

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI

**SIÇANLARDA KİMYASAL PERİTONİTE BAĞLI
PERİTON FİBROZİSİNDE PENTOKSİFİLİNİN
FİBROZİSE VE İLGİLİ GÖSTERGELERE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr.Ayşe Gül TEMİZKAN

TEZ DANIŞMANI

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI
NEFROLOJİ BİLİM DALI

**SIÇANLARDA KİMYASAL PERİTONİTE BAĞLI
PERİTON FİBROZİSİNDE PENTOKSİFİLİNİN
FİBROZİSE VE İLGİLİ GÖSTERGELERE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr.Ayşe Gül TEMİZKAN

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ	ii
GRAFİK LİSTESİ.....	iii
RESİM LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	ix
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY (İNGİLİZCE ÖZET).....	4
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	7
4. GENEL BİLGİLER.....	9
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
6. BULGULAR.....	26
7. TARTIŞMA.....	44
8. KAYNAKLAR	50

TABLO LİSTESİ

Tablo. 1 Matriks Metalloproteinazlar

Tablo. 2 Poliakrilamid jellerin hazırlanması

Tablo. 3 Solüsyon ve tamponların hazırlanması

Tablo. 4 Paryetal periton fibrotik alan yüzdesi, fibrozis skorlaması, paryetal periton kalınlığı, yangı skorlaması, damarlanma skorlamasının tüm gruplara göre ortalama \pm standart sapma değerleri.

Tablo. 5 Tüm histopatolojik göstergeler için paryetal peritona ait ikili grup karşılaştırmalarının istatistiksel sonuçları

Tablo. 6 Visseral periton fibrozis skorlaması, visseral periton kalınlığı ve yangı skorlamasının tüm gruplara göre dağılımı

Tablo. 7 Visseral periton için ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen istatistiksel sonuçlar

Tablo. 8 Paryetal periton dokusunda proMMP-2 ve aktif MMP-2'nin tüm gruplarda ki ortalama \pm standart sapma değerleri.

Tablo. 9 Paryetal peritona ait ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen istatistiksel sonuçlar

Tablo. 10 Paryetal periton dokusunda TIMP-1 ve TIMP-2'nin tüm gruplarda ki ortalama \pm standart sapma değerleri.

Tablo. 11 Paryetal periton dokusunda TIMP-1 ve TIMP-2'nin ikili grup karşılaştırmalarından elde edilen istatistiksel sonuçlar .

Tablo. 12 Visseral periton dokusunda proMMP-2 ve aktifMMP-2 tüm gruplarda ki ortalama \pm standart sapma değerleri.

Tablo. 13 Visseral periton dokusunda proMMP-2'nin ikili grup karşılaştırmalarından elde edilen istatistiksel sonuçlar .

Tablo. 14 Visseral periton dokusunda proMMP-9'un ikili grup karşılaştırmalarından elde edilen istatistiksel sonuçlar .

Tablo. 15 Visseral peritondaki TIMP-1 ve TIMP-2'nin tüm gruplardaki ortalama \pm standart sapma değerleri.

SEKİL LİSTESİ

Şekil. 1 Periton fibrozisinin şematik olarak gösterilmesi

Şekil. 2 Hücre dışı matriksin yeniden yapılanmasında; MMP'lerin aktivasyon ve inhibisyonları

Şekil. 3 MMP'lerin aktivitelerinin düzenlenme basamakları (ESM: Hücre dışı matriks)

Şekil. 4 Çalışma tasarımı

GRAFİK LİSTESİ

Grafik. 1 Paryetal periton fibrozis skorlamasının tüm gruplara göre dağılımı

Grafik. 2 Paryetal periton kalınlığının tüm gruplara göre dağılımı

Grafik. 3 Visseral periton fibrozis skorunun tüm gruplardaki dağılımı

Grafik. 4 Visseral periton kalınlığının tüm gruplardaki dağılımı

Grafik. 5 Visseral peritonda proMMP-2'nin tüm gruplara göre dağılımı

Grafik. 6 Visseral peritonda ölçülen proMMP-9'un tüm gruplarda dağılımı

RESİM LİSTESİ

Resim. 1 I Mason Trichrome boyamasıyla paryetal peritonda fibrotik alanların görünümü

II. İmaj analiz sistemi ile yeşil boyalı alanların yüzdesinin belirlenmesi amacıyla program tarafından yarı otomatik olarak seçili görünüm.

Resim. 2 KH grubundan bir sıçanın paryetal periton kalınlığına ait görünüm.

Resim. 3 Serum fizyolojik grubundan bir sıçanın paryetal peritonunda fibrozis ve yangıya ait görünüm

Resim. 4 KH grubundan bir sıçanın paryetal peritonundaki yangıya (kırmızı ok) ve damar oluşumlarına (siyah oklar) ait görünümleri.

Resim. 5 KH grubundan bir sıçanın visseral peritonuna ait fibroz ve kalınlık artışı ve yangı durumu (F: fibroz, Y: yangı, F+Y: fibroz + yangı)

Resim. 6 KH + pentoksifilin grubundan bir sıçanın visseral peritonunda fibrozisin yokluğuna ait görünüm

Resim.7 Paryetal periton proMMP-2 ve aktif MMP-2'nin jelatin zimografik görünümü

A: KH, B: Pentoksifilin, C: KH + Pentoksifilin, D: Derişik tuzlu su, E: Serum Fizyolojik

Resim.8 Visseral periton proMMP-2, aktif MMP-2, proMMP-9 ve aktif MMP-9'un jelatin zimografik görünümü

KISALTMALAR

CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
PTX	Pentoxifylline
cAMP	Cycle Adenosin Mono Phosphate
MMP-2	Matrix Metalloproteinases-2
MMP-9	Matrix Metalloproteinases-9
MT-MMP	Zara bağlı MMP
TIMP-1	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases-1
TIMP-2	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases-2
TIMP-3	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases-3
TIMP-4	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases-4
proMMP-2	Öncül Matriks Metalloproteinaz-2
proMMP-9	Öncül Matriks Metalloproteinaz-9
CHX	Chlorhexidin
NaCl	Sodyum Klorür
HE	Hematoxiline & Eosine
MT	Masson's Trichrome
ELISA	Enzyme-Linked Immunoassay
SAPD	Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi
KH	Klorheksidin
GFH	Glomerül Filtrasyon Hızı
K/DOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
SDBY	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
PD	Periton Diyalizi
SAPD	Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi
APD	Aletli Periton Diyalizi
GAPD	Gece Aletli Periton Diyalizi
SDPD	Sürekli Döngüsel Periton Diyalizi
AGEs	Glikozilasyon Son Ürünleri
IL-1 β	İnterlökin-1 β
TNF- α	Tümör nekrozis faktör- α
IL-6	İnterlökin-6
FGF2	Fibroblast büyüme faktörü-2

TGF- β	Tümör büyüme faktörü- β
EGF	Damar endotel büyüme faktörü
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
PDGF	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
USA	Amerika Birleşik Devletleri
ml	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimol
CaCL ₂	Kalsiyum Klorür
μ l	Mikrolitre
TCA	Trikloroasetikasit
BCA	Bicinkoninik Asit
Cu ⁺²	Bakır
nm	Nanometre
μ m	Mikrometre
BSA	Sığır Serum Albumin
μ g	Mikrogram
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
d	Distile
TMB	Tetrametilbenzidin
ng	Nanogram
EIA	Enzim Immunoassay
H R P	At Radish Peroksidaz
F	Fibrozis
Y	Yangı

pg/mg protein pikogram/miligram protein

pmol/mg protein pikomol/miligram protein

TEŞEKKÜR

Nefroloji uzmanlık eğitim boyunca bilgi ve birikimleriyle yetişmemde katkıları bulunan Nefroloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Taner Çamsarı'ya, Nefroloji Bilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Ali Çelik, Doç. Dr. Caner Çavdar, Doç. Dr. Aykut Sifil'e , tezimin hazırlanması sırasında çalışmalarımda yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı asistanı Efsun Kolatan'a, Patoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Sülen Sarıoğlu'na, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gülgün Oktay'a ve doktora öğrencisi Zahide Çavdar'a, tezimin yazılmasında bana yardımcı olan Dr. Dilek Solmaz, Dr. Elif Yaka'ya ve her türlü desteği ile yanımda olan kız kardeşim Serpil Temizkan'a teşekkür ederim.

ÖZET

SIÇANLARDA KİMYASAL PERİTONİTE BAĞLI PERİTON FİBROZİSİNDE PENTOKSİFİLİNİN FİBROZİSE VE İLGİLİ GÖSTERGELERE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ayşe Gül Temizkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi

İç Hastalıkları A.B.D. Nefroloji B.D

Yazışma Adresi: DEUTF İç Hastalıkları A.B.D Nefroloji B.D Balçova/ İZMİR

Elektronik posta:aysegul.temizkan@deu.edu.tr

Giriş: Periton fibrozisi sürekli ayaktan periton diyaliz tedavisinin (SAPD) sonlandırılmasında önemli bir nedendir. SAPD'ye bağlı periton fibrozisinin tedavisi veya önlenmesi önemli bir konu olarak kalmıştır. Günümüzdeki kanıtlar periton fibrozisinin gelişmesinde matriksin aşırı üretiminin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. SAPD'li hastalarda gelişen periton fibrozisinin tedavisi yüz güldürücü değildir. Pentoksifilin bir metilksantin türevidir. Bir çok çalışmada; deri, karaciğer ve böbrekte gelişen fibrozisi geriletliği gösterilmiştir.

Amaç: Klorheksidin ile oluşturulan periton fibrozisinde, pentoksifilinin; fibrozis üzerine olan etkisini belirlemek ve bu olgu ile ilgili olabilecek; periton doku cAMP düzeylerindeki değişikliği tespit edip bunların periton doku MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 dengeleri üzerine etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 40 adet Wistar albino sıçan alındı. Beş gruba bölündü. Tüm uygulamalar karın içine 24 G iğne ile 14 gün boyunca yapıldı. Grup 1'de kimyasal peritonit oluşturuldu. Karın içine %0,1 lik klorheksidin (KH) + %15'lik etanol + serum fizyolojik karışımından 3 ml/gün verildi. Grup 2'de karın içine, pentoksifilin 4mg/100 g (0,2 ml/100 g) serum fizyolojik ile karıştırılıp 3 ml/gün verildi. Grup 3'de periton fibrozisin önlenmesi amacıyla karın içine: %0,1'lik KH + %15'lik etanol + serum fizyolojik ve 4mg/100 g (0,2 ml/100 g) pentoksifilin karışımından 3 ml/gün verildi. Grup 4; pentoksifilinin içinde bulunduğu derişik tuzlu su idi, 1 ml arı su + 35 mg NaCl karışımından 3 ml/gün karın içine verildi. Grup 5 kontrol grubu olarak belirlendi ve karın içine %0,9'luk serum fizyolojikten 3 ml/gün verildi.

15.günde sıçanlar sakrifiye edildi ve paryetal periton için karın ön duvarından ve visseral periton için karaciğerden örnekler alındı. Patolojik inceleme için Hematoksilen & Eosin (HE) ve modifiye Masson's Trichrome (MT) boyası kullanıldı. Işık mikroskopisi ile şu göstergeler değerlendirildi:1) Periton kalınlığı (paryetal ve visseral periton) 2) Fibrozis skorlaması (paryetal ve visseral periton) 3) Damarlanma skorlaması (paryetal periton) 4) Yangı skorlaması (paryetal ve visseral periton) 5) Paryetal periton fibrotik alan yüzdesi. Kalınlıklar ve fibrotik alan yüzdesi mikrometre (μm) olarak diğer skorlamalar boyama tekniğine dayanılarak değerlendirildi. Biyokimyasal değerlendirmede; paryetal ve visseral periton doku örneklerinde; a) proMMP-2, b) proMMP-9 c) aktif MMP-2 d) aktif MMP-9 e) TIMP-1 f) TIMP-2 g) cAMP göstergelerine bakıldı. MMP'lerin çalışılmasında jelatin zimoğrafı, TIMP'ler için ELİSA ve cAMP için EIA yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Paryetal peritonda fibrozisin tüm histopatolojik göstergeleri açısından KH ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı. ($p<0.05$). Visseral periton oluşan fibrozis için yangı skorlaması dışında diğer göstergeler için istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Paryetal peritonda ölçülen proMMP-2 düzeyleri KH grubunda yüksek bulundu. Serum fizyolojik grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p<0,05$). Ancak KH ile KH + pentoksifilin verilen grup arasında istatistiksel anlamlılığa rastlanılmadı. ($p>0.05$) Paryetal peritonda ölçülen aktif MMP-2, TIMP-1 ve cAMP değerleri için tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$). TIMP-2 ölçümünde ise KH + pentoksifilin grubunda KH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik bulundu ($p<0.05$). Paryetal peritonda proMMP-9 ölçümüne hiçbir grupta rastlanılmadı.

Visseral peritonda proMMP-2 ve proMMP-9 ölçümleri KH grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). Aktif MMP-2 KH grubu dışındaki gruplarda gösterilemedi. Yine aktif MMP-9 visseral peritonda gösterilemedi. TIMP-1, TIMP-2 ve cAMP içinde tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı.

Sonuç: Klorheksidinle paryetal ve visseral periton dokusunda fibrozis oluşturulmuştur. Pentoksifilin ise oluşturulan bu fibrozisi histopatolojik olarak engellemiştir. Fibrozisin oluşmasında proMMP-2 ve proMMP-9 artışı her iki periton dokusunda da gösterilmiştir. Pentoksifilin ile fibrozisin engellenmesinde visseral periton dokusunda proMMP-2 ve proMMP-9'un düzeylerinin azalması etkili olabilir. Pentoksifilin paryetal periton fibrozisini önlemede TIMP-2 düzeyini artırabilir, ancak visseral peritonda buna rastlanmamıştır. cAMP

düzeylelerinde değişiklik olmaması periton fibrozisinin önlenmesinde pentoksifilin başka bir yolu kullanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: MMP'ler, TIMP'ler, pentoksifilin, periton fibrozis, cAMP

SUMMARY

THE EVALUATION OF PENTOXIFYLLIN REGARDING FIBROSIS AND POSSIBLE RELATED INDICATORS IN RAT CHEMICAL PERITONITI.

Temizkan, Ayşe Gül MD.

Department of Nephrology, School of Medicine, Dokuz Eylül University İzmir

Address for correspondence: DEUTF İç Hastalıkları A.B.D. Nefroloji B.D.Balçova/ İZMİR

e-mail: aysegul.temizkan@deu.edu.tr

Introduction: Peritoneal fibrosis is a common cause for terminating Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD) treatment. Treatment or prophylaxis of CAPD-related peritoneal fibrosis, is still an important matter. Excessive production of matrix has been reported to be responsible of peritoneal fibrosis. Up to now, treatment of peritoneal fibrosis in patients with CAPD remains unsatisfactory. Pentoxifylline (PTX) is a methyl xanthine derivative. A number of studies has shown that Pentoxifylline to impede the progress of skin, liver and kidney fibrosis.

Objective: To determine the effect of Pentoxifylline on chlorhexidin induced peritoneal fibrosis and; to investigate the influence of peritoneal tissue cAMP level alterations on peritoneal tissue MMP-2; MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 balances.

Method: 40 Wistar albino rats were divided into five groups. All administrations were done intraabdominally with 24 G needle for 14 days.

In group 1; chemical peritonitis was formed. A mixture of %0,1 chlorhexidin (CHX) + %15 ethanol + normal saline 3 ml/ day were administered.

In group 2; PTX 4mg/100 g (0,2 ml/100g) mixed with normal saline were administered 3 ml/day

In group 3; to prevent peritoneal fibrosis, 3 ml mixture of %0,1 CHX + %15 ethanol + normal saline and 4mg/100 g (0,2 ml/100g) PTX were administered daily.

In group 4; received a solvent including PTX that forms from 1 ml distilled water + 35 mg NaCl 3 ml/day.

In group 5; was described as control group and received %0,9 NS 3 ml/day

All rats were sacrificed at 15. day and samples were obtained from anterior abdominal wall for parietal peritoneum and from liver for visceral peritoneum for tissue analysis.

Sections were stained with Hematoxiline & Eosine (HE) and modified Masson's Trichrome (MT) for pathological examination.

These parameters were evaluated by light microscope; 1) thickness of peritoneum (parietal and visceral peritoneum) 2) fibrosis score (parietal and visceral peritoneum) 3) angiogenesis score (parietal peritoneum) 4) inflammation score (parietal and visceral peritoneum) 5) percentage of fibrotic areas on parietal peritoneum

Thicknesses and percentage of fibrotic areas were evaluated as μm . Other score evaluations were based on staining techniques.

a) proMMP-2 b) proMMP-9 c) active MMP-2 d) active MMP-9 e) TIMP-1 f) TIMP-2 g) cAMP were analysed biochemically from parietal and visceral peritoneal tissues.

To measure TIMP's ELISA; for cAMP Enzyme-linked immunoassay and for MMP's gelatin zymography were used. TIMP's activities were measured by ELISA; cAMP activities by Enzyme-linked immunoassay and MMP's activities were measured by gelatin zymography.

Results: There was statistically significant difference among all histopathological indicators of fibrosis between CHX and other groups ($p < 0.05$) on parietal peritoneum.

There was also significant difference among other indicators except inflammation score for visceral peritoneum ($p < 0.05$).

Pro MMP-2 levels of parietal peritoneum in CHX group were significantly higher than the other groups ($p < 0.05$). When compared with the SF group there was statistically significant difference ($p < 0.05$). However there was no statistically significant finding between CHX and CHX+PTX.

There was no significant difference concerning measured active MMP-2, TIMP-1 and cAMP levels between groups ($p > 0.05$).

TIMP-2 was measured in CHX+PTX group as significantly higher than CHX group ($p < 0.05$).

