

Sıçanlarda Doksisisiklinin Kimyasal Peritonite Bağlı Peritoneal Fibrozis Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

The Effects of Doxycycline on Peritoneal Fibrosis Induced by Chemical Peritonitis in Rats

ÖZ

AMAÇ: Çalışmada; sıçanlarda kimyasal peritonite bağlı peritoneal fibrozis modelinde, doksisisiklin uygulamasının periton morfolojisindeki değişiklikler, periton yıkama sıvısındaki matriks metalloproteaz (MMP) ve matriks metalloproteaz doku inhibitörü (TIMP) aktiviteleri üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Çalışmaya alınan 21 adet sıçan her grupta yedi adet olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Birinci gruptaki sıçanlarda klorhekzidin glukonat (CHX) ile kimyasal peritonit oluşturuldu, ikinci grupta CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan sıçanlara intraperitoneal doksisisiklin verildi, üçüncü grup ise kontrol grubu olarak kabul edildi. Çalışma sonunda kurban edilen sıçanlardan periton yıkama sıvıları, parietal ve visseral periton doku örnekleri alındı. Peritoneal yıkama sıvılarında MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 ve prokollajen tip I C-terminal peptid (PICP) düzeyleri ölçümü yapıldı. Periton doku örneklerinde kalınlık ölçümü, olgunlaşmamış kollajen düzeyi ölçümü ve inflamasyon skorlaması yapıldı.

BULGULAR: Parietal periton olgunlaşmamış kollajen düzeyleri, parietal-visseral periton kalınlıkları ve inflamasyon skorları açısından gruplar arasında anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Periton yıkama sıvısında ölçülen TIMP-1 ve PICP düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanırken ($p<0,05$), MMP-2 ve TIMP-2 düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

SONUÇ: Bu deneysel çalışmada, CHX solüsyonu periton dokusunda kimyasal hasarlanmaya yol açmıştır. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da doksisisiklin uygulaması CHX solüsyonunun periton dokusunda yapmış olduğu hasarlanmayı azaltmıştır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: MMP'ler, MMP inhibisyonu, Doksisisiklin, Peritoneal fibrozis

ABSTRACT

OBJECTIVE: We investigated the effects of doxycycline on changes in peritoneal morphology, matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP) activities in peritoneal lavage fluids in a rat model of peritoneal fibrosis due to chemical peritonitis.

MATERIAL and METHODS: 21 rats were divided into three groups ($n=7$). In the first group, we administered chlorhexidine gluconate (CHX) intraperitoneally (i.p.) to the rats. In the second group, we administered i.p. doxycycline in addition to CHX to rats. The third group was the control. MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and procollagen type I C-terminal peptide (PICP) levels in the peritoneal fluid were analyzed. Thickness of the peritoneum, amount of immature collagen and the inflammation scores were measured in peritoneal tissue samples.

RESULTS: Immature collagen levels in parietal peritoneum, parietal-visceral peritoneal thickness and inflammation scores were compared and a significant difference was observed between the groups ($p<0,05$). TIMP-1 and PICP levels were compared and a significant difference was observed between the groups ($p<0,05$). MMP-2 and TIMP-2 levels were compared and no significant difference was observed between the groups ($p>0,05$).

CONCLUSION: CHX solution leads to peritoneal injury in peritoneal tissue. Although an insignificant difference is present statistically, doxycycline decreases the peritoneal injury due to CHX solution.

KEY WORDS: MMPs, MMP inhibition, Doxycycline, Peritoneal fibrosis

Serkan YILDIZ¹
Zahide ÇAVDAR²
Gülşün OKTAY³
Sülen SARIOĞLU⁴
Ensari GÜNELİ⁵
Osman YILMAZ⁵
Taner ÇAMSARI¹

- 1 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye
- 2 Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
- 3 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
- 4 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
- 5 Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Bilimi AD, İzmir, Türkiye



Geliş Tarihi : 21.04.2017

Kabul Tarihi : 16.06.2017

Yazışma Adresi:

Serkan YILDIZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Tel : +90 232 412 37 66

E-posta : serkan.yildiz@gmail.com

GİRİŞ

Periton diyalizi (PD) son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) hastalarında uygulanan böbrek yerine koyma tedavi seçeneklerinden birisidir (1). SDBY'nin tedavisinde, uzun süreli bir tedavi seçeneği olarak PD'nin başarısı, hem solüt hem de sıvının etkin bir şekilde uzaklaştırılmasına bağlıdır (2). PD tedavisi ile ilişkili en önemli kısıtlayıcı faktörlerden birisi periton zarının diyaliz etkinliğinde zamanla ilerleyici bir azalmanın oluşmasıdır. PD hastalarında zamanla oluşan ultrafiltrasyon (UF) yetmezliği de, periton zarının işlevsel geçirgenliğinde bozulmanın bir sonucudur, sıklıkla hastaların PD tedavisinden çıkartılmalarına sebep olur. Bu olumsuz gelişmelerin önemli bir nedeni peritoneal fibrozis gelişimi, peritoneal mezotel tabakası ile bazal membran bütünlüğünün bozulmasıdır (3).

Periton zarı, mezotel ve altta yatan stroma diyaliz sıvısına geçen bakteriyel veya kimyasal toksinlerin yol açtığı hasarlanmaya cevap olarak morfolojik değişiklikler geçirirler. Matriks metalloproteazlar (MMP'ler) ve matriks metalloproteazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) fibrozis sürecinde önemli rol oynarlar (4).

