

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

**SIÇANLARDA KİMYASAL PERİTONİTE
BAĞLI PERİTON FİBROZİSİNDE
DARBEOETİN'İN PERİTONEAL FİBROZİS
İLE PERİTONEAL DOKU MMP-2 VE TIMP-2
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. Ali BORAZAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Taner ÇAMSARI

İZMİR-2008

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

**SIÇANLARDA KİMYASAL PERİTONİTE
BAĞLI PERİTON FİBROZİSİNDE
DARBEOETİN'İN PERİTONEAL FİBROZİS
İLE PERİTONEAL DOKU MMP-2 VE TIMP-2
ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

NEFROLOJİ UZMANLIK TEZİ

Dr. ALİ BORAZAN

Bu Araştırma, Dokuz Eylül Böbrek Hastalarına Yardım ve Dayanışma ile Bilimsel Araştırmaları Destekleme Derneği tarafından 14.12.2007 tarih ve 36 sayılı kararı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ	ii
GRAFİK LİSTESİ.....	iii
RESİM LİSTESİ.....	iv
KISALTMALAR.....	vi
TEŞEKKÜR.....	ix

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY (İNGİLİZCE ÖZET).....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER.....	7
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	18
6. BULGULAR.....	30
7. TARTIŞMA.....	47
8. KAYNAKLAR	52

TABLO LİSTESİ

Tablo-1: İnsanlardaki matriks metalloproteinazların sınıflandırılması ve kromozdaki yerleri

Tablo-2: Jelatin Zimografi yönteminde poliakrilamid jellerin hazırlanması

Tablo-3: Jelatin Zimografi yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Tablo-4: Grupların çalışmanın başlangıcındaki ve sonundaki ağırlık ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel değerlendirme sonuçları

Tablo-5: Gruplara ait paryetal periton kalınlıkları, yangı skorlaması, damarlanma skorlaması ve fibrotik alan yüzdelerinin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel değerlendirme sonuçları

Tablo-6: Gruplara ait visseral periton kalınlıkları, yangı skorlaması, damarlanma skorlaması ve fibrotik alan yüzdeleri ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel değerlendirme sonuçları

Tablo-7: Paryetal periton dokusunda MMP-2 ve TIMP-2'nin tüm gruplardaki ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Tablo-8: Visseral periton dokusunda MMP-2 ve TIMP-2'nin tüm gruplarda ki ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Tablo-9: Paryetal periton dokusunda proMMP-2 ve aktif MMP-2 ve TIMP-2'nin tüm gruplardaki ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları

SEKİL LİSTESİ

Şekil -1: Peritoneal fibrozisin şematik olarak gösterilmesi

Şekil-2: TIMP-2 bağımlı MT-1 MMP aracılı MMP-2 aktivasyon mekanizması

Şekil-3: “Sandwich tip enzim immünoassay” tekniğinin şematik gösterilmesi

Şekil-4: BSA standart ölçümleme eğrisi

Şekil-5: TIMP-2 standart ölçümleme eğrisi

GRAFİK LİSTESİ

Grafik-1: Grupların çalışma başlangıcındaki ve sonundaki ağırlık ortalamaları

Grafik-2: Gruplara ait ortalama paryetal periton kalınlıkları

Grafik-3: Gruplara ait ortalama visseral periton kalınlıkları

Grafik-4: Gruplara ait ortalama paryetal periton MMP-2 düzeyleri

Grafik-5: Gruplara ait ortalama paryetal periton TIMP-2 düzeyleri

Grafik-6: Gruplara ait ortalama visseral periton MMP-2 düzeyleri

Grafik-7: Gruplara ait ortalama visseral periton TIMP-2 düzeyleri

Grafik-8: Gruplara ait ortalama paryetal periton proMMP-2 düzeyleri

Grafik-9: Gruplara ait ortalama paryetal periton aktif MMP-2 düzeyleri

Grafik-10: Gruplara ait ortalama paryetal periton aktif MMP-2/proMMP-2 düzeyleri

Grafik-11: Gruplara ait ortalama paryetal periton TIMP-2 düzeyleri

RESİM LİSTESİ

Resim-1: Sıçanların dört'lü gruplar halinde kafesteki görünümeleri görünümü

Resim-2: KH grubundaki sıçanda peritonun karın ön duvarına (A) ve karaciğer (B) üzerine yapıştığı görülmektedir

Resim-3: SF grubundaki normal karaciğer ve karın ön duvarının görünümü

Resim-4: Histopatolojik olarak KH grubuna ait periton kalınlıkları A (paryetalx20), B (visseralx20)

Resim-5: Histopatolojik olarak KH+Epo grubuna ait periton kalınlıkları A (paryetalx20), B (visseralx20)

Resim-6: Histopatolojik olarak SF grubuna ait periton kalınlıkları A (paryetalx20), B (visseralx20)

Resim-7: KH grubundaki paryetal peritonda damar lümenindeki hiyalinizasyon ve damar çapının daraldığı görülmektedir

Resim-8: KH grubuna ait Von Gieson ile paryetal periton fibrozisi (sol), imaj analizi ile yüzde seçimi (sağ). Kırmızı boya ile boyanan alanlar fibrozisi göstermektedir

Resim-9: KH+Epo grubuna ait Von Gieson ile paryetal periton fibrozisi (sol), imaj analizi ile yüzde seçimi (sağ). Kırmızı boya ile boyanan alanlar fibrozisi göstermektedir

Resim-10: SF grubuna ait Von Gieson ile paryetal periton fibrozisi (sol), imaj analizi ile yüzde seçimi (sağ). Kırmızı boya ile boyanan alanlar fibrozisi göstermektedir

Resim-11: İmmünohistokimyasal olarak KH grubuna ait peritondaki MMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)

Resim-12: İmmünohistokimyasal olarak KH+Epo grubuna ait peritondaki MMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)

Resim-13: İmmünohistokimyasal olarak SF grubuna ait peritondaki MMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)

Resim-14: İmmünohistokimyasal olarak KH grubuna ait peritondaki TIMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)

Resim-15: İmmünohistokimyasal olarak KH+Epo grubuna ait peritondaki TIMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)

Resim-16: İmmünohistokimyasal olarak SF grubuna ait peritondaki TIMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)

Resim-17: Gruplara ait paryetal periton proMMP-2 ve aktif MMP-2'nin jelatin zimoğrafik görünümü

KISALTMALAR

CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
MMP-2	Matrix Metalloproteinases-2
MMP-9	Matrix Metalloproteinases-9
MT-MMP	Zara bağı MMP
TIMP-1	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases-1
TIMP-2	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases-2
TIMP-3	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases-3
TIMP-4	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases-4
proMMP-2	Öncül Matriks Metalloproteinaz-2
NaCl	Sodyum Klorür
HE	Hematoxilene & Eosine
MT	Masson's Trichrome
ELISA	Enzyme-Linked Immunoassay
SAPD	Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi
KH	Klorheksidin glukonat
SDBY	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
PD	Periton Diyalizi
SAPD	Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi
APD	Aletli Periton Diyalizi
GAPD	Gece Aletli Periton Diyalizi
SDPD	Sürekli Döngüsel Periton Diyalizi
AGEs	Glikozilasyon Son Ürünleri
IL-1 β	İnterlökin-1 β
TNF- α	Tümör nekrozis faktör- α
IL-6	İnterlökin-6
FGF2	Fibroblast büyüme faktörü-2
TGF- β	Tümör büyüme faktörü- β
EGF	Damar endotel büyüme faktörü
HGF	Hepatosit büyüme faktörü
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentetaz
PDGF	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
rHuEPO	Rekombinant insan eritropoetin
Epo	Eritropoetin
ml	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimol
μ l	Mikrolitre
kDa	Kilodalton
TCA	Trikloroasetikasit
BCA	Bicinkoninik Asit
Cu ⁺⁺	Bakır
Zn ⁺⁺	Çinko
nm	Nanometre,
μ m	Mikrometre
BSA	Sığır Serum Albumin
μ g	Mikrogram

SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
d	Distile
TMB	Tetrametilbenzidin
ng	Nanogram
EIA	Enzim Immunoassay
H RP	At Radish Peroksidaz
pg/mg protein	pikogram/miligram protein
pmol/mg protein	pikomol/miligram protein

TEŞEKKÜR

Nefroloji uzmanlık eğitimi boyunca bilgi, beceri ve tecrübeleriyle yetişmemde büyük katkıları bulunan ayrıca Tıp biliminde Türkçe diline verdiği önem ve çalışmalarından dolayı Nefroloji Bilim Dalı Başkanı hocam sayın Prof. Dr. Taner ÇAMSARI'ya, beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum diğer hocalarım Nefroloji Bilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Ali ÇELİK, Doç. Dr. Caner ÇAVDAR, Doç. Dr. Aykut SİFİL'e teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında büyük emekleri bulunan Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sülen SARIOĞLU ve Araş. Gör. Dr. Anıl AYSAL'a, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülgün OKTAY ve Dr. Zahide ÇAVDAR'a, Multidisipliner Laboratuvarı ve Laboratuvar Hayvanlarının Sağlık Bilimlerinde Kullanımını Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Osman YILMAZ ve Araştırma Görevlisi Efsun KOLATAN'a teşekkür ederim.

Ayrıca bu araştırmanın maddi desteğini sağlayan “Dokuz Eylül Böbrek Hastalarına Yardım ve Dayanışma ile Bilimsel Araştırmaları Destekleme Derneği” başkanı Sayın Prof. Dr. Taner ÇAMSARI'ya, dernek saymanı Prof. Dr. Ali ÇELİK'e, dernek genel sekreteri Doç. Dr. Caner ÇAVDAR'a ve diğer yönetim kurulu üyelerine ayrı ayrı teşekkür ederim.

Doç. Dr. Ali BORAZAN

ÖZET

SIÇANLARDA KİMYASAL PERİTONİTE BAĞLI PERİTON FİBROZİSİNDE DARBEPOETİN'İN PERİTONEAL FİBROZİS İLE PERİTONEAL DOKU MMP-2 VE TIMP-2 ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Ali BORAZAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi

İç Hastalıkları AD/ Nefroloji Bilim Dalı

Yazışma Adresi: DEÜTF İç Hastalıkları AD Nefroloji BD İnciraltı/ İZMİR

Elektronik posta:borazanali@hotmail.com

Uzun süreli periton diyaliz (PD) tedavisi sonrası periton zarında meydana gelen patolojik değişiklikler sonucu enkapsüle periton sklerozu (EPS) gelişebilir. EPS, PD'nin ciddi bir komplikasyonu olup PD yetersizliğine ve ölüme neden olabilir. Günümüzde henüz tam olarak tedavisi mümkün değildir. Darbepoetin; bir hemopoetik büyüme faktörü olup anemi tedavisinde kullanılır. Darbepoetin'in peritoneal fibrozisteki etkinliğini gösteren henüz bir çalışma yoktur. Bazı çalışmalarda kalp, beyin ve böbrekte gelişen fibroziste, fibrozisi azalttığı gösterilmiştir.

Amaç: Bu çalışmada darbepoetin'in; sıçanlarda tuzlu su içinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 klorheksidin glukonat bulunan solusyon ile peritoneal fibrozis gelişimi ve peritoneal fibrosis gelişimi ile ilgili olabilecek peritoneal doku MMP-2 ve TIMP-2 üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Yirmi dört adet dişi Wistar albino sıçan üç gruba bölündü. Grup1 (KH grubu): Kimyasal peritonit oluşturmak için tuzlu su içinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 KH bulunan karışımı 3 ml / gün karın içine, grup 2 (KH+Epo grubu): tuzlu su içinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 KH bulunan karışımı 3 ml / gün karın içine + ilk gün ve yedinci günde darbepoetin 12.5 mcg/kg dozunda iki kez ciltaltına, grup 3 (SF grubu): %0,9'luk serum fizyolojikten 3 ml / gün karın içine uygulandı. Karın içine tüm uygulamalar karnın sağ alt kadrından 21 gauge iğne ile yapıldı. Çalışma süresi 14 gün olarak belirlendi. 15.günde sıçanlar sakrifiye edildi ve paryetal periton için karın sol ön duvarından visseral periton için karaciğer üzerinden örnekler alındı. Patolojik inceleme için Hematoksilen &

Eosin (HE) ve Von Gieson (VG) boyası kullanıldı. Işık mikroskopisi ile paryetal ve visseral peritonun kalınlığı, damar çoğalması, fibrozis ve yangı değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak MMP-2 ve TIMP-2 antikor boyaları kullanılarak ışık mikroskopisi ile değerlendirildi. Biyokimyasal olarak paryetal periton doku örneklerinde MMP-2 ve TIMP-2 çalışıldı. MMP'lerin çalışılmasında jelatin zimografi, TIMP'ler için ELİSA yöntemi kullanıldı.

Bulgular: Histopatolojik değerlendirmede HE ve VG ile KH+Epo grubunda KH grubuna göre paryetal ve visseral peritonda kalınlık azalması istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Yangı skorlaması, damarlanma skorlaması ve fibrotik alan yüzdesi açısından anlamlı fark bulunmadı ($P>0,05$) İmmünohistokimyasal olarak Darbepoetin paryetal ve visseral peritonda MMP-2'yi KH grubuna göre baskımlarken ($p<0,05$), TIMP-2 üzerine etkili bulunmamıştır ($p>0,05$). Biyokimyasal olarak ise paryetal peritonda aktif MMP-2'nin proMMP-2'ye oranı KH+Epo grubunda KH grubuna göre artırması anlamlı bulunurken ($p<0,001$), Hem KH grubunda hemde KH+Epo grubunda TIMP-2 düzeylerinin kontrol grubuna göre baskımlandığı ($p<0,05$) görüldü.

Sonuç: Darbepoetin; KH ile oluşturulan kimyasal peritonit sonrasında histopatolojik olarak peritoneal fibrozis gelişimini azaltmaktadır. Darbepoetin'in periton fibrozisine neden olmadığı ve periton fibrozisini engelleyebileceği söylenebilir. Ancak bu konuda gerek doz ile ilgili gerekse süre ile ilgili geniş çaplı deneysel ve klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Peritoneal fibrozis, darbepoetin, MMP-2, TIMP-2

SUMMARY

THE EFFECTS OF DARBEPOETIN ON PERITONEAL FIBROSIS INDUCED BY CHEMICAL PERITONITIS AND ON PERITONEAL TISSUE MMP-2 AND TIMP-2 LEVELS AT RATS

BORAZAN, Ali MD

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

Address for correspondence: DEÜTF İç Hastalıkları AD/ Nefroloji BD- İZMİR

e-mail: borazanali@hotmail.com

Encapsulating peritoneal sclerosis (EPS) may develop as a result of pathological changes occurring at peritoneal membrane after long-term peritoneal dialysis (PD). EPS is regarded as a serious complication of peritoneal dialysis, and may lead to inadequate dialysis and death. Currently, no validated guidelines for management of EPS exist. Darbepoetin, a hematopoietic growth factor, is a synthetic analogue of erythropoietin and used as an erythropoiesis stimulating agent. The study showing effectiveness of darbepoetin on peritoneal fibrosis is not available yet. However, there are some studies showing that it can decrease fibrosis in heart, brain, and kidneys.

Objective: To assess the influence of darbepoetin on development of peritoneal fibrosis on rats induced by daily injections of chlorhexidine gluconate (0,1%) and ethanol (15%) dissolved in saline, and on peritoneal tissue levels of MMP-2 and TIMP-2 that may be regarded as factors playing role on development of peritoneal fibrosis.

Subjects and Methods: Twenty-four female Wistar albino rats were divided into three groups. The first group received 3 ml daily injections of chlorhexidine gluconate (0,1%) and ethanol (15%) dissolved in saline intraperitoneally to induce chemical peritonitis; group 2 (Chlorhexidine gluconate and Epo group) received 3 ml daily injections of chlorhexidine gluconate (0,1%) and ethanol (15%) dissolved in saline and also darbepoetin 12.5 microgr/ per kilogram/ day subcutaneously on the first and seventh days; group 3 (saline group) received 0.9% saline (3 ml/d) intraperitoneally through right lower quadrant by 21 gauge needle. The study duration was fourteen days. On the fifteenth day rats were sacrificed, parietal and visceral peritoneum samples were obtained from left anterior abdominal wall and liver, respectively. Pathological samples were examined using Hematoxyline & Eosin

(HE), and Von Gieson (VG) stains. The thickness, vascular proliferation, and inflammation were determined by light microscopy. MMP-2 and TIMP-2 were studied immunohistochemically by monoclonal antibody staining. The expression of MMP-2 on parietal peritoneum were studied biochemically by using gelatin zymography, and of TIMP-2 by ELISA.

Results: The decrease in thickness of parietal and visceral peritoneum in group 2 was statistically significant when compared to group 1 ($p < 0.05$). Inflammation scores, vascularization scores, and the percentages of fibrotic surfaces were not statistically different between these groups ($p > 0.05$). Immunohistochemically darbepoetin was shown to decrease MMP-2 expression on parietal and visceral peritoneum than group 2 ($p < 0.05$), but has no effect on TIMP-2 ($p > 0.05$). Biochemically the ratio of active MMP-2 to proMMP-2 was significantly increased in group 2 than group 1 ($p < 0.001$), however, TIMP-2 levels in both groups were decreased compared to control group ($p < 0.05$).

Discussion: Darbepoetin histopathologically reduces peritoneal fibrosis induced by chlorhexidine gluconate. We can suggest that Darbepoetin does not cause peritoneal fibrosis and may prevent peritoneal fibrosis. But from dosage and duration points of view we need extended further clinical and experimental studies.

Key Words: Peritoneal fibrosis, darbepoetin, MMP-2, TIMP-2

GİRİŞ VE AMAC

Periton diyalizi (PD), böbrek işlevlerinin azalmasında veya kaybolmasında uygulanan etkinliği ve güvenliği kanıtlanmış böbrek yerine koyma tedavilerinden birisidir. Zaman içinde periton zarında gelişen değişiklikler periton diyalizinin sonlandırılmasına neden olmaktadır. Periton diyaliz etkinliğinin azalmasının en önemli nedenlerinden biri ise peritoneal fibrozistir (1,2).

Peritoneal yangı reaksiyonu; periton diyaliz solüsyonlarındaki; a) yüksek glikoz içeriği b) yüksek osmotik yapı c) düşük pH d) ileri glikozilasyon son ürünleri e) laktat içeriği, ayrıca tekrarlayan peritonitlere bağlı ve üreminin neden olduğu karbonil strese bağlı olarak başlamaktadır. Bu etkenlerle peritoneal mezotel hücreleri, diğer peritoneal hücrelerle (peritoneal fibroblast, makrofaj, monosit, nötrofil) ve bu hücrelerden salınan sitokinlerin etkisiyle peritoneal fibrozis gelişmesine katkıda bulunurlar. Peritoneal fibrozis gelişiminde asıl patogenetik mekanizma peritoneal mezotel hücrelerinin ve/veya peritoneal fibroblastların aşırı üretimi ve hücre dışı sıkı dokunun (matriks) aşırı birikimidir (1,2). Periton zarında gelişen bu patolojik değişiklikler, PD'nin ciddi bir komplikasyonu olan sklerozan enkapsüle peritonite (SEP) ilerleyebilir. Uzun süreli PD ile görülen membran değişiklikleri; ciddi mezotel altı kalınlaşma, mezotel hücrelerinde azalma ve vaskülopati ile birlikte görülen yeniden damarlanmadır. Periton membranının solüt geçirgenliğindeki değişiklik, vaskülopati ile artan damar yüzey alanı ile ilişkilidir. Yeniden damarlanma ve vaskülopati, su ve solüt geçirgenliğinde önemli etkiye sahiptir (3).