ProMMP-9 was not measured in any groups on the parietal peritoneum.

Levels of proMMP-2 and proMMP-9 were determined significantly higher than other groups on visceral peritoneums of CHX group. ($p < 0.05$).

Active MMP-2 wasn't measured except CHX group. Also active MMP-9 was not established in visceral peritoneums.

Significant difference was not determined among groups about TIMP-1, TIMP-2 and cAMP.

Conclusion:

Fibrosis was formed with Chlorhexidin on parietal and visceral peritoneal tissue. Pentoxifylline prevented this Chlorhexidin induced fibrosis histopathologically. ProMMP-2 and proMMP-9 increment was demonstrated on both peritoneal tissues during fibrosis formation. Pentoxifylline may have a role in preventing peritoneal fibrosis on visceral peritoneum by reducing proMMP-2 and pro MMP-9 levels. Pentoxifylline may increase TIMP-2 levels for preventing parietal peritoneal fbrosis. Since there is no change in cAMP levels, it can be thought that pentoxifylline prevents peritoneal fibrosis using another pathway.

Key Words: Matrix metalloproteinases (MMP's), tissue inhibitors of matrix metalloproteinase (TIMP's), Pentoxifylline (PTX), peritoneal fibrosis, cAMP

GİRİŞ VE AMAC

Periton diyaliz son dönem böbrek yetmezliğinde sıklıkla ve başarı ile uygulanan bir tedavi yöntemidir. Zaman içinde periton zarında gelişen değişiklikler periton diyalizinin sonlandırılmasına neden olmaktadır. Periton diyaliz etkinliğinin azalmasının en önemli nedenlerinden biri ise periton fibrozisidir.

Periton zarı, periton boşluğunu sınırlayan seröz bir zardır. Periton zarı; mikrovillüsleri olan ve üzerinde ince ve kaygan bir sıvı tabakası bulunan mezotel hücrelerine sahiptir. Mezotelyal dokunun altında peritonun kılcal damarları, lenfatikleri, kollajeni ve diğer lifleri içeren matriksten oluşan interstisyum bulunur.

Periton zarında, mezotelyal hücreler ve alttaki stromal tabakada, diyaliz sırasında çeşitli etkenler sonucu (bakteriyel, kimyasal) hasarlanma oluşur ve zarda yapısal değişiklikler gelişir. Bu değişiklikler; tabaklanmış deri görüntüsünden, ciddi ve yaşamı tehdit eden enkapsüle peritonite kadar farklılıklar gösterir.

Peritonda ki yangı reaksiyonu; periton diyaliz solüsyonlarında bulunan; a) yüksek glikoz içeriğine b) yüksek osmotik yapıya c) düşük PH'a d) laktat içeriğine, e) ileri glikozilasyon son ürünlerine ayrıca tekrarlayan peritonitler ve üreminin neden olduğu karbonil strese bağlı olarak başlamaktadır. Bu etkenler; periton mezotelyal hücreler, periton fibroblast, makrofaj, monosit, nötrofil ve bunlardan salınan sitokinler ile periton fibrozisinin gelişmesine neden olur. Periton fibrozisinin gelişiminde asıl mekanizma periton mezotelyal hücrelerin ve / veya periton fibroblastların aşırı üretimi ve hücre dışı matriksin aşırı birikimidir.

Hücre dışı matriks yıkımı serin proteaz, plazmin ve matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ile gerçekleştirilmektedir. Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) hücre dışı matriks yıkımını sağlayan nötral endopeptidazlar olup hücresel çoğalmanın yangısal ve fibrotik fazlarında rol oynar. MMP'ler substrat özelliklerine göre sınıflandırılırlar. MMP-1 (İnterstisyel kollajenaz) Tip 1 kollajenin yıkımından sorumlu iken MMP-2 ve -9 (Jelatinaz A-B) Tip 4 kollajenin (peritonun hücre dışı matriksinde bulunur), MMP-3 ise (Stromelizin) Tip 4-5 kollajen ve proteoglikanların yıkımından sorumludur. MMP'lerin aktiviteleri; dokularda enzime özgül ve doğal olan doku matriks protein inhibitörleri (TIMP'ler) ve α -makroglobülin tarafından durdurulur. Dört farklı TIMP tanımlanmıştır (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4).

TIMP'ler ve MMP'ler arasındaki denge hücre dışı matriks depolanması ve yıkımı arasındaki dengede anahtar rol oynar.

MMP'lerin ve TIMP'lerin periton mezotelyal hücreler, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından üretildikleri gösterilmiştir. Yine periton da MMP-2, MMP-3 ve MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 aktivitesinin belirgin olduğu görülmüş ve periton yangısında peritondaki fibroblast /miyofibroblast ve makrofaj gibi stromal hücrelerde dikkate değer ölçüde MMP-2 artışı gösterilmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda periton fibrozisinde ve peritonitler sırasında periton sıvısında MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 artışı gösterilmiştir.

Pentoksifilin bir metilksantin türevidir ve özgül olmayan yoldan fosfodiesterazı inhibe eder böylece hücre içi cAMP artışı yapar. Pentoksifilin klinikte; periferel damar hastalıkları ve serebrovasküler hastalıklarda kullanılır. Yayınlarda cAMP artışı sağlayan ilaçların hücre çoğalmasını ve hücre dışı matriks birikimini azalttıkları gösterilmiştir. Pentoksifilinin sıçan kresentik glomerulonefrit modelinde ilerlemeyi durdurduğu, deneysel mesengial proliferatif glomerulonefrit modelinde de mezengial hücrelerde hücre çoğalmasını durdurduğu ve kollajen sentezini baskıladığı gösterilmiştir. İnsan periton fibroblastlarında pentoksifilinin in vitro olarak kollajen sentezini ve büyümeyi durdurduğu gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada insan periton fibroblastlarında in vitro MMP'lerin (MMP-1 ve MMP-8) etkisine bakılmış ancak etkisi gösterilememiştir. Yine bu çalışmada silika ilişkili peritonite bağlı fibrozisin de pentoksifilin ile düzeldiği görülmüştür.

Pentoksifilinin periton fibrozisteki etkinliğini gösteren az sayıda çalışma vardır. Ayrıca bu etkiyi yaparken hangi yolağı kullandığı ve matriks metalloproteinazları ile onların durdurucuları olan TIMP'ler üzerine etkili olup olmadığı bilinmemektedir. Yine şimdiye kadar periton fibrozisinde, periton dokusunda MMP ve TIMP'lerin etkisini gösteren bir çalışmaya taradığımız literatürlerde rastlayamadık.

Amaç:

Klorheksidin ile oluşturulan periton fibrozisinde pentoksifilinin fibrozis üzerine olan etkisini belirlemek ve bu olgu ile ilgili olabilecek; periton doku cAMP düzeylerinde ki değişikliği tesbit edip bunların periton doku MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 dengeleri üzerine etkisini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

1. Süregen Böbrek Yetmezliği:

Süregen böbrek yetmezliği; böbrek işlevlerinin ilerleyici ve geri dönüşümsüz kaybı olarak tanımlanır. Böbrek hasarlanmasına bağlı olarak glomerüler filtrasyon hızının (GFH) üç ay veya daha uzun süre 60 ml/dk'nın altında olmasıdır. Günümüzde Böbrek Hastalıkları Sonuçları Kalite Girişimi (K/DOQI) (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) kılavuzuna göre beş evreye ayrılmaktadır.

Evre 1: GFH normal veya artmış, ancak mikroalbüminüri/proteinüri, hematüri veya böbrekte histolojik değişiklikler gibi böbrek hasarlanmasının bazı kanıtları vardır.

Evre 2: GFH ılımlı derecede azalmıştır (60-89 ml/dk/1,73 m²).

Evre 3: GFH orta derecede azalmıştır (30-59 ml/dk/1,73 m²).

Evre 4: GFH ciddi derecede bozulmuştur (15-29 ml/dk/1,73 m²).

Evre 5: Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY)(GFH < 15 ml/dk/1,73 m²).

Evre 5 teki hastaların yaşamlarının sürdürülebilmesi için böbrek yerine koyma tedavisi gereklidir (1).

Diyaliz yarı geçirgen bir zar aracılığı ile hastanın kanı ve uygun diyaliz solüsyonu arasında sıvı-solüt değişimini temel alan bir tedavi şeklidir. Sıvı solüt hareketi genellikle hastanın kanından diyalizata doğru olur. Diyaliz işleminde diffüzyon ve ultrafiltrasyon kuralları işler (2).

Diyaliz tedavisi hemodiyaliz ve periton diyalizi olarak iki şekilde yapılabilir.

2. Periton Diyalizi:

Periton diyalizi(PD); sıvı içeren iki bölüm arasında, bir zar aracılığı ile su ve solütlerin geçişi işlemidir. Bu iki bölümden birincisi periton kan damarları, ikinci bölüm ise periton içine verilen glikoz içeren periton diyaliz sıvısıdır. Diyalizer olarak işlev gören periton zarının ise farklı yapıda delikleri olan, heterojen ve yarı geçirgen özellikleri vardır.

Süregen periton diyalizi başlıca ikiye ayrılır; sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) ve aletli periton diyalizi (APD). Sürekli ayaktan periton diyalizinde günde dört veya beş kez; hastanın karın içi hacmine ve sıvıyı tahammül edebilirliğine göre 2-2,5-3 L sıvı verilir, 4-6

saatlik bekleme süreleri sonrasında sıvı boşaltılır ve yerine yeni sıvı verilir. Bu işlem hasta tarafından elle yapılır ve yer çekimi kurallarından yararlanır.

APD de ise sıvıyı hastanın karnına veren ve daha sonrada boşaltımı sağlayan bir cihaz kullanılır. APD’de kendi içinde sürekli döngüsel periton diyalizi (SDPD: hastanın gündüz karnında sıvı vardır ve gece cihaza bağlanmadan önce bu sıvıyı boşaltır) ve gece aralıklı periton diyalizi (GAPD: hastanın karnı gündüz boş tutulur ve gece cihaza bağlanır) olmak üzere ikiye ayrılır . Ayrıca SAPD ve APD’nin ortak kullanıldığı melez tedavi seçenekleri de vardır.

3. Periton Zarı:

Periton; barsakları ve diğer iç organları örten visseral periton ve karın duvarını örten paryetal peritondan oluşan seröz bir zardır. Büyüklüğü yaklaşık olarak vücut yüzey alanına eşittir ve 1-2 m² civarındadır. Visseral periton; peritonun %80’nini oluşturur, süperior mezenterik arterden beslenir ve venöz dönüşü portal sisteme olur. Paryetal periton lomber, interkostal ve epigastrik arterlerden kanlanır ve venöz dönüşü inferior vena kavaya olur. Toplam periton kan akımının 50- 100 ml/dk arasında olduğu tahmin edilmektedir. Periton ve periton boşluğunun ana lenfatik drenajı diyafragmatik peritonda bulunan açık ağızlar, visseral ve paryetal peritondaki lenfatik kanallar yoluyla olmaktadır.

Periton zarı mikrovillüsları olan; ince ve kaygan bir sıvı tabakası oluşturan tek katlı mezotel hücreleri ile örtülüdür. Bunun altında kollajen lifler ve kan damarları ve lenfatiklerin yer aldığı jele benzer matriksten oluşan ara doku vardır (2).

4. Periton Diyaliz Yeterliliği:

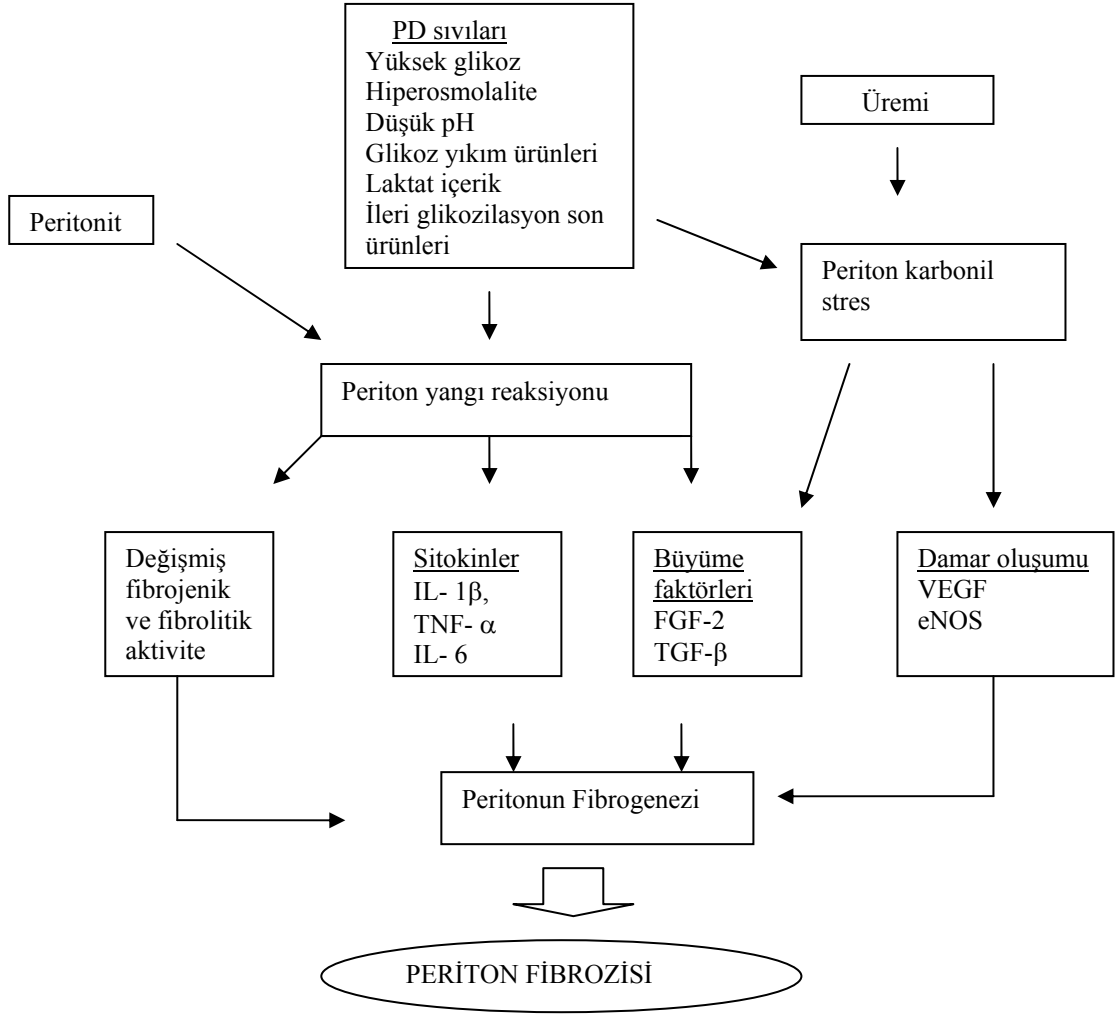
Hem hemodiyaliz hem de periton diyalizinde amaç birikmiş atık ürünlerin ve/veya aşırı sıvının uzaklaştırılmasıdır. Bu nedenle diyaliz yeterliliğinde bu iki göstergenin değerlendirilmesi önemlidir. Periton diyaliz tedavisi ile uzun dönemde bu iki göstergede bozukluk oluşmakta ve periton zarının geçirgenliği azalmaktadır. Bu ise kliniğe ultrafiltrasyonda ve solüt geçirgenliğinde azalma olarak yansımakta ve hastanın periton diyalizinin sonlandırılmasına neden olmaktadır (3). Periton diyalizi yeterliliğinde önemli olan sadece periton zarı özellikleri değildir, ayrıca; geriye kalan (rezidüel) böbrek işlevleri, hastanın tedaviye uyumu, peritonun yüzey alanı ve geçirgenlik özellikleri, lenfatik emilim, kullanılan diyalizatın hacmi, yoğunluğu, bekleme süresi gibi bir takım faktörlerin varlığı da söz konusudur.

5. Periton Fibrozisi:

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

Yara iyileşmesi dışındaki durumlarda görülen fibroziste, fibröz doku normal dokunun yerini almakta ve organ işlev bozuklukları gelişmektedir. Periton fibrozisi düzenli periton diyalizi yapan hastaların periton biyopsilerinde yaygın bir bulgudur. Büyük kohort çalışmalarında periton diyalizi yapan hastalarda periton membran değişiklikleri periton biyopsileri ile gösterilmiştir (4). Periton membranında oluşan değişiklikler özellikle mezotel altında görülen yangı, fibrozis ve damarlanmaya neden olmakta ve sonuçta ultrafiltrasyon yetmezliği gelişmektedir (5). Yapılan çalışmalarda periton diyaliz süresi ile paryetal peritondaki submezotelyal yoğun bölgede artış gözlenmiştir. Üremi tek başına submezotelyal kalınlaşma ile ilişkili iken özellikle sekiz yıldan fazla süredir periton diyalizi yapan hastalarda bu kalınlaşma çok daha belirgin olup periton membranının yetmezliğinden dolayı kateterin çıkartılmasına neden olmaktadır (6). Periton diyalizi ile ilişkili olan periton fibrozisi periton parlaklık kaybından, sklerozan enkapsüle peritonite kadar olan çeşitli görünümde kendini gösterir. Sklerozan enkapsüle peritonit; periton diyalizinin sonlandırılması, kilo kaybı, ultrafiltrasyon yetmezliği barsak tıkanması hatta ölüme kadar giden durumlara yol açabilir (7). Periton fibrozisi, periton diyalizi yapan hastalarda çeşitli hasarlanmalara karşı yanıt olarak gelişir. Bu hasarlanmalar arasında biyoyumsuz diyaliz solüsyonları, peritonitler, üremi ve süregen yangı sayılabilir (8). Üremi; periton karbonil stres ve ileri glikozilasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumunu hızlandırır (9). Peritonit atakları ve periton diyaliz solüsyonları ile peritonda ki yangı sürekli uyarılır. Bu bileşenlerin birlikteliği ile periton mezotel hücreleri, diğer periton hücre toplulukları ve onlardan salınan çeşitli sitokinler aracılığıyla (periton makrofaj, fibroblast, monosit ve nötrofiller) periton fibrozisi gelişir (Şekil-1). Periton fibrozisi gelişiminde ana mekanizma peritonun mezotelyal hücrelerinin ve fibroblastlarının aşırı üretimi sonucu hücre dışı matriks birikimidir (8-10).