Matriks metalloproteazlar aktif bölümünde çinko atomu içeren enzim ailesidir, hücre dışı matriks bileşenlerinin yıkımına yol açan nötral endopeptidazlardır ve proteolitik aktiviteye sahiptirler (5). MMP'ler ve TIMP'ler periton dokusunda mezotel hücreleri, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından üretilir. Fibrozis sürecinde MMP'lerin aktiviteleri birçok basamakta regüle edilir. Proenzimlerin aktivasyonu ile aktiviteleri artar, TIMP'lerin tarafından aktiviteleri baskılanır (6). Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, periton dokusunda özellikle MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 aktivitelerinin belirgin olduğu gösterilmiştir (7).

Doksisisiklin antimikrobiyal ve antiinflamatuvar etkiye sahiptir, aynı zamanda MMP inhibitörüdür (8). Literatürde bu antibiyotik grubunun MMP inhibisyonu ile ilgili deneysel hayvan çalışmaları bulunmaktadır (9), ancak kimyasal peritonite bağlı fibrozis gelişimi üzerine etkisi ile ilgili klinik ve deneysel hayvan çalışması yoktur.

Bu çalışmada; sıçanlarda kimyasal peritonite bağlı peritoneal fibrozis modelinde, doksisisiklin uygulamasının periton morfolojisindeki değişiklikler ve periton yıkama sıvısındaki MMP ve TIMP aktiviteleri üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışmada, 21 adet yetişkin, dişi, ağırlıkları 180-260 gram arasında değişen, üremik olmayan Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Tüm hayvanlar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'ndeki optimal koşullarda barındırıldı, standart yem ve su ile beslendi. Deney süresince hayvan hakları ile ilgili olarak National Institute of Health (NIH)'in belirlediği kriterler (Principles of Laboratory Animal

Care) esas alındı (10). Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alındı.

Çalışmaya alınan sıçanlar; her grupta yedi adet olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Çalışma süresi 14 gün olarak belirlendi. Çalışma öncesi sıçanlar tartıldı. Birinci gruptaki sıçanlarda sadece kimyasal peritonit oluşturuldu. İkinci grupta kimyasal peritonit oluşturulan sıçanlara karın içine doksisisiklin verildi. Üçüncü grup ise kontrol grubu olarak kabul edildi, bu gruptaki sıçanlarda kimyasal peritonit oluşturulmadı ve doksisisiklin verilmedi.

Sıçanlarda kimyasal peritonit oluşturmak için klorhekzidin glukonat (CHX) kullanıldı (11). Aseptik olarak solüsyon (% 0.1 CHX/% 15 etanol/fizyolojik salin) hazırlandı. Sıçanlara 14 gün boyunca günde 1 ml solüsyon 24 G iğne ile karın içine verildi. Bir sonraki enjeksiyon öncesi karın içinde önceki enjeksiyondan kalan sıvı aspire edildi.

Sıçanlara 24 G iğne ile 14 gün boyunca karın içine doksisisiklin uygulandı (doksisisiklin CHX solüsyonu içerisinde çözülde). Bir sonraki enjeksiyon öncesi karın içinde önceki enjeksiyondan kalan sıvı aspire edildi. Daha önce sıçanlarda yapılmış olan deneysel çalışmalar incelendi ve karın içine verilen doksisisiklin dozu 4 mg/kg olarak belirlendi (12-14).

Kontrol grubundaki sıçanlara 14 gün boyunca günde 1 ml fizyolojik salin 24 G iğne ile karın içine verildi. Bir sonraki enjeksiyon öncesi batın içinde önceki enjeksiyondan kalan sıvı aspire edildi.

Sıçanlar çalışma tamamlandıktan sonra, 15. günde yüksek doz eterle sakrifiye edildi. Sıçanlardan sakrifikasyon öncesi periton yıkama sıvıları alındı. Bu işlem; karın içerisine 24 G iğne ile 50 ml/kg % 2.27 glukozlu PD solüsyonu (Dianeal® - Baxter) verildikten sonra bu sıvının (periton yıkama sıvısı) daha sonra incelemelerde kullanılmak üzere aspire edilmesiyle gerçekleştirildi.

Periton yıkama sıvılarının bir bölümü beyaz küre sayımı ve kültür için ayrıldı, geriye kalan bölümüne de +4°C'de 10 dakika 4000 rpm'de soğuk santrifüj uygulandı, hücrelerinden ayrıldı ve oluşturulan süpernatant biyokimyasal incelemeler yapılmaya kadar -70°C'de saklandı.

Sakrifikasyon sonrasında sıçanlardan histopatolojik inceleme için karaciğer yüzeyinden visseral periton doku örnekleri ve karın sol ön duvarından parietal periton doku örnekleri alındı. Örnekler histopatolojik inceleme yapılmaya kadar formalin ile tespit edildi. Örneklerin formalin ile tespitinin ardından karaciğer dokusundan ve parietal peritondan yüzeye dik olacak şekilde 2 mm kalınlığında doku parçaları alındı. Rutin doku takibinden sonra 3 mm kalınlığındaki kesitlere Hematoksilen-Eozin (H&E) ve Sirius Red boyaları uygulandı ve kesitler ışık mikroskopi ile değerlendirildi.

Tüm olgular parietal ve visseral periton inflamasyon skorlaması için ayrı ayrı değerlendirildi ve yarı-niceliksel olarak

şu şekilde skorlandı; 0: yok, 1: hafif, 2: orta şiddette, 3: şiddetli, 4: çok şiddetli ve kas tabakasına da uzanım gösteriyor.

