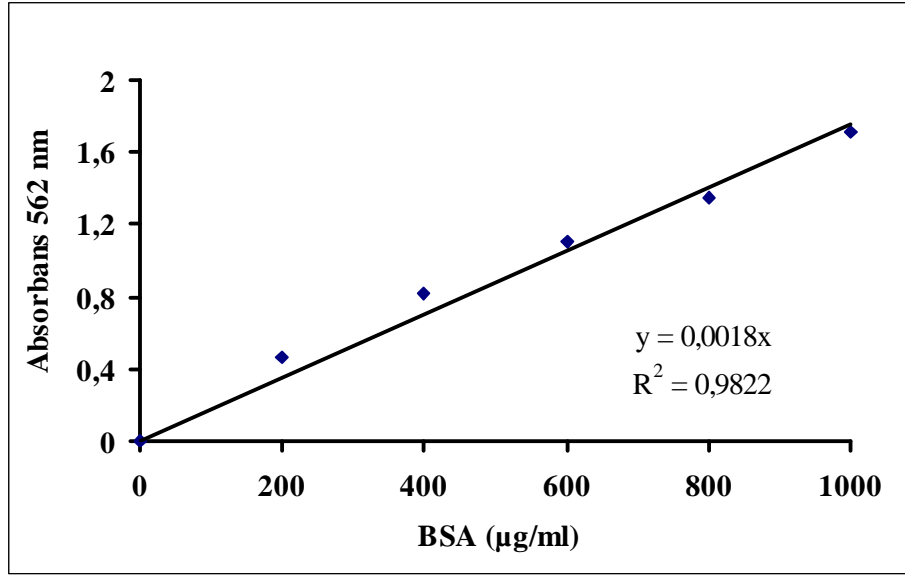
#### *vi. TIMP-1 ELISA analizi*

Dokulardan hazırlanan homojenatlarda TIMP-1 analizi için Amersham marka enzim immünoassay (EIA) kiti kullanıldı. TIMP-1 antikoruna ile kaplanmış kuyucuklara standartlar ve örnekler uygulandı. Örneklerdeki TIMP-1 in antikora bağlanması için inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklara bağlanmayan proteinler yıkama işlemi ile uzaklaştırıldı. Daha sonra tüm kuyucuklara “biotinlenmiş anti-TIMP-1 antikoruna” ilave edildi. Bağlanmayan fazla “biotinlenmiş antikoruna” ortamdaki uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapıldıktan sonra tüm kuyucuklara “Streptavidin ile konjuge edilmiş at radish peroksidaz (HRP) enzimi” eklendi. Yıkama işleminden sonra TMB solüsyonu eklenerek TIMP-1 miktarı ile doğru orantılı olarak gelişen renk oluşumu 450 nm de değerlendirildi. 1.56, 3.12, 6.25 ve 25 pikogram (pg)/ml TIMP-1 standartları ile oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak örneklerdeki TIMP-1 miktarı mg protein başına pg olarak ifade edildi.



*vii. Doku homojenatlarında protein düzeyleri*

Doku homojenatlarında protein düzeyleri Şekil’de gösterilen standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak hesaplandı.

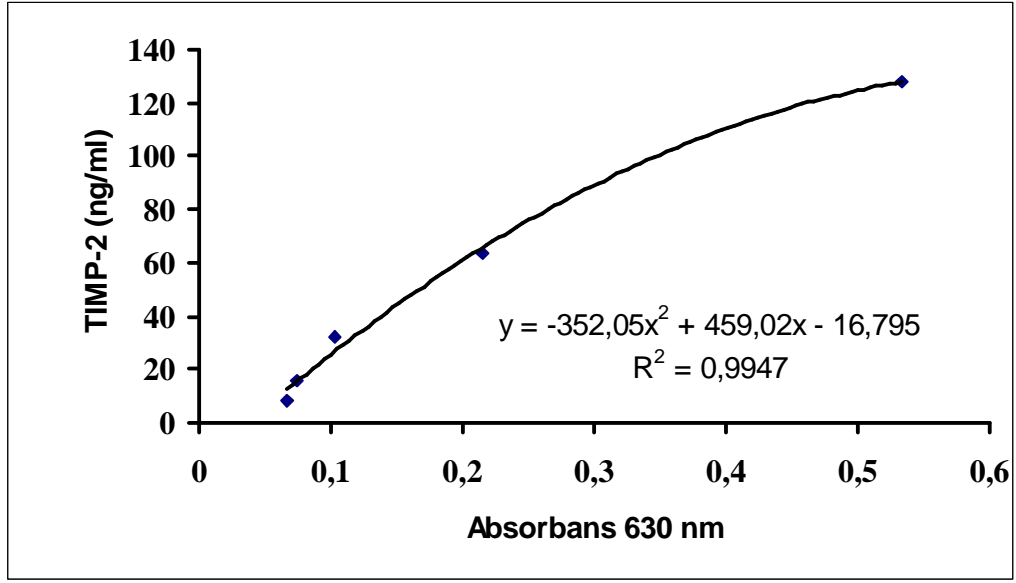


**Şekil 3: BSA standart kalibrasyon eğrisi**

Her doku örneği için saptanan protein düzeyleri; jelatinaz aktivite düzeylerinin µg protein başına (AU/µg protein), TIMP-2 düzeylerinin mg protein başına ng TIMP-2 (ng/mg protein) ve TIMP-1 düzeylerinin ise mg protein başına pikogram (pg) TIMP-1 (pg/mg protein) olarak ifade edilmesinde kullanıldı.

*viii. TIMP-2 Düzeyleri*

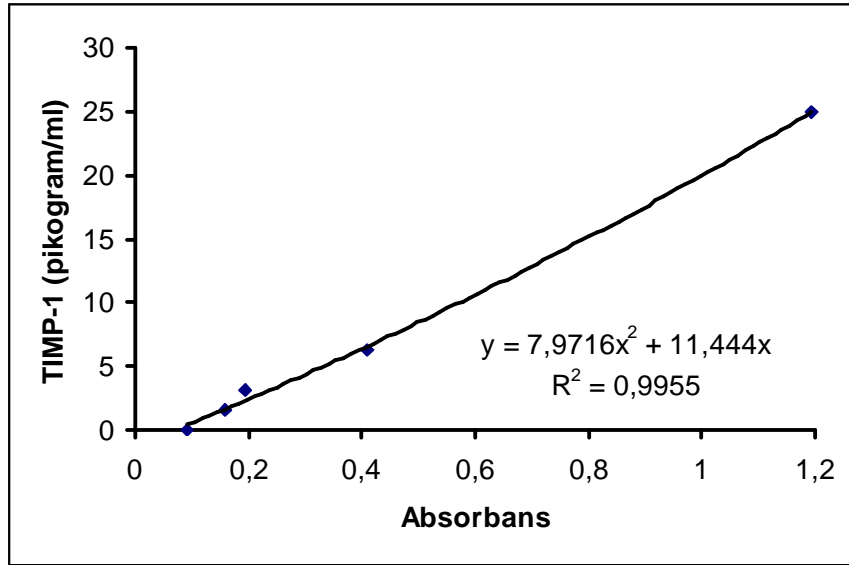
Dokularda TIMP-2 protein düzeyleri oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden (Şekil) yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 4: TIMP-2 standart kalibrasyon eğrisi

*ix. TIMP-1 Standart Kalibrasyon Eğrisi*

Dokularda TIMP-1 protein düzeyleri oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden (Şekil) yararlanılarak hesaplandı.



Şekil 5 : TIMP-1 standart kalibrasyon eğrisi

#### **4. İstatistiksel Yöntem:**

Tüm grupların değerlerinin ortalama ve standart sapmaları belirlendi. Önce tüm grupları karşılaştırmak için nonparametrik testler kullanıldı (Kruskal Wallis Testi) ve daha sonra fark saptanan gruplarda ikili karşılaştırma için Mann Whitney U Testi uygulandı. Bu işlemler sırasında Statistical Package for the Social Sciences 11.00 (SPSS Inc, Chicago, USA) bilgisayar programından yararlanıldı.

## **BULGULAR**

Glomeruloskleroz sadece kontrol grubunda izlenmemiş olup diğer gruplarda saptanmıştır. TipIV kollajen, MMP-9, TIMP2, farklı gruplarda değişen oranlarda izlendi. Biyokimya analiz sonuçları ve histopatolojik verilerin ortalama ve standart sapmaları Tablo 6'da sunulmuştur.

**Tablo 6. Glomeruloskleroz, Tip IV kollajen, MMP-9 ve TIMP II'nin skorları ile proMMP-9, proMMP-2, aktif MMP-2, TIMP 1 ve TIMP2'nin biyokimyasal ölçüm değerlerinin ortalama ve standart sapmaları (BTIMP1: Biyokimya TIMP 1, BTIMP2: Biyokimya TIMP 2 , BProMMP-9: Biyokimya ProMMP-9, BPro MMP-2: Biyokimya ProMMP-2, BAktif MMP-2: Biyokimya Aktif MMP-2)**

	<b>SKLEROZ</b>	<b>TipIVKoll</b>	<b>MMP 9</b>	<b>TIMP2</b>	<b>BTIMP1(pg)/ml</b>	<b>BTIMP2(pg)/ml</b>	<b>BProMMP-9(pg)/ml</b>	<b>BProMMP-2(pg)/ml</b>	<b>BAktif MMP-2(pg)/ml</b>
<b>Grup 1</b>	2,14±0,38	1,71±0,76	1,29±0,49	2,86±0,38	75,66±14,99	1083,21±129,82	1273419±335651,4	44837,37±19523,81	27983,02±25607,06
<b>Grup 2</b>	0,63±0,52	1,75±0,71	2,13±0,99	1,75±0,88	167,30±243,471	1201,7±137	1567954±285709,2	94796,95±46939,77	54216,61±22105,32
<b>Grup 3</b>	0,29±0,49	2,29±0,49	2,29±0,49	0,29±0,49	78,81±7,7	1164,74±182,04	898070,6±130706	52152,76±15107,95	23687,35±10954,45
<b>Grup 4</b>	0	2,83±0,41	0	0,5±0,55	45,70±2,82	662,40±73,23	1441713±568313,8	94249,79±21957,19	18191,06±10326,74
<b>Toplam</b>	0,79±0,92	2,11±0,74	1,5±1,07	1,39±1,2	96,21±132,99	1047,27±246,70	1299798±421437,2	71528,76±36784,82	32306,14±23009,52

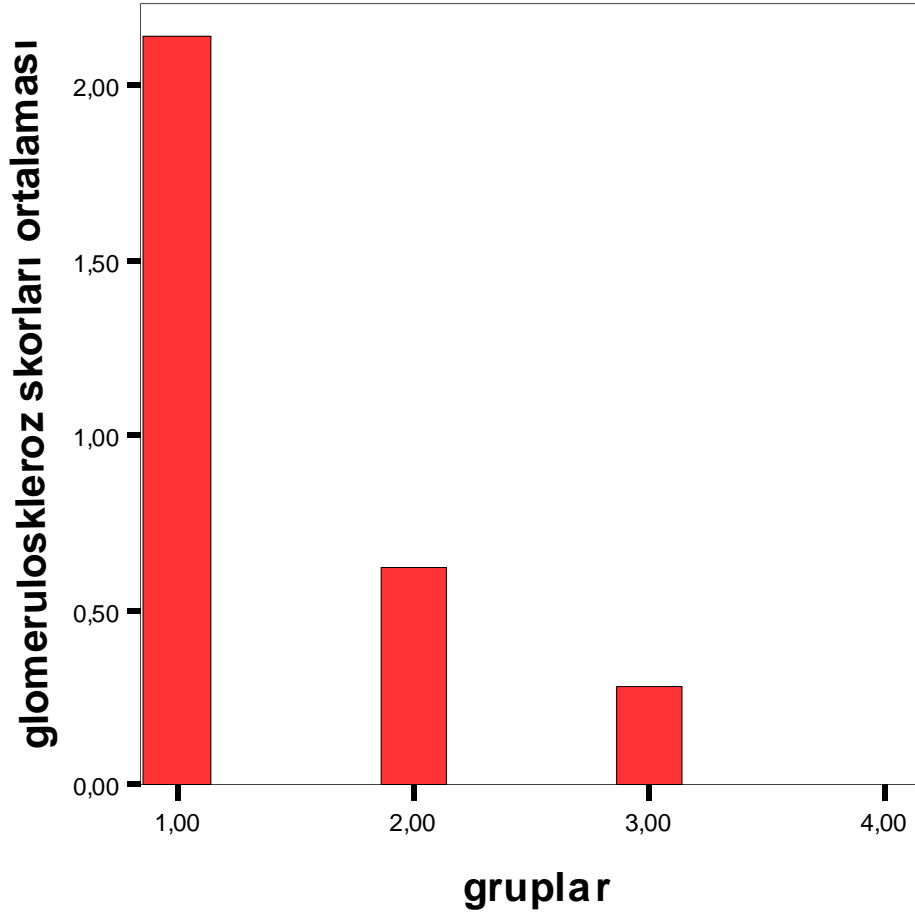
### 1.Glomeruloskleroz Bulguları:

Gruplar arasında glomeruloskleroz gelişimi açısından farkın değerlendirilmesi sonucu anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ , Kruskal Wallis Test). Glomeruloskleroz skorunun kontrol grubunda 0 olduğu, 5/6 nefrektomi grubunda en yüksek olduğu buna karşın 5/6 nefrektomi olup doksisiklin alanlarda belirgin olarak azaldığı saptandı. İlginç olarak sadece doksisiklin alan grupta da skleroz saptandı. Bu sıçanlarda izlenen skleroz, 5/6 nefrektomi olup doksisiklin alan gruptan daha az bulunmakla birlikte her iki grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. (Tablo 7, Şekil 6, Resim 1,2,3).

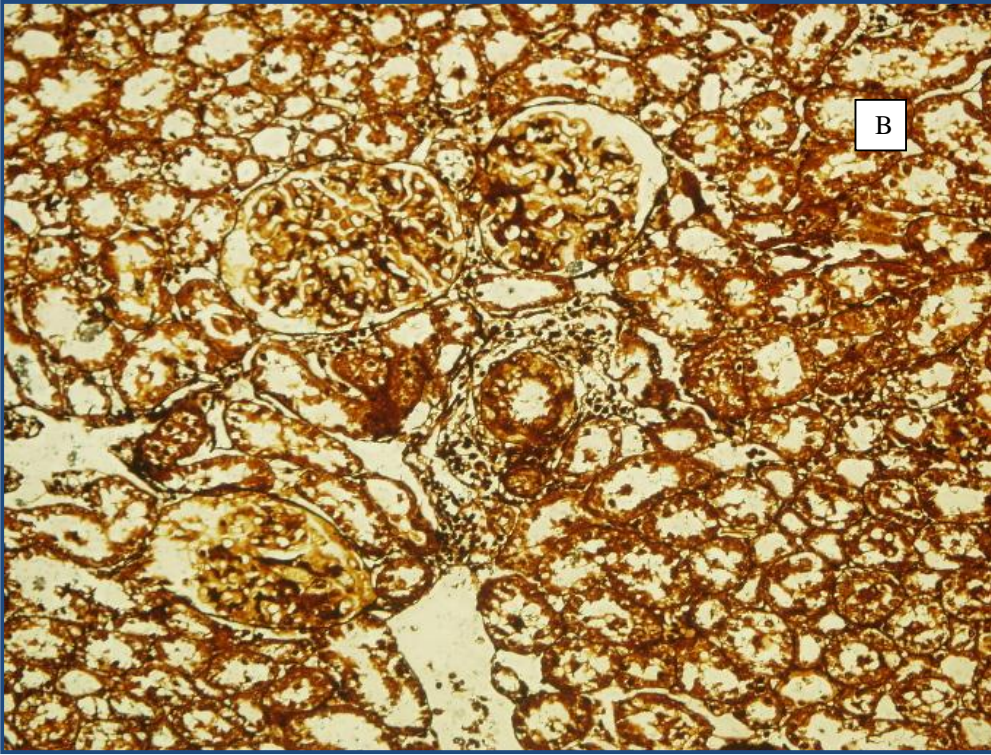
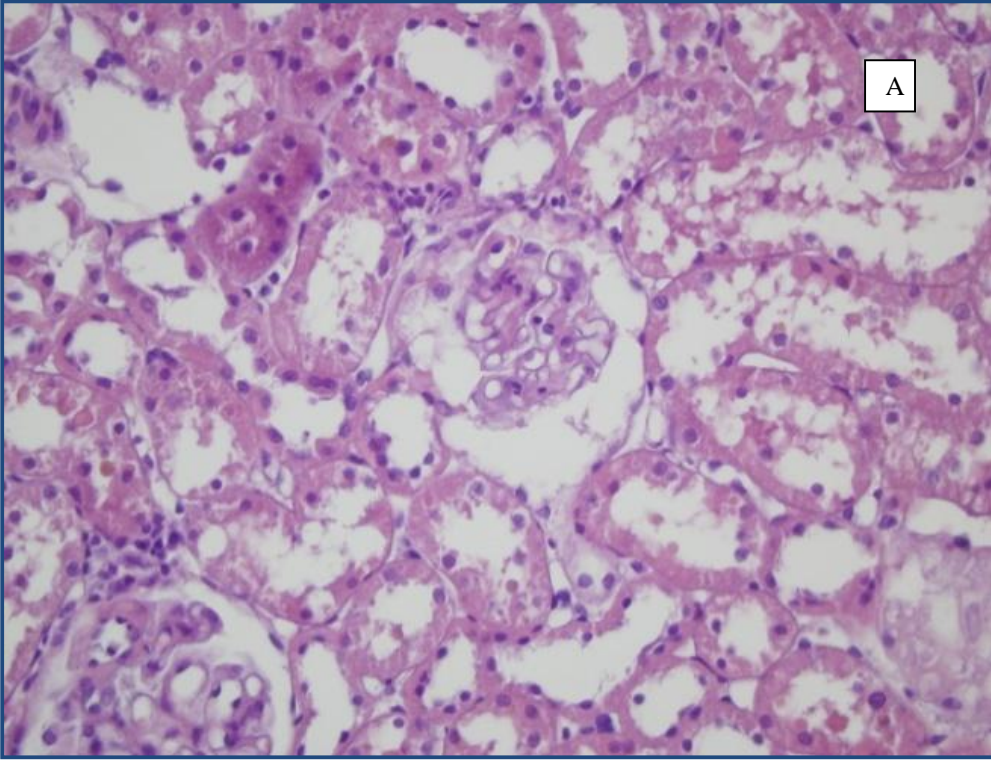
**Tablo 7. Glomeruloskleroz için yapılan değerlendirmede gruplar arası fark saptandı, Mann Whitney U Test p değerleri**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