Yakın zamanlı çalışmalarda deneysel periton fibrozis modelinde ve insanlarda SEP'de, periton dokusu ve sıvısında başlıca matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) olmak üzere MMP yapımında artış olduğu gösterilmiştir (2,4). MMP-2 başlıca fibroblastlar, epitelyal hücreler ve makrofajlardan tarafından salınırken, MMP-9 nötrofiller başta olmak üzere yangı hücrelerinden salınır (2,5). İnterlökin 1(IL-1), transforme edici büyüme faktörü (Transforming growth factor-beta = TGF-β) ve hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte growth factor = HGF) mezotel hücrelerinden MMP salınımını artırır. Uyarılmış endotel hücreleri de damar yapımında (anjioenez) rol alan MMP-2 ve MMP-9 salınımına neden olur. MMP baskılayıcıları, yangı, fibrozis ve tümör invazyonunun engellenmesinde kullanılmıştır (6). MMP'lerin aktiviteleri; dokularda enzime özgül ve doğal olan doku matriks protein inhibitörleri (TIMP) ve α-makroglobülin tarafından durdurulur. Dört farklı

TIMP tanımlanmıştır (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4). TIMP'ler ve MMP'ler arasındaki denge hücre dışı sıkı doku depolanması ve yıkımı arasındaki dengede de anahtar rol oynarlar (6).

Darbepoetin; bir hemopoetik büyüme faktörü olup rekombinant insan eritropoetin (rHuEPO)'nun sentetik analogudur ve aynı endikasyonlarda kullanılır. Aneminin tedavisinde milyonlarca hastada kullanılmıştır. Son zamanlarda hücreleri koruyucu işlevlerinin de olduğu gösterilmiştir (7).

Travmatik kafa yaralanmasında, subaraknoid kanamalarda serebral infarkt alanını %75 azalttığı gösterilmiştir (8). Koroner iskemide kardiyomyosit kaybını, sol ventrikül hacmini ve işlevsel azalmayı %50 oranında düzelttiği gösterilmiştir (9). Ayrıca süregen siklosporin A toksisitesinde interstisyel fibrozis ve yangıda böbrekleri koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (10).

rHuEPO'nun; TGF- β mRNA ekspresyonunu azalttığı, apoptotik hücre ölümünü azalttığı, böbrek tubül hücrelerinde çoğalmayı artırdığı, düşük dozlarda hemoglobin ve hematokrit düzeylerini etkilemediği değişik çalışmalarda gösterilmiştir(7,11,12).

Darbepoetin 5/6 nefrektomize edilmiş deney hayvanlarında damarsal sklerozis, glomerulosklerozis ve tubulointerstitiyel hasarı önleyici etkisi gösterilmiştir (13).

Darbepoetin'in peritoneal fibrozisteki etkinliğini gösteren henüz bir çalışma yoktur.

Amaç

Bu çalışmada, sıçanlarda tuzlu su içinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 KH bulunan solusyon ile oluşturulan kimyasal peritonite bağlı periton fibrozisinde darbepoetin'in peritoneal fibrozis, peritoneal dokuda immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak MMP-2 ve TIMP-2 üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

1. Periton Zarı

Periton; barsakları ve diğer iç organları örten visseral periton ve karın duvarını örten paryetal peritondan oluşan seröz bir zardır. Periton zarının anatomik yüzey alanı vücut yüzey alanı ile eşittir ve 1,7- 2 m² arasında olduğu hesaplanmıştır. Visseral periton peritonun % 80'nini oluşturur, süperior mezenterik arterden beslenir ve venöz dönüşü portal sisteme olur. Paryetal periton lomber, interkostal ve epigastrik arterlerden kanlanır ve venöz dönüşü inferior vena kavaya olur. Toplam periton kan akımının 50- 100 ml / dk arasında olduğu tahmin edilmektedir. Periton ve periton boşluğunun ana lenfatik drenajı diyafragmatik peritonda olan açıkagızlar, visseral ve paryetal peritondaki lenfatik kanallar yoluyla olmaktadır (14,15).

Normal pariyetal membran yüzeyi devamlılık gösteren ince ve kaygan bir sıvı tabakası oluşturan tek katlı mezotel hücreleri ile örtülüdür. Bu hücreler ideal koşullarda yüzeylerini mikrovilluslar ile arttırır. Mezotel hücreleri tip 4 kollajenden oluşan bazal membran üzerine yerleşmiştir. Membranın mezotel altı sıkı dokusu elastik fibrilleri ile sarılmış kollajen lifleri içerir. Makrofajlar ve fibroblastlar dendrositlerle bu sıkı dokudan geçerler. Vasküler yatak, sıkı doku ve altındaki adipoz dokuda maksimumdur (14,15).

Periton, küçük moleküllü maddelere ve sıvılara karşı yarı geçirgen bir zar olarak görev alırken, aynı zamanda da diyafram bölgesinde belli alanlarda fizyolojik şartlarda büyük moleküllü maddelerin ve bakterilerin kana geçişlerini engeller. Böyle büyük molekül mezotel hücreleri arasında bulunan bazı açıklıklardan emilebilirler. Mezotel hücreleri arasındaki açıklıklar elastiktir ve çapı 10 µ' a kadar olan moleküllerin geçişine izin verirler. Ekspirasyon sırasında lakünalar dolar ve bunlar inspirasyon sırasında diyaframın kasılması ile lenfatik sisteme boşaltılır. Bu mekanizma ile bakterilerin peritondan hızlı bir şekilde uzaklaştırılması mümkün olur (14,16).

Periton diyalizinde sıvı ve solüt taşınmasında periton zarının etkin yüzey alanı önemlidir. Etkin peritoneal yüzey alanı, diyaliz solüsyonu ile temasta olan ve solüt ve sıvı taşınmasına katkıda bulunan kapillerler tarafından perfüze olan periton yüzey alanı olarak tanımlanır. Periton zarının geçirgenliği, kapiller duvar, intersitisyum ve mezotelyum tarafından yaratılan dirençle belirlenir (15,16,17).

2. Periton Diyalizi

Periton diyalizi, sıvı içeren iki bölüm arasında bir zar aracılığı ile su ve solütlerin geçişi işlemidir. Su ve solütlerin taşınması, yarı geçirgen periton zarındaki kan ve diyaliz solüsyonu arasındaki hidrostatik ve ozmotik basınç gelişmesiyle oluşmaktadır. Bu nedenle periton zarının fiziksel özellikleri (yüzey alanı ve geçirgenlik) solüt ve su taşınmasında en önemli belirleyicilerdir (18).

Sürekli periton diyalizi; sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) ve aletli periton diyalizi (APD) diye ikiye ayrılır. SAPD’de günde dört veya beş kez, hastanın karın içi hacmine ve sıvıyı tahammül edebilirliğine göre 2- 2,5- 3 L sıvı verilir, 4- 6 saatlik bekleme süreleri sonrasında sıvı boşaltılır ve yerine yeni sıvı verilir. Bu işlem hasta tarafından elle yapılır ve yer çekimi kurallarından yararlanır. APD’de ise sıvıyı hastanın karnına veren ve daha sonrada boşaltımı sağlayan bir cihaz kullanılır. APD’de kendi içinde sürekli çevrimsel periton diyalizi (SSPD: hastanın gündüz karnında sıvı vardır ve gece cihaza bağlanmadan önce bu sıvıyı boşaltır) ve gece aralıklı periton diyalizi (GAPD: hastanın karnı gündüz boş tutulur ve gece cihaza bağlanır) olmak üzere ikiye ayrılır ayrıca SAPD ve APD’nin ortak kullanıldığı melez tedavi seçenekleride vardır (19–20).

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

Yapılan çalışmalarda PD uygulanan hastalarda aynı özellikteki hemodiyaliz hastalarına oranla yaşam süresinde 3 yıldan fazla artış olduğu gösterilmiştir (21). Aynı zamanda PD ile tedaviye başlanıp devamında hemodiyalize geçilen hastalarda da sadece hemodiyaliz uygulananlara göre yine yaşam süresi uzamıştır (22).

Periton diyalizinin mekanik yan etkileri; ie akım ağrısı, dışa akım yetersizliği, kateter pozisyon bozukluğu, herni oluşumu, karın duvarı ve kateter çevresi sızıntısı, genital dem, solunumsal yan etkileri (hidrotoraks, solunum fonksiyonlarında değişiklik), sırt ağrısı, UF yetersizliği ve sklerozan enkapsüle peritonittir (23–26).

Metabolik komplikasyonları; beslenme bozukluğu, glukoz emilimi, lipid bozuklukları, protein kaybı, sodyum düşüklüğü/fazlalığı, potasyum düşüklüğü/fazlalığı, kalsiyum düşüklüğü/fazlalığı, fosfor düşüklüğü/fazlalığı, düşük ve yüksek döngülü kemik hastalığı ve artmış kardiyovasküler hastalıklardır (25–27).

İnfeksiyöz komplikasyonları; kateter giriş yeri infeksiyonu, tünel infeksiyonu ve peritonittir (7).

3. Periton diyalizini sonlandırma nedenleri

PD hastalarının %50'sinin tedavisine çeşitli nedenlerle son verilmektedir. Bunun en sık nedenleri; böbrek nakli, tekrarlayan infeksiyonlar (peritonit ya da tünel infeksiyonları) ve UF'de azalma (peritoneal membranda meydana gelen değişikliklere bağlı olarak)'dır. Uygulanan diyaliz süresi ile ya da tekrarlayan peritonitlere bağlı olarak gelişen periton zarı morfolojisindeki değişimi gösteren sınırlı sayıda küçük çalışma mevcuttur. Henüz bu konuda yapılmış geniş çaplı bir araştırma yoktur (29–31).

4. Ultrafiltrasyon (UF) Yetersizliği

Glukoz temelli %4.25'lik ya da 3.86'lık solusyonlardan iki litre karın içine konulduğu ve dört saat beklendiği zaman 2400ml'den daha az boşaltım hacmi UF yetersizliğini gösterir. UF yetersizliği, kapillerarası UF hızı ile lenfatik emilim hızı arasındaki denge değiştiği zaman ortaya çıkar. Klinik olarak bu durum, sıvı yüklenmesi bulgularını ortadan kaldırmak için daha hipertonic değişimlere gereksinim olması ile tanımlanır (32). Bu değişiklikler a) daha fazla glukoz emilimi ve osmolar gradyenin daha hızlı yok olmasına yol açan yüzey alanı/geçirgenlik artışına (tip I UF yetersizliği), b) su ve solüt taşınmasını önemli derecede kısıtlayan etkin peritoneal yüzey alanı/geçirgenlikte ciddi azalmaya (tip II UF yetersizliği), c) lenfatik emilim artışına (tip III UF yetersizliği), ve d) osmotik gradyanın dilüsyonla daha hızlı kaybına yol açan rezidüel hacim artışına bağlıdır.

Peritoneal eşitleme testi (PET) hem su hemde solüt taşınmasının önemli bir değerlendirme yoludur. UF yetersizliğinin değerlendirilmesine yardımcı olur (32,33).

5. Peritoneal Fibrozis

Fibrozis doku hasarlanmasına verilen olağan bir yanıttır ve yara iyileşmesi, glomerülonefrit, siroz, akciğer fibrozisi gibi farklı klinik durumlarda görülür. Yara iyileşmesi dışındaki durumlarda görülen fibroziste, fibröz doku normal dokunun yerini almakta ve organ işlev bozuklukları gelişmektedir. Peritoneal fibrozis düzenli periton diyalizi yapan hastaların periton biyopsilerinde yaygın bir bulgudur. Büyük kohort çalışmalarında PD yapan hastalarda peritoneal membran değişiklikleri periton biyopsileri ile gösterilmiştir (34). Periton membranında oluşan değişiklikler özellikle mezotel altında görülen yangı, fibrozis ve damarlanmaya neden olmakta ve sonuçta UF yetmezliği gelişmektedir (35).

Yapılan çalışmalarda periton diyaliz süresi ile paryetal peritondaki submezotelyal yoğun bölgede artış gözlenmiştir. Üremi tek başına submezotelyal kalınlaşma ile ilişkili iken özellikle sekiz yıldan fazla süredir periton diyalizi yapan hastalarda bu kalınlaşma çok daha belirgin olup periton membran yetmezliğinden dolayı kateterin çıkarılmasına neden olmaktadır (5). Periton diyaliziyle ilişkili olan peritoneal fibrozis, periton parlaklık kaybından, SEP'e kadar olan çeşitli görünümelerde kendini gösterir. SEP bağırsak tıkanıklığı, kilo kaybı, ultrafiltrasyon yetmezliği, periton diyalizinin sonlandırılması hatta ölüme kadar giden durumlara yol açabilir (36). Peritoneal fibrozis, peritoneal diyaliz hastalarında çeşitli hasarlanmalara karşı yanıt olarak gelişir. Bu hasarlanmalar arasında biyoyumsuz diyaliz solüsyonları, peritonitler, üremi ve süregen yangı sayılabilir (37). Üremi; peritoneal karbonil stres ve ileri glikozilasyon son ürünlerin (AGEs) oluşumunu hızlandırır (38). Peritonit atakları ve PD solüsyonları ile peritoneal yangı sürekli uyarılır. Bu bileşenlerin birlikteliği ile peritoneal mezotel hücreler diğer peritoneal hücre toplulukları(peritoneal makrofaj, fibroblast, monosit ve nötrofiller) ve onlardan salınan çeşitli sitokinler aracılığıyla peritoneal fibrozis gelişir. Peritoneal fibrozis gelişimi şematik olarak Şekil-1'de gösterildi. Peritoneal fibrozis gelişimde ana patogenik mekanizma peritoneal mezotelyal hücrelerin ve fibroblastların aşırı üretimi sonucu hücre dışı matriks birikimidir (14,37,38).

Peritoneal fibrozis gelişiminde mezotel hücrelerin fibroblastlara dönüşümü ve çoğalmaları gösterilmiştir (39). MMP- 2 enziminin mezotel hücrelerindeki dönüşümü önlediği gösterilmiştir (40).

6. Matriks metalloproteinazlar ve doku inhibitörleri

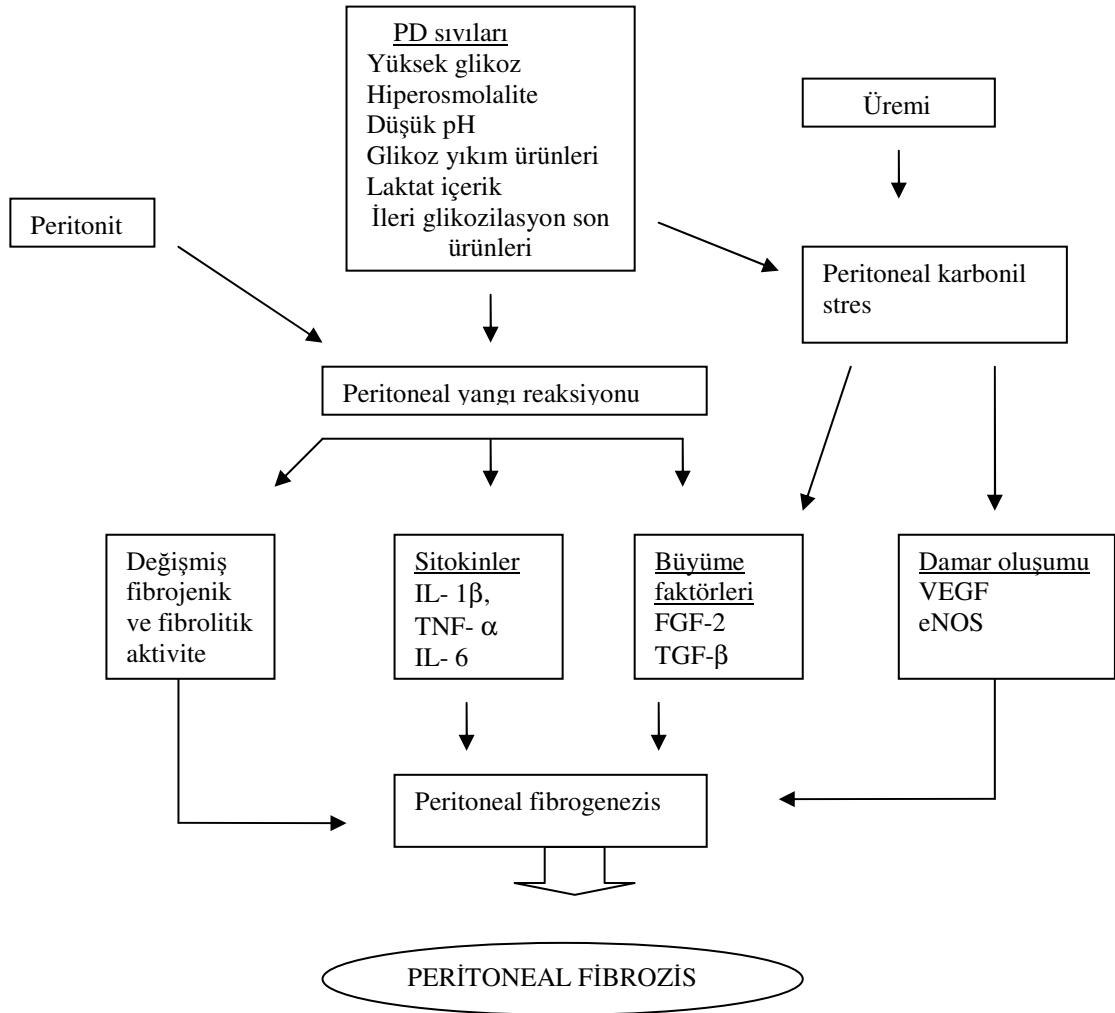
Matriks metalloproteinazları (MMP); hücre dışı sıkı doku ile bazal membran bileşenlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve aktif bölgesinde çinko (Zn^{++}) ve kalsiyum (Ca^{++}) bulunduran homolog bir enzim ailesidir. MMP'ler fizyolojik ve patolojik doku yıkımında önemli rol oynayan hücre dışı proteazlardır. MMP'ler, lökositler, keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler, düz kas hücreleri gibi epitelial ve mezenkimal kökenli hücreler tarafından sentezlenirler (41,42).