Periton fibrozisi gelişiminde mezotel hücrelerinin fibroblastlara dönüşümü ve çoğalmaları gösterilmiştir (11). MMP-2'nin ise mezotel hücrelerindeki bu dönüşümü önlediği gösterilmiştir (12). Fibrozisin başlaması ve devam etmesinde kollajenazlar ve onların durdurucuları rol almaktadır (8).



Şekil 1. Periton fibrozisinin şematik olarak gösterilmesi

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

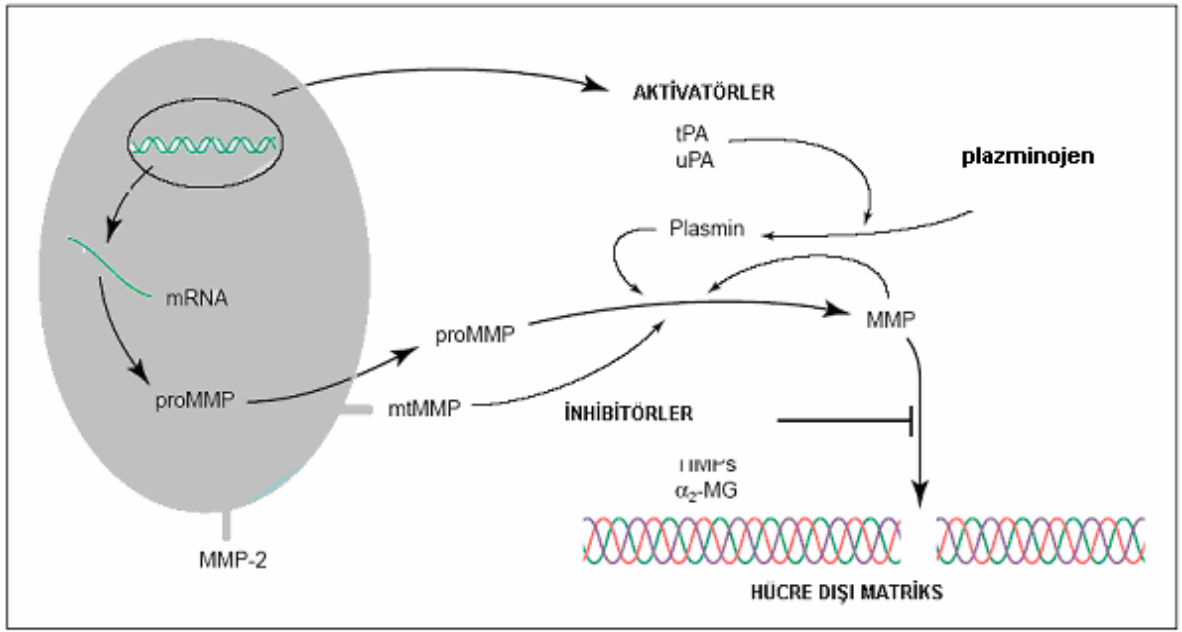
6. Matriks Metalloproteinazlar ve Doku İnhibitörleri:

Matriks metalloproteinazları; matriksin diye adlandırılan ve; embriyonik gelişim, apopitoz, kemik uzaması, üreme, damar oluşumu (anjiyogenez), dokunun yeniden yapılanması, multipl skleroz, sistemik lupus eritematozus, artrit, periodontit, glomerulonefrit, ateroskleroz, doku ülserleri, kanser hücreleri invazyonu ve yayılımı, sepsis gibi bir çok olayda rol alan bir enzim grubudur. MMP'ler çinko ve kalsiyum bağımlı enzimlerdir. Çok sayıda MMP tanımlanmıştır (Tablo 1).

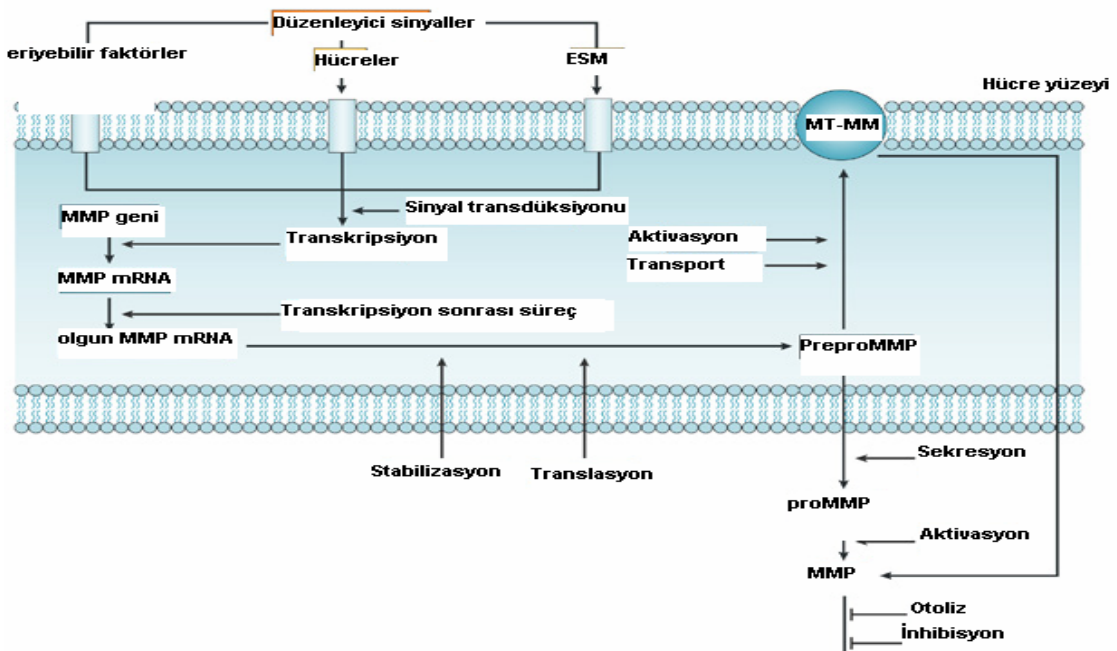
MMP ailesi	ENZİM		Yıktıkları Ana maddeler
	Tanımlayıcı isim	Numara	
KOLLAJENAZLAR	Aradoku kollajenazları	MMP-1	Fibriller kollajenler; Tip I, II, III
	Nötrofil kollajenazı	MMP-8	
	Kollajenaz-3	MMP-13	
	Xenopus kollajenaz	MMP-18	
JELATİNAZLAR	Jelatinaz A	MMP-2	Fibriller olmayan kollajenler, tip IV, V
	Jelatinaz B	MMP-9	
STROMELİZİNLER	Stromelizin-1	MMP-3	Proteoglikanlar, laminin, fibronektin, fibriller olmayan kollajenler
	Stromelizin-2	MMP-10	
	Matrilizin	MMP-7	
	Stromelizin-3	MMP-11	Serin proteaz inhibitörleri
ELASTAZ	Metalloelastaz	MMP-12	Elastin, fibriller olmayan kollajenler
MEMBRAN TİP	MT1-MMP	MMP-14	Projelatinaz A
	MT2-MMP	MMP-15	
	MT3-MMP	MMP-16	
	MT4-MMP	MMP-17	
	MT5-MMP	MMP-21	
SINIFLANDIRILMAMIŞ	Enamelizin	MMP-20	Bilinmiyor
		MMP-19	
		MMP-23	
		MMP-24	

Tablo 1. Matriks Metalloproteinazlar

Bir çok MMP'nin sunumu, büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler ve hücrel değişim ile düzenlenmektedir (13).



Şekil 2. Hücre dışı matrisin yeniden yapılanmasında; MMP'lerin aktivasyon ve inhibisyonları.



Şekil 3. MMP'lerin aktivitelerinin düzenlenme basamakları (ESM: Hücre dışı matrisi).

MMP'ler preproenzim şeklinde sentezlenir ve latent proenzim olarak salınırlar. N-terminal peptidin proteolitik ayrılması ile etkinleşirler. MMP'lerin aktiviteleri belli basamaklarda düzenlenmektedir. Bunlar; a) gen transkripsiyonu, b) mRNA stabilitesi, c) translasyonel kontrol d) hücre ile birleşmesi e) zimojen aktivasyonu f) doğal inhibitörler (37). Şekil-2 de hücre dışı matriksin yeniden şekillenmesi sırasında MMP'lerin aktivasyonları ve inhibisyonları gösterilmektedir (14). Şekil-3 de MMP'lerin aktivitelerinin düzenlenme basamakları gösterilmiştir. MMP'lerin aktiviteleri; dokularda enzime özgül ve doğal olan doku matriks protein inhibitörleri (TIMP'ler) ve serum α_2 -makroglobülin tarafından durdurulur. Yeniden yapılanmadaki hücre dışı matriks miktarı aktif MMP'lerin TIMP'lere oranına bağlıdır. Eğer oran MMP'ler yönündeyse hücre dışı matriks yıkımı olurken, eğer oran TIMP'ler lehine ise yıkım durdurulur ve matriks depolanması olur (14). TIMP'ler MMP'lere sıkıca bağlanırlar ve kompleks oluştururlar (15).

MMP'ler hücreSEL çoğalmanın yangısal ve fibrotik fazlarında rol oynar, yangı ve yeniden yapılanma işlemlerinde artmış yapımları vardır. MMP gen ekspresyonu ve öncü-enzim üretimi çeşitli kontrol mekanizmaları ile denetlenmektedir. MMP'ler substrat özelliklerine göre sınıflandırılırlar. MMP-1 (aradoku kollajenazı) Tip 1 kollajenin yıkımından sorumlu iken MMP-2 ve MMP-9 (Jelatinaz A-B) Tip 4 kollajenin, MMP-3 ise (Stromelizin) Tip 4-5 kollajen ve proteoglikanların yıkımından sorumludur (Tablo-1). TIMP'ler hücre dışı matriks depolanması ve yıkımı arasındaki dengenin sürdürülmesinde anahtar rol oynarlar (16). Dört değişik TIMP tanımlanmıştır (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4).

TNF- α ve IL-1 β gibi yangısal sitokinler, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri MMP ve TIMP'lerin üretiminde artışa neden olurlar. TIMP-1'in MMP-1, MMP-3 ve MMP-9 üzerine inhibitör etkisi belirginken, TIMP-2'nin MMP-2 üzerine inhibitör etkisi daha belirgindir (17). Aterosklerozis, renal fibrozis, pulmoner fibrozis ve hepatik fibrozis gibi farklı fibrozis süreçlerinde MMP-2, MMP-9 düzeylerinde artış gösterilmiştir (18).

Peritonda ise MMP'ler ve TIMP'lerin periton mezotelyal hücreler, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından üretildikleri gösterilmiş ve periton hücre kültürlerinde MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 aktivitelerinin belirgin olduğu ölçülmüştür (17). Yapılan farklı çalışmalarda peritonun fibrozisinde ve peritonitler sırasında periton sıvısında MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 artışı gösterilmiştir (19-20). Enkapsüle peritonit geliştirilen sıçanlarda periton doku ve diyalizat sıvısında MMP-2 aktivitesinin arttığı saptanmıştır (21).

7. Pentoksifilin:

Pentoksifilin bir metilksantin türevidir ve özgül olmayan yoldan fosfodiesterazı inhibe eder böylece hücre içi cAMP artışı yapar. Pentoksifilin klinikte; periferel damar hastalıkları ve beyin damar hastalıklarında kullanılır.

Yayınlarda cAMP artışı sağlayan ilaçların hücre çoğalmasını ve hücre dışı matriks birikimini azalttıkları gösterilmiştir (22). Pentoksifilin sığın kresentik glomerülonefrit modelinde ilerlemeyi durdurduğu gösterilmiştir (23). Yine pentoksifilin deneysel mesengial proliferatif glomerulonefrit modelinde mezengial hücrelerin çoğalmasını durdurduğu ve kollajen sentezini baskıladığı gösterilmiştir (24). Başka bir çalışmada pentoksifilin serumla uyarılmış periton mezotelyal hücrelerin çoğalmasını ve bu hücrelerde TGF- β aracılı kollajen gen sunumunu durdurmuştur (25). İnsan periton fibroblastlarında pentoksifilin in vitro olarak kollajen sentezini ve büyümeyi durdurduğu gösterilmiş olup aynı çalışmada insan periton fibroblastlarında in vitro MMP'lerin (MMP-1 ve MMP-8) etkisi gösterilememiştir. Ayrıca bu çalışmada silika ilişkili peritonite bağlı fibrozisin de pentoksifilinle düzeldiği görülmüştür (26).

GEREC VE YÖNTEM

1. Kullanılan Hayvanların Sayı, Özellik ve Türleri:

Çalışmada 40 adet, yetişkin dişi, ağırlıkları 180-200 gram arasında değişen, Wistar albino sıçan kullanıldı. Çalışma için Deney Hayvanları Etik kurulundan onay alındı. Tüm hayvanlar DEÜTF Deney Hayvanları Birimindeki en uygun koşullarda barındırıldı ve standart yem ve su ile beslendi.

2. Deneysel Tasarı:

Çalışmaya alınan sıçanlar çalışma öncesi tartıldı ve her grupta sekiz sıçan olacak şekilde beş gruba ayrıldı. Çalışma süresi 14 gün olarak belirlendi. Periton fibrozisi oluşturmak için Io Hiroaki ve arkadaşlarının modeli (27); %0,1'lik klorheksidin (KH) (Drogsan İlaçları AŞ. Balgat, Ankara) + %15 etanol + serum fizyolojik karışımı aseptik olarak hazırlanıp kullanıldı. Pentoksifilin olarak (Trental ampul 100 mg/5ml, NaCl + arı su çözücüsünün içinde, Hoechst Marion Roussel) 4 mg/100 gr (0,2 ml/100g) kullanıldı. Karın içi enjeksiyonların tümünde 24 G iğne kullanıldı.

Grup 1'deki sıçanlara; kimyasal peritonit oluşturmak için karın içine %0,1 lik klorheksidin + %15'lik etanol + serum fizyolojik karışımından 3 ml/gün, 14 gün boyunca verildi.

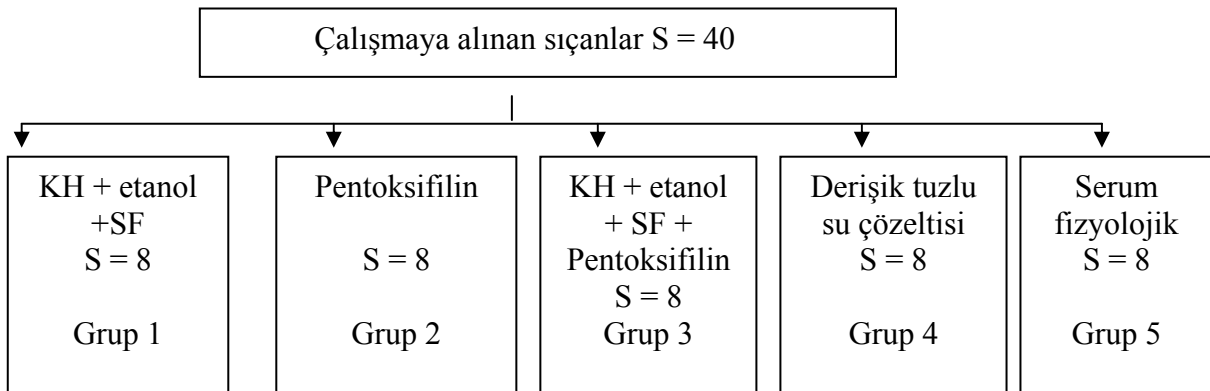
Grup 2'deki sıçanlara; karın içine 4 mg/100 g (0,2 ml/100g) pentoksifilin serum fizyolojik ile 3 ml'ye tamamlanıp 14 gün boyunca verildi.

Grup 3'deki sıçanlara; karın içine %0,1'lik klorheksidin + %15'lik etanol + serum fizyolojik ve 4mg/100 g (0,2 ml/100g) pentoksifilin 3 ml'ye tamamlanıp 14 gün boyunca verildi.

Grup 4'deki sıçanlara; karın içine pentoksifilinin içinde bulunduğu çözücü (1 ml arı su içine 35 mg NaCl) 3 ml/gün, 14 gün boyunca verildi.

Grup5 deki sıçanlara; karın içine %0,9 luk serum fizyolojiktan 3 ml/gün, 14 gün boyunca verildi (Şekil 4).

Şekil 4. Çalışma tasarımı



Sıçanlar 15. günde eter anestezisi altında sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrasında paryetal periton örnekleri için karın ön duvarından ve visseral periton örnekleri içinde karaciğer sağ lobundan dokular alındı. Örnekler iki parçaya ayrıldı; patolojik değerlendirme için karın duvarı peritonundan ve karaciğerden alınan örnekler %10'luk formaldehit içine hemen konuldu. Biyokimyasal çalışma içinde karın duvarı ve karaciğerden alınan örnekler ependorf tüplerine konulup kuru buz içine yerleştirildi. Biyokimyasal çalışma için ayrılan örnekler çalışmaya kadar – 80°C de saklandı.

Ölü sıçanlar özel torbalara konularak ve diğer atık maddelerde özel olarak belirlenmiş atık tanklarına atıldı.