Glomeruloskleroz	1.grup	2.grup	3.grup
1.grup			
2.grup	0,001		
3.grup	0,001	0,204	
4.grup	0,001	0,020	0,171



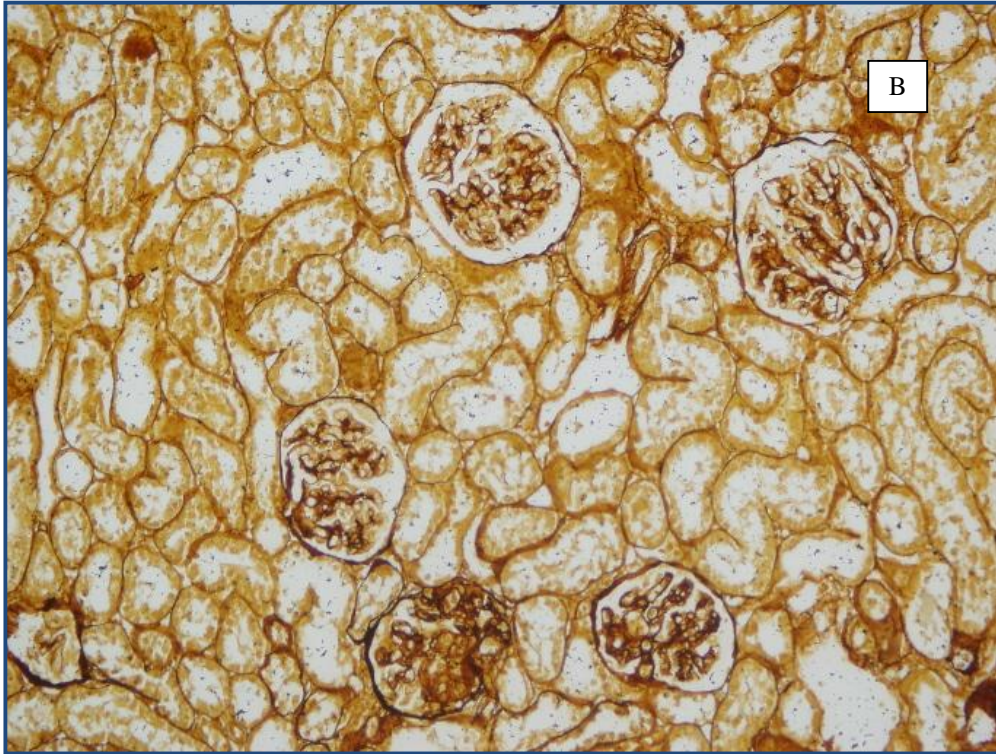
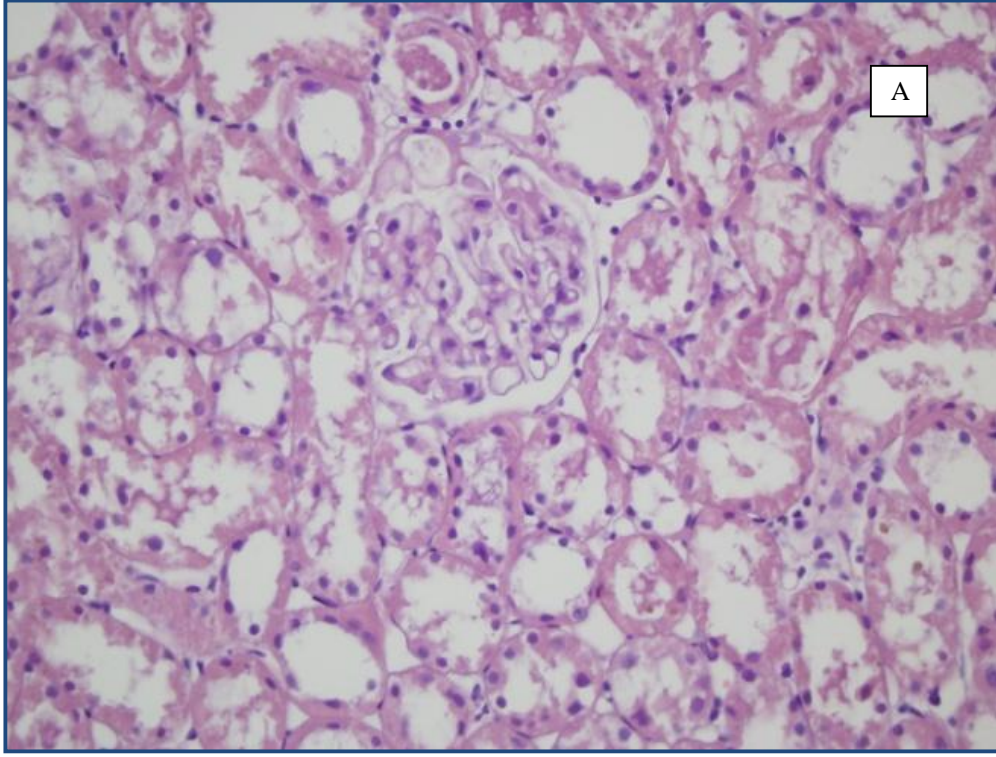
**Şekil 6: Gruplar arasında glomeruloskleroz gelişimi açısından farkın değerlendirilmesi**



**Resim 1:Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup**

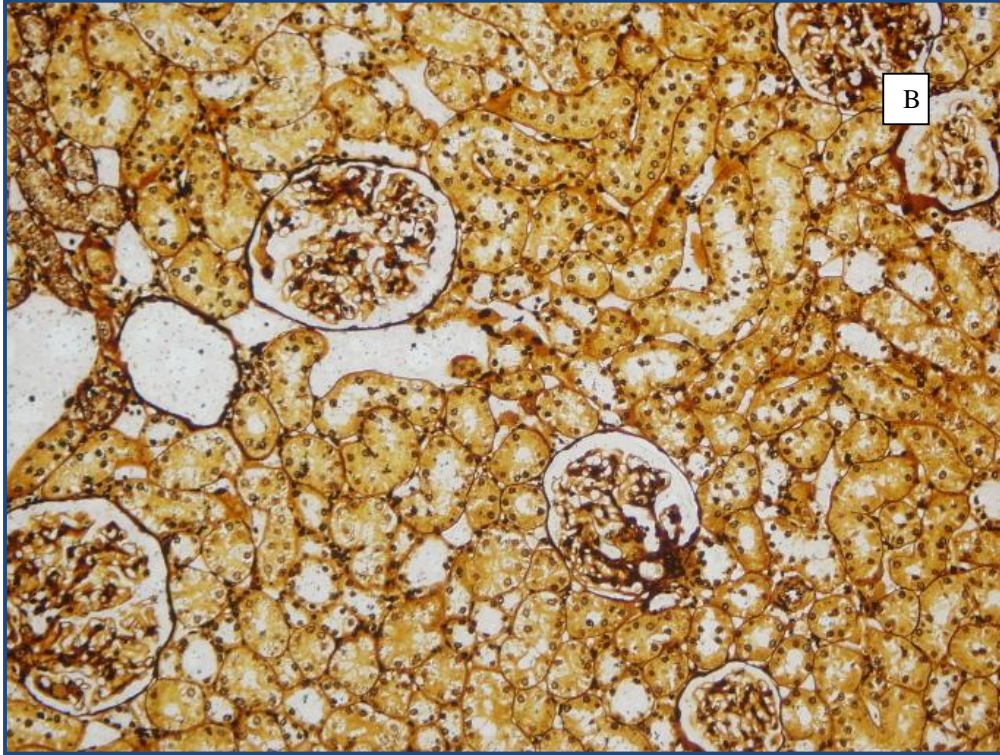
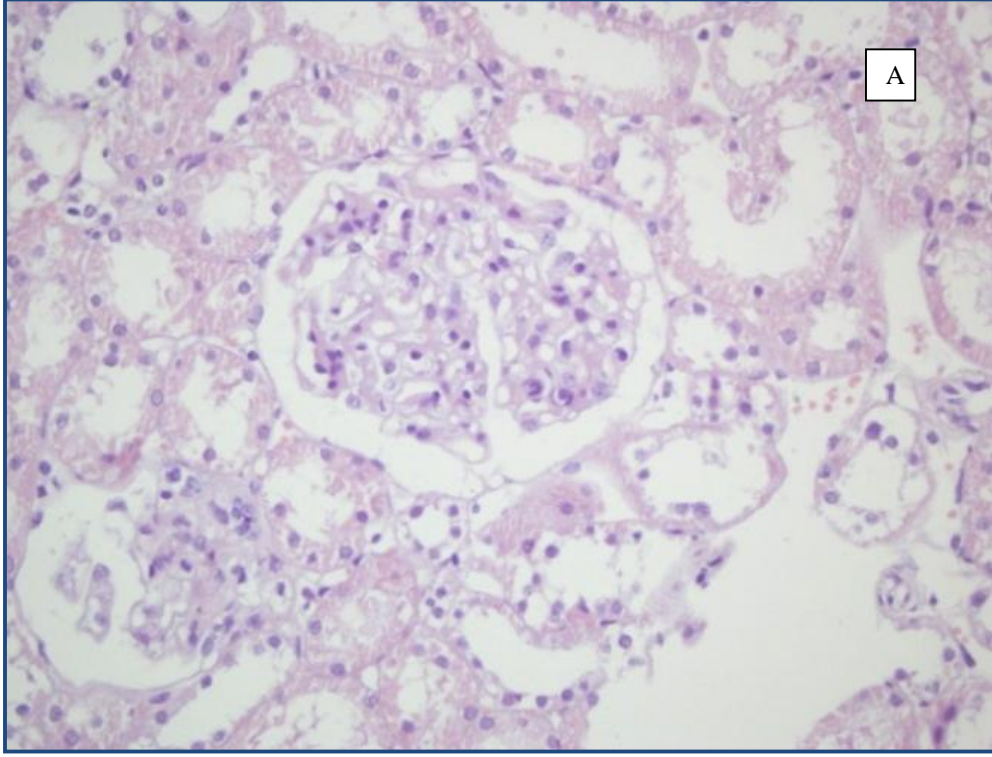
**A: HE boyası X 400 B: PAMS boyası X 200**





**Resim 2: Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisiklin verilen grup**

**A: HE boyası X 400 B: PAMS boyası X 200**



**Resim 3: Grup 3: Yalnızca Doksisiklin verilen grup**

**A: HE boyası X 400 B: PAMS boyası X 200**

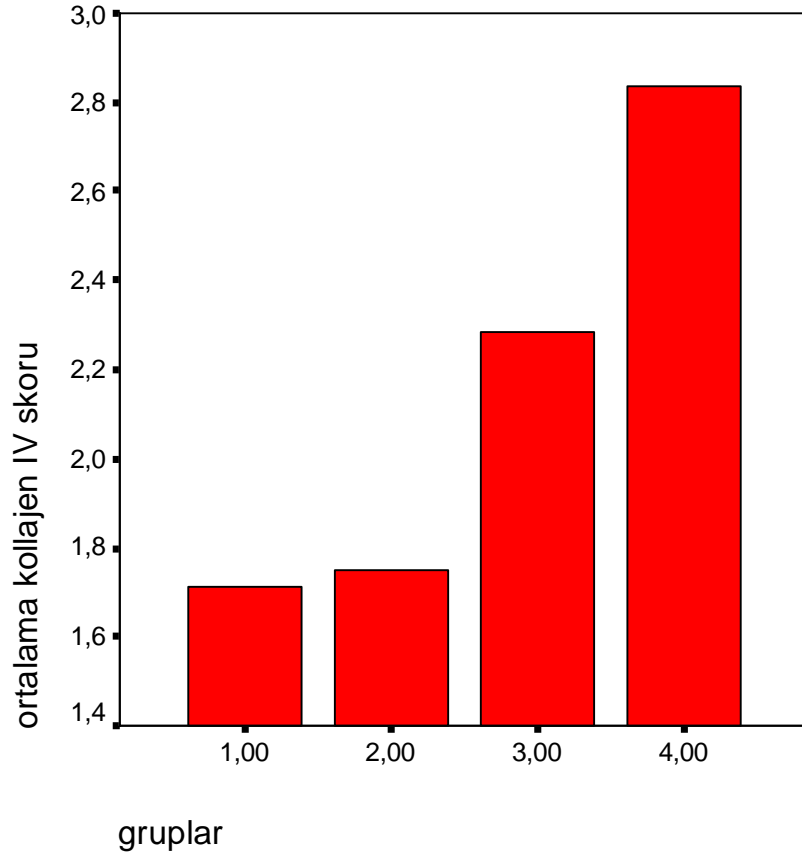
## 2.Kollajen Tip IV Ekspresyon Bulguları:

Gruplar arasında kollajen Tip IV ekspresyonu açısından farkın değerlendirilmesi sonucu anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ , Kruskal Wallis Test). İmmunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilen kollajen tip IV skorlarının kontrol grubunda en yüksek düzeyde olduğu buna karşın diğer gruplarda azaldığı saptandı. 5/6 nefrektomi olup doksisisiklin alan gruba ait kollajen skoru 5/6 nefrektomi grubundan daha yüksek olduğu saptandı. Sadece doksisisiklin alan grupta kollajen tip IV ekspresyonunun kontrol grubundan daha az oranda olduğu saptandı.(Tablo 8, Şekil 7, Resim 4,5,6,7)

**Tablo 8: Tip IV kollajen için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark, (Mann Whitney U Test )**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

Tip IV kollajen	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup
1.grup				
2.grup	0,116			
3.grup	0,116	0,01		
4.grup	0,014	0,01	0,058	



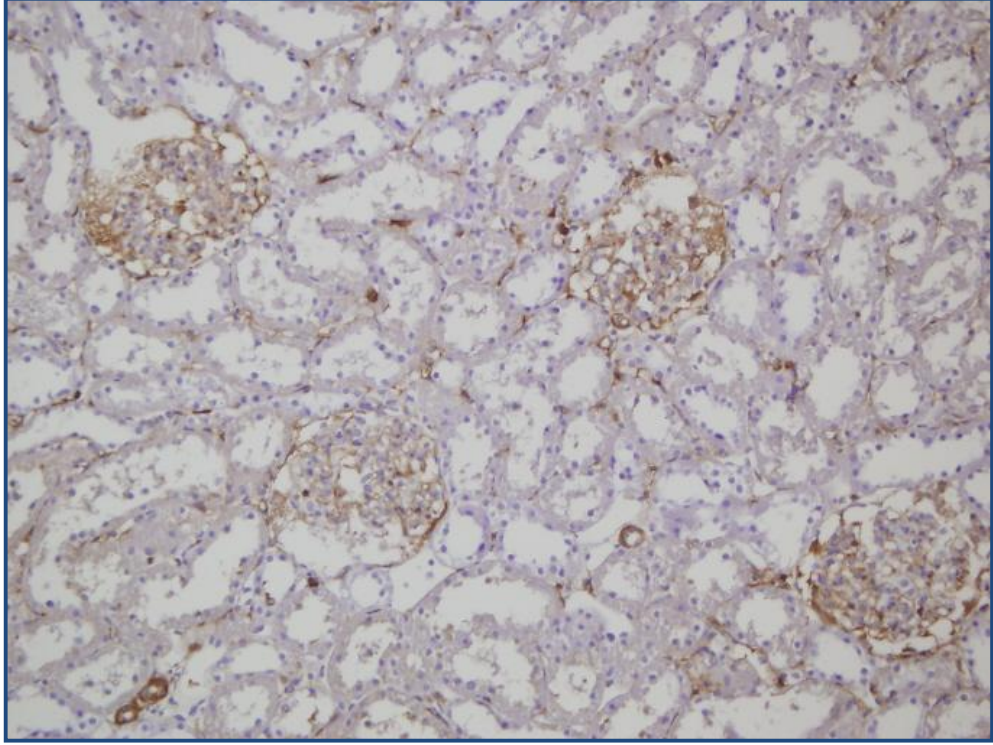
**Şekil 7:TipIV kollajen birikimi için gruplar arasında anlamlı fark saptandı (p=0,003 Kruskal-Wallis Test)**

Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup

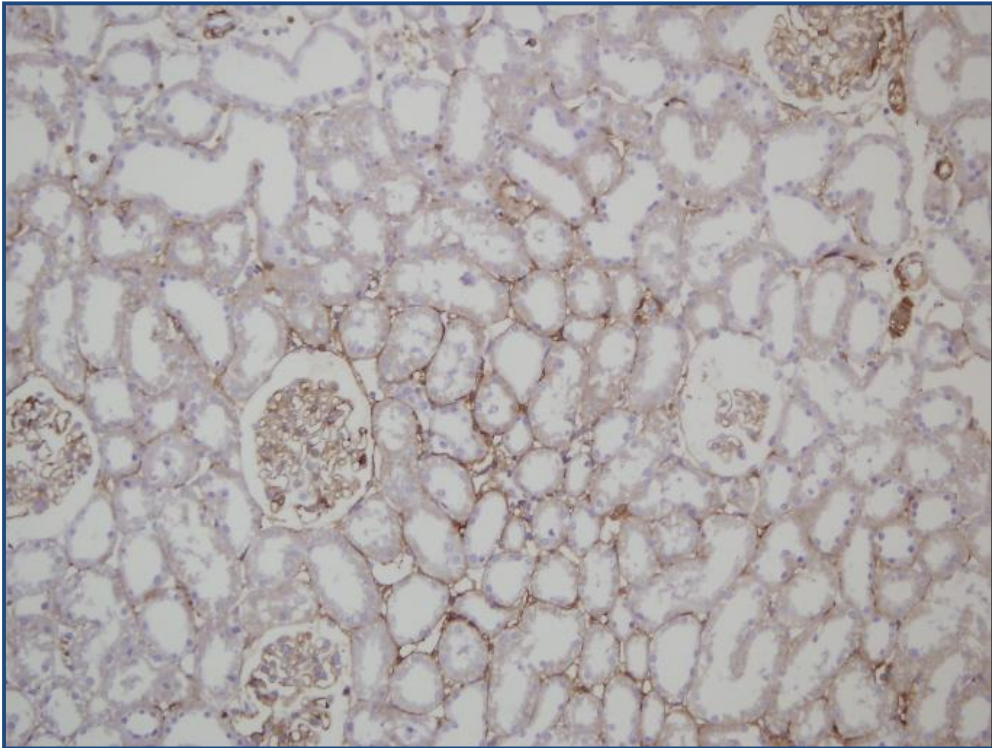
Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup

Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup

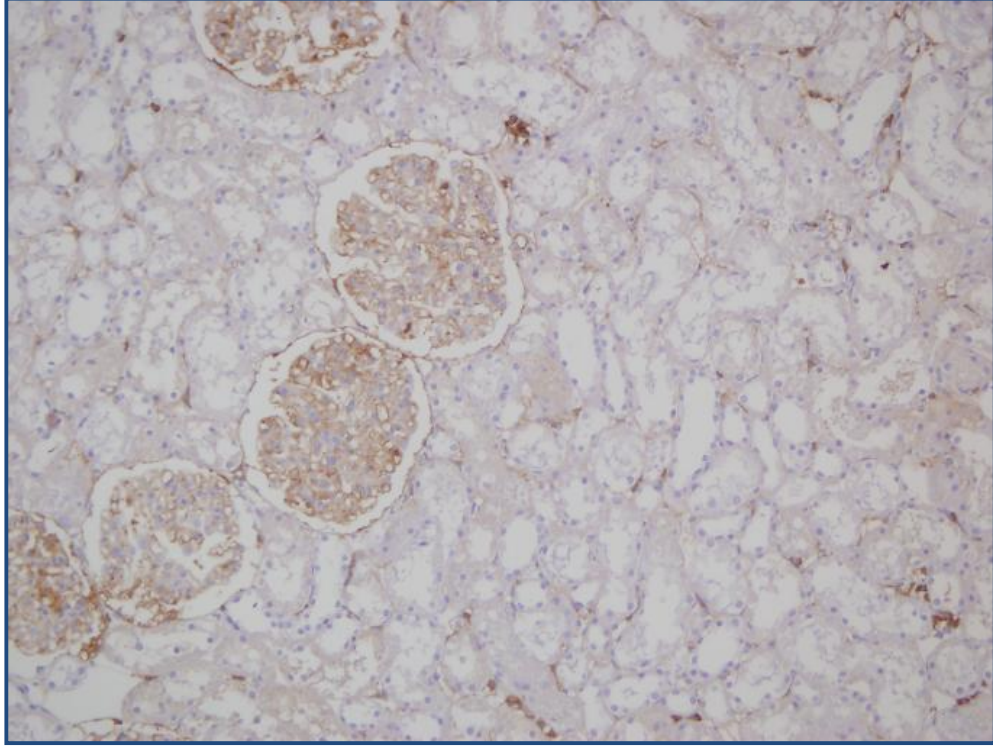
Grup 4: Kontrol grubu



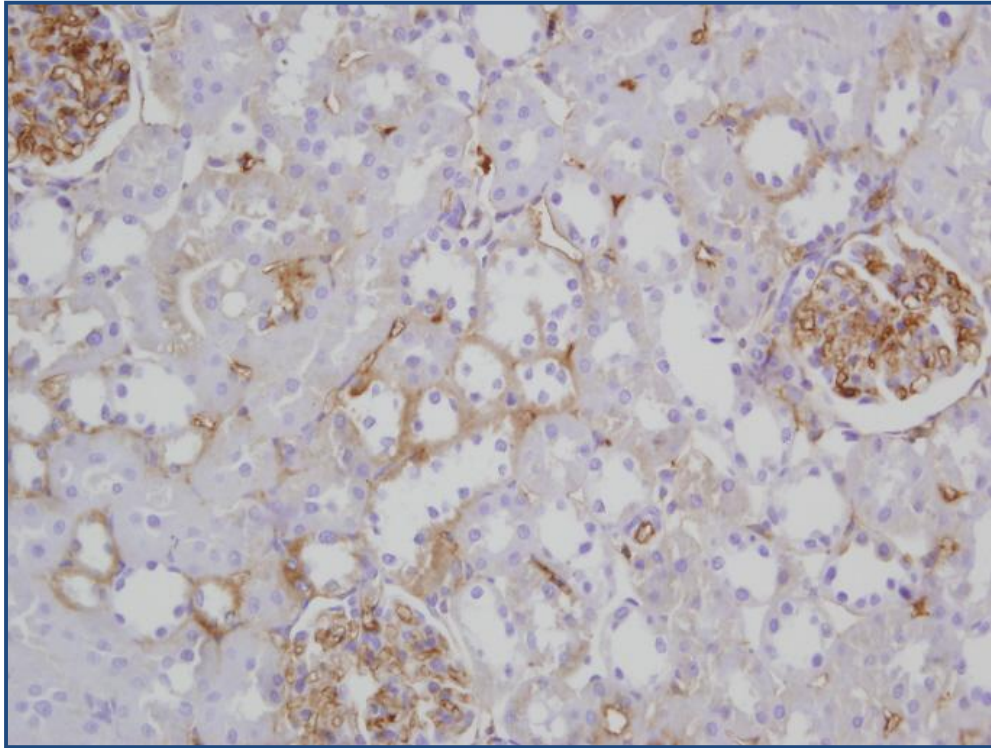
**Resim 4: Grup 1: Sadece 5/6 nefrektomi Yapılan Grup  
Kollajen Tip IV X400**



**Resim 5 : Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin  
verilen grup  
Kollajen Tip IV . X200**



**Resim 6: Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup  
Kollajen Tip IV X400**



**Resim 7: Grup 4: Kontrol grubu  
Kollajen Tip IV . X400**

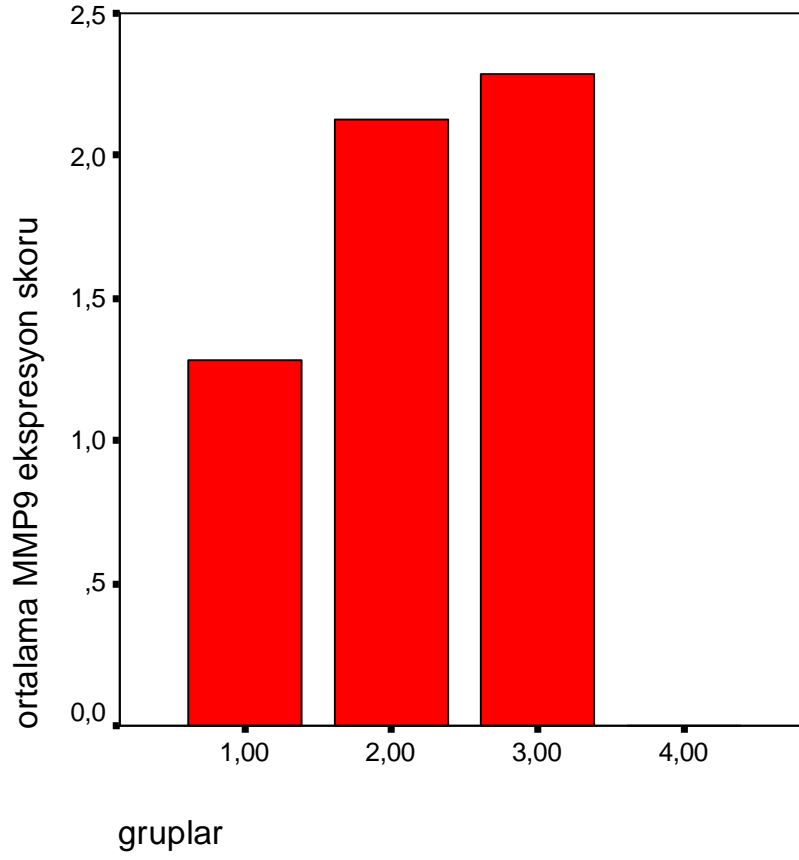
### 3.MMP 9 Ekspresyonu Bulguları:

Gruplar arasında MMP 9 ekspresyonu açısından farkın değerlendirilmesi sonucu anlamlı fark saptandı ( $p<0,001$ , Kruskal Wallis Test). İmmunfloresan yöntemlerle değerlendirilen MMP-9 ekspresyonu, kontrol grubunda negatif olarak saptandı. Sadece doksisisiklin alan grupta en yüksek MMP 9 ekspresyonu izlendi. 5/6 nefrektomi olan grupta bu ekspresyonun sadece doksisisiklin alan gruba göre azaldığı, doksisisiklin alan ve 5/6 nefrektomi olanlarda ise bunların arasında bir düzeyde ekspresyon olduğu ancak bunların istatistiksel olarak sadece kontrol grubundan farklı bulunduğu saptandı. (Tablo 9, Şekil 8, Resim 8,9,10,11).

**Tablo 9: MMP 9 için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark, (Mann Whitney U Test)**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

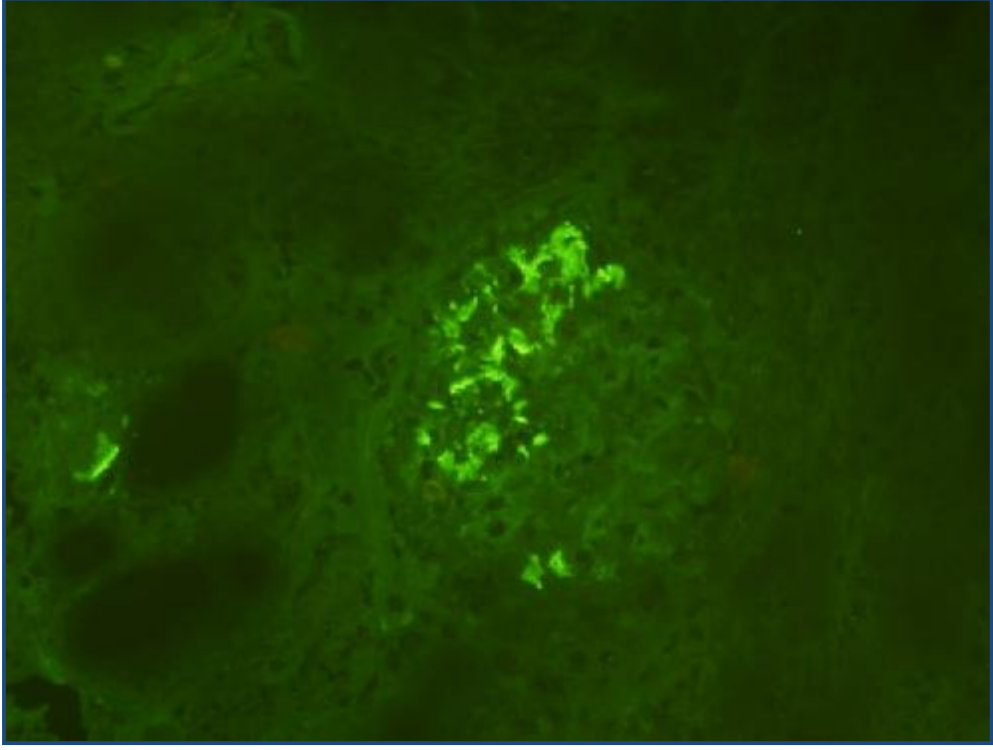
MMP 9	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup
1.grup				
2.grup	0,085			
3.grup	0,011	0,867		
4.grup	0,001	0,001	0,001	



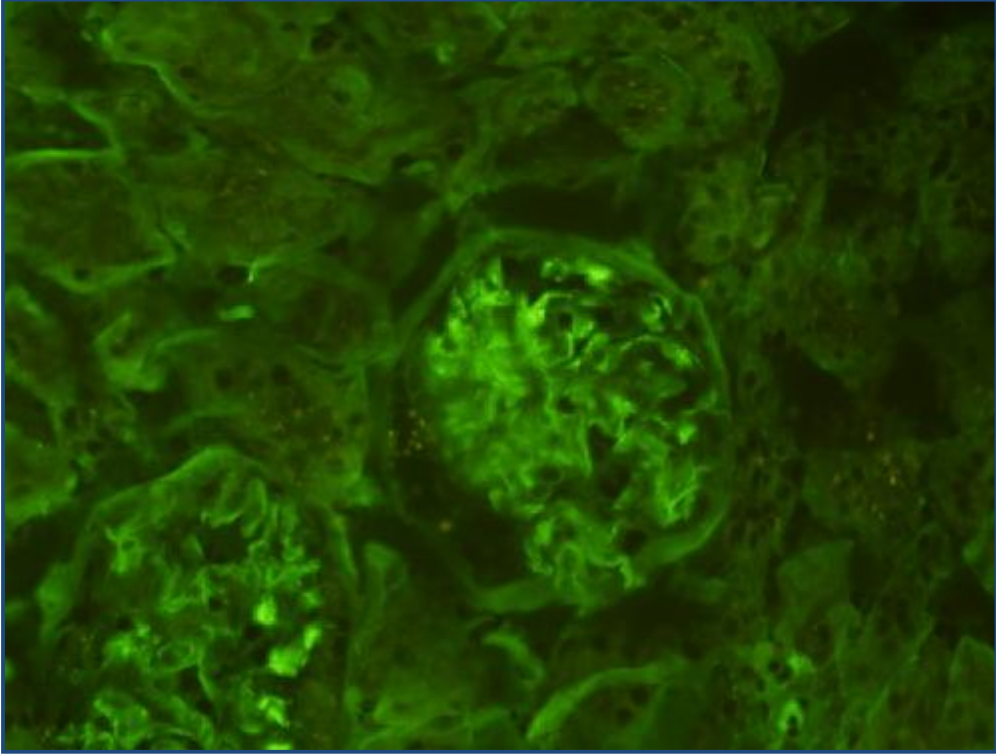
**Şekil 8:MMP-9 ekspresyonu için gruplar arasında anlamlı fark saptandı (p=0,003 Kruskal-Wallis Test)**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

