



T.C.

ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI

ANABİLİM DALI

ÇOCUK NEFROLOJİ BİLİM DALI

**KRONİK PERİTON DİYALİZ MODELİNDE
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
TRANSPLANTASYONUNUN İNFLAMASYON
ÜZERİNE ETKİSİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uzm. Dr. SEBAHAT TÜLPAR

KAYSERİ – 2011

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**KRONİK PERİTON DİYALİZ MODELİNDE
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
TRANSPLANTASYONUNUN İNFLAMASYON
ÜZERİNE ETKİSİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uzm. Dr. SEBAHAT TÜLPAR

Danışman

Prof. Dr. M. HAKAN POYRAZOĞLU

KAYSERİ – 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
TEŞEKKÜR	I
KISALTMALAR	II
TABLO LİSTESİ	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
A- PERİTON ANATOMİSİ	3
B-PERİTONUN HİSTOLOJİSİ VE FONKSİYONU	4
C-PERİTON DİYALİZİ	4
D-PERİTON DİYALİZİ SIRASINDA ORTAYA ÇIKAN YAPISAL VE FONKSİYONEL DEĞİŞİKLİKLERİN SEBEPLERİ	5
E-PERİTON DİYALİZİ SIRASINDA ORTAYA ÇIKAN YAPISAL DEĞİŞİKLİKLER	8
F-PERİTON DİYALİZİ SIRASINDA İNFLAMASYON BELİRTEÇLERİ VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ	12
G-PERİTON DİYALİZİ DENEYSEL HAYVAN MODELLERİ	15
H-MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER	16
I-MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN İŞARETLENMESİ	17
İ-MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE İNFLAMASYON	17
MATERYAL VE METOD	20
RATLAR	20
DENEY PROSEDÜRÜ	21
DİYALİZ SIVISININ VERİLMESİ	21
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER	21
PERİTON DOKUSUNUN ALINIŞI	24
HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME	25
PERİTON DOKUSUNDAN TNF- α , IL-6, TGF- β 1 VE VEGF ÖLÇÜMLERİNİN YAPILMASI	27
İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	27
BULGULAR	29
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN PERİTONA YERLEŞMESİ	30
PERİTON ZARINDA GELİŞEN HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER	31
İMMUNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	40

GRUPLARIN TNF- α , IL-6, VEGF VE TGF- β DÜZEYLERİ AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI	40
TARTIŞMA	45
SONUÇLAR	50
KAYNAKLAR	51
TEZ ONAY SAYFASI	58

TEŞEKKÜR

Yan dal uzmanlık eğitimim esnasındaki emek, destek ve anlayışlarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Ruhan Düşünsel, Prof. Dr. Zübeyde Gündüz, Prof. Dr. M. Hakan Poyrazoğlu ve Doç. Dr. İsmail Dursun'a teşekkür ederim.

Bu çalışmanın hazırlanmasında katkı ve desteklerinden dolayı Uzm. Dr. Funda Baştuğ, Doç. Dr. Hatice Özbilge, Yrd. Doç Dr. Esma Kaya, Uzm. Dr. Yasemin Altuner Torun, Doç. Dr. Hülya Akgün, Uzm. Dr. Erman Dörterler, Yrd. Doç. Dr. Ebru Çetin, Uzm. Dr. Osman Baştuğ'a, başta Erkut Bey olmak üzere DEKAM çalışanlarına ve patoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

KISALTMALAR

AGEs	: İleri glikasyon ürünleri
EMT	: Epitelden mezenkimale dönüşüm
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FGF-2	: Fibroblast büyüme faktörü-2
GDP	: Glukoz yıkım ürünleri
GFP	: Green fluorescent protein
HD	: Hemodiyaliz
ICAM	: İnterselüler adezyon molekülü
IL	: İnterlökin
İP	: İntraperitoneal
İV	: İntravenöz
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1
MKH	: Mezenkimal kök hücreler
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
PAI-1	: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
PBS	: Fosfat buffer solüsyonu
PD	: Periton diyalizi
PGE2	: Prostaglandin E2
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
TGF-β1	: Transforming büyüme faktörü-beta 1
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü-alfa
UF	: Ultrafiltrasyon
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

TABLO LİSTESİ

		Sayfa no
Tablo 1	Periton diyalizi sırasında peritonda değişikliğe yol açan sebepler	7
Tablo 2	Ratların gruplara göre dağılımı	29
Tablo 3	Grupların 1. hafta histopatolojik değerlendirmeleri	33
Tablo 4	Grupların 2.hafta histopatolojik değerlendirmeleri	34
Tablo 5	Grupların 3. hafta histopatolojik değerlendirmeleri	36
Tablo 6	MKH gruplarının histopatolojik değerlendirilmesi	38
Tablo 7	Plasebo gruplarının histopatolojik değerlendirmeleri	39
Tablo 8	Grupların VEGF, TNF- α ve IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması (Birinci hafta)	40
Tablo 9	Grupların VEGF, TNF- α , IL-6 ve TGF- β düzeylerinin karşılaştırılması (İkinci hafta)	41
Tablo 10	Grupların VEGF, TNF- α , IL-6 ve TGF- β düzeylerinin karşılaştırılması (Üçüncü hafta)	42
Tablo 11	Plasebo gruplarının VEGF, IL-6, TNF- α ve TGF- β düzeylerinin karşılaştırılması	43
Tablo 12	MKH gruplarının VEGF, IL-6, TNF- α ve TGF- β düzeylerinin karşılaştırılması	44

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa no
Şekil 1	Normal periton ve PD sırasında oluşan değişiklikler 9
Şekil 2	Mezotel hücrelerinin EMT ile myofibroblastlara dönüşümü 10
Şekil 3	Uzun süreli PD'nin periton zarı üzerine etkileri ve takiben oluşan yapısal, fonksiyonel değişiklikler ve klinik sonuçları 12
Şekil 4	PD sıvısına maruz kalındığında hücrelerin inflamatuvar cevabı 15
Şekil 5	Mezenkimal kök hücrenin immunitede görevli hücreler üzerine etkileri 18
Şekil 6	Deney prosedürü 22
Şekil 7	İmmunfloresan mikroskopta GFP parlamasının değerlendirilmesi 30
Şekil 8	Kontrol (a) ve PD gruplarının (b) histopatolojik görünümleri 31

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada periton zar hasarı oluşturulmuş ratlarda, intraperitoneal olarak mezenkimal kök hücrelerin (MKH) transplantasyonunun periton zarı ve inflamasyon üzerine etkisini araştırmak amaçlandı.

Materyal ve metod: Çalışmada 77 wistar albino erkek rat kullanıldı. Ratlar başlangıçta kontrol (n=10) ve çalışma grubu (n=67) olarak ikiye ayrıldı. Kontrol grubuna herhangi bir tedavi uygulanmadı. Çalışma grubuna 6 hafta süresince günde bir kez %3.86'lık diyaliz sıvısı intraperitoneal enjeksiyonla verildi. Altı haftanın sonunda çalışma grubu üçe ayrıldı: PD grubu, MKH grubu ve plasebo grubu. MKH grubuna intraperitoneal (İP) yolla MKH verilirken, plasebo grubuna ise plasebo verildi. Kontrol ve PD grubundaki ratlarda 6. haftanın sonunda, plasebo ve MKH gruplarındaki ratlarda ise İP tedavinin 1, 2 ve 3. haftasında anestezi altında periton örneği alınıp ratlar sakrifiye edildi. Peritonda ELİSA yöntemi ile TNF- α , IL-6, TGF- β ve VEGF çalışıldı ve histolojik değerlendirme yapıldı.

