

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NEFROLOJİ BİLİM DALI

**PEROKSİZOM PROLİFERATÖR AKTİVE
RESEPTÖR- γ AGONİSTİ PİOGLİTAZON'UN
ENKAPSÜLE PERİTONEAL FİBROZİS
MODELİNDE PERİTON MEMBRANI ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİ**

Dr.Funda SAĞLAM

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2009

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NEFROLOJİ BİLİM DALI

**PEROKSİZOM PROLİFERATÖR AKTİVE
RESEPTÖR- γ AGONİSTİ PİOGLİTAZON'UN
ENKAPSÜLE PERİTONEAL FİBROZİS
MODELİNDE PERİTON MEMBRANI ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİ**

**NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ
Dr.Funda SAĞLAM**

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı ve
Dokuz Eylül Böbrek Hastalarına Yardım ve Dayanışma ile Bilimsel
Araştırmaları Destekleme Derneği Tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	1
ŞEKİL LİSTESİ	2
GRAFİK LİSTESİ	3
RESİM LİSTESİ	4
KISALTMALAR	5
TEŞEKKÜR	6
ÖZET	7
İNGİLİZCE ÖZET	9
GİRİŞ VE AMAÇ	11
GENEL BİLGİLER	14
GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
BULGULAR	29
TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	46

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Matriks Metalloproteinazlar

Tablo 2: Pariyetal periton patolojik değerlendirme sonuçları

Tablo 3: Visseral periton patolojik değerlendirme sonuçları

Tablo 4: MMP-2 ve pro-MMP-2 etkinliği

Tablo 5: Pro-MMP-2, MMP-2, pro-MMP-9, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 (ELİSA)

Tablo 6: TGF- β (ELİSA)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Periton fibrozisi oluşumu

Şekil 2: Çalışma tasarımı

Şekil 3: TIMP-1 için ELISA ile ölçüm yöntem şeması

GRAFİK LİSTESİ

- Grafik 1:** Pariyetal periton enflamasyon skoru
- Grafik 2:** Pariyetal periton kalınlığı
- Grafik 3:** Pariyetal periton fibrozis yüzdesi-enflamasyon skoru
- Grafik 4:** Visseral periton enflamasyon skoru
- Grafik 5:** Visseral periton kalınlığı
- Grafik 6:** Visseral periton fibrozis ve enflamasyon
- Grafik 7:** MMP-2 etkinliği (Zimografi)
- Grafik 8:** Pro-MMP-2 etkinliği (Zimografi)
- Grafik 9:** Aktif MMP-2 etkinliği (ELİSA)
- Grafik 10:** Pro-MMP-2 etkinliği (ELİSA)
- Grafik 11:** Aktif MMP-9 etkinliği (ELİSA)
- Grafik 12:** Pro- MMP-9 etkinliği (ELİSA)
- Grafik 13:** TIMP-1 etkinliği (ELİSA)
- Grafik 14:** TIMP-2 etkinliği (ELİSA)
- Grafik 15:** TGF- β etkinliği (ELİSA)

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Pariyetal periton (H&E), kontrol grupları

Resim 2: Pariyetal periton, VG, kontrol grupları

Resim 3: Pariyetal periton, VG-seçilmiş, kontrol grupları

Resim 4: Pariyetal periton (H&E), KH ve KH+Pioglitazon grupları

Resim 5: Pariyetal periton, VG, KH ve KH+Pioglitazon grupları

Resim 6: Pariyetal periton, VG-seçilmiş, KH ve KH+Pioglitazon grupları

KISALTMALAR

SAPD:	Sürekli ayaktan periton diyalizi
PD:	Periton diyalizi
KH:	Klorheksidin
HE:	Hematoksilen & Eosin
MT:	Masson's Trichrome
MMP:	Matriks metaloproteinazlar
TIMP:	Doku matriks protein inhibitörleri
EPS:	Enkapsüle periton skleroz
TGF-β:	Transforming büyüme faktörü-beta
VEGF:	Damar endotelyal büyüme faktörü
TZD:	Tiazolidinedionlar
PPAR-γ:	Peroksizom proliferatör aktive reseptör- γ
PAI-1:	Plazminojen aktivatör inhibitör-1
KBY:	Kronik böbrek yetmezliği
GFH:	Glomerüler filtrasyon hızının
K/DOQI:	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
UF:	Ultrafiltrasyon
AGE:	İleri glikozilasyon son ürünlerinin
IL-1 α:	İnterlökin-1 α
TNF- α:	Tümör nekroz faktör- α
IL-6:	İnterlökin -6
FGF2:	Fibroblast büyüme faktörü-2
eNOS:	Endotelyal nitrik oksit sentaz
SF:	Serum fizyolojik
VG:	Von Gieson
BSA:	Sığır serum albumin
SDS:	Sodyum dodesil sülfat

TEŞEKKÜR

Yan dal uzmanlık eğitimi sürecindeki katkı ve desteklerinden dolayı başta hocamız Sayın Prof. Dr. Taner Çamsarı olmak üzere, Prof. Dr. Ali Çelik, Doç. Dr. Aykut Sifil ve Doç. Dr. Caner Çavdar'a teşekkür ederim.

İç Hastalıkları uzmanlık eğitimim ve sonrasındaki katkıları nedeniyle başta Sayın Prof. Dr. İlkay Şimşek olmak üzere, tüm İç Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanmasında emeği geçen Prof. Dr. Taner Çamsarı, Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu, Prof. Dr. Gülgün Oktay, Prof. Dr. Osman Yılmaz, Dr. Zahide Çavdar, Dr. Devrim Tayfur ve Araş. Gör. Efsun Kolatan'a teşekkür ederim.

Nefroloji eğitimim süresince benimle birlikte olan asistan ve uzman doktor arkadaşlar, periton diyalizi ve hemodiyaliz hemşireleri, diyaliz ve poliklinik sekreterleri, diyaliz ve poliklinik personeli ile birlikte çalışmaktan mutluluk duydum.

Yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, eğitim ve hekimlik hayatımda da desteklerini gördüğüm ve sevgileriyle bana güç veren aileme çok teşekkür ederim.

Dr.Funda SAĞLAM

ÖZET

PEROKSİZOM PROLİFERATÖR AKTİVE RESEPTÖR- γ AGONİSTİ PIOGLİTAZON'UN ENKAPSÜLE PERİTONEAL FİBROZİS MODELİNDE PERİTON MEMBRANI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ

Funda Sağlam

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: funda.saglam@deu.edu.tr

Giriş: Periton fibrozisi sürekli ayaktan periton diyaliz tedavisinin (SAPD) sonlandırılmasında önemli bir nedendir. Günümüzdeki kanıtlar periton fibrozisinin gelişmesinde matriksin aşırı üretiminin sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. SAPD'li hastalarda gelişen periton fibrozisinin tedavisi yüz güldürücü değildir. Ağızdan anti-diyabetik ilaçların yeni bir sınıfı sayılan tiazolidinedionlar (TZD), nükleer reseptör hormon ailesinin üyesi olan peroksizom proliferatör aktive reseptör- γ (PPAR- γ)'yı uyarmaktadırlar. In vitro çalışmalarla, PPAR-aktivatörlerinin hücre dışı matriks yapımını, TGF- β , tip 1 kollajen, fibronektin ve MMP-9 başta olmak üzere MMP sentezini de baskıladığı ortaya konmuştur. PPAR etkinliğinin, plazminojen aktivatör inhibitör (PAI-1) ve TGF- β sentezini baskılayarak glomeruler hücre artışını azalttığı gösterilmiştir Peritonda ya da periton fibrosis modelinde PPAR- γ ve agonistlerinin işlevi iyi bilinmemesine karşın, insan periton mezotel hücrelerinde PPAR- γ bulunduğu ve agonistlerinin TGF- β 1 yapımını azalttığı gösterilmiştir

Amaç: Klorheksidin ile oluşturulan periton fibrozisinde pioglitazonun fibrozis üzerine olan etkisini belirlemek ve periton dokusundaki MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 ve TGF- β 'yi baskılayarak yapımı üzerine etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 32 adet Wistar albino sıçan alındı. Periton fibrozisi oluşturmak için %0,1'lik klorheksidin (KH) kullanıldı. Sıçanlar 4 gruba ayrıldı: Grup 1; SF grubu, Grup 2; SF+Pioglitazon grubu, Grup 3; KH grubu, Grup 4; KH+Pioglitazon grubu. Model için KH ve tedavi 14 gün boyunca uygulandı. Sıçanlar sakrifiye edildi ve paryetal periton için karın ön duvarından ve visseral periton için karaciğerden örnekler alındı.

Bulgular: KH ile oluşturulan periton fibrozisi modelinde, pariyetal ve visseral peritonda enflamasyon, periton zarında kalınlık artışı ve fibrozis yüzdesinde anlamlı bir artma saptandı. Pioglitazon tedavisi uygulanan grupta KH grubu ile karşılaştırıldığında, enflamasyon skorunda, periton zarı kalınlığı ve fibrozis yüzdesinde anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir. KH grubuna Pioglitazon tedavisi verildiğinde pro-MMP-2 ve pro-MMP-9'da anlamlı bir baskılanma saptanmıştır. Pioglitazon tedavisi EPS modelinde TIMP-1 ve TGF- β etkinliğinde de anlamlı bir baskılanma sağlamıştır.

Sonuç: Sonuç olarak; PPAR- γ agonisti pioglitazon, deneysel EPS modelinde jelatinazları ve TGF- β 'yı baskılayarak, periton zarı enflamasyonunu, periton duvar kalınlığını ve fibrozisi iyileştirmiştir.

Bu bulgular ışığında, diyabetik nefropati ilişkili SDBY hasta sayısının hızla arttığı göz önünde bulundurulduğunda, bu hasta grubunda uygulanabilecek tiazolidinedion tedavisinin kalp damar sağlığı yanı sıra, periton işlevi üzerine de olumlu etkisinin olabileceği düşünülebilir. Risk altındaki hastalarda, pioglitazonun bu potansiyel etkisi, nadir ancak ölümcül bir komplikasyon olan EPS'nin önlenmesi ya da tedavisinde göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar kelimeler: Matriks metaloproteinazlar (MMP'ler), doku matriks protein inhibitörleri (TIMP'ler), Pioglitazon, periton fibrozisi

SUMMARY

PIOGLITAZONE REDUCES PERITONEAL FIBROSIS VIA INHIBITION OF TGF- β , MMP-2 AND MMP-9 IN A MODEL OF ENCAPSULATING PERITONEAL SCLEROSIS

Funda Sağlam, MD.

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

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

e-mail: funda.saglam@deu.edu.tr

Introduction: Peritoneal dialysis (PD) is an established renal replacement therapy modality in end-stage renal disease (ESRD) patients. Although, after long-term treatment, peritoneal fibrosis (PF) results as a serious complication in some patients, causing membrane failure. Long term and progressive fibrosis may lead to encapsulating peritoneal sclerosis (EPS), the irreversible sclerosis of both visceral and peritoneal peritoneum which is associated with the symptoms of ileus and is life threatening. It is well known that increased production of ECM and decreased production of matrix-degrading proteinases (MMPs) results with the cumulation of ECM leading to fibrosis. Thiazolidinediones (TZDs), synthetic peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ ligands, having central role in insulin sensitization and adipogenesis and used extensively in patients with diabetes, are involved in the inflammatory cascade and reduce inflammation and fibrosis due to their ability to down-regulate proinflammatory gene expression and inflammatory cell functions.

Objective: We investigated the effects of pioglitazone on fibrosis, tissue TGF- β , MMP-2 and MMP-9 activation in an experimental model of EPS.

Method: The EPS model was induced by the injection of 0.1% CG and 15% ethanol dissolved in saline (3ml) for 14 days intraperitoneally (IP). A total of 32 female Wistar albino rats were randomized to four groups. Group 1 (n:8); the control (C) group, received 0.9% saline, group 2 (n:8); the pioglitazone (Pio) group, received pioglitazone and 0.9% saline, group 3 (n:8); the encapsulating peritoneal sclerosis group, received intraperitoneal chlorhexidine gluconate (CG), group 4 (n:8); the treatment group, received CG and pioglitazone (CG+Pio). Pioglitazone (30mg/kg) was administered daily (group Pio and CG+Pio) by gavage for 14 days.

Results: In the EPS group, all rats developed parietal and visceral peritoneal inflammation and fibrosis. The treatment group (CG+Pio) showed significant reduction in parietal and visceral peritoneal inflammation and submesothelial thickness as well as fibrosis. Rats with EPS receiving Pioglitazone demonstrated a similar visceral peritoneal inflammation score with the control groups (C, Pio). pro-MMP-2 was importantly suppressed by pioglitazone treatment in EPS. Pioglitazone itself (Pio) induced pro-MMP-2 suppression. Both EPS and treatment groups had a significant higher MMP-2 activity than the controls. Pro-MMP-9 level in the EPS group was higher when compared with the controls (C and P). Pioglitazone treatment showed a significant pro-MMP-9 suppression. When compared with controls (C, Pio), TIMP-1 level was higher in the CG group. Pioglitazone treatment significantly suppressed TIMP-1 level. However the TIMP-1 activity in the treatment group was still higher than the control groups (C, Pio). The EPS model resulted with an induction of TGF- β level and Pioglitazone treatment provided a significant reduction of TGF- β level.

Conclusion:

Considering statistically significant decrease in peritoneal inflammation, submesothelial thickness as well as fibrosis, along with decreased pro-MMP-2, pro-MMP-9, TIMP-1 and TGF- β activation in pioglitazone treated group, it seems pioglitazone, via MMP and TGF- β inhibition, may lessen accumulation of peritoneal ECM and fibrosis to some extent in an EPS model.