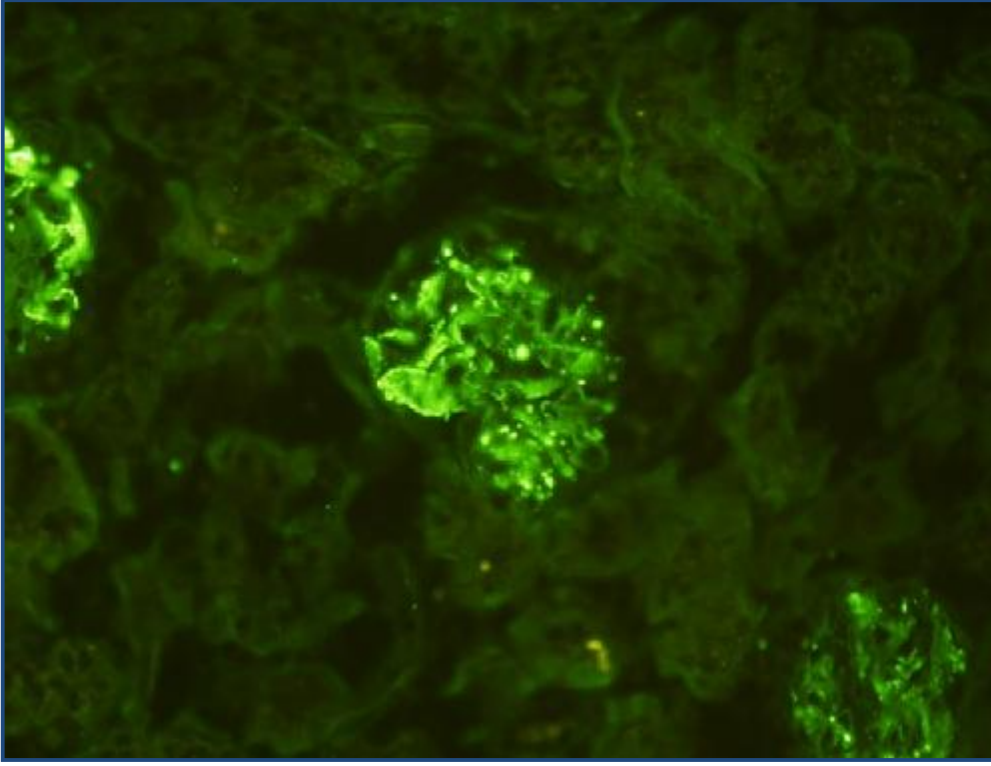




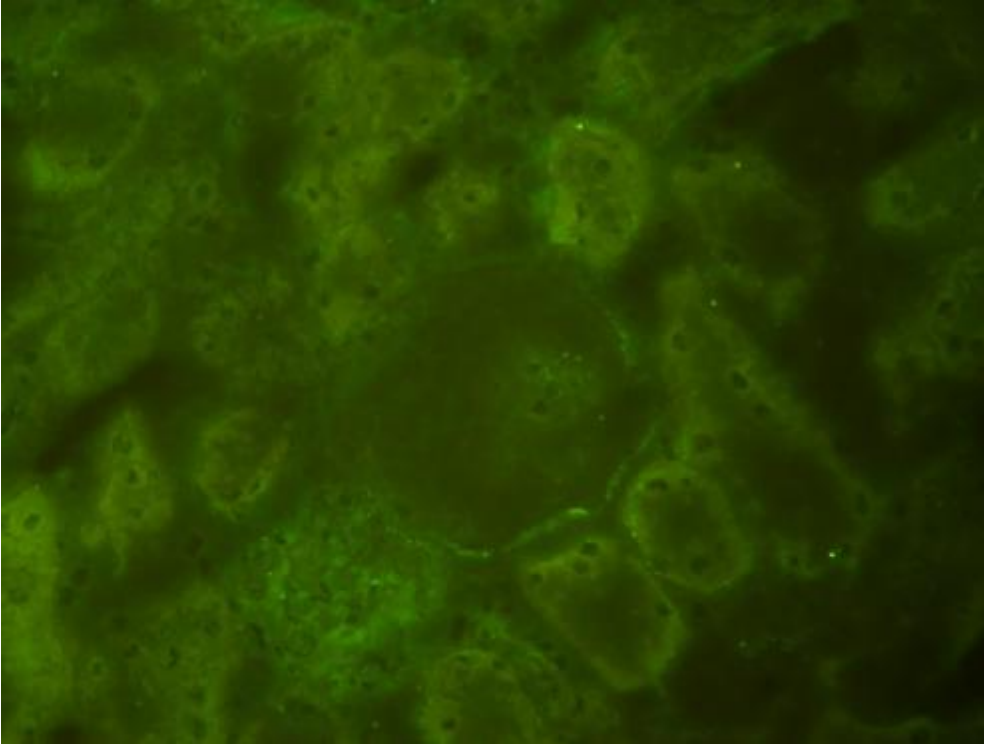
**Resim 8:: Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup  
MMP-9 . X400**



**Resim 9: Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin  
verilen grup  
MMP-9 . X400**



**Resim 10: Grup 3: Yalnızca Doksisiklin verilen grup  
MMP-9 . X400**



**Resim 11: Grup 4: Kontrol grubu  
MMP-9 . X400**

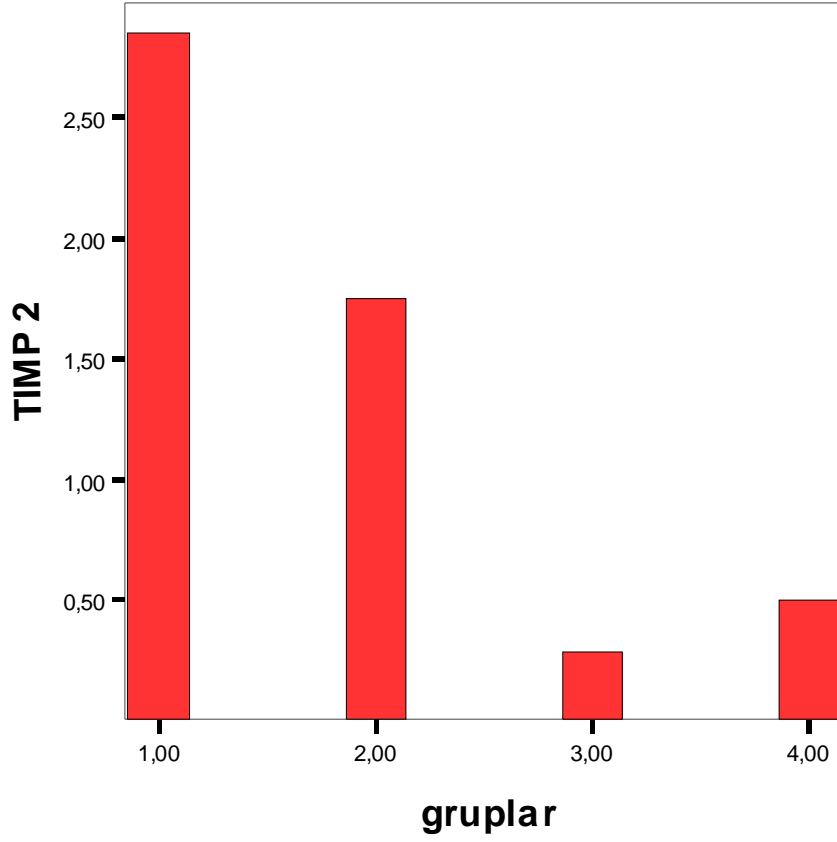
#### 4. TIMP-2 Miktarının Değerlendirilmesi

Gruplar arasında TIMP 2 ekspresyonu açısından farkın değerlendirilmesi sonucu anlamlı fark saptandı ( $p < 0,001$ , Kruskal Wallis Test). İmmunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilen TIMP 2 miktarlarının 5/6 nefrektomi grubunda en yüksek düzeyde olduğu; 5/6 nefrektomi yapıp doksisisiklin alan grupta buna göre azaldığı izlendi. Ayrıca 5/6 nefrektomi olup doksisisiklin alan grupta da kontrol grubuna göre artmış miktarda olduğu saptandı. Yalnızca Doksisisiklin alan grupta TIMP 2 miktarları ile kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ( Tablo 10, Şekil 9, Resim 12,13,14).

**Tablo 10: TIMP II ekspresyonu için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark, (Mann Whitney U Test)**

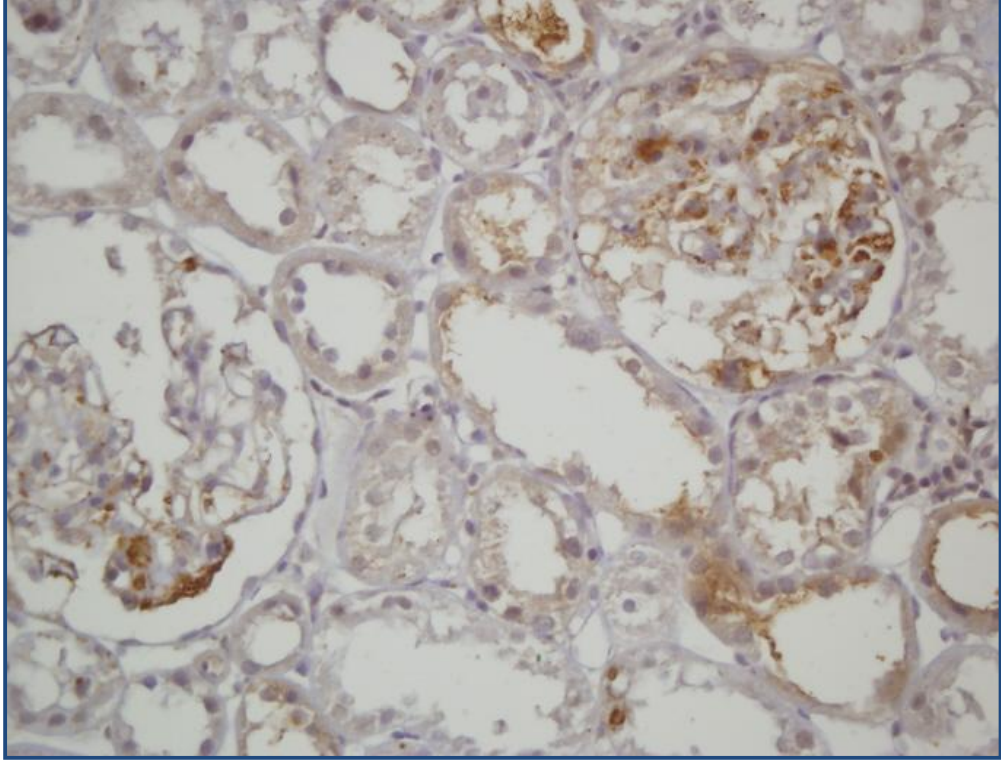
(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

TIMP II	1.grup	2.grup	3.grup
1.grup			
2.grup	0,007		
3.grup	0,001	0,006	
4.grup	0,001	0,015	0,447

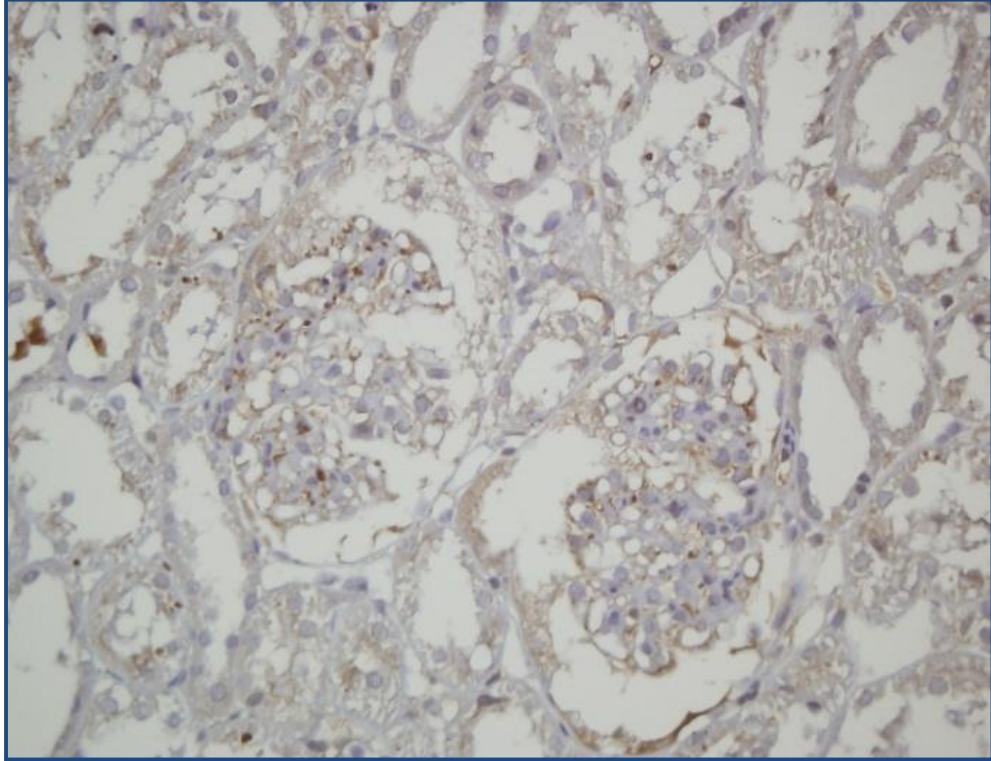


**Şekil 9:TIMP II patolojik inceleme bulguları: TIMP II ekspresyonu için gruplar arasında anlamlı fark saptandı (p=0,003 Kruskal-Wallis Test)**

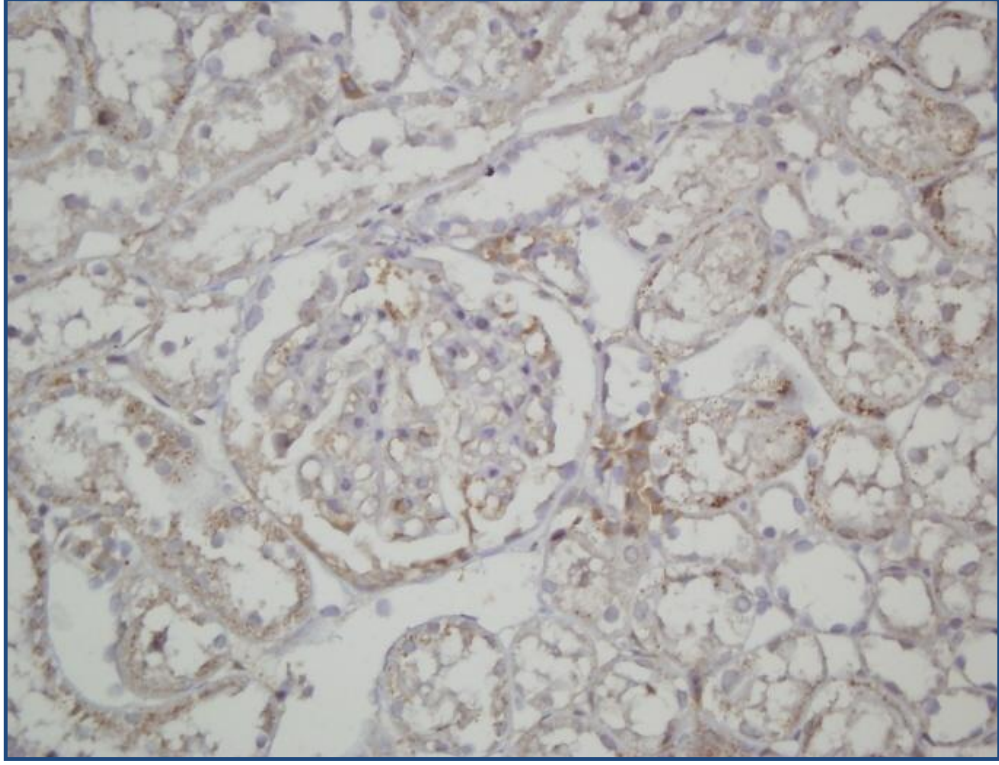
(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)



**Resim 12: Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup  
TIMP-2. X400**



**Resim 13:Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin  
verilen grup  
TIMP-2. X400**



**Resim 14: Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup  
TIMP-2. X400**

## 5. Biyokimyasal TIMP-1 ve TIMP-2 Bulgularının Değerlendirilmesi

### i. TIMP I:

Gruplar arasında TIMP 1 ekspresyonu açısından anlamlı fark saptanmadı ( $p < 0,001$ , Kruskal Wallis Test)

### ii. TIMP II:

Gruplar arasında TIMP 2 ekspresyonu açısından anlamlı fark saptanmadı ( $p < 0,001$ , Kruskal Wallis Test)

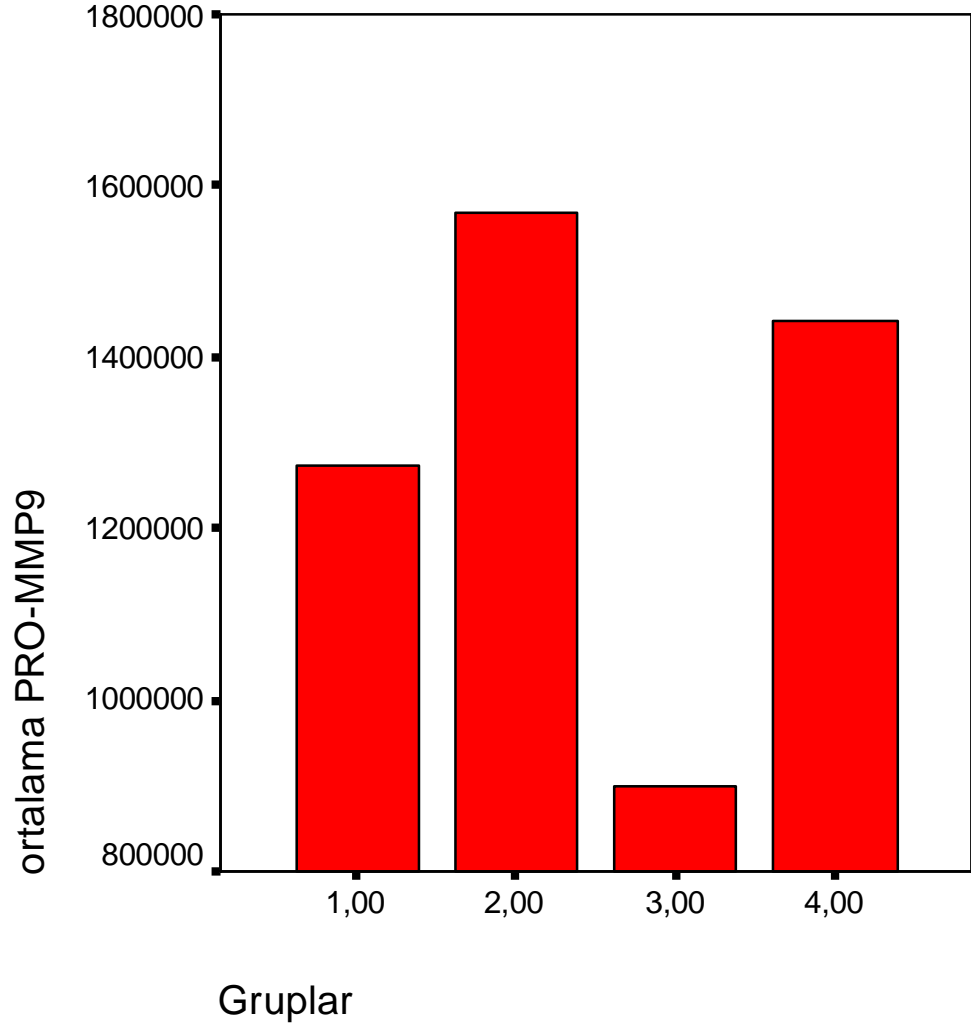
### iii. ProMMP-9:

