

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



Deneysel Rat Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Transplantasyonunun Sklerozan
Peritonit Üzerine Etkisi

Proje No: TSA-11-3567

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Zübeyde GÜNDÜZ
Tıp Fakültesi/Çocuk Nefroloji

Araştırmacılar
Uzm. Dr. Funda Baştuğ /Çocuk Nefroloji
Uzm. Dr. Sebahat Tülpar/ Çocuk Nefroloji
Prof. Dr. Saim Özdamar /Histoloji ve Embriyoloji
Doç. Dr. İsmail Dursun /Çocuk Nefroloji

Şubat 2013
KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu proje ERÜ BAP tarafından desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2.GENEL BİLGİLER	8-12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12-15
4. BULGULAR	15-16
5. TARTIŞMA	17
6. KAYNAKLAR	18-20

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı sklerozan peritonit rat modelinde mezenkimal kök hücre (MKH) naklinin periton zar fonksiyonu ve fibrozis üzerine etkisini incelemektir.

Materyal-Metod:

Wistar albino ratlar dört gruba ayrıldı: Kontrol (n=7), klorheksidin glukonat (KG)(n=8), MKH (n=8) ve plasebo(P) (n=8) grupları. Kontrol grubu hariç tüm ratlara dört hafta süresince günlük intraperitoneal (ip) yolla 2 ml/200gr dozunda KG çözeltisi (KG çözeltisinin içeriği: izotonik içinde çözünmüş %0.1 KG ve %15 etanol) verildi. Dört haftanın sonunda MKH grubuna 1.5-2 milyon/kg dozunda MKH, P grubuna ise MKH grubundaki ile eşit hacimde olacak şekilde izotonik çözeltisi ip yolla verildi. Kontrol ve KG grupları dört haftanın, MKH ve P grubu ise beş haftanın sonunda değerlendirildi. Tüm ratlara PET yapıldı. Pariyetal periton ışık mikroskobunda değerlendirildi.

Bulgular: Plasebo grubunda peritonda ciddi makroskobik değişiklikler görüldü. D/Püre, D/Pprotein ve D/Psodyum değerleri KG, MKH ve P gruplarında kontrol grubundan yüksek bulundu. Bu solütlerin geçirgenliği MKH grubunda KG ve P gruplarındaki ile benzerdi. DD0glukoz ve D/Pcrea açısından gruplar arasında farklılık bulunmadı. Fibrozis MKH grubunda KG grubuna göre azalmıştı (p=0.04). P ve KG grubu arasında ise fibrozis açısından fark bulunmadı (p=0.8). P grubunda neovaskularizasyon MKH grubunkine göre fazla olmakla birlikte istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı (p=0.08).

Tartışma:

Çalışmamızda sklerozan peritonit rat modelinde MKH tedavisinin fibrozisi geriletmediği gözlemlendi. Fakat periton zar fonksiyonu üzerinde MKH naklinin iyileştirici bir etkisi gözlenmedi. Periton fonksiyonu üzerinde düzeltici etkinin görülmemesi periton iyileşmesi için yeterli sürenin olmaması ile ilgili olabilir.

Anahtar Kelimeler: deneysel model, mezenkimal kök hücre, sklerozan peritonit

ABSTRACT

EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION ON SCLEROSING PERITONITIS

Aim: The purpose of this study was to determine the effect of mesenchymal stem cells (MSC) transplantation on the peritoneal fibrosis and function of peritoneal membrane in rat models of sclerosing peritonitis.

Materials-Methods:

Wistar albino rats divided into four groups: Control (C) (n=7), chlorhexidine gluconate (CG) (n=8), MSC (n=8) and placebo (P) (n=8) groups.

All rats, except for C group, were given 2ml/200gr 0.1% CG and 15% ethanol dissolved in saline daily by intraperitoneal (ip) injection during four weeks.

After 4 weeks, MSC group was treated with 1.5-2million MSC/kg and P group was treated with an equal volume of saline solution via ip injection.

The C and CG groups were evaluated at the end of fourth week, MSC and P groups were evaluated at the end of fifth week. PET was performed to all animals. The parietal peritoneum was evaluated histologically by light microscopy.

Results:

Placebo group showed a serious macroscopic change with adhesion of the peritoneum. D/Purea, D/Pprotein and D/PNa in the CG, MSC and P groups were significantly higher than the C group. The permeability of this solutes in the MSC group was similar to those of the CG and P groups. There was no difference between groups in terms of DD0glucose and D/Pcr. Fibrosis of the MSC group was low compared with CG group ($p=0.04$). No significant differences were found between the P and CG group according to fibrosis. There was more neovascularization process was observed in the P group than in the MSC group, although this difference was not reached to statistically significant levels ($p=0.08$).

Conclusion:

MSC treatment decreased peritoneal fibrosis in our rat sclerosing peritonitis model. MSC transplantation did not lead to improvement in peritoneal membrane function. Failure in peritoneal functional improvement possibly was due to there was not enough time for adequate peritoneal healing.