Bulgular: Submezotelyal kalınlığın PD ve plasebo gruplarında kontrol ve MKH gruplarına göre arttığı görüldü. Morfolojik bulgular açısından MKH grubu ile kontrol arasında anlamlı fark yoktu. Üçüncü haftadaki değerlendirmede plasebo grubunda fibrozis belirgindi. İmmunfloresan mikroskobu ile değerlendirmede MKH grubunda mezotel hattı boyunca parlama görüldü. Plasebo grubunda TGF- β 2. haftada yüksek saptandı. Mezenkimal kök hücre grubunda MKH verilmesinin 2. haftasında TNF- α ve IL-6 değerlerinin kontrol, PD ve plasebo gruplarına kıyasla yüksek olduğu görüldü. Tedavinin 3. haftasında hem

MKH, hem de plasebo grubunun TNF- α ve IL-6 değerleri kontrol ve PD grubuna göre düşüktü.

Sonuç: Bulgular mezenkimal kök hücre naklinin periton zarını koruyucu etkisi olduğunu düşündürmektedir. Bulgularımız bu alanda öncül sonuçlar olup, MKH naklinin umut verici olduğuna dair ipuçları içermektedir.

Anahtar kelimeler: İnflamasyon, kronik periton diyalizi, mezenkimal kök hücreler

EFFECTS OF MESENCHYMAL STEM CELL TRANSPLANTATION ON INFLAMATION IN A RAT MODEL OF CHRONIC PERITONEAL DIALYSIS

ABSTRACT

Aim: The purpose of this study was to determine the effect of mesenchymal stem cells (MSC) transplantation on the peritoneal morphology and inflammation markers in rat models of chronic peritoneal dialysis (PD).

Materials and Methods: Wistar albino male rats were divided into two groups: Control (C) group (n=10) and study group (n=67). The study group received daily intraperitoneal injection with 3.86 % glucose-based PD fluid once daily during six weeks. Rats without dialysis and treatment served as controls. After 6 weeks, study group was divided into three groups: PD, MSC and placebo group. MSC group was treated with MSC and placebo group was treated with phosphate buffer solution (PBS) via intraperitoneal injection. Peritoneal biopsy was performed to control and PD groups at the end of 6 weeks and to MSC and placebo groups at first, second and

third week after receiving MSC or PBS. The peritoneum was evaluated histologically by light microscopy. The levels of TNF- α , IL-6, TGF- β , and VEGF in the peritoneal tissue were studied by ELISA method.

Results: The submesothelial area was significantly thickened in PD and placebo groups compared with C and MSC groups. No significant differences were found between the MSC and C groups according to morphological findings. At third week evaluation, fibrosis was marked in the placebo group. Fluorescent cells were observed using fluorescent microscopy in the MSC groups. At second week, levels of TNF- α and IL-6 were significantly increased in the MSC group compared to the C, PD and placebo groups. At third week, TNF- α and IL-6 levels in MSC and P groups were significantly lower than PD and C groups. The TGF- β levels were found to be higher in the placebo group at second week.

Conclusion: Mesenchymal stem cells may offer promise as novel therapeutics in peritoneal dialysis patients to protect the peritoneal membrane.

Key words: Inflammation, chronic peritoneal dialysis, mesenchymal stem cells

GİRİŞ VE AMAÇ

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

Periton zarı tek tabakalı mezotel hücreleri ile kaplıdır. Mezotel periton zarının önemli bir komponentidir ve fibrin homeostazı, mikrosirkülasyon ve inflamatuvar cevabın regülasyonunda görev alır (2, 3). Kronik periton diyalizinde mezotel hücreleri sürekli olarak hiperosmotik, hiperglisemik ve asidik periton diyaliz sıvısına maruz kalır. Bu maruz kalma sonucunda kronik inflamasyon oluşur. Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6) gibi proinflamatuvar sitokinler, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve transforming büyüme faktörü-beta1 (TGF- β 1) artar. Sonuçta periton zar yetersizliği gelişir (4).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik iliği veya diğer dokulardan kaynaklanıp in vitro ortamda plastiğe yapışma özelliği olan hücrelerdir (5) Önceleri, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler 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 (6-11). Mezenkimal kök hücrelerin, miyokard, akciğer ve spinal kord hasarı deney modellerinde, antiinflamatuvar etkileri gözlenmiştir (12-14).

Bu çalışmada periton zar hasarı oluşturulmuş ratlarda, intraperitoneal olarak mezenkimal kök hücre transplantasyonunun periton zarı ve inflamasyon üzerine 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 anjiogenezise 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 neoanjiogeneziste 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 değışikliğe 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 hücresinde 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 bileşikleri olan GDP'nin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Mezotel hücreleri GDP'ye maruz kaldığında proinflatuvar 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

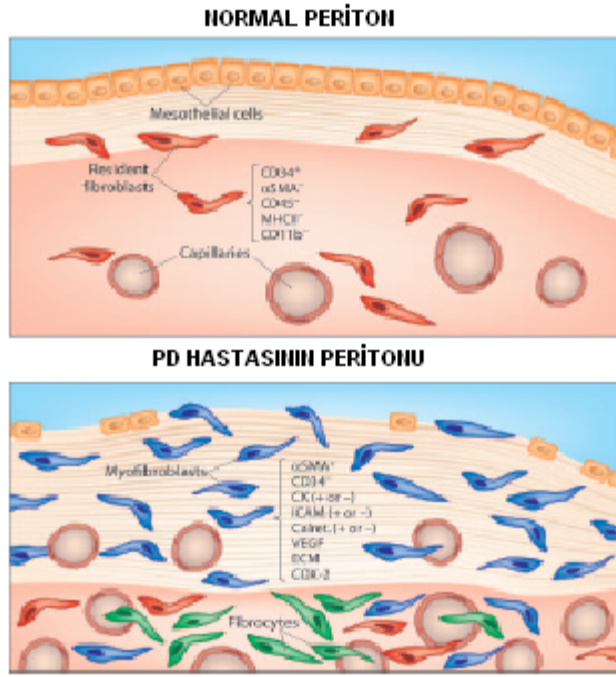
vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1)'in yapımını arttırmaktadır, apoptozu indüklemektedir (4, 29).

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, anjiogenezis, vaskülopati ve bazal membranda kalınlaşma meydana gelmektedir (24, 33) (Şekil 1).

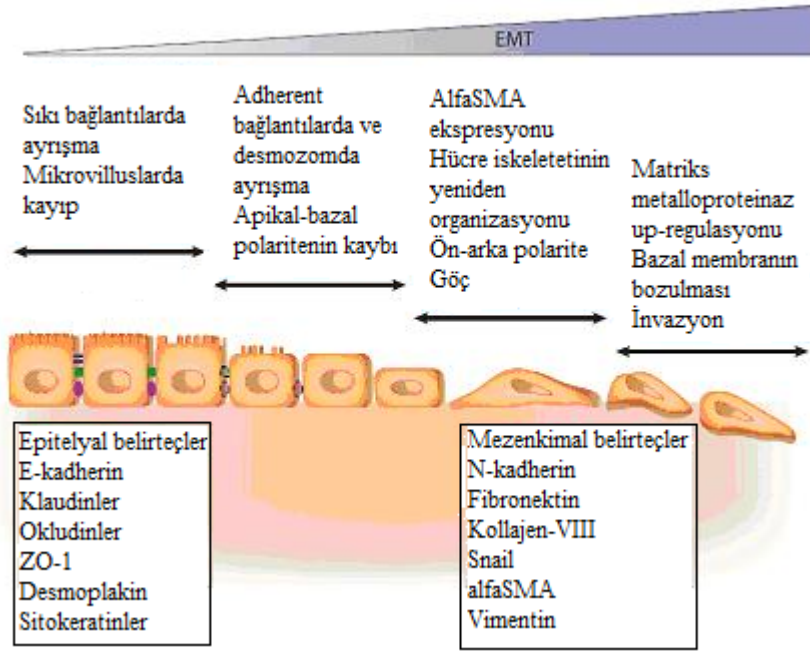
Periton diyalizi ile mezotel hücrelerindeki mikrovilluslar kaybolmaya başlamakta, hücreler arasındaki bağlantılar gevşemektedir. Periton diyalizine başlanmasından 8-10 ay sonra mikrovillusların tamamı yok olmaktadır. Hücreler arasındaki bağlantıların gevşemesi mezotel hücrelerinin birbirlerinden ayrılmasına 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)