Gruplar arasında proMMP-9 ekspresyonu açısından farkın değerlendirilmesi sonucu anlamlı fark saptandı ( $p < 0,001$ , Kruskal Wallis Test). Yalnızca doksisisiklin verilen grupta pro-MMP-9'un belirgin olarak baskılandığı izlendi. En yüksek değer 5/6 nefrektomi yapılp ayrıca doksisisiklin alan grupta bulundu.( Tablo 11, Şekil 10)

**Tablo 11: MMP-9 ekspresyonu için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark, (Mann Whitney U Test)**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

MMP-9	1.grup	2.grup	3.grup
1.grup			
2.grup	0,064		
3.grup	0,006	0,001	
4.grup	0,317	0,606	0,046



**Şekil 10: proMMP-9. Biyokişimsyal inceleme bulguları. Gruplar arasında anlamlı fark saptandı (p=0,003 Kruskal-Wallis Test)**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)



iv. *Aktif MMP-9:*

Jelatin zymografi yöntemi ile aktif MMP-9 tüm gruplarda izlenmedi

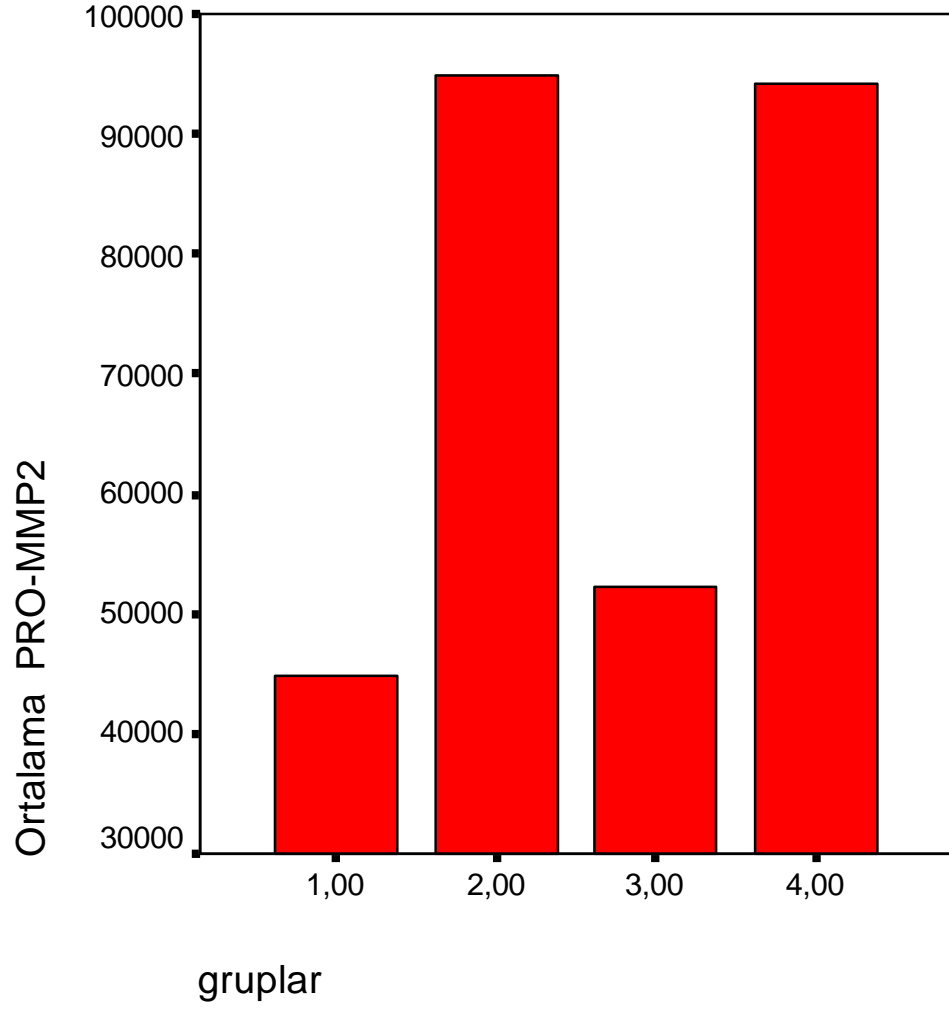
v. *ProMMP-2:*

Gruplar arasında proMMP-2 ekspresyonu açısından farkın değerlendirilmesi sonucu anlamlı fark saptandı ( $p < 0,001$ , Kruskal Wallis Test). ProMMP-2 ekspresyonu, kontrol grubuna göre doksisiklin alan deneklerde anlamlı olarak azalmış olarak bulundu. Buna karşın 5/6 nefrektomi grubunda proMMP2'nin azaldığı ancak doksisiklin verilen 5/6 nefrektomide belirgin şekilde arttığı saptandı. (Tablo 12, Şekil 11)

**Tablo 12: Pro MMP2 ekspresyonu için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark, (Mann Whitney U Test)**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

Pro-MMP2	1.grup	2.grup	3.grup
1.grup			
2.grup	0,005		
3.grup	0,406	0,008	
4.grup	0,007	0,366	0,010



**Şekil 11. proMMP-2. Biyokişmyasal inceleme bulguları. Gruplar arasında anlamlı fark saptandı (p=0,003 Kruskal-Wallis Test)**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

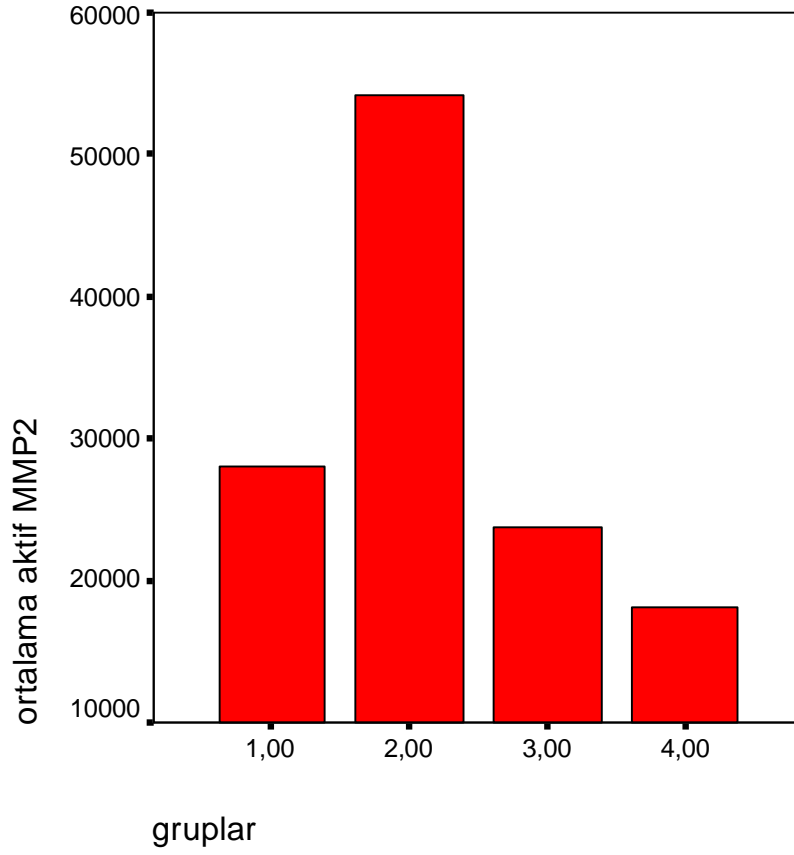
vi. *Aktif MMP-2:*

Gruplar arasında aktif-MMP-2 ekspresyonu açısından farkın değerlendirilmesi sonucu anlamlı fark saptandı ( $p < 0,001$ , Kruskal Wallis Test). Aktif MMP-2 ekspresyonu, kontrol grubuna göre doksisiklin alan deneklerde farklı bulunmadı. 5/6 nefrektomi grubunda ise proMMP2'nin değişmediği, ancak doksisiklin verilen 5/6 nefrektomide belirgin şekilde arttığı saptandı. (Tablo 13, Şekil 12)

**Tablo 13: Aktif MMP-2 ekspresyonu için yapılan değerlendirmede Gruplar arası fark, (Mann Whitney U Test)**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

Aktf MMP-2	1.grup	2.grup	3.grup
1.grup			
2.grup	0,028		
3.grup	0,749	0,011	
4.grup	0,568	0,010	0,475



**Şekil 12. aktifMMP-2. Biyokimyasal inceleme bulguları. Gruplar arasında anlamlı fark saptandı (p=0,003 Kruskal-Wallis Test)**

(Grup 1: Yalnızca 5/6 nefrektomi uygulanan grup Grup 2: 5/6 nefrektomi uygulandıktan sonra Doksisisiklin verilen grup, Grup 3: Yalnızca Doksisisiklin verilen grup, Grup 4: Kontrol grubu)

## TARTIŞMA

Bu araştırmada daha önce yayınlanmış literatür bilgisi bulunmayan bir deneysel model oluşturularak 5/6 nefrektomi olan deneklerde MMP inhibitörü olarak tanımlanan bir tetrasiklin grubu antibiyotik olan doksisisiklinin etkisi araştırıldı.

Bu araştırma sonunda doksisisiklinin bu modelde glomeruloskleroza azalttığı literatürde uygulanmış yöntemler kullanılarak histopatolojik olarak saptandı (67). Ancak kontrol grubunda hiç glomeruloskleroz bulunmamasına karşın sadece doksisisiklin alanlarda da glomerulosklerozun oluştuğu izlendi.

Deneysel modelde kullanılan doksisisiklinin antibiyotik özelliği yanı sıra MMP inhibitörü olduğu bilinmektedir (10). MMP'ler pro formlarında sentezlenirler ve gereksinim durumunda membran tip MMP'ler ile de aktif hale gelirler ve etkin olan sadece bu formdur(4).

Literatürde matriks metallo proteinazlar pek çok çalışmada yer almıştır. MMP-1 ile ilgili karsinogenez (76) çalışmalarının yanısıra daha çok bağ dokusu ile ilgili patolojik durumlar ile ilişkisini gösteren çalışmalar yapılmıştır (77,78,79).

MMP-2 daha sıklıkla çalışılmış MMP üyesi olup karsinogenez ile ilişkisi (49,50,51,80,81) yanısıra, inflamatuvar durumlar (82,83) ve lipogenez (84), vasküler değişiklikler (85,44) ile ilişkisi araştırılmıştır.

MMP-3'ün özellikle inflamatuvar süreçle yakın ilişkisi saptanmıştır (86) ve özellikle artropatiler ile ilişkileri araştırılmıştır (41,87,88). Zhu ve Yu'nin spondiloartropatilerde matriks metalloproteinaz ekspresyonları ile ilgili yayınlamış oldukları çalışmada (89) spondiloartropati atakları sırasında synoviumda matriks metalloproteinaz düzeylerinin arttığı ve özellikle yoğun miktarda artış gösteren MMP-3 düzeylerinin ankilozan spondilitte görüldüğu saptanmıştır.

Literatürde özellikle tümör invazyon patogenezi aydınlatmaya çalışan MMP-4 ve inhibitörleri ile MMP-7 ile ilgili tümör invazyonu konusunda pek çok çalışma vardır (90-97).

MMP-5 ve 6 ile ilgili araştırmalar yok denecek kadar azdır (98).

MMP-8'in kanda ölçümü yapılan tek MMP'dir. Ayrıca karsinogenez ile ilgili çalışmalar (99, 100) yanı sıra erken membran rüptürü ilişkili çalışmalar da vardır (101).

MMP-9 en çok çalışmaya konu olmuş MMP üyesidir. Bir gelatinaz olan MMP-9 inflamasyonda rol aldığı gibi (102,103), malignitelerle ilişkisi de incelenmiştir (40,104-108). Ayrıca vasküler patolojiler ile ilişkisi de araştırma konularından olmuştur (109-111,112,113).

Pek çok diğer MMP gibi MMP-10 için de tümör patolojisiyle ilişkisine ışık tutacak araştırmalar yapılmıştır (114,115,116). Ayrıca vasküler hasarlanma ile ilgili bazı araştırmalara da konu olmuştur (117,118).

MMP-11 ve 12 de literatürde özellikle tümör ve tümör invazyonu ile ilişkisi araştırılmıştır (119,-,123). Ayrıca MMP-12'nin inflamatuvar reaksiyonlardaki rolü araştırılmıştır (124).

MMP-13'ün kemik rejenerasyonuna etkisi (125), inflamasyondaki yeri (43) ve karsinogenez sürecine etkisi(126) araştırılmıştır.

MP-14,15,16,17,21 membran tip MMP'lerdir. MT-1MMP (MMP-14) hücre yüzeyinde aktif haldedir ve görevi proMMP-2'yi aktiflemektir (127). Böylece MMP-2'nin patogenezi etkinliği olduğu düşünülen tüm durumlarda etkindir. Bu MMP'leri eksprese eden genlerin lokalizasyonları hakkında (128), diyabetik ülserlerle (37) ve anjiogenez (33) ile ilişkilerine yönelik araştırmalar vardır.

Büyük Matriks metalloproteinaz ailesinin iki üyesi olan MMP-2 ve 9'un bazal membran yapılıması ile ilişkisi vardır (129). Özellikle vasküler yapılar ile ilgili hasarlanmalarda ve enflamasyonun erken aşamalarında kollajen TipIV'ün parçalanması

basamaklardan birini oluşturmaktadır. Jelatinazlardan MMP-9'un bu aşamadaki rolü büyüktür. Ayrıca inflamatuvar ve non-inflamatuvar böbrek hastalıklarıyla en yakın ilişkili MMP'ler bunlardır (55,130–133). Özellikle glomeruloskleroz ile giden kronik böbrek hastalıklarında patofizyolojisinde etkin olan matriks metalloproteinazlar MMP-2 ve MMP-9'dur (4). Öncelikli olarak MMP-9'un glomeruloskleroz ile ilişkili olduğu saptanmıştır (134). Tüm bu sebeplerle çalışmamızda bir MMP inhibitörü olan Doksisiklinin glomeruloskleroz üzerine olan etkisi; glomeruloskleroz ile ilişkili MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri ile değerlendirilmiştir.

TIMP 1 ve TIMP 2 MMP'ların doku inhibitörleri olup glomerullerde ekspresyonu gösterilmiştir(135). Çalışmamızda glomeruloskleroz ile ilişkisi saptanmış olan TIMP-1 ve 2 biyokimyasal veriler ile değerlendirilmiştir. Glomerullerde eksprese edilen ve MMP-9 inhibisyonu açısından spesifiklik gösteren TIMP-2 ise immunohistokimyasal yöntemler ile değerlendirilmiştir (135).

MMP'ların pek çok hastalığın patogenezindeki etkinlikleri tespit edilince sentetik MMP inhibitörleri de bir umut ışığı olmuştur. Daha önce CGS 27023A, AG3340, Ro 32-3555 ve marimastat (136), MMI270 (137), BB-94 (45) gibi pek çok MMP inhibitörü fonksiyonları araştırılmıştır. Daha sonra Tetrasiklinler de bu gruba dahil edilmişlerdir (138). Tetrasiklinler bakteride protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik bir etki oluştururlar (64). Bir Tetrasiklin grubu üyesi olan doksisiklinin bu işlevden farklı olarak MMP'ları inhibe etme yeteneği vardır (10). Doksisiklin MMP'lerin inhibisyonunu bu enzimlerin çinko içeren katalitik bölümüne bağlanarak gerçekleştirir (66). Doksisiklinin etki mekanizmaları TIMP'lere benzerdir (38,52). MMP inhibisyonu ve bakteriyostatik inhibisyonu yanısıra son zamanlarda doksisiklinin daha ne gibi ek fonksiyonları olabileceği araştırılmıştır; Lalu ve arkadaşları (46) yapmış oldukları deneysel çalışmada; sepsis oluşturulmuş sıçanlarda kardiyak işlev bozukluğunun karın içine doksisiklin uygulaması sonrası kalp kasındaki MMP-9 aktivitesini azalttığını ve bunun sonucunda kalp işlevlerinin düzeldiğini saptamışlardır. Toshinao ve arkadaşlarının (139) insan kolorektal kanser hücreleri üzerinde yapmış oldukları bir çalışma da tetrasiklinlerin büyümeyi durdurucu etkileri ve mitokondrial kaynaklı apoptozu indüklediklerini gösterilmektedir. Literatürde Doksisiklin artık pek çok çalışma içerisinde MMP inhibitörü olarak yer almaktadır. Cintia S. De Paiva ve arkadaşlarının yapmış

