

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**Kronik Peritoneal Diyaliz Modelinde Mezenkimal Kök Hücre
Transplantasyonunun Antioksidan Sisteme Etkisi**

Proje No: TSA-10-3064

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. M. Hakan Poyrazoğlu
Tıp Fakültesi/Çocuk Nefroloji

Araştırmacılar

Uzm.Dr. Sebahat Tülpar, Tıp Fakültesi/Çocuk Nefroloji
Uzm. Dr. Funda Baştuğ, Tıp Fakültesi/Çocuk Nefroloji
Prof. Dr. Hatice Özbilge, Eczacılık Fakültesi
Yrd. Doç. Dr. Esma Kaya, Eczacılık Fakültesi
Doç. Dr. Hülya Akgün, Tıp Fakültesi/Patoloji
Uzm. Dr. Yasemin Altuner Torun, Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Şubat 2013

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Bu araştırma ERÜ BAP tarafından desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER	8-17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18-22
4. BULGULAR	23-26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	27-28
6. KAYNAKLAR	29-33
7. YAYIN	34

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı ratlardaki kronik periton diyaliz (PD) modelinde mezenkimal kök hücre (MKH) naklinin periton morfolojisi ve antioksidan sistem üzerindeki etkilerini incelemektir

Gereç-Yöntem: Wistar albino erkek ratlar 4 gruba ayrıldı: Kontrol (K), PD, MKH ve plasebo grupları. Kontrol grubu hariç diğerlerine 6 hafta süresince %3.86'lık glukozlu PD sıvısı intraperitoneal yolla verildi. Altı haftanın sonunda MKH grubuna MKH, plasebo grubuna ise fosfat buffer solüsyonu verildi. Kontrol ve PD grubundaki ratlar 6 haftanın sonunda, P ve MKH grupları ise tedaviyi takip eden 1., 2. ve 3. haftalarda değerlendirildi (MKH1, P1, MKH2, P2, MKH3 ve P3 grupları). Peritonda ELİSA yöntemi ile GPx ve SOD çalışıldı ve histolojik değerlendirme yapıldı.

Bulgular: Submezotelyal kalınlık PD ve plasebo gruplarında K ve MKH gruplarına kıyasla belirgin artmıştı. GPx ve SOD düzeyleri PD grubunda kontrol grubuna göre belirgin artmıştı. GPx ve SOD düzeyleri MKH2 grubunda PD grubuna göre düşükken P2 grubundan yüksekti. GPX ve SOD düzeyleri MKH3 ve P3 grubunda PD grubuna kıyasla düşüktü.

Sonuç: Çalışmamızda MKH'nin suubmezotelyal kalınlığı belirgin olarak azalttığı görüldü. MKH'nın düzeltici etkisi kısmen antioksidan sistem yoluyla olabilir. MKH PD hastalarında periton zarını korumada umut vaat edici bir tedavi olabilir.

Anahtar kelimeler: Periton diyalizi, MKH, antioksidan sistem

ABSTRACT

EFFECTS OF MESENCYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION ON ANTIOXIDANT SYSTEM IN A RAT MODEL OF CHRONIC PERITONEAL DIALYSIS

Objective: The aim of the present study was to investigate the effect of mesenchymal stem cells (MSC) transplantation on the peritoneal morphology and antioxidant system in rat models of chronic peritoneal dialysis (PD).

Material-Methods: Wistar albino male rats were divided into four groups: Control (C) group, Peritoneal dialysis (PD) group, MSC group and placebo (P) group. PD, MSC and placebo groups received daily intraperitoneal injection with 3.86 % glucose-based PD fluid once daily during six weeks. After 6 weeks, MSC group was treated with MSC and placebo group was treated with phosphate buffer solution via intraperitoneal injection. Rats without dialysis and treatment served as controls. Placebo and MSC groups were evaluated at the first, second and third week of treatment (MSC1, P1, MSC2, P2, MSC3 and P3 groups). At the end of the study, parietal peritoneum sample was taken from all rats under anesthesia. The activity of glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) in the peritoneal tissue were studied by ELISA method. The peritoneum was evaluated histologically.

Results: The submesothelial area was significantly thickened in PD and placebo groups compared with C and MSC groups. Levels of GPx and SOD were significantly increased in the PD group compared to the C group. At second week, the levels of GPx and SOD in MSC group were lower than PD group while the level of SOD in MSC group was higher than P group. At third week, GPx and SOD levels in MSC and P groups were significantly lower than PD group.

Conclusions: In our study, MSC markedly decrease submesothelial thickness. The beneficial effect of MSC on the peritoneum may be partly through antioxidant system. Mesenchymal stem cells may offer promise as novel therapeutics in peritoneal dialysis patients to protect the peritoneal membrane.

Keywords: Peritoneal dialysis, MSC, antioxidant system

GİRİŞ

Çocuklarda, özellikle de erken çocukluk döneminde, son dönem böbrek yetmezliğinde bir renal replasman tedavisinde ilk tercih periton diyalizidir. Periton diyalizinde en önemli zorluk periton membran bütünlüğünün uzun süreli korunamamasıdır. Kronik periton diyalizi sırasında 5-10 yıl içerisinde periton membran bütünlüğü bozulmakta ve yeterli ultrafiltrasyon sağlanamamaktadır (1). Periton membran geçirgenliği bozulan ve yeterli vücut kitlesine sahip olmayan küçük çocuklarda uygun cihazların olmaması sebebiyle hemodiyaliz de yapılamamaktadır ve bu çocuklarda peritonun korunması daha büyük önem arz etmektedir.

Periton membranı tek tabakalı mezotel hücreleri ile kaplıdır. Mezotelium peritoneal membranın önemli bir komponentidir ve fibrin homeostazı, mikrosirkülasyon ve inflamatuvar cevabın regülasyonunda görev alır. CPD'nde mezotelial hücreler sürekli olarak hiperosmotik, hiperglisemik ve asidik periton diyaliz sıvısına maruz kalır. Bu maruz kalma sonucunda periton membran yetersizliği oluşur. Periton membran yetersizliğinin patogeneğinde oksidatif stresin de rol aldığı gösterilmiştir (2-6).

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 (7-13). Mezenkimal kök hücrelerin otoimmün ensefalomyelit deney modelinde antioksidan etkisi gözlenmiştir (14).

Bu çalışmada, periton membran hasarı oluşturulmuş ratlarda, intraperitoneal olarak mezenkimal kök hücre transplantasyonunun antioksidan sisteme etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

A-PERİTONUN ANATOMİSİ

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 (15, 16). Ayrıca visseral periton anatomik periton yüzey alanının % 85'ini oluşturmasına rağmen total PD değişiminin sadece % 30'una katkıda bulunmaktadır (4).

B-PERİTONUN HİSTOLOJİSİ ve FONKSİYONU

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 (2, 3, 17).

C- PERİTON DİYALİZİ

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). Dört yıllık tedaviden sonra PD hastalarının yaklaşık %35’inde UF yetersizliği ortaya çıkmaktadır (24).

D- PERİTON DİYALİZİ SIRASINDA ORTAYA ÇIKAN YAPISAL VE FONKSİYONEL DEĞİŞİKLİKLERİN SEBEPLERİ

Uzun süreli PD sırasında bazı yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bu değişiklikler üremi, tekrarlayan peritonitler, biyouyumsuz diyaliz solüsyonlarına maruz kalma, PD katateri gibi sebeplerle oluşmaktadır (19, 24) (Tablo 1).