Birçok MMP embriyogenez aşamasında yaygın olarak sentez edilir. Yetişkinlerde ise plasentada, endometriyumda, meme bezlerinin involüsyonu esnasında ve yangıda hızla eksprese edilirler. Embriyonik gelişim, apoptoz, kemik uzaması, üreme, damar oluşumu (anjyogenez), dokunun yeniden yapılanması, multipl skleroz, sistemik lupus eritematozus, ovulasyon, artrit, periodontit, glomerulonefrit, ateroskleroz, doku ülserleri, kanser hücresi invazyonu ve yayılımı, yangı, kronik akciğer hasarı, bronşiyal astım, pulmoner hipertansiyon gibi birçok hastalığın patolojisinde MMP'ler önemli rol oynamaktadır (43).

MMP enzim ailesinin bugüne kadar tanımlanmış ve sınıflandırılmış 66'dan fazla üyesi bulunmaktadır. Bunlardan 23'ünün insanlarda sentez edildiği kromozomlardaki yeri gösterilmiştir. MMP'ler substrat özelliklerine göre sınıflandırılırlar. MMP-1 (aradoku kollajenazı) Tip 1 kollajenin yıkımından sorumlu iken MMP-2 ve -9 (Jelatinaz A-B) Tip 4 kollajenin, MMP-3 ise (Stromelizin) Tip 4-5 kollajen ve proteoglikanların yıkımından sorumludur. MMP'lerin sınıflandırılması, kromozomdaki yeri ve yıktıkları ana maddeler Tablo -1'de gösterilmiştir (6).

MMP'ler pre-proenzim şeklinde sentezlenir ve latent öncüenzim olarak salınırlar, N-terminal peptidin proteolitik ayrılması ile etkinleşirler.

MMP'lerin aktiviteleri belli basamaklarda düzenlenmektedir. Bunlar; a) gen transkripsiyonu, b) mRNA stabilitesi, c) translasyonel kontrol d) hücre ile birleşmesi e) zimojen aktivasyonu f) doğal inhibitörlerdir (6,44). MMP'lerin aktiviteleri; dokularda enzime özgül ve doğal olan doku matriks protein inhibitörleri (TIMPs) ve serum α -makroglobülin tarafından durdurulur. Yeniden yapılanmadaki hücre dışı sıkı doku miktarı aktif MMP'lerin TIMP'lere oranına bağlıdır. Eğer oran MMP'ler yönündeyse hücre dışı sıkı dokunun yıkımı olurken, eğer oran TIMP'ler lehine ise yıkım durdurulur ve sıkı doku depolanması olur (45). TIMP'ler MMP' lere sıkıca bağlanırlar ve kompleks oluştururlar (46).



Şekil -1: Peritoneal fibrozisin şematik olarak gösterilmesi

MMP'ler hücrel çöğalmanın 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 (47).

TNF- α ve IL- 1β gibi yangısal sitokinler, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri MMP ve TIMP üretiminde artışa neden olurlar. TIMP-1'in MMP- 1, MMP- 3 ve MMP- 9 üzerine inhibitör etkisi belirgin, TIMP-2'nin MMP-2 üzerine inhibitör etkisi daha belirgindir (48). Aterosklerozis, böbrek fibrozisi, pulmoner fibrozis ve hepatik fibrozis gibi farklı fibrozis süreçlerinde MMP- 2, MMP- 9 düzeylerinde artış gösterilmiştir (49).

Peritonda ise MMP'ler ve TIMP'lerin peritoneal mezotelyal hücreler, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından üretildikleri gösterilmiş ve periton hücre kültürlerinde MMP- 2, MMP- 3 ve MMP- 9, TIMP- 1 ve TIMP- 2 aktivitelerinin belirgin olduğu ölçülmüştür (48). Yapılan farklı çalışmalarda peritoneal fibroziste ve peritonitler sırasında periton sıvısında MMP- 2, MMP- 9, TIMP- 1 ve TIMP-2 artışı gösterilmiştir (50–51).

7. MMP enzim aktivitesinin inhibisyonu

MMP aktivitesinin kontrolünde çok özel doku inhibitörleri olan TIMP'ler anahtar rol oynarlar. Bundan başka α 2-makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve sentetik inhibitörler de aktif MMP inhibitörleri arasında yer alırlar (52). TIMP'ler bağ dokusu metabolizmasının düzenlenmesinde temel olan proteinlerdir (42).

TIMP'ler birçok dokuda ve vücut sıvılarında bulunurlar. MMP'lere geri dönüşsüz ve kovalent olmayan biçimde bağlanarak latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe ederler. Böylece TIMP'ler MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini sıkı kontrol altında tutarlar (42,53,54) Bugüne kadar insanlarda TIMP-1, 2, 3 ve 4 olmak üzere 4 TIMP türü tespit edilmiştir (42,54). TIMP'ler de MMP'ler gibi vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentez edilirler (52,55). TIMP'ler MMP aktivitesini inhibe etme yönünden benzerlik göstermekle beraber sıkı dokudaki yerleşimleri ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi yönünden aralarında farklar vardır. Ayrıca değişik MMP türlerine göre de özgüllük gösterirler. Örneğin; Jelatinaz A (MMP-2) tercihen TIMP-2 ile Jelatinaz B (MMP-9) ise TIMP-1 ile inhibe edilirler (56).

Grup adı	Tanımlayıcı isim	MMP-numara	Kromozomdaki yeri	Yıktıkları ana maddeler
KOLLAJENAZLAR	Aradoku kollajenazları	MMP-1	11q22-q23	Fibriller kollejenler, Tip I, II, III
	Nötrofil kollajenazlar	MMP-8	11q21-q22	
	Kollejenaz-3	MMP-13	11q22.3	
	Xenopus kollejenaz	MMP-18	Bilinmiyor	
JELATİNAZLAR	Jelatinaz A	MMP-2	16q13	Fibriller olmayan kollajenler, tip IV, V
	Jelatinaz B	MMP-9	20q11.2-q13.1	
STROMELİZİNLER	Stromelizinler -1	MMP-3	11q23	Proteoglikanlar, laminin, fibronektin, fibriller olmayan kollajenler
	Stromelizinler -2	MMP-10	11q22.3-q23	
	Stromelizin -3	MMP-11	22q11.2	
MATRİLİZİNLER	Matrilizin-1	MMP-7	11q21-q22	Serin proteaz inhibitörleri
	Matrilizin 2	MMP-26	11p15	
MEMBRAN TİP (Transmembran tip)	MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12	Projelatinaz A
	MT2-MMP	MMP-15	15q13-q21	
	MT3-MMP	MMP-16	8q21	
	MT5-MMP	MMP-24	20q11.2	
MEMBRAN TİP	MT4-MMP	MMP-17	12q24.3	Projelatinaz A
	MT6-MMP	MMP-25	16p13.3	
SINIFLANDIRILMAMIŞ	Makrofaj elastaz	MMP-12	11q22.2-q22.3	Bilinmiyor
	-	MMP-19	12q14	
	Enamelizin	MMP-20	11q22.3	
	-	MMP-21	Bilinmiyor	
	CA-MMP	MMP-23	1p36.3	
	-	MMP-27	11q24	
	Epilizin	MMP-28	17q21.1	

Tablo-1: İnsanlardaki matriks metalloproteinazların sınıflandırılması ve kromozomdaki yerleri

Aktif MMP inhibitörlerinden biri olan α 2-makroglobulin yüksek molekül ağırlıklı bir serum proteinidir ve aktif MMP-2'ye bağlandığında onun total molekül ağırlığını arttırarak hareket yeteneğini kısıtlar. Ayrıca inhibitör etkinliğinin sıvı fazda gerçekleştiği ileri sürülmektedir (42,52).

TIMP'ler MMP molekülünün Zn^{++} içeren aktif bölgesine bağlanarak enzimde yapısal değişikliğe yol açarlar ve enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar (57). Son yıllarda peptid ve peptid olmayan yapıda sentetik MMP inhibitörleri de üretilmiştir (58-61). Bu inhibitörler en çok kanser tedavisinde olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar, artrit, psöriyazis, periodontal hastalık ve makula dejenerasyonu gibi farklı hastalıkların tedavisinde denenmiştir (59,62,63).

8. TIMP-2 bağımlı MT-1 MMP aracılı proMMP-2 aktivasyon mekanizması

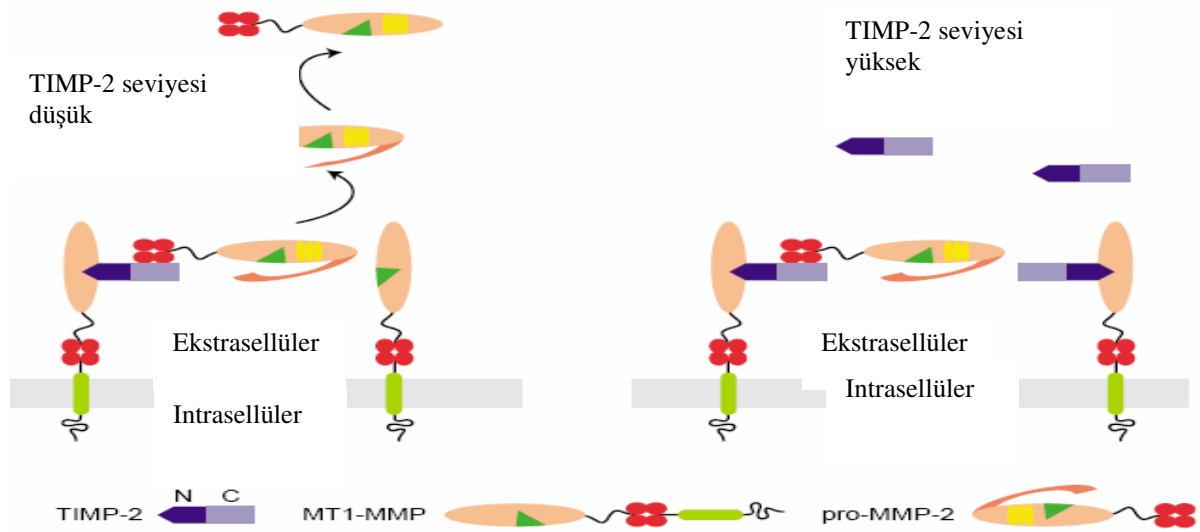
MMP-2'nin aktivasyon mekanizması, diğer MMP'lerden farklı olarak hücre yüzeyinde TIMP-2 bağımlı MT-1 MMP aracılı mekanizma ile gerçekleşmektedir. MMP-2'nin endojen inhibitör proteini olarak tanımlanan TIMP-2, aynı zamanda MT-1 MMP aracılı MMP-2 aktivasyonunda rol oynar. Düşük seviyede bulunan TIMP-2, N-terminal bölgesinden MT-1 MMP'nin aktif bölgesine bağlanır. Bu ikili karmaşık proMMP-2'nin bağlanması için reseptör görevi görür: TIMP-2, C-terminalinden proMMP-2'nin C terminaline bağlanır. Serbest MT-1 MMP molekülü proMMP-2'nin propeptid bölgesini koparır, ara ürün oluşur. Daha ileri proteoliz işlemi ile MMP-2 tamamen aktif MMP-2 formuna dönüşür. İleri proteoliz ya otokatalitik (64) bir proteoliz ile ya da plasminojen (plasmin) sisteminin devreye girmesiyle oluşur (65). TIMP-2 yüksek seviyede bulunduğu zaman ise fazla TIMP-2'ler MT-1 MMP'lere bağlanarak proMMP-2 aktivasyonunu engeller (66). TIMP-2 bağımlı MT-1 MMP aracılı MMP-2 aktivasyon mekanizması Şekil-2'de gösterilmektedir.

9. Eritropoetin (Epo)

Eritropoetin, 165 aminoasit ihtiva eden, 30,4 kDa molekül ağırlığına sahip glikoprotein yapısında ve temelde peritübüler kapiller endotel hücrelerince üretilen bir hormondur (67,68). Doğumdan önce karaciğerden üretilen Epo doğumdan kısa bir süre

sonra böbrekten üretilmeye başlar. Epo'nun böbrekler içinde parakrin hücre koruyucu fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir (68).

Epo etkisini eritroid öncü hücrelerin yüzeyindeki Epo reseptörlerine bağlanarak bunların fonksiyonel eritrositlere dönüşümünü ve olgunlaşmasını sağlayarak gösterir. Normalde serum Epo seviyeleri 818mU/ml iken anemide 100–1000 kat artış gösterir. Böbrek dokusunun oksijenizasyonu ile Epo salınımı arasında feedback mekanizmalar bulunmaktadır. Epo üretimini etkileyen diğer faktörler anjiotensin II ve adenoizindir. Bunlar böbrekten Epo üretimini direkt olarak uyarırlar (68,69).



Şekil-2: TIMP-2 bağımlı MT-1 MMP aracılı MMP-2 aktivasyon mekanizması

Fonksiyonel Epo reseptörleri hemapoetik sistem dışında böbrek tubül epitel hücrelerinde, mezengial ve endotel hücrelerinde gösterilmiştir. Fiziksel ve metabolik stres sonrası böbrek dışı bazı dokularda da lokal olarak üretildiği gösterilmiştir. Yine endotel hücrelerinde, santral sinir sistemi hücrelerinde ve kardiyomyositlerde Epo reseptörlerinin varlığı ortaya konmuştur. Gerek Epo'nun lokal üretimi gerekse bu dokularda Epo reseptörlerinin varlığı Epo'nun hematopoez dışı etkilerinin olduğunu düşündürmektedir (7,70,71).

Son zamanlarda Epo'nun böbrek yetmezliğine bağlı aneminin tedavisinde kullanımının dışında iskemi-reperfüzyon modelinde (7), beyinde (8), retinal sinir

hücrelerinde (72), karaciğer (73) ve kalp dokusunda (9) yaralanmayı azaltıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir.

Epo'nun, böbreklerde iki taraflı iskemik-reperfüzyon modeli ile oluşturulan akut böbrek yetmezliğinde dışardan verilmesi ile apoptozisi inhibe ettiği, tübüler epiteliyal rejenerasyonu artırdığı ve böbrek fonksiyonlarının geri dönüşümünü hızlandığı gösterilmiştir (7). Ayrıca tübüler hasarı ve intersitisyel fibrozisi azalttığı gösterilmiştir.

Epo'lar eritropoetin alfa, eritropoetin beta ve darbepoetin olarak üç molekülü klinikte kullanılmaktadır. Epo alfa ve beta benzer farmakokinetik özelliklere sahip moleküllerdir. Darbepoetin de diğer Epo'lar gibi direkt veya indirekt yolla eritropoezi uyaran 2. kuşak bir moleküldür. Darbepoetin alfa'nın serum yarılanma ömrü diğer Epo'lardan aşağı yukarı üç kat daha uzun olması ve Epo ile benzer etkiler göstermesi farmakokinetik açıdan klinik kullanımda daha avantajlı gibi görünmektedir (74). Darbepoetin alfa'nın rekombinant Epo'lar kadar etkin ve güvenilir olduğu gösterilmiştir (75).

GEREC VE YÖNTEM

1. Çalışmanın projesi

Bu çalışma, proje danışmanı öğretim üyesi ile belirlendikten sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi(DEÜTF), İç Hastalıkları AD/Nefroloji BD, Patoloji AD, Biyokimya AD ve Multidisipliner Laboratuvarı ve Laboratuvar Hayvanlarının Sağlık Bilimlerinde Kullanımı AD Öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerinin katıldığı toplantıda tartışılarak kararlaştırıldı.

2. Çalışmanın etik kurulu

Bu çalışma DEÜTF “Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu” tarafından 15.11.2007 tarih ve 106/2007 sayılı kararı ile onaylandıktan sonra yapıldı.

3. Kullanılan hayvanların sayı ve tür olarak seçilme nedenleri

DEÜTF Deneysel Araştırma Laboratuvarında çalışma gruplarının homojen olması ve cinsiyet hormonlarından çalışmanın etkilenmemesi için çalışmada toplam 24 adet ağırlıkları 200–230 gram arasında değişen 6-8 aylık dişi Wistar albino sıçan kullanıldı.

4. Araştırmada kullanılan deney hayvanlarının bakım yeri, süresi ve koşulları

Tüm hayvanlar Deney Hayvanları Biriminde en uygun koşullarda barındırıldı ve standart yem ve su ile beslendi.

Çalışmada kullanılan sıçanlar DEÜTF Multidisipliner Laboratuvarının standart kafesleme koşullarında, 4'lü kafeslerde standart yemleme ve su ile 14 günlük çalışma dönemi süresince barındırıldı. Gruplara ait sıçanların 4'lü kafeslerdeki görünümü Rresim-1'de gösterildi.

5. Kullanılan anestezi ve analjezi türü (doz, veriliş yolu ve şekli)

Çalışma sonunda hayvanların yaşamlarına son vermek için toksik dozda eter kullanıldı.

6. Deney hayvanının araştırmadan çıkarılma kriterleri (enfeksiyon, sistemik reaksiyon)

Çalışma sırasında sıçanlarda istenilen peritoneal sklerozis dışında bir enfeksiyon ve sistemik tepkime gelişmesi veya başka bir sebepten dolayı yaşayamayacak hale gelmesi çalışmadan çıkarılma ölçütü olarak kabul edildi.