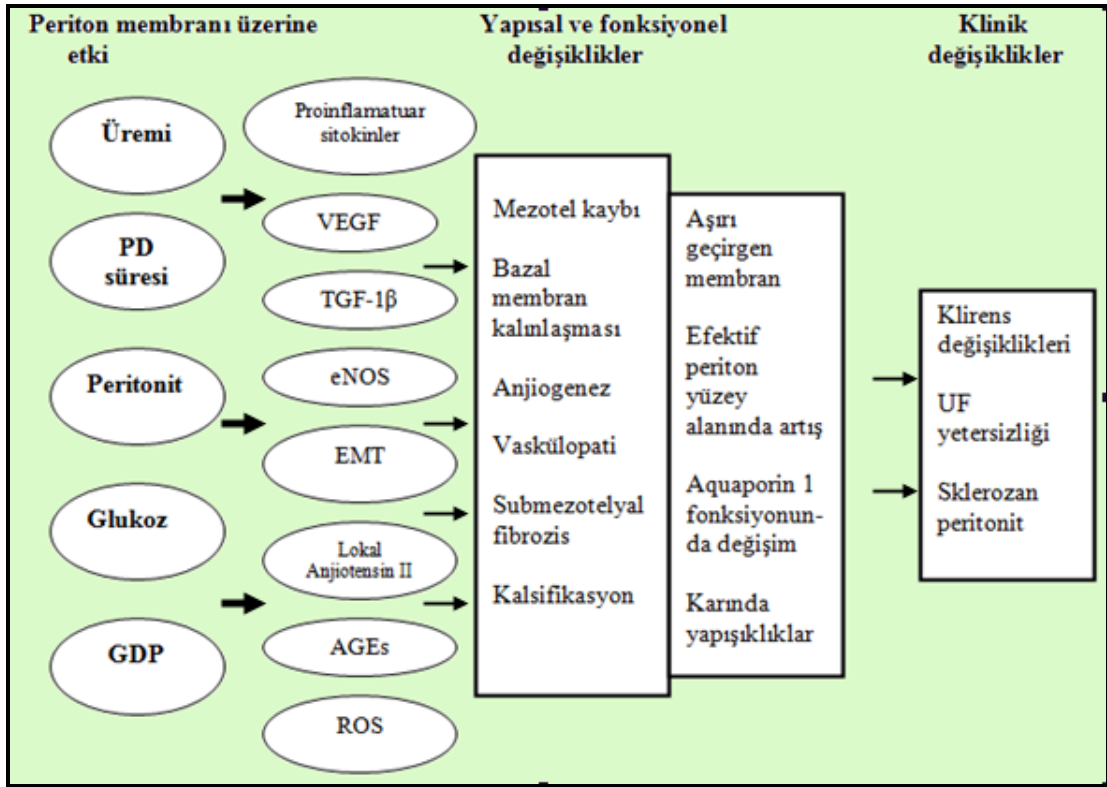
Periton diyalizi sırasında submezotelyal tabakada da değişiklikler oluşmaktadır. Periton diyalizi sırasında submezotelyal tabaka kalınlaşmaktadır (24). Erişkin PD hastalarında PD tedavisi sırasında periton zarında meydana gelen değişikliklerle ilgili en geniş çalışmayı Williams ve ark (25) yapmıştır. 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 hastalarinki 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 tıkalı 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 endotelyal büyüme faktörü, TGF-1 β ; transforming büyüme faktörü-1 beta, eNOS; endotelyal nitrik oksit sentetaz, EMT; epitelden mezenkime dönüşüm, AGEs; ileri glikasyon ürünleri, ROS; reaktif oksijen ürünleri, UF; ultrafiltrasyon (24)

F- PERİTON DİYALİZİ SIRASINDA İNFLAMASYON BELİRTEÇLERİ VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ

İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökin-6 makrofaj, T ve B hücreler, endotel hücresi, endometrial stromal hücre ve daha birçok hücre tarafından yapılan, 26 kDa ağırlığında bir sitokindir. Bağışıklık hücrelerinin büyüme ve farklılaşmasının düzenlenmesi, akut faz proteinlerinin indüksiyonu, hedef hücre tipine bağlı olarak hücre büyümesinin stimülasyon veya inhibisyonu gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri vardır (35).

Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF- α)

Tümör Nekroz Faktörü-alfa geniş biyolojik aktiviteye sahip bir sitokindir. Başlıca makrofaj ve monositler tarafından 26 kDa ağırlığında prekürsör olarak salgılanmakta, proteolitik mekanizmayla 17 kDa ağırlığındaki matür formuna ayrılmaktadır. Duyarlı hücrelere karşı makrofaj sitotoksitesini düzenlemektedir. Proinflamasyon, büyümeyi arttırma, büyümeyi inhibe etme, immunomodulasyon, angiogenezis, hücre toksisitesi gibi birçok etkisi olan bir faktördür. Nötrofilleri aktive etmektedir, tümör alanındaki damarlarda fibrin birikimini uyarmaktadır, in vitro olarak insan fibroblastlarının çoğalmasını uyarmaktadır (35).

Transforming Büyüme Faktörü-beta 1 (TGF- β 1)

Başlıca makrofaj, platelet, osteoblast ve aktif lenfositlerde yapılan 25 kDa ağırlığında bir peptittir. Büyümeyi düzenleyici özelliğinin dışında ayrıca makrofaj, fibroblast ve monositler için çok güçlü kemotaksi özelliği vardır. Fibrozis ve angiogenezi indüklemektedir. TGF- β 1'in T lenfosit, B lenfosit ve NK hücre fonksiyonunu belirgin inhibe edici immunomodulator aktivitesi de vardır (35).

Periton hücreleri tarafından TGF- β 1'in aşırı üretimi fibrozis, angiogenezis ve UF yetersizliğine yol açmaktadır. TGF- β 1 peritoneal sklerozun başlamasına ve ilerlemesine yol açmaktadır. Sekonder mediatörler aracılığıyla sklerozun devam ettirilmesine yol açtığı düşünülmektedir. Yüksek konsantrasyonda glukozun ve TGF- β 1'in mezotel hücreleri arasındaki bağlantıları hasarladığı gösterilmiştir (29).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörünü içeren bilinen en güçlü anjiogenik faktördür. Bu faktörler yüksek affiniteli 2 adet transmembran tirozin kinaz reseptörüne bağlanmaktadır: VEGFR-1 ve VEGFR-2. Bu reseptörler selektif olarak endotel hücrelerinde eksprese edilmektedir. Ayrıca VEGFR-1 inflamatuvar hücrelerde de eksprese edilmektedir. Bundan dolayı VEGF'lerin bir kısmı angiogeneze ilaveten inflamasyonu da uyatabilmektedir (36). VEGF fizyolojik ve patolojik angiogenezin ana düzenleyicisidir (37).

