

Üreterovezikal darlık olgularında bozulmuş pacemaker aktivitesi ve fibrotik değişiklikler*

Başak UÇAN, Derya YAYLA, Ragıp ORTAÇ, Günyüz TEMİR, Gülden DİNİZ, Aytaç KARKINER, Münevver HÖŞGÖR, İrfan KARACA

Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Cerrahisi Kliniği ve Patoloji Bölümü, İzmir

Özet

Amaç: Üreterovezikal darlık (ÜVD) etiopatogenezi henüz aydınlatılamamıştır. İn vitro çalışmalar üreterin sinirsel kontrolü olduğunu kanıtlamıştır. Üreteral peristaltizmin diğer düz kaslarda olduğu gibi kas tabakaları arasında yer alan kimyasal bir mediatör tarafından sağlanan bir stimulus veya üreteral pacemaker aktivitesiyle ortaya çıkabileceği düşündürülen çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızın amacı ÜVD olgularında bozulmuş pacemaker aktivitesi ve fibrotik değişikliklerin etiopatogenezdeki yerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: 2000- 2006 yılları arasında kliniğimizde ÜVD nedeniyle opere olan 8 olgudan (E/K:4/4, yaş ortalaması: 6,2 yaş) alınan 9 üreterin üreterovezikal bölgesi ve proksimalindeki dilate segmentlerine ait patoloji materyalleri incelenmiştir. Kontrol grubu olarak aynı yaş grubundaki tümör nefrektomilerinin distal üreter segmentine ait örnekler (6 olgu) kullanılmıştır. Kesitlere Hemotoksilen Eozin, Gomori trikrom histokimya boyaları yanı sıra Avidine-Biotin Peroksidaz yöntemi ve DAB kromojen madde kullanılarak S100 (Nöral hücre belirteci), c-kit antikorları (Cajal hücre belirteci) ile immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Bulguları değerlendirmek için Spearman korelasyon analizi kullanılmıştır.

Bulgular: Distal dar segment örnekleri ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında S100 proteini (p:0.032) ve c-kit (p: 0.029) anlamlı olarak azalmış olarak bulunmuştur. Kontrol grubuna göre dar ve dilate segmentte fibrozisin (p:0.017) anlamlı olduğu gösterilmiştir.

Sonuç: Çalışmamız ÜVD etiopatogenezinde nöral dağılımdaki yetersizliğin ve lveya dar segmentlerde saptanan fibrozisin rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: Üreterovezikal darlık, c-kit, S100

Giriş

Üreterovezikal darlık (ÜVD) etiopatogenezi henüz

* XXIV. Ulusal Çocuk Cerrahisi Kongresi'nde sunulmuştur, 3-8 Kasım 2006, Adana

Adres: Dr. Başak Uçan, Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Cerrahisi Kliniği, Alsancak, İzmir

Yayına kabul tarihi: 21.3.2007

Summary

Altered pacemaker activity and fibrotic changes in ureterovesical obstruction cases

Aim: Etiology of ureterovesical junction obstruction (UVJO) is still unknown. In vitro studies have proven that the ureter has a nervous control. There are studies that suggest that ureteral peristalsis can be triggered by a stimulus provided by a chemical mediator located between layers of muscle or by ureteral pacemaker activity. The purpose of our study is to explain the impact of distorted pacemaker activity and fibrotic changes on etiopathogenesis of UVJO.

Material and Methods: Pathological material of the ureterovesical regions (9 ureters) and proximal dilated segments (5 ureters) of the 8 patients who have been operated for UVJO in our department between 2000 and 2006 have been analyzed. As a control sample, specimens of the distal ureteral segment of tumor nephrectomies (6 ureters) of the same age group have been used. Using specific antibodies, we studied by immunohistochemistry using S100 (a supporting neuronal cell marker), c-kit (Cajal cell marker). Hematoxyline - Eosin and Gomori tricrom was also studied for fibrosis.

Results: Spearman's statistical non-parametric correlation analysis has yielded a significant decrease of S100 (p: 0.032), c-kit (P: 0.029) in the distal segments of the patients compared to the control samples. The fibrosis in the dilated and narrow segments has been also found significant (p: 0.017) compared to the control samples.