Keywords: experimental model, mesenchymal stem cell, sclerosing peritonitis

GİRİŞ

Çocuklarda, özellikle de erken çocukluk döneminde, son dönem böbrek yetmezliğinde bir renal replasman tedavisi olarak periton diyalizi büyük önem taşımaktadır. Periton diyalizi sırasında birçok komplikasyon ortaya çıkabilmektedir. Sklerozan peritonit nadir görülmekle birlikte çok tehlikeli, hatta ölüme yol açabilen bir PD komplikasyonudur. Sklerozan peritonitte periton membranında sklerotik kalınlaşma ile birlikte kısmi veya tam bağırsak tıkanıklığı gelişir. Sklerozan peritonitin en önemli nedenleri olarak tekrarlayan peritonit atakları ve uzun süredir PD tedavisi görülmektedir. Sklerozan peritonitin tedavisi tartışmalıdır. Tedavisinde total parenteral beslenme, immunosupresif tedavi, cerrahi, periton diyalizinin kesilmesi gibi uygulamalar vardır (1).

Kemik iliği hücreleri kültür kaplarında kültüre edildikleri zaman hızla plastik kültür kabına yapışan (adhere olan) hücrelerin kemik iliği stromal hücreleri olduğu, yapışmayan (non-adherent) hücrelerin ise hematopoietik hücreler olduğu 1966'lı yıllardan beri bilinmektedir. Son yıllarda ise, stromal hücre sistemine duyulan ilgi giderek artmaktadır. Önceleri, kemik iliği kökenli stromal hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler (MSC) hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girerken daha sonraları in vivo ve in vitro çalışmalarla aralarında kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, adipoz doku, böbrek, akciğer ve bağırsakların da olduğu çeşitli hematopoietik olmayan dokuların parankimal hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir. İn vivo ve in vitro çalışmalar, mezenkimal kök hücreleri her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokuları oluşturan bir multipotent kök hücre kaynağı olarak belirlemişlerdir (2-8). Mezenkimal kök hücrelerin miyokard, karaciğer ve tıkanıklığa sekonder böbrek fibrozis deney modellerinde fibrozisi önleyici ve fibrozisi azaltıcı etkileri gözlenmiştir (9-11).

Bu çalışmada, deneysel olarak sklerozan peritonit oluşturmuş ratlarda, intraperitoneal olarak mezenkimal kök hücre transplantasyonunun fibrozisi düzeltici etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Peritonun Anatomisi

Periton karın boşluğunu döşeyen seröz zardır. İki bölümden oluşmaktadır. Karın ön ve arka duvarlarının iç, diafragmanın alt ve pelvis boşluğunun üst yüzünü saran bölümü paryetal periton, karın arka duvarından ve diafragmadan bazı bölgelerde ayrılarak, iç organların bir kısmını veya tamamını saran bölümü ise visseral periton olarak adlandırılmaktadır. İki periton bölümü arasındaki boşluğa periton boşluğu denilmektedir. Bu boşlukta surfaktan benzeri, fosfolipidden zengin az miktarda periton sıvısı bulunur, bu sıvı başlıca mezotelyal hücreler tarafından salgılanır. Periton diyalizi sırasında yüzey alanının yaklaşık üçte biri periton sıvısı ile temas halinde olur (12-13). Ayrıca visseral periton anatomik periton yüzey alanının % 85'ini oluşturmaya rağmen total PD değişiminin sadece % 30'una katkıda bulunmaktadır (14).

Peritonun Histolojisi Ve Fonksiyonu

Periton zarı 2 tabakadan oluşmaktadır: a) Mezotel b) peritoneal interstisyum. Mezotel tabakası tek sıralı birbirlerine sıkıca bağlı yassı, skuamöz, özelleşmiş epitel hücrelerinden oluşmaktadır. Mezotel hücrelerinin yüzeyinde mikrovilli ve silialar vardır. Bunlar mezotel yüzeyini sürtünme hasarından korumakta ve surfaktan benzeri sıvının yapılmasını düzenlemektedir. Mezotel hücreleri arasında üç tip bağlantı vardır: desmosom, sıkı bağlantılar ve zonula adherens. Sıkı bağlantılar en çok bulunan bağlantı tipidir. Mezotelin başlıca görevi peritoneal homeostazın sağlanmasıdır. Mezotel hücrelerinden salgılanan glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve fosfolipidler hücrelerin etrafını saran glikokaliksi oluşturmaktadır ve karın içi organlarının sürtünme ile hasarlanmasını önlemektedir. Mezotel sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerini sentezleyerek inflamasyonun başlatılmasını ve düzenlenmesini sağlamaktadır. Mezotel hücreleri matriks proteinlerini de sentezlemektedir. Peritoneal kaviteden sıvı ve solütlerin taşınmasını sağlamaktadır. Mikroorganizmalara karşı bariyer görevi de görmektedir. Peritonun diğer tabakası olan interstisyum amorf madde içine gömülmüş lifler ve hücrelerden oluşmaktadır. Başlıca hücreler fibroblast ve başlıca lifler kollajendir. İnterstisyumda az sayıda hücre bulunmaktadır. Fibroblastlar ve mast hücreleri kan damarlarının yanında yer almaktadır. Çok az sayıda monosit ve makrofaj da bulunmaktadır. Amorf madde polisakkaritlerden oluşmaktadır. Kapillerlerin duvarı bazal membran ve endotelden oluşmaktadır ve insan peritonundaki kapiller damarların büyük çoğunluğu kesintisiz tiptedir, paryetal peritonda % 1.7 oranında pencere tipte kapiller saptanmıştır. İnterstisyumda lenfatikler de bulunmaktadır (15- 17).