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

Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör- γ Agonisti Pioglitazon'un Enkapsüle Peritoneal Fibrozis Modelinde Periton Membranı Üzerine Olan Etkileri

Giriş ve Amaç

Periton diyalizi (PD), 30 yılı aşkındır son dönem böbrek yetmezliğinde etkili bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. PD temel olarak, sıvı içeren iki kompartmanı ayıran bir zar (periton zarı) aracılığıyla su ve solütlerin taşınmasına dayanır. Bu iki kompartman, peritoneal kapillerlerdeki kan ve periton boşluğundaki diyaliz solüsyonundan oluşmaktadır. Periton membranından küçük molekül ağırlıklı solütlerin taşınması, etkili peritoneal yüzey alanına bağlıdır. Zaman içinde periton zarında gelişen değişiklikler, periton diyalizinin sonlandırılmasına neden olmaktadır. Periton diyaliz etkinliğinin azalmasının en önemli nedenlerinden biri ise periton fibrozisidir (1).

Periton zarı, periton boşluğunu sınırlayan seröz bir zardır. Üzerinde ince ve kaygan bir sıvı tabakasının eşlik ettiği, mikrovillüsler içeren mezotel hücrelerinden oluşmaktadır. Mezotelyal dokunun altında; kılcal damarlar, lenfatikler, kollajen ve diğer lifleri içeren matriksten oluşan interstisyum bulunur (2).

Periton zarında sık görülen işlevsel yetersizliklerden birisi de ultrafiltrasyon yetersizliğidir. Bu durum, PD tedavisinin süresi ve periton zarında meydana gelen yapısal değişikliklerle ilişkilidir. Uzun süreli PD tedavisi gören hastaların periton zarı yapısındaki değişiklikler, bu hasta grubunda ciddi komplikasyonlardan birisi sayılan enkapsüle periton skleroza (EPS) ilerleyebilir. Uzun süreli PD hastalarının periton zarı bulguları; mezotel altı dokuda ciddi kalınlaşma, mezotel hücre kaybı ve vaskülopati ile seyreden yeniden damarlanmayı içermektedir (3). Bu hastalarda; periton zarı solüt taşınmasındaki değişiklikler, sıklıkla damarsal alandaki artış ve vaskülopati sonucudur. Peritonun yeniden damarlanması ve vaskülopati, su ve solüt taşınmanın düzenlenmesinde baskın rol oynamaktadır. Damarsal değişikliklerin fibrozis gelişimi üzerindeki rolleri ise henüz iyi bilinmemektedir.

Yakın zamanda, sıçanlara periton içi klorheksidin glukonat (KH) uygulaması ile periton sklerozu modeli oluşturulmuştur (4). Sıçan peritonuna transforming growth factor-beta (TGF- β) gen transferi yapıldığında, periton zarının kalınlaştığı, mezotel altı sıkı dokuda yangısal hücrelerin ve kılcalların arttığı gösterilmiştir (5). Yine aynı fibrosiz modeline, anti-VEGF

(vascular endothelial growth factor) antikorunun, damarlanma ve makrofaj göçünü azaltarak interstisyel fibrozisi azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle, kronik yangı ve periton fibrozisi patogeneğinde makrofaj infiltrasyonu ve yeniden damarlanmanın asıl rol oynadığı düşünülebilir.

TGF- β , hücre dışı matriks oluşumunda önemli işleve sahip olup, hücre dışı protein sentezinde artışa, yıkımında ise azalmaya neden olur. TGF- β , doku tamirinde hayati öneme sahiptir. Ancak aşırı etkinlik durumunda fibrozise neden olmaktadır (6).

Periton fibrozisi deneysel modellerini ve EPS hastalarını inceleyen yakın zamanlı çalışmalarda, periton sıvısı ve dokusunda matriks metaloproteinaz (MMP) aktivitesinde, özellikle de MMP-2 ve MMP-9'da artış olduğu gösterilmiştir (7). MMP-2, başlıca fibroblastlardan, epitelial hücrelerden ve makrofajlardan sentezlenirken, MMP-9 nötrofillerden salgılanmaktadır (8,9). MMP'ler hücre dışı matriks yıkımını sağlayan nötral endopeptidazlar olup hücrel çoğalmanın yangısal ve fibrotik fazlarında rol oynarlar. MMP'ler substrat özelliklerine göre sınıflandırılırlar. MMP-1 (interstisyel 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 etkinliği; dokularda enzime özgül ve doğal olan doku matriks protein inhibitörleri (TIMP'ler) ve α -makroglobülin tarafından baskılanır. 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 (10).

MMP'lerin ve TIMP'lerin periton mezotelyal hücreler, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından üretildikleri gösterilmiştir. Peritonda MMP-2, MMP-3 ve MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 aktivitesinin belirgin olduğu gösterilmiş 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 (11, 12).

MMP baskılayıcıları ile periton fibrozisinde iyileşmenin olduğunu gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Ağızdan anti-diyabetik ilaçların yeni bir sınıfı sayılan insülin duyarlılığını artıran tiazolidinedionlar (TZD), nükleer reseptör hormon ailesinin üyesi olan peroksizom proliferatör aktive reseptör- γ (PPAR- γ)'yı uyarmaktadırlar (13). TZD'lar, PPAR- γ için agonistik etki göstermekte ve PPAR- γ 'ya bağlanarak özgül genlerin sentezlenmesini

düzenlemektedirler. Birçok dokuda metabolik yolların düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar. Yağ asidi oksidasyonu, adiposit diferansiasyonu, insülin duyarlılığı, metabolik sendrom ve benzeri durumlarda yangısal yanıtta görev alırlar. Deneysel çalışmalarda, PPAR'ın üç izoformunu (α , β , γ) etkinleştiren ligandların yangı baskılayıcı etkileri gösterilmiştir.

In vitro çalışmalarda, PPAR-aktivatörlerinin hücre dışı matriks yapımını, TGF- β , tip 1 kollajen, fibronektin ve MMP-9 başta olmak üzere MMP sentezini de baskıladığı ortaya konmuştur. PPAR etkinliğinin, plazminojen aktivatör inhibitör (PAI-1) ve TGF- β sentezini baskılayarak glomeruler hücre artışını azalttığı gösterilmiştir (14). Bir TZD olan Pioglitazonun tübüler albumin geri emilimini artırarak proteinüriyi azalttığı, fibrosis öncüsü monosit kemoatraktan protein-1 ve TGF- β 1 yapımını baskıladığı gösterilmiştir (15). Yine TZD ailesinden Troglitazonun, streptozosin ilişkili diyabet modelinde, hücre dışı matriks protein (fibronektin ve tip 4 kollajen) ve TGF- β 1 yapımını azalttığı gösterilmiştir (16). Peritonda ya da periton fibrosis modelinde PPAR- γ ve agonistlerinin işlevi iyi bilinmemesine karşın, insan periton mezotel hücrelerinde PPAR- γ bulunduğu ve agonistlerinin TGF- β 1 yapımını azalttığı gösterilmiştir (17, 18).

PPAR- γ agonistlerinin, kimyasal peritonit (EPS) modelindeki etkisiyle ilgili literatürde yakın zamanda yayımlanan tek bir çalışma vardır. Bu çalışmada, roziglitazonun EPS'de fibrozisi azalttığı gösterilirken, bunu hangi yolak üzerinden gerçekleştirdiği araştırılmamıştır (19).

Önceki bulgulardan da yola çıkarak, PPAR- γ agonistlerinin, kimyasal peritonit (EPS) modelinde, MMP-2, MMP-9 ve TGF- β 'yi baskılayarak fibrozisi azaltabileceği hipotezi ortaya konulabilir.

Amaç:

Klorheksidin ile oluşturulan periton fibrozisinde pioglitazonun fibrosis üzerine olan etkisini belirlemek ve periton dokusundaki MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 ve TGF- β yapımı üzerine etkisini araştırmaktır.

Genel Bilgiler

Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY):

Kronik 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.

KBY, K/DOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) kılavuzuna göre beş evreye ayrılmaktadır (20).

Evre 1: GFH normal veya artmış, ancak mikroalbüminüri/proteinüri, hematüri veya böbrekte histolojik değişiklikler gibi böbrek hasarlanmasının bazı kanıtları vardır. (≥ 90 ml/dk/1,73 m²)

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) (< 15 ml/dk/1,73 m²)

Evre 5 KBY hastalarının yaşamlarını sürdürülebilmeleri için böbrek yerine koyma tedavisine gereksinimleri vardır (21).

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 (22).

Diyaliz tedavisi hemodiyaliz ve periton diyalizi tedavisi olarak iki şekilde yapılabilir.

Periton Diyalizi Tedavisi:

PD temel olarak, sıvı içeren iki kompartmanı ayıran bir zar (periton zarı) aracılığıyla su ve solütlerin taşınmasına dayanır. Bu iki kompartman, peritoneal kapillerlerdeki kan ve periton boşluğundaki diyaliz solüsyonudur. Diyalizer olarak işlev gören periton zarının farklı yapıda delikleri, heterojen ve yarı geçirgen özellikleri vardır.

Periton Diyaliz Yeterliliği:

Periton diyalizinde amaç birikmiş atık ürünlerin ve aşırı sıvının uzaklaştırılmasıdır. Bu nedenle diyaliz yeterliliğinde bu iki göstergenin değerlendirilmesi gerekmektedir. Periton membranından küçük molekül ağırlıklı solütlerin taşınması, etkili periton yüzey alanına bağlıdır (23). Klinik ve deneysel çalışmalar, etkili periton yüzey alanı artışıyla, küçük molekül ağırlıklı solütlerin geçişlerinin arttığını ve sonuçta ultrafiltrasyon (UF) yetersizliği geliştiğini göstermiştir (24). UF yetmezliği, PD tedavisinin birinci yılında %3, altıncı yıl sonunda ise %31 sıklığında görülmektedir. UF yetmezliği sonucunda; yüksek glukoz yoğunluklu solüsyonlar kullanılmasına karşın kuru ağırlığa ve normal kan basıncına ulaşılamaz, ciddi tuz kısıtlamasına karşın semptomlar devam eder, hemodiyaliz tedavisine geçiş gerekebilir (25).

Periton Zarı:

Periton; barsakları ve diğer iç organları örten visseral periton ve karın duvarını örten pariyetal 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. Pariyetal periton ise lomber, interkostal ve epigastrik arterlerden kanlanır ve venöz dönüşü inferior vena kavaya olur. Toplam periton kan akımı yaklaşık 50- 100 ml/dk'dır. Periton ve periton boşluğunun ana lenfatik drenajı, diyafragmatik peritonda bulunan açık ağızlar, visseral ve pariyetal peritondaki lenfatik kanallar yoluyla olmaktadır.

Periton zarı, mikrovillsuları 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 (26).

Periton Fibrozisi

Periton fibrozisi, düzenli periton diyalizi tedavisi gören hastaların periton biyopsilerinde görülen yaygın bir bulgudur (27). Periton membranında oluşan değişiklikler özellikle mezotel altında görülen yangı, fibrozis ve damarlanmaya neden olmaktadır. Bunun sonucunda ultrafiltrasyon yetmezliği gelişebilir (28).

Periton diyaliz süresinin uzaması ile pariyetal peritondaki submezotelyal dokuda artış olduğu gözlenmiştir. Üremi tek başına submezotelyal kalınlaşma ile ilişkili olabilirken uzun süredir periton diyalizi tedavisi alan hastalarda bu kalınlaşma daha belirgin olup periton membranının yetmezliğinden dolayı kateterin çıkartılmasına neden olmaktadır (29). Periton diyalizi ile ilişkili olan periton fibrozisinde, periton parlaklık kaybından EPS'ye kadar olan çeşitli bulgular görülür. Sklerozan enkapsüle peritonit (EPS); periton diyalizinin sonlandırılması, kilo kaybı, ultrafiltrasyon yetmezliği, barsak tıkanması hatta ölüme kadar giden durumlara yol açabilir (30).