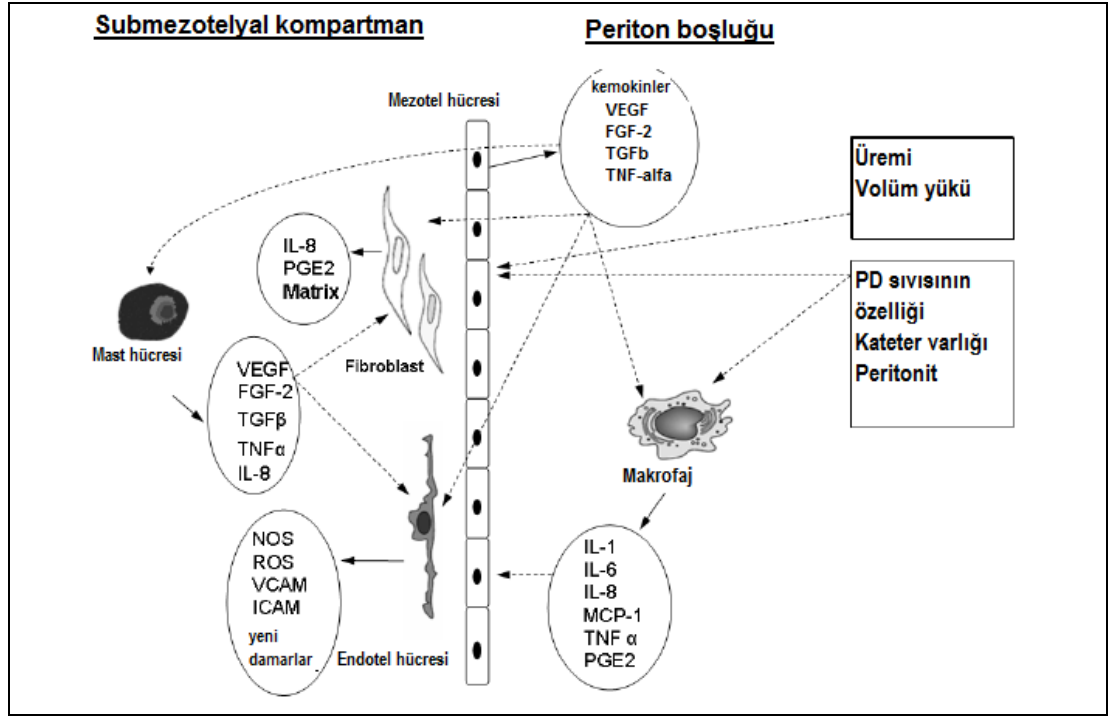
Periton diyalizi sırasında aktive olan hücrelerden birçok sitokin ve büyüme faktörü salgılanmaktadır. Periton diyalizinin etkisi ile yeniden şekillenmede makrofajlar önemli rol oynamaktadır. Aktif makrofajlarda monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1), IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler yapılmaktadır (Şekil 4). IL-1 β ve TNF- α 'nın aşırı yapımı akut inflamatuvar cevaba ve bunun sonucunda VEGF ve TGF- β 'nin ekspresyonuna yol açmaktadır. Sonuçta anjiogenezis ve fibrozis gelişmektedir. İnterlökin-8 nötrofillerin birikmesini ve aktif hale gelmelerini sağlamaktadır. Monosit kemoatraktan protein-1 mononükleer hücreleri toplamaktadır. Peritonit sırasında PD sıvısında IL-8 ve MCP-1 artmaktadır. Enfeksiyon düzeldikten sonra da bu kemokinlerin yapımının devam ettiği gözlenmiştir (19).

Birçok büyüme faktörü PD sırasındaki değişikliklere katkıda bulunmaktadır. Bu faktörler içinde VEGF ve TGF- β en önemlileridir. Peritonda mezotel hücreleri tarafından salgılanan VEGF endotel geçirgenliğini etkilemekte ve anjiogenezisin başlamasına katkıda bulunmaktadır. Glukoz yıkım ürünleri ve AGEs, VEGF yapımını çok arttırmaktadır. Yüksek glukoz konsantrasyonu TGF- β 'nin artışına yol açmaktadır. Peritonda TGF- β 'nin aşırı yapımı peritonda fibrozis, anjiogenezis, EMT, periton geçirgenliğinde artış ve UF'de azalmayla sonuçlanmaktadır (19).

Periton diyaliz solüsyonlarının peritonu bozucu etkisinde en önemli faktör glukoz ve GDP'nin AGEs'ni oluşturması, TGF- β 'yi de içeren çeşitli mediatörleri uyarması gibi gözükmemektedir. Akut ve kronik peritonitler sırasında TGF- β sentezi peritoneal lökosit kaynaklı faktörler tarafından da uyarılabilmektedir. Peritoneal inflamatuvar olaylar TGF- β 'nin yapımını arttırmaktadır ve TGF- β 'nin aşırı yapımı PD'de kötü sonuçlar ile korelasyon göstermektedir (34). Peritoneal fibrozis ile TGF- β 'nin ilişkisi in vivo rat modelinde gösterilmiştir. Bu modelde TGF- β 'nin adenovirüs vektörü ile periton boşluğuna aktarılmasıyla PD hastalarındakine benzer yapısal ve fonksiyonel değişiklikler oluşmuştur (38).

Periton diyalizi sırasında peritonda fibrozis dışında kapiller sayısında ve vaskülopatide de artış olmaktadır. Anjiogenezis ve mikrovasküler geçirgenlikte artış olması ultrafiltrasyon yetersizliğinin ana belirleyicileridir (34). TGF- β 1'in VEGF'nin üretimini arttırdığı gösterilmiştir (29). Vasküler endotelial büyüme faktörü çok güçlü

proanjiogenik bir sitokindir. Peritoneal anjiogeneziste VEGF'nin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Yakın zamandaki bulgular VEGF sentezi, mezotel hücrelerinin EMT'si ve periton zar yetmezliği arasında ilişki olduğunu göstermektedir. İn vitro ortamda mezotel hücrelerinin GDP, AGEs ve TGF- β gibi çeşitli uyarıların etkisi ile VEGF ürettiği gözlenmiştir (34).



Şekil 4. PD sıvısına maruz kaldığında hücrelerin inflamatuvar cevabı. Dış faktörler ve PD sıvısının özellikleri mezotel hücrelerini ve makrofajları aktive eder. Büyüme faktörleri ve inflamatuvar sitokinlerin yapımı başlar. Bu faktörler fibroblastları, endotel hücrelerini ve mast hücrelerini aktive eder. Anjiogenik ve fibrotik sitokinler, büyüme faktörleri salgılanır. IL; interlökin, PGE2; prostaglandin E2, VEGF; vasküler endotelial büyüme faktörü, FGF-2; temel fibroblast büyüme faktörü, TGF- β ; transforming büyüme faktörü beta, TNF- α ; tümör nekroz faktörü alfa, NOS; nitrik oksit sentetaz, ROS; reaktif oksijen ürünleri, VCAM; vasküler hücre adezyon molekülü, ICAM; interselüler adezyon molekülü, MCP-1; monosit kemoatraktan protein 1 (19)

G- PERİTON DİYALİZİ DENEYSEL HAYVAN MODELLERİ

Periton diyalizinin periton zar fonksiyonu ve yapısı üzerindeki uzun süreli etkilerini değerlendirmek için çeşitli kronik periton diyalizi modelleri geliştirilmiştir (39). Bu modellerde çoğunlukla rat ve tavşanlar kullanılmaktadır. Her iki hayvanın da avantaj

ve dezavantajları vardır. Ratların temini ve bakımı kolaydır. Ratları kullanmanın dezavantajı küçük olmaları ve göreceli olarak geniş periton yüzey alanına sahip olmalarından dolayı verilen diyalizatın geri alınmasının zor olmasıdır (40).

Periton sıvısı iki yolla uygulanabilmektedir: 1) Sıvının direkt olarak periton boşluğuna enjekte edilmesi 2) Peritona takılan kateter yoluyla sıvının verilmesi. İntraperitoneal enjeksiyon uygulamasının 20 haftaya kadar devam ettirilebilmesi mümkündür. İntraperitoneal enjeksiyon uygulamasının dezavantajı tekrarlayan enjeksiyonların enfeksiyona yol açabilmesidir. Çalışma süresince profilaktik antibiyotik verilmesi ile peritonit önlenabilmektedir. Ratlarda PD modellerinde dolum volümü olarak 10-25 ml diyaliz sıvısı kullanılmaktadır. Diyaliz sıvısının verilme sıklığı çalışmalarda genellikle günde 1-2 kezdir (39).

H- 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 (5). Bu hücreler kemik iliği dışında dolaşan kan, dalak, amniotik sıvı, kıkırdak, kas tendonları, plasenta, adipoz doku, fetal dokular, periost, sinovyal sıvı, timus, trabeküler kemik, dermis, diş pulpası ve akciğer gibi birçok doku ve organda saptanmıştır (11). 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 ekprese 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).