Periton Diyalizi

Son dönem böbrek yetmezliği dönemine gelen çocuklar renal transplantasyona kadar bekleme sürecini diyaliz tedavisiyle geçirmek durumundadırlar. Diyaliz seçeneklerinden biri olan PD çocuklarda ilk kez 1978 yılında Toronto’da uygulanmış ve kısa sürede yaygınlaşmıştır (18).

Periton diyalizinin üç bileşeni vardır: 1) PD sıvısı 2) PD katateri 3) Periton zarı. Periton diyalizinde periton zarı diyaliz zarı olarak görev görmektedir, diyaliz sıvısı ile dolaşım arasında değişime olanak sağlamaktadır. Periton diyaliz sıvısı elektrolitler, tampon ve osmotik ajan içermektedir ve periton boşluğuna kalıcı kateter aracılığı ile verilmektedir (19, 20).

Kuzey Amerika ve Kanada’da PD’nin diyalize başlanan çocukların ~% 60’ında ilk tercih edilen tedavi şekli olduğu ve diyalize giren çocukların % 64’ünün PD tedavisinde olduğu bildirilmiştir (21). Türk Nefroloji Derneği verilerinde 2008 yılı sonu itibariyle Türkiye’de kronik diyaliz programında olan çocuk hastalardan 177’sinin hemodiyaliz (HD) programında 677’sinin ise PD programında olduğu bildirilmiştir (PD/HD= 3.8). Kronik diyalize başlanan çocuk hastaların % 70’inde ise PD ilk tercih edilen yöntem olmuştur (22). Periton diyalizi diyaliz modaliteleri içinde çocuklarda daha çok tercih edilen form olmasına rağmen 3-5 yıl için güvenilir ve etkin bir tedavidir. Periton diyalizinin teknik etkinliği peritonun yapısal ve fonksiyonel bütünlüğüne bağlıdır. Zaman içinde peritonun yapı ve fonksiyonunda oluşan değişiklikler periton diyalizinin uzun yıllar uygulanabilmesini engellemektedir (23).

Periton Geçirgenliğinin Değerlendirilmesi

Periton membran fonksiyonlarını değerlendirmek için farklı testler uygulanabilir. Bu testler arasında en yaygın kullanılanı PET’tir.

a) Periton eşitleme testi (PET)

Periton eşitleme testi, 2 litre % 2.27’lik diyalizat kullanılarak yapılan 4 saatlik tek bir değişim ile periton membranının geçirgenlik özelliğinin belirlenmesini sağlar.

Testin Yapılışı

1. Bir gece önce hasta normal periton diyalizi değişimini gerçekleştirir ve 8-12 saatlik bekletme zamanını takiben geceki diyalizatı boşaltmadan hastaneye gelir.
2. Geceki diyalizat hasta oturur pozisyonda iken 20 dakikada boşaltılır ve volümü kayıt edilir.
3. Hasta yatar pozisyonda iken 1100 ml/m² % 2.27’lik diyaliz solüsyonu 10 dakikada periton boşluğuna verilir. Bu sırada her 2 dakikada bir hasta sağ ve sola çevrilerek verilen çözeltinin

karında bulunan diyalizat ile karışması sağlanır. İnfüzyon tamamlandıktan hemen sonra 10 ml'lik bir diyalizat örneği alınır.

4. Test süresince hastanın dolaşması sağlanır.

5. Bekletmenin 2. ve 4. saatinde tekrar 10 ml diyalizat örneği alınır. Aynı anda kan örneği alınır.

6. Direnaja volümü ölçülür ve alınmış örnek sıvılar (30 ml) volüme ilave edilir.

7. Kan ve diyalizat örneklerinde kreatinin ve glukoz konsantrasyonu ölçülür.

8. Dördüncü saat diyalizat kreatinin konsantrasyonunun plazma kreatinin konsantrasyonuna oranı (D/P_{Cr}) ve 4. saat diyalizat glukoz konsantrasyonunun 0. saat diyalizat glukoz konsantrasyonuna oranı ($D/D_{0glukoz}$) hesaplanır. Bu sonuçlara göre hastanın peritonun geçirgenlik özelliği belirlenir (24).