Üremik ve HD yapılan hastaların peritonunda PD yapılanlarınkine benzer değişiklikler görülmüştür (25). Hayvan çalışmalarında da PD yapılmayan üremik hayvanlarda vasküler ağda artış olduğu doğrulanmıştır (26). Bu bulgular üreminin peritonda inflamasyonu tetiklediğini düşündürmektedir. Üremide IL-1 β ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler, VEGF, ileri glikasyon ürünleri (AGEs), nitrik oksit (NO) artmaktadır, ekstrasellüler matrikste artış olmaktadır ve vaskülopati gelişmektedir (19, 24, 27).

Peritonit atakları ağır inflamatuvar cevap, damarlanmada artış ve mezotel hücrelerinde hasar oluşturarak peritonda ciddi değişikliklere sebep olmaktadır (19). Proinflamatuvar sitokinler (IL-1 β , TNF- α , IL-6), NO ve prostaglandinlerin etkisi ile periton zarında akut değişiklik meydana gelir, efektif periton yüzey alanında hızlı ve geri dönüşümlü artış oluşur (24). Bakteriyel peritonit sırasında PD sıvısında hücre sayısında 400 kat artış olduğu ve bu artışın klinik düzelmeye rağmen 3 haftaya kadar devam ettiği, proinflamatuvar sitokinlerin ve sklerozan büyüme faktörlerindeki artışın ise en az 6 hafta devam ettiği gösterilmiştir (28). Tekrarlayan peritonitler zarda geçirgenlik artışına ilaveten submezotelyal fibrozis ve angiogeneze yol açmaktadır (24).

Standart PD sıvılarının düşük pH, laktat ve yüksek glukoz konsantrasyonu, hiperosmolarite gibi özellikleri ve glukoz yıkım ürünleri (GDP), AGEs gibi maddelerin varlığı periton zarını etkilemektedir (19). Standart PD sıvılarında osmotik ajan olarak glukoz kullanılmaktadır. Diyaliz sırasında periton boşluğundaki glukoz konsantrasyonu normal plazma düzeyinden 15-40 kat daha fazla olmaktadır. Yüksek glukoz konsantrasyonu mezotel ve lökositler için toksiktir. Fibroblast çoğalma hızını ve kollajen sentezini arttırması, TGF- β 1, VEGF, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve fibronektin sekresyonunu arttırması glukozun peritoneal fibrozis ve neoangiogeneze direkt rolü olduğunu düşündürmektedir (4, 29). Ayrıca glukoz, reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) ve lokal anjiotensin II'nin yapımını uyarmaktadır (24). Ortaya

çıkan ROS ilerleyici zar geçirgenliğinden, anjiogenezisten, ekstrasellüler matriks birikiminden ve peritondaki fibrozisten sorumlu tutulmaktadır. Anjiotensin II hücre proliferasyonunu, apoptozu ve fibrozisi düzenleyen bir büyüme faktörüdür. Anjiotensin II makrofajları ve fibroblast benzeri hücreleri TGF- β 'yı sekrete etmeleri için uyarmaktadır ve proinflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve VEGF gibi anjiogenik büyüme faktörlerinin sentezini düzenlemektedir. Ayrıca aldosteronun yapımını uyarmaktadır. Aldosteronun da fibrozis gelişiminde rolü vardır (19).

Tablo 1. Periton diyalizi sırasında peritonda değişikliğe yol açan sebepler

▪ Üremi
▪ Peritonit
▪ Kateter
▪ Basınç
▪ Biyouyumsuz PD sıvıları
-Düşük pH, laktat
-Hiperosmolarite
-Yüksek glukoz konsantrasyonu
-Glukoz yıkım ürünleri (GDP)
-İleri glikasyon ürünleri (AGEs)

Hiperosmolarite mezotel hücrelerinin çoğalmasını baskılamakta, TGF- β 1, prostaglandinler, doku tipi plazminojen aktivatörü ve fibronektin gibi ürünlerin mezotel hücrelerinde yapımını arttırmaktadır. Sonuçta hücre hasarı ortaya çıkmaktadır (4, 29).

Düşük pH'lı (pH=5.3) PD sıvıları peritonun savunma sistemini etkilemektedir. Ayrıca düşük pH'nın mezotel hücrelerinin fibrinolitik aktivite ile ilgili maddeleri yapmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Periton diyaliz sıvılarında tampon madde olarak kullanılan laktatın bikarbonata göre daha zararlı olabileceği düşünülmektedir (4, 29).

Glukoz içeren periton diyaliz sıvılarının ısı ile sterilizasyonu ve uzun süreli depolanması reaktif karbonil bileşikler olan GDP'nin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Mezotel hücreleri GDP'ye maruz kaldığında proinflamatuvar cevap ve sitotoksik hasar meydana gelmektedir. Glukoz yıkım ürünleri lökosit fonksiyonunu bozmakta, VEGF ve TGF- β yapımını artırmakta,

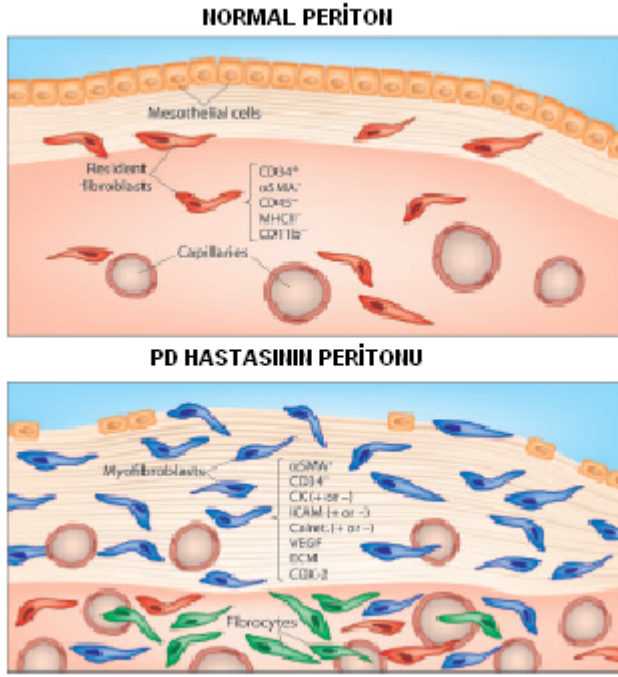
hücreler arası sıkı bağlantıların ekspresyonunu azaltmakta ve de AGEs'nin oluşmasına sebep olmaktadır (27, 29, 30). Glukoz ve GDP proteinlerin serbest amino gruplarına enzimatik olmayan yolla bağlanır, oksidatif ve nonoksidatif reaksiyonlar sonucunda AGEs oluşur. Periton diyalizi yapılanlarda AGEs'nin mezotel tabakasında, submezotelyal alanda ve damar duvarında biriktiği gösterilmiştir (31). Mezotelde bulunan reseptöre bağlandıktan sonra AGEs VEGF, IL-6, IL-8, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1)'in yapımını arttırmaktadır, apoptozu indüklemektedir (4, 29).

Kateterin peritondaki yapısal değişikliklere kısmen katkısı vardır. Periton diyaliz kateteri periton zarında inflamatuvar cevabı arttırmakta, fibrozis ve anjiogenezi indüklemekte ve peritoneal geçirgenliği arttırmaktadır (19, 32). Periton diyaliz sıvısının peritona verilmesi ile oluşan basınç da inflamasyonu tetiklemektedir (19).

E- PERİTON DİYALİZİ SIRASINDA ORTAYA ÇIKAN YAPISAL DEĞİŞİKLİKLER

Periton diyalizi sırasında mezotel hücrelerinde kayıp, submezotelyal fibrozis, anjiogenezi, vaskülopati ve bazal membranda kalınlaşma meydana gelmektedir (24, 33) (Şekil 1).