Conclusion: Our study has suggested that deficiency in neural distribution and/or fibrosis found in narrow segments could be a factor in UVJO etiopathogenesis.

Key words: Ureterovesical junction obstruction, c-kit, S100

aydınlatılamamıştır. Pek çok olguda proksimal üreterdeki ileri derece genişlemeye rağmen üreterovezikal alanda belirgin bir darlık saptanmamaktadır. Bu durum olgulardaki obstrüksiyonun fonksiyonel olabileceği yönünde görüşler doğurmuştur. Pek çok etiolojik faktör suçlanmış ancak hiçbirisi tam olarak kabul görmemiştir.

Notley elektron mikroskopik çalışmasında, distal üreterde lamina propria ve kas lifleri arasında yoğun kollajen birikiminden söz etmiş ve patolojiden kollajen birikimini sorumlu tutmuştur. Ayrıca üreterin nonganglionik bir organ olduğunu, inervasyonunun üreteral duyu ve vazomotor fonksiyondan ibaret olduğunu bildirmiştir (9,10).

Hanna elektron mikroskopik çalışmasında, üreterde ganglion hücresi saptamamış ancak lamina propriada, kas tabakasında ve adventisiada miyelinsiz sinir lifleri bulunduğunu göstermiştir. İn vitro çalışmalar üreterin sinirsel kontrolü olduğunu kanıtlamıştır. Bu da üreteral peristaltizmin diğer düz kaslarda olduğu gibi kas tabakaları arasında yer alan kimyasal bir mediatör tarafından sağlanan bir stimulus veya üreteral pacemaker aktivitesiyle ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir (3,4).

Üreterdeki peristaltizmin cerrahi denervasyondan ve nöron bloke edici ajanlardan etkilenmemesi bu savı desteklemektedir (6). Üreterdeki pacemaker aktivitesinin proksimal üreterden başlamakla birlikte orta ve alt kısımlara yayıldığı saptanmıştır (13,14).

Sonraki çalışmalarda ise insanlarda distal üreterde proksimal bölüme oranla daha yoğun innervasyon varlığı gösterilmiştir (2). Özellikle Cajal hücrelerinin (CH) distal üreterde yoğun olduğu bildirilmiştir (8). İlk olarak gastrointestinal sistemde gösterilen CH'nin koordine barsak motilitesinde önemli rol oynadığı ve CH'nin azalması sonucunda gastrointestinal sistemde motilite bozukluğu geliştiği kanıtlanmıştır (7,12,16).

S100 antikoru ise klinik ve deneysel olarak nöral kaynaklı hücreleri lokalize etmekte kullanılan bir belirteçdir. Üreterdeki nöral ağı dokümanete edebileceği düşünülmektedir. Oswald ve arkadaşları, reflü üreterlerinde azalmış S100 pozitif sinir liflerinin defektif innervasyondan sorumlu olduğunu bildirmiştir (11,19).

Çalışmamızın amacı, ÜVD olgularında CH ve S100 pozitif sinir liflerinin sayı ve dağılımlarının ve bu bölgedeki fibrotik değişikliklerin belirlenerek ÜVD etiopatogenezindeki rollerinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem

2000-2006 yılları arasında kliniğimizde ÜVD nedeniyle opere edilmiş 8 olgudan (E/K:4/4) alınan üreterovezikal bölge (9 üreter) ve proksimaldeki dilate segmentlere (5 üreter) ait patoloji materyalleri incelenmiştir. Olguların yaşları 1 ile 12 yaş (ortalama 6,2 yaş) arasındadır. Tüm olgularda vezikoüreteral reflü, mesane disfonksiyonu ve posterior üretral valv dışlanmıştır. Kontrol grubu olarak aynı yaş grubundaki tümör nefroüretrektomilerinden alınan örnekler (6 olgu) kullanılmıştır. Tüm örnekler gözden geçirildikten sonra uygun bloklar seçilmiştir. Bu seçme aşamasında preparatların üreteri tam kat içermesi göz önüne alınmıştır. Parafin bloklardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitlere Hemotoksilen Eozin, Gomori trikrom histokimya boyaları yanı sıra Avidine-Biotin Peroksidaz yöntemi ve DAB kromojen madde kullanılarak S100 (Dako, USA; N1573) ve c-kit (Dako, Denmark; A4502) antikoları ile immunohistokimyasal boyama yapılmıştır. Antikolar için üretici firmaların önerdiği optimal dilüsyon kullanılmıştır. İmmunohistokimyasal boyamaların tamamında S100 için beyin dokusu ve c-kit için de dokudaki mast hücreleri pozitif kontrol olarak yer almıştır. Tüm preparatlar aynı patolog tarafından değerlendirilmiştir.