D/P kreatinin <0.50 Düşük geçirgenlik

D/P kreatinin $0.50-0.65$ Düşük-orta geçirgenlik

D/P kreatinin $0.66-0.81$ Yüksek-orta geçirgenlik

D/P kreatinin >0.81 Yüksek geçirgenlik

Düşük peritoneal geçirgenliği olan olgularda ozmotik gradientin değişim süresince korunması nedeniyle mükemmel ultrafiltrasyon sağlanır, ancak üremik toksin atılımı yetersiz olabilir. Yüksek periton geçirgenliği olan olgularda ise yeterli solüt klirensi sağlanmasına karşın, ozmotik gradientin hızlı kaybolması sonucu ultrafiltrasyon yetersizliği görülebilir(14, 24).

Yüksek periton geçirgenlik durumu kötü prognostik bir göstergedir. Test sonucuna göre hasta için en uygun periton diyalizi rejimi belirlenir. PET verileri diyaliz dozunun reçetelendirilmesi, membran fonksiyonunun uzun süreli izlenmesi, solüt klirensi ve ultrafiltrasyon yetersizliklerinin ayırıcı tanısında da kullanılabilir. İlk testin periton diyalizine başladıktan sonra 2-4 hafta içinde yapılması ve daha sonra 6 aylık aralıklarla veya klinik bir sorunla karşılaşıldığında tekrarlanması önerilmektedir (14, 24-26).

b) Farklı PET yöntemleri:

Modifiye PET: %3.86 lık sıvı kullanılarak yapılır, sodyum ölçümü eklenir

- UF kapasitesi
- Sodyum geçişi (Aquaporin fonksiyonu) ilk 30-90 dk'da olur
- Membranın solütlere geçirgenliği hakkında fikir verir

Hızlı PET: Sadece 4. saat ölçümleri yapılır

Kısa PET: 0 ve 2. saatte ölçüm yapılır, 4. saat yapılmaz

Mini PET: %3.86 ile 1. saatte kreatinin, glukoz ve sodyum değerlendirilir. Diyalizin 1. saati sonunda D/P Na ölçümü su transportu konusunda en basit bilgi edinme yoludur

Çift mini-PET: mini PET 1kez 3.86, 1kez 1.36 ile yapılır, 1. saatte Na ve volem ölçülür. Solut transportu, UF ve serbest su transportu hakkında bilgi verir (27-29).

c) Kronik periton diyalizi hayvan modellerinde yapılan farklı PET yöntemleri

Bir saatlik PET: Ratlara 20 ml %2.27 veya %1.5 glukozlu PD solüsyonu İP olarak yavaş bir şekilde verilir. Enjeksiyon sonrası 1. saatte periton sıvısı ve kan örnekleri alınır (30).

Doksan dakikalık PET: Ratlara 25-35 ml %3,86 glukozlu PD solüsyonu İP olarak verilir. Enjeksiyon sonrası 90. dakikada PD sıvısı ve kan örnekleri alınır (31).

İki saatlik PET: Ratlara 25-30 ml %2.27 glukozlu PD solüsyonu İP olarak verilir. Enjeksiyon sonrası 2. saatte PD sıvısı ve kan örnekleri alınır (32).

Sklerozan Peritonit

Sklerozan peritonit nadir görülmekle birlikte çok tehlikeli, hatta ölüme yol açabilen bir PD komplikasyonudur. Periton zarında belirgin sklerotik kalınlaşma ile birlikte kısmi veya tam barsak tıkanıklığı ile karakterize bir hastalıktır. Sıklığı %0.7-2.8 arasında değişmektedir. Mortalite oranı yüksektir. Vakaların 1/3 ila 2/3'ü ölüm ile sonuçlanmaktadır (1). Sklerozan peritonit gelişiminde birçok faktör vardır: Biyouyumsuz PD sıvıları, uzun süredir PD programında olmak, tekrarlayan peritonitler, özellikle S.aureus, pseudomonaslar ve mantarlardan kaynaklanan ağır ve/veya dirençli peritonitler. Patogenezinde inflamasyon, fibrozis, anjiogenez rol almaktadır (1, 33).

Sklerozan peritonitin klinik belirtileri bulantı-kusma, karın ağrısı, kilo kaybı, kanlı diyalizat, UF kaybı, hafif ateştir. Tanı klinik olarak şüphelenilen hastalarda radyolojik testler ve biyopsi yardımı ile konulmaktadır.

Sklerozan peritonitin tedavisi tartışmalıdır. Tedavisinde total parenteral beslenme, immunosupresif tedavi, cerrahi, periton diyalizinin kesilmesi gibi uygulamalar vardır (34).

Sklerozan Peritonit Deneysel Hayvan Modelleri

Literatürde birçok hayvan modeli kullanılmıştır ve bunlar arasında klorheksidin glukonat ile oluşturulan en çok tercih edilmiştir (35).