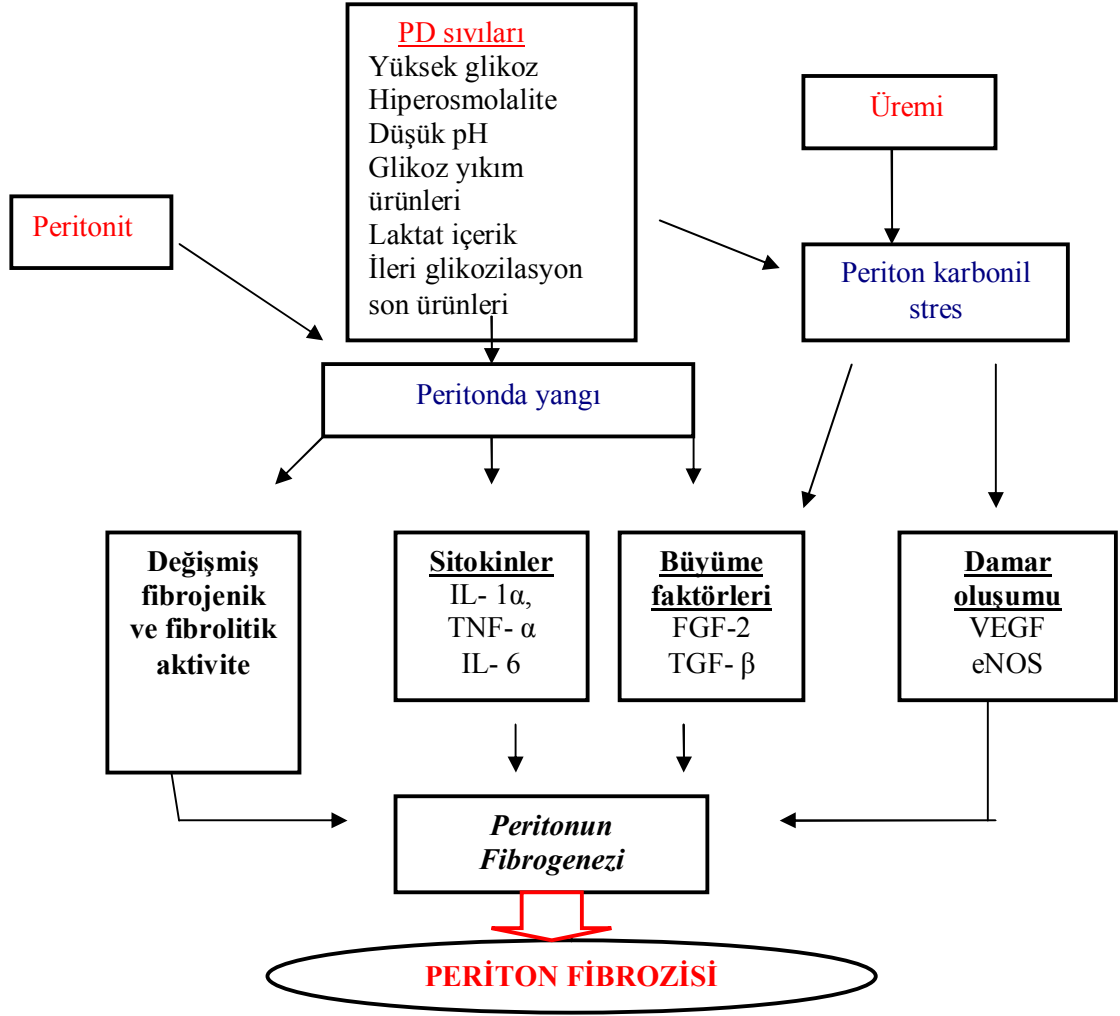
PD tedavisi alanlarda, visseral ve pariyetal periton fibrozisi ve UF yetmezliğinin en önemli nedenleri:

1. Biyouyumsuz ve hipertonic solüsyonlara sürekli maruziyet,
2. Peritonit atakları,
3. Üremi ve süregen yangıdır.

Üremi; karbonil stres ve ileri glikozilasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumunu hızlandırırken, peritonit atakları ve periton diyaliz solüsyonları peritondaki yangıyı uyarırlar. Tüm bu bileşenler, periton mezotel hücreleri, diğer periton hücreleri (makrofaj, fibroblast, monosit ve nötrofiller) ve onlardan salınan çeşitli sitokinler aracılığıyla periton fibrozisine neden olur (Şekil-1).

Periton fibrozisi gelişiminde ana mekanizma peritonun mezotelyal hücrelerinin ve fibroblastlarının aşırı üretimi sonucu hücre dışı matriks birikimidir (31). Periton fibrozisi gelişiminde, mezotel hücrelerinin fibroblastlara dönüştüğü ve çoğaldığı bilinmektedir (32). MMP-2'nin mezotel hücrelerindeki bu dönüşümünde rol oynadığı gösterilmiştir (33).

Fibrozisin başlaması ve devam etmesinde kollajenazlar ve baskılayıcıları rol almaktadır (34).



Şekil 1. Periton fibrozisi oluşumu

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

Matriks Metalloproteinazlar ve Doku Baskılayıcıları:

Matriks metalloproteinazlar; embriyonik gelişim, apoptoz, kemik uzaması, üreme, damar oluşumu (anjyogenez), dokunun yeniden yapılanması gibi birçok fizyopatolojik süreçte rol alan bir enzim grubudur. Bu etkileri ile, multipl skleroz, sistemik lupus eritematozus, artrit, periodontit, glomerulonefrit, ateroskleroz, doku ülserleri, kanser hücreleri invazyonu ve yayılımı, EPS gibi bir çok hastalığın patogenezinde rol oynarlar. MMP'ler çinko ve kalsiyum bağımlı enzimlerdir. Çok sayıda MMP tanımlanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Matriks Metalloproteinazlar

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	

MMP'ler, pre-pro-enzim şeklinde sentezlenir ve sessiz (latent) proenzim olarak salınırlar. N-terminal peptidin proteolitik ayrılması ile etkinleşirler. MMP'lerin aktiviteleri belli basamaklarda düzenlenmektedir.

MMP etkinliği; 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 yönündeysse hücre dışı matriks yıkımı olurken, eğer oran TIMP'ler lehine ise yıkım durdurulur ve matriks depolanması olur (35). TIMP'ler MMP'lere sıkıca bağlanırlar ve kompleks oluştururlar (36).

MMP'ler hücresele 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 (36). 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. Aterosklerozis, renal fibrozis, pulmoner fibrozis ve hepatik fibrozis gibi farklı fibrozis süreçlerinde MMP-2, MMP-9 düzeylerinde artış gösterilmiştir (37).

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 saptanmıştır (38). Yapılan farklı çalışmalarda peritonun fibrozisinde ve peritonitler sırasında periton sıvısında MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 artışı gösterilmiştir (39,40). EPS modellerinde periton doku ve diyalizat sıvısında özellikle MMP-2 aktivitesinin artışı saptanmıştır (41).

Transforming growth factor (TGF)- β :

TGF- β , hücre dışı matriks birikimine neden olarak birçok klinik hastalığın fibrozis işleminde merkezi rol oynamaktadır. TGF- β , fibronektin, kollajenler ve proteoglikanları uyararak hücre dışı matriks üretimini artırıp, yıkımını azaltan başlıca sitokindir. Doku tamirinde yaşamsal öneme sahipken, aşırı etkinleşmesinde durumunda fibrozise neden olur. Bir sıçan modelinde, adenovirus aracılı gen nakli ile TGF- β aşırı yapımına yol açıldığında,

periton fibrozisi oluşturulmuştur. Aynı modelde, TGF- β ilişkili VEGF yapımı artışına bağlı yeniden damarlanma da gözlenmiştir (42). Bu nedenle, TGF- β 'nin periton fibrozisinde anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir (43). Periton fibrozisini önlemeye yönelik tedavi stratejilerinde, TGF- β 'nin baskılanmasının hedeflenmesi gerekmektedir (44).

Pioglitazon:

Ağızdan diyabetik ilaçların yeni bir sınıfı sayılan tiazolidinedionlar (TZD), çekirdek reseptör hormon ailesinin üyesi olan *peroksizom proliferatör aktive reseptör- γ* (PPAR- γ)'yı uyararak insülin duyarlılığını artırmaktadırlar (45). TZD'lar, PPAR- γ için agonistik etki göstermekte ve PPAR- γ 'ya bağlanarak özgül genlerin sentezlenmesini düzenlemektedirler. PPAR reseptörlerinin, monosit, makrofaj, mikroglia, T-lenfosit, B-lenfosit, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerde bulunduğu bilinmektedir. İnsan endotel hücre apoptozunu uyarırlar, IL-8 ve MCP-1 baskılaması ile endotel enflamasyonu baskırlar. Damar düz kasında (media/intima) MMP-2, MMP-9, PDGF'yi baskılayarak düz kas hücre çoğalması ve göçünü engellerler. Monosit ve makrofajlarda MMP-9, TNF, IL-1 β , IL-6, NF-kB'yı, T hücrelerinde IFN- γ , IL-2, TNF α 'yi baskırlarken, B hücrelerinde apoptozu engellerler (46).

Tiazolidinedionların, insülin direncini düzeltmek dışındaki etkileri de araştırılmıştır. Örneğin, deneysel çalışmalarda, pioglitazonun böbrek proksimal tübül epitel hücrelerinden albumin geri emilimini artırarak proteinüriyi azalttığı gösterilmiştir (47). Mekanizmasının tübül epitel hücrelerinde, kemoatraktan protein-1 ve TGF-1 gibi enflamasyon ve fibrozis öncüsü sitokinlerde baskılanma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Troglitazonun streptozisin ile oluşturulmuş DM modelinde hücre dışı matriks yapımını (TGF- β 1'i baskılayarak) azalttığı gösterilmiştir (48). PPAR etkinliğinin, plazminojen aktivatör inhibitör (PAI-1) ve TGF sentezini baskılayarak glomeruler hücre artışını azalttığı da gösterilmiştir (49). In vitro çalışmalarda PPAR-aktivatörlerinin hücre dışı matriks yapımını, tip 1 kollajen, fibronektin sentezini baskıladığı ortaya konmuştur (50).

Bozkurt ve ark.ları PPAR- γ agonisti Roziglitazonun, periton fibrozisini azalttığını göstermelerine rağmen bunun hangi yolak üzerinden olduğunu göstermemişlerdir (19). İnsan periton mezotel hücrelerinde (PMH), PPAR reseptörlerinin varlığı ve agonistlerinin TGF- β 1 yapımını azalttığı gösterilmiştir (51). Sıçan PMH'de, PPAR- γ agonistleri ile, yangı ve fibrozis öncüsü CD 40 olumlu lenfosit ve ICAM-1'de baskılanma olduğu gösterilmiştir.

Bu bulgulardan yola çıkarak, PPAR- γ agonistlerinin özellikle MMP-2, MMP-9 ve TGF- β yolağını baskılayarak, kimyasal peritonit modelinde fibrozisi azaltabileceği hipotezi ortaya konulabilir.

Gereç ve Yöntemler

Çalışmada 32 adet, yetişkin dişi, ağırlıkları 180-200 gram arasında değişen, Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar DEÜTF Deney Hayvanları Birimindeki en uygun koşullarda barındırıldı ve standart yem ve su ile beslendi.

Çalışma öncesinde Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alındı.

Deneysel Model:

Çalışmaya alınan sıçanlar çalışma öncesi tartıldı ve her grupta sekiz sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Çalışma süresi 14 gün olarak belirlendi. Periton fibrozisi oluşturmak için Io ve arkadaşlarının modeli (52); %0,1'lik klorheksidin (KH) (Drogan İlaçları AŞ. Balgat, Ankara) + %15 etanol + serum fizyolojik karışımı aseptik olarak hazırlanıp kullanıldı. Pioglitazon etken maddesi (Sanovel, Türkiye) 30mg/kg dozunda sıçanların içme sularına eklendi.

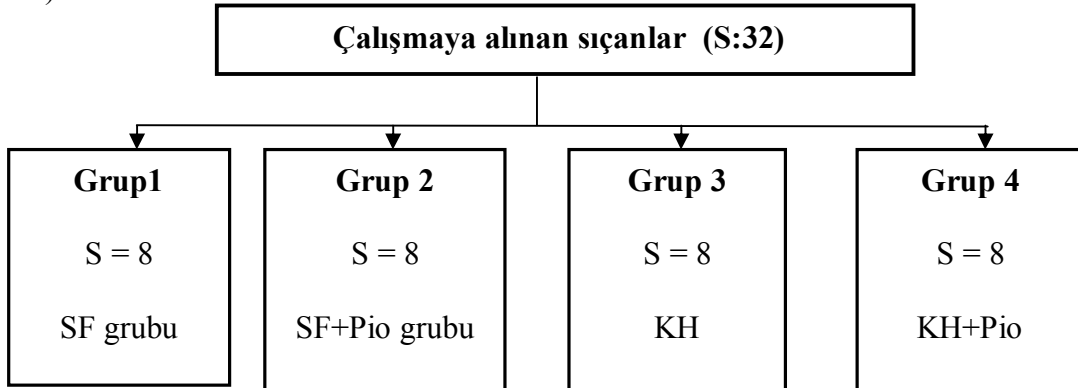
Grup 1 (SF grubu): Karın içine %0,9 luk serum fizyolojik (3 ml/gün), 14 gün boyunca uygulandı.

Grup 2 (SF+Pioglitazon grubu): Karın içine %0,9 luk serum fizyolojik (3 ml/gün), içme suyuna ise 30 mg/g pioglitazon, 14 gün boyunca uygulandı

Grup 3 (KH grubu): Kimyasal peritonit oluşturmak için karın içine %0,1 lik klorheksidin + %15'lik etanol + serum fizyolojik karışımından 3 ml/gün,14 gün boyunca uygulandı.

Grup 4 (KH+Pioglitazon grubu): Karın içine %0,1'lik klorheksidin + %15'lik etanol + serum fizyolojik karışımı (3 ml), içme sularına da pioglitazon (30 mg/kg/G), 14 gün boyunca uygulandı .

(Şekil 2).



Şekil 2. Çalışma tasarımı

Sıçanlar 15. günde eter anestezisi altında sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrasında pariyetal periton örnekleri için karın ön duvarından ve visseral periton örnekleri için de karaciğer sağ lobundan dokular alındı. Örnekler iki parçaya ayrıldı; patolojik değerlendirme için karın duvarı peritonundan ve karaciğerden alınan örnekler %10'luk formaldehit içine 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.

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

Histopatolojik Değerlendirme:

Pariyetal 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 µm'lik kesitler alındı. Alınan kesitler parafine gömüldü ve Hematoksilen & Eosin (HE) ve modifiye Von Gieson (VG) boyası ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopisi ile karaciğerden alınan visseral peritonun ve karın duvarı pariyetal peritonun miktarı, fibrozis ve yangı, pariyetal peritonda damar çoğalması ve pariyetal peritonda fibrozis alan yüzdesi açısından araştırıldı.