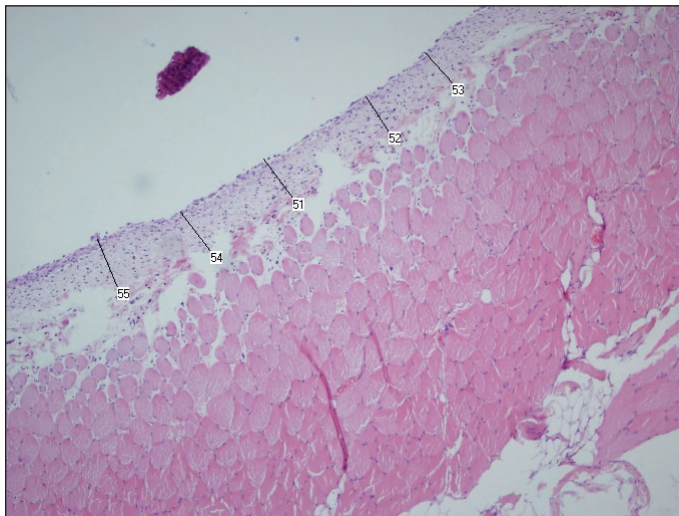
Periton kalınlığı ölçümü için H&E boyalı kesitlerden ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüler video kamera ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Periton kalınlığının saptanması için görüntü analizi programı kullanılarak piksel cinsinden her olguda 10 alanda ölçüm yapıldı. Bunun için bilgisayar ekranı üzerindeki görüntüden fare yardımı ile dik doğru parçaları işaretlendi ve yazılım tarafından ölçüm gerçekleştirildi. Visseral periton için ölçümlerde X40, parietal periton için ölçümlerde ise X10 büyütme kullanıldı.

Parietal peritondaki olgunlaşmış ve olgunlaşmamış kollajen düzeyi (fibrozisin dolaylı bir göstergesi) Sirius Red boyamasına göre bilgisayar ortamında sayısal görüntü analizi ile ölçüldü (15).

Periton yıkama sıvısındaki MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri gelatin zimografi yöntemi kullanılarak ölçüldü (16).

Periton yıkama sıvısındaki TIMP-1, TIMP-2 ve prokollajen tip I C-terminal peptid (PIPC) düzeyleri iki taraflı “sandviç tip” ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi kullanılarak ölçüldü (17).

İstatistiksel değerlendirmede, 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 karşılaştırılmasında kullanılan Kruskal-Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı fark var ise, anlamlı farkın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için iki grup ortalamasının karşılaştırılmasında kullanılan Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Kruskal-Wallis Varyans Analizi için $p < 0.05$ ise aradaki farkın anlamlı olduğuna karar verildi. Mann-Whitney U



Şekil 1: CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta parietal peritonda kalınlık ölçümü.

Testi için Bonferroni düzeltmesi kullanıldığından $p < 0.0167$ ise aradaki farkın anlamlı olduğuna karar verildi. Değerler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan sıçanların ağırlık ortalamaları birinci grupta $208,33 \pm 17,79$ gram, ikinci grupta $200,71 \pm 13,67$ gram, üçüncü grupta ise $214,57 \pm 21,97$ gram olarak bulundu. Söz konusu üç gruba ayrılan sıçanlar arasında ağırlık ortalamaları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

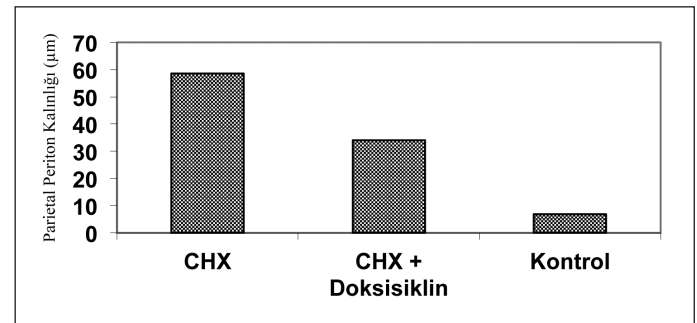
HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

A. Parietal Periton Kalınlık Ölçümü

Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta parietal periton kalınlığı ortalaması $58,53 \pm 34,02 \mu\text{m}$, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisiklin verilen ikinci grupta parietal periton kalınlığı ortalaması $34,05 \pm 12,20 \mu\text{m}$, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise parietal periton kalınlığı ortalaması $6,80 \pm 0,84 \mu\text{m}$ olarak bulundu. Kruskal-Wallis analizinde; ölçülen parietal periton kalınlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p = 0,001$). Bonferroni anlamlılık düzeyi dikkate alınarak yapılan Mann-Whitney U testinde ise; birinci ve ikinci grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamasına karşın birinci ve üçüncü grup, ikinci ve üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p = 0,101$, $p = 0,001$, $p = 0,001$). Şekil 1'de CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta parietal peritonda kalınlık ölçümü görülmektedir. Şekil 2'de çalışma sonunda her üç grupta ölçülen parietal periton kalınlıkları görülmektedir.

B. Visseral Periton Kalınlık Ölçümü

Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta visseral periton kalınlığı ortalaması $22,20 \pm 15,30 \mu\text{m}$, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisiklin verilen ikinci grupta visseral periton kalınlığı ortalaması $15,34 \pm 7,14 \mu\text{m}$, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise visseral periton kalınlığı ortalaması $5,52 \pm 4,44 \mu\text{m}$ olarak bulundu. Kruskal-Wallis analizinde; ölçülen visseral periton kalınlıkları açısından



Şekil 2: Çalışma sonunda her üç grupta ölçülen parietal periton kalınlıkları.

gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,009$). Bonferroni anlamlılık düzeyi dikkate alınarak yapılan Mann-Whitney U testinde ise; birinci ve ikinci grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamasına karşın birinci ve üçüncü grup, ikinci ve üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,731$, $p=0,008$, $p=0,007$). Şekil 3'de CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta visseral peritonda kalınlık ölçümü görülmektedir. Şekil 4'de çalışma sonunda her üç grupta ölçülen visseral periton kalınlıkları görülmektedir.