Mezenkimal Kök Hücreler

Kemik iliği veya diğer dokulardan kaynaklanıp in vitro ortamda plastiğe yapışma özelliği olan hücrelerdir. Mezodermal kökenli hücrelerin dışında endodermal ve ektodermal kökenli hücrelere de dönüşebilmektedirler (2, 3). Mezenkimal kök hücrelerin miyokard, karaciğer ve böbrek fibrozis deney modellerinde fibrozisi önleyici ve fibrozisi azaltıcı etkileri gözlenmiştir (9-11). Daha önceki çalışmamızda kronik periton diyaliz modelinde MKH naklinin periton zarı üzerine olumlu etkilerini gözledik (36).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne bağlı Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) yapıldı. Çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Etik Kurul Karar No: 10/16). Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklendi.

Çalışmada 35 dişi wistar rat kullanıldı. Ratlar konvansiyonel laboratuvar şartlarında bakıldı ve su - yiyecek kısıtlanması yapılmadı.

Wistar albino ratlar dört gruba ayrıldı: Kontrol (n=7), klorheksidin glukonat (KG), MKH ve plasebo(P) grupları. Kontrol grubu hariç tüm ratlara dört hafta süresince günlük intraperitoneal (ip) yolla 2 ml/200gr dozunda KG çözeltisi (KG çözeltisinin içeriği: izotonik içinde çözünmüş %0.1 KG ve %15 etanol) verildi. Dört haftanın sonunda MKH grubuna 1.5-2 milyon/kg dozunda MKH, P grubuna ise MKH grubundaki ile eşit hacimde olacak şekilde izotonik çözeltisi ip yolla verildi. Kontrol ve KG grupları dört haftanın, MKH ve P grubu ise beş haftanın sonunda değerlendirildi. Tüm ratlara periton içine 20 ml %3.86 glukozlu PD sıvısı verilerek 60 dakikalık PET yapıldı. Pariyetal periton ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Mezenkimal Kök Hücreler

Dondurularak saklanan MKH'lere çözündürme işlemi uygulandı. Bu işleme başlamadan önce; Medium önceden hazırlandı. Su banyosu 37 °C ye ısınmış hale getirildi. Bütün bu hazırlıklardan sonra çözündürme işlemine geçildi.

İşlem Basamakları

- ✓ Derin dondurucudan çıkarılan kriyotüp son derece hızlı bir şekilde 37 °C su banyosuna koyuldu. Bir-iki dakika içinde hücreler çözüldüler. Tüp ele alındı ve alkolle silindi, özellikle kapak bölgesinin alkolle iyice silinmiş olmasına dikkat edildi.
- ✓ Kapak nazıkçe açıldı ve hücrelere çok nazık ve hafif bir şekilde pipetaj yapıldı.
- ✓ İçerik son derece dikkatli ve yavaş manipulasyonlarla pipete çekildi.
- ✓ Falkon tüpe (15 ml) aktarıldı ve içerisine 5-6 ml normal medium yavaşca kondu.
- ✓ 800 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- ✓ Süpernatant nazık şekilde çekilerek atıldı.
- ✓ Falkonun üzerine normal mediumdan 3-4 ml eklendi ve hafif şekilde pipetaj yapıldı.
- ✓ Tekrar 800 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- ✓ Kalan pelete 2 ml medium eklendi ve nazıkçe pipetaj yapıldı. Sonra flaksa ekildi, 24 saat beklendi. Ertesi gün ilk medium yıkama işlemi yapılarak değiştirildi. Fosfat buffer solusyonu ile 1-2 kez yıkandı. Sonra üç güne bir yıkama yapıldı ve medium değiştirildi. Takibi ise günlük yapıldı.
- ✓ %70-80 konfluense erişmiş hücreler pasajlama için ideal olarak kabul edildi.
- ✓ Hücreler tripsinizasyon öncesi kalsiyum ve magnezyum içermeyen PBS ile yıkandı.
- ✓ Daha sonra 2 ml tripsin (%0.25) flaska eklendi ve inkübatöre kaldırdı, 2-3 dk süreyle beklendi ve eğer hücreler kalkmamışsa inkubatörden alınan flaska hücrelerin kalkmasını sağlamak için hafif hafif vuruldu
- ✓ Hücrelere mikroskopta bakıldı. Eğer hücreler kalkmamışsa 1 dk daha inkubasyona bırakıldı.
- ✓ Hücrelerin kalkışı gözlenince flask dik şekilde köşesi üzerinde tutuldu ve pipetle hücrelerin tamamı toplandı.
- ✓ 15 ml'lik falkona içerik eklendi ve derhal üzerine 5-7 ml medium eklendi.
- ✓ Daha sonra 1200 rpm 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant atıldı.
- ✓ Tekrar 5 cc taze medium eklendi ve vortexlendi.
- ✓ Tekrar santrifüj yapıldı (1200 rpm'de 5 dk) ve süpernatant atıldı. Sonra 2 ml medium ilave edildi ve pipetaj yapılarak hücre sayımı ve canlılığı için 100 mikrolitre alındı, ependorfa kondu. Geri kalan kısmı flaska ekildi.
- ✓ 100 mikrolitre alınan hücre solüsyonuna 100 mikrolitre tripan blue kondu. Thoma lamina lamel kapatıldı. Kanallardan yavaşca 50 mikrolitre hücre verildi. 40'lık büyütme ile 16 büyük kare içindeki hücreler sayıldı. Mavi hücreler ölmüş hücrelerdir. Maviye boyanmamış hücreler sayıldı. Aşağıdaki formüle göre toplam hücre sayısı hesaplandı.