Preparatlar xylolde deparafinize edildikten sonra dereceli alkollerden geçirilmiştir. Distile suda yıkandıktan sonra 10 dk. PBS'de, 10 dk. hidrojen peroksidazda bekletilmiştir. Distile suda tekrar yıkandıktan sonra sitrat tampon solusyonda (PH:6) mikrodalga fırında 5 dk. ılık, 5 dk. orta derecede ısıtılıp 10 dk. soğutulmuştur. C-kit için 10 dk. ılık, 10 dk. orta derecede kaynatma, 15 dk. soğutma sonrasında PBS de yıkayıp primer antikorda 60 dk. oda sıcaklığında, karanlık ortamda (c-kit için 90 dk.) kalmıştır. Sırasıyla PBS ile yıkama, biotinize antikorda 30 dk., PBS ile yıkama, biotine karşı geliştirilmiş avidin antikoru ile 30 dk., PBS de yıkama, DAB kromojen madde 10 dk. tutulup en son distile su ile yıkayıp Meyer Hematoksilin 5 dk. boyanmış, distile su ile yıkayıp, dereceli alkol serilerinden geçirip, kurutulmuş ve xylolde şeffaflandırılıp, entellan ile kapatılmıştır.

Değerlendirmede her kesitte 10 değişik alanda Nikon E200 mikroskop kullanılarak monitör üzerinde fo-

toğraflamalar yapılmıştır. Sinir liflerinin birim alandaki sayısı için $\times 10$, Cajal hücrelerinin birim alandaki sayısı için ise $\times 40$ objektif kullanılmıştır.

Fibrozis için ise fotoğraflar monitöre aktarılarak 4 mm^2 alanda trikrom boyası ile yeşil boyanan alanların tüm dokuya oranı, semikantitatif bir yöntem ile aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir.

0: Fibrozis yok (Resim 1)

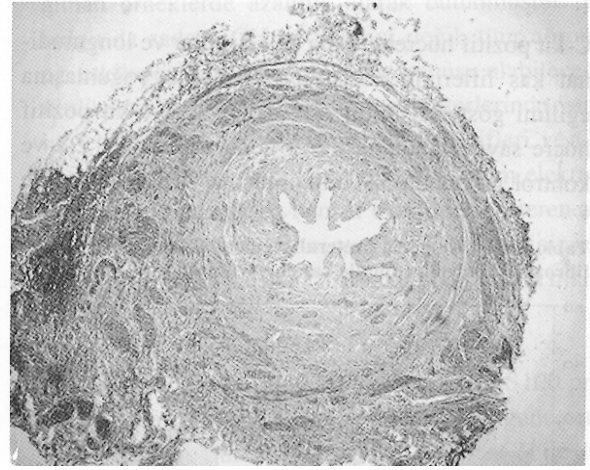
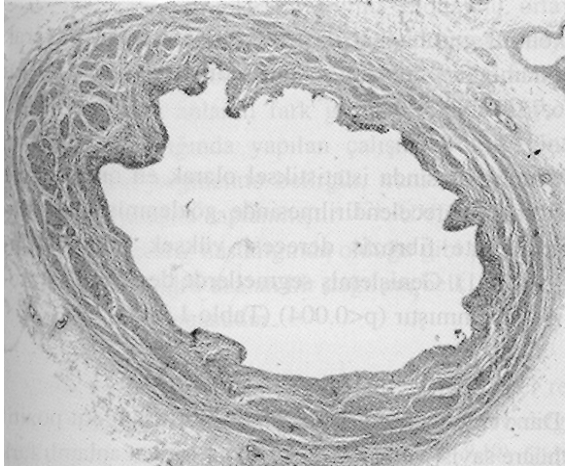
1: Submukozada sınırlı fibrozis (Resim 2)