Enflamasyon; HE ve VG boyları ile yarı nicel olarak skorlandı; **0:** yok, **1:** hafif şiddette, **2:** orta şiddette, **3:** şiddetli.

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

Seçilmiş bölgelerden dijital görüntüleme ile ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) visseral ve pariyetal periton için ölçümler X 40 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 VG 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) (53).

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 elektronik ortamda depolandı. Karaciğer visseral peritonundan ve karın duvarı peritonundan alınan her kesit için, periton kalınlığını belirlemede 10 ölçüm alındı. Bu ölçümlerin ortalaması istatistiksel analizde kullanıldı.

Biyokimyasal İncelemeler:

Biyokimyasal analizler için doku örneklerinin hazırlanması

Dondurulmuş parietal periton doku örnekleri (100 mg) sıvı nitrojen altında ezilip toz haline getirildi. Daha sonra örnekler 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve ağırlıklarının 10 katı hacminde (1 ml) ekstraksiyon ortamı (50 mM Tris-HCl pH 7.4, %1 NP-40, %0.25 deoksi kolat, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) ilave edildi ve buz üzerinde 10 saniye sonikatör (Sonics&Materials Inc, Danbury Connecticut USA) ile homojenize edildi. Homojenatlar 10 000 xg de 15 dak. 4 °C'de santrifüj edildikten sonra çökteller alındı ve analiz süresine kadar -80 °C de saklandı.

Protein Analizi

Protein düzeyleri BCA (Bicinchoninic Acid) yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla Sigma marka (Kat No: BCA-1, B9643) protein analiz kiti kullanıldı. Yöntemin temeli, alkali ortamda Cu^{+2} -protein kompleksi oluşumuna ve Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesine dayanmaktadır. Örneklerde var olan protein miktarı indirgenmiş Cu^{+1} miktarı ile doğru orantılıdır. Oluşan renk oluşumu 562 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Referans).

Analiz aşamaları

- Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA) kullanıldı. (250, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/ml}$) olmak üzere farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.
- Standart ve örneklerden 25'er μl kuyucuklara eklendi.

- Tüm kuyucuklara 200 µl BCA ve % 4'lük Bakır-2-Sülfat Pentahidrat solüsyonlarının sırasıyla 1:50 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan analiz solüsyonundan ilave edildi.
- 37 °C de 30 dak. inkübasyona bırakıldı ve 562 nm'de multiplak okuyucuda (BioTek, Synergy) okundu.
- Standart kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak protein miktarları hesaplandı.

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 mavisi ile boyanması sonucunda koyu mavi zemin üzerinde beyaz bantlar olarak ortaya çıkar.

Jelatin Zimografi Yönteminin Uygulama Aşamaları

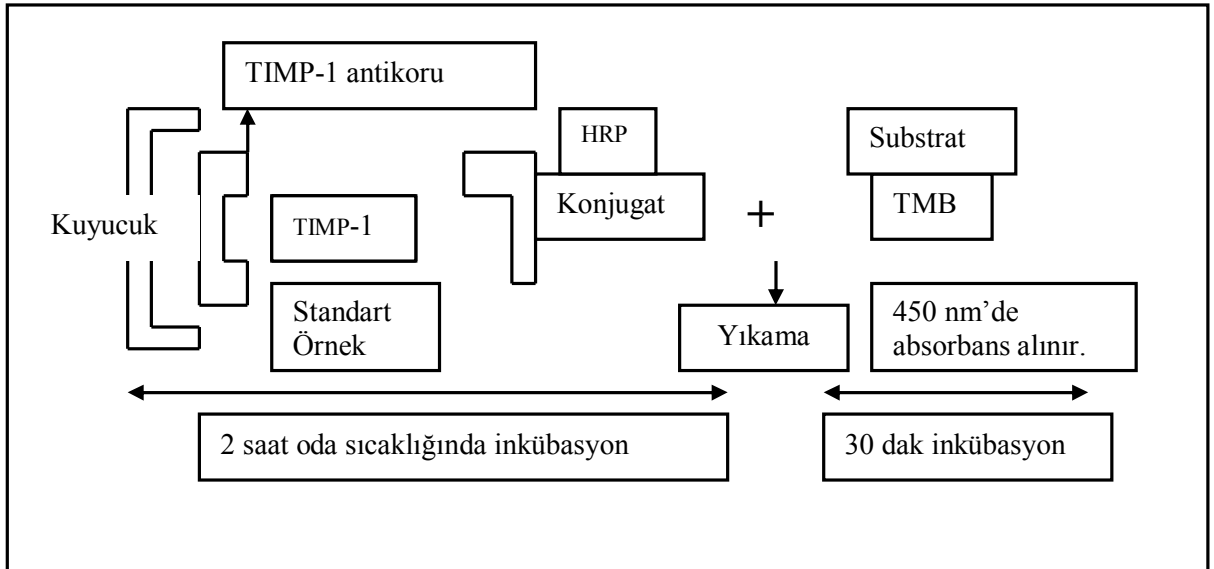
Doku örneklerinden elde edilen homojenatlarda mevcut jelatinazların aktivitelerini ölçmek için %1 Tip I jelatin ve %10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) içeren % 7.5'lük poliakrilamid jeller kullanıldı:

- Ayırıcı jel % 7.5 oranında hazırlandı 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.
- Jelleşme gerçekleştikten sonra % 4 oranındaki paketleyici 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.
- Hazırlanan jeller, elektroforez tankına yerleştirildi.
- Eşit hacimde doku homojenatları, indirgeyici-olmayan örnek tamponu ile karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara 75 µg protein olacak şekilde uygun hacimde yüklendi.
- Sisteme "Elektroforez Yürütme Tamponu" eklendi.
- Elektroforez +4°C soğuk oda koşullarında gerçekleştirildi. Karşılıklı iki jel için 125 sabit voltaj, 40-60 mA/jel 4.5 saat uygulanarak elektroforez yapıldı.

- Elektroforezden sonra jellerden SDS’i uzaklaştırmak için jeller iki kez 15’şer dakika % 2.5’lik Triton X-100 “Renatürasyon Tamponu” ile yıkandı.
- Daha sonra jeller, enzimlerin (MMP-2 ve MMP-9) jel içindeki substratlarını (jelatin) tüketmelerini sağlamak için 18 saat 37 °C’de “Aktivasyon Tamponu” ile inkübe edildi.
- 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.
- Jellerin, jel dökümantasyon sistemi ile (UVP Marka Jel Dökümantasyon Sistemi) densitometrik analizi yapıldı. Her bir bantın (pro ve aktif) alan/mm² ve optik densitesi (OD) saptandı. Substrat jelin lizis miktarı “AlanxOD/μg protein” formülünden yararlanılarak hesaplandı.
- Pozitif kontrol olarak MMP-2 ve MMP-9 un hem pro hem de aktif formlarını içeren ticari olarak üretilmiş MMP marker (Chemicon) kullanıldı.

TIMP-1 Analizi

Hazırlanan doku homojenatları, ELISA temelli Ray Bio[®] marka (Kat No: ELR-TIMP-1-001) kit ile yapıldı. Bu ölçüm yöntemi, TIMP-1 düzeylerinin kantitatif olarak ölçümü için hazırlanmış “sandwich tip enzim immünoassay” tekniğine dayanır (Şekil 3).



Şekil 3 : TIMP-1 için ELISA ile ölçüm yöntem şeması

Sonuçlar mg protein başına ng TIMP-1 olarak ifade edildi.

TIMP-2 Analizi

Hazırlanan doku homojenatlarında TIMP-2 analizi, ELISA temelli Ray Bio® marka (Kat No: ELH-TIMP2-001) kit ile yapıldı. Bu ölçüm yöntemi, TIMP-2 düzeylerinin kantitatif olarak ölçümü için hazırlanmış “sandwich tip enzim immünoassay” tekniğine dayanır. Analiz aşamaları TIMP-1 ile benzerdir.

MMP-2 Analizi

Hazırlanan doku homojenatlarında MMP-2 analizi, ELISA temelli Amersham® marka (Kat No: RPN2631) kit ile yapıldı. Bu yöntemde tek bir peoteolitik tepkime vasıtasıyla aktif MMP-2 tarafından aktiveleştirilen QuickZyme™ saptama enzimi ile, pro MMP-2 tarafından etkinleşen p-aminofenilmerkürük asetat (APMA) kullanılmaktadır. Sonuçlar mg protein başına ng MMP-2, pro-MMP-2 olarak ifade edildi

MMP-9 Analizi

Hazırlanan doku homojenatlarında MMP-9 analizi, ELISA temelli Amersham® marka (Kat No: RPN2634) kit ile yapıldı. Bu yöntemde tek bir peoteolitik tepkime vasıtasıyla aktif MMP-9 tarafından aktiveleştirilen QuickZyme™ saptama enzimi ile, pro MMP-9 tarafından etkinleşen p-aminofenilmerkürük asetat (APMA) kullanılmaktadır. Analiz aşaması MMP-2 ile benzerdir.

TGF-β Analizi

Hazırlanan doku homojenatlarında TGF-β analizi, ELISA temelli R&D Systems® marka (Kat No: RPN2634) kit ile yapıldı. Bu ölçüm yöntemi, TGF-β düzeylerinin kantitatif olarak ölçümü için hazırlanmış “sandwich tip enzim immünoassay” tekniğine dayanır. Hazırlandıktan sonra kuyucuklara pipetle konulan standart, kontrol ve örnek dokularda bulunan TGF-β1’ler, antikoru ile bağlanır. Bağlanmamış bölüm yıkanarak uzaklaştırıldıktan sonra, solüsyonlara substrat madde eklenir ve renk absorbansına (450 nm’de) göre TGF-β1 yoğunlukları ölçülür.

İstatistiksel Değerlendirme:

İstatistiksel değerlendirmede, gruplardaki örnek sayısı 30'un altında olduğu için parametrik olmayan yöntemler kullanıldı.

Gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığı, anlamlı farkın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için iki grup ortalamasının karşılaştırmasında kullanılan Mann-Whitney-U Testi kullanıldı. P değerinin $< 0,05$ olması istatistiksel anlamlılık olarak kabul edildi. Değerler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi.

Bulgular

Morfolojik Değişiklikler

1.Pariyetal Periton Sonuçları:

KH ile oluşturulan periton fibrozisi modelinde, pariyetal peritonda enflamasyon, periton zarında kalınlık artışı ve fibrozis yüzdesinde anlamlı bir artma saptandı ($p<0.001$). Hafif damarsal yangı da oluşturulmasına karşın, kontrol grubu (SF) ile karşılaştırıldığında anlamlılık kazanmamıştır ($p=0,14$). Pioglitazon tedavisi uygulanan grupta KH grubu ile karşılaştırıldığında, enflamasyon skorunda ($p=0,01$), periton zarı kalınlığı ve fibrozis yüzdesinde anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir ($p<0,001$). Damarsal yangı skorlaması Pioglitazon tedavisi alan grupta hafif olarak tanımlanırken, KH grubunda orta şiddette idi ancak iki grup arasındaki fark anlamlı değildi. Fibrozis oluşturulmadan pioglitazon uygulanan sıçanlarda, periton zarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Resim 1, 2 ve 3’de kontrol gruplarının periton kalınlığı sırasıyla H&E, VG boyası ve seçilmiş alan görüntüleri bulunmaktadır. Her iki grupta da periton zarı ince görünmektedir. Resim 4, 5 ve 6’da ise KH ve KH+Pioglitazon gruplarının aynı boyalarla görüntüleri verilmiştir. Tedavi grubunda periton kalınlığının daha az olduğu, mezotel altı dokunun daha ince olduğu görülmektedir. Tüm grupların toplu sonuçları tablo 2’de bir arada verilmiştir.

Tablo 2 . Pariyetal periton patolojik değerlendirme sonuçları

PARIYETAL PERİTON GRUPLAR	FİBROTİK ALAN YÜZDESİ (μm)	PARIYETAL PERİTON KALINLIĞI (μm)	YANGI SKORLAMASI	DAMARLANMA SKORLANMASI
I-SF	0,84 \pm 0,54	7,01 \pm 3,89	0	0
II-SF+Pioglitazon	0,77 \pm 0,15	12,3 \pm 37 ^a	0	0
III-KH	10,76 \pm 8,95 ^{a,b,d}	156,85 \pm 29,13 ^{a,b,d}	1,5 \pm 0,53 ^{a,b,d}	0,5 \pm 0,92
IV-KH-Pioglitazon	4,77 \pm 0,91 ^{a,b,c}	56,00 \pm 35,33 ^{a,b,c}	0,62 \pm 0,51 ^{a,b,c}	0

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerleri olarak verilmiştir.