Periton diyalizi ile mezotel hücrelerindeki mikrovilluslar kaybolmaya başlamakta, hücreler arasındaki bağlantılar gevşemektedir. Periton diyalizine başlanmasından 8-10 ay sonra mikrovillusların tamamı yok olmaktadır. Hücreler arasındaki bağlantıların gevşemesi mezotel hücrelerinin birbirlerinden ayrılmasına yol açmaktadır (4). Nihayet mezotel hücreleri periton boşluğuna dökülmeye başlamaktadır. Mezotel hücrelerindeki dökülmenin PD'ye başladıktan 3-6 ay sonra gibi kısa sürede olabileceği görülmüştür (4, 27). Peritonitler ve PD sıvısına kronik olarak maruz kalma mezotel hücrelerinin bir kısmının kaybına yol açmaktadır. Geriye kalan mezotel hücreleri aktif hale gelmekte ve çeşitli prostaglandinler, kemokinler ve sitokinleri salgılamaktadır. Sonuçta akut veya kronik inflamasyon ortaya çıkmaktadır. Bu durum da periton zarının bozulmasına neden olmaktadır (19, 33). Mezotel hücrelerinin GDP'ye maruz kalması hücre büyümesinde, hücre canlılığında inhibisyona, TGF- β ve VEGF sentezinde artışa yol açmaktadır (19). Periton diyalizi sırasında ayrıca mezotel bazal membranında kalınlaşma meydana gelmektedir (31).

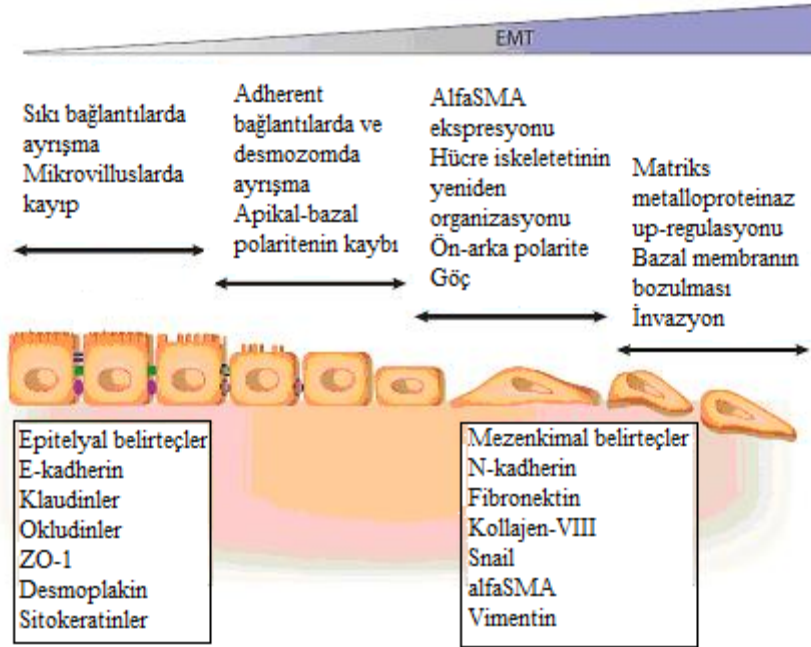


Şekil 1. Normal periton ve PD sırasında oluşan değişiklikler (33)

Peritondaki mezotel hücrelerinin sayısı hücre çoğalması ile hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Normal şartlarda herhangi bir anda mezotel tabakasında mitoz sadece hücrelerin % 0.1-0.5'inde meydana gelmektedir (2). Peritonit sırasında iki-üç gün içinde hücre çoğalması maksimal %19'a kadar çıkabilmektedir. Fakat üremiklerde hücre çoğalması büyük oranda inhibisyona uğramaktadır (17). Mezotel hücrelerindeki hasar hücre ölümü ve hücre çoğalmasını arttırmakta, bunun sonucunda periton zarının yapısal bütünlüğü etkilenmektedir (2). Mezotel hücrelerinin rejenerasyonu ile ilgili dört hipotez vardır. Birinci hipotez; kemik iliği kaynaklı hücrelerin rejenerasyonu sağladığıdır. İkinci hipotez; serozal boşlukta serbest yüzen hücrelerin hasarlı bölgeye yerleştiği ve kademeli olarak yeni mezotel hücrelerine farklılaştığıdır. Üçüncü hipotezde ise; hasarın ilk 24 saati içinde makrofajlar hasar alanına gelir. Daha sonra interstisyel alandaki mezenkimal öncüller metaplazi ile mezotel hücrelerine dönüşür ve göç ederek dökülen mezotel hücrelerinin yerini alır. Bu hipotez geniş kabul görmemiştir. Diğer bir görüş ise peritoneal makrofajların mezotel hücrelerine dönüştüğü şeklindedir. Dördüncü hipotez ise; geriye kalan mezotel hücrelerinin çoğalması ve göçüyle mezotel hücrelerinin döküldüğü alanların rejenerasyonunun sağlanmasıdır (17).

Son zamanlardaki veriler mezotel hücrelerinin epitelden mezenkimale dönüşüme (EMT) uğradığını göstermiştir (19). Klaudin, okludin, E-kadherin, zona okludens ve desmoplakin gibi adezyon moleküllerinin baskılanması sonucu hücreler arası bağlantıların gevşemesi, apikal-

bazal polaritenin ve mikrovillusların kaybı EMT'yi başlatmaktadır. Hücre iskeletinin yeniden organizasyonu ile hücre ön-arka polariteye adapte olmaktadır. Göçme yeteneği artmaktadır. Değişime uğrayan hücreler submezotelyal tabaka içine girmektedir (33) (Şekil 2).



Şekil 2. Mezotel hücrelerinin EMT ile myofibroblastlara dönüşümü (33)