2: Kas liflerini kesen kalın fibröz bantlar (Resim 3)
Dilate segment, üreterovezikal bölge ve kontrol gruplarına ait sonuçlar SPSS software programında

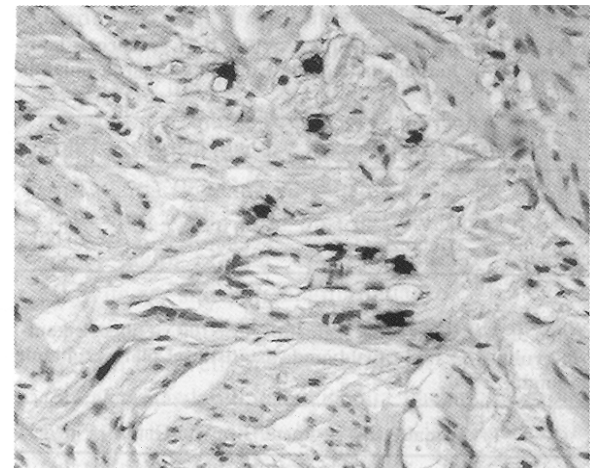
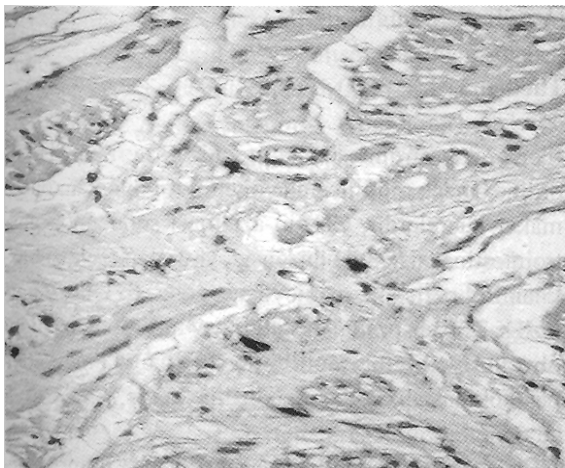
Spearman korelasyon analizi yapılarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular

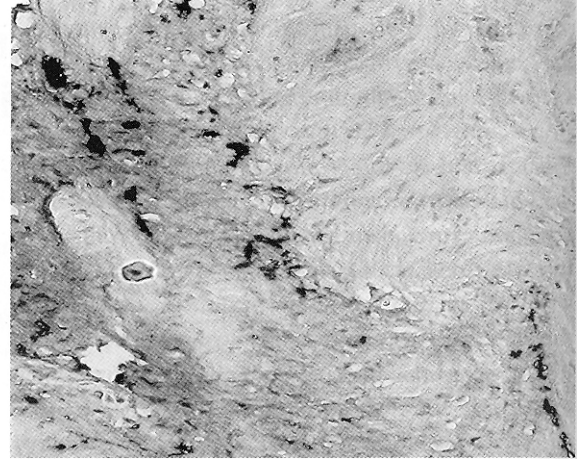
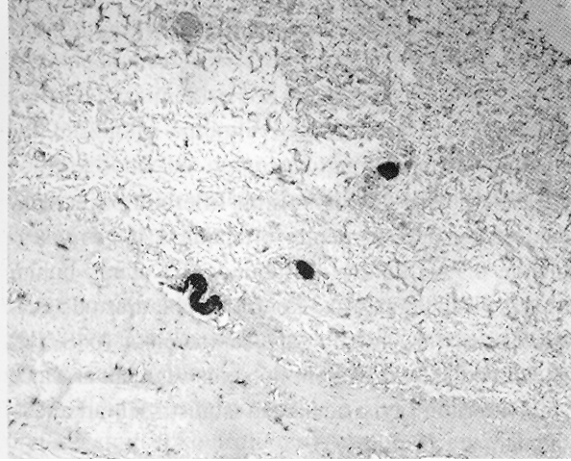
S100 ile pozitif boyanmış sinir liflerinin birim alandaki sayısı dar segmentte ortalama 1.4, geniş segmentte 0.9 ve kontrol grubunda 2.3 olarak bulunmuştur. Dar segment ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p=0.032$) (Resim 4,5). Dar segment ile geniş segment arasında sinir liflerinin sayısı açısından istatistiksel farka rastlanmamıştır (Tablo 1,3).