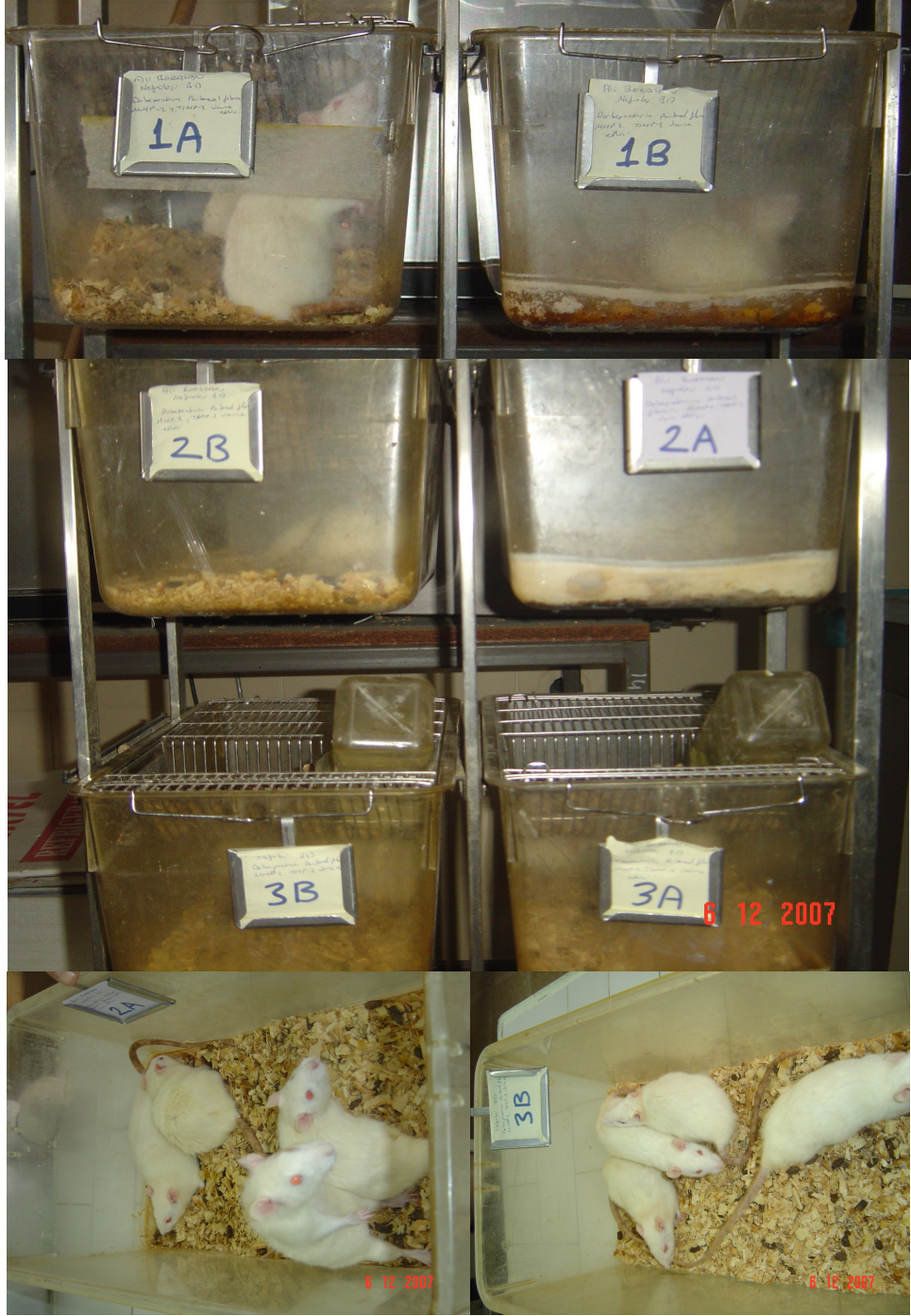
7. Deneysel Tasarı

Çalışmaya alınan sıçanlar çalışma öncesi tartıldı ve her grupta sekiz sıçan olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Çalışma süresi 14 gün olarak belirlendi. Peritoneal fibrozis oluşturmak için İshii ve arkadaşlarının modeli (76); %0,1'lik klorheksidin glukonat (KH) (Drogasana İlaçları AŞ. Balgat, Ankara) + %15 etanol+ serum fizyolojik karışımı aseptik olarak hazırlanıp kullanıldı. Darbepoetin olarak Aranesp enjektör 40 mcg/0.4ml (Amgen Europe B.V. Breda, Hollanda) kullanıldı.

Birinci gruptaki (klorheksidin=KH grubu) sekiz sıçanda kimyasal peritonit oluşturmak için tuzlu su içinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 KH bulunan solusyonu sekiz sıçana 3 ml / gün olarak 14 gün boyunca karın içine 21 G iğne ile verildi.

İkinci gruptaki (klorheksidin glukonat+eritropoetin=KH+Epo grubu) sekiz sıçana tuzlu su içinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 KH bulunan solusyonu sekiz sıçana 3 ml / gün olarak 14 gün boyunca karın içine 21 G iğne ile verildi. Ayrıca 12.5mcg/kg dozunda Darbepoetin 0. ve 7. günde iki kez 21 G iğne ile cilt altına verildi.

Üçüncü gruptaki (serum fizyolojik=SF grubu) sekiz sıçana %0,9 serum fizyolojik 3 ml/gün 21 G iğne ile 14 gün boyunca karın içine verildi.



Resim-1: Sıçanların dört'lü gruplar halinde kafesteki görünüşleri

8. Deney hayvanlarının yaşamını sonlandırma zamanı ve yöntemi

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

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

9. Histopatolojik Değerlendirme

Paryetal periton için karın duvarından ve visseral periton içinde karaciğer yüzeyinden elde edilen ve formaldehit ile tesbit edilen doku örneklerinden; karın duvarından ve karaciğer kapsülünden dikey 3 mm'lik kesitler alındı. Kesitler alındıktan sonra parafine gömüldü ve Hematoksilen & Eosin (H&E) ve Von Gieson (VG) boyası ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopisi ile karaciğer kapsülü ve karın duvarı paryetal peritonun miktarı, damar çoğalması, fibrozis ve yangı açısından araştırıldı.

Işık Mikroskopik İnceleme

Yangı H&E boyalı kesitlerde yarı nicel skorlandı; 0: yok, 1: hafif, 2: orta şiddette, 3: şiddetli.

Vaskülopati endotel altı hyalinizasyon derecesine göre Williams ve arkadaşlarının (5) tanımladıkları şekil değiştirilerek derecelendirildi. Buna göre normal: 0, endotel altı hyalinizasyon: 1, luminal düzensizlik ve daralma: 2 ve luminal tıkanma: 3 olarak derece verildi.

Periton kalınlıklarının ölçümü için H&E boyalı kesitlerden elde edilen mikroskopik görüntüler bir kamera (Olympus BX50, Olympus Optical Co, Tokyo, Japon) ile bilgisayara aktarıldı. Visseral ve paryetal periton kalınlıkları kameraya ait yazılım yardımı ile kullanılan büyütme göre kalibre edilerek mikron metre cinsinden 10 alanda ölçüldü ve ortalaması periton kalınlığı olarak kabul edildi.

Benzer şekilde VG boyalı kesitlerden elde edilen görüntüler de bilgisayara aktarıldı. Görüntülerde patolog tarafından seçilen renklerin izlendiği alanları otomatik olarak işaretleyen Bilgisayar Programı (Mustafa Şakar tarafından yazılmıştır) kullanılarak ölçüm yapıldı (77). VG boyasında kollajen kırmızı renkte boyandığı için bu renk alanları seçildi ve her olgu için boyalı alan yüzdesi (BAY) saptandı (77,78,79).

İmmünohistokimyasal İnceleme

Poli-L-lizinli lamlara hazırlanan kesitler MMP-2 Neomarkers (72kDa Collagenase IV) Ab-1 (Clone CA-4001) (1:100, 200 mikro g/ml) ve TIMP-2 Ab-5 Neomarkers (prediluted, Clone 3A4) (Cat. MS-1485-R7 7,0 ml) immünohistokimyasal boyalarıyla boyanmıştır. Bu immünohistokimyasal boyama işlemi sırasında şu aşamalar uygulanmıştır:

- 1- Hazırlanan kesitler 1 saat süreyle 65 derecede etüvde bekletilmiştir.
- 2- Kesitler 20 dk. Ksilolde bekletilerek parafinden ayrıştırıldı.
- 3- Daha sonra %96'lık alkolden başlayarak %70'lik alcole dek azalan alkol serilerinden geçirilerek yeniden hidrate edilmiştir.
- 4- Kesitler akan suda yıkanmıştır.
- 5- Kesitler EDTA ile 20 dk. süreyle 99 derecede kaynatılmıştır.
- 6- Daha sonra Lab Vision Autostainer 360 ile boyama işlemi yapılmıştır. Bu işlem sırasında kesitler:
 - * %3 'lük H₂O₂ damlatılarak 15 dk. bekletilmiştir.
 - * Sonra Tris solüsyonu ile yıkanmıştır.
 - * Large Volume Ultra V Block damlatılarak 5 dk. bekletilmiştir.
 - * Yıkama yapılmadan primer antikorlar (MMP-2 1:100 oranında sulandırılarak ve TIMP-2 sulandırılmadan) damlatılarak 60 dk bekletilmiştir.
 - * Süre sonunda yıkama solüsyonu Tris solüsyonu ile yıkanmıştır.
 - * Daha sonra biotinlenmiş keçi anti-polyvalent ile 20 dk süreyle yıkanmıştır.
 - * Süre sonunda yıkama solüsyonu Tris solüsyonu ile yıkanmıştır.
 - * Daha sonra streptavidin peroksidaz ile 20 dk süreyle yıkanmıştır.
 - * Diaminobenzidin (DAB) kromojen damlatılarak 7 dk süreyle bekletilmiştir (DAB Kromojen solüsyonu 10 ml yıkama solüsyonu Tris solüsyonu içinde DAB kromojen tabletin eritilip 3 damla H₂O₂ eklenmesiyle elde edilmiştir).
 - * Distile su ile yıkanmıştır.

7- Boyama işlemi sonrası kesitler 30 sn. Mayer's hematoksilen ile boyanıp distile suda yıkanmıştır.

8- Kesitler %70'lik alkolden başlayarak %96'lık alkole dek çoğalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir.

9- Ksilol ile 10 dk süreyle şeffaflandırıldıktan sonra lamalar kapatma (montaj) makinesinde kapatılmıştır.

10- Pozitif kontrol olarak MMP-2 için plasenta dokusu, TIMP-2 için kolon tümör dokusu kullanılmıştır.

Kesitlerdeki boyanma düzeyi, ışık mikroskopik olarak değerlendirilmiş ve boyanma yaygınlığı ve şiddeti ayrı ayrı 0-4 arası artan şiddetle ilişkili olarak skorlanmıştır. Bu iki parametrenin çarpımı boyanma yoğunluğu olarak değerlendirilmiş ve her olguda visseral ve paryetal periton için ayrı olmak üzere 0-16 arasında değerler elde edilmiştir. Dört ve bundan küçük değerler zayıf boyanma, daha fazla boyanma ise şiddetli boyanma olarak kabul edilmiştir (80).

10. Biyokimyasal analizler için doku örneklerinin hazırlanması

MMP-2 ve TIMP-2 için dokuların hazırlanması

Dondurulmuş paryetal 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. Sonifikatör (Sonics&Materials Inc, Danbury Connecticut USA) ile buz üzerinde 10 saniye doku supernatantları hazırlandı. 10 000xg de 10 dak. santrifüj edildikten sonra supernatantlar alındı ve analiz süresine kadar -80 °C de saklandı.

Protein Analizi

Protein düzeyleri Bicinkoninik Asit (BCA) yöntemi ile belirlendi. Yöntemin temeli alkali ortamda Cu^{+2} -protein kompleksi oluşumuna ve Cu^{+2} nin Cu^{+1} indirgenmesine dayanmaktadır. Örneklerde var olan protein miktarı indirgenmiş Cu^{+1} miktarı ile doğru

orantılıdır. Oluşan renk oluşumu 562 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA) proteini kullanıldı. 7 farklı yoğunlukta (25, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 µg/ml) hazırlanan standart ile oluşturulan standart ölçümleme eğrisinden yararlanılarak örneklerdeki protein miktarı 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 (81,82).

Jelatin Zimografi Yönteminin Uygulama Aşamaları

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

- ✓ Laemmli'nin tanımladığı gibi SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez) jel hazırlandı (83). Doku homojenatlarında varolan MMP-2'lerin aktivitelerini ölçmek için % 0.1 tip I jelatin ve %10 SDS içeren % 7.5'luk poliakrilamid jeller tablo-2'de belirtildiği gibi hazırlandı (Tablo-2) 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 (Tablo-2) 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 (Tablo-3) ile karıştırılarak jel üzerindeki kuyucuklara 50 µg protein olacak şekilde uygun hacimde yüklendi.

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

Tablo–2: Jelatin Zimografi yönteminde poliakrilamid jellerin hazırlanması

- ✓ Sisteme “Elektroforez Yürütme Tamponu” (Tablo–3) eklendi.
- ✓ Elektroforez +4⁰C 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.

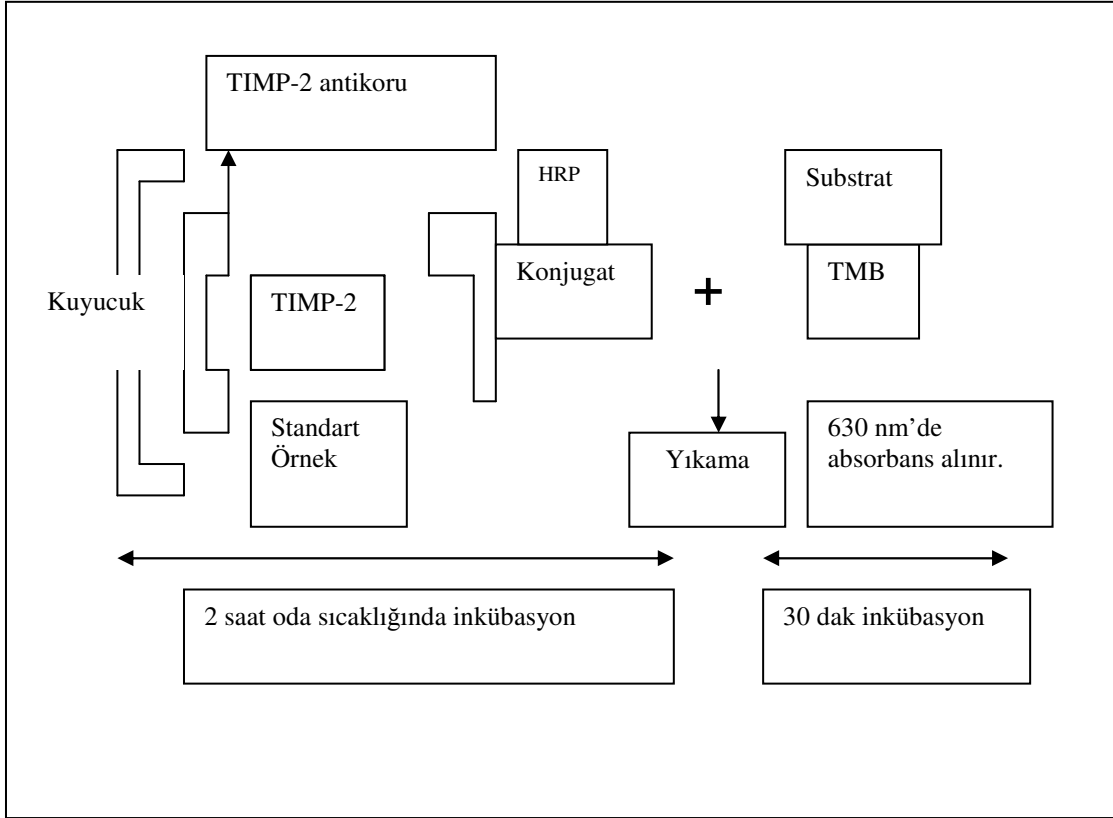
- ✓ Daha sonra jeller, enzimlerin (MMP-2) jel içindeki substratlarını (jelatin) tüketmelerini sağlamak için 18 saat 37 °C’de “Aktivasyon Tamponu” ile inkübe edildi.
- ✓ Jeller, % 0,5’lik Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandı ve % 40 metanol-% 10 asetik asit içeren tampon ile jel zeminindeki fazla 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 “Alan x OD /µg protein” formülünden yararlanılarak hesaplandı.
- ✓ Pozitif kontrol olarak MMP-2’nin hem pro hem de aktif formlarını içeren ticari olarak üretilmiş MMP marker kullanıldı.
- ✓ Kullanılan çözeltilerin içerikleri Tablo-3’de açıklanmaktadır.

ÇÖZELTİLER	İÇERİK
Aktivasyon Tamponu	50 mM Tris-HCl, pH:7,6 10 mM CaCl ₂ .2H ₂ O, 50 mM NaCl, % 0.05 Brij 35
5x Yürütme Tamponu	125 mM Tris-HCl, pH:8.3 1.23 M Glisin % 0.5 SDS
Renatürasyon Tamponu Triton X-100	% 2.5’lik Triton X-100
2x İndirgeyici Olmayan Tampon	1.0 ml 0.5 M Tris-HCL, pH:6.8 0.8 ml Gliserol 3.2 ml %10’luk SDS 0.2 ml % 0,2’lik Bromfenol 2.8 ml d H ₂ O
% 30’luk Akrilamid Çözeltisi	29.2 g Akrilamid 0.8 g N’N’-bisakrilamid
Boya Çözeltisi	% 0.5’lik Coomassie Brilliant Blue R-250 % 40 metanol % 10 asetik asid
Jel Zeminindeki Boyayı Uzaklaştıran Çözelti	% 40 metanol % 10 asetik asid

Tablo-3: Jelatin Zimografi yönteminde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

TIMP-2 ELISA Analizi

Hazırlanan doku homojenatlarında TIMP-2 analizi, ELISA temelli Calbiochem marka (Kat No: QI40) kit ile yapıldı. Bu ölçüm yöntemi, TIMP-2 düzeylerinin niceleyici olarak ölçümü için hazırlanmış “sandwich tip enzim immünoassay” tekniğine dayanır (Şekil-3). Kitin ölçüm aralığı 8–128 ng/ml arasındadır. Sensitivitesi ise 2 ng/ml dir.



Şekil-3: “Sandwich tip enzim immünoassay” tekniğinin şematik gösterilmesi

Analiz aşamaları aşağıdaki şekilde özetlenmektedir:

- ✓ 96 kuyucuklu plak, analiz tamponu ve enzim substratı oda sıcaklığına getirildi.
- ✓ Liyofilize standart (256 ng/ml) 1.0 ml distile su ile çözüldü. 8, 16, 32, 64 ve 128 ng/ml olacak şekilde analiz tamponu ile seri dilüsyon yapıldı.
- ✓ Peroksidaz konjugatı 12 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı.

- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µl analiz tamponu, 50 µl standart ve örnek eklendi. Kör için ayrılan kuyucuğa sadece 100 µL analiz tamponu eklendi.
- ✓ Tüm kuyucuklara 50 µl peroksidaz konjugatı eklendi ve 20–27 °C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkama yapıldı. Kuyucuklarda yıkama solüsyonu kalmayacak şekilde kuyucuklardan yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı.
- ✓ Tüm kuyucuklara 100 µL TMB substratı (3,3’,5,5’Tetrametilbenzidin (TMB)/Hidrojen Peroksit) eklendi ve 30 dak. beklendi.
- ✓ Oluşan renkli çözeltinin absorbansı 630 nm’de okundu.
- ✓ Örneklerdeki TIMP–2 düzeyi, oluşturulan standart ölçümleme eğrisinden yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar mg protein başına ng TIMP–2 olarak ifade edildi.

10. İstatistiksel Değerlendirme

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

BULGULAR

A. Çalışma gruplarının değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan 24 sıçanın tamamı çalışmayı bitirdi. Çalışmanın ilk gününde KH ve KH+Epo grubunda periton içine ilk doz ilaç uygulamasından yaklaşık on dakika sonra sıçanların tamamında solunum sayısında artış, uyku hali, yürüyememe gibi belirtiler gözlemlendi. Yaklaşık bir saat sonunda solunumları, altı saat sonunda da yürümeleri düzeldi. İkinci günden itibaren ilaç uygulamasından sonra çalışma bitene kadar hergün üç-dört saat süreyle yürüyememe ve uyku hali devam etti. SF grubunda bu bulgular gözlenmedi.

Grupların çalışmanın başlangıcındaki ve sonundaki ağırlık ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ve istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo-4’de gösterildi.