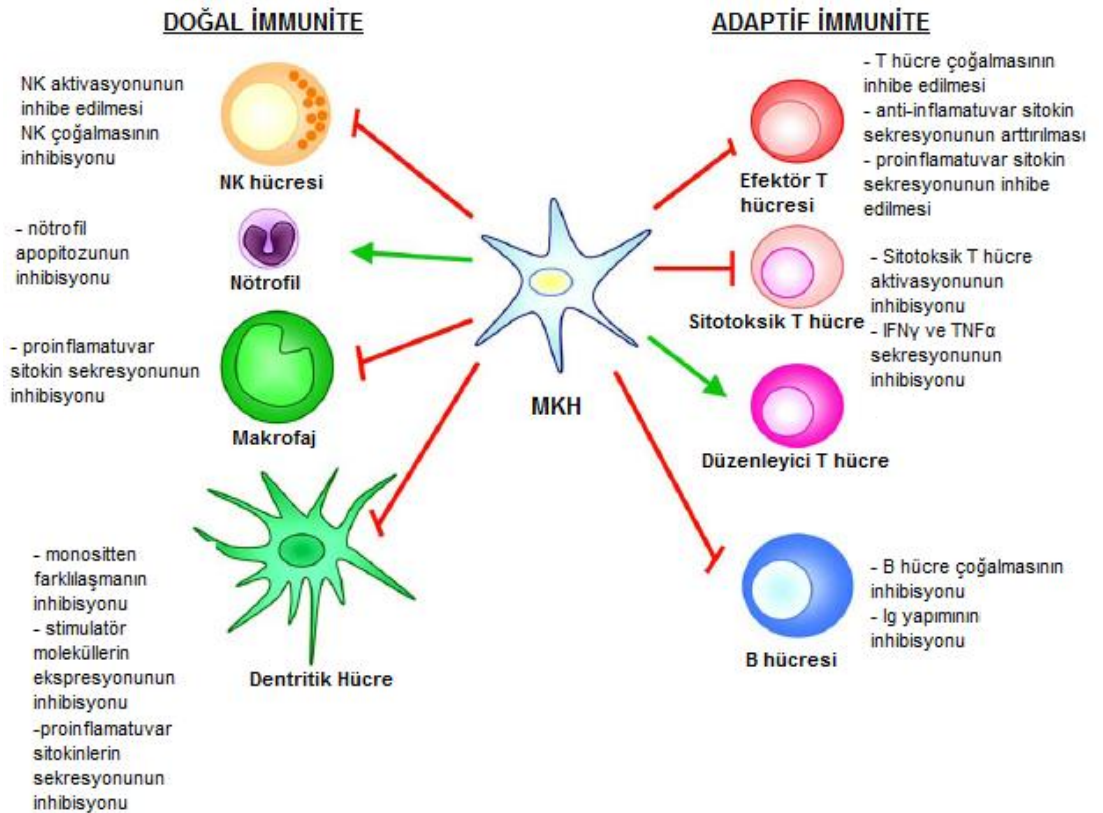
I- MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN İŞARETLENMESİ

Son yıllarda yapılan çalışmalar MKH'in doku yenilenmesine yönelik yeni bir hücresel tedavi olarak önemli bir potansiyel gösterdiğini düşündürmektedir (52). Kök hücre tedavisinin başarısı için hücre göçünün izlenmesi ve dokunun yenilenmesinin eksojen verilen hücre kaynaklı olup olmadığının saptanması önemlidir (53-55). Transplante edilen MKH'lerin göçünün izlenmesi ve bu hücrelerin hasarlı dokuya yerleşip yerleşmediğinin tesbiti için çeşitli işaretleme yöntemleri kullanılmıştır (56, 57). Mezenkimal kök hücreler genler, floresan boyalar veya kontrast ajanlar ile işaretlenebilmektedir (56-58). Green fluorescent protein (GFP) 238 aminoasitten oluşan, 26.9 kDa ağırlığında, mavi ışığa maruz kaldığında yeşil renk yayan bir proteindir. Günümüzde GFP hücre biyolojisi çalışmalarında tanımlayıcı gen ve hücre işaretleyici olarak kullanılmaktadır (59, 60).

İ- MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER VE İNFLAMASYON

Mezenkimal kök hücreler güçlü immunmodulator hücrelerdir. Doğal ve adaptif immun sistem hücreleri üzerindeki etkileri ile MKH immun sistemi düzenleyebilir (Şekil 5). Mezenkimal kök hücreler hasarlı dokuya göç eder, hedef alandaki immun

ve inflamatuvar yanıtı inhibe eder ve hasarlı dokunun tamirini kolaylaştırır (46). Mezenkimal kök hücrelerin MI, spinal kord hasarı, akciğer hasarı gibi çeşitli durumlarda güçlü antiinflamatuvar etkisi gözlenmiştir (12-14). Ratlarda miyokard infarktüsü modelinde MKH transplantasyonunun TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (12). Bleomisin ile oluşturulan akciğer hasar ve fibrozisinde intravenöz (İV) verilen MKH akciğerdeki inflamasyonu düzeltmiştir. Bleomisin ile oluşturulan hasarda MKH'nin IL-1 reseptör antagonisti üreterek anti-inflamatuvar etki gösterdiği tesbit edilmiştir. İntraperitoneal Escherichia coli endotoksini verilmesini takiben İV MKH verilmesinin endotoksinin indüklediği akciğer inflamasyon, hasar ve ödeminin önlendiği görülmüştür. Mezenkimal kök hücre tedavisi plazma ve bronkoalveolar lavajda pro-inflamatuvar sitokinlerin seviyesini azaltırken IL-10 gibi birçok anti-inflamatuvar sitokinlerin seviyesini arttırmaktadır (13).



Şekil 5. Mezenkimal kök hücrenin immunitede görevli hücreler üzerine etkileri (46)

Kronik periton diyalizinde peritonun bozulmasında inflamasyon önemli rol oynamaktadır. Mezenkimal kök hücre transplantasyonu ile inflamasyon baskılanabilirse belki de periton zarındaki yapısal ve fonksiyonel değişikliklerin önüne geçilebilir.

MATERYAL VE METOD

Bu alışma 8 Kasım 2010- 10 Ocak 2011 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakóltesi'ne bağlı Hakan etinsaya 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 (Proje No: TSU-10-3059).

RATLAR

Çalışmada 267-440g ağırlığında 5 aylık 77 erkek wistar rat kullanıldı. Ratlar konvansiyonel laboratuvar şartlarında bakıldı ve su - yiyecek kısıtlanması yapılmadı.