Resim 1,2. Kontrol grubunda üreterde kollajen birikimi saptanmazken, ÜVD olgusunda dar segmentte belirgin kollajen birikimi görülmektedir (X400).



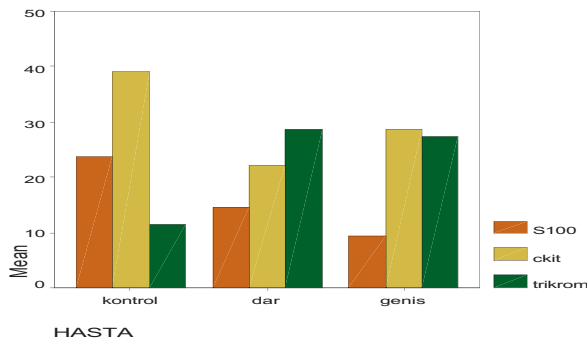
Resim 3,4. Kontrol grubunda S100 proteini ile boyalı sinir lifleri belirginken, ÜVD olgusunda dar segmentte S100 proteini ile boyalı sinir lifleri azalmış olduğu görülmektedir (X400).



Resim 5,6. ÜVD olgusunda c-kit eksprese eden CH hücreleri kontrol grubuna göre belirgin azalmış olarak görülmektedir (X400).

C-kit pozitif hücreler daha çok sirküler ve longitudinal kas liflerinin kesiştiği bölgelerde yoğunlaşma eğilimi göstermişlerdir. Dar segmentte c-kit pozitif hücre sayısı ortalaması 2.2, geniş segmentte 2.8 ve kontrol grubunda 3.9 bulunmuştur. Dar segment ile

Tablo 1. Dar ve geniş üreteral segmentlerdeki S100, CH ve fibrozisin kontrol grubu ile karşılaştırılması.



Tablo 2. Dar distal segmentlerde S100, İCH ve fibrozis kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

	Dar Distal Segment	Kontrol Grubu	P değeri
S 100	1.4	2.3	0.032
İCH	2.2	3.9	0.017
Trikrom	Fibrozis (+)	Fibrozis (-)	<0.001

Tablo 3. Proksimal geniş segmentlerde S100 ve fibrozis kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

	Proksimal Geniş Segment	Kontrol Grubu	P değeri
S 100	0.9	2.3	0.001
CH	2.8	3.9	0.139
Trikrom	Fibrozis (+)	Fibrozis (-)	0.004

kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark dikkati çekmektedir ($p=0.017$) (Resim 6,7) (Tablo 1,2).

Gruplar arasında istatistiksel olarak en önemli fark fibrozis derecelendirilmesinde gözlenmiş olup, dar segmentte fibrozis derecesi yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Genişlemiş segmentlerde de anlamlı fibrozis saptanmıştır ($p<0.004$) (Tablo 1,2,3).

Dar ve geniş segment arasında fibrozis, c-kit pozitif hücre sayısı ve sinir lifi sayısı açısından anlamlı fark saptanmamıştır.

Fibrozis derecesi ile Cajal hücre sayısı ve S100 pozitif sinir lifi sayısı arasında anlamlı korelasyon yoktur.

Tartışma

İlk olarak gastrointestinal sistemde gösterilen CH koordine barsak motilitesinde önemli rol oynayan pace-maker hücrelerdir. CH'nin azalması sonucunda gastrointestinal sistemde düzensiz, yavaşlamış veya basılanmış peristaltizm meydana gelir. CH'nin yetersizliği Hirschsprung hastalığı ve intestinal pseudo-obstrüksiyon gibi motilite bozukluğuyla seyreden pek çok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (7,12,16).

CH'nin üriner sistemdeki varlığı ilk kez domuz mesanesinde ve daha sonra üst üriner sistemde gösterilmiştir. Bundan yola çıkarak üreteropelvik darlık ol-

gularında yapılan çalışmalarda CH'nin pelviste azalmış dansitede bulunduğu ve bu nedenle peristaltik koordinasyonun bozulduğu ve etiyojiden sorumlu tutulabilecekleri bildirilmiştir (8,15). Benzer bir mekanizma ÜVD olguları için de geçerli olabilir. Lee ve arkadaşları ÜVD ve UPD'nin ureterin farklı seviyelerinde aynı etiyojistik faktörler ile meydana gelen hastalıklar olduğunu savunmuşlardır (5). Her iki patolojide de distalde standart bir darlık görülmeksizin proksimal segmentte belirgin dilatasyon saptanmaktadır ve etiopatogenezleri tam olarak aydınlatılamamıştır.