Hücre sayısı = Sayılan hücre x Dilüsyon oranı (2 ml) x 10.000

✓ Daha sonra hücreler inkubatöre kaldırıldı, 24 saat sonunda kontrol edildi. Pasaj zamanına kadar medium ~ 48 saatte bir değiştirildi.

✓ Üçüncü pasajda hücreler tripsinizasyondan sonra iki kere yıkanarak kullanıldı.

Mezenkimal kök hücreler ratlara verilmeden hemen önce tekrar sayıldı. Rat başına 1.2 milyon /kg olacak şekilde MKH intraperitoneal yolla verildi.

Histolojik İnceleme

Submezotelyal kalınlık, Damar sayısı, Fibrozis ve İnflamasyon açısından değerlendirme yapıldı. İnflamasyon ve fibrozis semikantitatif olarak değerlendirildi (0=normal, 1=hafif, 2=orta ve 3=ağır). Damar sayısı her dokuda rastgele 10 farklı alandaki damar sayısı sayıldı, ortalaması alındı, n/mm² olarak belirtildi. Submezotelyal kalınlık 10'ar ölçüm yapıp ortalaması alındı, µm olarak belirtildi.

BULGULAR

PET bulguları

Gruplar arasında DPüre, DPNa, DPcrea, DD0glukoz açısından fark bulunmadı.

	Kontrol	KG	MKH	Plasebo
DPüre	0.35 (0.24-0.55)	0.73b (0.52-0.85)	0.81b (0.41-1.69)	0.7b (0.47-1.1)
DPNa	0.7 (0.41-0.7)	0.8a (0.6-0.95)	0.93b (0.46-1.83)	0.84b (0.78-1)
DPprotein	0.008 (0.006-0.008)	0.070c (0.025 -0.177)	0.044c (0.015-0.227)	0.076b (0.017-0.099)
DPcrea	0.64±0.18	0.72±0.22	0.89±0.28	0.75±0.12
DD0glukoz	1 (0.18-1)	0.18 (0.09-1)	0.14 (0.02-1)	0.23 (0.08-1)

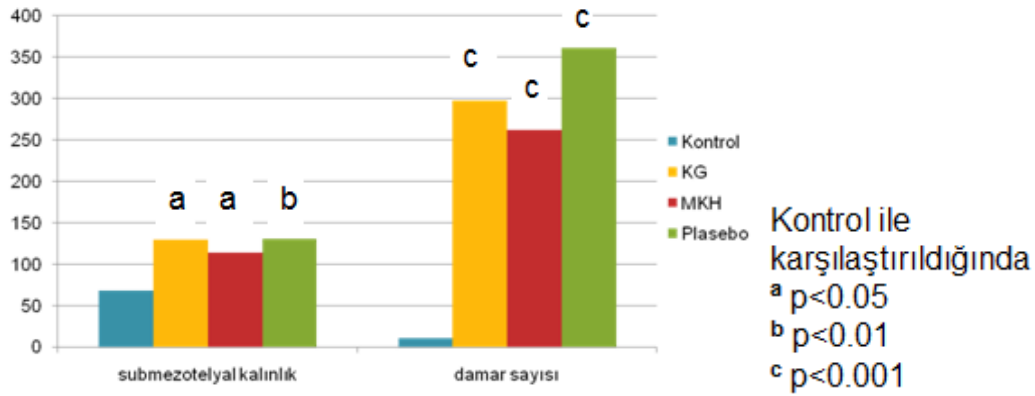
a $p<0.05$ kontrol ile karşılaştırıldığında

b $p<0.01$ kontrol ile karşılaştırıldığında

c $p<0.001$ kontrol ile karşılaştırıldığında

Damar sayısı ve submezotelyal kalınlık

Kontrole kıyasla diğer grupların hem damar sayısı hem de submezotelyal kalınlığı fazlaydı. MKH grubunda hem damar sayısı hem de submezotelyal kalınlık plasebo ve KG grubuna göre az olmakla birlikte istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı.