DENEY PROSEDÜRÜ

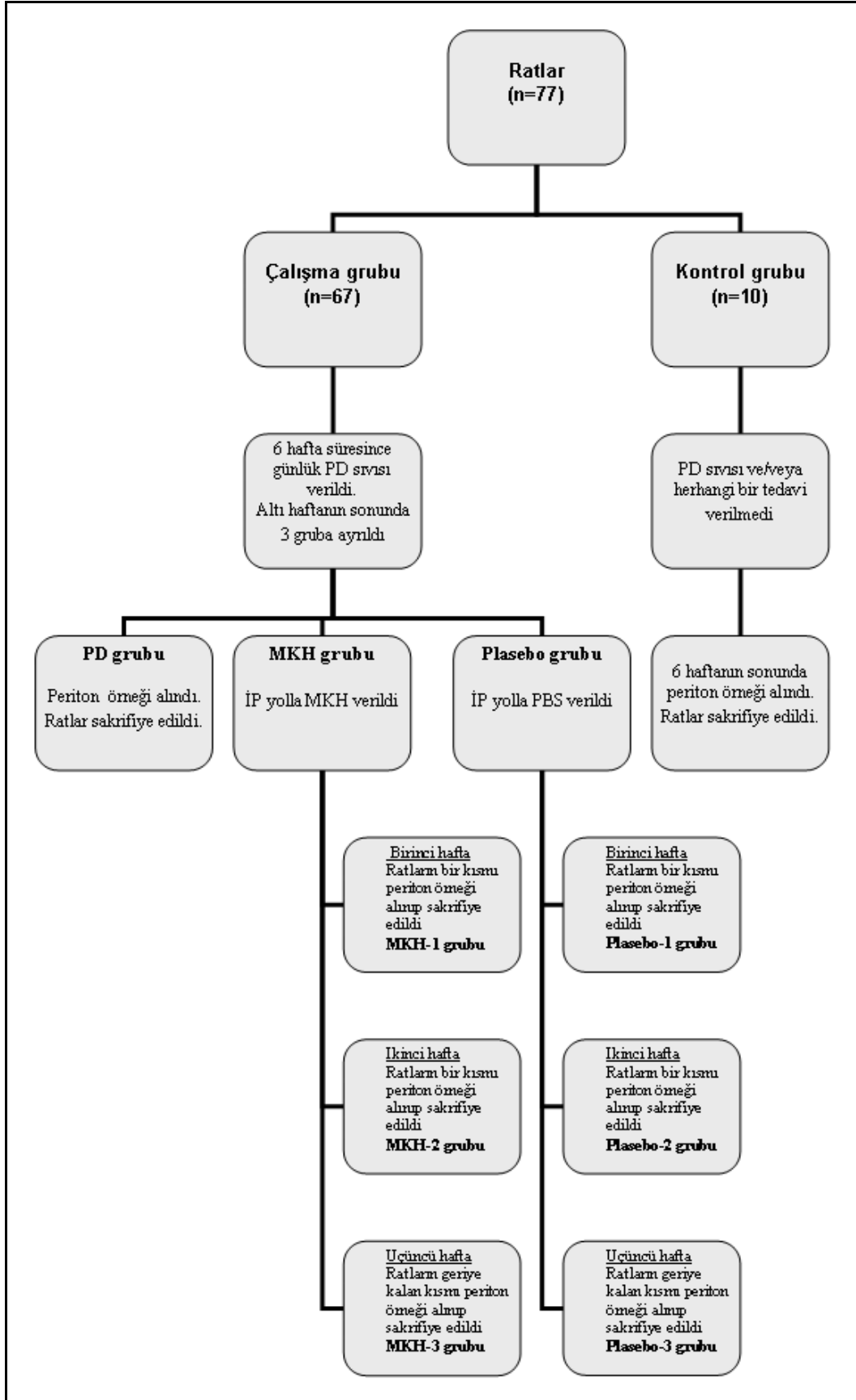
Ratlar çalışmanın başlangıcında rastgele iki gruba ayrıldı: kontrol grubu (n=10) ve çalışma grubu (n= 67). Çalışma grubuna altı hafta süresince intraperitoneal yolla periton diyaliz sıvısı verildi. Altı haftanın sonunda çalışma grubu 3 gruba ayrıldı: Periton diyaliz (PD) grubu, mezenkimal kök hücre (MKH) 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 (Şekil 6). Tüm ratların periton dokusunda TNF- α , IL-6, TGF- β 1 ve VEGF düzeyleri ölçüldü, histopatolojik değerlendirme yapıldı.

DİYALİZ SIVISININ VERİLMESİ

Ticari diyaliz sıvısı (%3,86 glukoz konsantrasyonlu) günde 1 kez (08⁰⁰-10³⁰ arası) 6 hafta süre ile intraperitoneal enjeksiyon yoluyla verildi. Diyaliz sıvısının volümü 3 gün içinde 10 ml'den 20 ml'ye çıkıldı. Her diyalizat içine peritoniti önlemek için profilaktik olarak seftazidim 125 mg/L dozunda katıldı. İnjeksiyon için 22 gauge iğne ucu ile plastik tek kullanımlık enjektörler kullanıldı. İnjeksiyon karın duvarı alt kadranının bir gün sağ, diğer gün sol yanından 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



Şekil 6. Deney prosedürü

saklandı. Çözdürme ve pasajlama işlemlerinin ardından MKH ratlara İP yolla verildi.

Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözdürülmesi ve Pasajlanması

Daha önceden dondurulan hücrelerin kültür ortamına alınması için hücrelerin eritilmesi işlemine *çözme* denir. Ekstrasellüler ortam intrasellüler ortamdan önce çözünür ve ani olarak serbest sıvı salınır. Ekstrasellüler sıvı hipotonik karakter kazanır. Sonuçta, hipotonik hücre şişerek patlar. Bu olumsuzlukların önüne geçebilmek için çözdürme işlemi olabildiğince hızlı yapılır.

Çözdürme işleminde ilk dikkat edilecek husus tüm materyallerin önceden hazırlanması ve hızlı kullanıma hazır hale getirilmiş olmasıdır. Bu nedenle işleme başlamadan önce;

- ✓ Medium önceden hazırlandı.
 - ✓ Su banyosu 37 °C ye ısınmış hale getirildi.
- Bütün bu hazırlıklardan sonra çözdürme 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 nazikçe açıldı ve hücrelere çok nazik 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 yavaşça kondu.
- ✓ 800 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- ✓ Süpernatant nazik 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 nazikçe 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 kaldırıldı, 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 lamına 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.

$$\text{Hücre sayısı} = \text{Sayılan hücre} \times \text{Dilüsyon oranı (2 ml)} \times 10.000$$
- ✓ 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 1-1.5 milyon Ü/kg olacak şekilde MKH intraperitoneal 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 hattın insizyon ile açıldı. Proinflatuar sitokinler ve büyüme faktörlerinin ölçümü için pariyetal periton örneği batın sağ üst

kadranından kas dokusundan sıyrılarak alındı. Histopatolojik inceleme için pariyetal periton örneği ise batın sol üst kadranından kas dokusu ile birlikte alındı. Ratlar kurbanı edıldı.

HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Karın duvarının sol üst kadranından alınan periton dokusunun bir kısmı kaset bloklaya kalıbına konularak doku dondurma vasatı içine gömüldü ve hemen –20 °C soğutucuya kaldırıldı. Donduktan sonra demir kasetlerden çıkarılıp alüminyum folyolara sarılan dokulardan frozen mikrotomunda 7 µm kalınlığında kesitler alınarak lızınli lamlara aktarıldı. Dokunun üzerine su bazlı kapama balzamu damlatılıp lamla kapatıldı. İmmunfloresan mikroskopunda değerdendirildi. Periton dokusunun diğerd kısmı formol ile fikse edildi. Rutin takip işlemlerinden geçirden periton dokularından parafin bloklar elde edildi. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındı. Doku kesitleri hemotoksilen-eozin, masson trikrom ve immunohistokimyasal boyama yöntemleri ile boyandı.

İmmunohistokimyasal boyama

Kollajen III ve kollajen IV'ü değerdendirmek için immunohistokimyasal boyama yapıldı. Parafine gömülü dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Lama alınmış dokular 60 °C etüvde 1 saat bekletildi. Etüvden çıkarılan dokular için 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 UltraAb 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.

Işık mikroskobu ile değerlendirme

Mezotel hücrelerinin reaktivitesi, bazal laminadaki değişiklikler, inflamasyonun varlığı, submezotelyal ödem, fibroblastik aktivite ve fibrozis, vaskularizasyon ve peritoneal kalınlık değerlendirildi. İnflamasyon, fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon, mononükleer hücreler, fibroblastlar ve kapillerler 40’lık büyütmede sayılarak semikantitatif olarak skorlandı (skor 0-3).

- ✓ Fibrozis ödem ve kollajen yoğunluğunun değerlendirmesi ile skorlandı.
- ✓ 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 matür olmayan kollajen) orta (matür olmayan 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 14 alanın ortalaması alınarak hesaplandı, μm olarak ifade edildi.

İmmünfloresan mikroskobu ile değerlendirme

Verilen GFP ile işaretli MKH'nın peritona yapışıp yapışmadığını görmek 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 mikroskop altındaki fotoğrafları çekildi.