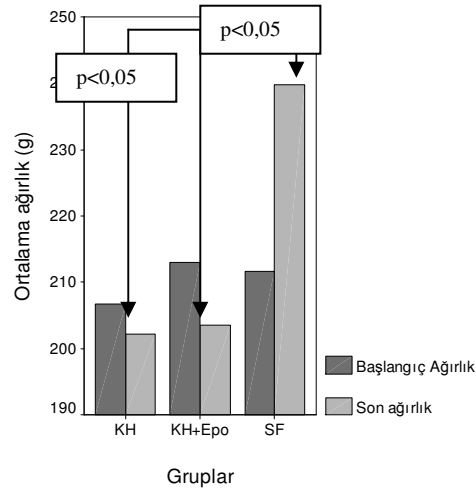
Gruplar	KH	KH+Epo	SF	p-değeri
Başlangıç ağırlık (g)	206,75 $\pm$ 8,01	213,0 $\pm$ 12,07	211,63 $\pm$ 8,55	>0,05 ^{a,b,c}
Son ağırlık (g)	202,13 $\pm$ 15,72	203,5 $\pm$ 12,08	239,75 $\pm$ 40,97	<0,05 ^{b,c} AD ^a

AD; anlamlı değil, a; KH ile KH+Epo arasında, b; KH ile SF arasında, c; KH+Epo ile SF arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar

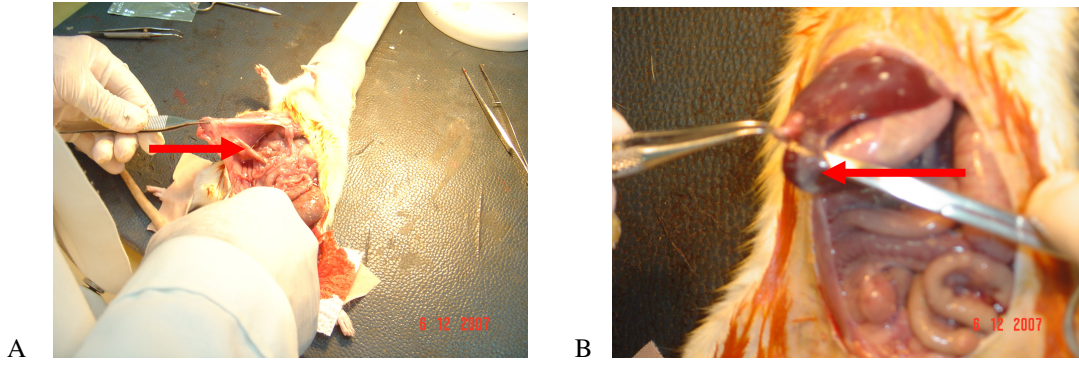
Tablo-4: Grupların çalışmanın başlangıcındaki ve sonundaki ağırlık ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel değerlendirme sonuçları

KH ve KH+Epo grubundaki sıçanların tamamında çalışmanın bitiminde ağırlık kaybı olurken SF grubundaki sıçanlarda ağırlık artışı gözlemlendi. Grupların çalışma başlangıcındaki ve sonundaki ağırlık ortalamaları Grafik-1’de gösterildi. Çalışmanın sonundaki KH ile KH+Epo gruplarındaki ağırlık azalması SF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunurken başlangıç ağırlıklarına göre SF grubundaki artış ve KH ile KH+Epo gruplarındaki azalma anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

KH ve KH+Epo grubundaki sıçanların tamamında makroskopik olarak pariyetal peritonda kalınlaşma, karaciğer üzerine ve karın duvarına yapışıklıklar olduğu gözlenirken SF grubunda yapışıklık gözlenmedi. KH grubundaki sıçanlarda görülen karın ön duvarına ve karaciğer üzerindeki periton yapışıklıkları Resim-2’de gösterildi.

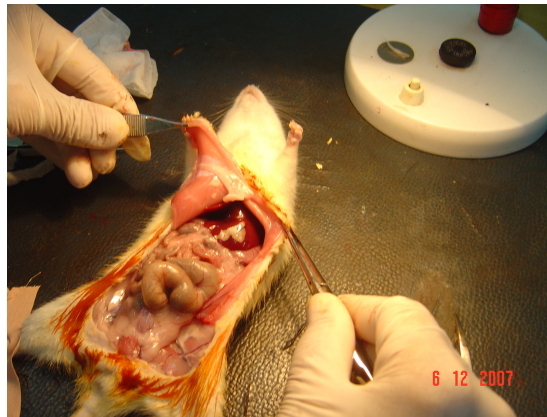


Grafik-1: Grupların çalışma başlangıcındaki ve sonundaki ağırlık ortalamaları



Resim-2: KH grubundaki sıçanda peritonun karın ön duvarına (A) ve karaciğer (B) üzerine yapıştığı görülmektedir.

Serum fizyolojik grubundaki normal karaciğer ve periton ise Resim-3'de gösterilmiştir.



Resim-3: SF grubundaki normal karaciğer ve karın ön duvarının görünümü

B. Histopatolojik Değerlendirme

Patolojik olarak tüm sıçanların örnekleri değerlendirildi.

1.Paryetal Periton Sonuçları

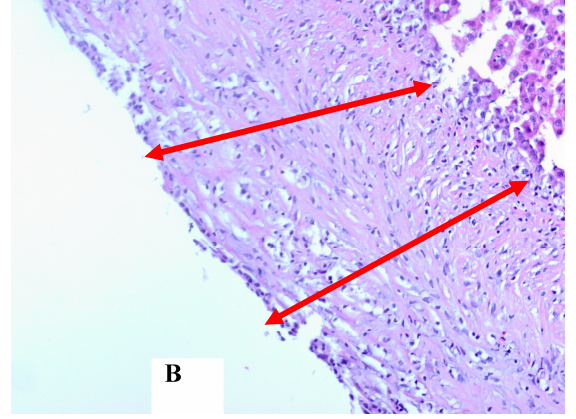
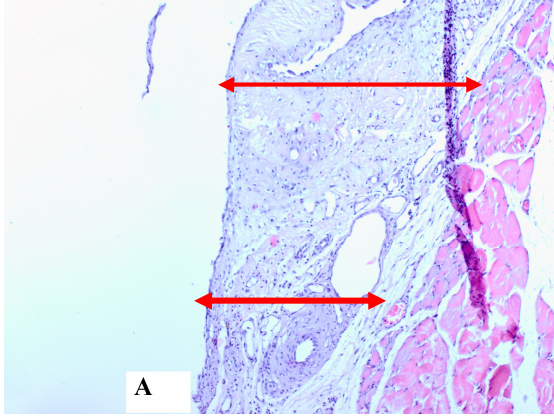
Çalışma sonucunda paryetal peritona ait periton kalınlıklarının, yangı skorlaması, damarlanma skorlaması ve fibrotik alan yüzdelерinin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ve istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo-5’de gösterilmiştir.

Gruplar (Paryetal Periton)	KH	KH+Epo	SF	p-değeri
Periton Kalınlığı (μ m)	175,34 $\pm$ 55,14	114,65 $\pm$ 36,81	8,95 $\pm$ 2,9	<0.001 ^{b,c} <0.05 ^a
Yangı Skorlaması	1,75 $\pm$ 0,70	1,50 $\pm$ 0,53	0,00 $\pm$ 0,00	<0.001 ^{b,c} AD ^a
Damarlanma Skorlaması	0,25 $\pm$ 0,46	0,25 $\pm$ 0,7	0,00 $\pm$ 0,00	AD ^{a,b,c}
Fibrotik Alan Yüzdesi (μ m)	10,76 $\pm$ 8,95	10,46 $\pm$ 5,64	0,84 $\pm$ 0,54	<0.001 ^{b,c} AD ^a

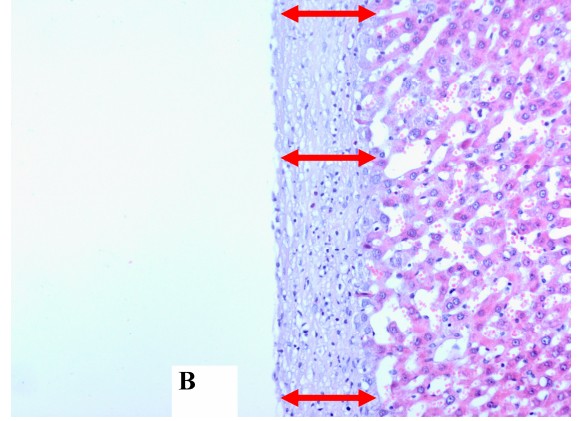
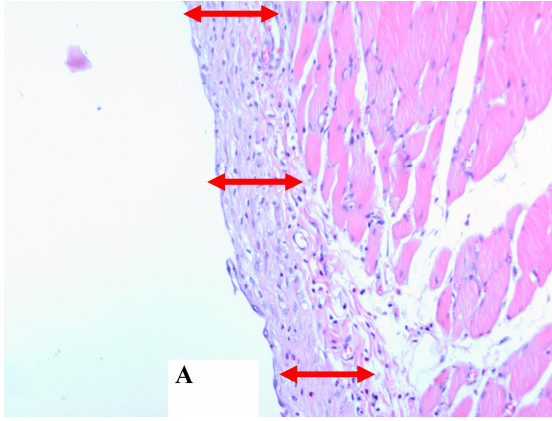
AD; anlamlı değil, a; KH ile KH+Epo arasında, b; KH ile SF arasında, c; KH+Epo ile SF arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar

Tablo-5: Gruplara ait paryetal periton kalınlıkları, yangı skorlaması, damarlanma skorlaması ve fibrotik alan yüzdelерinin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel değerlendirme sonuçları

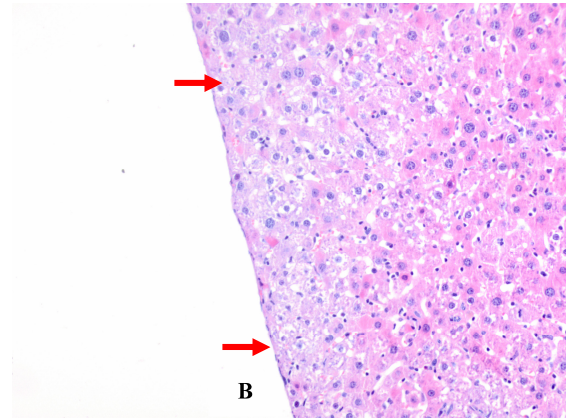
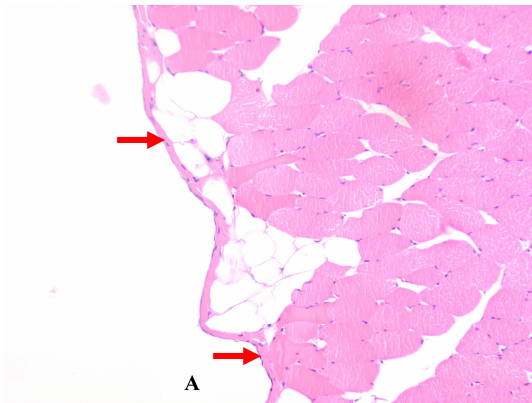
Paryetal periton kalınlığı açısından yapılan istatistiksel karşılaştırmada KH grubundaki ortalama kalınlık artışı KH+Epo grubuna göre daha fazla bulundu ($p<0,05$) (Grafik-2). KH ve KH+Epo gruplarındaki paryetal periton kalınlık artış SF grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0,001$). Histopatolojik olarak gruplara ait periton kalınlıkları Resim-4,5,6’da gösterildi.



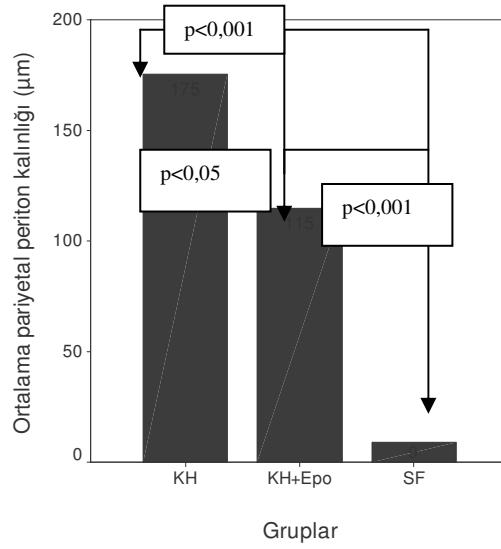
Resim-4: Histopatolojik olarak KH grubuna ait periton kalınlıkları A (parietalx20), B (visseralx20)



Resim-5: Histopatolojik olarak KH+Epo grubuna ait periton kalınlıkları A (parietalx20), B (visseralx20)

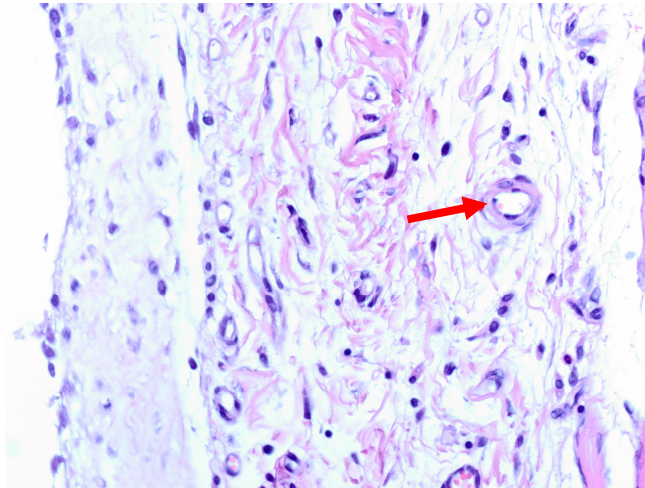


Resim-6: Histopatolojik olarak SF grubuna ait periton kalınlıkları A (parietalx20), B (visseralx20)



Grafik–2: Gruplara ait ortalama paryetal periton kalınlıkları

Yangı skorlaması açısından gruplar değerlendirildiğinde KH grubundaki sıçanların paryetal peritonunda 3’ünde hafif, 4’ünde orta şiddette ve 1’inde şiddetli yangı görüldü. KH+Epo grubundaki sıçanların paryetal peritonunda 4’ünde hafif, 4’ünde orta şiddette yangı görülürken SF grubundaki sıçanların paryetal peritonunda yangı görülmedi. Yangı skorlamasında açısından SF grubuna göre KH ve KH+Epo gruplarındaki ortalama yangı skorlamasındaki artış anlamlı bulundu ($p<0,001$).



Resim–7: KH grubundaki paryetal peritonda damar lümenindeki hiyalinizasyon ve damar çapının daraldığı görülmektedir.

Damarlanma skorlaması yönünden KH grubundaki 2 sıçanın paryetal peritonunda vaskülopati görülürken KH+Epo grubundaki 1 sıçanda paryetal peritonda vaskülopati görüldü. SF grubundaki sıçanların paryetal peritonunda vaskülopati görülmedi. KH grubunda vaskülopati görülen paryetal periton Resim-7’de gösterildi. Ortalama damarlanma skorlaması açısından gruplararası fark görülmedi ($p>0,05$).

Ortalama fibrotik alan yüzdesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında KH ve KH+Epo grubundaki fibrotik alan yüzdesi SF grubuna göre anlamlı artış gösterdiği görüldü ($p<0,001$). KH ile KH+Epo arasında fark bulunmadı ($p>0,05$). Gruplara ait Von Gieson boyası ile paryetal periton fibrozu ve imaj analizi ile yüzde seçimi Resim-8,9,10’da gösterilmiştir.

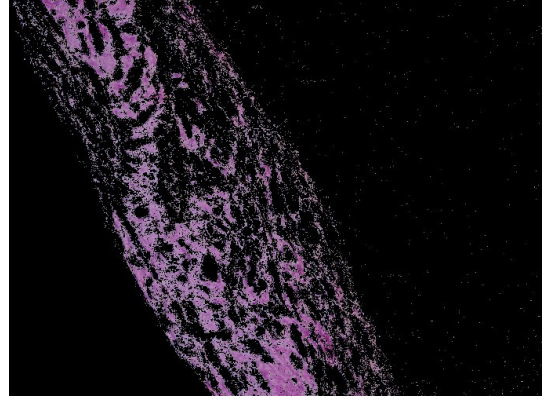
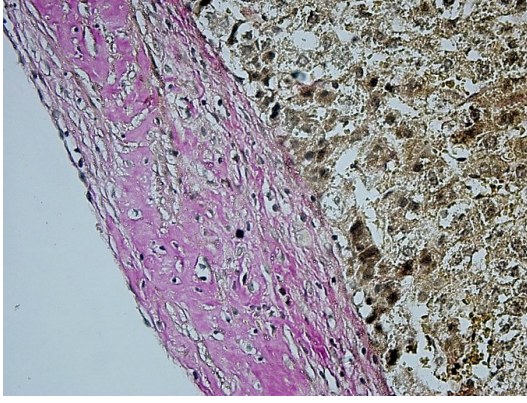
3.Visseral Periton Sonuçları

Çalışma sonucunda visseral peritona ait periton kalınlıkları, yangı skorlaması, damarlanma skorlaması ve fibrotik alan yüzdelerinin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ve istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo-6’de gösterilmiştir.