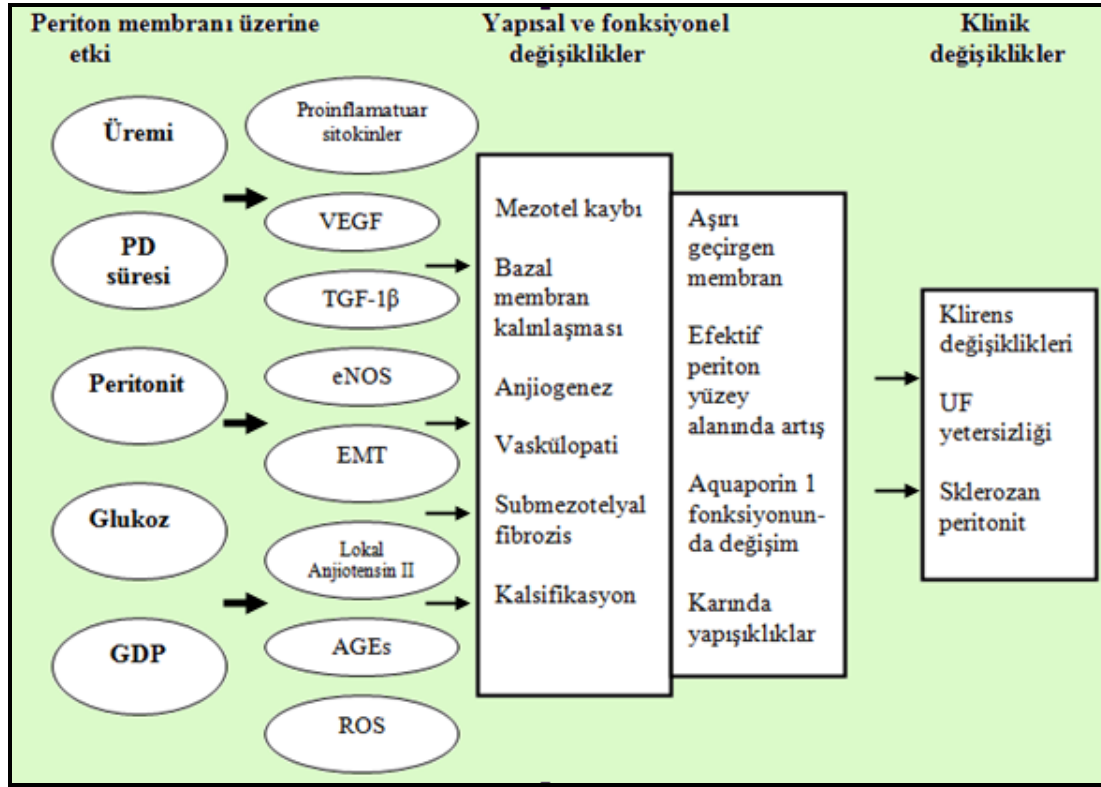
Periton diyalizi sırasında submezotelyal tabakada da değişiklikler oluşmaktadır. Periton diyalizi sırasında submezotelyal tabaka kalınlaşmaktadır (24). Erişkin PD hastalarında PD tedavisi sırasında periton zarında meydana gelen değişikliklerle ilgili en geniş çalışmayı Williams ve ark (25) yapmıştır. Uzun süredir PD yapılan 130'dan fazla hastanın biyopsisi sağlıklı kontrollerle ve üremik hastalarla karşılaştırılmıştır. Üremik hastaların submezotelyal alanı sağlıklı kişilere kıyasla 3 kat daha kalın, PD hastalarındaki ise 5 kat kalın bulunmuştur (25). Peritonun ortalama kalınlığı sağlıklı kişilerde 40 μm (30-70 μm)'dir. Hiç PD yapılmamış üremik hastalarda submezotelyal tabakanın kalınlığı artmaktadır (ortalama 150 μm). Kalınlık PD hastalarında daha belirgin bir şekilde artmakta, iki yıldan az PD yapılanlarda submezotelyal tabakanın kalınlığı 180 μm iken 8 yıldan fazla PD yapılanlarda 600 μm 'e ulaşmaktadır. İnterstisyel kalınlaşmaya ilaveten interstisyel hücrelerin sayısında da artış belirlenmiştir (4).

Kapiller bazal membran da kalınlaşmaktadır. Bu kalınlaşma kapiller lümen tıkanana kadar devam etmektedir (19). Yapısal değişikliklere ilaveten damarların sayısı da artmaktadır (4).

Kapiller bazal membrandaki değişim interstisyel matrikste genişleme ve bileşiminde değişim ile birliktelik göstermektedir. İdiopatik peritoneal sklerozda submezotelyal alandaki kollajen birikimi başlıca kollajen tip I ve III'den oluşurken, PD hastalarında başlıca kollajen tip IV'de artış olmaktadır. Kapiller damarların media tabakasında kollajen tip IV ve laminin birikimi fibrozis ve hiyalinizasyona sebep olmaktadır (31). Submezotelyal alanın kalınlığı ve de tıkaçıcı vaskülopatinin derecesi PD süresi ile korelasyon göstermektedir. Aletli PD yapanlarda fibrozis daha kısa sürede gelişmektedir, bunun kümülatif glukoz etkisi ile olduğu düşünülmektedir (24).

Peritoneal fibrozis bazıları miyofibroblastik özellikte olan fibroblastların sayısında artışla birlikte interstisyumda kollajen I, III, IV, V, VI, fibronektin, tenaskin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin birikmesiyle oluşmaktadır (31, 34). Fibroblastların kaynağı tartışmalıdır. Bu konuda üç görüş vardır. Klasik görüş fibroblastların organogenez sonrası farklı dokularda kalmış artık embriyonik mezenkimal hücreler olduğu şeklindedir. Yeni görüş fibroblastların mezotel hücrelerinden EMT ile dönüştüğünü veya kandaki CD34+ hücrelerden (fibrosit) kaynaklandığını savunmaktadır (34).

Özetle uzun süreli PD'de devamlı biyouyumsuz PD sıvılarına ve peritonite maruz kalınması periton zarında inflamasyona yol açmaktadır. Mezotel hücrelerinde kayıp, ilerleyici bir şekilde fibrozis ve anjiogenezis görülmektedir, en sonunda UF yetersizliği oluşmaktadır (19, 24) (Şekil 3).



Şekil 3. Uzun süreli PD'nin periton zarı üzerine etkileri ve takiben oluşan yapısal, fonksiyonel değişiklikler ve klinik sonuçları (Fusshoeller A 2008 *Pediatr Nephrol*) GDP; glukoz yıkım ürünleri, VEGF; vasküler endotelial büyüme faktörü, TGF-1 β ; transforming büyüme faktörü-1 beta, eNOS; endotelial nitrik oksit sentetaz, EMT; epitelden mezenkime dönüşüm, AGEs; ileri glikasyon ürünleri, ROS; reaktif oksijen ürünleri, UF; ultrafiltrasyon (24)

F- PERİTON DİYALİZİ SIRASINDA ANTİOKSİDAN SİSTEM

Oksidatif stresin periton zarında yetersizliğe yol açan peritoneal ve sistemik inflamasyonun başlamasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Oksidatif stres reaktif oksijen ürünleri (ROS) ile antioksidan sistem arasındaki dengenin ROS lehine bozulmasından kaynaklanmaktadır. PD hastalarında antioksidan enzimler azalmıştır(4). Ayrıca PD sıvısındaki glukoz reaktif oksijen türlerinin yapımını indüklemektedir (24).

G- MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Kök hücreler kendini yenileyebilme ve en az bir çeşit matür hücre tipine farklılaşma özelliği olan hücrelerdir. Kök hücreler kökenlerine ve bir veya daha fazla matür hücreye dönüşebilme potansiyellerine göre alt gruplara ayrılırlar (41, 42). Kök hücreleri kökenlerine göre ikiye ayrılabilir: Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastokist iç hücre kitlesinden elde

edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler (embriyonik olmayan kök hücreler, dokuya özgün kök hücreler, doğum sonrasındaki kök hücreler) (42, 43). Embriyonik olmayan kök hücre çeşitlerinden biri olan mezenkimal kök hücreler, ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenstein tarafından tanımlanmıştır (44). Mezenkimal kök hücreler kemik iliği veya diğer dokulardan kaynaklanıp in vitro ortamda plastiğe yapışma özelliği olan hücrelerdir (7). Bu hücreler kemik iliği dışında dolaşan kan, dalak, amniotik sıvı, kıkırdak, kas tendonları, plasenta, adipöz doku, fetal dokular, periost, sinovyal sıvı, timus, trabeküler kemik, dermis, diş pulpası ve akciğer gibi birçok doku ve organda saptanmıştır (13). Dominici ve ark (45) MKH tanımlaması için üç kriter önerisinde bulunmuşlardır. Bu kriterlerden birincisi standart kültür ortamında plastiğe yapışma özelliğinin olması, ikincisi spesifik yüzey antijen ekspresyonu (mezenkimal kök hücreler CD105, CD73 ve CD90 eksprese etmeli, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA sınıf II ekspresyonu olmamalı), üçüncüsü ise multipotent farklılaşma potansiyelinin olmasıdır. Multipotent farklılaşma yeteneğinin olduğunu söyleyebilmek için in vitro ortamda hücre osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşabilmelidir (45).

Yakın zamana kadar bir dokudan elde edilen kök hücrenin çok daha farklı diğer hücrelere kaynaklık edemeyeceği düşünülüyorken MKH'lerin kemik, kas, kıkırdak, tendon, yağ gibi mezodermal kökenli hücrelerin dışında endodermal ve ektodermal kökenli hücrelere de dönüşebileceği gösterilmiştir (46).