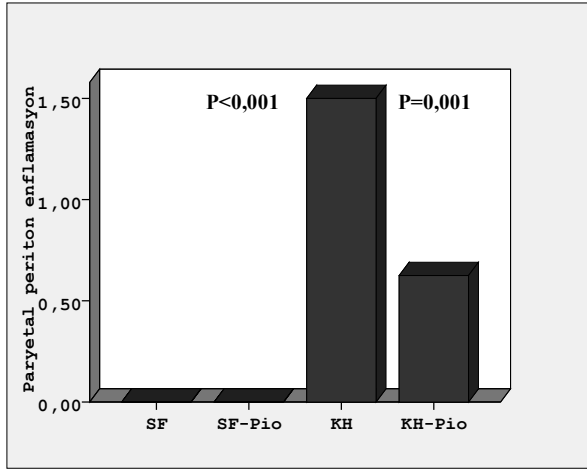
^a $p < 0.05$, SF grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p < 0.05$, SF+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

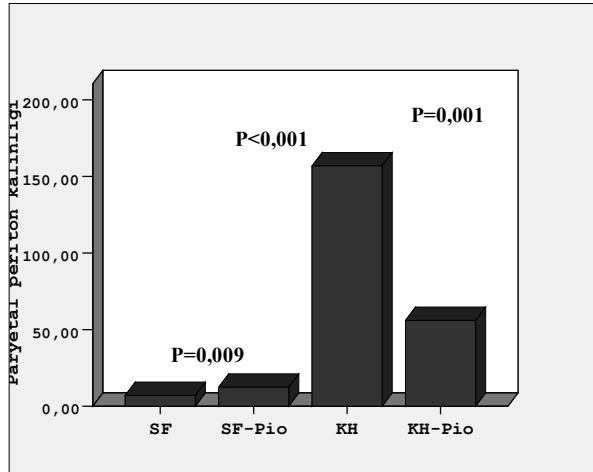
^c $p < 0.05$, KH grubu ile karşılaştırıldığında

^d $p < 0.05$, KH+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

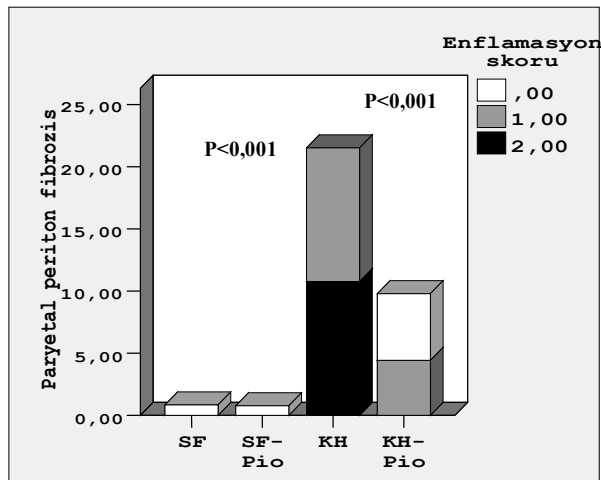
Grafik 1. Pariyetal periton enflamasyon skoru



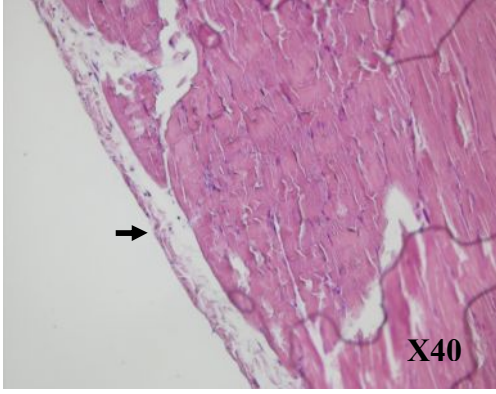
Grafik 2. Pariyetal periton kalınlığı



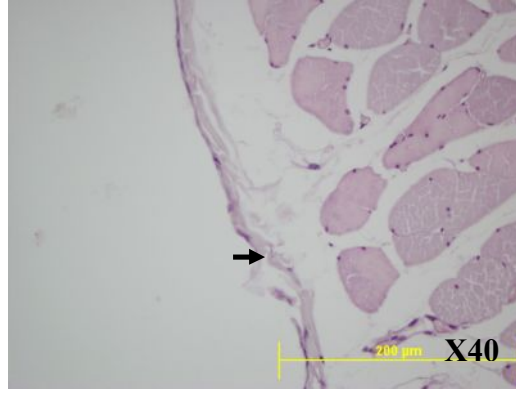
Grafik 3. Pariyetal periton fibrozis yüzdesi-enflamasyon skoru



Resim 1. Pariyetal periton (H&E), kontrol grupları

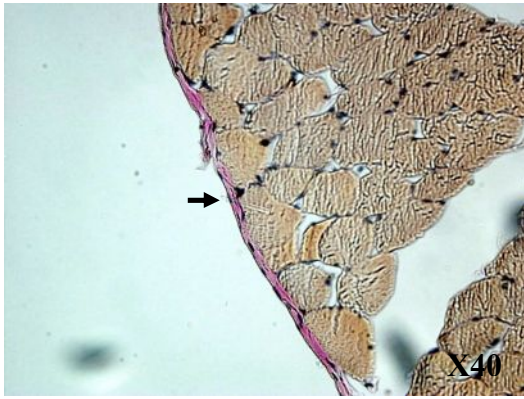


SF grubu

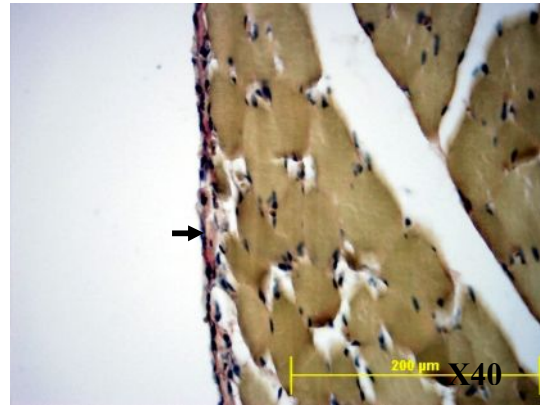


SF+Pioglitazon grubu

Resim 2. Pariyetal periton, VG, kontrol grupları

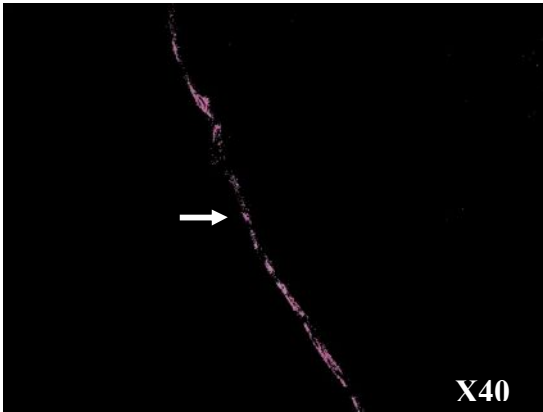


SF grubu

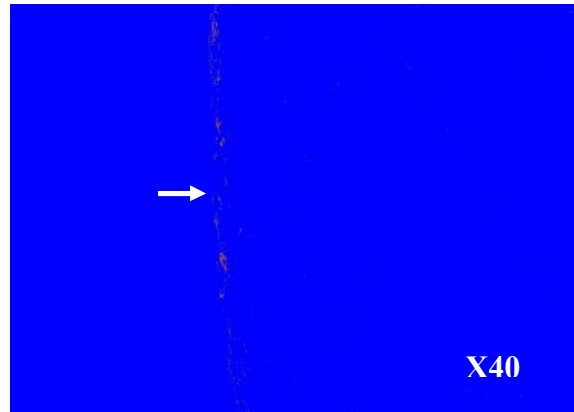


SF+Pioglitazon

Resim 3. Pariyetal periton, VG-seçilmiş, kontrol grupları

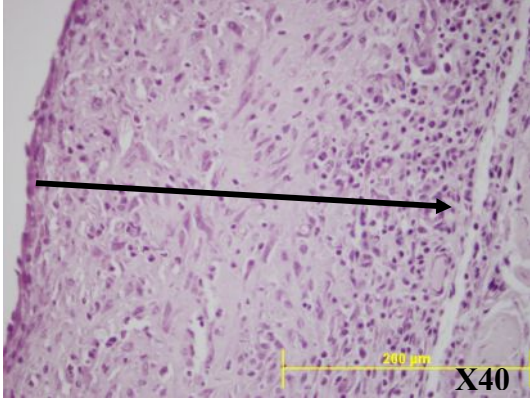


SF grubu

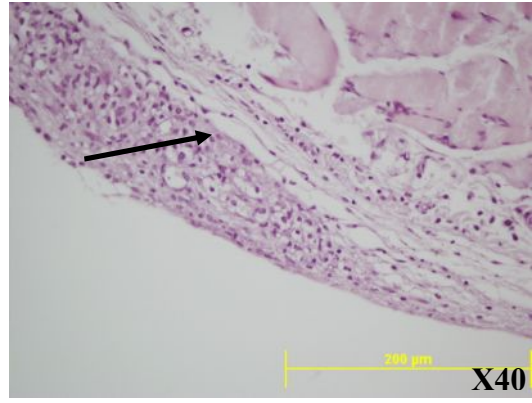


SF+Pioglitazon

Resim 4. Pariyetal periton (H&E), KH ve KH+Pioglitazon grupları

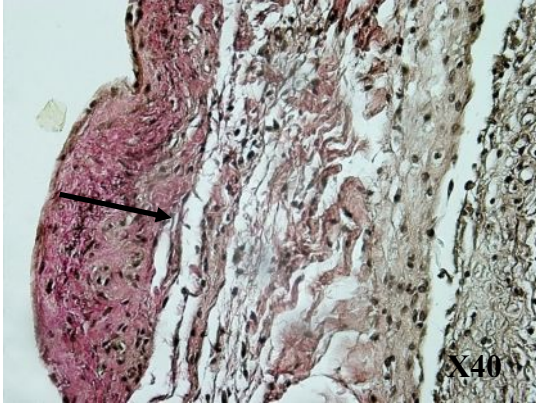


KH grubu

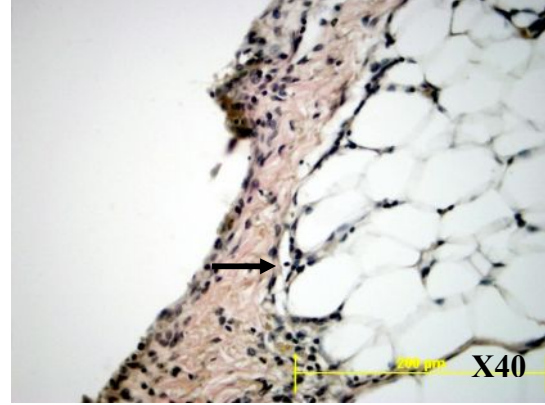


KH+Pio grubu

Resim 5. Pariyetal periton, VG, KH ve KH+Pioglitazon grupları

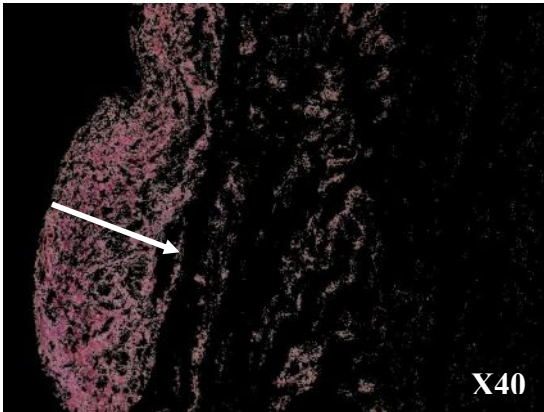


KH grubu

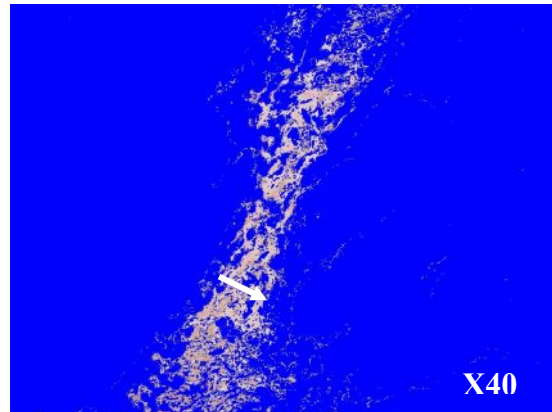


KH+Pio grubu

Resim 6. Pariyetal periton, VG-seçilmiş, KH ve KH+Pioglitazon grupları



KH grubu



KH+Pio

Visseral Periton Sonuçları:

KH ile oluşturulan periton fibrozisi modelinde, visseral peritonda enflamasyon, periton zarında kalınlık artışı ve fibrozis yüzdesinde anlamlı bir artma saptandı ($p<0.001$). Hafif damarsal yangı da oluşturulmasına karşın, kontrol grubu (SF) ile karşılaştırıldığında anlamlılık kazanmamıştır ($p=0,44$). Pioglitazon tedavisi uygulanan grupta KH grubu ile karşılaştırıldığında, enflamasyon skorunda, periton zarı kalınlığı ve fibrozis yüzdesinde anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir ($p<0.001$). Damarsal yangı skorlaması KH grubunda hafif olarak sınıflanırken, Pioglitazon tedavi grubunda hiç gözlenmemiştir. Ancak iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Fibrozis oluşturulmadan pioglitazon uygulanan sıçanlarda, periton zarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Tüm grupların toplu sonuçları tablo 3’de bir arada verilmiştir.

Tablo 3. Visseral periton patolojik değerlendirme sonuçları

VİSERAL PERİTON GRUPLAR	FİBROTİK ALAN YÜZDESİ (μm)	VİSERAL PERİTON KALINLIĞI (μm)	YANGI SKORLAMASI	DAMARLANMA SKORLANMASI
I-SF	0,29 \pm 0,18	8,13 \pm 5,05	0	0
II-SF+Pioglitazon	0,24 \pm 0,05	27,13 \pm 9,41	0	0
III-KH	10,11 \pm 4,43 ^{a,b,d}	182,1 \pm 54,83 ^{a,b,d}	1,87 \pm 0,35 ^{a,b,d}	0,37 \pm 0,74
IV-KH-Pioglitazon	0,77 \pm 0,28 ^{a,b,c}	50,62 \pm 19,97 ^{a,b,c}	0	0

Sonuçlar ortalama \pm standart sapma değerleri olarak verilmiştir.