Fibrozis açısından grupların karşılaştırılması

	yok	hafif	Orta-ağır
Kontrol	7	0	0
KG	0	1	7
Plasebo	0	2	6
MKH	0	5	3

P=0.001 Kontrol grubu ile KG, plasebo ve MKH grupları karşılaştırıldığında

P=0.04 MKH ile KG karşılaştırıldığında

KG plasebo ile karşılaştırıldığında fark bulunmadı (p=0.5)

MKH plasebo ile karşılaştırıldığında fark bulunmadı (p=0.1)

İnflamasyon açısından grupların karşılaştırılması

	yok	hafif	Orta-ağır
Kontrol	7	0	0
KG	0	0	8
P	0	6	2
MKH	1	3	4

p=0.003, kontrol ile MKH karşılaştırıldığında

p=0.0001, kontrol ile KG karşılaştırıldığında

p=0.001, kontrol ile plasebo karşılaştırıldığında

p=0.02, plasebo ile KG karşılaştırıldığında

p=0.07, MKH ile KG karşılaştırıldığında

p=0.3, MKH ile plasebo karşılaştırıldığında

TARTIŞMA

Çalışmamızda sklerozan peritonit rat modelinde MKH tedavisinin fibrozisi geriletmediği gözlemlendi. Wang ve ark. (9)'larının çalışmalarında miyokard iskemisi rat modelinde 2 hafta sonra yapılan değerlendirmede MKH grubundaki fibrotik alanın plasebo grubundakine göre az olduğu gözlemlenmiştir. Kronik periton diyaliz modelinde MKH naklinin etkisini değerlendirdiğimiz daha önceki çalışmamızda da MKH'nin fibrozisi geriletici etkisini gözlemlemiştik (36). Bulgularımız MKH naklinin periton zarındaki fibrozisi de geriletebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda MKH naklinin inflamasyon üzerinde baskılayıcı etkisinin plasebo grubundaki kadar olmadığı görüldü. Önceki çalışmamızda da erken dönemde inflamasyon belirteçleri MKH grubunda yüksek bulunmuş, daha sonra bu belirteçlerin normale döndüğü gözlemlenmişti (36). Erken dönemde görülen inflamasyondaki nisbi artış MKH nakline bağlı etkileşimlerle ilişkili olabilir

Plasebo grubunda yeniden damarlanma artma eğilimindeydi, fakat MKH grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadı.

Periton zar fonksiyonu üzerinde MKH naklinin iyileştirici bir etkisi gözlemlenmedi. Periton fonksiyonu üzerinde düzeltici etkinin görülmemesi periton iyileşmesi için yeterli sürenin olmaması ile ilgili olabilir.

Çalışmamızın zayıf yönleri 1) MKH'nin peritona ulaştığını Western blot gibi daha güvenilir bir yöntemle gösterememiş olmamız (mali sebeplerden)

2) Değerlendirmeyi MKH tedavisini takiben bir hafta sonra yaptığımız için net etkiyi göremediğimizi düşünmekteyiz.

Sonuç olarak MKH nakli sklerozan peritonitte ümit verici bir tedavi yöntemi olabilir gibi düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1	Honda M, Warady BA. Long-term peritoneal dialysis and encapsulating peritoneal sclerosis in children. <i>Pediatr Nephrol</i> . 2010 Jan;25(1):75-81
2	Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. <i>Stem Cells</i> 2004; 22:487-500.
3	Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during exten subcultivation and following cryopreservation. <i>J Cell Biochem</i> . 1997; 64: 278-294.
4	Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. <i>Bone</i> 1992; 13: 81-88.
5	Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult hu mesenchymal stem cells. <i>Science</i> 1999; 284: 143-147.
6	Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. <i>Circ Res</i> 2004; 95: 9-20.
7	Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source hepatic oval cells. <i>Science</i> 1999; 284:1168-1170.
8	Rastegar F, Shenaq D, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. <i>World J Stem Cells</i> 2010; 2:67-80.
9	Wang D, Zhang F, Shen W, et al. Mesenchymal stem cell injection ameliorates the inducibility of ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rats. <i>Int J Cardiol</i> 2010, doi:10.1016/j.ijcard.2010.07.025
10	Lin H, Xu R,Zhang Z, Chen L, Shi M and Wang FS. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. <i>Cellular & Molecular Immunology</i> 2011; 8, 19–22
11	Asanuma H, Vanderbrink BA, Matthew T. Et al. Arterially Delivered Mesenchymal Stem Cells Prevent Obstruction-Induced Renal Fibrosis. <i>Journal of Surgical Research</i> , 2010 doi:10.1016/j.jss.2010.06.022
12.	Dobbie JW. New concepts in molecular biology and ultrastructural pathology of the peritoneum: their significance for peritoneal dialysis. <i>Am J Kidney Dis</i> 1990; 15: 97-109.
13.	Rangan G. Periton membranının fizyolojisi. In: Harris D, Elder G, Karaitis L, Rangan G. <i>Basic Clinical Dialysis</i> . Çeviri: Gürkan Kazancı. Klinik Diyalizin Temel İlkeleri. Nobel Tıp, İstanbul 2008, sf 170-175.
14.	Saxena R. Pathogenesis and treatment of peritoneal membrane failure. <i>Pediatr Nephrol</i> 2008; 23:695-703.
15.	Yung S, Chan TM. Mesothelial Cells <i>Perit Dial Int</i> 2007; 27:110–115.
16.	Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Dobbie JW. The biology of the mesothelium du peritoneal dialysis. <i>Perit Dial Int</i> 1995; 15: 13-22.
17.	Gotloib L. Functional structure of the peritoneum as a dialysing membrane. In: Khanna R, Krediet RT (eds), <i>Nolph Gokal's Textbook of Peritoneal dialysis</i> (Third edition). Springer, New York 2009, pp, 73-136.
18.	Söylemezoğlu O. Çocuklarda Diyaliz Uygulamaları. <i>Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci</i> 2008; 4:144-152.
19.	Schilte MN, Celie JW, Wee PM, Beelen RH, van den Born J. Factors contributing to peritoneal tissue remodeling in peritoneal dialysis. <i>Perit Dial Int</i> 2009; 29: 605-