Çalışmalar kök hücrelerin dejeneratif, otoimmün ve genetik hastalıklarda kullanılabileceğini göstermektedir (47-51).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 8 Kasım 2010- 10 Ocak 2011 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne bağlı Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) yapıldı. Çalışma Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylandı (Etik Kurul Karar No: 10/16) ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklendi (Proje No: TSA-10-306).

RATLAR

Çalışmada DEKAM'da üretilen ve çalışmaya başlamadan önceki ağırlıkları 267-440 g ağırlığında olan erkek wistar-albino ratlar kullanıldı. Ratlar konvansiyonel laboratuvar şartlarında ve 12 saat aydınlık/karanlık ortamda bulundu. Su ve yiyecek kısıtlanması yapılmadı. Çalışmaya başlamadan bir hafta önce ratların çalışmacılara alışması için ratlar ile temas sağlandı. Çalışmaya başlamadan önce ve 6 haftanın sonunda ratlar tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi.

DENEY PROSEDÜRÜ

Ratlar çalışmanın başlangıcında rastgele iki gruba ayrıldı: kontrol grubu (n=10) ve çalışma grubu (n= 67). Çalışma grubuna altı hafta süresince intraperitoneal yolla periton diyaliz sıvısı verildi. Altı haftanın sonunda çalışma grubu 3 gruba ayrıldı: Periton diyaliz (PD) grubu, mezenkimal kök hücre (MKH) grubu ve plasebo grubu. Kontrol grubu ve PD grubundaki ratlar periton dokusu örneği alındıktan sonra sakrifiye edildi. Mezenkimal kök hücre grubuna intraperitoneal MKH, plasebo grubuna intraperitoneal (İP) MKH volümüne denk miktarda fosfat buffer solüsyonu (PBS) verildi. İntraperitoneal tedaviden 1, 2 ve 3 hafta sonra her iki gruptaki ratlar periton dokusu örneği alındıktan sonra sakrifiye edildi. Tüm ratların periton dokusunda glutatyon peroksidaz (GPx) ve superoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ölçüldü, histopatolojik değerlendirme yapıldı.

İNTRAPERİTONEAL ENJEKSİYON

Çalışma grubu'ndaki ratlara günde bir kez 20 ml ticari %3,86 glukozlu PD solusyonu (Dianeal 3.36%; Eczacıbaşı-Baxter Healthcare, İstanbul, Turkey) intraperitoneal enjeksiyon ile verildi. Enjeksiyon için 22 gauge iğne ucu ile plastik tek kullanımlık enjektörler kullanıldı. Enjeksiyon karın duvarının bir gün sağ ve diğer gün sol alt kadranı olacak şekilde, 45° lik eğimle girilerek yapıldı.

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden satın alınan rat kemik iliğinden elde edilmiş GFP ile işaretli mezenkimal kök hücreler kullanıldı. Kullanılacağı zamana kadar MKH -80°C'de saklandı. Çözdürme ve pasajlama işlemlerinin ardından MKH ratlara İP yolla verildi.

PERİTON DOKUSUNUN ALINIŞI

Ratlara intraperitoneal olarak ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (40 mg/kg) verilerek anestezi sağlandıktan sonra karınları tıraşlandı. Ratlar tespit tahtasına alındı. Karınları batikonla silindikten sonra orta hattan insizyon ile açıldı. GPx ve SOD ölçümü için pariyetal periton örneği batın sağ üst kadrانından kas dokusundan sıyrılarak alındı. Histopatolojik inceleme için pariyetal periton örneği ise batın sol üst kadrانından kas dokusu ile birlikte alındı. Ratlar kurbanı edıldı.

HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Ratlar anestezi ile uyutulup, abdominal duvarın ön sol yarısından (parietal periton) periton dokusu alındı. Periton dokusu alındıktan sonra ratlara ötenazi uygulandı. Periton dokusu alınırken enjeksiyon yerlerinden alınmamaya özen gösterıldı. Histolojik değerlendirme için alınan periton dokusu hemen oda ısısındaki %10 formalin solusyonu içinde fixe edıldı. Işık mikroskobi için rutin doku takip işlemleri izlenerek periton ve karaciğer dokusu aynı kasette parafin bloklar haline getirıldı. Parafin bloklardan hemotoksilen-eozin boyama için 5 µm kalınlığında kesitler lam üzerine alındı, immünohistokimyasal boyama için 5 µm kalınlığında

kesitler lizinli lamalar üzerine alındı. Ayrıca alınan yaklaşık 0,5x0,3 mm ebadında periton dokusu immünfloresan mikroskobunda değerlendirmek için 0,7x0,7 mm ebadındaki demir kasetlere konularak tissue freezing medium içine gömüldü ve hemen -20 °C soğutucuya kaldırıldı. Donduktan sonra demir kasetlerden çıkarılıp alüminyum folyolara sarılan dokulardan frozen mikrotomunda 7 µm kalınlığında kesitler alınarak lizinli camlara doku aktarıldı. Hazırlanan preparatlar güneş ışığından korumak için kapaklı plastik mape içinde saklandı.

a) Işık mikroskopik değerlendirme

Kesitlerin ışık mikroskopisi ile değerlendirilmesi gruplar hakkında bilgisi olmayan bir patolog tarafından yapıldı. Mezotel hücrelerinin sayısı ve reaktivitesi, bazal laminadaki değişiklikler, inflamasyonun varlığı, submezotelial ödem, fibroblastik aktivite ve fibrozis, vaskularizasyon ve peritoneal kalınlık değerlendirildi. İnflamasyon, fibroblastik aktivite ve neovaskularizasyon mononükleer hücreler, fibroblastlar ve kapillerler 40'lık büyütmede sayılarak semikantitatif olarak skorlandı (skore 0-3).

- ✓ Fibrozis ödem ve kollajen yoğunluğunun değerlendirmesi ile skorlandı.
- ✓ Mezotel hücreleri 40'lık büyütmede 5 farklı alanın ortalaması alınarak sayıldı ve normal, azalmış ve artmış olarak sınıflandırıldı.
- ✓ Mezotel hücreleri normal (düz hücreler) ve reaktif (düz hücrelerin kübik hale gelmesi) olarak da sınıflandırıldı.
- ✓ Bazal lamina normal (eritrositlerin boyutu kadar), kalın ve ince olarak değerlendirildi.
- ✓ Fibrozis, yok, erken dönem (ödem ve birkaç lacy kollajen) orta (lacy ve matür kollajen) ve geç dönem (matür kollajen fibrilleri) olarak değerlendirildi.

Peritonun interstisyel kalınlığı mezotel tabakası ve kasın arasında kalan iç yüzeyinden ölçüldü. Peritonun interstisyel kalınlığı 2 araştırmacı tarafından farklı 3 alanın ortalaması alınarak hesaplandı.

b) İmmünfloresan mikroskop ile değerlendirme

Verilen GFP ile işaretli MSC'lerin peritona yapışıp yapışmadığını göstermek için immunofloresan değerlendirme yapıldı. Olympus BX50 marka immunfloresan mikroskopta mavi ışık kullanarak direkt bakı ile preparatlar değerlendirildi. Periton hattı boyunca yeşil floresan veren preparatlar pozitif boyanmış olarak kabul edildi. Olympus-E330 marka dijital fotoğraf makinası ile preparatların mikroskopik görünümünün fotoğrafları çekildi.

c) İmmunohistokimyasal inceleme

Parafine gömülü dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Lama alınmış dokular 60 °C etüvde 1 saat bekletildi. Etüvden çıkarılan dokular aşağıdaki basamaklar izlendi:

1) Dokuların hidrasyonu

Ksilolde 15 dk, % 99'luk, % 96'lık ve % 70'lik alkolde 5'er dk ve distile suda 5 dk bekletilerek hidrasyon işlemi yapıldı.