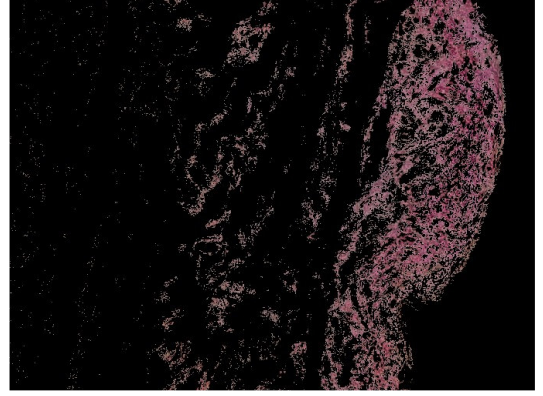
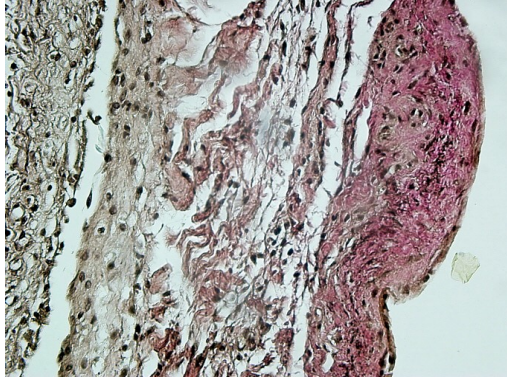
Gruplar (Visseral Periton)	KH	KH+Epo	SF	p-değeri
Periton Kalınlığı (μm)	204,15 $\pm$ 44,96	152,71 $\pm$ 39,87	4,17 $\pm$ 0,87	<0.001 ^{b,c} <0.05 ^a
Yangı Skorlaması	1,50 $\pm$ 0,53	1,87 $\pm$ 0,35	0,00 $\pm$ 0,00	<0.001 ^{b,c} AD ^a
Damarlanma Skorlaması	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	AD ^{a,b,c}
Fibrotik Alan Yüzdesi (μm)	10,11 $\pm$ 4,43	10,86 $\pm$ 10,76	0,29 $\pm$ 0,18	<0.001 ^{b,c} AD ^a

AD; anlamlı değil, a; KH ile KH+Epo arasında, b; KH ile SF arasında, c; KH+Epo ile SF arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar

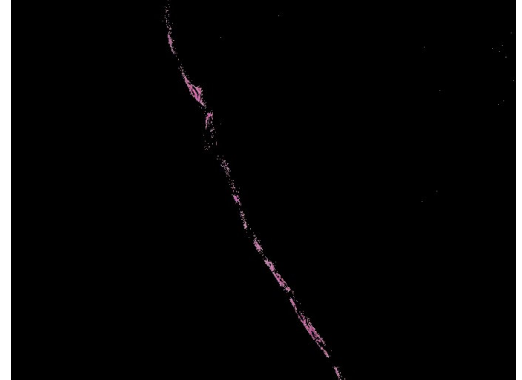
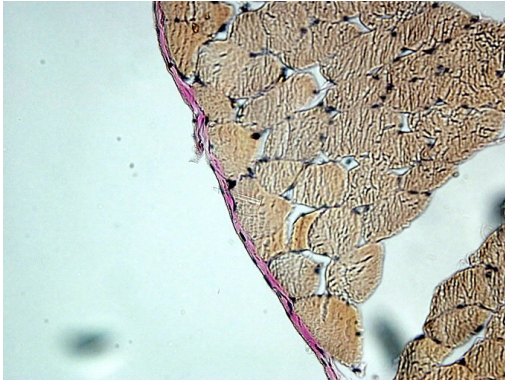
Tablo-6: Gruplara ait visseral periton kalınlıkları, yangı skorlaması, damarlanma skorlaması ve fibrotik alan yüzdeleri ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel değerlendirme sonuçları



Resim-8: KH grubuna ait Von Gieson ile paryetal periton fibrozisi (sol), imaj analizi ile yüzde seçimi (sağ). Kırmızı boya ile boyanan alanlar fibrozisi göstermektedir.

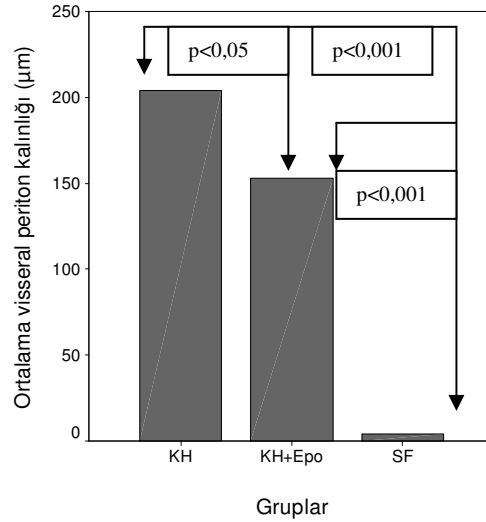


Resim-9: KH+Epo grubuna ait Von Gieson ile paryetal periton fibrozisi (sol), imaj analizi ile yüzde seçimi (sağ). Kırmızı boya ile boyanan alanlar fibrozisi göstermektedir.



Resim-10: SF grubuna ait Von Gieson ile paryetal periton fibrozisi (sol), imaj analizi ile yüzde seçimi (sağ). Kırmızı boya ile boyanan alanlar fibrozisi göstermektedir.

Visseral periton kalınlığı açısından yapılan istatistiksel karşılaştırmada KH grubundaki ortalama visseral periton kalınlık artışı KH+Epo grubuna göre daha fazla bulundu ($p<0,05$). KH ve KH+Epo gruplarındaki paryetal periton kalınlık artış SF grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). Histopatolojik olarak gruplara ait visseral periton kalınlıkları Resim-4,5,6’da gösterildi (Grafik-3).



Grafik-3: Gruplara ait ortalama visseral periton kalınlıkları

Yangı skorlaması açısından gruplar değerlendirildiğinde KH grubundaki sıçanların visseral peritonunda 4’ünde hafif, 4’ünde orta şiddette yangı görüldü. KH+Epo grubundaki sıçanların visseral peritonunda 1’inde hafif, 7’sinde orta şiddette yangı görülürken SF grubundaki sıçanların visseral peritonunda yangı görülmedi. Yangı skorlamasında açısından SF grubuna göre KH ve KH+Epo gruplarındaki ortalama yangı skorlamasındaki artış anlamlı bulundu ($p<0,001$).

Damarlanma skorlaması açısından tüm grupların visseral peritonunda vaskülopati görülmedi. Ortalama damarlanma skorlaması açısından gruplararası fark görülmedi ($p>0,05$).

Ortalama fibrotik alan yüzdesi bakımından gruplar karşılaştırıldığında KH ve KH+Epo grubu

ndaki visseral periton fibrotik alan yüzdesi SF grubuna göre anlamlı artış gösterdiği görüldü ($p<0,001$). KH ile KH+Epo arasında fark bulunmadı ($p>0,05$).

C. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

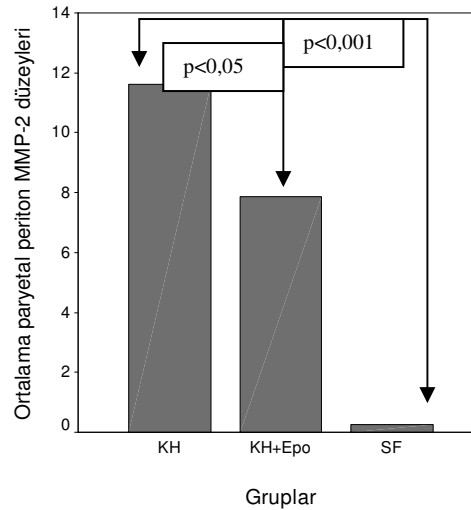
Çalışma sonucunda paryetal peritona ait MMP-2 ve TIMP-2'ye ait ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ve istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo-7'de gösterilmiştir.

Gruplar (Paryetal Periton)	KH	KH+Epo	SF	p-değeri
MMP-2	11,62 $\pm$ 4,27	7,87 $\pm$ 3,9	0,25 $\pm$ 0,46	<0.001 ^{b,c} <0.05 ^a
TIMP-2	4,5 $\pm$ 4,03	5,62 $\pm$ 3,24	0,12 $\pm$ 0,35	<0.001 ^{b,c} AD ^a

AD; anlamlı değil, a; KH ile KH+Epo arasında, b; KH ile SF arasında, c; KH+Epo ile SF arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar

Tablo-7: Paryetal periton dokusunda MMP-2 ve TIMP-2'nin tüm gruplardaki ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Paryetal periton MMP-2 skorlamasında açısından gruplar değerlendirildiğinde SF grubuna göre KH ve KH+Epo gruplarındaki ortalama artış anlamlı bulundu ($p<0,001$). Ayrıca KH+Epo grubunda KH grubuna göre MMP-2'nin baskılandığı görüldü ($p<0,05$). Gruplara ait ortalama paryetal periton MMP-2 düzeyleri Grafik-4'de gösterildi.

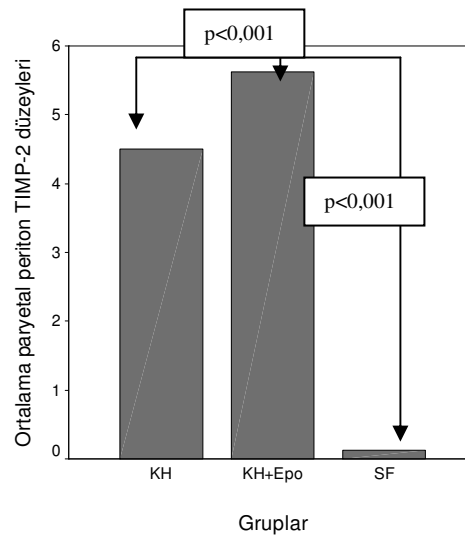


Grafik-4: Gruplara ait ortalama paryetal periton MMP-2 düzeyleri

Paryetal periton TIMP-2 skorlamasında açısından gruplar değerlendirildiğinde SF grubuna göre KH ve KH+Epo gruplarındaki ortalama artış anlamlı bulundu ($p<0,001$). KH grubu ile KH+Epo grubu arasında TIMP-2 açısından fark bulunmadı ($p>0,05$) (Grafik-5).

Çalışma sonucunda visseral peritona ait MMP-2 ve TIMP-2'ye ait ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ve istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo-8'de gösterilmiştir.

Visseral periton MMP-2 skorlaması açısından gruplar değerlendirildiğinde SF grubuna göre KH ve KH+Epo gruplarındaki ortalama artış anlamlı bulundu ($p<0,001$). Ayrıca KH+Epo grubunda KH grubuna göre MMP-2'nin baskılandığı görüldü ($p<0,05$) (Grafik-6).



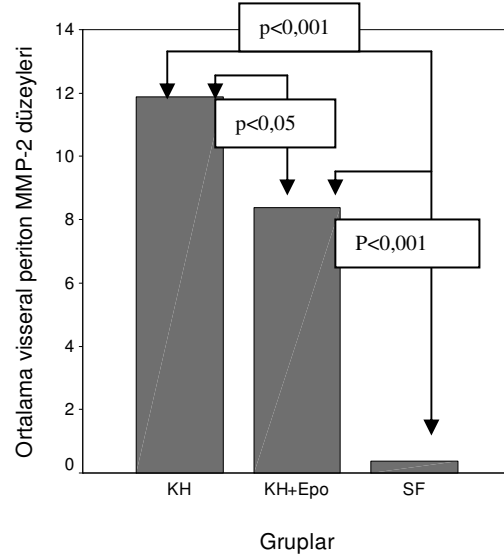
Grafik-5: Gruplara ait ortalama paryetal periton TIMP-2 düzeyleri

Gruplar (Visseral Periton)	KH	KH+Epo	SF	p-değeri
MMP-2	11,87 $\pm$ 2,9	8,37 $\pm$ 3,4	0,38 $\pm$ 1,06	<0.001 ^{b,c} <0.05 ^a
TIMP-2	5,5 $\pm$ 3,07	5,9 $\pm$ 2,89	0,00 $\pm$ 0,00	<0.001 ^{b,c} AD ^a

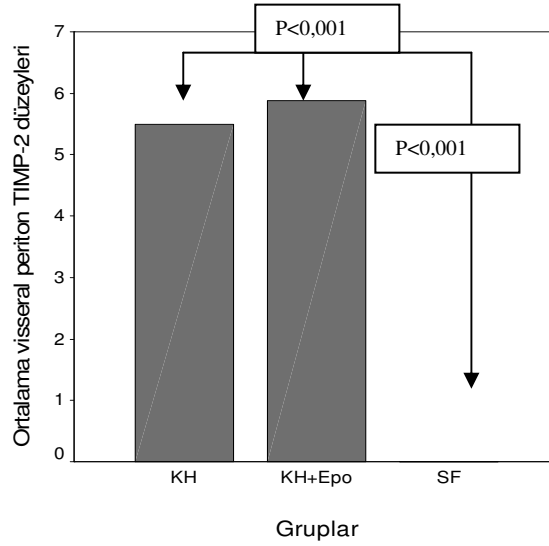
AD; anlamlı değil, a; KH ile KH+Epo arasında, b; KH ile SF arasında, c; KH+Epo ile SF arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar

Tablo-8: Visseral periton dokusunda MMP-2 ve TIMP-2'nin tüm gruplarda ki ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel karşılaştırma sonuçları

Visseral periton TIMP-2 skorlaması açısından gruplar değerlendirildiğinde SF grubuna göre KH ve KH+Epo gruplarındaki ortalama artış anlamlı bulundu ($p<0,001$). KH grubu ile KH+Epo grubu arasında TIMP-2 açısından fark bulunmadı ($p>0,05$) (Grafik-7).

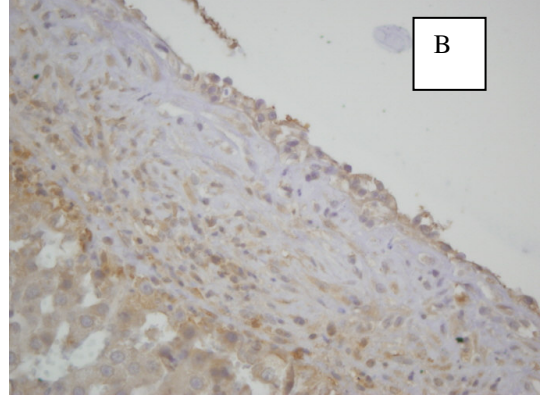
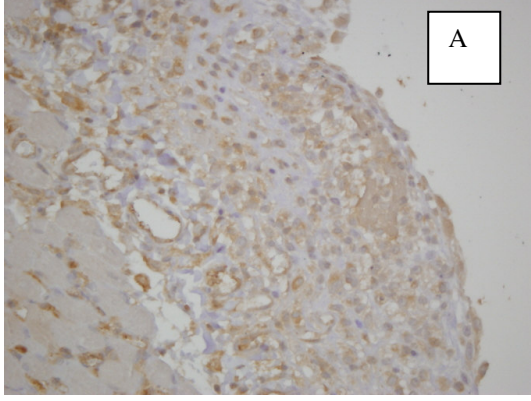


Grafik-6: Gruplara ait ortalama visseral periton MMP-2 düzeyleri

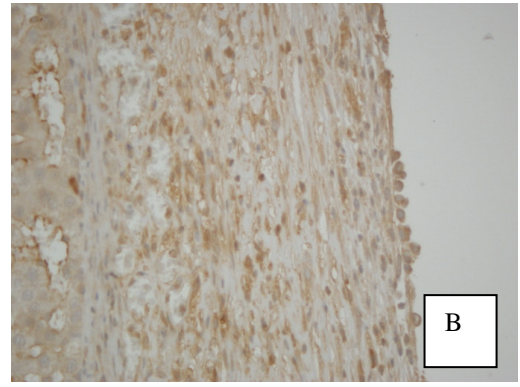
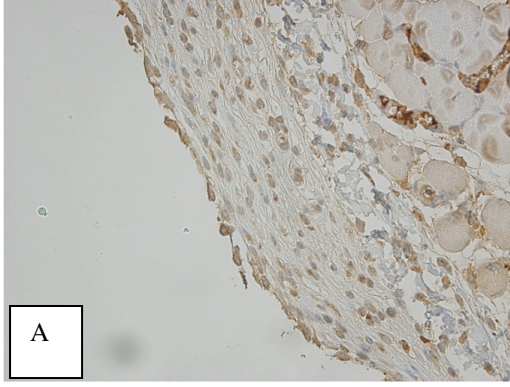


Grafik-7: Gruplara ait ortalama visseral periton TIMP-2 düzeyleri

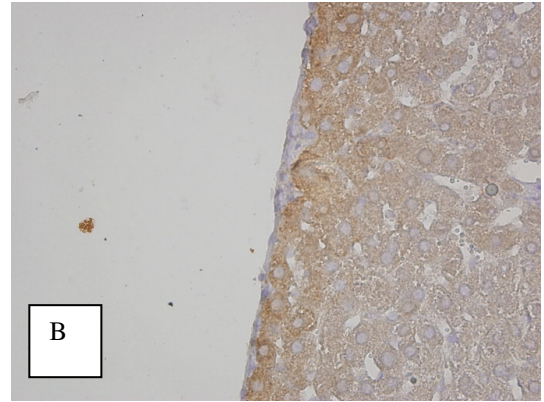
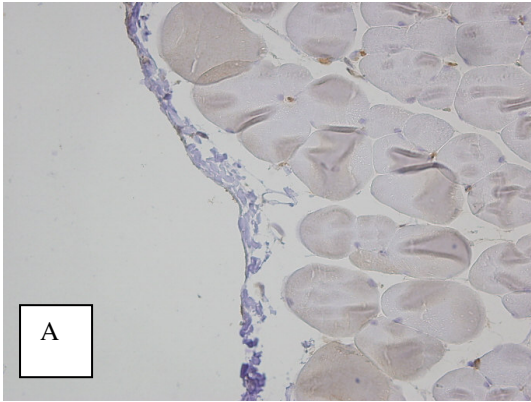
İmmünohistokimyasal olarak gruplara ait paryetal ve visseral peritondaki MMP-2 görüntüleri Resim-11,12,13'de gösterildi. Yine gruplara ait paryetal ve visseral peritondaki TIMP-2 görüntüleri Resim-14,15,16'da gösterildi.