Çalışmamız ÜVD olgularının üreterovezikal bileşkelelerinden alınan örneklerde kontrol grubuna göre CH sayısının anlamlı olarak azalmış olduğunu ortaya koymuştur. Proksimal segmentlere ait örneklerdeyse CH sayısı düşük bulunmuş olmakla birlikte kontrol grubuna göre anlamlı fark göstermemiştir. Hirschsprung hastalığında yapılan çalışmalarda CH'inde aganglionik segmentte belirgin, transizyonel zonda ise ılımlı azalma saptanmıştır (12). ÜVD olgularında da Hirschsprung hastalığında olduğu gibi proksimalden distale doğru azalan bir dağılım, belki de bir geçiş zonu söz konusudur.

Daha önceki çalışmalarda megaiüreterlerde ister reflüye sekonder ister obstrüktif kökenli olsun belirgin oranda kollajen birikimi saptanmıştır (3,4,9,10). Çalışmamızda da ÜVD olgularının üreterlerinden alınan örneklerin tümünde, kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı olarak artmış kollajen varlığı gösterilmiştir. Bu artış, özellikle üreterovezikal bileşkeden alınan örneklerde belirgindir. Reflü megaiüreterlerinde yapılan bir çalışmada, hücre dışı matris metalloproteinlerinde (MMP) artış, kas-kollajen oranında azalma saptanmış ve bu üreterlerdeki nöral bozukluğun MMP'nin nörotoksik etkilerine bağlı olabileceğine dair görüş belirtilmiştir (11).

CH'nin motiliteye etkileri düz kaslar üzerinden gerçekleşmektedir ve bazı araştırmacılar düz kaslarla CH'nin aynı mezenkimal prekürsörden geliştiğini savunmaktadır (17). Gelişimleri nöron gelişiminden bağımsız olmakla birlikte ayrılaşmaları için nöronlar ve düz kas prekürsörlerine gereksimleri olduğu bildirilmiştir (18). Birbirleriyle bu şekilde sıkı bağlantılı hücrelerden birinin gelişim sürecinde ortaya çıkacak bir bozukluğun tümünü birden etkileyeceği düşünül-

lebilir. Düz kasların kollajen salgıladıkları bilinmektedir. ÜVD olgularında düz kaslarda belirlenen patolojilerin ve düz kaslar arasında depolanan kollajenin CH veya nöral iletim üzerinde nasıl bir etki meydana getirdiği belirsizdir. Çalışmamızda distal ve proksimal segmentlerdeki kollajen birikimi ile CH dağılımı veya S100 proteini arasında bir korelasyon saptanmamıştır. Ancak bu korelasyon embriyoner dönemden itibaren çok daha karmaşık mekanizmalar içeriyor olabilir.

S100 proteini klinik ve deneysel olarak üreterdeki nöral ağı dökümanate edebileceği düşünülen bir belirteçtir (19). Çalışmamızda S100 proteini içeren sinir lifi sayısı hem distal hem de proksimal segmentlerden alınan örneklerde azalmış olarak bulunmuştur. Bu bulgu da sadece CH hücrelerini değil, tüm nöronal ağı etkileyen bir bozukluğun söz konusu olabileceğini düşündürmektedir. Reflü megaiüreterlerinde yapılan çalışmalarda da S100 pozitif sinir lifleri ve CH azalmış oranda saptanmıştır (11). Bu durum elektron mikroskopik olarak da benzer özellikler gösteren ancak kliniğe çok farklı yansıyan bu iki patolojinin etiyojisinin birbirinden ayrılmasını bu aşamada mümkün kılmamaktadır.