C. Parietal Periton İnflamasyon Skorlaması

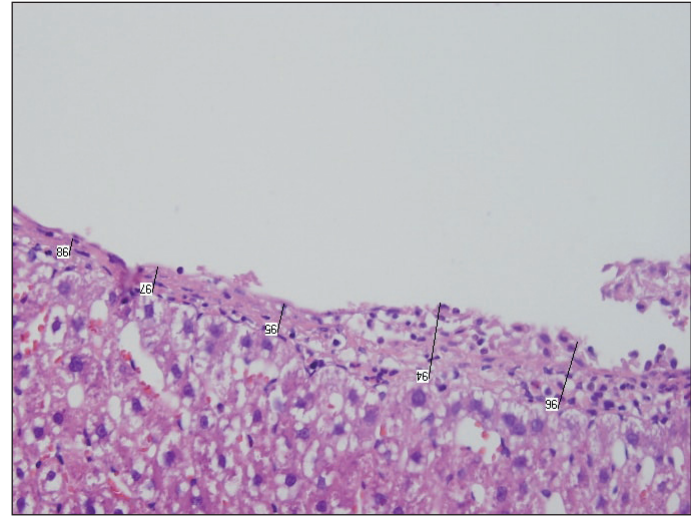
Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta parietal periton inflamasyon skoru ortalaması $2,33 \pm 1,03$, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisisiklin verilen ikinci grupta parietal periton inflamasyon skoru ortalaması $1,71 \pm 0,48$, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise parietal periton inflamasyon skoru ortalaması $0,14 \pm 0,37$ olarak bulundu. Kruskal-Wallis analizinde; ölçülen parietal periton inflamasyon skorları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,001$). Bonferroni anlamlılık düzeyi dikkate alınarak yapılan Mann-Whitney U testinde ise; birinci ve ikinci grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamasına karşın birinci ve üçüncü grup, ikinci ve üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,295$, $p=0,001$, $p=0,001$). Şekil 5'te CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta parietal peritondaki inflamasyon görülmektedir.

D. Visseral Periton İnflamasyon Skorlaması

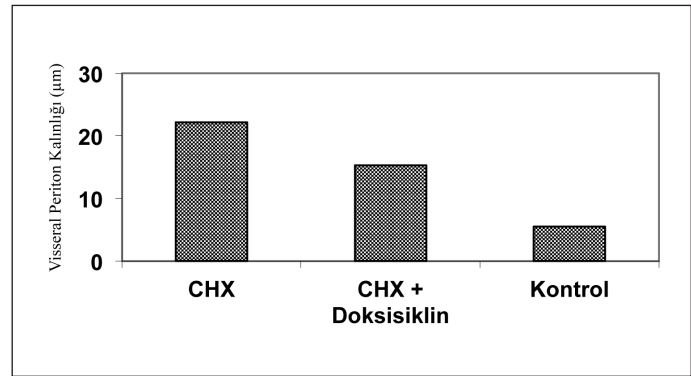
Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta visseral periton inflamasyon skoru ortalaması $0,83 \pm 0,75$, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisisiklin verilen ikinci grupta visseral periton inflamasyon skoru ortalaması $0,42 \pm 0,53$ olarak bulundu, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise visseral peritonda inflamasyon saptanmadı. Kruskal-Wallis analizinde; ölçülen visseral periton inflamasyon skorları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,040$). Bonferroni anlamlılık düzeyi dikkate alınarak yapılan Mann-Whitney U testinde ise; birinci ve ikinci grup, birinci ve üçüncü grup, ikinci ve üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,366$, $p=0,051$, $p=0,209$). Şekil 6'te CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta visseral peritondaki inflamasyon görülmektedir.

E. Parietal Periton Olgunlaşmamış Kollajen Düzeyi (Fibrozis Skorlaması)

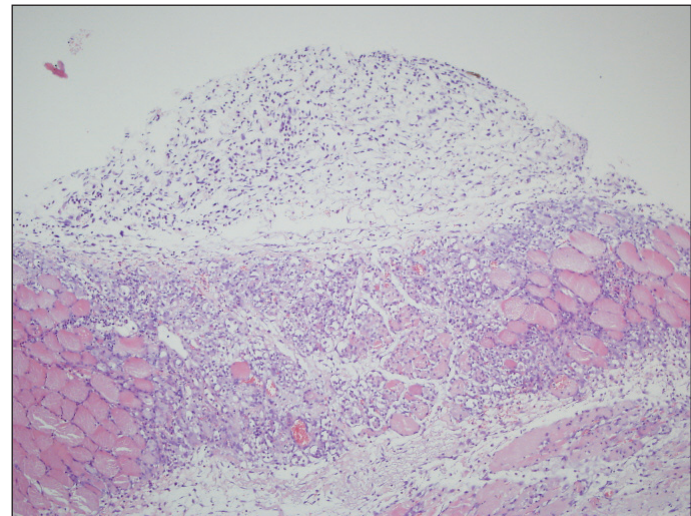
Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta parietal periton olgunlaşmamış kollajen düzeyi ortalaması $12,75 \pm 3,94\%$, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisisiklin verilen ikinci grupta parietal periton olgunlaşmamış kollajen düzeyi ortalaması $10,57 \pm 2,90\%$, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise parietal periton olgunlaşmamış kollajen düzeyi ortalaması $2,38 \pm 0,41\%$ olarak bulundu.



Şekil 3: CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta visseral peritonda kalınlık ölçümü.