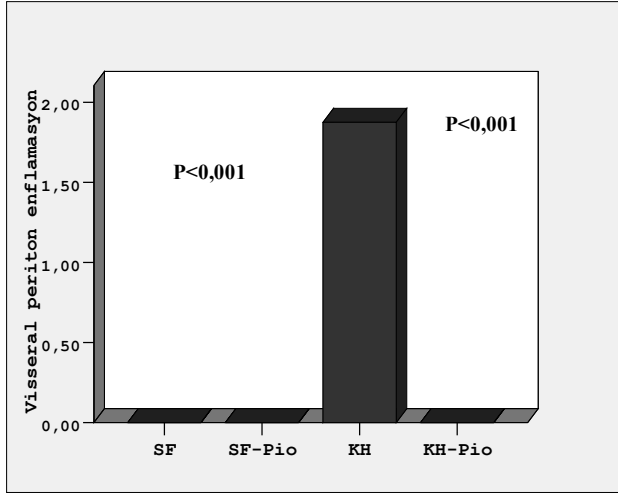
^a $p < 0.05$, SF grubu ile karşılaştırıldığında

^b $p < 0.05$, SF+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

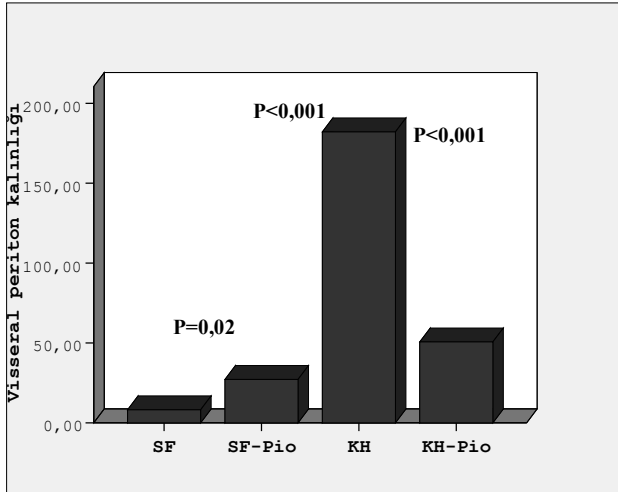
^c $p < 0.05$, KH grubu ile karşılaştırıldığında

^d $p < 0.05$, KH+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

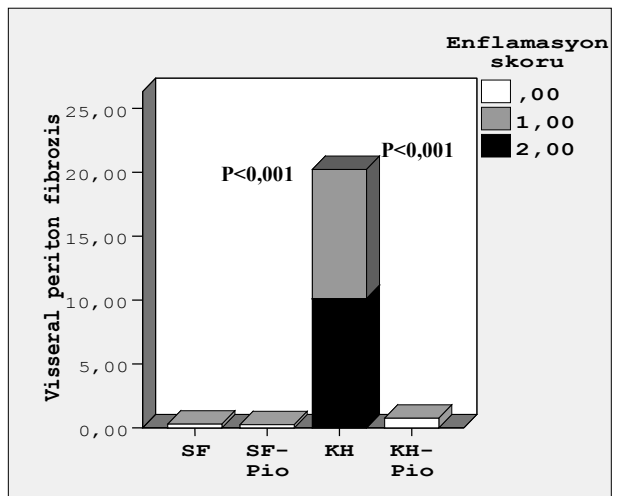
Grafik 4. Visseral periton enflamasyon skoru



Grafik 5. Visseral periton kalınlığı



Grafik 6. Visseral periton fibrozis ve enflamasyon



Biyokimyasal Bulgular

Zimografi sonuçları (MMP-2, MMP-9)

Jelatin zimografi ile yapılan pro ve aktif MMP-2 ve MMP-9 ölçümleri sonucunda hiçbir dokuda MMP-9 etkinliği gösterilememiştir. Tüm grupların MMP-2 ve pro-MMP-2 etkinlik ölçümleri tablo 4'te bir arada verilmiştir.

Tablo 4. MMP-2 ve pro-MMP-2 etkinliği

GRUPLAR	MMP-2	Pro-MMP-2
I-SF	7,79±1,48	149,37±28,33
II-SF+Pioglitazon	3,95±1,53	78,47± 19,27 ^{a,c}
III-KH	92,43± 58,63 ^{a,b}	199,60±37,02 ^{a,b,d}
IV-KH-Pioglitazon	51,79±52,24 ^{a,b}	103,31±41,44 ^{a,c}

^a p <0.05, SF grubu ile karşılaştırıldığında

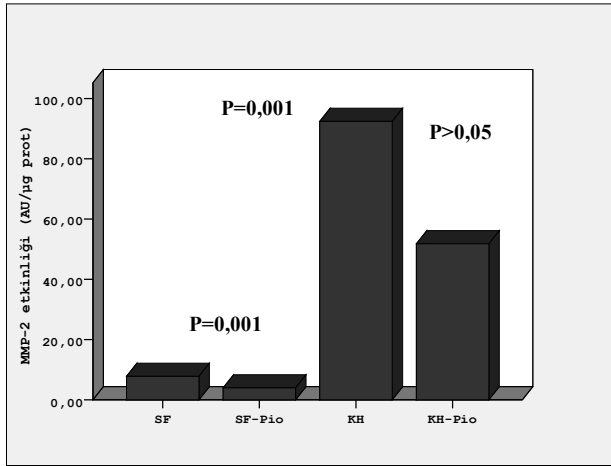
^b p <0.05, SF+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

^c p <0.05, KH grubu ile karşılaştırıldığında

^d p <0.05, KH+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

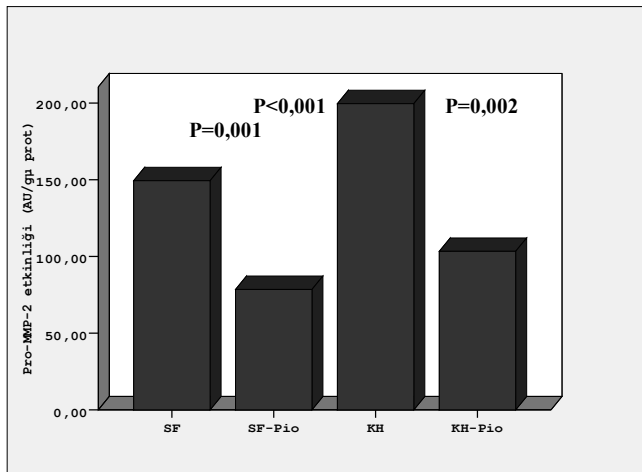
Kontrol grupları (SF ve SF+Pio) ile karşılaştırıldığında, KH grubunda MMP-2 etkinliğinde anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0.001$). KH grubuna Pioglitazon tedavisi verildiğinde MMP-2 de anlamlı olmasa da bir baskılanma görülmektedir ($p=0,17$). Bu gruptaki MMP-2 etkinliği yüksek olsa da, SF grubu ile karşılaştırıldığında aradaki farkın anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p=0.09$). SF grubu ile karşılaştırıldığında, SF+Pioglitazon grubunda MMP-2 de anlamlı bir baskılanma olduğu gösterilmiştir ($P=0,001$).

Grafik 7. MMP-2 etkinliği (Zimografi)



Pro-MMP 2 etkinlik sonuçlarına bakıldığında; kontrol grupları (SF ve SF+Pio) ile karşılaştırıldığında, KH grubunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. KH grubuna Pioglitazon tedavisi verildiğinde pro-MMP-2’de anlamlı bir baskılanma saptanmıştır ($p=0,002$). SF grubu ile karşılaştırıldığında, SF+Pioglitazon grubunda pro-MMP-2’e anlamlı bir baskılanma olduğu gösterilmiştir ($P=0,001$).

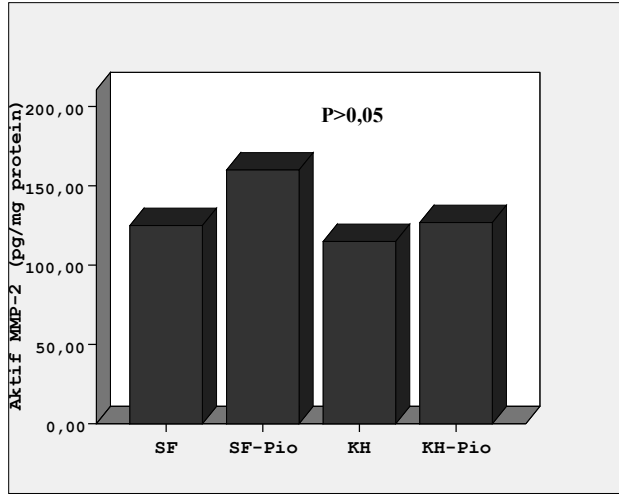
Grafik 8. Pro-MMP-2 etkinliği (Zimografi)



MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 Etkinlik Ölçümleri (ELİSA)

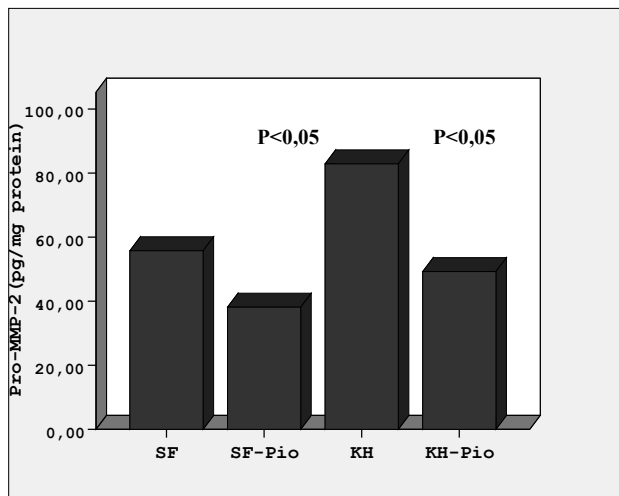
Kontrol grupları (SF ve SF+Pio) ile karşılaştırıldığında, KH grubunda aktif MMP-2 etkinliğinde anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p>0.05$).

Grafik 9. Aktif MMP-2 etkinliği (ELİSA)



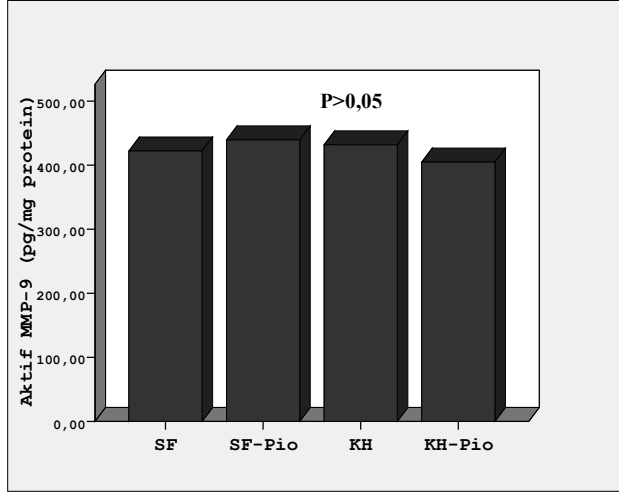
Kontrol grupları (SF ve SF+Pio) ile karşılaştırıldığında, KH grubunda Pro-MMP-2 etkinliğinde anlamlı bir artış saptanmıştır ($P<0.05$). KH grubuna pioglitazon tedavisi verildiğinde pro-MMP-2 etkinliğinde anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir ($p<0.05$). Pioglitazon tedavisi alan gruptaki pro-MMP-2 etkinliği, kontrol grupları ile benzer bulunmuştur ($p>0.05$).

Grafik 10. Pro-MMP-2 etkinliği (ELİSA)



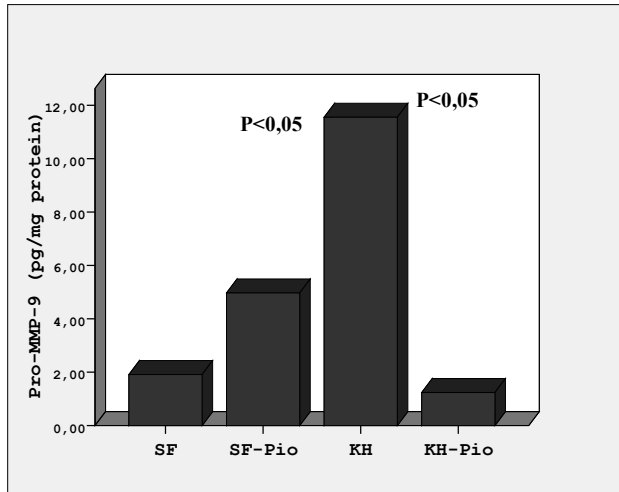
Kontrol grupları (SF ve SF+Pio) ile karşılaştırıldığında, KH grubunda aktif MMP-9 etkinliğinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Grafik 11. Aktif MMP-9 etkinliği (ELİSA)



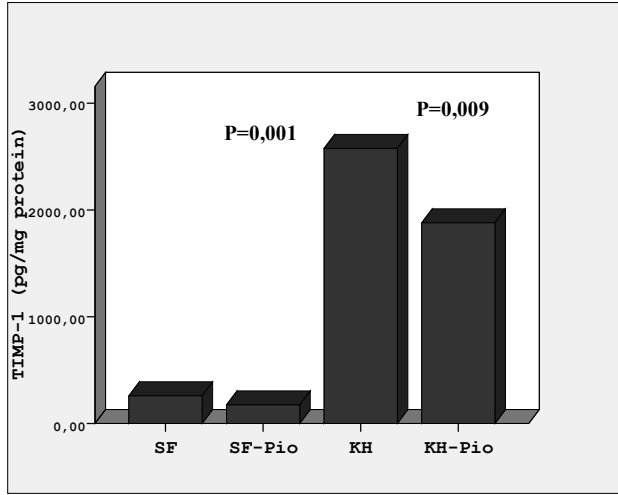
Kontrol grupları (SF ve SF+Pio) ile karşılaştırıldığında, KH grubunda Pro-MMP-9 etkinliğinde anlamlı bir artış saptanmıştır ($P<0.05$). KH grubuna pioglitazon tedavisi verildiğinde pro-MMP-9 etkinliğinde anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir ($p<0.05$). Pioglitazon tedavisi alan gruptaki pro-MMP-9 etkinliği, kontrol grupları ile benzer bulunmuştur ($p>0.05$).