Çalışmaya alınan sıçanlarda kimyasal peritonit dışında herhangi bir hastalık gelişmesi durumunda çalışmadan çıkarılması kararlaştırıldı.

3. Histopatolojik Değerlendirme:

Paryetal periton için karın duvarından ve visseral periton içinde karaciğer yüzeyinden elde edilen ve formaldehit ile tespit edilen doku örneklerinden; karın duvarından ve karaciğer kapsülünden dikey 3 mm'lik kesitler alındı. Alınan kesitler parafine gömüldü ve Hematoksilen & Eosin (HE) ve modifiye Masson's Trichrome (MT) boyası ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopisi ile karaciğerden alınan visseral peritonun ve karın duvarı paryetal peritonun miktarı, fibrozis ve yangı, paryetal peritonda damar çoğalmasında paryetal peritonda fibrozis alan yüzdesi açısından araştırıldı.

Yangı ve fibrozis HE ve MT boya ile yarı nicel olarak skorlandı; 0: yok, 1: hafif şiddette, 2: orta şiddette, 3: şiddetli.

Damar çoğalması da peritondaki gibi yarı nicel olarak skorlandı; 0: yok, 1: hafif şiddette, 2: orta şiddette 3: şiddetli

Visseral peritondaki fibrozisli alan yüzdesi, toplam visseral periton alanları çok küçük olduğu ve mikroskopik büyütme alanının küçük bir alanını kapladığından programın çalışmasına olanak tanımadığı için çalışılmadı.

Seçilmiş bölgelerden dijital görüntüleme ile ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) visseral periton için ölçümler X 40 ve paryetal periton için X 20 büyütme ile (Nikon Labophot-2, Japan) ve dijital renk 3CCD renkli video kamera (Olympus DP70, Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) ile yapılarak birleştirildi. Görüntüler Mediskop Görüntü Analizi Yazılım Programı (Bs 200D Görüntü Analiz Yazılımı, BAB Mühendislik Müh. Müş. San Ve Tic. Ltd.Şti. Ankara, Türkiye) ile değerlendirildi. Yazılım

için renk skalası tasarlandı, bu skalada renkler komşuluklarına göre tanımlandı. Patoloğun seçtiği renkler boyalı bölgelerin otomatik seçimi için ölçüt olarak kabul edildi.

Fibrozis ölçümleri MT boyası ile yapıldı. Her bakılan bölge için; yeşil boyama bölgesinin yüzdesi yarı otomatik belirlendi. İlk yeşil boyama bölgesi görsel inceleme ile uzman tarafından seçildi. Takiben bu sistemle aynı derecede ve biçimde boyanan bölgeler seçildi ve belirlendi. Ortalama 10 alan arandı ve belirlendi daha sonra boyalı alanlar yüzdelendi (SAP) (28- 29- 30).

Görüntüler başka bir görüntü analiz programı ile de (Bs 200D Görüntü Analiz Yazılımı, BAB Mühendislik Müh. Müş. San Ve Tic. Ltd.Şti. Ankara, Türkiye) değerlendirildi ve bilgisayarda (Vestel, Manisa, Türkiye) depolandı. Karaciğer visseral peritonundan ve karın duvarı peritonundan alınan her kesit için, periton kalınlığını belirlemede 10 ölçüm alındı. Bu ölçümlerin ortalaması istatistiksel analizde kullanıldı (31-32).

4. Biyokimyasal Analizler İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması:

Jelatinazlar (MMP-2, MM -9) ve TIMP 1, TIMP-2 için dokuların hazırlanması:

Paryetal periton ve visseral periton örneklerinden 100 mg doku tartıldı. Doku örneklerine ağırlıklarının 10 katı hacminde (1 ml) ekstraksiyon ortamı (0.15 M NaCl, 10 mM CaCl₂ ve % 0.05 Brij 35 içeren 50 mM Tris-HCl pH 7.0) ilave edildi. Sonics marka (Sonics&Materials Inc, Danbury Connecticut USA) sonikatör ile buz üzerinde homojenize edildi. 10 000 devirde 10 dak santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alındı ve analiz süresine kadar -80 °C de saklandı.

cAMP İçin Doku Hazırlığı:

Deney kurgusunun bitiminde toplanan örnekler kuru buz içinde taşınarak -80 °C de analiz süresine kadar saklandı. Analiz günü tüm örneklerden 150 mg tartım yapıldı. Dokulara, ağırlıklarının 5 katı hacimde (750 µl) %5 lik TCA (Trikloroasetikasit) çözeltilisinden eklendi. Teflon tip homojenizatörde (Braun marka, Germany) buz üzerinde homojenize edildi. Homojenizasyon işleminden sonra 1500 devirde 5 dk santrifüj edildi, toplanan süpernatantlar cAMP analizinde kullanıldı.

cAMP Analizi:

“cAMP doku hazırlığı” bölümünde belirtildiği gibi hazırlanan süpernatantlarda cAMP analizi Cayman marka (Kat No: 581001) “Enzim Immunoassay” tekniğine dayanan kit kullanılarak gerçekleştirildi. Testin uygulama basamakları aşağıda özetlenmiştir:

- 1) Öncelikle doku homojenatlarından elde edilen supernatantlardaki TCA, ultra-saf su ile doyurulmuş eter kullanılarak iki kez yapılan ayırılma işlemi ile uzaklaştırıldı. Örnek hazırlığının son aşamasında ise ortamdaki eter, örnekler 70 °C 5 dak. bekletilerek uçuruldu.
- 2) Sekiz farklı konsantrasyonda (2.3, 4.7, 9.4, 18.8, 37.5, 75, 150, 300 pmol/ ml) cAMP standartı hazırlandı.
- 3) Antikor ile kaplı kuyucuklara standart ve örnekler uygulandı. +4 °C de 18 saat inkübasyona bırakıldı.
- 4) Yıkama işleminden sonra, tüm kuyucuklara Ellman reaktifi eklendi. 120 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve cAMP miktarı ile ters orantılı olarak gelişen renk oluşumu 415 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Standartlar ile oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak karaciğer ve periton dokusundaki cAMP miktarı miligram protein başına pikomol (pmol/mgprotein) olarak hesaplandı.

Protein Analizi:

Protein düzeyleri Bicinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile belirlendi. Yöntemin temeli alkali ortamda Cu^{+2} – protein kompleksi oluşumuna ve Cu^{+2} nin Cu^{+1} indirgenmesine dayanmaktadır. Örneklerde var olan protein miktarı indirgenmiş 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 μ g/ml) hazırlanan standart ile oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak örneklerdeki protein miktarı hesaplandı (35).

Jelatin Zimografi Denemeleri:

“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. Jellerin Coomassie Brilliant Blue ile boyanması ile proteolizisin gerçekleştiği bölgeler koyu mavi zemin üzerinde beyaz bantlar olarak ortaya çıkar (36). Doku homojenatlarında varolan MMP’lerin (MMP-2 ve MMP-9) aktivitelerini ölçmek için % 0.1 Tip I jelatin ve %10 SDS içeren % 7.5’luk poliakrilamid jeller Tablo 2 de belirtildiği gibi hazırlandı. Tablo 3 de kullanılan solüsyonların ve tamponların hazırlanışı gösterildi.

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

Tablo 2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması.

SOLÜSYON/ TAMPON	İÇERİK	HAZIRLANIŞI
Aktivasyon tamponu	50 mM Tris-HCl ,pH:7.6 10 mM CaCl ₂ .2H ₂ O, 50 mM NaCl, % 0.05 Brij 35	6.06 g Tris, 1.47 g CaCl ₂ . 2,92 g NaCl, 0.5 g Brij 35 1 L d H ₂ O (distile su) içinde çözülür. (+4 ⁰ C 'de saklanır)
5x Yürütme Tamponu	125 mM Tris-HCl, pH:8.3 1.23 M Glisin % 0.5 SDS	15.1 g Tris, 94 g Glisin 5 g SDS 1 L d H ₂ O içinde çözülür. (+4 ⁰ C' de saklanır)
Renatürasyon Tamponu Triton X-100	% 2.5'lik Triton X- 100	25 ml Triton X- 100 975 ml d H ₂ O
2x İndirgeyici olmayan Tampon	1.0 2.0 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 Blue 2.8 ml d H ₂ O	Oda ısısında saklanır
% 30'luk Akrlamid Çözeltisi	29.2 g Akrlamid 0.8 g N'N'-bisakrlamid	(+4 ⁰ C 'de karanlıkta saklanır)
Boya Çözeltisi	%0.5'lik Coomassie Brilliant Blue R-250 %40 metanol %10 asetik asid	Taze hazırlanır
Jel Zeminindeki Boyayı uzaklaştıran çözelti	%40 metanol %10 asetik asid	Taze hazırlanır

Tablo 3. Solüsyon ve tamponların hazırlanması

Yöntemin Uygulanışı :

Zimografi ile doku örneklerinden elde edilen homojenatlarda varolan MMP'lerin aktivitelerini ölçmek için %1 Tip I jelatin ve %10 SDS içeren %7.5 'luk poliakrilamid jeller kullanıldı.

- 1) Laemmli'nin (35) tanımladığı gibi SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez) jel hazırlandı. Önce ayırıcı jel % 7.5 oranında hazırlandı ve önceden kurulmuş olan elektroforez düzeneğinde yer alan iki cam arasına döküldü ve 1 saat jelleşme için bekletildi. Jel-hava temasını engellemek için yüzey üzerine n-propanol eklendi.
- 2) Jelleşme gerçekleştikten sonra % 4 oranındaki düzenleyici jel hazırlandı 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.
- 3) Hazırlanan jeller, elektroforez tankına yerleştirildi.
- 4) Eşit hacimde doku homojenatları, indirgeyici-olmayan örnek tamponu ile karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara 100 µg protein olacak şekilde uygun volümde yüklendi.
- 5) Sisteme "Elektroforez Yürütme Tamponu" eklendi.
- 6) Elektroforez + 4⁰C soğuk oda koşullarında gerçekleştirildi. Karşılıklı iki jel için 125 sabit voltaj, 40- 60 mA/jel 4.5 saat uygulanarak elektroforez yapıldı.
- 7) Elektroforezden sonra jellerden SDS'i uzaklaştırmak için jeller iki kez 15'şer dakika %2.5'lik Triton X- 100 "Renatürasyon Tamponu" ile yıkandı.
- 8) Daha sonra jeller, enzimlerin (MMP-2 ve MMP-9) jel içindeki substratlarını (jelatin) tüketmelerini sağlamak için 18 saat 37 ⁰C'de "Aktivasyon Tamponu"nda inkübe edildi.
- 9) Jeller, % 0.5'lik Coomassie Brilliant Blue R- 250 ile boyandı ve %40 metanol - %10 asetik asid içeren tampon ile jel zeminindeki fazla boya uzaklaştırıldı.
- 10) Substrat jelin lizis miktarı (alan*yoğunluk) dansitometrik analiz (UVP Marka Jel Dökümantasyon Sistemi) ile saptandı ve µg total protein başına elde edilen lizis birimi olarak sayıldı.
- 11) Pozitif kontrol olarak MMP-2 ve MMP-9'un hem pro hem de aktif formlarını içeren ticari olarak üretilmiş rekombinant MMP marker (Chemicon Marka Kat No: CC073) kullanıldı.

TIMP-2 ELISA Analizi:

Hazırlanan visseral ve paryetal periton doku homojenatlarında TIMP-2 analizi, ELISA temelli Amersham marka (Kat No: RPN 2618) kit ile yapıldı. Bu ölçüm yöntemi, TIMP-2 düzeylerinin nicel 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 standardı (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 pikogram TIMP-2 olarak ifade edildi.

TIMP- 1 ELISA Analizi:

Visseral ve paryetal periton dokusundan hazırlanan homojenatlarda TIMP-1 analizi için Ray Bio marka (Katalog No:ELR-TIMP-1-001C) enzim immunoassay (EIA) kiti kullanıldı. Sıçan TIMP-1 antikoru 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-sıçan TIMP-1 antikoru” ilave edildi. Bağlanmayan fazla “biotinlenmiş anti-sıçan TIMP-1 antikoru”nu ortamdan 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. 7 farklı TIMP-1 standardı (8.23, 24.69, 74.07, 222.2, 666.7, 2000, 6000 pikogram/ml) kullanılarak oluşturulan standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak visseral ve paryetal periton dokusunda TIMP-1 miktarı mg protein başına pg olarak ifade edildi.

5. İstatistiksel Değerlendirme:

İstatistiksel değerlendirme de, gruplardaki sıçan sayısı 30'un altında olduğu için parametrik olmayan yöntemler kullanıldı. Gruplar arasında fark olup olmadığını saptamak için üç ya da daha çok sayıda grup ortalamasının karşılaştırmasında kullanılan Kruskal-Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı fark var ise, anlamlı farkın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için iki grup ortalamasının karşılaştırmasında kullanılan Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Kruskal-Wallis Varyans ve Mann-Whitney U analizi için $p < 0,05$ ise aradaki farkın anlamlı olduğuna karar verildi. Değerler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi.

BULGULAR

A. Histopatolojik Değerlendirme:

Çalışmaya 40 sıçan alındı. Sıçanlar her grupta sekiz sıçan olmak üzere beş gruba ayrıldı. Derişik tuzlu su grubundan bir sıçanın ve serum fizyolojik grubundan iki sıçanın patolojik örneklerinin değerlendirilmesi teknik bazı nedenlerden ötürü yapılamadı. Patolojik olarak toplam 37 sıçanın örnekleri değerlendirildi.

1.Paryetal Periton Sonuçları:

Çalışma sonucunda paryetal peritona ait fibrozis, yangı, damarlanma skorları ve fibrotik alan yüzdeleri ile paryetal periton kalınlıklarının sonuçları tablo 4 de gösterilmiştir. Tablo 5 de Mann-Whitney U testi kullanılarak yapılan ikili grup karşılaştırmalarının istatistiksel değerlendirme sonuçları verilmiştir.

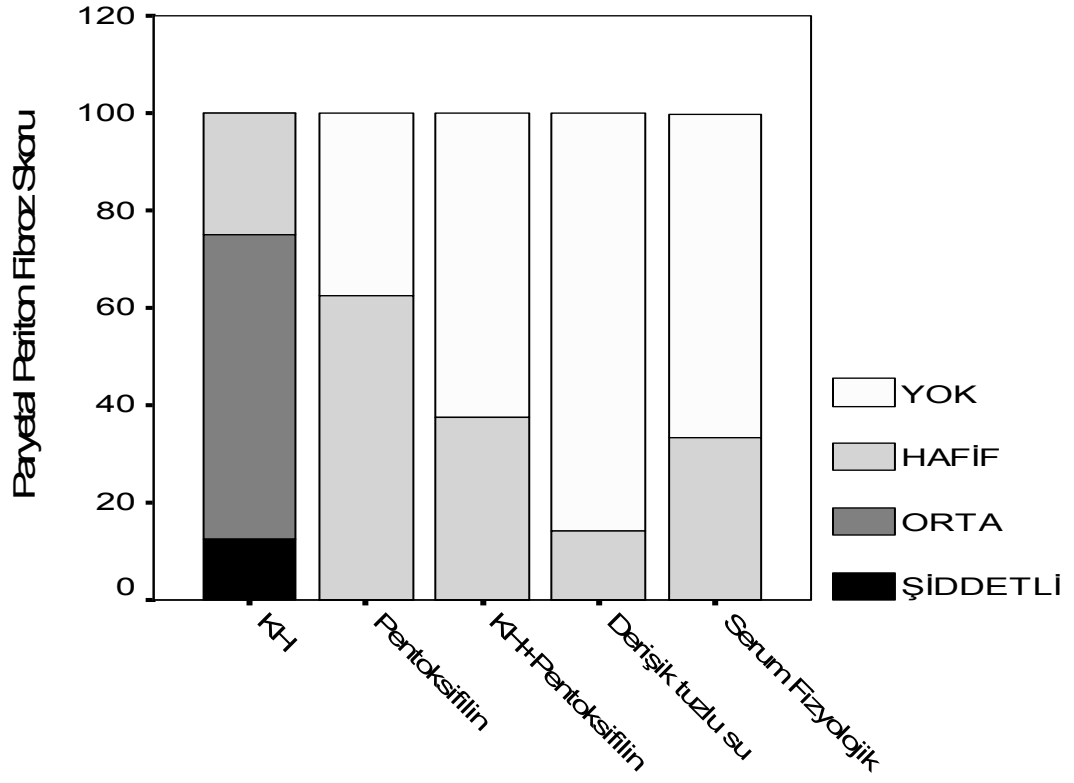
(PARYETAL PERİTON) GRUPLAR	FİBROTİK ALAN YÜZDESİ (µm)	FİBROZİS SKORLAMASI	PARYETAL PERİTON KALINLIğI (µm)	YANGI SKORLAMASI	DAMARLANMA SKORLANMASI
I-KH	24,38 ± 11,8	1,88 ± 0,64	280,75 ± 144,96	2 ± 0,75	1 ± 0,53
II-PENTOKSİFİLİN	9,50 ± 7,30	0,63 ± 0,51	111,50 ± 60,70	0,63 ± 0,74	0,25 ± 0,46
III-KH + PENTOKSİFİLİN	7,75 ± 2,81	0,38 ± 0,51	94,25 ± 50,00	0,63 ± 0,50	0,13 ± 0,35
IV-DERİşİK TUZLU SU	3,86 ± 2,03	0,14 ± 0,37	74,71 ± 34,61	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
V-SERUM FİZYOLOJİK	5,50 ± 1,51	0,33 ± 0,51	86,17 ± 48,84	0,17 ± 0,40	0,17 ± 0,40

Tablo 4. Paryetal periton fibrotik alan yüzdesi, fibrozis skorlaması, paryetal periton kalınlığı, yangı skorlaması, damarlanma skorlamasının tüm gruplara göre ortalama ± standart sapma değerleri.