Çalışmamız, ÜVD olgularında CH'nin ve S100 proteini içeren sinir lifi sayısının azalmış olduğunu ortaya koymuştur. Buna bağlı olarak, üreterde CH ile düz kaslara ulaşan pacemaker aktivitenin bozulduğu ve üreter peristaltizminin bundan olumsuz yönde etkilendiği düşünülmüştür. Ancak Hirschsprung hastalığı, pilor stenozu gibi gastrointestinal obstrüksiyonlarda ve özellikle reflü megaiüreterlerinde de CH'nin azalmış olarak saptanmış olması bunun ÜVD olgularına özgü bir patoloji olmadığını, olasılıkla ikincil olarak meydana geldiğini ve obstrüksiyonu daha da belirginleştirdiğini akla getirmektedir. Daha önceki yayınlarda saptanan ve çalışmamızda da gösterilmiş olan kollajen birikimi obstrüksiyona neden olan bir diğer faktör olabilir. ÜVD olgularında pacemaker aktivite ve sinir lifi dağılımında yetersizlik olduğu çalışmamızda açık olarak gösterilmiştir. Ancak, CH'nin ÜVD etiopatogenezindeki rolünün daha net olarak anlaşılabilmesi için düz kaslarla ve kollajen varlığı ile etkileşimlerinin ortaya konulabilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Cocchia D, Lauriola L, Sentinelli S, et al: Immunohistochemical distribution of S-100 antigen in urinary system of man and rat. *Cell Biol Int Rep* 9:957-960, 1985
2. Edyvane KA, Truscull DC, Jonavicius J, et al: Presence and regional variation in peptide-containing nerves in the human ureter. *J Auton Nerv Syst* 15: 39(2):127-37, 1992
3. Hanna MK, Jeffs RD, Sturgess JM, et al: Ureteral structure and ultrastructure. Part 1. The normal human ureter. *J Urol* 116:718, 1976
4. Hanna MK, Jeffs RD, Sturgess JM, et al: Ureteral structure and ultrastructure. Part 3. The congenitally dilated ureter (megaureter). *J Urol* 117:24-27, 1977
5. Lee BR, Partin AW, Epstein JI, et al: A Quantitative histological analysis of the dilated ureter of childhood. *J Urol* 148:1482-1486, 1992
6. Maggi CA, Giuliani S, Meini S, et al: Calcitonin gene related peptide as inhibitory neurotransmitter in the ureter. *Can J Physiol Pharmacol* 73:986-90, 1995
7. Meier-Ruge WA, Muller-Lobeck H, Stoss F, et al: The pathogenesis of idiopathic megacolon. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18(11):1209-15, 2006
8. Metzger R, Schuster T, Till H, et al: Cajal like cells in the human upper urinary tract. *J Urol* 172:769-772, 2004
9. Notley RG: Electron microscopy of the primary obstructive megaureter. *Br J Urol* 44:229-234, 1972
10. Notley RG: The musculature of the human ureter. *Br J Urol* 42:724, 1970
11. Oswald J, Schwentner C, Brenner E, et al: Extracellular matrix degradation and reduce nevre supply in refluxing ureteral endings. *J Urol* 172:1099-1102, 2004
12. Rolle U, Piotrowska AP, Nemeth L, et al: Altered distribution of interstitial cells of Cajal in Hirschsprung disease. *Arch Pathol Lab Med* 126:928-33, 2002
13. Shafik A: Electroureterogram: human study of the electromechanical activity of the ureter. *Urology* 48:696-9, 1996
14. Shafik A: Effect of renal pelvic and ureteral distension on the striated urethral sphincter with recognition of the "reno-vesico-sphincteric reflex". *Urol Res* 26:331-6, 1998
15. Solari V, Piotrowska Piaseczna A, Puri P: Altered expression of interstitial cells of cajal in congenital üreteropelvic junction obstruction. *J Urol* 170:2420-2422, 2003
16. Taguchi T, Suita S, Masumoto K, et al: Universal distribution of c-kit-positive cells in different types of Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int* 19:273-9, 2003
17. Ward SM , Sanders M: Physiology and Pathophysiology of the Interstitial Cell of Cajal: From Bench to Bedside.I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol Gastroint and Liver Physiol* 281, G602- G611, 2001
18. Wu JJ, Rothman TP, Gershon MD: Development of the interstitial cell of Cajal: Origin, kit dependence and neural and nonneural sources of kit ligand. *J Neurosci Res* 59:384-401, 2000
19. Yucel S, Baskin LS: Neuroanatomy of the ureterovesical junction: clinical implications. *J Urol* 170:945-8, 2003