2) EDTA ile muamele

Dokular 1: 10 oranında distile su ile dilue edilmiş EDTA içinde mikrodalga fırında 20 dk ısıtıldı, soğumaya bırakıldı. Ardından 5 dk distile suda yıkandı. Dokuların etrafı kalemle çizildi.

3) Hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulaması

Dokulara % 3'lük H₂O₂ damlatılıp 10 dk bekletildi. Distile suda 5 dk yıkandı. Ardından 5 dk PBS'de yıkandı.

4) Primer antikor uygulaması

Pre-blocking solusyonu damlatılıp 10 dk bekletildi. Lam silkelendi.

Primer antikorun hazırlanması: Kollagen III ve kollagen IV antikorları antikor dilue edici madde ile (Large Volume UltrAb diluent, Thermo scientific) 1/200 oranında dilue edildi. Hazırlanan primer antikor dokulara damlatılıp 1 saat süresince bekletildi. Ardından 10 dk PBS'de yıkandı.

5) Biotin uygulaması

Sekonder antikor damlatıldı, 10 dk bekletildi. Ardından 10 dk PBS'de yıkandı.

6) Streptavidin uygulaması

Peroksidaz streptavidin damlatıldı, 10 dk bekletildi. Ardından 10 dk PBS'de yıkandı.

7) Kromojen uygulaması

1 ml DAB substrata 50 µl DAB kromojen olacak şekilde hazırlanan karışım damlatıldı, 10 dk bekletildi. Ardından 10 dk distile suda yıkandı.

8) Mayer hematoksilen uygulaması

Mayer hematoksilen damlatıldı, 2 dk bekletildi. Ardından 5 dk distile suda yıkandı.

9) Dokuların dehidrasyonu

% 70'lik, % 96'lık ve % 99'luk alkolde 5'er dk, ksilolde ise 15 dk bekletildi. Balsam ile kapatıldı.

PERİTON DOKUSUNDAN GPx ve SOD ÖLÇÜMLERİNİN YAPILMASI

Karın duvarının sağ yarısındaki periton dokusu diğer dokulardan sıyrılarak çıkarıldı, tartıldı. Periton dokusu 1 gram/ 7 ml oranında PBS'la, buzlu ortamda, mekanik uçlu homojenizatörde 16000 devir/ dakika hızda ~30 sn homojenize edildi. Homojenatlar + 4 °C'ye ayarlı soğutmalı santrifüjde 10000 x g'de 30 dakika santrifüj edildi ve süpernatant ependorf tüplerine alındı. Tüm numuneler analiz zamanına kadar -80 °C'de saklandı. Numuneler Eczacılık Fakültesi Mikrobiyoloji laboratuvarında ticari kitler ve SynergyHT (Biotek) multidetection microplatereader ELISA cihazı kullanılarak ve ticari kitlerin kullanım kılavuzlarındaki bilgilere uygun olarak çalışıldı. GPx ve SOD düzeyleri U/g yaş doku olarak ifade edildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Araştırma verilerinin değerlendirilmesinde SPSS 15.0 istatistik paket programından yararlanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine Shapiro-Wilk Normallik Testi ile bakıldı. Normal dağılım gösteren parametreler ortalama $\pm$ SD, anormal dağılım gösteren parametreler ise ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerde iki grup için karşılaştırmalarda Student T testi, 3 ve daha fazla grup için karşılaştırmalarda Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu fark çıkan grupların karşılaştırılması Tukey Testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde ise iki grup için karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi, 3 ve daha fazla grup için karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis H Testi kullanıldı. Kruskal-Wallis H Testi sonucu fark çıkan grupların karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. Tüm istatistiksel analizlerde $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

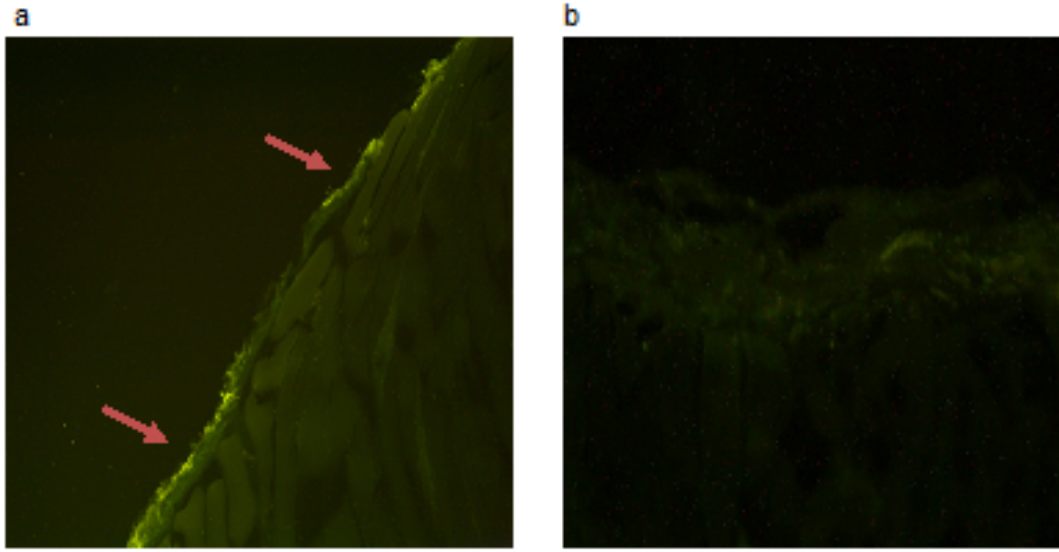
Çalışmaya 77 rat alındı. Kontrol grubunda 10 rat, çalışma gruplarında 67 rat vardı. Çalışma süresince kontrol grubundan 2 rat, çalışma gruplarından ise 7 rat telef oldu. Ratların gruplara göre son dağılımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Ratların gruplara göre dağılımı

Grup	Rat sayısı
Kontrol grubu	8
Periton diyaliz grubu	8
MKH 1. hafta grubu	8
Plasebo 1. hafta grubu	8
MKH 2. hafta grubu	9
Plasebo 2. hafta grubu	9
MKH 3. hafta grubu	9
Plasebo 3. hafta grubu	9

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN PERİTONA YERLEŞMESİ

Green fluorescent protein ile işaretli MKH verildikten 1, 2, ve 3 hafta sonra özel yöntemle dondurulmuş periton dokusundan alınan kesitler direkt olarak immünfloresan mikroskopta mavi ışıkta incelendi. GFP işaretli MKH'in mezotel hattı boyunca floresan verdiği görülürken, plasebo gruplarında ise mezotel hattı boyunca floresan parlama yoktu (Şekil 4).



Şekil 4. İmmunfloresan mikroskopta GFP parlamasının değerlendirilmesi. İmmünofloresan mikroskopta MKH verilmiş grupta mezotel hattı boyunca floresan veren MKH'ler görülürken (a), plasebo olarak PBS verilmiş grupta mezotel hattı boyunca herhangi bir floresan parlama görülmedi (b).

PERİTON ZARINDA GELİŞEN HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Periton boşluğuna %3.86 glikozlu PD sıvısının 6 hafta süre ile verilmesi sonucunda peritonun yapısında PD grubunda, kontrol grubuna göre önemli değişiklikler olduğu görüldü.