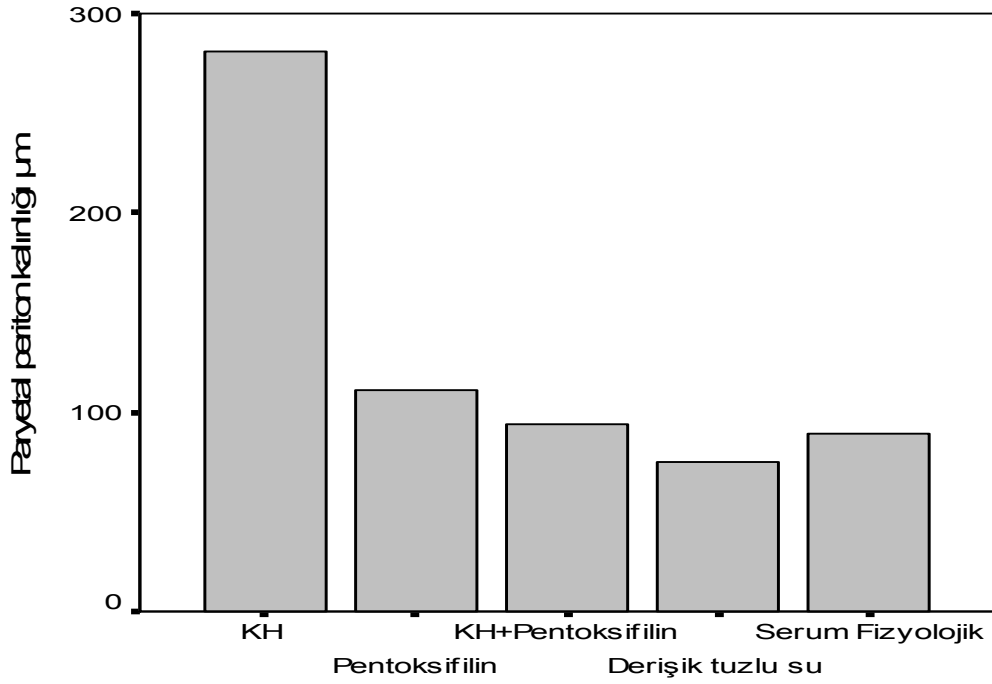
PARYETAL PERİTON GRUPLAR	FİBROTİK ALAN YÜZDESİ	FİBROZİS SKORLAMASI	PARYETAL PERİTON KALINLIĞI	YANGI SKORLAMASI	DAMARLANMA SKORLANMASI
Grup I - Grup II	<u>p = 0,01</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,01</u>
Grup I - Grup III	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>
Grup I - Grup IV	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>
Grup I - Grup V	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,01</u>
Grup II - Grup III	p = 1,00	p = 0,44	p = 0,67	p = 0,86	p = 0,53
Grup II - Grup IV	p = 0,10	p = 0,06	p = 0,35	<u>p = 0,03</u>	p = 0,17
Grup II - Grup V	p = 0,57	p = 0,29	p = 0,43	p = 0,19	p = 0,71
Grup III - Grup IV	<u>p = 0,01</u>	p = 0,32	p = 0,45	<u>p = 0,01</u>	p = 0,35
Grup III - Grup V	<u>p = 0,10</u>	p = 0,87	p = 0,89	p = 0,09	p = 0,83
Grup IV - Grup V	p = 0,14	p = 0,43	p = 0,61	p = 0,28	p = 0,28

Tablo 5. Tüm histopatolojik göstergeler için paryetal peritona ait ikili grup karşılaştırmalarının istatistiksel sonuçları

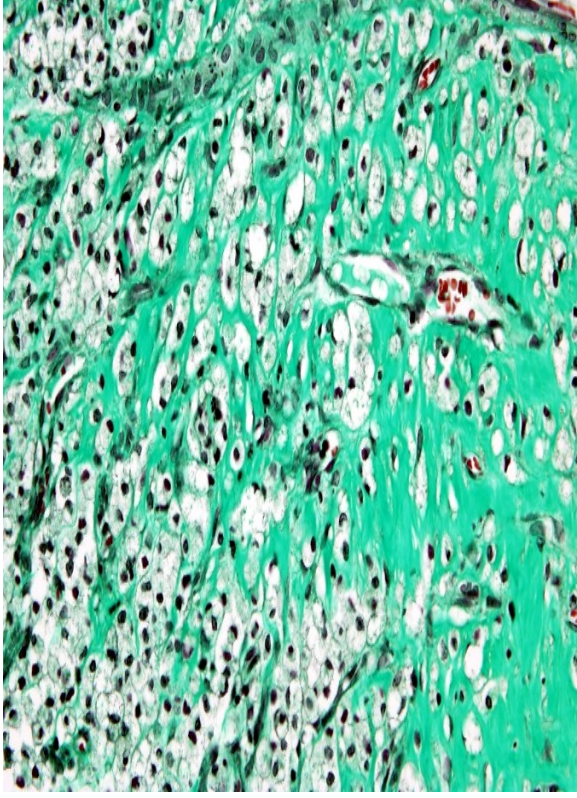
Grafik 1 de paryetal periton fibroz skorlamasının, grafik 2 de ise paryetal periton kalınlığının gruplar arasındaki dağılımı gösterilmiştir. Resim 1 de Mason Trichrome boyamasıyla paryetal peritonda fibrotik alanların görünümü ve imaj analiz sistemi ile yeşil boyalı alanların yüzdesinin belirlenmesi amacıyla program tarafından yarı otomatik olarak seçili görünüm gösterilmiştir. Resim 2 de KH grubundan bir sığana ait paryetal periton kalınlığı gösterilmektedir. Resim 3 de kontrol grubundan bir sığana ait paryetal periton dokusunda fibrozisin olmadığı gösterilmiştir Resim 4 de KH grubundan bir sığanın paryetal periton dokusunda yangı ve damar çoğalmaları gösterilmiştir.



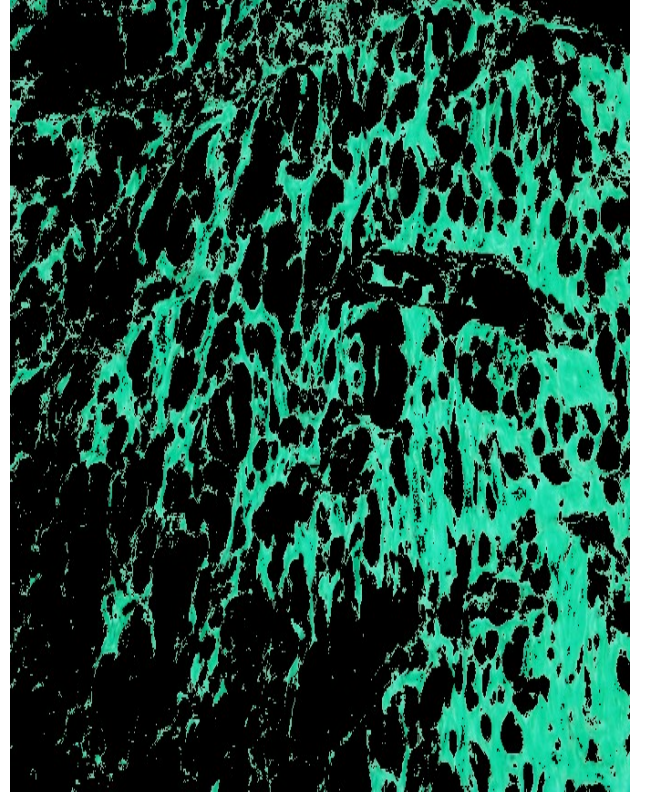
Grafik 1. Paryetal periton fibrozis skorlamasının tüm gruplara göre dağılımı.



Grafik 2. Paryetal periton kalınlığının tüm gruplara göre dağılımı.

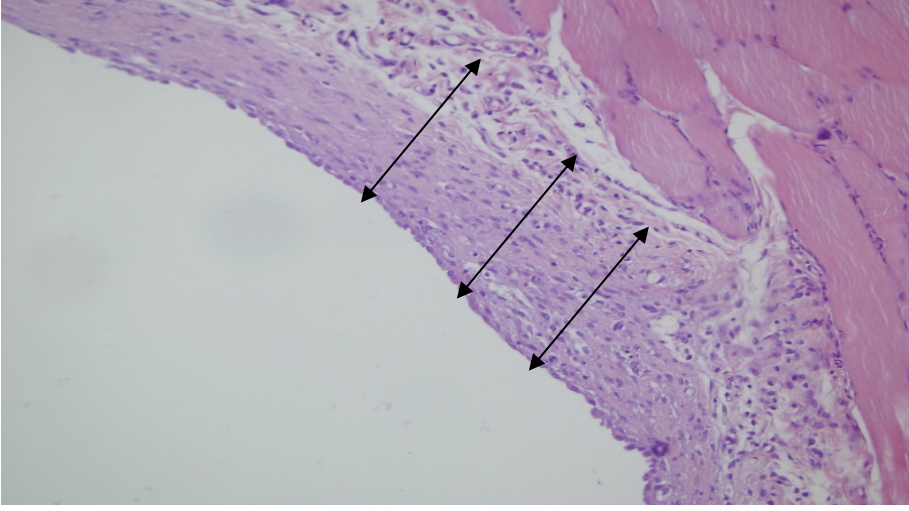


I

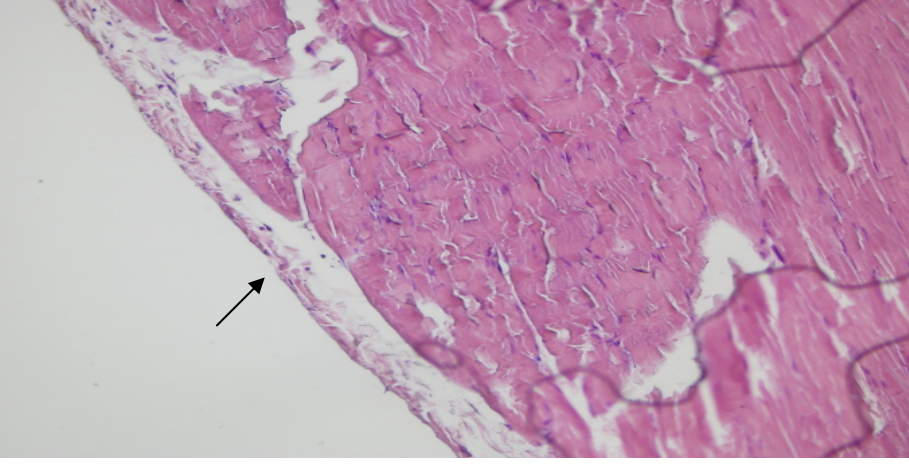


II

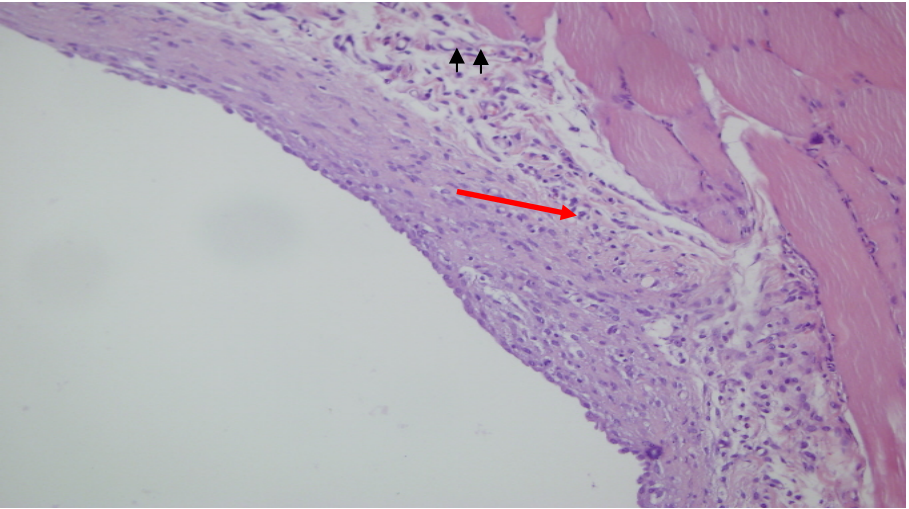
Resim 1. I Mason Trichrome boyamasıyla paryetal peritonda fibrotik alanların görünümü
II. İmaj analiz sistemi ile yeşil boyalı alanların yüzdesinin belirlenmesi amacıyla program tarafından yarı otomatik olarak seçili görünüm.



Resim 2. KH grubundan bir sıçanın paryetal periton kalınlığına ait görünüm.



Resim 3. Serum fizyolojik grubundan bir sıçanın paryetal peritonunda fibrozis ve yangının olmadığı gösterilmiştir.



Resim 4. KH grubundan bir sıçanın paryetal peritonundaki yangıya (kırmızı ok) ve damar oluşumlarına (siyah oklar) ait görünümleri.

2.Visseral Periton Sonuçları:

Tablo 6 da çalışma sonucunda visseral peritona ait fibrozis ve yangı skoru ile visseral periton kalınlık ölçümlerinin tüm gruplarda ki ortalama \pm standart sapma değerleri gösterilmiştir.

Tablo7 de ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen istatistiksel sonuçlar gösterilmiştir.

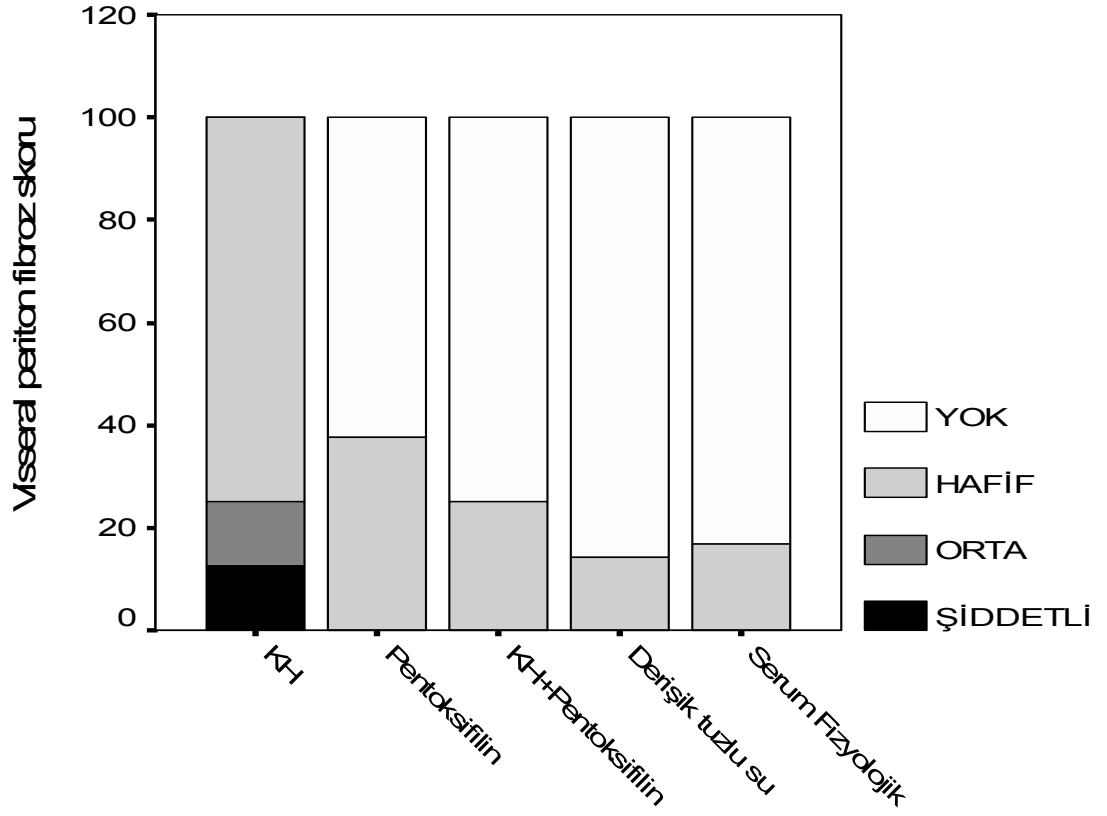
(VİSSERAL PERİTON) GRUPLAR	FİBROZİS SKORLAMASI	VİSSERAL PERİTON KALINLIĞI(μ m)	YANGI SKORLAMASI
I-KH	1,38 \pm 0,74	87,63 \pm 75,27	1,00 \pm 1,06
II-PENTOKSİFİLİN	0,38 \pm 0,51	23,00 \pm 13,90	0,00 \pm 0,00
III-KH + PENTOKSİFİLİN	0,25 \pm 0,46	30,50 \pm 47,71	0,25 \pm 0,46
IV-DERİŞİK TUZLU SU	0,14 \pm 0,37	14,86 \pm 5,72	0,14 \pm 0,37
V-SERUM FİZYOLOJİK	0,17 \pm 0,40	16,67 \pm 12,56	0,00 \pm 0,00

Tablo 6. Visseral periton fibrozis skorlaması, visseral periton kalınlığı ve yangı skorlamasının tüm gruplara göre dağılımı

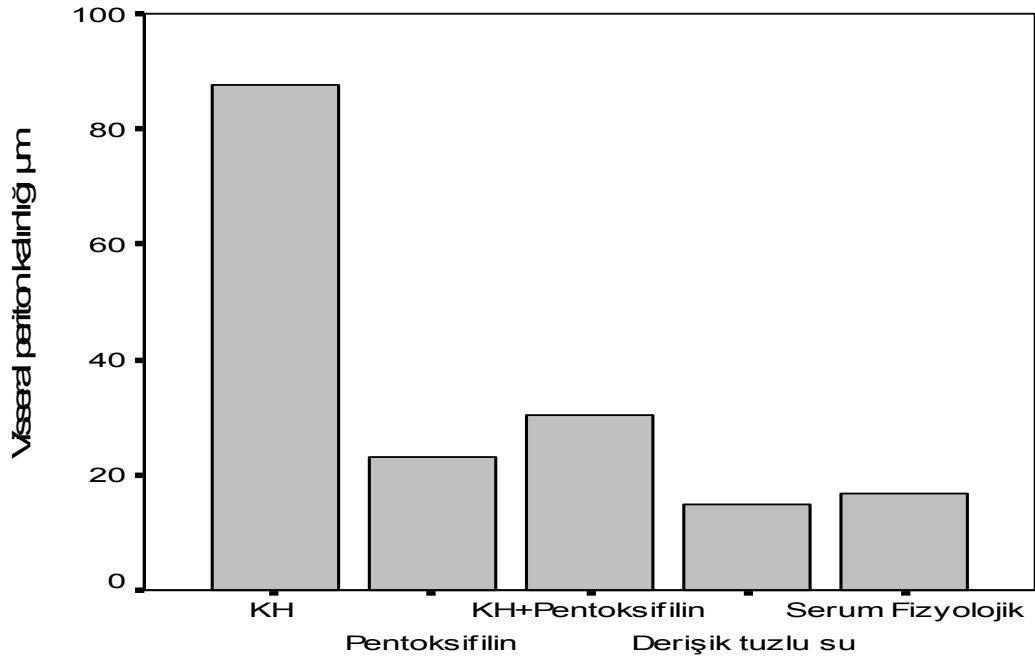
VİSSERAL PERİTON GRUPLAR	FİBROZİS SKORLAMASI	VİSSERAL PERİTON KALINLIĞI	YANGI SKORLAMASI
Grup I - Grup II	<u>p = 0,01</u>	<u>p = 0,03</u>	<u>p = 0,01</u>
Grup I - Grup III	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,02</u>	p = 0,09
Grup I - Grup IV	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>	p = 0,05
Grup I - Grup V	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,02</u>	p = 0,05
GrupII - Grup III	p = 0,72	p = 0,19	p = 0,44
Grup II - Grup IV	p = 0,46	p = 0,28	p = 0,69
Grup II - Grup V	p = 0,57	p = 0,22	p = 1,00
Grup III - Grup IV	p = 0,77	p = 0,86	p = 0,77
Grup III - Grup V	p = 0,85	p = 0,95	p = 0,49
Grup IV - Grup V	p = 0,94	p = 0,73	p = 0,73

Tablo 7. Visseral periton için ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen istatistiksel sonuçlar.