oldukları bir deneysel çalışmada (140) farelere 'scopolamine hydrobromide' subkutan enjeksiyonu ile kuru göz modeli uygulanmıştır ve araştırılan gruba günde dört kez topikal doksisisiklin uygulanmıştır. Çalışma sonunda MMP-9'un korneal epitel hücreleri arasındaki interselüler bağları koparttığını ve doksisisiklinin inhibitör etkisi ile bu bariyerin korunmasında ve kuru göz tedavisinde önemli yeri olduğunu ispat etmişlerdir. Ayrıca Björn Pasternak ve arkadaşlarının sıçanlar üzerine yaptıkları bir çalışmada (141) aşil tendonlarına sütür atılıp oral olarak doksisisiklin verilen grup ile doksisisiklinli filmle kaplanmış sütürle aşil tendonları sütürlen grup kontrol grubuyla kıyaslandığında doksisisiklinin her iki uygulamasıyla da sütür kuvvetini ve direncini arttırdığı görülmüştür. Dorothe Burggraf ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada (142) sıçanlara içme sularının içerisinde on gün doksisisiklin verilmesinin ardından beyin iskemisi gerçekleştirilmiştir. Beyin dokularındaki MMP düzeyleri jelatin zymografi ve western blot yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda iskemi öncesinde verilen Doksisisiklinin MMP inhibisyonu yaptığı ayrıca hasarlı beyin volumünü ve fokal serebral iskemiye bağlı kılcal damar hasarını azalttığı saptanmıştır. Björn Pasternak ve arkadaşlarının (143) doksisisiklin kaplı sütürlerle yaptıkları deneysel çalışmada sıçanlara kolonik anastomoz yapılmış ve Doksisisiklinli filmle kaplı sütür ile yapılan anastomozlarda doku bütünlüğünün ve kuvvetinin arttığı saptanmıştır. Bu çalışmalarda genel olarak doksisisiklinin MMP inhibitör etkisi dikkati çekmektedir. Renal araştırmalar ise sınırlıdır. Doksisisiklinin proliferatif glomerülo nefritte iyileştirici klinik etkisi öne sürülmüş olup (11), bizim 24 sıçan üzerinde yapmış olduğumuz immün-kompleks nefriti modelinde immün-kompleks nefritli olup doksisisiklin alan grupta MMP-9 düzeyinde belirgin azalma saptanmış olmakla birlikte yalnızca Doksisisiklin alan grupta MMP-9 ekspresyonu kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (144) Genel olarak doksisisiklinin iyileşmeyi arttırıcı ve MMP inhibitörü etkisini kuşkulu duruma getiren bu veriler Hiramatsu N ve arkadaşlarının (145,146) yapmış oldukları bir çalışmaları da göz önünde bulundurularak tartışılmalıdır. İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ilişkili genlerin aktarımı ile oluşturulan transgenik ratlarda doksisisiklin bu genlerden birinin ekspresyonunu uyarmakta ve böylelikle segmental skleroz gelişimi oluşmaktadır. Bu durum doksisisiklinin beklenmedik gen ekspresyonlarını indüklemek gibi bir rolü bulunabileceğini de düşündürmektedir. Bir diğer önemli nokta Doksisisiklinin MMP'ler üzerine etkisinin in vivo çalışma gruplarında in vitro çalışmadan farklı bulunmasıdır (147,40). Wong ET ve arkadaşlarının (40) çalışmalarında, malign gliomlu hastaların tedavilerine oral Doksisisiklin eklenip beyin omurilik sıvılarında MMP 2 ve MMP 9



düzeylerini incelenmiş ve arttığı bulunmuştur. Buna karşın in vitro glioma hücrelerine Doksisisiklin uygulandığında MMP düzeylerini azaldığı saptanmıştır. Bu tabloda MMP'lerin pro formlarından aktif formlarına geçişlerinde doksisisiklin etkisinin bulunması, buna bağlı olarak in vivo ve in vitro fark olması söz konusu olabilir, ancak bu makalede bu konuda değerlendirme bulunmamaktadır.

Bu ilginç etki mekanizma ve sonuçlarının ortaya konulduğu MMP inhibitörü olarak tanımlanan, sadece antibiyotik etkisi için günlük kullanıma giren bir etken olan doksisisiklinin ablasyon nefropatisindeki etkisi araştırılmamış olduğundan bu çalışma planlanmıştır.

Fokal Segmental Glomeruloskleroz sık görülen son dönem böbrek yetmezliği nedenlerinden biridir. Bununla ilgili deneysel model sıklıkla 5/6 nefrektomi modelidir (27). Daha önce değişik maddelerle glomeruloskleroza azaltmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. 1996 yılında Amann ve arkadaşlarının (148) yaptıkları bir çalışmada 5/6 nefrektomi uygulanan sıçanlara operasyondan sekiz saat sonra ayrı gruplar halinde ramipril, nifedipine ve moxonidin uygulanmıştır. Işık mikroskobu ile yapılan glomerul değerlendirilmesinin ardından ramipril ve moxonidin uygulanan grupta glomerulosklerozda belirgin azalma saptanmıştır. Başka bir araştırma da Zhang G ve arkadaşları (149) bitkisel tedavi amaçlı kullanılan rhubarb (R. palmatum) bitkisinin glomeruloskleroza olan etkisi araştırmış ve 120 gün sonra rhubarb (R. palmatum) bitkisinin köklerinin bulunduğu suyu içen grupta glomerulosklerozda belirgin azalma izlenmiştir. Hamaguchi A ve arkadaşları (150) 5/6 nefrektomi uyguladıkları sıçanlara operasyondan iki hafta sonra ayrı gruplar halinde anjiyotensin II tip 1 reseptör antagonisti ve Ca kanal blokörünü oral olarak vermişlerdir. Çalışmanın sonunda glomerulosklerozun belirgin ölçüde azaldığı bulunmuştur. Hahn S ve arkadaşları (151) 5/6 nefrektomi modelini uyguladıkları sıçanlarda 2 hafta sonra başlayan  $\alpha$ -tocopherol ile glomerulosklerozda belirgin azalma bildirmişlerdir. Soylu ve arkadaşlarının (152) yapmış oldukları ablasyon nefropati deneysel modelinde Vitamin A'nın skleroz gelişimini önleyici etkisi bulunmamıştır. Lin SL ve arkadaşları ise (153) fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin ile 5/6 nefrektomi modelinde glomerulosklerozda belirgin azalma tespit etmişlerdir. Ma LJ ve arkadaşları (154) 5/6 nefrektomi uyguladıkları sıçanlara operasyondan 8 hafta sonra diyet içerisinde ACE inhibitörü ve anjiyotensin 1 reseptör antagonisti uygulamışlardır. Anjiyotensin 1 reseptör antagonisti alan grupta belirgin olmak üzere her iki grupta da glomerulosklerozda gerileme

saptanmıştır. Literatürde antihipertansif ve antioksidanlarla glomeruloskleroz azaltıcı etki araştırılmış olmakla birlikte farklı mekanizmalara yönelinmemiştir. Aslında önemli bir böbrek yetmezliği nedeni olan glomerulosklerozla ilişkili daha çok araştırma gereksinimi dikkati çekmekte olup, bu çalışmada 5/6 nefrektomi modelinde Doksisisiklinin glomeruloskleroza olan etkisi değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada deneysel olarak 5/6 nefrektomi başarıyla gerçekleştirildi ve bu gruplarda glomerulosklerotik değişiklikler saptandı. 5/6 nefrektomi modelinde doksisisiklinin glomeruloskleroza azaltıcı etkisi; yalnızca 5/6 nefrektomi yapılan ve 5/6 nefrektomi yapıp birlikte doksisisiklin verilen gruplardaki glomeruloskleroz düzeyleri karşılaştırılarak aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ve glomerulosklerozun azaldığı bulundu. İlginç olarak sadece doksisisiklin alan grupta da kontrol grubunda bulunmayan glomerulosklerotik değişikliklere rastlandı ancak arada istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Literatürde Doksisisiklinin glomeruloskleroz geliştirici etkisi sadece HIV ilişkili fokal segmental skleroz modelinde, HIV ilişkili genler taşıyan transgenik farelerde bu genlerin ekspresyonunu indükleyerek tanımlanmıştır (155,156). Ancak normal sıçanlarda böyle bir mekanizma tanımlanmamıştır. Doksisisiklinin MMP inhibisyonu, doğal homeostasis sürecini bozarak saptadığımız bu etkiye neden olmuş olabilir. Kollajen TipIV skorlarındaki azalma da bu denge bozukluğu ile ilişkili olabilir. Mekanizma tanımlanamamakla birlikte bulgular doksisisiklinin tek başına glomerulosklerozla ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir. Hatta sadece doksisisiklin alan grup ile 5/6 nefrektomi olup doksisisiklin alan grup arasında fark bulunmamıştır. Sadece doksisisiklin alan ve 5/6 nefrektomi olup doksisisiklin alan denekler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması, 5/6 nefrektominin olumsuz etkisini azaltan bir tablo varlığını ortaya koymakta, izlenen glomerulosklerotik değişikliklerin ise doksisisikline mi yoksa 5/6 nefrektomiye mi bağlı olduğu konusunda soru işaretine yol açmaktadır.

Bu çalışmada doksisisiklinin inhibitör etkisinin tanımlandığı MMP-2, 9 ve TIMP-1, 2 ekspresyonları değerlendirilmiş, yine glomerül bazal membranının doğal komponenti olan kollajen Tip IV ile ilişkileri incelenmiştir. Doğal glomerül yapısının yapısal ve işlevsel olarak korunmasında ve glomeruloskleroz patogeneğinde sadece sözü geçen bu faktörler etkili olmamakta aynı zamanda diğer MMP'ler ve inhibitörleri ile ekstrasellüler matriks

komponentleri de büyük önem taşımaktadır (5,18,14). Bu araştırmada belirtilen parametrelerin araştırılmasının gerekçesi; böbrek dokusunda en yoğun bağ dokusu elamanının Tip IV kollajen olması ve bu jelatinazların Tip IV kollajene daha spesifik olmasıdır. Ayrıca MMP 2 ve 9'un bazal membran yapılıması (129) ile ilişkisi olduğu bilinmektedir. MMP-9'un glomeruloskleroz ile ilişkili olduğu saptanmıştır (134). Araştırmanın sonucunda bu parametreleri değerlendirdiğimizde glomeruloskleroz oranı ile ters ilişkili olarak kollajen tip IV birikiminde azalma saptadık. Bu azalış glomerüller hasar ile ters ilişkili olduğunu düşündürecek şekilde en yoğun olarak 5/6 nefrektomi grubunda ardından daha az olarak da 5/6 nefrektomi yapılarak doksisiklin verilen grupta ve sadece Doksisiklin alan gruplarda da izlendi. Her üç grup ta da kontrol grubuna göre kollajen tip IV miktarında azalma oldu. Tip IV kollajen artış göstermiyor hatta azalıyor artmış glomeruloskleroz durumunda onun yerine başka bir bağ dokusu elamanının artmış olması gerekliliği açıktır. Olgemöller ve Schleicher (5) diabetik nefropati üzerine yapmış oldukları çalışma dikkat çekicidir. Araştırmacılar glomerüllerde meydana gelen sklerotik değişikliklerde irreversible hasarın da bir belirteci olarak glomerüllerde tip IV kollajen yerine Tip III kollajen biriktiğini göstermişlerdir. Bu durum özellikle 5/6 nefrektomide saptamış olduğumuz yoğun skleroza eşlik eden belirgin azalmış Tip IV kollajen ekspresyonunu açıklayabilir.

Tüm MMP ve TIMP verilerini ele aldığımızda biyokimyasal incelemenin tüm kortikal alanı yansıttığını buna karşın doku kesitlerindeki patolojik incelemenin izole olarak glomerülleri değerlendirme olanağı sağladığı göz önünde bulundurulmalıdır. Farklı sonuçlar bu durumdan da kaynaklanıyor olabilir.

Bu araştırmada biyokimyasal inceleme sonuçları ve patolojik inceleme ile doku kesitlerindeki MMP-9 düzeyleri farklı bulundu.

Kontrol grubu ve sadece Doksisiklin alan grup karşılaştırıldığında immünfloresan incelemede Doksisiklin alan grupta MMP-9 ekspresyonu kontrol grubundan yüksek olarak bulundu. Ancak biyokimyasal olarak proMMP-2 ve proMMP-9'un sadece doksisiklin alan grupta normale göre azaldığı saptandı. Aktif MMP-9 hiçbir grupta saptanmazken aktif MMP-2 sadece doksisiklin alan grupta artmış olarak saptandı. İki yöntemin kontrol grubu ele alındığında farklı sonuç vermesi yani MMP-9'un immünfloresan incelemede detekte edilemez

düzye de bulunurken biyokimyasal olarak belirgin olarak saptanması yöntemlerin duyarlılıkları arasındaki farkı göstermektedir. Ayrıca aktif MMP2 nin artışı ve immünfloresan olarak hem aktif hem de pro MMP9'un gösterildiği durumda MMP9'un artışı, doksisiklinin MMP-2 ve 9'un aktif formu üzerindeki inhibitör etkisini kuşku hale getirmektedir. TIMP-1 ve 2 düzeylerinde biyokimyasal olarak farklılık saptanmamış immünhistokimyasal olarak da TIMP 2 anlamlı değişim göstermemiştir. Kollajen Tip IV'ün azalması da doksisiklin alanlarda kontrol grubuna göre belirgin azalmıştır ( $p=0,058$ ). Bu veriler ele alındığında doksisiklinin sadece pro-MMP 2 ve 9'u inhibe ettiğini söyleyebiliriz. Oysa genel MMP-2 ve 9 inhibisyonundan çok arttırıcı etki izlenmekte bu hem glomeruloskleroz hem de kollajen Tip IV azalması ile de ortaya konulmaktadır. Doksisiklinin MMP üzerine olan inhibitör etkisinin MMP'nin sentezini inhibe etmekten çok bu enzimlerin çinko içeren katalitik bölümüne bağlanarak gerçekleşmesi nedeniyle (66) işlevsiz kalanın yerine yeninin sentezlenmesi söz konusu olabileceği de hatırd a tutulmalıdır.

Sadece 5/6 nefrektomi yapılan grupta glomeruloskleroz oluşmuş, kontrol grubuna göre TipIV kollajen azalmış; histopatolojik incelemede MMP-9 ve TIMP-2 artmış, TIMP-1 ve 2 düzeylerinde biyokimyasal olarak farklılık saptanmamış, ancak aktifMMP-2 ve proMMP-9 değişmemiş, oysa proMMP-2 belirgin şekilde azalmıştır. Bu bulgular proMMP-2'nin belirgin şekilde aktif forma geçtiği, genel olarak MMPve TIMP-2'nin ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı bu durumda da Tip IV kollajen'in belirgin şekilde azaldığı ve bununla birlikte glomerulosklerozun arttığı görülmektedir. Bu bulgular beklenen mekanizmayla uyumludur. Daha önce Catania ve arkadaşlarının (4) yaptıkları bir çalışmada tek taraflı üreter obstriksiyon modeliyle ratlarda glomeruloskleroz geliştirmiş araştırmanın sonucunda renal skar geliştikçe TIMP-1 düzeyleri artmıştır.

5/6 nefrektomi olup Doksisiklin alan ve almayanlar karşılaştırıldığında Doksisiklinle glomeruloskleroz, TIMP-2 ekspresyonu azalmış, biyokimyasal olarak TIMP-1 ve 2 düzeylerinde farklılık saptanmamıştır. Ancak aktif ve proMMP-2 belirgin şekilde artmış, proMMP-9 ve histopatolojik olarak değerlendirilen MMP-9'da değişiklik olmamıştır. TipIV kollajen ise daha fazla düzeyde saptanmıştır. Bu bulgular Doksisiklinin glomeruloskleroz üzerine azaltıcı etkisini ortaya koymakta, ancak bunun MMP-2 ve 9 inhibisyonuyla ilişkisi açıklık kazanmamaktadır.

Sıçanlarda immün-kompleks nefriti geliştirmiş olduğumuz bir diğer çalışmada immün-kompleks nefritli olup doksisisiklin alan grupta MMP-9 düzeyinde belirgin azalma saptanmıştır (157). Bu veri ve şu anki çalışma sonuçları ele alındığında Doksisisiklinin MMP üzerine olan inhibitör etkisini kuşku hale getirmekte ve inhibisyon olasılığının farklı durumlarda sürdüğünü göstermektedir. Yukarıda belirtildiği gibi MMP'nin sentezini inhibe etmekten çok bu enzimlerin çinko içeren katalitik bölümüne bağlanarak gerçekleşmesi nedeniyle (66) işlevsiz kalanın yerine yeninin sentezlenmesi söz konusu olabilir. Miktarı artsa da aktif kısmı bağlandığı için artan MMP'ler işlevsiz olmaktadır. Bu durum Wong ET ve arkadaşlarının (40) yapmış oldukları bir çalışmalarında da izlenmiştir. İn vivo doksisisiklin uygulanan grupta MMP düzeyi yükselmiş olarak tespit edilmiştir. İn vitro değerlendirmede böyle bir artış olmamıştır. Bizim ablasyon nefropatisi çalışmamızda da böyle bir mekanizma söz konusu olabilir. Doksiklin MMP'lara bağlanarak etkilerini inhibe etmekte ve ihtiyaç halinde salınımları üzerine etkisi olmamaktadır. Ancak bu durum sonucu olasılıkla aktif MMP-2 düzeylerinin gereksinim duyulan düzeye yükselememesi, sentezlerinin de artışına neden oluyor olabilir ve bu durum da proMMP artışına sebep olabilir. Bu nedenle aktif MMP'lerin öncülleri 5/6 nefrektomi yapıp doksisisiklin alan grupta en yoğun düzeyde bulunmuştur. Aktif MMP-2 ekspresyonunun yalnızca 5/6 nefrektomi yapılan grupta, yalnızca doksisisiklin alan gruba göre daha yüksek çıkması MMP-2'nin renal ablasyon modeliyle gelişen glomeruloskleroz patogenezinde etkin rol oynadığının bir göstergesi olabilir. Jelatin zymografi yöntemiyle aktif MMP-9'un hiçbir grupta izlenmemesi uygulamadan kaynaklanan teknik hatalara bağlı olabilir ancak bu durum verilerin yorumunu güçleştirmektedir.