- PD grubunun submezotelyal kalınlığı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi. ($P=0,001$).
- Periton zarında meydana gelen diğer histopatolojik değişiklikler semi kantitatif olarak değerlendirildiğinde;
 - PD grubunda, periton zarında inflamasyon ve neovaskülarizasyon kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştı ($P<0.05$).

Mezenkimal kök hücrenin bozulmuş peritona etkileri

Birinci hafta: MKH ve plasebo gruplarının 1.hafta submezotelyal kalınlıkları birbirleriyle, PD ve kontrol grubu ile kıyaslandığında;

- MKH-1 grubunun submezotelyal kalınlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yok iken, PD ve plasebo-1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($P<0.05$).
- Plasebo-1 grubunun submezotelyal kalınlık değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek iken ($P<0.05$), PD grubu ile arasında anlamlı farklılık belirlenmedi .

- MKH-1 grubunda inflamasyon yoktu ve inflamasyon varlığı açısından PD grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ($P<0.05$). İnflamasyon varlığı açısından karşılaştırıldığında MKH-1, plasebo-1 ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0.05$). Ayrıca inflamasyon açısından plasebo-1 grubu ile PD grubu arasında önemli bir fark bulunmadı ($P>0.05$).
- Hücre morfolojisi, bazal lamina kalınlığı, fibrozis, fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon açısından değerlendirildiğinde MKH-1 ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($P>0.05$).

İkinci hafta: MKH ve plasebo gruplarının 2. hafta submezotelyal kalınlıkları birbirleriyle, PD ve kontrol grubu ile kıyaslandığında;

- MKH-2 grubunun submezotelyal kalınlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yok iken ($P>0.05$), PD ve plasebo-2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($P<0.05$).
- Plasebo-2 grubunun submezotelyal kalınlık değeri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek iken ($P<0.05$), PD grubu ile arasında anlamlı farklılık belirlenmedi ($P>0.05$).
- MKH-2 grubu ile PD, kontrol ve plasebo-2 grupları arasında diğer histopatolojik değerlendirmeler açısından farklılık yok iken, aynı şekilde plasebo-2 grubu ile PD ve kontrol grupları arasında da fark yoktu ($P>0.05$).

Üçüncü hafta: MKH ve plasebo gruplarının 3. hafta submezotelyal kalınlıkları birbirleriyle, PD ve kontrol grupları ile kıyaslandığında;

- MKH-3 grubunun submezotelyal kalınlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yok iken, PD ve plasebo-3 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($P<0.05$).
- Plasebo-3 grubunun submezotelyal kalınlık değeri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek iken ($P<0.05$), PD grubu ile arasında anlamlı farklılık belirlenmedi ($P>0.05$).
- MKH-3 grubu hücre morfolojisi, bazal lamina kalınlığı, fibroblastik aktivite, inflamasyon ve neovaskülarizasyon açısından PD, kontrol ve plasebo-3 grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı ($P>0.05$). Plasebo-3 grubunda fibroziste kontrol ve MKH-3 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı artış bulundu. Neovaskülarizasyon açısından karşılaştırıldığında plasebo-3 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı artış varken ($P<0.05$), PD grubu ile aralarında fark yoktu ($P>0.05$).

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Fibrozisin derecesini göstermek için immünohistokimyasal olarak yapılan kollajen III ve kollajen IV antikorları ile boyanma teknik nedenlerden dolayı yeterli olmadı ve değerlendirme dışı tutuldu.

GRUPLARIN GPx ve SOD DÜZEYLERİ AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Tablo 3. GPx ve SOD sonuçları

	K	PD	P-1	MKH-1	P-2	MKH-2	P-3	MKH-3
GPx	24.96 (24.49 - 25.62)	35.59 (34.99-39.14)	26.09 (21.21-27.87)	21.39 (18.95-28.15)	31.95 (1.22-48.04)	24.58 (19.24-33.03)	22.61 (21.39-26.74)	22.90 (21.86-25.62)
SOD	3.93 (3.51-4.11)	5.85 (3.34-6.21)	4.03 (3.68-4.16)	3.93 (3.49-4.20)	3.72 (2.98-4.02)	4.01 (3.82-4.16)	4.07 (3.78-4.10)	4.10 (3.91-4.19)

Grupların birbirleri ile karşılaştırılması sonucunda farklılık bulunanlar:

K vs PD → GPx için p= **0.0002**, SOD için p= **0.01**,
K vs P-3 → GPx için p=**0.006**
K vs MKH-3 → GPx için p=**0.04**, SOD için p= 0.09
PD vs P-1 → GPx için p= **0.0002**, SOD için p= **0.01**
PD vs MKH-1 → GPx için p=**0.0002**, SOD için p=**0.01**
PD vs P-2 → SOD için p=**0.006**
PD vs MKH-2 → GPx için p=**0.0001**, SOD için p=**0.008**
PD vs P-3 → GPx için p=**0.0001**, SOD için p= **0.008**
PD vs MKH-3 → GPx için p=**0.0001**, SOD için p=**0.008**
P-2 vs MKH-2 → SOD için p= **0.006**

TARTIŞMA VE SONUÇ

Uzun süreli PD sırasında üremi, tekrarlayan peritonitler, biyouyumsuz diyaliz solüsyonlarına maruz kalma, PD katateri gibi sebeplerle bazı yapısal ve fonksiyonel değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Mezotel hücreleri arasındaki bağlantılar

gevşemekte, mezotel hücrelerinde kayıp meydana gelmekte, mezotel bazal membranı kalınlaşmaktadır. İnterstisyumda kollajen birikimi ve ekstrasellüler matriksteki artışın etkisiyle submezotelyal kalınlık artmaktadır. İnterstisyumda yeni damarlar oluşmakta, ayrıca damarların yapısında da değişim olmaktadır. Kapiller damarlarda kollajen birikimine bağlı olarak lümen daralmaktadır. Bu değişikliklerin klinik yansıması UF yetersizliği olarak kendini göstermektedir (4, 19, 24, 25, 31).

Çalışmamızda da daha önceki çalışmalara benzer şekilde, yüksek glukoz konsantrasyonlu standart PD sıvısına periton zarının kronik olarak maruz kalması sonucu mezotel hücrelerinin reaktif hale gelmesi, bazal laminanın kalınlaşması, fibroblastik aktivitenin ortaya çıkması, inflamasyon, yeni damar gelişimi ve submezotelyal kalınlıkta artışla kendini gösteren morfolojik değişiklikler saptanmıştır. Zareie ve ark (52)'nin yaptıkları çalışmada beş hafta süresince PD kateteri ile %3.86'lık PD sıvısı verilmesi sonucunda ratların peritonunda çalışmamıza benzer şekilde submezotelyal kalınlığın arttığı, inflamatuvar hücrelerin ve damar sayısının arttığı görülmüştür. Elektron mikroskopik incelemede standart PD sıvısına kronik maruz kalma sonucunda mezotel hücrelerinde hasar ve mezotel hücre kaybı geliştiğini gözlemlemişlerdir (61). Schilte ve ark (53) da kronik PD sıvısına maruz kalma sonucunda ratların peritonunda benzer değişiklikler gözlemişlerdir. Makrofaj sayısı artmış, mezotel hücreleri artmış, submezotelyal kalınlık artmış, yeni damarlar oluşmuştur. Williams ve ark (25) kronik PD'deki hastaların peritonunu inceledikleri çalışmalarında submezotelyal kalınlıkta artış, vaskülopati,

mezotel hücrelerinde reaktivasyon, mezotel hücrelerinde kayıp, inflamasyon saptamışlardır. Periton diyaliz süresi arttıkça submezotelyal kalınlıkta ve vaskülopati derecesinde artış olmuştur (25). Çalışmamızın sonuçları bu bulguları desteklemektedir.