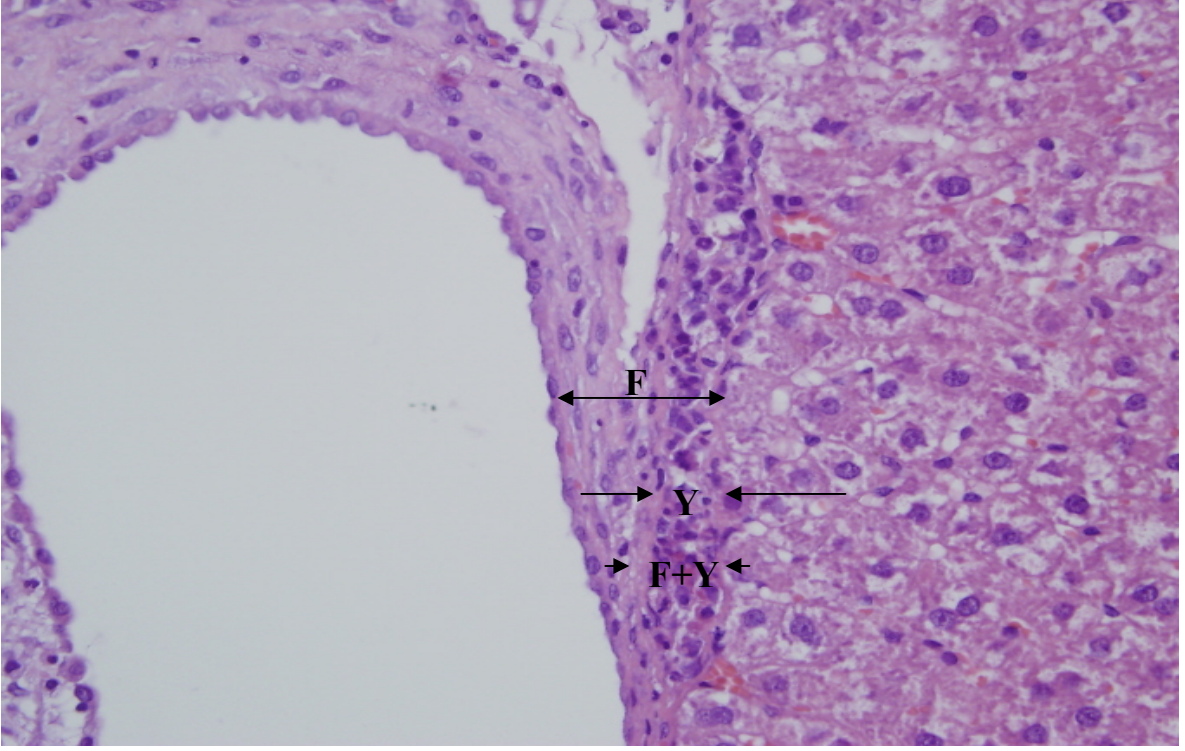
Grafik 3 de visseral periton fibrozis skorunun Grafik 4 de visseral periton kalınlığının tüm gruplardaki dağılımı gösterilmiştir. Resim 5 de KH grubundan bir sıçanın visseral peritonuna ait fibrozis ve kalınlık artışı ve Resim 6 de ise KH + pentoksifilin grubundan bir sıçanın visseral peritonunda fibrozisin olmadığı gösterilmiştir.



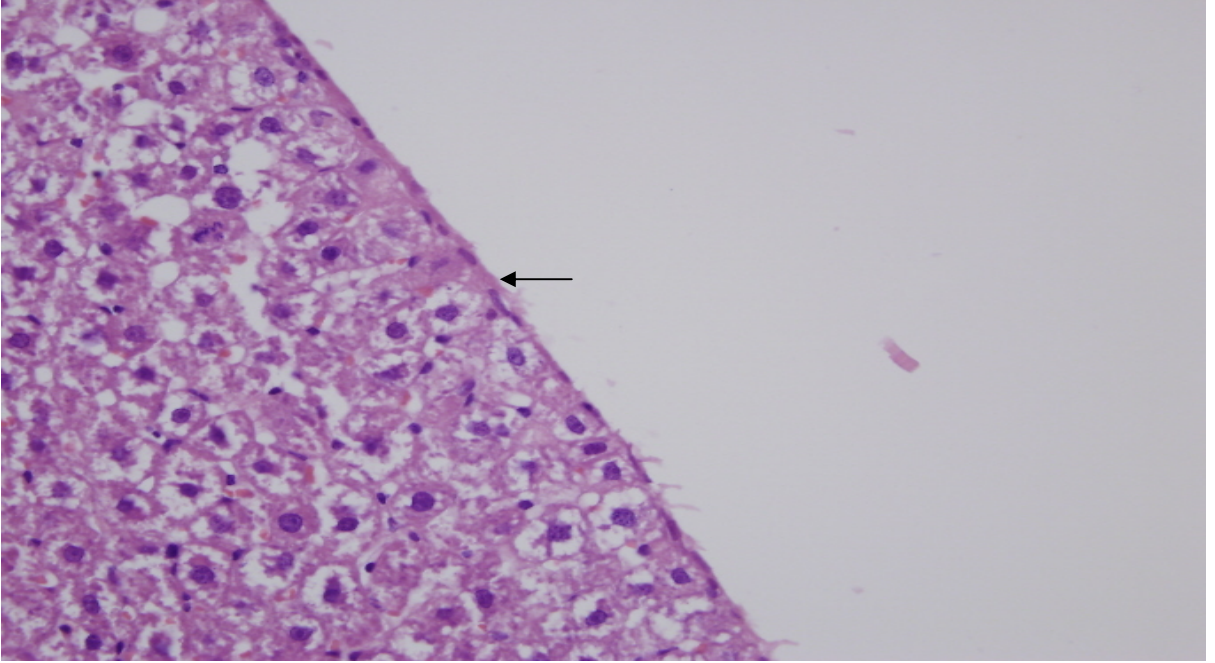
Grafik 3. Visseral periton fibrozis skorunun tüm gruplardaki dağılımı.



Grafik 4. Visseral periton kalınlığının tüm gruplardaki dağılımı.



Resim 5. KH grubundan bir sıçanın visseral peritonuna ait fibroz ve kalınlık artışı ve yangı durumu (F: fibrozis, Y: yangı, F+Y: fibrozis + yangı).



Resim 6. KH + pentoksifilin grubundan bir sıçanın visseral peritonunda fibrozisin olmadığı gösterilmiştir.

B. Biyokimyasal Değerlendirme:

1. Paryetal Periton Dokusunda Ölçülen Pro ve Aktif MMP-2 Düzeyleri:

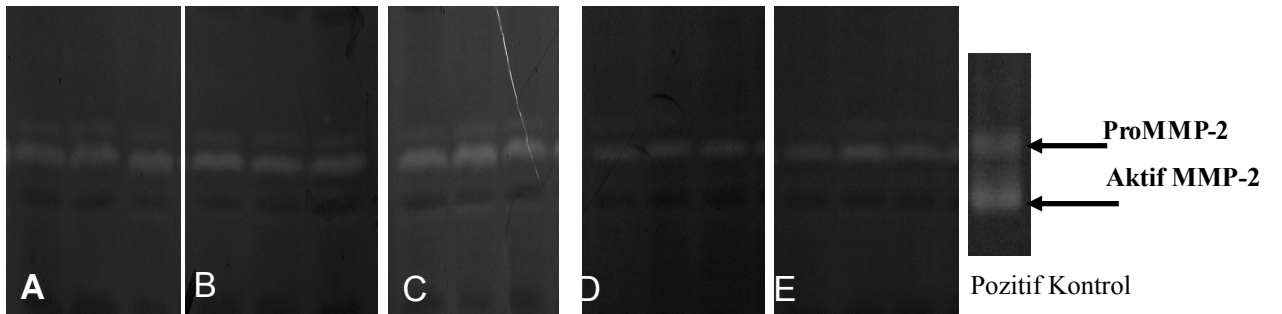
Tablo 8 de paryetal periton dokusunda gösterilen proMMP-2 ve aktif MMP-2'nin tüm gruplarda ki ortalama \pm standart sapma değerleri verilmiştir. ProMMP-2 ve aktif MMP-2 için bulunan değerler yoğunluk/mikrogram protein olarak ifade edilmiştir. Tablo 9 da ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen istatistiksel sonuçlar gösterilmiştir.

GRUPLAR	Paryetal Periton ProMMP-2 yoğunluk/mikrogram protein	Paryetal Periton aktif MMP-2 yoğunluk/mikrogram protein
I-KH	160526 \pm 58163	15478 \pm 15382
II-Pentoksifilin	137275 \pm 31361	12684 \pm 2707
III-KH + pentoksifilin	154762 \pm 56573	20508 \pm 12733
IV-Derişik tuzlu su	108262 \pm 36305	10444 \pm 6282
V-Serum fizyolojik	66513 \pm 9744	6467 \pm 1912

Tablo 8. Paryetal periton dokusunda proMMP-2 ve aktif MMP-2'nin tüm gruplarda ki ortalama \pm standart sapma değerleri.

PARYETAL PERİTON GRUPLAR	proMMP-2	aktif MMP-2
Grup I - Grup II	p = 0,79	p = 0,87
Grup I - Grup III	p = 0,95	p = 0,57
Grup I - Grup IV	p = 0,07	p = 0,77
Grup I - Grup V	<u>p = 0,00</u>	p = 0,27
Grup II - Grup III	p = 0,64	p = 0,38
Grup II - Grup IV	p = 0,12	p = 0,15
Grup II - Grup V	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,00</u>
Grup III - Grup IV	p = 0,12	p = 0,12
Grup III - Grup V	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,01</u>
Grup IV - Grup V	<u>p = 0,02</u>	p = 0,18

Tablo 9. Paryetal peritona ait ikili grup karşılaştırmalarında elde edilen istatistiksel sonuçlar.



Resim 7. Paryetal periton proMMP-2 ve aktif MMP-2'nin jelatin zimografik görünümü.

A: KH, B: Pentoksifilin, C: KH + Pentoksifilin, D: Derişik tuzlu su, E: Serum Fizyolojik

2. Paryetal Periton Dokusunda Ölçülen proMMP-9 Düzeyleri:

Paryetal periton dokusunda hiçbir grupta proMMP-9 düzeyine rastlanmadı.

3. Paryetal Periton Dokusunda Ölçülen TIMP-1 ve TIMP-2 Düzeyleri:

GRUPLAR	Paryetal Periton TIMP-1 pg / mg protein	Paryetal Periton TIMP-2 pg / mg protein
KH	1184 ± 517	1371 ± 206
Pentoksifilin	592 ± 283	1192 ± 215
KH + pentoksifilin	1115 ± 525	1666 ± 323
Derişik tuzlu su	429 ± 154	1663 ± 407
Serum fizyolojik	411 ± 274	1545 ± 397

Tablo 10. Paryetal periton dokusunda TIMP-1 ve TIMP-2'nin tüm gruplarda ki ortalama ± standart sapma değerleri.

PARYETAL PERİTON GRUPLAR	TIMP-1	TIMP-2
Grup I - Grup II	<u>p = 0,02</u>	p = 0,16
Grup I - Grup III	p = 0,77	p = 0,05
Grup I - Grup IV	<u>p = 0,00</u>	<u>p = 0,03</u>
Grup I - Grup V	<u>p = 0,00</u>	p = 0,19
GrupII - Grup III	p = 0,05	<u>p = 0,00</u>
Grup II - Grup IV	p = 0,23	<u>p = 0,01</u>
Grup II - Grup V	p = 0,27	<u>p = 0,03</u>
Grup III - Grup IV	<u>p = 0,00</u>	p = 0,87
Grup III - Grup V	<u>p = 0,00</u>	p = 0,50
Grup IV - Grup V	p = 0,50	p = 0,32

Tablo 11. Paryetal periton dokusunda TIMP-1 ve TIMP-2'nin ikili grup karşılaştırmalarından elde edilen istatistiksel sonuçlar.

Paryetal periton dokusunda ölçülen TIMP-1 ve TIMP-2 değerleri pikogram/miligram protein (pg/mg protein) olarak ifade edilmiştir.

4. Paryetal Periton Dokusunda Ölçülen cAMP Düzeyleri:

Paryetal periton dokusunda ölçülen cAMP düzeyleri pikomol/miligram protein (pmol/mg protein) olarak hesaplanmıştır. Tüm gruplarda değerler şöyle bulundu; KH grubunda $60,6 \pm 19,4$ pmol/mg protein, pentoksifilin grubunda $59,6 \pm 15,8$ pmol/mg protein, KH + pentoksifilin grubunda $80,5 \pm 23,1$ pmol/mg protein, derişik tuzlu su grubunda $81,2 \pm 29,0$ pmol/mg protein ve serum fizyolojik grubunda $75,0 \pm 18,1$ pmol/mg protein.

Yapılan grup karşılaştırmalarında istatistiksel anlamlı farka rastlanılmadı.

5. Visseral Periton Dokusunda Ölçülen Pro ve Aktif MMP- 2 Düzeyleri:

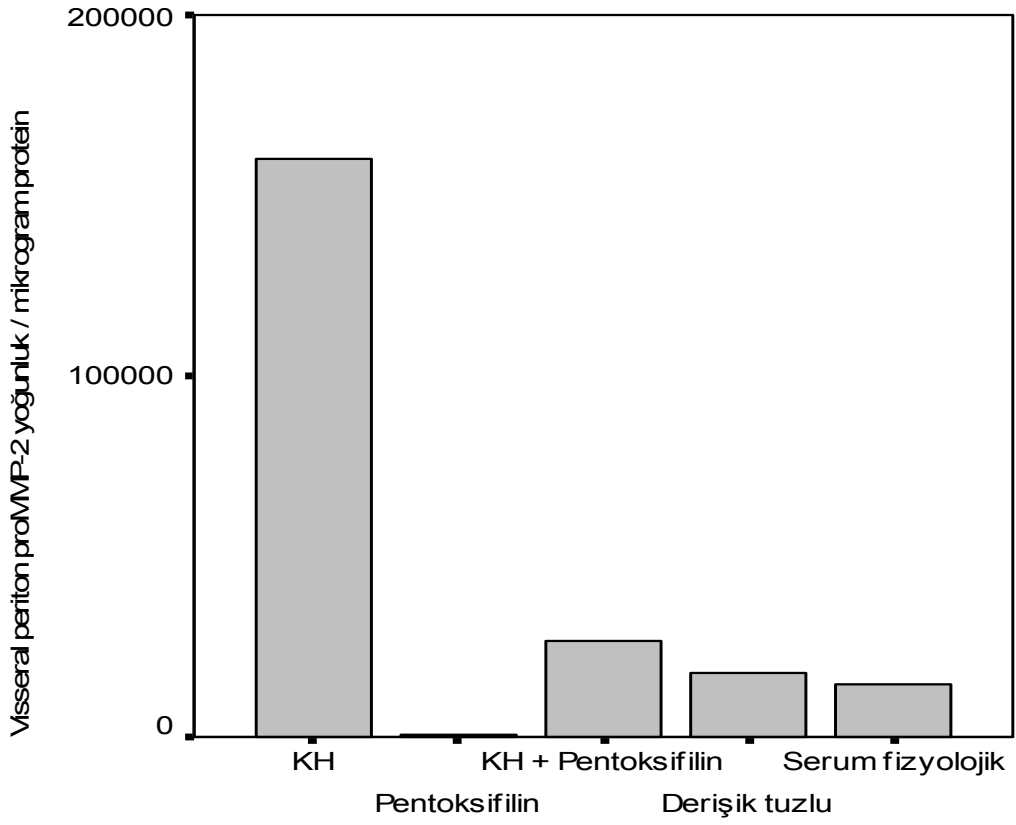
Tablo 12 de visseral periton dokusunda gösterilen proMMP-2 ve aktif MMP-2'nin tüm gruplarda ki ortalama \pm standart sapma değerleri verilmiştir. Değerler yoğunluk/mikrogram protein olarak ifade edilmiştir. Tablo 13 de ikili grup karşılaştırmalarından elde edilen istatistiksel sonuçlar verilmektedir. Grafik 4 de visseral periton da proMMP-2'nin tüm gruplardaki dağılımı gösterilmektedir. Visseral peritonda aktif MMP-2 KH grubu dışında diğer gruplarda ölçülemedi. Bu nedenle istatistiksel değerlendirme yapılmadı.