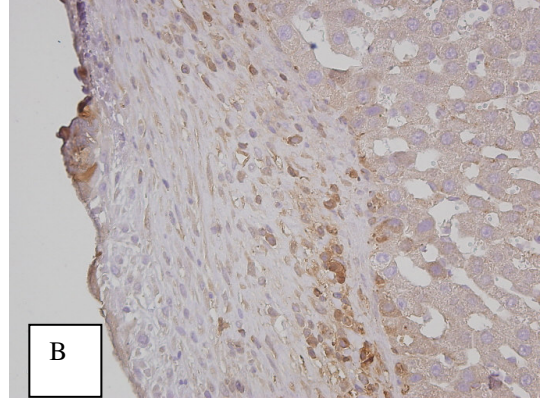
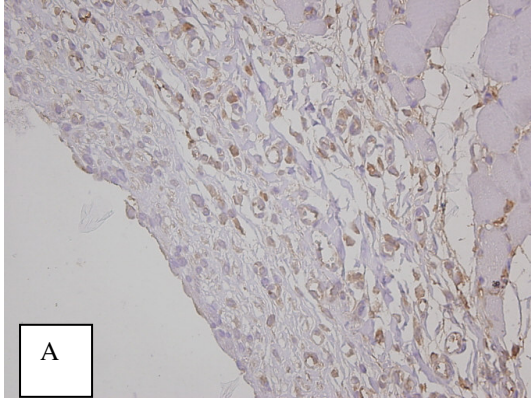
Resim-11: İmmünohistokimyasal olarak KH grubuna ait peritondaki MMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)



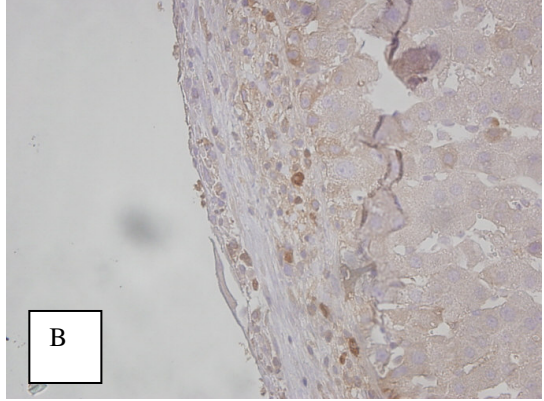
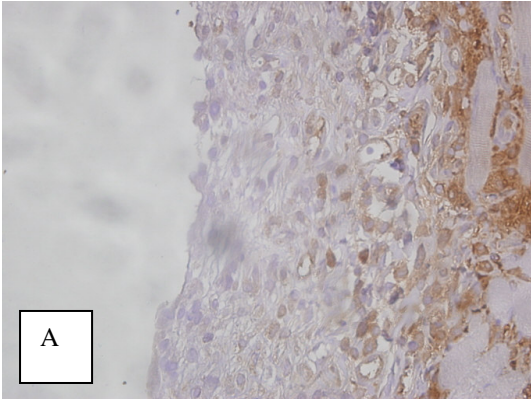
Resim-12: İmmünohistokimyasal olarak KH+Epo grubuna ait peritondaki MMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)



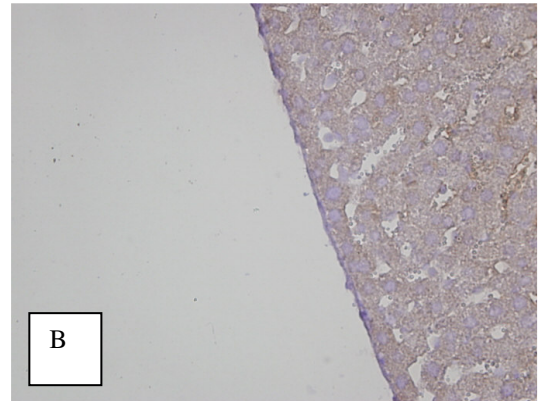
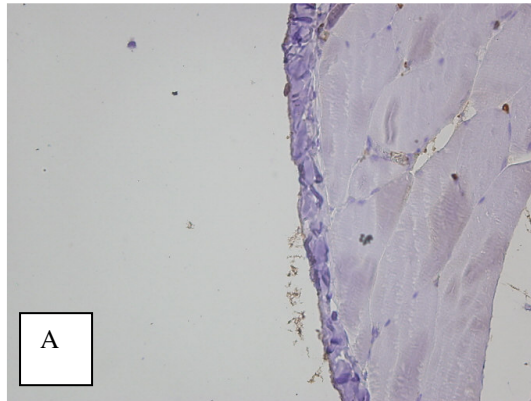
Resim-13: İmmünohistokimyasal olarak SF grubuna ait peritondaki MMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)



Resim-14: İmmünohistokimyasal olarak KH grubuna ait peritondaki TIMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)



Resim-15: İmmünohistokimyasal olarak KH+Epo grubuna ait peritondaki TIMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)

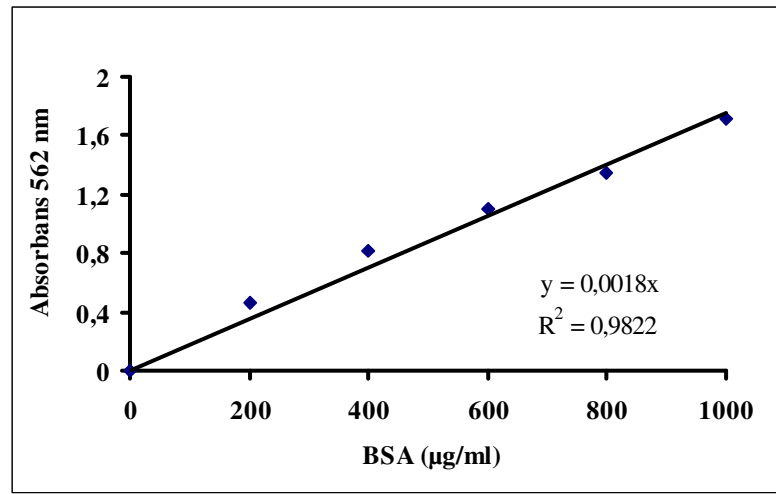


Resim-16: İmmünohistokimyasal olarak SF grubuna ait peritondaki TIMP-2 görünümü. A (paryetal) B (Visseral)

D. Biyokimyasal Değerlendirme

Parietal periton doku homojenatlarında protein düzeyleri

Parietal periton doku homojenatlarındaki protein düzeyleri Şekil-4’de gösterilen standart ölçümleme eğrisinden yararlanılarak hesaplandı. Her doku örneği için saptanan protein düzeyleri; jelatinaz aktivite düzeylerinin μg protein başına (AU/ μg protein) ve TIMP-2 düzeylerinin mg protein başına ng TIMP-2 (ng/mg protein) olarak ifade edilmesinde kullanıldı.



Şekil-4: BSA standart ölçümleme eğrisi

Paryetal Periton Dokusunda Ölçülen Pro ve Aktif MMP-2 ile TIMP-2 Düzeyleri

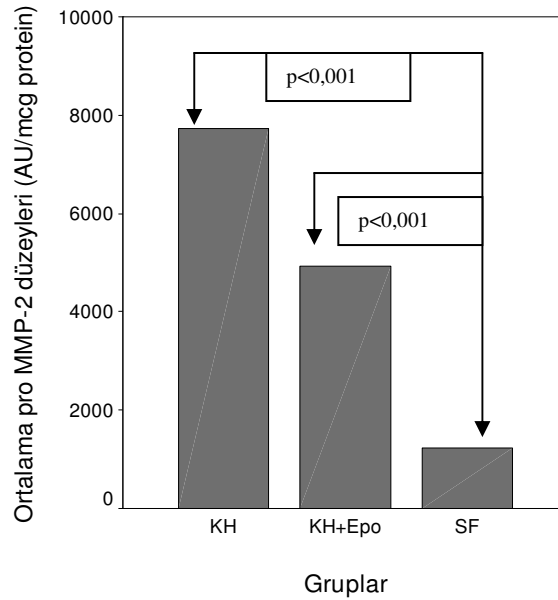
Paryetal periton dokusunda biyokimyasal olarak ölçülen proMMP-2, aktif MMP-2, Aktif MMP-2/proMMP-2 oranı ve TIMP-2’nin tüm gruplardaki ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo-9’da gösterilmiştir. ProMMP-2 ve aktif MMP-2 için bulunan değerler yoğunluk/mikrogram protein olarak ifade edilmiştir.

Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada ortalama proMMP-2 açısından KH ve KH+Epo gruplarındaki artış SF grubuna göre anlamlı bulundu ($p < 0,001$). KH grubu ile KH+Epo grubu arasında proMMP-2 açısından fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Grafik-8).

Gruplar	KH	KH+Epo	SF	p-değeri
Paryetal Periton ProMMP-2 (yoğunluk/mikrogram protein)	7736±3452	4120±2277	1219±480	<0,001 ^{b,c} AD ^a
Paryetal Periton aktif MMP-2 (yoğunluk/mikrogram protein)	2224±1310	3745±1225	51±30	<0,001 ^{b,c} AD ^a
Aktif MMP-2/proMMP-2	0,30±0,16	0,70±0,32	0,04±0,02	<0,01 ^a <0,001 ^{b,c}
Paryetal Periton TIMP-2 (pg / mg protein)	1506±1344	1957±1073	3379±2014	<0,05 ^{b,c} AD ^a

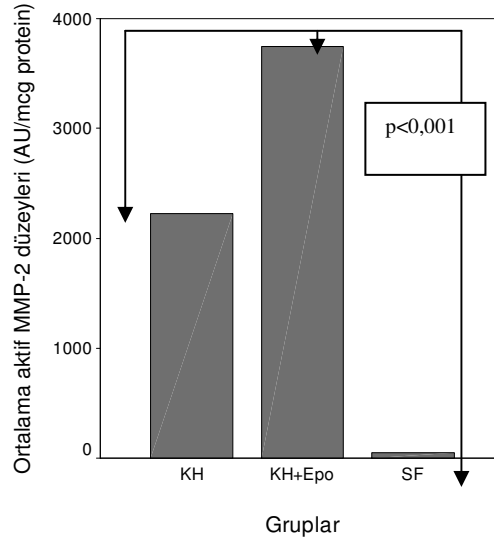
AD; anlamlı değil, a; KH ile KH+Epo arasında, b; KH ile SF arasında, c; KH+Epo ile SF arasındaki istatistiksel karşılaştırma

Tablo-9: Paryetal periton dokusunda proMMP-2 ve aktif MMP-2 ve TIMP-2'nin tüm gruplardaki ortalama ± standart sapma değerleri ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları



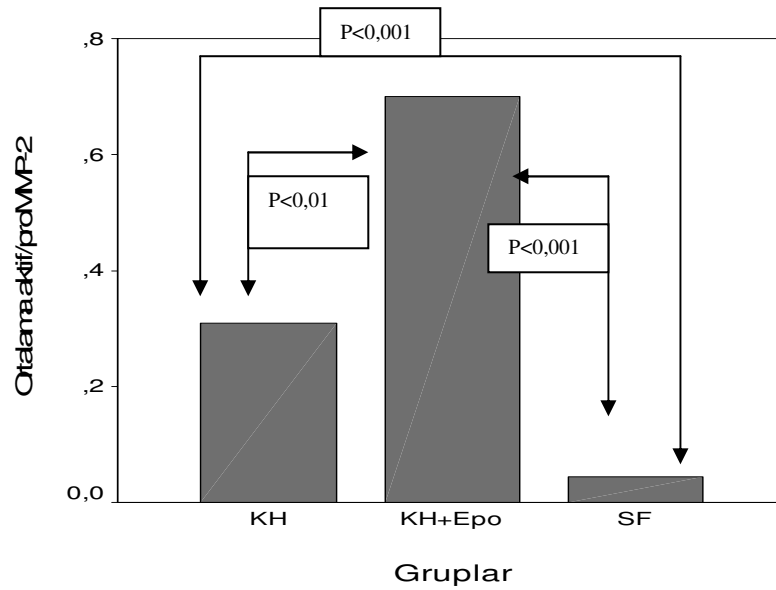
Grafik-8: Gruplara ait ortalama paryetal periton proMMP-2 düzeyleri

Ayrıca ortalama aktif MMP-2 açısından KH ve KH+Epo gruplarındaki artış SF grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0,001$). KH grubu ile KH+Epo grubu arasında proMMP-2 açısından fark bulunmadı ($p>0,05$) (Grafik-9).

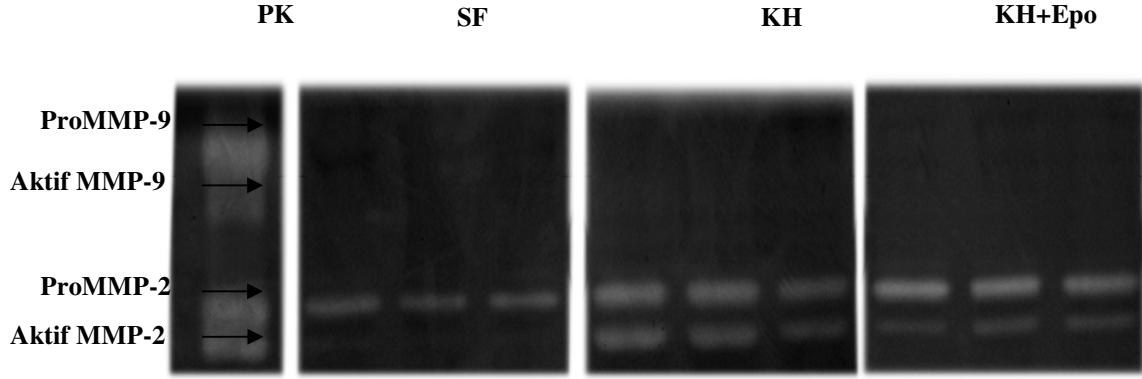


Grafik-9: Gruplara ait ortalama paryetal periton aktif MMP-2 düzeyleri

KH+Epo grubunda KH grubuna göre aktif MMP-2/proMMP-2 oranı anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,01$) (Grafik-10). Tüm grupları temsil eden zimogram örneği Resim-17’de gösterildi.

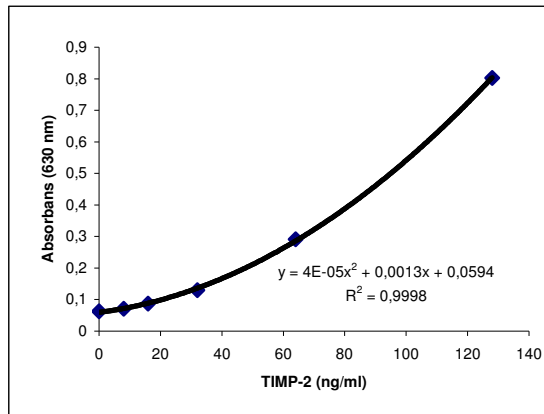


Grafik-10: Gruplara ait ortalama paryetal periton aktif MMP-2/proMMP-2 düzeyleri



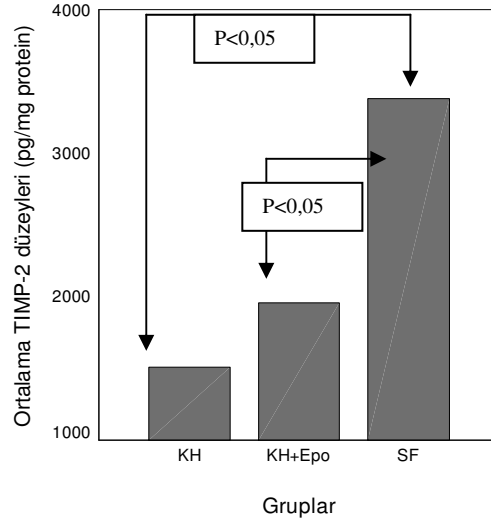
Resim-17. Gruplara ait paryetal periton proMMP-2 ve aktif MMP-2'nin jelatin zimografik görünümü

Dokularda TIMP-2 protein düzeyleri oluşturulan standart ölçümleme eğrisinden (Şekil-5) yararlanılarak hesaplandı. Paryetal periton dokusunda ölçülen TIMP-2 değerleri pikogram/miligram protein (pg/mg protein) olarak ifade edilmiştir.



Şekil-5: TIMP-2 standart ölçümleme eğrisi

Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmada ortalama TIMP-2 açısından KH ve KH+Epo gruplarındaki azalma SF grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0,05$). KH grubu ile KH+Epo grubu arasında TIMP-2 açısından fark bulunmadı ($p>0,05$) (Grafik-11).



Grafik-11: Gruplara ait ortalama paryetal periton TIMP-2 düzeyleri

TARTIŞMA

Çalışmamızda histopatolojik olarak darbepoetin hem paryetal hem de visseral peritonda klorheksidin glukonat grubuna göre periton kalınlaşmasını azalttığı gösterildi. Ancak yangı skorlaması, damarlanma skorlaması ve fibrotik alan yüzdesi üzerine etkili olmadığı görüldü. Darbepoetin'in peritonda kalınlaşmayı azaltmasına rağmen; yangı skorlaması, damarlanma skorlaması ve fibrotik alan yüzdesi açısından farklılık olmamasını, bu bulguların daha geç dönemde ortaya çıkmasından kaynaklanabileceği düşüncesiyle açıklayabiliriz.

Bu çalışmada paryetal ve visseral peritonda meydana gelen değişiklikler histopatolojik ve immünohistokimyasal olarak aynı bulundu. Visseral peritonun biyokimyasal çalışmalar için özellikle serum fizyolojik grubunda karaciğer üzerinden yeterli ve iyi bir örnekleme yapmanın zorlukları nedeniyle biyokimyasal çalışmalarda visseral periton kullanılmadı.

Çalışmamızda darbepoetin saf olarak kullanılmadı. Darbepoetin alfa; sodyum fosfat monobazik, sodyum fosfat dibazik, sodyum klorür, polisorbit 80, saf su gibi yardımcı maddelerle birlikte kullanılmaktadır. Çalışma sonunda peritoneal fibrozis gelişimin azalttığı için gerek darbepoetin gerekse yardımcı maddelerden herhangi birisinin peritoneal fibrozis yapıcı etkisi olduğunu düşünmüyoruz. Hem darbepoetin hemde yardımcı maddelerden herhangi birisinin peritoneal fibrozis yapıcı etkisi olsa bile bunu da önlemiş olduğunu söyleyebiliriz. Çünkü klinik olarak darbepoetin içerdiği maddelerle birlikte cilt altına uygulanmaktadır. Bu nedenlerle içerdiği maddelerin peritoneal fibrozis üzerine etkisini göstermek için ayrı kontrol grupları kullanılmadı.

Periton diyaliz (PD) hastalarında peritoneal fibrozis (PF) gelişmesinde birçok faktör önemli rol oynamaktadır. PF'ne neden olan en önemli faktörler biyoyumsuz diyaliz sıvıları, diyaliz sıvılarındaki glikoz miktarının yüksekliği, diyaliz sıvılarının fazla ısıtılmasına bağlı olarak gelişen glikoz yıkım ürünleri ve ileri glikozilasyon son ürünleridir (37,38). Üreminin tek başına PF'ne neden olduğu sağlıklı kontrol grubunun peritonu ile diyaliz başlamadan önceki son dönem böbrek yetmezliği hastalarının periton kalınlığı karşılaştırıldığında gösterilmiştir (5).

Biz çalışmamızda deneysel peritoneal fibrozis oluşturmak için tuzlu su içinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 klorheksidin glukonat bulunan solusyonu kullandık. Deneysel peritoneal fibrozis karın içine klorheksidin glukonat (KH) kullanılarak yapılabilmektedir

(2). Klorheksidin glukonat bugün için klinikte kullanılmayan ancak deneysel periton fibrozisi oluşturmak için kullanılan kimyasal bir maddedir. Deneysel peritoneal fibrozis oluşturmak için değişik modeller mevcuttur ve peritoneal fibrozis gelişimini önlemek için çalışmalar sürmektedir (4,84).

Klorheksidin glukonat ve alkol'un peritoneal fibrozisi'nin patogenezisindeki önemini ilk kez 1985 yılında Junor ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (76). Periton diyaliz kateterini alkol içerisinde klorheksidin glukonat ile sterilize ettiklerinde klinik olarak sklerozan enkapsüle peritonit (SEP) geliştiğini rapor etmişlerdir. Bunun üzerine Ishii ve arkadaşları tuzlu su içerisinde %0,1 klorheksidin glukonat ve %15 etil alkol kullanarak 0,3ml karın içerisine uyguladıkları deney hayvanlarında peritoneal fibrozis geliştiğini göstermişlerdir (76).

Deney hayvanlarında tuzlu su içerisinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 klorheksidin glukonat ile yapılan peritoneal fibrozis modellerinde ilk doz uygulamasından sonra görülen bulgular belirtilmemiştir. Deney hayvanlarında gözlenen bu bulguların yüksek doz etil alkol ve klorheksidin glukonat'ın yarattığı akut metabolik asidozdan ve alkolün nörolojik etkilerinden veya kan basıncı düşüklüğüne sebep olarak gelişmiş olabileceğini düşünüyoruz.