PERİTON DOKUSUNDAN TNF- α , IL-6, TGF- β 1 VE VEGF 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 Rat TNF- α (Invitrogen, UK), Rat IL-6 Platinum ELISA (eBioscience, Austria), Multispecies TGF- β 1 (Biosource, Belgium) ve Rat VEGF ELISA (RayBio®, USA) ticari kitleri ve SynergyHT (Biotek) multidetection microplatereader ELISA cihazı kullanılarak ve ticari kitlerin kullanım kılavuzlarındaki bilgilere uygun olarak çalışıldı. VEGF ve TNF- α düzeyleri pg/g yaş doku, IL-6 ve TGF- β 1 ise pg/mg 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 Dunn 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 çalışma grubundan 2 rat, çalışma gruplarından ise 7 rat telef oldu.

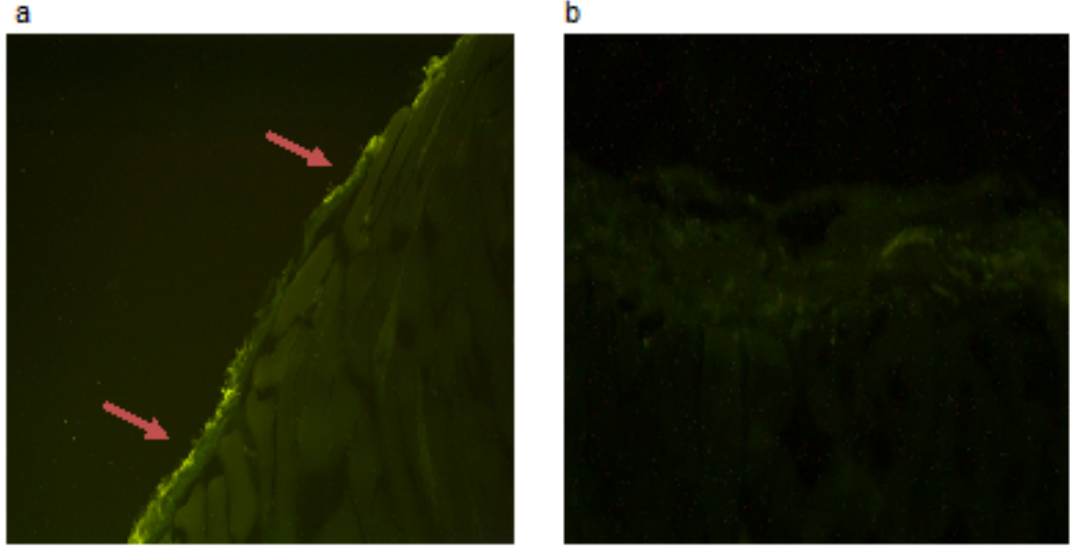
Ratların gruplara göre son dağılımı tabloda gösterilmiştir (Tablo 2).

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 7).

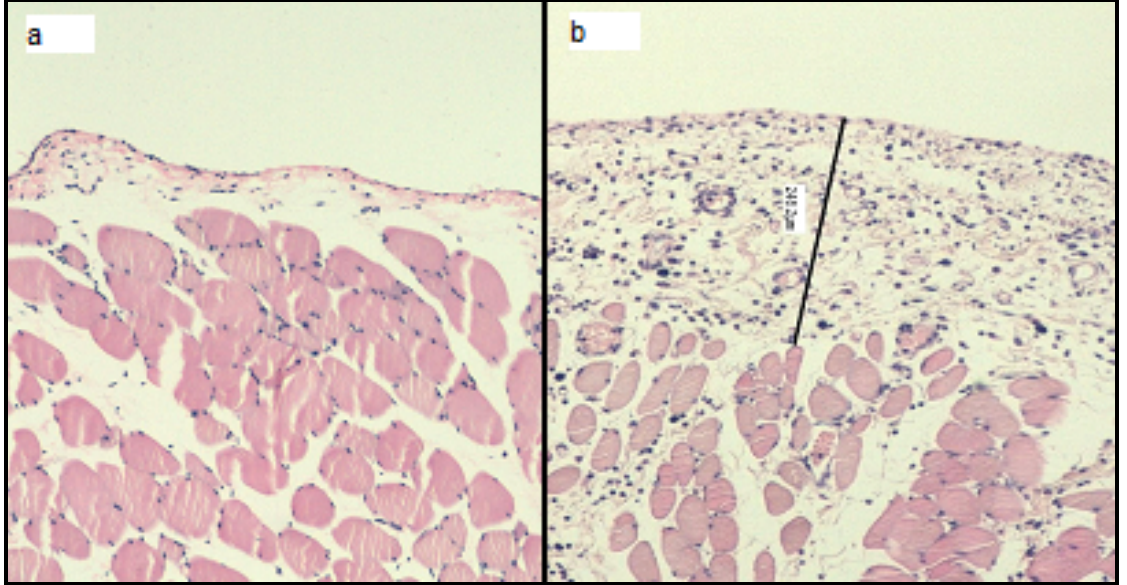


Şekil 7. İmmünfloresan mikroskopta GFP parlamasının değerlendirilmesi. İmmünfloresan mikroskopta MKH verilmiş grupta mezotel hattı boyunca floresan veren MKH'ler görülürken (a), plasebo olarak PBS verilmiş grupta mezotel hattı boyunca herhangi bir floresan parlama görülmedi (b).

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. ($P=0,001$, Şekil 8, Tablo 3).
- 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 ($P<0.05$, Şekil 8, Tablo 3).



Şekil 8. Kontrol (a) ve PD gruplarının (b) histopatolojik görünüşleri. PD grubunda submezotelyal kalınlıkta kontrol grubuna göre artış ve submezotelyal alanda artmış inflamatuvar hücreler görülmektedir (x10, H&E).

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 ($P<0.05$, Tablo 3).
- 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 (Tablo 3).
- 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 ($P>0.05$) (Tablo 3).
- Hücre morfolojisi, bazal lamina kalınlığı, fibrozis, fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon açısından değerlendirildiğinde MKH-1 ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($P>0.05$, Tablo 3).

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 ($P<0.05$, Tablo 4).
- 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 ($P>0.05$, Tablo 4).
- 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 ($P>0.05$, Tablo 4).

Tablo 3: Grupların 1. hafta histopatolojik değerlendirmeleri

Değişken	Çalışma grupları			
	Kontrol n=8	PD n=8	MKH-1 n=8	Plasebo-1 n=8
Submezotelyal kalınlık (µm)	66.3 ± 24.8	132.9 ± 40.1 ^a	84.9 ± 15.1 ^b	153.7 ± 85.3 ^{a,c}
Hücre morfolojisi				
Normal	8	5	7	6
Reaktif	0	3	1	2
Bazal lamina				
Normal	8	5	7	7
Kalın	0	3	1	1
Fibrozis				
Var	1	2	2	1
Yok	7	6	6	7
Fibroblastik aktivite				
Var	2	3	2	4
Yok	6	5	6	4
İnflamasyon				
Var	0	4 ^a	0 ^b	2
Yok	8	4	8	6
Neovaskülarizasyon				
Var	1	5 ^a	4	4
Yok	7	3	4	4

^a P<0.05, kontrol grubu ile kıyaslandığında^b P<0.05, PD grubu ile kıyaslandığında^c P<0.05, MKH-1 grubu ile kıyaslandığında

Tablo 4: Grupların 2.hafta histopatolojik değerlendirmeleri

Değişken	alışma grupları			
	Kontrol n=8	PD n=8	MKH-2 n=9	Plasebo-2 n=9
Submezotelyal Kalınlık (μm)	66.3 ± 24.8	132.9 ± 40.1 ^a	69.7 ± 9.3 ^b	140.7 ± 30.1 ^{a,c}
Hücre morfolojisi				
Normal	8	5	6	7
Reaktif	0	3	3	2
Bazal lamina				
Normal	8	5	7	7
Kalın	0	3	2	2
Fibrozis				
Var	1	2	2	4
Yok	7	6	7	5
Fibroblastik aktivite				
Var	2	3	2	2
Yok	6	5	7	7
İnflamasyon				
Var	0	4 ^a	3	3
Yok	8	4	6	6
Neovaskülarizasyon				
Var	1	5 ^a	4	3
Yok	7	3	5	6

^a P<0.05, Kontrol grubu ile kıyaslandığında^b P<0.05, PD grubu ile kıyaslandığında^c P<0.05, MKH-2 grubu ile kıyaslandığında

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 ($P<0.05$, Tablo 5).
- 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 ($P>0.05$, Tablo 5).
- 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 ($P>0.05$, Tablo 5). 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 ($P>0.05$, Tablo 5).