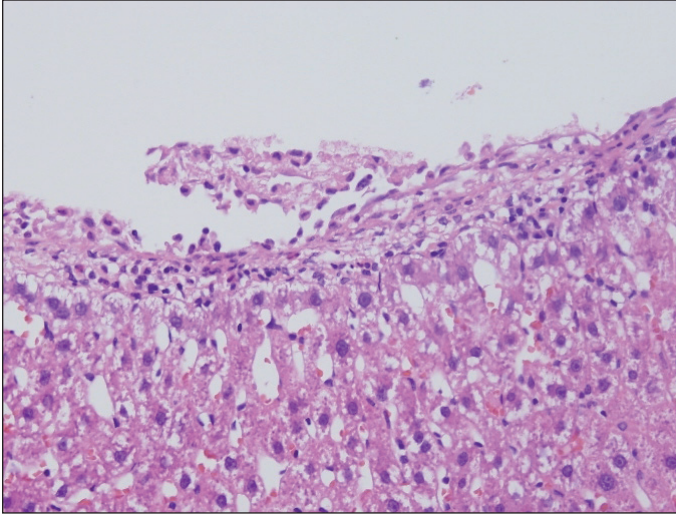


Şekil 4: CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta parietal peritondaki inflamasyon.

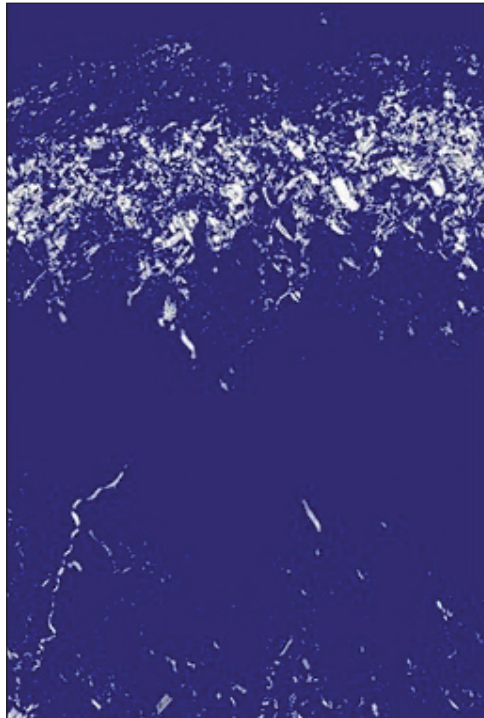
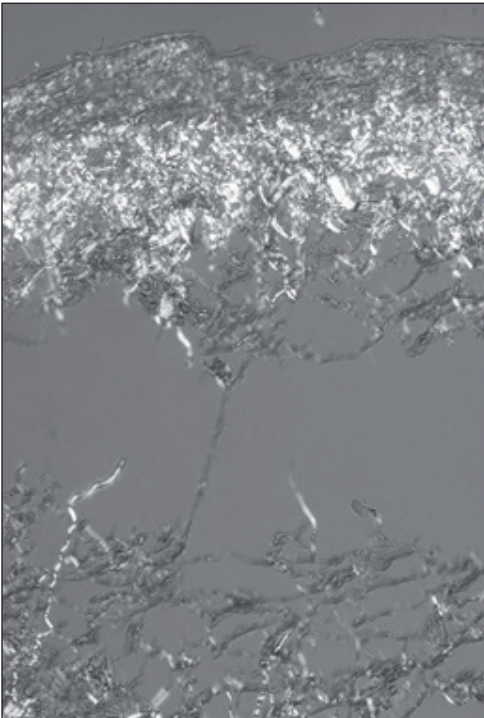


Şekil 5: CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta visseral peritondaki inflamasyon.

Kruskal-Wallis analizinde; ölçülen parietal periton olgunlaşmamış kollajen düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,001$). Bonferroni anlamlılık düzeyi dikkate alınarak yapılan Mann-Whitney U testinde ise; birinci ve ikinci grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamasına karşın birinci ve üçüncü grup, ikinci ve üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,295$, $p=0,001$, $p=0,001$). Şekil 7’de CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta Sirius Red ile boyanmış parietal periton kesitinin polarize ışık altındaki görünümü görülmektedir.



Şekil 6: Çalışma sonunda her üç grupta ölçülen visseral periton kalınlıkları.



Şekil 7: CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan grupta Sirius Red ile boyanmış parietal periton kesitinin polarize ışık altındaki görünümü.

BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

A. Periton Yıkama Sıvısında Ölçülen MMP-2 Düzeyleri

Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta periton yıkama sıvısındaki MMP-2 düzeyi ortalaması $7,32 \pm 12,39$ relatif proteinaz aktivitesi/ μg protein, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisiklin verilen ikinci grupta periton yıkama sıvısındaki MMP-2 düzeyi ortalaması $4,84 \pm 4,56$ relatif proteinaz aktivitesi/ μg protein, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise periton yıkama sıvısındaki MMP-2 düzeyi ortalaması $3,82 \pm 1,07$ relatif proteinaz aktivitesi/ μg protein olarak ölçüldü. Kruskal-Wallis analizinde; periton yıkama sıvısında ölçülen MMP-2 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,281$).

B. Periton Yıkama Sıvısında Ölçülen MMP-9 Düzeyleri

Çalışma sonunda; her üç grupta periton yıkama sıvılarında gelatin zimografi yöntemiyle MMP-9 enzim aktivitesi gösterilemedi.

C. Periton Yıkama Sıvısında Ölçülen TIMP-1 Düzeyleri

Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta periton yıkama sıvısındaki TIMP-1 düzeyi ortalaması $1,43 \pm 0,16$ ng/ml, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisiklin verilen ikinci grupta periton yıkama sıvısındaki TIMP-1 düzeyi ortalaması $1,17 \pm 0,18$ ng/ml, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise periton yıkama sıvısındaki TIMP-1 düzeyi ortalaması $1,49 \pm 0,17$ ng/ml olarak ölçüldü.