Grafik 12. Pro- MMP-9 etkinliği (ELİSA)



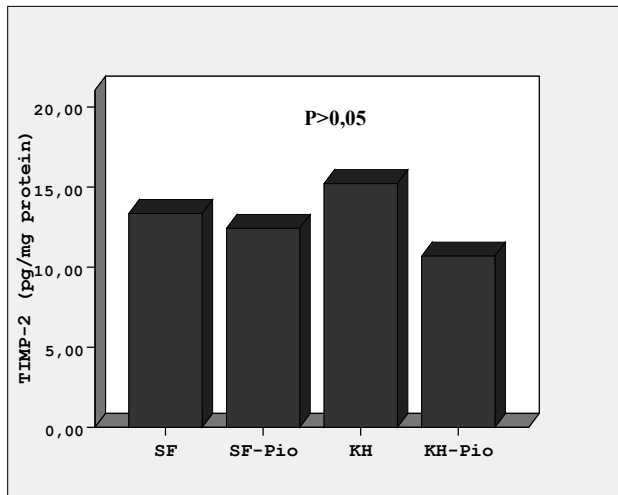
Kontrol grupları (SF ve SF+Pio) ile karşılaştırıldığında, KH grubunda TIMP-1 etkinliğinde anlamlı bir artış saptanmıştır (P=0.001). KH grubuna pioglitazon tedavisi verildiğinde TIMP-1 etkinliğinde anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir (p=0.009). Pioglitazon tedavisi alan gruptaki TIMP-1 etkinliği, kontrol gruplarından yüksek bulunmuştur (p<0.05).

Grafik 13. TIMP-1 etkinliği (ELİSA)



Kontrol grupları (SF ve SF+Pio) ile karşılaştırıldığında, KH grubunda TIMP-2 etkinliğinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P>0.05). KH grubuna pioglitazon tedavisi verildiğinde TIMP-2 etkinliğinde baskılanma gözlenmesine karşın bu sonuç anlamlı bulunmamıştır (p=0.07).

Grafik 14. TIMP-2 etkinliği (ELİSA)



Tüm grupların MMP-2, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 toplu sonuçları tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Pro-MMP-2, MMP-2, pro-MMP-9, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 (ELİSA)

GRUPLAR	Pro-MMP-2 (pg/mg protein)	Aktif MMP-2 (pg/mg protein)	Pro-MMP-9 (pg/mg protein)	Aktif MMP-9 (pg/mg protein)	TIMP-1	TIMP-2
I-SF	55,75±17,10 ^c	124,94±13,91	1,91±2,64 ^c	422,12±51,53	259,07±139,36 ^{c,d}	13,35±4,89
II-SF+Pio	38,13±32,02 ^c	159,92± 60,76	4,96±14,05 ^c	439,48±91,87	174,23±42,98 ^{c,d}	12,41±9,11
III-KH	82,88±32,02 ^{a,b,d}	114,88±15,06	11,55±13,87 ^{a,b,d}	431,78±35,18	2576,69±331,62 ^{a,b,d}	15,21±6,14
IV-KH+Pio	49,25±38,47 ^c	126,78±9,32	1,23±2,30 ^c	404,87±58,81	1879,57±497,48 ^{a,b,c}	10,68±2,49

Sonuçlar ortalama ± standart sapma değerleri olarak verilmiştir.

^a p <0.05, SF grubu ile karşılaştırıldığında

^b p <0.05, SF+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

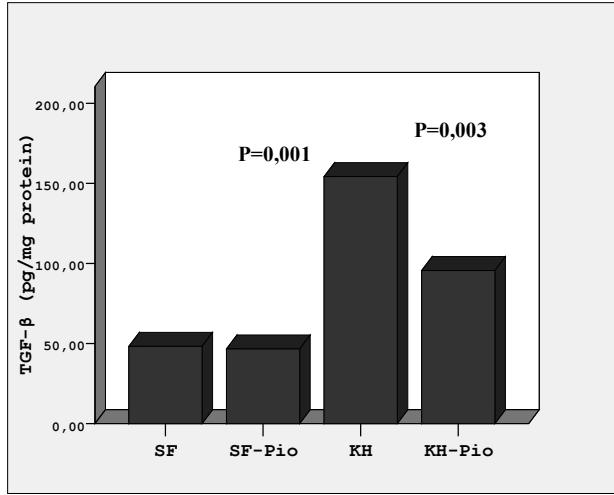
^c p <0.05, KH grubu ile karşılaştırıldığında

^d p <0.05, KH+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

TGF-β Etkinlik Ölçümü (ELİSA)

Kontrol grupları (SF ve SF+Pio) ile karşılaştırıldığında, KH grubunda TGF-β etkinliğinde anlamlı bir artış saptanmıştır (P=0.001). KH grubuna pioglitazon tedavisi verildiğinde TGF-β etkinliğinde anlamlı bir baskılanma gözlenmiştir (p=0.009). Pioglitazon tedavisi alan gruptaki TGF-β etkinliği, kontrol gruplarından yüksek bulunmuştur (p=0.003).

Grafik 15. TGF- β etkinliği (ELİSA)



Tüm grupların TGF-β toplu sonuçları tablo 5’de verilmiştir

Tablo 6. TGF- β (ELİSA)

GRUPLAR	TGF-β (pg/mg protein)
I-SF	48,23±22,93 ^{c,d}
II-SF+Pioglitazon	46,61±25,97 ^{c,d}
III-KH	154,2±31,71 ^{a,b,d}
IV-KH-Pioglitazon	95,57±36,30 ^{a,b,c}

Sonuçlar ortalama ± standart sapma değerleri olarak verilmiştir.

^a p <0.05, SF grubu ile karşılaştırıldığında

^b p <0.05, SF+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

^c p <0.05, KH grubu ile karşılaştırıldığında

^d p <0.05, KH+Pio grubu ile karşılaştırıldığında

Tartışma

Periton membranında uzun süreli PD sonucu gelişen değişiklikler, mezotel hücre azalması/kaybı ile kollajen dejenerasyonu ve vaskülopati ilişkili interstisiyel fibrozis sonucu mezotel altı sıkı dokunun artmasının sonucudur. Bu çalışmayla EPS modelinde, pioglitazonun fibrozis oluşumunda görev alan MMP-2, MMP-9, TGF- β ve enflamasyon ile fibrozis üzerine olan etkilerini aydınlattık.

Çalışmamızda, EPS modelinde eşzamanlı pioglitazon uygulamasıyla, mezotel altı sıkı doku artışının ve enflamasyonun baskılanarak periton kalınlaşmasının azaldığı gözlenmiştir.

PD hastalarında periton fibrozisinden sorumlu tutulan birden fazla etmen vardır. Bunlardan en önemlisi yüksek yoğunlukta glukoz ve glukoz yıkım ürünü (GYÜ) içeren biyouyumsuz PD sıvılarıdır. GYÜ'leri; metil-glioksal, glioksal ve 3-deoksiglukozon olup, bunlar PD sıvılarının ısı sterilizasyonu sırasında ortaya çıkmaktadırlar. PD işlemi sırasında, periton boşluğunda ileri glukoz son ürünleri (AGE) de oluşturulmaktadır. Bunlarla birlikte, üreminin kendisi de artmış yangı ve oksidan hasar ile skleroz nedeni olarak kabul edilmektedir. SDBY hastalarının, sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında daha kalın bir periton membranına sahip olmaları bunu desteklemektedir (54). Peritonitler sırasında ortaya çıkan yangı öncüsü sitokinler, süregen yangının şiddetini artırarak, mezotel hücreleri ve damar hücrelerinde fibrozis ve damarlanma öncüsü mediatör yapımını artırarak fibrozisi hızlandırabilir.

KH, PD'de klinik olarak kullanılmayan, periton fibrozis patogenezinin çalışıldığı deneysel EPS modellerinde özgül olmayan fibrozis oluşturucu kimyasal bir maddedir. Sıçanlara periton içine KH enjeksiyonları ile oluşturulmuş kimyasal EPS modeli, interstisiyel fibrozis ve peritoneal kalınlaşmayı değerlendirebilmemiz bakımından uygun bir modeldir.

Fibrozis patogenezinde birçok yolak görev alırken, önemlilerinden birisi MMP'lerdir. Yakın zamanlı fare modellerinde, MMP'lerden özellikle jelatinazların (MMP-2, MMP-9) akciğer fibrozisi, karaciğer fibrozisi, kronik böbrek hastalıklarında ve miyokard enfarktüsünde rol oynadığı gösterilmiştir (52). Periton fibrozisinde de MMP'lerin rolü iyi bilinmektedir. KH hayvan modellerinde ve EPS'li PD hastalarında, periton zarı ve PD sıvısındaki MMP-2, MMP-9 etkinliklerinin arttığı gösterilmiştir (7). Jelatinazların, periton sklerozu oluşturulmuş sıçanlarda EPS oluşumu ve ilerlemesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. EPS sıçan modellerinde, mezotel hücre kaybı, yeniden damarlanma, interstisiyel fibrozis ve periton kalınlaşması gelişmeden önceki ilk bulgunun belirgin hücrel infiltrasyon ve interstisiyel

ödem olduğu gösterilmiştir (55). İnfiltrate olan hücreler (makrofajlar), fibroblast büyüme faktörünü uyararak fibrozisi hızlandırabilir (56). Yangıda rol oynayan hücreler, diğer hücrelere göç sırasında hücre dışı matriks yıkımını sağlayan MMP'leri salgırlar. MMP baskılanması, bu hücrelerin bazal membranları aşarak periferik kılcalların hücre içlerine geçmelerini engeller. MMP etkinleşmesi ve EPS oluşumu için, öncesinde bunu tetikleyen basit bir sklerozun bulunması gereklidir. Tetiklenen MMP'lerle yapım yıkım dengesinin yapım lehine bozulması sonucu skleroz ilerleyici bir özellik kazanabilir. Bu nedenle MMP baskılamaya yönelik tedavi seçenekleri gündeme gelmiştir. MMP baskılayıcılarının tümör metastazını, yeniden damarlanmayı ve enflamasyonu azalttığı birçok çalışma ile gösterilmiştir (57).

TGF- β 'nın, kollajen gen yazılımı için promotor olduğu bilinmektedir. Tip 1 ve tip 3 kollajen yapımını uyarır. Periton fibrozisi gelişimde, VEGF'in TGF- β ile doğrudan ilişkisi henüz net değildir. Bu nedenle, TGF- β ve VEGF sentezleyen hücrelerin yeniden damarlanmayı tetikleyerek, fibrozis patogeneğinde ortak rol oynadığı düşünülmektedir.

Diyabetik hastalarda insülin direncini azaltması dışındaki diğer metabolik olumlu etkileri nedeniyle yaygın olarak tercih edilen bir tedavi seçeneği olan tiazolidinedionların MMP ve TGF- β baskılayıcı etkileri bilinmektedir (46, 51). Tiazolidinedionlardan Roziglitazonun MMP-2 sentezini baskılayarak SGC-7901 gastrik kanser hücre invazyonunu engellediği gösterilmiştir (58). Ciglitazonun kanser hücrelerinde, pro-MM-2'yi baskılayarak damarlanma ve kanser invazyonunu azalttığı bildirilmiştir (59). Troglitazonun, THP-1 makrofajlarında MMP-2 ve MMP-9 gen yazılımını baskıladığı, bunun da yangı ve fibrozis patogeneğinde önemli olduğu vurgulanmıştır (60). Pioglitazonun ise Tip 2 Diyabet deneysel modelinde, MMP-2 etkinliğini baskılayıp, NO düzeyini artırarak preglomerular arteriyoldeki yeniden yapılanmayı (remodeling) düzelttiği gösterilmiştir (61). Tiazolidinedionların MMP baskılayıcı etkileri ile ortaya konulan enflamasyon ve fibrozis azaltıcı etkilerini gösteren çalışmaların örnekleri artırılabilir. Bizim çalışmamızda da pioglitazon, aktif-MMP-2, pro-MMP-2 ve pro-MMP-9 etkinliğini baskılayarak KH ile oluşturulmuş EPS modelinde bu yolak üzerinden hem pariyetal periton hem de visseral periton zarında enflamasyonu baskılamıştır. Tedavi grubunda periton fibrozis yüzdesinde ve periton duvar kalınlığında anlamlı bir azalma saptandı. MMP-9'un inhibitörü olan TIMP-1'in de tedavi ile baskılandığını saptadık. TIMP'ler, aktive olan MMP'lere yanıt olarak artmaktadır. MMP baskılanması durumunda TIMP'ler de azalmaktadır. Bu sonuç, pro-MMP-9'un baskılanması ile uyumlu gözlenmiştir.