	617.
20.	Teitelbaum I, Burkart J. Peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis 2003; 42:1082-1096.
21.	NAPRTCS 2008 Annual Report. www.emmes.com/study/ped/annlrept/Annual%20Report%20-2008.pdf
22.	Türkiye’de Nefroloji-Diyaliz ve Transplantasyon Registry 2008. www.tsn.org.tr/folders/file/registry%20kitap.pdf
23.	Chaudhary K, Sangha H, Khanna R. Peritoneal dialysis first: rationale. Clin J Am Soc Nephrol 2011; 6: 447-456.
24	Aksu N, Mir S. Çocuklarda sürekli ayaktan periton diyalizi. Akçiçek F (ed). Sürekli ayaktan periton diyalizi temel bilgiler kitabı. Ege Üniveristesi basımevi, Bornova, İzmir. 1997, pp: 189-204 (kaynak 34)
25	Smit W. Estimates of peritoneal membrane function—new insights. Nephrol Dial Transplant 2006; 21 (Suppl 2):16–19 (kaynak 22)
26	Andreas Fusshoeller. Histomorphological and functional changes of the peritoneal membrane during long-term peritoneal dialysis. Pediatr Nephrol 2008; 23:19–25 (kaynak 23)
27	Fitzwater DS, Jones DP. Use of a modified peritoneal equilibration test to optimize solute and water clearance. Pediatr Nephrol. 1995;9:341-5. kayn37
28	Milia VL, Di Filipo S, Crepaldi M et al. Mini-peritoneal equilibration test: A simple and fast method to assess free water and small solute transport across the peritoneal membrane. Kidney Int 2005; 68:840–46 kayn38
29	Rodrigues AS, Silva S, Bravo F et al. Peritoneal membrane evaluation in routine clinical practice. Blood Purif 2007;25:497-504 kayn39
30	Reddy DK, Moore HL, Lee JH et al. Chronic peritoneal dialysis in irondeficient rats with solutions containing iron dextran. Kidney Int 2001;59:764–73 kayn40
31	Schilte MN, Loureiro J, Keuning ED et al. Long-term intervention with heparins in a rat model of peritoneal dialysis. Perit Dial Int. 2009;29:26-35 kay41
32	Pecoits-Filho RF, Twardowski ZJ, Kim YL et al. The absence of toxicity in intraperitoneal iron dextran administration: a functional and histological analysis. Perit Dial Int. 1998 Jan-Feb;18(1):64-70. kayn42
33	Kawaguchi Y, Kawanishi H, Mujais S, Topley N, Oreopoulos DG. Encapsulating peritoneal sclerosis: definition, etiology, diagnosis, and treatment. International Society for Peritoneal Dialysis Ad Hoc Committee on Ultrafiltration Management in Peritoneal Dialysis. Perit Dial Int. 2000;20 Suppl 4:S43-55
34	Cornelis T, Oreopoulos DG. Update on potential medical treatments for encapsulating peritoneal sclerosis; human and experimental data. Int Urol Nephrol. 2011 Mar;43(1):147-56
35	Hoff CM. Experimental Animal Models of Encapsulating Peritoneal Sclerosis. Perit Dial Int 2005; 25:S57–S66
36	Tülpar S, Poyrazoğlu MH, Özbilge H, Baştuğ F, Gündüz Z, Torun YA, Kaya EG, Akgün H, Dursun I, Düşünsel R. Modulation of inflammation by mesenchymal stem cell transplantation in peritoneal dialysis in rats. Ren Fail. 2012;34(10):1317-23

Bu çalışma 45. ESPN kongresinde (45th Annual Scientific Meeting of the European Society for Paediatric Nephrology) Polonya’da poster bildirisi olarak, 29. Ulusal Nefroloji, HT, Diyaliz ve Transplantasyon kongresinde ise Antalya’da sözlü bildirisi olarak sunulmuştur.