Kruskal-Wallis analizinde; periton yıkama sıvısında ölçülen TIMP-1 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,016$). Bonferroni anlamlılık düzeyi dikkate alınarak yapılan Mann-Whitney U testinde ise; birinci ve ikinci grup, birinci ve üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamasına karşın, ikinci ve üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,035$, $p=0,366$, $p=0,007$).

D. Periton Yıkama Sıvısında Ölçülen TIMP-2 Düzeyleri

Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta periton yıkama sıvısındaki TIMP-2 düzeyi ortalaması $6,25 \pm 0,91$ ng/ml, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisisiklin verilen ikinci grupta periton yıkama sıvısındaki TIMP-2 düzeyi ortalaması $6,26 \pm 1,23$ ng/ml, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise periton yıkama sıvısındaki TIMP-2 düzeyi ortalaması $7,57 \pm 0,84$ ng/ml olarak ölçüldü. Kruskal-Wallis analizinde; periton yıkama sıvısında ölçülen TIMP-2 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,073$).

E. Periton Yıkama Sıvısında Ölçülen PIPC Düzeyleri

Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta periton yıkama sıvısındaki PIPC düzeyi ortalaması $6,58 \pm 4,63$ ng/ml, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisisiklin verilen ikinci grupta periton yıkama sıvısındaki PIPC düzeyi ortalaması $3,71 \pm 1,86$ ng/ml, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise periton yıkama sıvısındaki PIPC düzeyi ortalaması $2,11 \pm 1,15$ ng/ml olarak ölçüldü. Kruskal-Wallis analizinde; periton yıkama sıvısında ölçülen PIPC düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,049$). Bonferroni anlamlılık düzeyi dikkate alınarak yapılan Mann-Whitney U testinde ise; birinci ve ikinci grup, birinci ve üçüncü grup, ikinci ve üçüncü grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,534$, $p=0,022$, $p=0,073$).

F. Periton Yıkama Sıvısında Ölçülen Beyaz Küre Sayıları

Sterilitesi negatif kültür sonuçları ile kanıtlanan periton yıkama sıvılarında beyaz küre sayımı yapıldı. Çalışma sonunda; CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci grupta periton yıkama sıvısındaki beyaz küre sayısı ortalaması $2,10 \pm 1,57$ 10^3 hücre/mm³, CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan ve doksisisiklin verilen ikinci grupta periton yıkama sıvısındaki beyaz küre sayısı ortalaması $1,41 \pm 0,78$ 10^3 hücre/mm³, üçüncü grup olan kontrol grubunda ise periton yıkama sıvısındaki beyaz küre sayısı ortalaması $1,64 \pm 1,04$ 10^3 hücre/mm³ olarak ölçüldü. Kruskal-Wallis analizinde; periton yıkama sıvısında ölçülen beyaz küre sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,559$).

TARTIŞMA

PD tedavisinde teknik başarısızlığın en önemli nedeni peritoneal fibrozis gelişimi, peritoneal mezotel tabakası ile bazal membran bütünlüğünün bozulmasıdır. Fibroziste doku yıkımı

ve yeniden biçimlendirme (remodelling) vardır, bazal membran kalınlaşır ve mezotel altında fibrotik doku (hücre dışı matriks bileşenleri) birikir (18).

Fibrozis sürecinde önemli rol oynayan MMP'ler ve TIMP'ler periton dokusunda mezotel hücreleri, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından üretilir. MMP'lerin aktiviteleri birçok basamakta düzenlenir; proenzimlerin aktivasyonu ile etkinlikleri artar ve TIMP'ler tarafından etkinlikleri baskılanır. Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, periton dokusunda özellikle MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 aktivitelerinin belirgin olduğu gösterilmiştir (7).

MMP'lerin doğal inhibitörlerinin yanı sıra sentetik inhibitörleri de bulunmaktadır. Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin antimikrobiyal özelliklerine ek olarak birçok inflamatuvar süreçte sitokin ve proteaz mediatörlerini inhibe edici etkileri vardır, MMP inhibisyonu da bunlardan birisidir. Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin özellikle MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerinin inhibisyonuna yolaçtığı gösterilmiştir. Bu grup içerisinde en güçlü MMP inhibisyonu etkisine sahip olan antibiyotik doksisisiklin'dir (19).

Literatürde bu antibiyotik grubunun MMP inhibisyonu ile ilgili deneysel hayvan çalışmaları vardır (20-22), ancak kimyasal peritonite bağlı fibrozis gelişimi üzerine etkisi ile ilgili klinik ve deneysel hayvan çalışması yoktur.

Çalışmamızdaki hayvan modelinde, öncelikle karın içine antiseptik (CHX) uygulaması sonucunda periton dokusunda kimyasal hasarlanmaya bağlı olarak steril inflamasyon yapılması amaçlanmıştır.

Çalışma sonunda ölçülen parietal ve visseral periton inflamasyon skorları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Bu inflamasyon sürecinin sonucunda periton dokusunda fibrozis ve kalınlaşma hedeflenmişti. Çalışma sonunda ölçülen parietal-visseral periton kalınlıkları ve parietal periton olgunlaşmamış kollajen düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Bu bulgular hedeflenen fibrozis ve kalınlaşmanın başarıldığını göstermektedir.

Dokuların yıkımında ve yeniden biçimlendirilmesinde MMP'lerin ve TIMP'lerin önemi bilinmektedir. MMP-2 ve MMP-9, tip IV kollajen ve fibronektin gibi hücre dışı matriks elemanlarının yıkımına yol açar. Çalışmamızda MMP inhibitörü olarak, özellikle MMP-2 ve MMP-9 aktivitelerini inhibe ettiği bilinen doksisisiklin kullanıldı.