MMP inhibitörü ile MMP-9'un etkilenmesi yanı sıra Tip III kollajene spesifik kollajenazlar olan MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18'in bu dokularda değişimi söz konusu olabilir. Doksisisiklin böbrek dokusunda mevcut olan pek çok MMP'ı da inhibe etmektedir. Bu metalloproteinazlardan MMP-14; MMP-2 ve MMP-9 gibi diğer proteinazların salınım ve aktiflenme aşamaları üzerine etkindir. Böylece bunlar üzerindeki inhibitör etki MMP-2 ve 9'nin aktifleşmesini azaltarak total aktif formun azalması sonucu pro-formların ekspresyonları indüklenebilir (127). Bu durum da 5/6 nefrektomi olup doksisisiklin alan gruptaki glomerulosklerozun ilk gruba göre azalması ile ilgili olarak bu kollajenazların da benzer bir modelde araştırılmasını düşündürmektedir.

Bu araştırmanın temel bulguları doksisiklinin ablyasyon nefropatisinde glomeruloskerozu azaltıcı rolünün ortaya konulmasıdır. Bu mekanizmada MMP-9, MMP-2 ve TIMP-2 ekspresyon paternlerinin etkilendiği ve özellikle glomeruloskerozla Tip IV kollajenin azaldığı ortaya konulmuştur. Ancak bu araştırmada incelenen MMP ve TIMP ekspresyonlarına dayanan bulgular doksisiklinin renal ablyasyondaki iyileştirici etkisini açıklamak için yeterli görülmemektedir. Kollajen Tip III, diğer MMP ve inhibitörlerinin de değeriendirilmesi mekanizmaya daha fazla ışık tutabilir.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

- Ü Doksisisiklinin renal ablasyon nefropatisinde glomeruloskleroza azaltıcı rolü vardır.
- Ü Doksisisiklinin izole uygulamasında MMP 2 ve 9'un proformlarında azalma gerçekleşmektedir. Ancak toplam MMP'de artış olmaktadır. Bu nedenle doksisisiklinin MMP'ler üzerinde kompleks etkisi vardır.
- Ü Glomeruloskleroza glomerulde eksprese edilen MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 ekspresyon paternleri etkilenmektedir.
- Ü Glomeruloskleroza glomerullerde azalan TipIV kollajen miktarı TIMP-2 ekspresyonu ile benzer şekildedir ancak MMP 2 ve 9 ekspresyonu ile ilişkisi tam olarak açıklanamamıştır .
- Ü Doksisisiklinin renal ablasyondaki iyileştirici etkisini açıklamak için Kollajen III, diğer MMP ve inhibitörlerinin de değerlendirilmesi mekanizmaya daha fazla ışık tutabilir

## KAYNAKLAR

1. Rosai, Nelson G. Ordonez and Juan. Urinary Tract. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Philadelphia: Elsevier, 2004, s. 1167.
2. Suzuki D, Miyazaki M, Jinde K, Koji T ve ark. In situ hybridization studies of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 1997 Jul;52(1):111-9.
3. Fogo AB. Mesangial Matrix Modulation And Glomerulosclerosis. *Exp Nephrol.* 1999 Mar-Apr;7(2):147-59.
4. Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role Of Matrix Metalloproteinases In Renal Pathophysiologies. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Mar;292(3):F905-11.
5. Olgemöller B, Schleicher E. Alterations of glomerular matrix proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Investig.* 1993;71(5 Suppl):S13-9.
6. Reckelhoff JF, Tygart VL, Mitias MM, Walcott JL. Stz-Induced Diabetes Results In Decreased Activity Of Glomerular Cathepsin And Metalloprotease In Rats. *Diabetes.* 1993 Oct;42(10):1425-32.
7. Strikerforonı A, Wang Y, Lenz O, Striker L.J, Striker G.E Association of a Decreased Number of d(CA) Repeats in the Matrix Metalloproteinase-9 Promoter with Glomerulosclerosis Susceptibility in Mice. 13, s.l. : *J Am Soc Nephrol* , 2002. 2068-2076.
8. Schaefer L, Han X, August C, Matzkies F ve ark. Differential regulation of glomerular gelatinase b (mmp) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (timp-1) in obese zucker rats. *Diabetologia.* 1997 Sep;40(9):1035-43.
9. Bolbrinker J, Markovic S, Wehland M, Melenhorst WB ve ark. Expression and response to angiotensin-Converting Enzyme Inhibition of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Renal glomerular damage in Young Transgenic Rats with Renin-Dependent Hypertension. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Jan;316(1):8-16.
10. Roach DM, Fitrige RA, Laws PE, Millard SH ve ark. Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2002 Mar;23(3):260-9.
11. Hayashi K, Horikoshi S, Osada S, Shofuda K ve ark. Macrophage-derived MTI-MMP and increased MMP-2 activity are associated with glomerular damage in crescentic glomerulonephritis. *J Pathol.* 2000 Jul;191(3):299-305.



12. Reidy K ve Kaskel FJ. Pathophysiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 2007 Mar;22(3):350–4.
13. Asanuma K, Mundel P The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol.* 2003 Dec;7(4):255–9.
14. Akash N. Pathogenesis of focal and segmental glomerulosclerosis: a review. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2007 Jun;18(2):226–30.
15. Daskalakis N, Winn MP. Focal and segmental glomerulosclerosis. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Nov;63(21):2506–11.
16. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis.* 2004 -43(2):368–82.
17. Related Articles, Links Sharma K, Ziyadeh FN. The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases. *Am J Physiol.* 1994 Jun;266(6 Pt 2):F829–42
18. Fogo AB. Animal models of FSGS: lessons for pathogenesis and treatment. *Semin Nephrol.* 2003 Mar;23(2):161–71.
19. Schnaper HW. Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003 Mar;23(2):183–93.
20. Ma LJ, Fogo AB. Modulation of glomerulosclerosis. *Semin Immunopathol.* 2007 Nov;29(4):385–95.
21. Meyrier A. E pluribus unum: The riddle of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003 Mar;23(2):135–40.
22. Aiello S, Noris M, Todeschini M, Zappella S ve ark. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. *Kidney Int.* 1997 Jul;52(1):171–81.
23. Bidani AK, Mitchell KD, Schwartz MM, Navar LG ve ark. Absence of glomerular injury or nephron loss in a normotensive rat remnant kidney model. *Kidney Int.* 1990 Jul;38(1):28–38.
24. Yoshida Y, Fogo A, Shiraga H, Glick AD ve ark. Serial micropuncture analysis of single nephron function in subtotal renal ablation. *Kidney Int.* 1988 Apr;33(4):855–67.
25. Santos LS, Chin EW, Ioshii SO, Tambara Filho R. Surgical reduction of the renal mass in rats: morphologic and functional analysis on the remnant kidney. *Acta Cir Bras.* 2006 Jul-Aug;21(4):252–7
26. Guray M, Sarioglu S, Yilmaz O, Ozer E ve ark. Cyclosporine A toxicity in association with reduced renal mass. *Transplant Proc.* 2003 Dec;35(8):3128–33.

27. Griffin KA, Picken MM, Bidani AK. Blood pressure lability and glomerulosclerosis after normotensive 5/6 renal mass reduction in the rat. *Kidney Int.* 2004 Jan;65(1):209–18.
28. Fujihara CK, Costa Malheiros DMA, Zatz R, Noronha ID Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int.* 1998 Nov;54(5):1510-9..
29. Brunner FP, Hermle M, Mihatsch MJ, Thiel G. Effect of cyclosporine in rats with reduced renal mass. *Clin Nephrol.* 1986;25 Suppl 1:S148–54.
30. Kriz W, Hosser H, Halinel B, Gretz N ve ark. From segmental glomerulosclerosis to total nephron degeneration and interstitial fibrosis: a histopathological study in rat models and human glomerulopathies. *Nephrol Dial Transplant.* 1998 Nov;13(11):2781–98.
31. Kaitu'u TJ, Shen J, Zhang J, Morison NB ve ark. Matrix metalloproteinases in endometrial breakdown and repair: functional significance in a mouse model. *Biol Reprod.* 2005 Oct;73(4):672–80.
32. Kurakata H, Oka M, Matsubara Y, Niwa T ve ark. Developmentally regulated expression of matrix metalloproteinases during fetal rat colon morphogenesis. *Dev Growth Differ.* 2008 Jan;50(1):41–8.
33. Lafleur MA, Handsley MM, Knäuper V, Murphy G ve ark. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs ) *J Cell Sci.* 2002 Sep 1;115(Pt 17):3427–38.
34. Lee HY, You HJ, Won JY, Youn SW ve ark. Forkhead factor, FOXO3a, induces apoptosis of endothelial cells through activation of matrix metalloproteinases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Feb;28(2):302–8.
35. Inada M, Wang Y, Byrne MH, Rahman MI ve ark. Critical roles for collagenase-3 (Mmp13) in development of growth plate cartilage and in endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 7;101(49):17192-7.
36. Pilka R, Oborna I, Lichnovsky V, Havelka P ve ark. Endometrial expression of the estrogen-sensitive genes MMP–26 and TIMP–4 is altered by a substitution protocol without down-regulation in IVF patients. *Hum Reprod.* 2006 Dec;21(12):3146–56.
37. Norgauer J, Hildenbrand T, Idzko M, Panther E, Bandemir E ve ark. Elevated expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and membrane-type matrix metalloproteinases in venous leg ulcers. *Br J Dermatol.* 2002 Dec;147(6):1180–6.
38. Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 1991 May;5(8):2145–54.

39. Yong VW, Agrawal SM, Stirling DP. Targeting MMPs in acute and chronic neurological conditions. *Neurotherapeutics*. 2007 Oct;4(4):580–9.
40. Wong ET, Alsop D, Lee D, Tam A ve ark. Cerebrospinal fluid matrix metalloproteinase-9 increases during treatment of recurrent malignant gliomas. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2008 Jan 11;5(1):1 [Epub ahead of print]
41. Maksymowych WP, Landewé R, Conner-Spady B, Dougados M ve ark. Serum matrix metalloproteinase 3 is an independent predictor of structural damage progression in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum*. 2007 Jun;56(6):1846-53.
42. Ağan S, Sönmez S, Serdar M. The effect of topical doxycycline usage on gingival crevicular fluid MMP-8 levels of chronic and aggressive periodontitis patients: a pilot study. *Int J Dent Hyg*. 2006 Aug;4(3):114-21.
43. Hernández M, Martínez B, Tejerina JM, Valenzuela MA ve ark. MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2007 Sep;34(9):729-35.
44. Epstein H, Grad E, Golomb M, Koroukhov N ve ark. Innate immunity has a dual effect on vascular healing: Suppression and aggravation of neointimal formation and remodeling post-endotoxin challenge. *Atherosclerosis*. 2007 Dec 5 [Epub ahead of print]
45. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2008 Jan 15;75(2):346-59.
46. Lalu MM, Gao CQ, Schulz R. Matrix metalloproteinase inhibitors attenuate endotoxemia induced cardiac dysfunction: a potential role for MMP-9. *Mol Cell Biochem*. 2003 Sep;251(1-2):61-6.
47. Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J ve ark. *Nature*. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. 1994 Jul 7; 370(6484):61–5.
48. Yu AE, Hewitt RE, Connor EW, Stetler-Stevenson WG Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs Aging*. 1997 Sep;11(3):229-44.
49. Sarioğlu S, Ozer E, Kirimca F, Sis B, Pabuçcuoğlu U. Matrix metalloproteinase-2 expression in laryngeal preneoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract*. 2001;197(7):483-6.
50. Baltazar-Rodriguez LM, Anaya-Ventura A, Andrade-Soto M, Monrroy-Guizar EA, ve ark. Polymorphism in the Matrix Metalloproteinase-2 Gene Promoter is Associated with

Cervical Neoplasm Risk in Mexican Women. *Biochem Genet.* 2008 Jan 22; [Epub ahead of print]

51. Cotignola J, Roy P, Patel A, Ishill N ve ark. Functional polymorphisms in the promoter regions of MMP2 and MMP3 are not associated with melanoma progression. *J Negat Results Biomed.* 2007 Oct 24; 6:9.

52. Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1999 Jul 30;274(31):21491-4. Review.

53. Naini AE, Harandi AA, Moghtaderi J, Bastani B ve ark. Doxycycline: a pilot study to reduce diabetic proteinuria. *Am J Nephrol.* 2007;27(3):269-73.

54 Akiyama K, Shikata K, Sugimoto H, Matsuda M ve ark. Changes in serum concentrations of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and type IV collagen in patients with various types of glomerulonephritis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1997 Feb; 95(2):115-28.

55. Lenz O, Elliot SJ, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol.* 2000 Mar;11(3):574-81. Review.

56. Keeling J, Herrera GA. Human matrix metalloproteinases: Characteristics and pathologic role in altering mesangial homeostasis. *Microsc Res Tech.* 2008 Feb 25; [Epub ahead of print]

57. Kumar V, Abbas A, Fausto N. *Pathologic Basis of Disease.* 2004, Cilt Chapter 3; 111.

58. Steinmann-Niggli K, Ziswiler R, Küng M, Marti HP. Inhibition of matrix metalloproteinases attenuates anti-Thy1.1 nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Mar; 9(3):397-407.

59. Zaoui P, Cantin JF, Alimardani-Bessette M, Monier F ve ark. Role of metalloproteases and inhibitors in the occurrence and progression of diabetic renal lesions. *Diabetes Metab.* 2000 Jul;26 Suppl 4:25-9. Review.

60. Schnaper HW. Balance between matrix synthesis and degradation: a determinant of glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol.* 1995 Feb;9(1):104-11. Review.

61. Williamson JR, Tilton RG, Chang K, Kilo C. Basement membrane abnormalities in diabetes mellitus: relationship to clinical microangiopathy. *Diabetes Metab Rev.* 1988 Jun;4(4):339-70. Review.

62. Ziyadeh FN. Renal tubular basement membrane and collagen type IV in diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1993 Jan;43(1):114-20. Review.
63. Ahuja TS. Doxycycline decreases proteinuria in glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis.* 2003 Aug;42(2):376-80. Links
64. Bertram G. Katzung, Ernest Jawetz, MD, PhD. Kloramfenikol ve Tetrasiklinler. San Francisco: a LANGE medical book, 1995. 925.
65. Van Bambeke F, Tulkens PM. Macrolides: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18 Suppl 1:S17-23.
66. Vieillard-Baron A, Frisdal E, Raffestin B, Baker AH, Eddahibi S, Adnot S, D'Ortho MP. Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer limits monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling in rats. *Hum Gene Ther.* 2003 Jun 10;14(9):861-9.
67. Wu LL, Cox A, Roe CJ, Dziadek M, Cooper ME, Gilbert RE. Transforming growth factor beta 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int.* 1997 May;51(5):1553-67.
68. Kren S, Hostetter TH. The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int.* 1999 Jul;56(1):333-7.
69. Lamparter S, Slight SH, Weber KT. Doxycycline and tissue repair in rats. *J Lab Clin Med.* 2002 May;139(5):295-302.
70. Perico N, Detcheva A, Khalil EI, Remuzzi G. Cyclosporine induces glomerulosclerosis: three-dimensional definition of the lesions in a rat model of renal transplant. *Kidney Int.* 1996 May;49(5):1283-8.
71. Schiller B, Moran J. Focal glomerulosclerosis in the remnant kidney model--an inflammatory disease mediated by cytokines. *Nephrol Dial Transplant.* 1997 Mar;12(3):430-7
72. Sanders JS, van Goor H, Hanemaaijer R, Kallenberg CG, Stegeman CA. Renal expression of matrix metalloproteinases in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Jun;19(6):1412-9.
73. Tatekawa Y, Kemmotsu H, Joe K, Mouri T, Arai J, Miyamoto Y, Ohkawa H. Matrix metalloproteinase-9 expression in congenital diaphragmatic hernia during mechanical ventilation. *Surg Today.* 2005;35(7):524-9.

74. Wiechelmann KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD . Investigation of bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 15:175 (1): 2373-2379).
75. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; 218:325-9.
76. Zitella A, Gontero P. Re: Lack of association between matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter polymorphism and risk of renal cell carcinoma. *Int Braz J Urol*. 2007 Nov-Dec;33(6):838-9.
77. Wang YD, Mao JW Expression of matrix metalloproteinase-1 and tumor necrosis factor-alpha in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2007 Nov 28;13(44):5926-32.
78. Fontana RJ, Goodman ZD, Dienstag JL, Bonkovsky HL ve ark. HALT• C Trial Group This is publication number 26 of the HALT• C study group. Relationship of serum fibrosis markers with liver fibrosis stage and collagen content in patients with advanced chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2008 Jan 3 [Epub ahead of print]
79. Wu YW, Yang WS, Chen MF, Lee BC, Hung CS, Liu YC, Jeng JS, Huang PJ, Kao HL. High serum level of matrix metalloproteinase-1 and its rapid surge after intervention in patients with significant carotid atherosclerosis. *J Formos Med Assoc*. 2008 Jan;107(1):93-8.
80. Sis B, Sağol O, Küpelioğlu A, Ozer E ve ark.. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, cathepsin D, and tenascin-C expression in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2004;200(5):379-87.
81. Nakoman C, Resmi H, Ay O, Acikel U ve ark. Effects of basic fibroblast factor (bFGF) on MMP-2, TIMP-2, and type-I collagen levels in human lung carcinoma fibroblasts. *Biochimie*. 2005 Mar-Apr;87(3-4):343-51.
82. Gürkan A, Emingil G, Saygan BH, Atilla G, ve ark. Gene polymorphisms of matrix metalloproteinase-2, -9 and -12 in periodontal health and severe chronic periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2007 Dec 20; [Epub ahead of print]
83. Kurzepa J, Stryjecka-Zimmer M. The effect of interferon beta-1a on MMP-2 and MMP-9 proteolytic activity. *Folia Biol (Praha)*. 2007;53(6):220-1
84. Dubois SG, Tchoukalova YD, Heilbronn LK, Albu JB ve ark. Look AHEAD Adipose Research Group. Potential role of increased matrix metalloproteinase-2 (MMP2) transcription in impaired adipogenesis in type 2 diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Mar 21;367(4):725-8.