Çalışmamızda Periton morfolojisinin PD yapılan grupta ve MKH verilmeyen grupta bozulduğu görülürken, MKH grubunda morfolojik değişikliklerin kontrolden anlamlı farklı olmadığı görüldü. Bu bulgular MKH tedavisinin periton zarındaki hasarı düzeltebileceğini/önleyebileceğini düşündürmektedir. Fakat MKH'nin etkisinde antioksidan sistemin de rolü olduğunu elde ettiğimiz sonuçlara göre söyleyebilmemiz zor. Bu konuda daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1.	Kim YI et al. Update on mechanisms of ultrafiltration failure. perit dial int. 2009 Feb;29 Suppl 2:S123-7
2.	Yung S, Chan TM. Mesothelial Cells Perit Dial Int 2007; 27:110–115.
3.	<u>Hjelle JT</u> , <u>Miller-Hjelle MA</u> , <u>Dobbie JW</u> . The biology of the mesothelium during peritoneal dialysis. Perit Dial Int 1995; 15: 13-22.
4.	Saxena R. Pathogenesis and treatment of peritoneal membrane failure. Pediatr Nephrol 2008; 23:695-703.
5.	Alhamdani MS. Impairment of glutathione biosynthetic pathway in uremia and dialysis. Nephrol Dial Transplant 2005, 20: 124-128
6.	Gotloib L. Mechanisms of cell death during peritoneal dialysis. A role for osmotic and oxidative stress. Contrib Nephrol. 2009, 163: 35- 44
7.	Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. Stem Cells 2004; 22:487-500.
8.	<u>Bruder SP</u> , <u>Jaiswal N</u> , <u>Haynesworth SE</u> . Growth kinetics, self-renewal, and osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. <u>J Cell Biochem</u> . 1997; 64: 278-29
9.	<u>Haynesworth SE</u> , <u>Goshima J</u> , <u>Goldberg VM</u> , <u>Caplan AI</u> . Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. Bone 1992; 13: 81-88.
10.	<u>Pittenger MF</u> , <u>Mackay AM</u> , <u>Beck SC</u> , et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-147.
11.	Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circ Res 2004; 95: 9-20.
12.	<u>Petersen BE</u> , <u>Bowen WC</u> , <u>Patrene KD</u> , et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 1999; 284:1168-1170.
13.	Rastegar F, Shenaq D, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. World J Stem Cells 2010; 2:67-80.
14.	Lanza C. Neuroprotective mesenchymal stem cells are endowed with a potent antioxidant effect in vivo. J Neurochem 2009, 110: 1674- 84

15.	Dobbie JW. New concepts in molecular biology and ultrastructural pathology of the peritoneum: their significance for peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis 1990; 15: 97-109.
16.	<i>Rangan G. Periton membranının fizyolojisi. In: Harris D, Elder G, Karaitis L, Rangan G. Basic Clinical Dialysis. Çeviri: Gürkan Kazancı. Klinik Diyalizin Temel İlkeleri. Nobel Tıp, İstanbul 2008, sf 170-175.</i>
17.	Gotloib L. Functional structure of the peritoneum as a dialysing membrane. In: Khanna R, Krediet RT (eds), Nolph Gokal's Textbook of Peritoneal dialysis (Third edition). Springer, New York 2009, pp, 73-136.
18.	Söylemezoğlu O. Çocuklarda Diyaliz Uygulamaları. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci 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. Perit Dial Int 2009; 29: 605-617.
20.	Teitelbaum I, Burkart J. Peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis 2003; 42:1082-1096.
21.	<i>NAPRTCS 2008 Annual Report. www.emmes.com/study/ped/annlrept/Annual%20Report%20-2008.pdf</i>
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.	Fusshoeller A. Histomorphological and functional changes of the peritoneal membrane during long-term peritoneal dialysis. Pediatr Nephrol 2008;23:19-25.
25.	Williams JD, Craig KJ, Topley N, et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. J Am Soc Nephrol 2002; 13: 470-479.
26.	Combet S, Ferrier ML, Van Landschoot M, et al. Chronic uremia induces permeability changes, increased nitric oxide synthase expression, and structural modifications in the peritoneum. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 2146-2157.
27.	Lai KN, Leung JC. Inflammation in peritoneal dialysis. Nephron Clin Pract 2010; 116: 11-18.
28.	Lai KN, Tang SC, Leung JC. Mediators of inflammation and fibrosis. Perit Dial

	Int 2007; 27: 65-71.
29.	Ito T, Yorioka N. Peritoneal damage by peritoneal dialysis solutions. Clin Exp Nephrol 2008; 12: 243-249.
30.	Devuyst O. Molecular mechanisms of peritoneal permeability--research in growth factors. Perit Dial Int 2001; 21: 19-23.
31.	De Vriese AS, Mortier S, Lameire NH. What happens to the peritoneal membrane in long-term peritoneal dialysis? Perit Dial Int 2001;21: 9-18.
32.	Flessner MF, Credit K, Henderson K, et al. Peritoneal changes after exposure to sterile solutions by catheter. J Am Soc Nephrol 2007; 18: 2294-302.
33.	Aroeira LS, Aguilera A, Sánchez-Tomero JA, et al. Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. J Am Soc Nephrol 2007; 18: 2004-2013.
34.	López-Cabrera M, Aguilera A, Aroeira LS, et al. Ex vivo analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. Perit Dial Int 2006; 26: 26-34.
35.	Seli E, Arici A. Cytokines in the peritoneal environment. In: Hill JA (ed) Cytokines in Human Reproduction Wiley, United States of America 2000, pp. 239-258.
36.	Molinas CR, Binda MM, Koninckx PR. Angiogenic factors in peritoneal adhesion formation. Gynecol Surg 2006; 3: 157-167.
37.	Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 1999; 13: 9-22.
38.	Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gauldie J. Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 2029-2039.
39.	Mortier S, Lameire NH, De Vriese AS. Animal models in peritoneal dialysis research: a need for consensus. Perit Dial Int 2005; 25: 16-24.
40.	Lameire N, Van Biesen W, Van Landschoot M, et al. Experimental models in peritoneal dialysis: a European experience. Kidney Int 1998; 54: 2194-2206.
41.	Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies and clinical applications.

	Vet Surg 2005; 34: 415-423.
42.	Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood 2003; 102: 3483-93.
43.	Mimeault M, Batra SK. Concise review: recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. Stem Cells 2006; 24: 2319-2345.
44.	Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol 1974; 2: 83-92.
45.	Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8: 315-317.
46.	Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, Danilkovitch-Miagkova A. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. Inflamm Allergy Drug Targets 2009; 8:110-123.
47.	Bambakidis NC, Miller RH. Transplantation of oligodendrocyte precursors and sonic hedgehog results in improved function and white matter sparing in the spinal cords of adult rats after contusion. Spine J 2004; 4:16-26.
48.	Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patellofemoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. J Tissue Eng Regen Med 2007; 1: 74-79.
49.	Sun L, Akiyama K, Zhang H, et al. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. Stem Cells 2009; 27: 1421-1432.
50.	Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 8932-8937.
51.	Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy

	(MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). Bone Marrow Transplant 2002; 30: 215-222.
52.	Zareie M, Keuning ED, ter Wee PM, Beelen RH, van den Born J. Peritoneal dialysis fluid-induced changes of the peritoneal membrane are reversible after peritoneal rest in rats. Nephrol Dial Transplant 2005; 20: 189-193.
53.	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.

Bu alışma 44. ESPN kongresinde (44th Annual Scientific Meeting of the European Society for Paediatric Nephrology) Hırvatistan'da poster bildirisi olarak sunulmuştur.