Çalışma sonunda yapılan histopatolojik değerlendirmede; karın içine doksisisiklin verilen ikinci grupta parietal-visseral periton kalınlıkları, parietal-visseral inflamasyon skorları ve parietal periton olgunlaşmamış kollajen düzeyleri CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci gruba göre daha düşük saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da (gruplardaki denek sayısının azlığından kaynaklanmış olabilir) doksisisiklin

uygulamasının CHX solüsyonunun periton dokusunda yapmış olduğu hasarlanmayı azalttığı görüldü. Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin MMP inhibisyonu dışında anti-inflamatuvar etkilerinin de bu sonuçta etkili olduğu düşüncesindeyiz.

Çalışma sonunda alınan periton yıkama sıvılarında, histopatolojik bulgulara paralel olarak karın içine doksisisiklin verilen ikinci gruptaki MMP-2 düzeyleri CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci gruptaki MMP-2 düzeylerine göre daha düşük saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da doksisisiklin uygulamasının CHX solüsyonunun periton yıkama sıvısında yol açtığı MMP-2 enzim aktivitesindeki artışı azalttığı görüldü.

Çalışma sonunda alınan periton yıkama sıvılarında, her üç grupta da gelatin zimografi yöntemiyle MMP-9 enzim aktivitesi gösterilemedi.

Hirahara ve ark. da, sıçanlarda yapmış oldukları deneysel çalışmalarda; karın içine CHX verilerek yapılan periton hasarlanması sonucunda periton yıkama sıvısında gelatin zimografi yöntemi ile MMP-2 aktivasyonunda artış saptamalarına rağmen MMP-9 aktivitesini gösterememişlerdir (11,23,24). MMP-9 aktivitesinde artış görüldüğü takdirde enfeksiyöz peritonitten şüphelenilmesi gerektiğini belirtmişlerdir (23). Fukudome ve ark.'nın da, PD hastalarında yapmış oldukları bir çalışmada; peritonit sırasında periton diyaliz sıvılarında MMP-9 aktivitelerinde artış olduğunu bildirmeleri bu düşüncayı desteklemektedir (4).

Çalışma sonunda alınan periton yıkama sıvılarında, karın içine doksisisiklin verilen ikinci gruptaki TIMP-1 ve PIPC düzeyleri CHX ile kimyasal peritonit oluşturulan birinci gruptaki TIMP-1 ve PIPC düzeylerine göre daha düşük saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da doksisisiklin uygulamasının CHX solüsyonunun periton yıkama sıvısında yol açtığı TIMP-1 ve PIPC düzeylerindeki artışı azalttığı görüldü.

Uzun-dönem PD hastalarında glukoz içeren diyaliz solüsyonlarının periton zarında geçirgenlik artışına ve fibroze yol açtığı bilinmektedir. Ha ve ark., yapmış oldukları deneysel bir çalışmada; insan periton mezotel hücrelerinden glukoz içeren periton diyaliz sıvıları ile maruziyet sonucunda PIPC salınımının gerçekleştiğini göstermişlerdir (25).

Nagaoka ve Hirota, yapmış oldukları deneysel bir hayvan çalışmasında; periton zarının glikojene maruziyetinin inflamasyona yol açtığını ve bunun sonucunda da peritoneal nötrofillerde TIMP-1 ekspresyonunda artış olduğunu bildirmişlerdir (26).

Çalışma sonunda alınan periton yıkama sıvılarında, ölçülen TIMP-2 düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Bizim çalışmamızın aksine, Hirahara ve ark., sıçanlarda yapmış oldukları deneysel çalışmalarda; karın içine CHX verilerek yapılan periton hasarlanması sonucunda periton dokusunda TIMP-2 ekspresyonunda artış saptamışlardır (11,24).

Matriks yıkımının anjiyogenez, tümör invazyonu ve yayılımındaki önemi anlaşıldıktan sonra, son yıllarda yapılan klinik ve deneysel çalışmalar sentetik MMP inhibitörlerinin anti-kanser ilaçlar olarak kullanımına odaklanmıştır (27). MMP inhibitörleri ile diyabetik nefropati ve iskemik kardiyomiyopatide fibrozis gelişimini önlemek amacıyla çalışmalar yapılmıştır (28,29).

Son yıllarda, MMP inhibitörlerinin periton zarında fibrozis gelişimi üzerine etkilerini ve hangi yolla verilmesi gerektiğini inceleyen klinik ve deneysel çalışmalar giderek artmaktadır (30-32).

Literatürde bu konuda daha önce yapılmış olan çalışmalar incelenmiş (11,23,24,30) ve çalışma süresi 14 gün olarak belirlenmiştir. Çalışma süresince sıçanlarda enfeksiyöz komplikasyon gelişmemiş ve çalışma sonunda sıçanlardan sakrifikasyon öncesi alınan periton yıkama sıvısı kültürlerinde üreme olmamıştır.

SDBY'nin tedavisinde, uzun süreli bir tedavi seçeneği olarak PD'nin başarısı, hem solüt hem de sıvının etkin bir şekilde uzaklaştırılmasına bağlıdır. Etiyolojisi ne olursa olsun, uzun-dönem PD hastalarında periton zarında görülen fibrozis ve skleroz gelişiminde doku yıkımının ve yeniden biçimlendirmenin önemi bilinmektedir. Peritoneal fibrozis gelişiminin önlenmesi PD tedavisinde teknik sağkalımı arttıracaktır. MMP'lerin ve TIMP'lerin fibrozis ve skleroz sürecindeki rolleri göz önüne alındığında MMP inhibisyonunun önemi daha iyi anlaşılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Flessner MF: Peritoneal transport physiology: Insights from basic research. *J Am Soc Nephrol* 1991;2:122-135
2. Dobbie JW: Durability of the peritoneal membrane. *Perit Dial Int* 1995;15:87-92
3. Dobbie JW: Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1992;12:14-27
4. Fukudome K, Fujimoto S, Sato Y, Hisanaga S, Eto T: Peritonitis increases MMP-9 activity in peritoneal effluent from CAPD patients. *Nephron* 2001;87:35-41
5. Bode W, Maskos K: Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Biol Chem* 2003;384:863-872
6. Kossakowska AE, Edwards DR, Lee SS, Urbanski LS, Stabber AL, Zhang CL, Phillips BW, Zhang Y, Urbanski SJ: Altered balance between matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental biliary fibrosis. *Am J Pathol* 1998;153:1895-1902
7. Martin J, Yung S, Robson RL, Steadman R, Davies M: Production and regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2000;20:524-533