85. Orn S, Manhenke C, Squire IB, Ng L, ve ark. Plasma MMP-2, MMP-9 and N-BNP in long-term survivors following complicated myocardial infarction: relation to cardiac magnetic resonance imaging measures of left ventricular structure and function. *J Card Fail.* 2007 Dec;13(10):843-9.
86. Nerusu KC, Warner RL, Bhagavathula N, McClintock SD ve ark. Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) in acute inflammatory tissue injury. *Exp Mol Pathol.* 2007 Oct;83(2):169-76.
87. Ateş A, Türkçapar N, Olmez U, Tiryaki O, ve ark. Serum pro-matrix metalloproteinase-3 as an indicator of disease activity and severity in rheumatoid arthritis: comparison with traditional markers. *Rheumatol Int.* 2007 Jun;27(8):715-22
88. Tsukahara S, Shinozaki M, Ikari K, Mochizuki T ve ark. Effect of matrix metalloproteinase-3 functional SNP on serum matrix metalloproteinase-3 level and outcome measures in Japanese RA patients *Rheumatology (Oxford).* 2008 Jan;47(1):41-4
89. Zhu J, Yu DT. Matrix metalloproteinase expression in the spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol.* 2006 Jul;18(4):364-8. Review
90. Koskivirta I, Rahkonen O, Mäyränpää M, Pakkanen S ve ark. Tissue inhibitor of metalloproteinases 4 (TIMP4) is involved in inflammatory processes of human cardiovascular pathology. *Histochem Cell Biol.* 2006 Sep;126(3):335-42.
91. Lee MH, Rapti M, Murphy G. Total conversion of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) for specific metalloproteinase targeting: fine-tuning TIMP-4 for optimal inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme. *J Biol Chem.* 2005 Apr 22;280(16):15967-75.
92. Ripley D, Tunuguntla R, Susi L, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinase-3 and -4 in normal ovary and ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2006 Sep-Oct;16(5):1794-800.
93. Kim M, Murakami A, Ohigashi H. Modifying effects of dietary factors on (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced pro-matrix metalloproteinase-7 production in HT-29 human colorectal cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007 Oct; 71(10):2442-50.
94. Matsumoto T, Kumagai J, Hasegawa M, Tamaki M ve ark. Significant increase in the expression of matrix metalloproteinase 7 in primary CNS lymphoma. *Neuropathology.* 2007 Dec 21 [Epub ahead of print]

95. Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomise H ve ark. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2007 Dec; 58(3):384-91
96. Kuhlmann KF, van Till JW, Boermeester MA, de Reuver PR ve ark. Evaluation of matrix metalloproteinase 7 in plasma and pancreatic juice as a biomarker for pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 May;16(5):886-91.
97. Kawasaki K, Kawakami T, Watabe H, Itoh F, Mizoguchi M, Soma Y. Expression of matrilysin (matrix metalloproteinase-7) in primary cutaneous and metastatic melanoma. *Br J Dermatol*. 2007 Apr; 156(4):613-9.
98. Wang X, Pei D. Shedding of membrane type matrix metalloproteinase 5 by a furin-type convertase: a potential mechanism for down-regulation. *J Biol Chem*. 2001 Sep 21;276(38):35953-60.
99. Aquilante CL, Beitelshees AL, Zineh I. Blood sampling and the measurement of circulating matrix metalloproteinase-8. *Clin Chim Acta*. 2008 Jan 11; [Epub ahead of print] 1
100. Decock J, Long JR, Laxton RC, Shu XO ve ark. Association of matrix metalloproteinase-8 gene variation with breast cancer prognosis. *Cancer Res*. 2007 Nov 1;67(21):10214-21
101. Kim KW, Romero R, Park HS, Park CW ve ark. A rapid matrix metalloproteinase-8 bedside test for the detection of intraamniotic inflammation in women with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Sep;197(3):292.e1-5
102. Al Mofleh IA. Severe acute pancreatitis: Pathogenetic aspects and prognostic factors. *World J Gastroenterol*. 2008 Feb 7; 14(5):675-84
103. El Zein N, Badran B, Sariban E. VIP differentially activates  $\beta_2$  integrins, CR1, and matrix metalloproteinase-9 in human monocytes through cAMP/PKA, EPAC, and PI-3K signaling pathways via VIP receptor type 1 and FPRL1. *J Leukoc Biol*. 2008 Jan 3; [Epub ahead of print]
104. Mroczko B, Kozłowski M, Groblewska M, Lukaszewicz M ve ark. The diagnostic value of the measurement of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), squamous cell cancer antigen (SCC) and carcinoembryonic antigen (CEA) in the sera of esophageal cancer patients. *Clin Chim Acta*. 2008 Mar; 389(1-2):61-6.



105. Sakata KI, Someya M, Omatsu M, Asanuma H ve ark. Correction: The enhanced expression of the matrix metalloproteinase 9 in nasal NK/T-cell lymphoma. *BMC Cancer*. 2008 Feb 7;8(1):45.
106. Kang DW, Park MH, Lee YJ, Kim HS ve ark. Phorbol Ester Up-regulates Phospholipase D1 but Not Phospholipase D2 Expression through a PKC/Ras/ERK/NF {kappa} B-dependent Pathway and Enhances Matrix Metalloproteinase-9 Secretion in Colon Cancer Cells *J Biol Chem*. 2008 Feb 15;283(7):4094-104.
107. Nakamura T, Kuwai T, Kim JS, Fan D, Kim SJ, Fidler IJ. Stromal metalloproteinase-9 is essential to angiogenesis and progressive growth of orthotopic human pancreatic cancer in parabiont nude mice. *Neoplasia*. 2007 Nov;9(11):979-86.
108. Tang CH, Tan TW, Fu WM, Yang RS. Involvement of matrix metalloproteinase-9 in stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway of lung cancer metastasis. *Carcinogenesis*. 2008 Jan;29(1):35-43.
109. Guo M, Cox B, Mahale S, Davis W ve ark. Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke. *Neuroscience*. 2008 Jan 24;151(2):340-51. Epub 2007 Oct 18. [Links](#)
110. Ye ZX, Leu HB, Wu TC, Lin SJ ve ark. Baseline serum matrix metalloproteinase-9 level predicts long-term prognosis after coronary revascularizations in stable coronary artery disease. *Clin Biochem*. 2008 Mar;41(4-5):292-298. Epub 2007 Nov 21. [Links](#)
111. Bouzeghrane F, Darsaut T, Salazkin I, Ogoudikpe C, Gevry G, Raymond J. Matrix metalloproteinase-9 may play a role in recanalization and recurrence after therapeutic embolization of aneurysms or arteries. *J Vasc Interv Radiol*. 2007 Oct; 18(10):1271-9
112. İşlekel H, Oktay G, Terzi C, Canda AE ve ark. Matrix metalloproteinase-9,-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cell Biochem Funct*. 2007 Jul-Aug;25(4):433-41.
113. Gong J, Zhao Y, Abdel-Fattah R, Amos S ve ark. Matrix metalloproteinase-9, a potential biological marker in invasive pituitary adenomas. *Pituitary*. 2008;11(1):37-48.
114. Gill JH, Kirwan IG, Seargent JM, Martin SW ve ark. MMP-10 is overexpressed, proteolytically active, and a potential target for therapeutic intervention in human lung carcinomas. *Neoplasia*. 2004 Nov-Dec;6(6):777-85.

115. Expression of matrix metalloproteinase-10 in human bladder transitional cell carcinoma. Seargent JM, Loadman PM, Martin SW, Naylor B, Bibby MC, Gill JH. 4, s.l. : Urology. , 2005 Apr, Cilt 65. 815-20.
116. Seargent JM, Loadman PM, Martin SW, Naylor B, Bibby MC, Gill JH. Expression of matrix metalloproteinase-10 in human bladder transitional cell carcinoma. Urology. 2005 Apr;65(4):815-20
117. Orbe J, Montero I, Rodríguez JA, Beloqui O ve ark. .Independent association of matrix metalloproteinase-10, cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis. J Thromb Haemost. 2007 Jan; 5(1):91-7
118. Saunders WB, Bayless KJ, Davis GE. MMP-1 activation by serine proteases and MMP-10 induces human capillary tubular network collapse and regression in 3D collagen matrices. J Cell Sci. 2005 May 15;118(Pt 10):2325-40.
119. Jia L, Cao J, Wei W, Wang S ve ark. CD147 depletion down-regulates matrix metalloproteinase-11, vascular endothelial growth factor-A expression and the lymphatic metastasis potential of murine hepatocarcinoma Hca-F cells. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(11):2135-42.
120. Yang YH, Deng H, Li WM, Zhang QY ve ark. Identification of matrix metalloproteinase 11 as a predictive tumor marker in serum based on gene expression profiling. Clin Cancer Res. 2008 Jan 1;14(1):74-81.
121. Houghton AM, Grisolano JL, Baumann ML, Kobayashi DK ve ark. Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases. Cancer Res. 2006 Jun 15;66(12):6149-55.
122. Woo M, Park K, Nam J, Kim JC. Clinical implications of matrix metalloproteinase-1, -3, -7, -9, -12, and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms in colorectal cancer. J Gastroenterol Hepatol. 2007 Jul;22(7):1064-70.
123. Yang X, Dong Y, Zhao J, Sun H, Deng Y, Fan J, Yan Q. Increased expression of human macrophage metalloelastase (MMP-12) is associated with the invasion of endometrial adenocarcinoma. Pathol Res Pract. 2007;203(7):499-505.
124. Chiba Y, Yu Y, Sakai H, Misawa M. Increase in the expression of matrix metalloproteinase-12 in the airways of rats with allergic bronchial asthma. Biol Pharm Bull. 2007 Feb; 30(2):318-23.

125. Behonick DJ, Xing Z, Lieu S, Buckley JM ve ark. Role of Matrix Metalloproteinase 13 in Both Endochondral and Intramembranous Ossification during Skeletal Regeneration. *2007 Nov 7*;2(11):e1150
126. Rath T, Roderfeld M, Graf J, Wagner S ve ark. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: a precancerous potential? *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Nov;12(11):1025-35.
127. Evans RD, Itoh Y. Analyses of MT1-MMP activity in cells. *Methods Mol Med.* 2007;135:239-49.
128. Mattei MG, Roeckel N, Olsen BR, Apte SS Genes of the membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene family, MMP14, MMP15, and MMP16, localize to human chromosomes 14, 16, and 8, respectively. *Genomics.* 1997 Feb 15;40(1):168-9.
129. Reichel CA, Rehberg M, Bihari P, Moser CM ve ark. Gelatinases mediate neutrophil recruitment in vivo: evidence for stimulus specificity and a critical role in collagen IV remodeling. *J Leukoc Biol.* 2008 Jan 3 [Epub ahead of print]
130. Lelongt B, Bengatta S, Delauche M, Lund LR ve ark. Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J Exp Med.* 2001 Apr 2;193(7):793-802.
131. Urushihara M, Kagami S, Kuhara T, Tamaki T ve ark. Glomerular distribution and gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2002 Jul;17(7):1189-96.
132. Sanders JS, van Goor H, Hanemaaijer R, Kallenberg CG ve ark. Renal expression of matrix metalloproteinases in human ANCA-associated glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Jun;19(6):1412-9.
133. Yang M, Huang H, Li J, Huang W, and Wang H. Connective tissue growth factor increases matrix metalloproteinase-2 and suppresses tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 production by cultured renal interstitial fibroblasts. *Wound Repair Regen.* 2007 Nov-Dec; 15(6):817-24
134. Fornoni A, Wang Y, Lenz O, Striker LJ ve ark. Association of a decreased number of d(CA) repeats in the matrix metalloproteinase-9 promoter with glomerulosclerosis susceptibility in mice. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Aug;13(8):2068-76.
135. Carome MA, Striker LJ, Peten EP, Moore J ve ar. Human glomeruli express TIMP-1 mRNA and TIMP-2 protein and mRNA. *Am J Physiol.* 1993 Jun;264(6 Pt 2):F923-9.

136. Brown PD. Matrix metalloproteinase inhibitors. *Angiogenesis*. 1998; 1(2):142-54
137. Eatock M, Cassidy J, Johnson J, Morrison R ve ark. A dose-finding and pharmacokinetic study of the matrix metalloproteinase inhibitor MMI270 (previously termed CGS27023A) with 5-FU and folinic acid. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2005 Jan;55(1):39-46. Epub 2004 Sep 10.
138. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV ve ark. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res*. 1998 Nov;12(2):12-26. Review
139. Onoda T, Ono T, Dhar DK, Yamanoi A ve ark. Tetracycline analogues (doxycycline and COL-3) induce caspase-dependent and -independent apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Cancer*. 2006 Mar 1;118(5):1309-15.
140. De Paiva CS, Corrales RM, Villarreal AL, Farley WJ ve ark. Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye. *Exp Eye Res*. 2006 Sep;83(3):526-35. Epub 2006 Apr 27. Links
141. Pasternak B, Missios A, Askendal A, Tengvall P ve ark. Doxycycline-coated sutures improve the suture-holding capacity of the rat Achilles tendon. *Acta Orthop*. 2007 Oct;78(5):680-6.
142. Burggraf D, Trinkl A, Dichgans M, Hamann GF. Doxycycline inhibits MMPs via modulation of plasminogen activators in focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2007 Mar;25(3):506-13. Epub 2006 Dec 12.
143. Pasternak B, Rehn M, Andersen L, Agren MS ve ark. Doxycycline-coated sutures improve mechanical strength of intestinal anastomoses. *Int J Colorectal Dis*. 2008 Mar;23(3):271-6. Epub 2007 Nov 28.
144. Therapeutic Approach by an MMP inhibitor drug, Doxycycline, in Experimental Immune Complex Nephritis" ASN . Saglam F, Celik A, Tayfur D, Cavdar Z, Yilmaz O, Sarioglu S, Oktay G, Kolatan E, Camsar T. San Fransisco : Renal Week, October 2007 .
145. . Hiramatsu N, Hiromura K, Shigehara T, Kuroiwa T ve ark. Angiotensin II type 1 receptor blockade inhibits the development and progression of HIV-associated nephropathy in a mouse model. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Feb;18(2):515-27
146. Ideura H, Hiromura K, Hiramatsu N, Shigehara T, Takeuchi S, Tomioka M, Sakairi T, Yamashita S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Kopp JB, Nojima Y. Angiotensin II

provokes podocyte injury in murine model of HIV-associated nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Oct;293(4):F1214-21.

147. Related Articles, LinksLalu MM, Cena J, Chowdhury R, Lam A, Schulz R. Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2006 Sep;149(1):31-42

148. Amann K, Nichols C, Tornig J, Schwarz U, Zeier M, Mall G, Ritz E. Effect of ramipril, nifedipine, and moxonidine on glomerular morphology and podocyte structure in experimental renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1996 Jun;11(6):1003-11

149. Zhang G, el Nahas AM. The effect of rhubarb extract on experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant.* 1996 Jan;11(1):186-90.

150. Hamaguchi A, Kim S, Wanibuchi H, Iwao H. Angiotensin II and calcium blockers prevent glomerular phenotypic changes in remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol.* 1996 May;7(5):687-93

151. Hahn S, Kuemmerle NB, Chan W, Hisano S, Saborio P, Krieg RJ Jr, Chan JC. Glomerulosclerosis in the remnant kidney rat is modulated by dietary alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol.* 1998 Nov;9(11):2089-95.

152. Soylu A, Kavukçu S, Sarioğlu S, Astarcioglu H ve ark. The effect of vitamin A on the course of renal ablation nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2001 Jun;16(6):472-6.

153. Chen YM, Lin SL, Chiang WC, Wu KD ve ark. Pentoxifylline ameliorates proteinuria through suppression of renal monocyte chemoattractant protein-1 in patients with proteinuric primary glomerular diseases. *Kidney Int.* 2006 Apr;69(8):1410-5.

154. Ma LJ, Nakamura S, Aldigier JC, Rossini M ve ark. Regression of glomerulosclerosis with high-dose angiotensin inhibition is linked to decreased plasminogen activator inhibitor-1. *J Am Soc Nephrol.* 2005 Apr; 16(4):966-76.

155. Hiramatsu N, Hiromura K, Shigehara T, Kuroiwa T ve ark. Angiotensin II type 1 receptor blockade inhibits the development and progression of HIV-associated nephropathy in a mouse model. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Feb;18(2):515-27

156. Ideura H, Hiromura K, Hiramatsu N, Shigehara T, Takeuchi S, Tomioka M, Sakairi T, Yamashita S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Kopp JB, Nojima Y. Angiotensin II provokes podocyte injury in murine model of HIV-associated nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007 Oct;293(4):F1214-21.

157 Saglam F, Celik A, Tayfur D, Cavdar Z ve ark. Therapeutic Approach by an MMP inhibitor drug, Doxycycline, in Experimental Immune Complex Nephritis's . San Fransisco : Renal Week, October 2007