GRUPLAR	Visseral Periton ProMMP-2 yoğunluk/mikrogram protein	Visseral Periton aktif MMP-2 yoğunluk/mikrogram protein
I-KH	159975 ± 209997	30379980 ± 84533818
II-Pentoksifilin	637 ± 128	0
III-KH + Pentoksifilin	26749 ± 10465	0
IV-Derişik tuzlu su	17838 ± 14725	0
V-Serum fizyolojik	14493 ± 10355	0

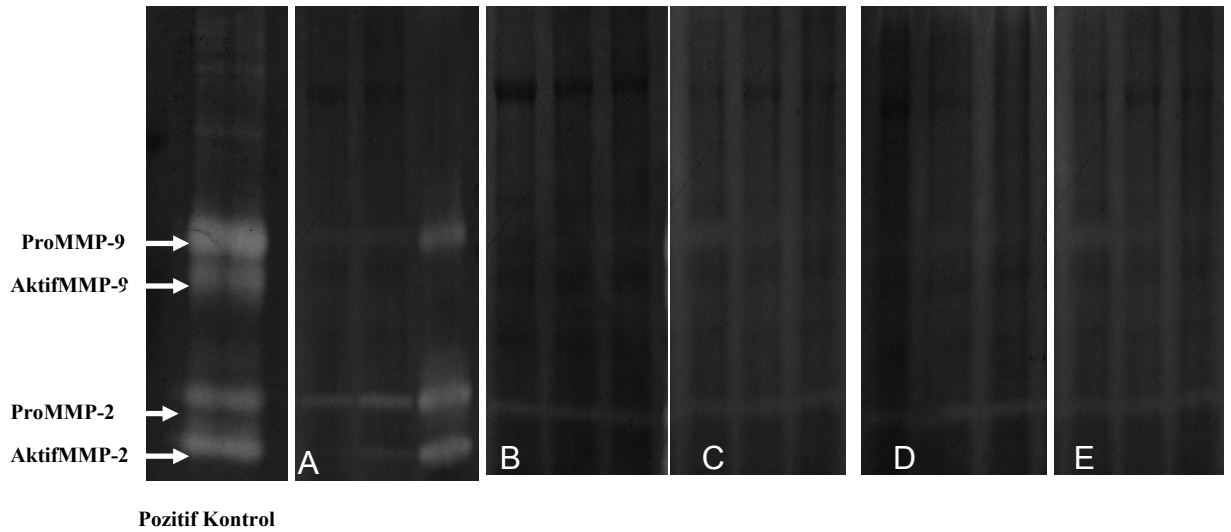
Tablo 12. Visseral periton dokusunda proMMP-2 ve aktifMMP-2 tüm gruplarda ki ortalama \pm standart sapma değerleri.

VİSSERAL PERİTON GRUPLAR	proMMP-2
Grup I - Grup II	<u>p = 0,00</u>
Grup I - Grup III	<u>p = 0,00</u>
Grup I - Grup IV	<u>p = 0,00</u>
Grup I - Grup V	<u>p = 0,00</u>
GrupII - Grup III	<u>p = 0,00</u>
Grup II - Grup IV	<u>p = 0,00</u>
Grup II - Grup V	<u>p = 0,00</u>
Grup III - Grup IV	p = 0,32
Grup III - Grup V	p = 0,07
Grup IV - Grup V	p = 0,75

Tablo 13.Visseral periton dokusunda proMMP-2'nin ikili grup karşılaştırmalarından elde edilen istatistiksel sonuçlar.



Grafik 4. Visseral peritonda proMMP-2'nin tüm gruplara göre dağılımı.

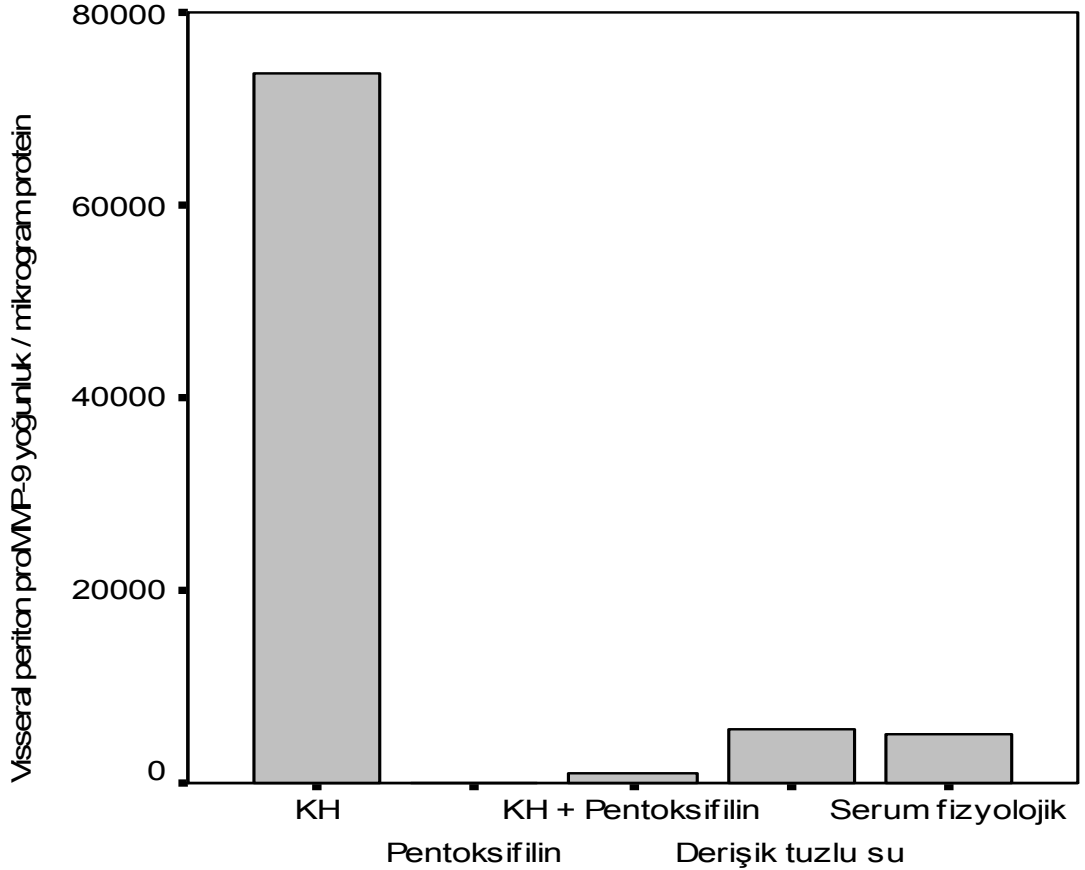


Resim 8. Visseral periton proMMP-2, aktif MMP-2, proMMP-9 ve aktif MMP-9'un jelatin zimografik görünümü.

A: KH, B: Pentoksifilin, C: KH + Pentoksifilin, D: Derişik tuzlu su, E: Serum Fizyolojik

6. Visseral Periton Dokusunda Ölçülen proMMP-9 Düzeyleri:

Visseral peritonda proMMP-9 ölçümü KH grubunda 73696 ± 130144 yoğunluk/mikrogram protein olarak bulundu. Pentoksifilin grubunda hiç proMMP-9 ölçümüne rastlanmadı. KH + pentoksifilin grubunda 908 ± 1265 yoğunluk/mikrogram protein, derişik tuzlu su grubunda 5495 ± 5833 yoğunluk/mikrogram protein ve serum fizyolojik grubunda 4970 ± 5602 yoğunluk/mikrogram protein bulundu. Grafik 5 de visseral peritona ait tüm gruplardaki proMMP-9 dağılımı gösterilmiştir. Pentoksifilin grubunda proMMP-9 ölçümüne rastlanmadığı için ikili grup karşılaştırmalarında grup 2 ile diğer gruplar karşılaştırılmamıştır. Tablo 14 de ikili grup karşılaştırmalarının istatistiksel sonuçları verilmiştir.



Grafik 5. Visseral peritonda ölçülen proMMP-9'un tüm gruplarda ki dağılımı.

VİSSERAL PERİTON GRUPLAR	proMMP-9
Grup I - Grup II	-----
Grup I - Grup III	<u>p = 0,00</u>
Grup I - Grup IV	<u>p = 0,00</u>
Grup I - Grup V	<u>p = 0,00</u>
GrupII - Grup III	-----
Grup II - Grup IV	-----
Grup II - Grup V	-----
Grup III - Grup IV	p = 0,06
Grup III - Grup V	<u>p = 0,02</u>
Grup IV - Grup V	p = 1,00

Tablo 14. Visseral periton dokusunda proMMP-9'un ikili grup karşılaştırmalarından elde edilen istatistiksel sonuçlar.

7. Visseral Periton Dokusunda Ölçülen TIMP-1 ve TIMP-2 Düzeyleri:

Visseral peritonda ölçülen TIMP-1 ve TIMP-2 değerleri pikogram/miligram protein (pg/mg protein) olarak ifade edilmiştir.

Tablo 15'de visseral peritondaki TIMP-1 ve TIMP-2'nin tüm gruplardaki ortalama \pm standart sapma değerleri gösterilmiştir.

Yapılan grup karşılaştırmalarında istatistiksel anlamlı farka rastlanılmadı

GRUPLAR	Visseral Periton TIMP-1 pg / mg protein	Visseral Periton TIMP-2 pg / mg protein
KH	743 ± 504	421 ± 133
Pentoksifilin	625 ± 95	360 ± 31
KH + pentoksifilin	657 ± 92	411 ± 56
Derişik tuzlu su	634 ± 114	373 ± 28
Serum fizyolojik	599 ± 194	370 ± 85

Tablo 15. Visseral peritondaki TIMP-1 ve TIMP-2'nin tüm gruplardaki ortalama ± standart sapma değerleri.

8. Visseral Periton Dokusunda Ölçülen cAMP Düzeyleri:

Visseral periton dokusunda ölçülen cAMP düzeyleri pikomol/miligram protein (pmol/mg protein) olarak hesaplanmıştır. KH grubunda $14,8 \pm 13,6$ pmol/mg protein, pentoksifilin grubunda $7,3 \pm 7,0$ pmol/mg protein, KH + pentoksifilin grubunda $9,2 \pm 4,8$ pmol/mg protein, derişik tuzlu su grubunda $12,0 \pm 7,3$ pmol/mg protein ve serum fizyolojik grubunda $9,1 \pm 5,3$ pmol/mg protein olarak ölçüldü.

İkili grup karşılaştırmalarında istatistiksel anlamlı farka rastlanılmadı.

TARTIŞMA

Düzenli periton diyalizi yapan hastaların tedavilerinin sonlandırılmasında en önemli nedenler; solüt geçişinde ve ultrafiltrasyonda yetersizliklerdir. Periton fibrozisi düzenli periton diyalizi yapan hastaların periton biyopsilerinde yaygın bir bulgudur (4). Periton membranında oluşan değişiklikler özellikle mezotel altında görülen yangı, fibrozis ve damarlanmaya neden olmakta ve sonuçta ultrafiltrasyon yetmezliği gelişmektedir (5). Bu ise, periton diyaliz tedavisinin sonlandırılmasına yol açmaktadır. Periton fibrozisi gelişiminde ana patogenetik mekanizma peritonun mezotelyal hücrelerinin ve fibroblastlarının aşırı üretimi sonucu hücre dışı matriks birikimidir (8-10). Fibrozisin başlaması ve devam etmesinde matriks metalloproteinazları ve onların doğal durdurucuları rol almaktadır (8). Peritonda MMP'ler ve TIMP'lerin periton mezotelyal hücreler, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından üretildikleri gösterilmiş ve periton hücre kültürlerinde MMP-2, MMP-3 ve MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 aktivitelerinin belirgin olduğu ölçülmüştür (17).

Yayınlarda cAMP artışı sağlayan ilaçların hücre çoğalmasını ve hücre dışı matriks birikimini azalttıkları gösterilmiştir (22). Pentoksifilin bir metilksantin türevidir ve özgül olmayan yoldan fosfodiesterazı inhibe eder böylece hücre içi cAMP artışı yapar. İnsan periton fibroblastlarında pentoksifilin in vitro olarak kollajen sentezini ve büyümeyi durdurduğu gösterilmiştir ve fibrozisin de pentoksifilin uygulaması ile gerilediği görülmüştür (26).

Bu çalışmada ki amacımız klorheksidin ile fibrozis oluşturulmuş sıçanlarda pentoksifilin, fibrozisi önlemedeki etkinliğini ve etkinlik sırasında olası yolları belirlemektir.

Çalışmada öncelikle sıçanların karın içine klorheksidin verilerek bir yangı oluşturulması amaçlandı. Daha sonraki hedefimiz yangı sürecinin ilerlemesiyle periton dokusunda fibrozis ve kalınlaşma gelişmesiydi. Periton hasarlanma ve süregen değişikliklerin değerlendirilmesi için paryetal ve visseral peritonda fibrozis skorlaması, kalınlık ölçümleri, damarlanma skorları ve yangı skorları değerlendirildi. Çalışma sonunda histopatolojik göstergelerin değerlendirilmesinde visseral periton yangı skorları dışında KH verilen grup ile diğer tüm gruplar arasında, bakılan tüm diğer histopatolojik göstergeler için istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde birincil hedefimiz olan klorheksidin ile periton fibrozis oluşturma deneyinin başarılı olduğu görüldü.

Pentoksifilin periton fibrozisini önlemedeki etkinliğini değerlendirmek için; KH ve KH + pentoksifilin grupları histopatolojik tüm göstergeler için karşılaştırıldı. Visseral periton yangı skorlaması dışında tüm diğer göstergeler için anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$) Yangı skorlarına bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber KH + pentoksifilin grubunda yangının daha az olduğu görüldü. Fibrozisin sonraki süreçleri için belirlenen göstergelerde KH ve KH + pentoksifilin grupları arasında anlamlı fark olması, çalışma daha uzun sürdürülseydi “yangı”nın azalabileceğini ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşabileceğini düşündürdü. Pentoksifilin peritonda ki etkisi serum fizyolojiktan farklı değildi. Yine pentoksifilin içinde çözünmüş olduğu derişik tuzlu su çözeltisinin de hem Parietal hem visseral peritonda ki fibrozis skoru, yangı skoru, kalınlıklar fibrozis oluşun alan yüzdesi ve damarlanma bakımından serum fizyolojik ile benzerdi.

Bu sonuç Fang C ve arkadaşlarının yapmış olduğu silika ilişkili periton fibrozisinin pentoksifilin ile önlediği çalışmanın sonuçları ile benzerdi (26). Yine bu çalışmada in vitro olarak tripsin-EDTA ile uyarılmış insan periton mesotel hücre kültürlerinde pentoksifilin uygulaması ile mesotel hücre büyümesi ve kollajen sentezinin durdurulduğu gösterilmişti (25). Başka bir çalışmada sıçanlarda barsak rezeksiyonu sonrası karın içi yapışıklıkların pentoksifilin uygulaması ile önlediği gösterilmişti (38). Yaptığımız çalışma da pentoksifilin uygulaması ile fibrozisin önlenmesi bu iki çalışmanın sonuçlarını destekliyordu. Hung KY ve arkadaşları özgül olmayan yolla fosfodiesterazı inhibe edip hücre içi cAMP artışı sağlayan dipiridamol ile in vitro olarak periton mezotel hücre çoğalmasını durdurduklarını ve in vivo olarakta periton kalınlaşması ve yapışıklıklarının azaldığını göstermişlerdi. Bu çalışmada aynı ilaç kullanılmamakla beraber aynı yolağı kullanan pentoksifilin kullanıldı ve periton dokusundaki sonuçları benzer bulundu (36). Tüm bu bulgular değerlendirildiğinde pentoksifilin uygulamasının; klorheksidin ile oluşturulan kimyasal peritonit ve sonrasında gelişen periton fibrozisini önleyebileceği sonucuna varıldı.

Martin J ve ark'nın çalışmasında; periton hücre kültürlerinde MMP-2, MMP-3 MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 aktivitelerinin olduğunu gösterilmişti (17). Yine Masunaga Y ve ark'nın, Fukudome K ve ark'nın çalışmalarında da periton fibrozisinde ve peritonitler sırasında periton sıvısında MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 artışı gösterilmişti (19-20). Başka bir çalışmada enkapsüle peritonit oluşturulan sıçanlarda diyalizat sıvısında MMP-2 aktivitesinin arttığı saptanmıştı (21). Çalışmamızın ikinci kısmında peritonda oluşun fibrozis sırasında ve pentoksifilin ile önlenmesinde MMP-2 ve MMP-9'un etkisini ve bu matriks

metalloproteinazların doğal durdurucuları olan TIMP-1 ve TIMP-2 düzeyini paryetal ve visseral periton doku örneklerinde değerlendirdik.