Ancak MMP-2'yi baskılayan TIMP-2'de benzer bir sonuca varamadık. Bu durum, TIMP-2 ölçüm tekniği ile ilgili sorunlar sonucu olabilir.

TGF- β , fibrozis patogeneğinde görev alan en önemli sitokin olarak bilinirken, tiazolidinedionların TGF- β etkinliğini azaltarak fibrozis oluşumunu engelledikleri birçok çalışma ile gösterilmiştir (62, 63). Tek taraflı üreter bağlaması ile oluşturulan böbrek fibrozisi modelinde troglitazon, TGF- β inhibisyonu yoluyla böbrek fibrozisini azaltmıştır (64). İnsan periton mezotel hücrelerinde de PPAR- γ 'nın bulunduğu ve agonistlerinin TGF- β 1 yapımını azalttığı gösterilmesine karşın (17, 18), tiazolidinedionların periton fibrozisindeki etkileri ise yakın zamanlı yayınlanan tek bir çalışmada araştırılmıştır (19). KH ile oluşturulmuş EPS modelinde roziglitazonun uygulandığı bu çalışmada, roziglitazon uygulanan grupta PET değerlendirmesi sonucu UF'da iyileşme saptanırken, üre klirensinde fark saptanmamıştır. Roziglitazon model ile eşzamanlı verildiğinde, periton duvarı kalınlaşması ve damarlanmasında anlamlı bir azalma sağlarken, enflamasyon skorunda iyileşme gözlenmemiştir. Model oluşturulduktan sonra 2 hafta boyunca uygulanan tedavi ile enflamasyon, periton duvar kalınlığı ve damarlanmada herhangi bir iyileşme bulunmamıştır. Eşzamanlı Roziglitazon tedavisinin periton işlevinde ve fibroziste düzelmeye sağladığı gösterilmesine karşın, roziglitazonun bu etkiyi hangi yolak üzerinden gerçekleştirdiği araştırılmamıştır. Bu etkinin, TGF- β /Smad yolağı üzerinden olabileceği hipotezi vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak Pioglitazon fibrozisle birlikte enflamasyon skorunu da düzeltirken, bu etkinin jelatinazlar ve TGF- β yolağının baskılanması ile gerçekleştiği gösterilmiştir.

EPS modelinde, TGF- β düzeyinin kontrol gruplarına göre oldukça arttığı saptanmıştır. Pioglitazon tedavisinin TGF- β 'yi baskılaması, patolojik bulgularda anlamlı iyileşme sağlarken, tedavi alan grupta TGF- β düzeyleri yine de kontrol gruplarına göre yüksek saptandı. Daha yüksek doz pioglitazonun TGF- β 'yi daha fazla baskılayarak periton yapısında daha fazla iyileşme sağlayıp sağlamayacağı ileri bir araştırma konusu olabilir.

Sonuç olarak; PPAR- γ agonisti pioglitazon, deneysel EPS modelinde jelatinazları ve TGF- β 'yi baskılayarak, periton zarı enflamasyonunu, periton duvar kalınlığını ve fibrozisi iyileştirmiştir.

Bu bulgular ışığında, diyabetik nefropati ilişkili SDBY hasta sayısının hızla arttığı göz önünde bulundurulduğunda, bu hasta grubunda uygulanabilecek tiazolidinedion tedavisinin kalp damar sağlığı yanı sıra, periton işlevi üzerine de olumlu etkisinin olabileceği

düşünülebilir. Risk altındaki hastalarda, pioglitazonun bu potansiyel etkisi, nadir ancak ölümcül bir komplikasyon olan EPS'nin önlenmesi ya da tedavisinde göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR:

1. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55: 341–356
2. Twardowski ZJ. Pathophysiology of peritoneal transport. *Contrib Nephrol* 2006; 150: 13-19
3. Williams JD, Craig KJ, Topley N et al. Peritoneal Biopsy Study Group. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 470–479
4. Mishima Y, Miyazaki M, Kohno S et al. Enhanced expression of heat shock protein 47 in rat model of peritoneal fibrosis. *Kidney Int* 2003; 23: 14–22
5. Margetts PJ, Kolb M, Galt T et al. Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2029–2039
6. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB. TGF-beta: regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 1992; 41: 557–559
7. Hirahara I, Umeyama K, Asano Y et al. Increase of matrix metalloproteinase-2 in dialysate of rat sclerosing encapsulating peritoneal model. *Nephrology* 2002; 7: 161–169
8. Ro Y, Hamada C, Tomino Y et al. Early diagnosis of CAPD peritonitis using a test kit for detection of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *Perit Dial Int* 2004; 24: 90–91
9. Hirahara I, Ogawa Y, Kusano E et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 causes peritoneal injury during peritoneal dialysis in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1732–1741
10. Watson SA, Tierney G. Matrix metalloproteinase inhibitors: a review. *BioDrugs* 1998, 9(4): 325-335.
11. Martin J, Yung S, Robson RL et al. Production and regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* Vol 20; 524-533.
12. Takahara T, Funaki J, Nakayama Y et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1995; 21 (3): 787-95.

13. Cho N, Momose Y. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as insulin sensitizers: from the discovery to recent progress. *Curr Top Med Chem.* 2008; 8(17):1483-507.
14. Ma LJ, Marcantoni C, Linton MF et al. Peroxisomeproliferator-activated receptor-gamma agonisttroglitazone protects against nondiabetic glomerulosclerosis in rats. *Kidney Int* 2001; 59: 1899–1910.
15. Zafiriou S, Stanners SR, Polhill TS et al Pioglitazone increases renal tubular cell albumin uptake but limits proinflammatory and fibrotic responses. *Kidney Int.* 2004; 65: 1647–53.
16. Isshiki K, Haneda M, Koya D et al. Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes* 2000; 49: 1022–32
17. Peng Y, Liu H, Liu F et al. Troglitazone inhibits synthesis of transforming growth factor- β 1 and reduces matrix production in human peritoneal mesothelial cells. *Nephrology* 2006; 11(6):516-23
18. Zhang YF, Yang X, Zhang YJ et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is expressed by rat peritoneal mesothelial cells: its potential role in peritoneal cavity local defense. *Am J Nephrol.* 2006; 26(6): 602-11.
19. Bozkurt D, Taşkın H, Sezak. et al. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor agonist, improves peritoneal alterations resulting from an encapsulated peritoneal sclerosis model. *Advances in Peritoneal Dialysis* 24: 32-38, 2008.
20. Levey AS, Coresh J, Balk E et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003; 15:139(2):137-47.
21. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; 67(6):2089-100.
22. Misra M. Basic mechanisms governing solute and fluid transport in hemodialysis *Hemodial Int.* 2008; 12 Suppl 2:S25-8. Review.
23. Heimbürger O, Waniewski J, Werynski A et al. Periton transport in CAPD patients with permanent loss of ultrafiltration capacity. *Kidney Int* 1990; 38 (39) :495-506.

24. Flessner MF. The effect of fibrosis on periton transport. *Contrib Nephrol* 2006; 150: 174-80.
25. Zhe XW, Tian XK, Shan YS et al. Evaluating peritoneal fluid transport in continuous peritoneal dialysis patients: a practical approach. *Nephron Clin Pract.* 2007; 107(4):c123-7.
26. John T. Daugirdas. *Handbook of Dialysis*. 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins 2003 Chapter 2 p .15.
27. 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
28. Flessner MF. The effect of fibrosis on periton transport. *Contrib Nephrol* 2006; 150: 174-80.
29. Mactier RA. The spectrum of periton fibrosing syndromes in periton dialysis. *Adv Perit Dial* 2000; 16: 23-8.
30. Pusateri R, Ross R, Marshall R et al. Sclerosing encapsulating peritonitis: report of a case with small bowel obstruction managed by long-term home parenteral hyperalimentation, and a review of the literature. *Am J Kidney Dis* 1986;8:56–60.
31. Chew MH, Sophian Hadi I, Chan G, Ong HS, Wong WK. A problem encapsulated: the rare peritoneal encapsulation syndrome. *Singapore Med J* 2006;47:808–10.
32. Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int.* 2003; 63(4):1530-9.
33. Naiki Y, Matsuo K, Matsuoka T et al. Possible role of hepatocyte growth factor in regeneration of human peritoneal mesothelial cells. *Int J Artif Organs* 2005; 28(2):141-9.
34. Fukudome K, Fujimoto S, Sato Y et al. Peritonitis increases MMP-9 activity in peritoneal effluent from CAPD patients. *Nephron.* 2001; 87(1): 35-41.
35. Nagase H, Woessner J.F. Matrix Metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; Vol 274: 21491–21494.
36. Woessner FJ. MMPs and TIMPs: an historical perspective. *Mol Biotechnol* 2002; 22 (1): 33 –49.
37. Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; 5(8):2145–2154

38. Radisky DC, Przybylo JA. Matrix metalloproteinase-induced fibrosis and malignancy in breast and lung. *Proc Am Thorac Soc.* 2008; 15;5(3):316-22
39. Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen.* 1999;7(6):477-85.
40. Kim JJ, Li JJ, Kim KS et al. High glucose decreases collagenase expression and increases TIMP expression in cultured human peritoneal mesothelial cells *Nephrol Dial Transplant* (2008) 23: 534–541.
41. 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.
42. Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gaultie J. Gene transfer of transforming growth factor-b1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2029–2039
43. Margetts PJ, Bonniaud P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 2003; 23: 530–541
44. Yung S, Chan TM. Preventing peritoneal fibrosis—insights from the laboratory. *Perit Dial Int* 2003; 23: S37–S41
45. Tsunoda M, Kobayashi N, Ide T et al. A novel PPARalpha agonist ameliorates insulin resistance in dogs fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008; 294(5): E833-40.
46. Maeda A, Horikoshi S, Gohda T et al. Pioglitazone attenuates TGF-beta(1)-induction of fibronectin synthesis and its splicing variant in human mesangial cells via activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma. *Cell Biol Int.* 2005; 29(6):422-8.
47. Zafirou S, Stanners SR, Polhill TS et al. Pioglitazone increases renal tubular cell albumin uptake but limits proinflammatory and fibrotic responses. *Kidney Int.* 2004; 65: 1647–53.
48. Isshiki K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, Kikkawa R. Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes* 2000; 49: 1022–32.

49. Ma LJ, Marcantoni C, Linton MF et al. Peroxisomeproliferator-activated receptor-gamma agonist troglitazone protects against nondiabetic glomerulosclerosis in rats. *Kidney Int* 2001; 59: 1899–1910.
50. Zheng F, Fornoni A, Eliot SJ et al. Upregulation of type I collagen by TGF-beta in mesangial cells is blocked by PPAR gamma activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F639–F648.
51. Peng Y, Liu H, Liu F et al. Troglitazone inhibits synthesis of transforming growth factorb 1 and reduces matrix production in human peritoneal mesothelial cells *Nephrology* 2006; 11, 516–523.
52. Io H, Hamada C, Ro Y, Tomino Y et al. Morphological changes of peritoneum and expression of VEGF in encapsulated sclerosis rat models. *Kidney Int* 2004; 65: 1927–1936
53. Sarioglu S, Sis B, Celik A et al. Quantitative digital histochemistry with methenamine silver staining in renal allograft biopsies excluding pure chronic allograft nephropathy cases. *Transplant Proc.* 2006 Mar; 38 (2): 490 – 491.
54. Williams JD, Craig KJ, Topley N et al. Peritoneal biopsy study group. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 470-479.
55. Corbel M, Caulet-Maugendre S, Boichot E et al. Inhibition of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat. *J Pathol* 2001; 193:538–545
56. Nathan C. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319–326
57. Muranishi Y, Mitani N, Sakai I et al. Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor (ONO-4817) on lung metastasis of murine renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001; 21: 3845–3852
58. He Q, Pang R, Song X et al. Rosiglitazone Suppresses the Growth and Invasiveness of SGC-7901 Gastric Cancer Cells and Angiogenesis In Vitro via PPARgamma Dependent and Independent Mechanisms. *PPAR Res* 2008;2008:649808.
59. Kim KH, Cho YS, Park JM et al. Pro-MMP-2 activation by the PPARgamma agonist, ciglitazone, induces cell invasion through the generation of ROS and the activation of ERK. *FEBS Lett* 2007; 581(17): 3303-10.

60. Ringseis R, Schulz N, Saal D et al. Troglitazone but not conjugated linoleic acid reduces gene expression and activity of matrix-metalloproteinases-2 and -9 in PMA-differentiated THP-1 macrophages. *J Nutr Biochem.* 2008; 19(9): 594-603.
61. Rodriguez WE, Tyagi N, Joshua IG et al. Pioglitazone mitigates renal glomerular vascular changes in high-fat, high-calorie-induced type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291(3): F694-701.
62. Zhang CH, Wen ZQ, Li JF et al. Inhibition of proliferation and transforming growth factor beta3 protein expression by peroxisome proliferators-activated receptor gamma ligands in human uterine leiomyoma cells *Chin Med J* 2008; 20;121(2): 166-71
63. Cheng HC, Ho TC, Chen SL et al. Troglitazone suppresses transforming growth factor beta-mediated fibrogenesis in retinal pigment epithelial cells. *Mol Vis.* 2008; 18;14: 95-104
64. Kawai T, Masaki T, Doi S et al. PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta. *Lab Invest* 2009; 89 (1): 47-58