8. Hanemaaijer R, Visser H, Koolwijk P, Sorsa T, Salo T, Golub LM, van Hinsbergh VW: Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemically modified tetracyclines (CMTs) in human endothelial cells. *Adv Dent Res* 1998;12:114-118
9. Lalu MM, Gao CQ, Schulz R: Matrix metalloproteinase inhibitors attenuate endotoxemia induced cardiac dysfunction: A potential role for MMP-9. *Mol Cell Biochem* 2003;251:61-66
10. Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF: Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J* 1997;38:41-48
11. Hirahara I, Ogawa Y, Kusano E, Asano Y: Activation of matrix metalloproteinase-2 causes peritoneal injury during peritoneal dialysis in rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1732-1741
12. Lalu MM, Gao CQ, Schulz R: Matrix metalloproteinase inhibitors attenuate endotoxemia induced cardiac dysfunction: A potential role for MMP-9. *Mol Cell Biochem* 2003;251:61-66
13. Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Mocchegiani F, Orlando F, Del Prete M, D'Amato G, Scalise G, Saba V: Quinupristin/dalfopristin bonding in combination with intraperitoneal antibiotics prevent infection of knitted polyester graft material in a subcutaneous rat pouch model infected with resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;24:230-234
14. Wu CM, Lin MW, Cheng JT, Wang YM, Huang YW, Sun WZ, Lin CR: Regulated, electroporation-mediated delivery of pro-opiomelanocortin gene suppresses chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Gene Ther* 2004;11:933-940
15. Francis RJ: Amyloid. In: Bancroft JD, Stevens A (eds). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990;155-175
16. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG: Quantitative zymography: Detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218:325-329
17. Cirak MY: Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Systems. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 1999;19:242-248
18. Henderson IS, Dobbie JW, Zaki MA, Wilson LS: Structure of the peritoneum and changes brought about by infection. *Contrib Nephrol* 1987;57:30-40
19. Villarreal FJ, Griffin M, Omens J, Dillmann W, Nguyen J, Covell J: Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation* 2003;108:1487-1492
20. Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Roach DM, Fitridge RA, Laws PE, Millard SH, Varelias A, Cowled PA: Up-regulation of MMP-2 and MMP-9 leads to degradation of type IV collagen during skeletal muscle reperfusion injury; protection by the MMP inhibitor, doxycycline. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2002;23:260-269
21. Lalu MM, Gao CQ, Schulz R: Matrix metalloproteinase inhibitors attenuate endotoxemia induced cardiac dysfunction: A potential role for MMP-9. *Mol Cell Biochem* 2003;251:61-66
22. Bezerra MM, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA: Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:613-616
23. Hirahara I, Umeyama K, Urakami K, Kusano E, Masunaga Y, Asano Y: Serial analysis of matrix metalloproteinase-2 in dialysate of rat sclerosing peritonitis models. *Clin Exp Nephrol* 2001;5:103-108
24. Hirahara I, Umeyama K, Shofuda K, Kusano E, Masunaga Y, Honma S, Asano Y: Increase of matrix metalloproteinase-2 in dialysate of rat sclerosing encapsulating peritonitis model. *Nephrology* 2002;7:161-169
25. Ha H, Cha MK, Choi HN, Lee HB: Effects of peritoneal dialysis solutions on the secretion of growth factors and extracellular matrix proteins by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2002;22:171-177
26. Nagaoka I, Hirota S: Increased expression of matrix metalloproteinase-9 in neutrophils in glycogen-induced peritoneal inflammation of guinea pigs. *Inflamm Res* 2000;49:55-62
27. John A, Tuszyński G: The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001;7:14-23
28. Zaoui P, Cantin JF, Alimardani-Bessette M, Monier F, Halimi S, Morel F, Cordonnier D: Role of metalloproteinases and inhibitors in the occurrence and progression of diabetic renal lesions. *Diabetes Metab* 2000;26 Suppl 4:25-29
29. Jayasankar V, Woo YJ, Bish LT, Pirolli TJ, Berry MF, Burdick J, Bhalla RC, Sharma RV, Gardner TJ, Sweeney HL: Inhibition of matrix metalloproteinase activity by TIMP-1 gene transfer effectively treats ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110:180-186
30. Saglam F, Cavdar Z, Sarioglu S, Kolatan E, Oktay G, Yilmaz O, Camsari T: Pioglitazone reduces peritoneal fibrosis via inhibition of TGF- β , MMP-2, and MMP-9 in a model of encapsulating peritoneal sclerosis. *Ren Fail* 2012; 34:95-102
31. Liu J, Zeng L, Zhao Y, Zhu B, Ren W, Wu C: Selenium suppresses lipopolysaccharide-induced fibrosis in peritoneal mesothelial cells through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition. *Biol Trace Elem Res* 2014;161:202-209
32. Zhang H, Li D, Li Z, Song Y: Effect of Ligustrazine on rat peritoneal mesothelial cells treated with lipopolysaccharide. *Ren Fail* 2016;38:961-969