Klorheksidinle peritonit ve fibrozis geliştirdiğimiz grupta hem paryetal hem de visseral peritonda proMMP-2 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırayla $p=0,00$, $p=0,00$). Ancak aktif MMP-2 düzeyleri paryetal periton dokusunda fibrozis oluşturulan grup ile kontrol grubu arasında farklı değildi. Visseral periton dokusunda ise KH grubu dışında aktif MMP-2 gösterilemedi. Bu sonuç periton fibrozisi oluşumunda proMMP-2'nin rol oynayabileceğini düşündürdü. Paryetal peritonda fibrozis oluşturulan grup ile pentoksifilin ile önleyici tedavinin verildiği gruplar arasında proMMP-2, aktif MMP-2 ölümlerinde istatistiksel olarak farklılık bulunmadı. Ancak visseral peritonda proMMP-2 için bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0.01$). Visseral peritonda pentoksifilinin fibrozisi önleyici etkisi sırasında proMMP-2'düzeyinin düşük bulunması pentoksifilinin bu Şekilde etkisini gösterebileceğini düşündürdü. Periton zarının paryetal ve visseral yapraklarının ayrı fizyolojik düzeneklerle çalışmayacağı düşüncesinden hareketle, visseral peritonda bulduğumuz bu bulgunun paryetal periton içinde geçerli olduğunu düşünebiliriz. Paryetal peritonda aktif MMP-2 istatistiksel anlamlı olmasa da klorheksidin alan grupta belirgin olarak daha yüksekti. İstatistiksel anlamlılığa ulaşmama nedeni ise olasılıkla aktif MMP-2 düzeyinin klorheksidin grubu içinde geniş bir aralığının olması ve oldukça yüksek bir standart sapma değerine sahip olmasıydı. Eğer grup içinde sıçan sayısı yüksek alınsaydı aktif MMP-2 için istatistiksel anlamlılığa ulaşılması mümkün olabilirdi. Visseral peritonda ise aktif MMP-2 düzeyleri klorheksidinle fibrozis oluşturulan grup dışındaki gruplarda gösterilemedi. Buradan Şu sonuçlar çıkarılabilir; a) klorheksidin güçlü bir fibrotik ajandır ve proMMP-2 den aktif MMP-2 ye geçişi belirgin olarak uyarır b) pentoksifilin klorheksidinin uyardığı proMMP-2 den aktif MMP-2'ye geçişi engelliyor olabilir ProMMP-2'nin aktifleşme süreci visseral peritonda farklı bulunmuştur. Aktifleşme mekanizmalarının visseral ve parteyal peritonda farklı farklı oabileceğini düşünmek gttr. Ancak bizim bulgumuz bu Őekildedir. Bunun nedeni visseral peritonu elde etmede ve ztn çıkarmada yaşanan teknik zorluklar nedeniyle olmuş olabilir.

Visseral periton dokusunda TIMP-2 için gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. Visseral peritonda proMMP-2 düzeyi pentoksifilin + KH verilen grupta düşük bulunmuşken TIMP-2 de anlamlı bir yükseklik olmaması; visseral peritonda TIMP-2'nin sunumunun belirgin olmamasından kaynaklanabilir. Ayrıca proMMP-2 düzeyinin azalması

TIMP-2 dışında pentoksifilin uygulaması gibi bir takım başka faktörler ile gerçekleşmiş olabilir. Paryetal peritonda ise TIMP-2 düzeyi fibrozis oluşturulan gruba kontrol grubu arasında farklı değilken, pentoksifilin ve klorheksidin verilen grupta klorheksidin verilen gruba göre yüksek bulundu ($p=0,04$). Paryetal peritonda pentoksifilin ve klorheksidin verilen grupta TIMP-2 yüksekliğine karşı beklentimiz bu grupta pro ve aktif MMP-2 düzeylerinin düşük olmasıydı ancak bu gösterilemedi. Yinede bu grupta proMMP-2 ve aktif MMP-2'lerde belirgin düşüklük olmasa fibrozisin önlenmesinde TIMP-2'lerin rolü olabilir. Çünkü TIMP'ler sadece MMP'leri durdurmazlar aynı zamanda dokuda farklı görevleri de vardır (40).

Paryetal periton dokusunda proMMP-9 hiçbir grupta ölçülemedi. Paryetal periton dokusunda proMMP-9'un gösterilememesi nedeni a) bu dokuda sunumunun olmaması b) kullandığımız teknik ile gösterilememesi olabilir. Eğer mRNA düzeyinde proMMP-9 çalışılmış olsaydı belki de paryetal periton dokusunda proMMP-9'a rastlanabilecekti. Dokularda proMMP sunumu TIMP'lerin sunumlarına bağlı olmadığı için proMMP-9'un paryetal peritonda gösterilememiş olması paryetal peritonda TIMP-1 varlığı ile ilişkilendirilmedi.

Visseral periton dokusunda ise fibrozis oluşturulan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek proMMP-9 düzeyleri gösterildi ($p=0.00$). Pentoksifilin ile önleyici tedavinin verildiği grupta ise belirgin olarak düşük proMMP-9 gösterildi ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.00$). Bu sonuca bakarak visseral peritonda pentoksifilin proMMP-9 düzeyini azaltarak fibrozisi önleyebileceği düşünüldü. Visseral periton dokusunda aktif MMP-9 ölçümüne rastlanılmadı. Yine bunun olası nedenleri a) proMMP-9'un aktif MMP-9 dönüşümünü engelleyen TIMP-1 dışında başka durdurucuların olması b) kullandığımız teknik nedeniyle aslında var olan aktif MMP-9'u ölçemememiz c) visseral peritonun elde edilmesinde ve özütünün çıkarılmasındaki yaşanan teknik zorluklar olabilir.

TIMP-1 ölçümlerine bakıldığında paryetal peritonda TIMP-1 ölçümü fibrozis oluşturulan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p=0.00$). Ancak klorheksidin ile fibrozis oluşturulan grup ile pentoksifilin ve klorheksidin verilen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Paryetal periton dokusunda proMMP-9 olmadan TIMP-1 olmasının olası nedeni TIMP'lerin sadece MMP'lerin durdurucuları olmayıp başka fizyolojik mekanizmalarda da rol oynamaları olabilir (40). Visseral peritondaki TIMP-1 düzeyleri incelendiğinde hiçbir grup karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı

farklılık gösterilemedi. Visseral periton için proMMP-9 düzeyinin klorheksidin ve pentoksifilin birlikte verildiği grupta istatistiksel olarak daha düşük bulunmasının nedeni olasılıkla pentoksifilin uygulaması gibi TIMP-1 dışındaki başka bir nedene bağlıdır.

Bu sonuçlar ışığında paryetal peritonda proMMP-2 artışı fibrozis gelişimine neden olabilir. Aynı şekilde visseral peritonda fibrozis gelişiminde proMMP-2 ve proMMP-9 artışları rol oynayabilir. Paryetal periton fibrozisinin engellenmesinde pentoksifilin proMMP-2, proMMP-9, TIMP-1 üzerine belirgin etkisi gösterilemedi. TIMP-2 ise paryetal periton dokusunda pentoksifilin ile önleyici tedavinin verildiği grupta yüksekti. Pentoksifilin paryetal periton dokusunda fibrozisi önlemedeki etkisinde TIMP-2'deki bu artış rol oynayabilir. Visseral periton dokusunda pentoksifilin fibrozisi önleyici etkisi ise TIMP-1 ve TIMP-2'ler dışında başka mekanizmalar ile proMMP-2 ve proMMP-9 düzeylerini azaltarak olabilir.

Fibrozis gelişen grupta pro MMP-2 düzeyleri yüksekliği daha önce peritonitli hastaların, periton sıvısında MMP-2 yüksek bulunmuş çalışmalarla uyumluydu (19-21)

Hirahara I.ve arkadaşlarının çalışmasında aktif MMP-2 periton hasarlanmasında daha yüksek bulunmuştu (41). Ancak bu çalışmada bunu gösteremedik.

Fudukoma ve arkadaşlarının çalışmasında özellikle bakteriyel peritonitlerin erken evresi ve iyileşme döneminde proMMP-9 düzeylerinin yüksekliği periton sıvısında gösterilmişti ancak kaynağı belirlenememişti (20). Bu çalışmada proMMP-9'u visseral periton fibrozisinde belirgin yüksek bulduk. Önceki çalışmada periton sıvısında yüksek tespit edilen proMMP-9'un kaynağının visseral periton olması muhtemeldir.

Pentoksifilin fosfodiesteraz inhibisyonu yaparak etkisini göstermektedir. Bu nedenle üçüncül olarak baktığımız gösterge cAMP idi. cAMP ölçümleri açısından paryetal ve visseral periton değerlendirilmelerinde hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlılığa rastlanılmadı.

Ayrıca çalışma sonuçlarının değerlendirilmesinde ne paryetal periton nede visseral periton dokusunda cAMP ile proMMP-2, aktif MMP-2, proMMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 arasında korelasyona rastlanılmadı.

Daha önce yapılan hücre kültürü çalışmalarında cAMP artışının hücre çoğalmasını engellediği gösterilmişti (39). Yine pentoksifilin insan mezotel hücrelerinde cAMP artışı yoluyla kollajen sentezini ve çoğalmasını durdurduğu da gösterilmişti (25- 26). Biz periton

fibrozisin de paryetal ve visseral dokuda cAMP çalıştık. Çalışmamızda her iki periton dokusunda da pentoksifilin ile fibrozisi önlemiş olmamıza rağmen cAMP artışına rastlamadık. Bunun iki olası açıklaması olabilir. Birincisi cAMP'nin yarı ömrü çok kısadır (yaklaşık 5 dk) ve cAMP çalışmamızın merkezinde yer almadığı için yarı ömrüne göre bir planlamada yapmadığımızdan dolayı böyle bir sonuç çıkmış olabilir. İkincisi ise pentoksifilin cAMP artışı dışında başka bir yolağı daha kullanıyor olabilir. Sistemik sklerozda TNF- α düzeylerinde artış gösterilmiştir. Pentoksifilin'nin ise TNF- α düzeylerinde azalma yaptığı gösterilmiş (42). Periton fibrozisinde de salınan sitokinler içinde TNF- α yer aldığı için belkide bu sitokinin düzeyinde değişiklik bu olumlu etkiden sorumlu olabilir.

SONUÇ: Klorheksidinle paryetal ve visseral periton dokusunda fibrozis oluşturulmuştur. Pentoksifilin ise oluşturulan bu fibrozisi histopatolojik olarak engellemiştir. Fibrozisin oluşmasında paryetal peritonda proMMP-2 visseral peritonda ise proMMP-2 ve proMMP-9 düzeylerinde artış gösterilmiştir. Pentoksifilin ise fibrozisin engellenmesinde visseral periton dokusunda proMMP-2 ve proMMP-9'un düzeylerini azaltarak etkili olabilir. Pentoksifilin paryetal periton fibrozisini önlerken TIMP-2 düzeyini artırıyor olabilir. cAMP düzeylerinde değişiklik olmaması teknik olarak ölçüm sorunları yoksa periton fibrozisinin önlenmesinde pentoksifilinin başka bir yolu kullanıyor olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR:

1. Nahas M. Progression of chronic renal failure. In: Johnson R, Feehally J, eds. *Comprehensive clinical nephrology* 2nd ed. Mosby; 2003; Section 14 p.843.
2. John T. Daugirdas. *Handbook of Dialysis*. 3rd ed. Lippincott Williams &Wilkins 2003; Chapter 2 p .15.
3. Heimburger O, Waniewski J, Werynski A, Tranaeus A. Periton transport in CAPD patients with permanent loss of ultrafiltration capacity. *Kidney Int* 1990; 38 (39) : 495-506.
4. Hung K, Huan J, Tsai T, Hsieh B. Peritoneal fibrosing syndrome: pathogenetic mechanism and current therapeutic strategies *J Chin Med Assoc* 2005 ;68(9):401-5.
5. Flessner MF. The effect of fibrosis on periton transport. *Contrib Nephrol* 2006; 150: 174-80.
6. Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C et al. Morphologic changes in the periton membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:470-9.
7. Mactier RA. The spectrum of periton fibrosing syndromes in periton dialysis. *Adv Perit Dial* 2000; 16: 23-8.
8. Peter J, Bounniaud M. Basic mechanisms and clinical implications of periton fibrosis. *Perit Dial Internatioal* 2003 ;23 (6); 530-541.
9. Miyata T, Devusyst O, Kurukowa K, Van Ypersele de Strihou C. Toward beter dialysis compatibility advances in the biochemistry and pathophysiology of the periton membranes. *Kidney Int* 2002; 61: 375-86.
10. Hung KY, Tsai TJ.Chen WY. Periton fibrosis and its prevention. *Nephrology*. 2002(7); 227-232.
11. Yanez–Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R. Periton dialysis and epithelial to mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 403–13.
12. Turck J, Pollock AS, Lovett DH. Gelatinase A is glomerular mesengial cell growth and differentiation factor. *Kidney Int* 1997;51:1397-400.
13. Nagase H, Woessner J.F. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491–21494.
14. McIntush EW, Smith MF. Matrix metalloproteinases of tissue inhibitors of proteinases in ovarian function. *Rev Reprot* 1998; 3(1):23-30.

15. Woessner FJ. MMPs and TIMPs: an historical perspective. *Mol Biotechnol* 2002; 22 (1): 33–49.
16. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5(8):2145–2154.
17. Martin J, Yung S, Robson RL, Steadman R et al. Production and regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human periton mesothelial cells. *Perit Dial Int Vol* 2000 20 (5); 524-533.
18. Takahara T, Funaki J, Nakayama Y, Miyabayashi C et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1995; 21 (3): 787-95.
19. Masunaga Y, Hirahara I, Shimano Y, Kurosu M et al. case of encapsulating peritoneal sclerosis at the clinical early stage with high concentration of matrix metalloproteinase-2 in periton effluent. *Clin Exp Nephrol* 2005; 9(1): 85-89.
20. Fukudome K, Fujimoto S, Sato Y, Hisanaga S et al. Peritonitis increases MMP-9 activity in periton effluent from CAPD patients. *Nephron* 2001; 87:35-41
22. Hewiston TD, Martic M, Darby IA, Kelynack KJ et al. Intracellular cyclic nucleotide analogues inhibit in vitro mitogenesis and activation of fibroblasts derived from obstructed rat kidneys. *Nephron Exp Nephrol* 2004; 96:59-66.
23. Chen Y, Lin S, Chiang W, Lan H et al. Pentoxifylline suppresses renal tumour necrosis factor- α and ameliorates experimental crescentic glomerulonephritis in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:1106-1115.
24. Chen Y, Chien C, Tsai M, Wu K et al. Pentoxifylline attenuates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 56:932-43.
25. Fang C, Yen C, Chen Y, Shyu R. Pentoxifylline inhibits human periton mesothelial cell growth and collagen synthesis: effects on TGF- β . *Kidney Int* 2000; 57:2626-33.
26. Fang C, Lai M, Chien C, Hung K et al. Effects of pentoxifylline on periton fibroblasts and silica-induced periton fibrosis. *Perit Dial Int* 2003; 23(3):228-236.
27. Io H, Hamada C, Ro Y, Yhirahara I. Morphologic Changes of peritoneum and expression of VEGF in encapsulated periton sclerosis rat models. *Kidney Int* 2004; (65):1927-1936.
28. Sanli A, Onen A, Sarioglu S, Sis B et al . Glutamine administration enhances the healing of lung parenchymal injuries and reduces air leakage in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2006; 210 (3):239-45.

29. Sarioglu S, Sis B, Celik A, Tekis D et al. Quantitative digital histochemistry with methenamine silver staining in renal allograft biopsies excluding pure chronic allograft nephropathy cases. *Transplant Proc.* 2006; 38 (2): 490 -1.
30. Sis B, Sarioglu S, Celik A, Kasap B et al. Renal medullary changes in renal allograft recipients with raised serum creatinine. *J Clin Pathol.* 2006;59(4):377-81.
31. Guray M, Sarioglu S, Turkmen M, Yilmaz O et al. Cyclosporine A toxicity in association with reduced renal mass. *Transplant Proc* 2003; 35 (8):3128-33.
32. Guneri EA, Tekin S, Yilmaz O, Ozkara E et al. The effects of hyaluronic acid , epidermal growth factor, and mitomycin in an experimental model of acute traumatic tympanic membrane perforation. *Otol Neurotol.* 2003; 24 (3): 371-6.
33. Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 1988 15: 175(1):231-7
34. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; 218:325-9.
35. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227:680–684.
36. Hung K, Shyu R, Fang C, Tsai C et al. Dipyridamole inhibits human periton mesothelial cell proliferation in vitro and attenuates rat periton fibrosis in vivo. *Kid Int* 2001 ;59(6):2316-2324.
37. Nagasa H, Visse R, Murphy G. Structure and functions of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research.*2006; 69:562-573.
38. Lai H-S, Chu S-Y, Chen Y, Wu C-H et al. Effect of pentoxifylline on intraperitoneal adhesions after intestinal resection in rats. *J Formos Med Assoc* 1994; 93:911-15.
39. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β -induced collagen synthesis:down regulation by cAMP. *FABES J* 1999; 13:1774-86.
40. Chirco R, Liv X-W, Jung K-K. Novel functions of TIMPs in cell signalling. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:99-113.
41. Hirahara I, Ogawa y, Kusano E, Asano Y. Activation of matrix metalloproteinase-2 causes periton injury during periton dialysis in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2004; 19(7):1732-41.

42. Neiko L, Latsyshyn RI. Use of pentoxifylline in the treatment of systemic scleroderma.
Lik Sprava 2002; 1:97-102 (Abstract)