Periton diyaliz hastalarında ve deneysel SEP geliştiğinde periton sıvısında ve periton dokusunda jelatinazlar ve özellikle MMP-2 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (2,4). Bu artışın sebebi MMP-2'nin peritoneal fibrozisinin ilerlemesiyle karın duvarında ve barsaklarda oluşan yapışıklıkların artmasıyla ilişkili olabileceği bildirilmektedir (2,4).

Çalışmamızın sonunda tuzlu su içinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 klorheksidin glukonat alan deney hayvanlarının peritonunda karaciğer ve karın ön duvarına yapışıklıklar olduğu gözlemlendi. Bu da deneyin başarılı olduğunu göstermektedir.

Son zamanlarda Eritropoetin'in, süregen böbrek yetmezliğindeki aneminin tedavisi dışında başka etkilerinin de olduğu gösterilmiştir. Böbreklerde iki taraflı iskemik-reperfüzyon modeli ile oluşturulan akut böbrek yetmezliği modelinde dışardan eritropoetin verilmesi ile apoptozisi inhibe ettiği, tübüler epitelyal rejenerasyonu artırdığı ve böbrek fonksiyonlarının geri dönüşümünü hızlandırdığı gösterilmiştir (7). Ayrıca tübüler hasarı ve interstisyel fibrozisi de azalttığı gösterilmiştir.

Periton zarında gelişen yangısal olaylarda salgılanan sitokinler periton zarındaki mezotel hücrelerden, damar duvarındaki hücrelerden ve yangı bölgesinde biriken hücrelerden fibrin yapıcı ve yeni damar yapımını artırıcı uyarıcıların salınımını artırarak

peritoneal fibrozis gelişimini artırır (2). Fibrozisin başlaması ve devam etmesinde matriks metalloproteinazları ve onların doğal durdurucuları rol almaktadır (48,85). Peritonda MMP'ler ve TIMP'lerin periton mezotelyal hücreler, fibroblastlar ve makrofajlar tarafından üretildikleri gösterilmiş ve periton hücre kültürlerinde MMP-2, MMP-3 ve MMP-9, TIMP-1 ve TIMP-2 aktivitelerinin belirgin olduğu ölçülmüştür. Ayrıca TIMP'lerin sadece MMP'leri baskılamadığı aynı zamanda dokuda düşük düzeylerde MMP aktivitesini artırdığı da gösterilmiştir(48,52,55). Son zamanlarda deney hayvanlarında peritoneal fibrozis gelişimini önlemek için MMP baskılayıcıları kullanılarak yeniden damar yapımının ve yangısal hücrelerin birikiminin önlendiğini gösteren çalışmalar yapılmaktadır (2,42,52).

Çalışmamızda hem paryetal hem de visseral peritonda immünohistokimyasal olarak Darbepoetin kullanılan grupta MMP-2 düzeyinin klorheksidin glukonat kullanılan gruba göre baskılandığı ancak serum fizyolojik grubuna göre arttığı görüldü. Biyokimyasal olarak ise aktif MMP-2/proMMP-2 oranını, Darbepoetin verilen sıçanların paryetal peritonunda klorheksidin glukonat kullanılan grubuna göre artırdığı görüldü. İmmünohistokimyasal olarak periton dokusunda MMP-2'ler hem pro-MMP-2'yi hem de aktif MMP-2'yi birlikte göstermektedir. Buna göre Darbepoetin'in periton dokusunda total MMP-2 düzeyini artırdığı ve pro-MMP-2'den aktif MMP-2 dönüşümünü hızlandığını immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak birlikte çalışıldığı için rahatlıkla söyleyebiliriz. Bu bulgulara göre Darbepoetin'in deney hayvanlarında klorheksidin glukonata bağlı peritoneal fibrozis gelişimini azaltmadaki etkisinin aktif MMP-2 düzeyini artırarak gösterdiğini düşünüyoruz.

Peritoneal doku TIMP-2 düzeyleri açısından değerlendirildiğinde, immünohistokimyasal olarak serum fizyolojik grubuna göre hem klorheksidin glukonat grubunda hem de Darbepoetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı arttığı ancak klorheksidin glukonat kullanılan grup ile Darbepoetin kullanılan grup arasında fark olmadığı görüldü. Biyokimyasal olarak ise serum fizyolojik grubuna göre hem klorheksidin glukonat hem de Darbepoetin kullanılanlarda istatistiksel olarak anlamlı düşüklük bulundu. İmmünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak bu sonuçlar çelişkili gibi görünmektedir. Bunun nedeni, biyokimyasal olarak TIMP-2 ölçülen doku hacminin diğer gruplarla eşit olması ve immünohistokimyasal olarak serum fizyolojik grubundaki periton zarının çok ince olması nedeniyle TIMP-2 skorlarının daha düşük görülmesine neden olmuş olabilir. Ayrıca bunun biyokimyasal olarak periton doku örneklemesinden kaynaklanmış olabileceğini

düşünmüyoruz. Çünkü böyle bir durumda yangının olduğu peritonda TIMP-2 düzeyi periton altındaki kas ve diğer dokulardan daha az birikmiş olabileceği sonucunu gösterir ki bu da bugünkü bilgiler ışığında mümkün görünmemektedir. Bu bulgulara göre klorheksidin glukonat kullanılarak yapılan peritoneal fibrozisde peritoneal dokuda TIMP-2 düzeyleri biyokimyasal olarak baskılanmaktadır. Darbepoetin kullanılan grupta peritoneal fibrozis gelişiminin azalmış olması yangıya bağlı olarak kontrol grubuna göre azalmış olan TIMP-2 düzeyini artırarak göstermiş olabilir. Bizim bulgularımızda Darbepoetin kullanılanlarda TIMP-2 düzeyinin klorheksidin glukonat kullananlara göre arttı fakat istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşamadı. Bunun nedeni yangının devam etmesinden veya çalışma gruplarındaki denek sayısının azlığından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Bütün bu bulgular ışığında; Darbepoetin kullanılan grupta peritoneal fibrozis gelişiminin önlenmesinde, periton dokusunda TIMP-2 düzeyini veya aktivitesini uyararak pro-MMP-2'nin aktif MMP-2'ye dönüşümünü artırarak etki ettiği sonucunu çıkarabiliriz. Ayrıca Darbepoetin'in deney hayvanlarında klorheksidin glukonata bağlı peritoneal fibrozisi azaltmada başka yollar üzerinden de yapmış olabileceği düşünülebilir. Bunun için periton fibrozisi üzerine etkili diğer yollar üzerinden başka çalışmalar yapılabilir.

Sonuç olarak: Bu çalışma sonunda tuzlu su içinde erimiş %15 etil alkol ve %0,1 KH ile paryetal ve visseral periton dokusunda fibrozis oluşturulması başarılı bulundu. Darbepoetin, klorheksidin glukonat ile oluşturulan kimyasal peritoneal fibrozisinde hem paryetal peritonda hem de visseral peritonda histopatolojik olarak azalmasına neden olmuştur. İmmünohistokimyasal olarak Darbepoetin hem paryetal hem de visseral peritonda MMP-2'yi klorheksidin glukonat grubuna göre baskılarken TIMP-2 üzerine etkili bulunmamıştır. Biyokimyasal olarak ise paryetal peritonda aktif MMP-2/proMMP-2'yi artırması anlamlı bulunurken TIMP-2 düzeyleri üzerine anlamlı etkisini gösteremedik. Darbepoetin kimyasal peritonit geliştirilen deney hayvanlarında peritoneal fibrozis gelişimini azaltması, periton dokusundaki TIMP-2'nin etkinliğini artırarak proMMP-2'nin aktif MMP-2'ye dönüşümünü hızlandırarak etkili olabilir. Ayrıca darbepoetin proMMP-2 ve aktif MMP-2 dışında başka yollar üzerinden de etkili olabilir. Darbepoetin'in peritoneal fibrozise neden olmadığı ve peritoneal fibrozis gelişimini azaltabileceği söylenebilir. Ancak bu konuda gerek doz ile ilgili gerekse süre ile ilgili geniş çaplı deneysel ve klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- 1- Krediet RT. 30 years of peritoneal dialysis development: the past and the future. *Perit Dial Int* 2007;27 (Suppl 2):S35–S41.
- 2- Hirahara I, Inoue M, Okuda K, Ando Y, et al. The potential of matrix metalloproteinase–2 as a marker of peritoneal injury, increased solute transport, or progression to encapsulating peritoneal sclerosis during peritoneal dialysis--a multicentre study in Japan. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22:560–7.
- 3- Heimbürger O, Waniewski J, Werynski A, Tranaeus A. Peritoneal transport in CAPD patients with permanent loss of ultrafiltration capacity. *Kidney Int* 1990;38:495 -506.
- 4- Hirahara I, Umeyama K, Shofuda, k, Kusano E, et al. Increase of matrix metalloproteinase–2 in dialysate of rat sclerosing encapsulating peritoneal model. *Nephrology* 2002;7:161–169.
- 5- Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:470–9.
- 6- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research* 2006; 69: 562 – 73.
- 7- Johnson DW, Pat B, Vesey DA, Guan Z, et al. Delayed administration of darbepoetin or erythropoietin protects against ischemic acute renal injury and failure. *Kidney Int* 2006;69:1806–13.
- 8- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10526–31.
- 9- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:4802–6.
- 10- Lee SH, Li C, Lim SW, Ahn KO, et al. Attenuation of interstitial inflammation and fibrosis by recombinant human erythropoietin in chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol* 2005;25:64–76.
- 11- Park SH, Choi MJ, Song IK, Choi SY, et al. Erythropoietin decreases renal fibrosis in mice with ureteral obstruction: role of inhibiting TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1497–507.

- 12- Nishiya D, Omura T, Shimada K, Matsumoto R, et al. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci* 2006;101:31–9.
- 13- Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, Mengel M, et al. Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. *Circulation* 2004;110:1006-12.
- 14- Dobbie JW, Anderson JD. Ultrastructure, distribution, and density of lamellar bodies in human peritoneum. *Perit Dial Int* 1996;16:482–7.
- 15- Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Wang AY, Heimbürger O, et al. Chronic inflammation in peritoneal dialysis: the search for the holy grail? *Perit Dial Int* 2004;24:327–39.
- 16- Nolph KD. Clinical implications of membrane transport characteristics on the adequacy of fluid and solute removal. *Perit Dial Int* 1994;14 (Suppl 3): S78–81.
- 17- Imholz AL, Koomen GC, Struijk DG, Arisz L, et al. Effect of an increased intraperitoneal pressure on fluid and solute transport during CAPD. *Kidney Int* 1993;44:1078–85.
- 18- Flessner M. Peritoneal transport physiology: insights from basic research. *J Am Soc Nephrol* 1991;2:122–35.
- 19- Teitelbaum I, Burkart J. Peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 2003;42:1082–96.
- 20- Brunkhorst RR. Individualized PD prescription: APD versus CAPD. *Perit Dial Int* 2005;25(Suppl 3):S92-S94.
- 21- Fenton SS, Schaubel DE, Desmeules M, Morrison HI, et al: Haemodialysis versus peritoneal dialysis: A comparison of adjusted mortality rates. *Am J Kidney Dis* 1997;30:334–42.
- 22- Van Biesen W, Vanholder RC, Veys N, Dhondt A, et al: An evaluation of an integrative care approach for end-stage renal disease patients. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:116–25.
- 23- Cochran ST, Do HM, Ronaghi A, Nissenson AR, et al. Complications of peritoneal dialysis: evaluation with CT peritoneography. *Radiographics* 1997;17:869–78.
- 24- Wanke T, Auinger M, Lahrmann H, Merkle M, et al. Diaphragmatic function in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Lung* 1994;172:231–40.
- 25- McCormick BB, Bargman JM. Noninfectious complications of peritoneal dialysis: implications for patient and technique survival. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:3023–5.

- 26- Oreopoulos DG. Pathogenesis and management of complications of chronic peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16 (Suppl 6): S103-S105.
- 27- Prichard S, Sniderman A, Cianflone K, Marpole D. Cardiovascular disease in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1996;16 (Suppl 1): S19-S22.
- 28- Bender FH, Bernardini J, Piraino B. Prevention of infectious complications in peritoneal dialysis: best demonstrated practices. *Kidney Int* 2006; (suppl 103):S44-S54.
- 29- Davies SJ, Phillips L, Griffiths AM, Russell LH, et al. What really happens to people on long-term peritoneal dialysis? *Kidney Int* 1998;54:2207–17.
- 30- Di Paolo N, Sacchi G, De Mia M, Gaggiotti E, et al. Morphology of the peritoneal membrane during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1986;44:204–211.
- 31- Rubin J, Rogers WA, Taylor HM, Everett ED, et al. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann Intern Med* 1980; 92:7–13.
- 32- Ho-dac-Pannekeet MM, Atasever B, Struijk DG, Krediet RT. Analysis of ultrafiltration failure in peritoneal dialysis patients by means of standard peritoneal permeability analysis. *Perit Dial Int* 1997;17:144–50.
- 33- Struijk DG, Krediet RT, Koomen GC, Boeschoten EW, et al. A prospective study of peritoneal transport in CAPD patients. *Kidney Int* 1994;45:1739–44.
- 34- Hung K, Huang J, Tsai T, Hsieh B. Peritoneal fibrosing syndrome: pathogenetic mechanism and current therapeutic strategies. *J Chin Med Assoc* 2005;68:401–5.
- 35- Flessner MF. The effect of fibrosis on peritoneal transport. *Contrib Nephrol* 2006;150:174–80.
- 36- Mactier RA. The spectrum of peritoneal fibrosing syndromes in peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 2000;6:23- 8.
- 37- Margetts PJ, Bonniaud P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 2003;23:530–41.
- 38- Miyata T, Devusyst O, Kurukowa K, Van Ypersele de Strihou C. Toward beter dialysis compatibility advances in the biochemistry and pathophysiology of the peritoneal membranes. *Kidney Int* 2002;61:375- 86.
- 39- Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003;348:403–13.
- 40- Turck J, Pollock AS, Lovett DH. Gelatinase A is glomerular mesengial cell growth and differentiation factor. *Kidney Int* 1997;51:1397–400.

- 41- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251–62.
- 42- Nagase H, Woessner JF Jr. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999;274:21491–4.
- 43- Ohbayashi H. Matrix metalloproteinases in lung diseases. *Curr Protein Pept Sci* 2002;3:409–21.
- 44- Maskos K, Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol* 2003;25:241–66.
- 45- McIntush EW, Smith MF. Matrix metalloproteinases of tissue inhibitors of proteinases in ovarian function. *Rev Reprod* 1998;3:23–30.
- 46- Woessner FJ. MMPs and TIMPs: an historical perspective. *Mol Biotechnol* 2002;22: 33 – 49.
- 47- Woessner JF. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991;5:2145 –54.
- 48- Martin J, Yung S, Robson RL, Steadman R et al. Production and regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* 2000;20:524–33.
- 49- Takahara T, Funaki J, Nakayama Y, Miyabayashi C et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1995;21:787–95.
- 50- 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 peritoneal effluent. *Clin Exp Nephrol* 2005;9:85–89.
- 51- Fukudome K, Fujimoto S, Sato Y, Hisanaga S et al. Peritonitis increases MMP-9 activity in peritoneal effluent from CAPD patients. *Nephron* 2001;87:35–41
- 52- Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res* 1995;77:863–8.
- 53- Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother* 2003; 57: 195-202.
- 54- Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;49:187–98.

- 55- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 2002;90:251–62.
- 56- Jacob MP, Badier-Commander C, Fontaine V, Benazzoug Y, et al. Extracellular matrix remodeling in the vascular wall. *Pathol Biol* 2001;49:326–32.
- 57- Loftus IM, Thompson MM. The role of matrix metalloproteinases in vascular disease. *Vasc Med* 2002;7:117–33.
- 58- Borkakoti N. Matrix metalloprotease inhibitors: Design from structure. *Biochem Soc Trans* 2004;32:17–20.
- 59- Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev* 2004;9:63–79.
- 60- Beaudeau JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, et al. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: Therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:121–31.
- 61- Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: Current developments and future perspectives. *Oncologist* 2001;6:415–27.
- 62- Borkakoti N. Matrix metalloprotease inhibitors: Design from structure. *Biochem Soc Trans* 2004;32:17–20.
- 63- Axisa B, Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, et al. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques. *Stroke* 2002;33:2858–64.
- 64- Murphy G, Stanton H, Cowell G, Butler G, et al. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation, *APMIS*, 1999; 107:38–44.
- 65- Baramova EN, Bajou K, Remacle A, Hoir CL, et al. Involvement of PA/plasmin system in the processing of pro-9 and in the second step of pro-MMP-2 activation. *FEBS Letters*, 1997; 405:157–62.
- 66- Barrantes HS, Toth M, Bernardo M, Yurkova M, et al. Binding of active (57 kDa) membrane type1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2) regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*, 2000; 275:12080–89.
- 67- Fisher JW, Koury S, Ducey T, Mendel S. Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. *Br J Haematol* 1996;95:27–32.

68- van der Putten K, Braam B, Jie KE, Gaillard CA. Mechanisms of Disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure. *Nat Clin Pract Nephrol* 2008;4:47–57.

69- Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 2004;18:1462–4.

70- Nishiya D, Omura T, Shimada K, Matsumoto T, et al. Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol* 2006;101:31–9.

71- Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL. Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int* 1999;55:808–20.

72- Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10659–64.

73- Bogoyevitch MA. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc Res* 2004;63:208–16.

74- Macdougall IC. Novel erythropoiesis stimulating protein. *Semin Nephrol* 2000;20:375–81.

75- Macdougall IC. Darbepoetin alfa: a new therapeutic agent for renal anemia. *Kidney Int* 2002; 80:55–61.

76- Ishii Y, Sawada T, Shimizu A, Tojimbara T, et al. An experimental sclerosing encapsulating peritonitis model in mice. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1262–6.

77- Sis B, Sarioglu S, Sokmen S, Sakar M, et al. Desmoplasia measured by computer assisted image analysis: an independent prognostic marker in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;5:32-8.

78- Sarioglu S, Sis B, Celik A, Tekis D et al. Quantitative digital histochemistry with methenamine silver staining in renal allograft biopsies excluding pure chronic allograft nephropathy cases. *Transplant Proc* 2006;38:490 -1.

79- Sis B, Sarioglu S, Celik A, Kasap B et al. Renal medullary changers in renal allograft recipients with raised serum creatinine. *J Clin Pathol* 2006;59:377–81.

- 80-Sokmen S, Lebe B, Sarioglu S, Fuzun M, et al. Prognostic value of CD44 expression in colorectal carcinomas. *Anticancer Res* 2001;21:4121–6.
- 81- Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 15:175:2373–79.
- 82- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994;218:325-9.
- 83- U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–4.
- 84- Ersoy R, Celik A, Yilmaz O, Sarioglu S, et al. The effects of irbesartan and spironolactone in prevention of peritoneal fibrosis in rats. *Perit Dial Int* 2007;27:424–31.
- 85- Margetts PJ, Bonniaud P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis *Perit Dial Int* 2003;23:530–41.