Tablo 5: Grupların 3. hafta histopatolojik değerlendirmeleri

Değişken	Çalışma grupları			
	Kontrol n=8	PD n=8	MKH-3 n=9	Plasebo-3 n=9
Submezotelyal Kalınlık (µm)	66.3 ± 24.8	132.9 ± 40.1 ^a	99.0 ± 57.1 ^b	308.3 ± 114.8 ^{a,c}
Hücre morfolojisi				
Normal	8	5	8	6
Reaktif	0	3	1	3
Bazal lamina				
Normal	8	5	7	5
Kalın	0	3	2	4
Fibrozis				
Var	1	2	2	6 ^{a,c}
Yok	7	6	7	3
Fibroblastik aktivite				
Var	2	3	5	6
Yok	6	5	4	3
İnflamasyon				
Var	0	4 ^a	3	3
Yok	8	4	6	6
Neovaskülarizasyon				
Var	1	5 ^a	3	6 ^a
Yok	7	3	6	3

^a P<0.05, Kontrol grubu ile kıyaslandığında^b P<0.05, PD grubu ile kıyaslandığında^c P<0.05, MKH-3 grubu ile kıyaslandığında

Plasebo ve MKH gruplarının 1.hafta, 2.hafta ve 3. haftalarında histopatolojik değişikliklerin değerlendirilmesi

MKH grubuna mezenkimal kök hücre, plasebo grubuna PBS verildikten sonra 1.hafta, 2.hafta ve 3. hafta değerlendirmelerinde her grubun kendi aralarındaki farklılıklara bakıldığında;

- MKH-1, MKH-2 ve MKH-3 gruplarının submezotelyal kalınlıkları ve diğer histopatolojik değerlendirmeler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($P>0,05$, Tablo 6)
- Plasebo-3 grubunun submezotelyal kalınlığı, kontrol, PD, plasebo-1 ve plasebo-2 grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştı ($P<0.05$) (Tablo 7).
- Plasebo-3 grubunda, plasebo-1'e kıyasla fibroziste artış bulundu ($P<0,05$, Tablo 7). Plasebo grupları arasında diğer histopatolojik özellikler yönünden farklılık bulunmadı.

Tablo 6: MKH gruplarının histopatolojik değeriendirilmesi

Değişken	Çalışma grupları				
	Kontrol n=8	PD n=8	MKH-1 n=8	MKH-2 n=9	MKH-3 n=9
Submezotelyal kalınlık (µm)	66.3 ± 24.8	132.9 ± 40.1 ^a	84.9 ± 15.1 ^b	69.7 ± 9.3 ^b	99.0 ± 57.1 ^b
Hücre morfolojisi					
Normal	8	5	7	6	8
Reaktif	0	3	1	3	1
Bazal lamina					
Normal	8	5	7	7	7
Kalın	0	3	1	2	2
Fibrozis					
Var	1	2	2	2	2
Yok	7	6	6	7	7
Fibroblastik aktivite					
Var	2	3	2	2	5
Yok	6	5	6	7	4
İnflamasyon					
Var	0	4 ^a	0 ^b	3	3
Yok	8	4	8	6	6
Neovaskülarizasyon					
Var	1	5 ^a	4	4	3
Yok	7	3	4	5	6

^a P<0.05, Kontrol grubu ile kıyaslandığında

^b P<0.05, PD grubu ile kıyaslandığında

Tablo 7: Plasebo gruplarının histopatolojik değerlendirmeleri

Değişken	Çalışma grupları				
	Kontrol n=8	PD n=8	Plasebo-1 n=8	Plasebo-2 n=9	Plasebo-3 n=9
Submezotelyal kalınlık (µm)	66.3 ± 24.8	132.9 ± 40.1 ^{a,b}	153.7 ± 85.3 ^a	140.7 ± 30.1 ^a	308.3 ± 114.8 ^{a,b}
Hücre morfolojisi					
Normal	8	5	6	7	6
Reaktif	0	3	2	2	3
Bazal lamina					
Normal	8	5	7	7	5
Kalın	0	3	1	2	4
Fibrozis					
Var	1	2	1	4	6 ^{a,b}
Yok	7	6	7	5	3
Fibroblastik aktivite					
Var	2	3	4	2	6
Yok	6	5	4	7	3
İnflamasyon					
Var	0	4 ^a	2	3	3
Yok	8	4	6	6	6
Neovaskülarizasyon					
Var	1	5 ^a	4	3	6 ^a
Yok	7	3	4	6	3

^a P<0.05, kontrol ile kıyaslandığında

^b P<0.05, Plasebo-1 grubu ile kıyaslandığında

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 TNF- α , IL-6, VEGF VE TGF- β DÜZEYLERİ AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Birinci hafta TNF- α , IL-6, VEGF VE TGF- β sonuçlarının karşılaştırılması

Birinci haftada TGF- β düzeyi MKH grubunun yarısında ölçülemediğinden dolayı gruplar TGF- β açısından karşılaştırılmadı. Gruplar arasında VEGF ve IL-6 açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($P>0.05$). Plasebo grubunda TNF- α düzeyinin kontrol ve PD grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi ($P<0.05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Grupların VEGF, TNF- α ve IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması (Birinci hafta)

Parametreler	Gruplar			
	K (n=8)	PD (n=8)	Plasebo-1 (n=8)	MKH-1 (n=8)
VEGF (pg/g yaş doku)	257.9 (0.1-433.8)	304.1 (0.0-596.3)	280.4 (135.1-675.2)	286.5 (229.2-380.6)
TNF- α (pg/g yaş doku)	674 (497-1147)	759 (548-1550)	996 ^{*, a} (773-1359)	854 (624-1187)
IL-6 (pg/mg yaş doku)	10.2 $\pm$ 1.3	10.4 $\pm$ 2	12.2 $\pm$ 3.4	11.6 $\pm$ 6.1
* $P<0.05$; kontrol grubu ile kıyaslandığında ^a $P<0.05$ PD grubu ile kıyaslandığında, Veriler ortanca (minimum-maksimum) veya ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verildi.				

İkinci hafta TNF- α , IL-6, VEGF VE TGF- β sonuçlarının karşılaştırılması

Gruplar arasında VEGF açısından anlamlı fark bulunmadı ($P>0.05$, Tablo 9). İnterlökin-6 ve TNF- α düzeyleri MKH-2 grubunda kontrol, PD ve plasebo-2 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$, Tablo 9). Plasebo-2 grubunda TGF- β düzeyi kontrol ve MKH-2 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi ($P<0.05$, Tablo 9).

Tablo 9. Grupların VEGF, TNF- α , IL-6 ve TGF- β düzeylerinin karşılaştırılması (İkinci hafta)

Parametreler	Gruplar			
	K	PD	Plasebo-2	MKH-2
VEGF (pg/g yaş doku)	260 $\pm$ 130	279 $\pm$ 184	261 $\pm$ 95	355 $\pm$ 83
TNF- α (pg/g yaş doku)	674 (497-1147)	759 (548-1550)	782 (517-1203)	1109*, a, b (430-2138)
IL-6 (pg/mg yaş doku)	10.6 (7.5-11.5)	11 (7.4-12.5)	10.8 (6.6-18.4)	16.1*, a, b (10.2-23.4)
TGF- β (pg/mg yaş doku)	2.58 (0.86-9.56)	6.13 (0.60-14.26)	8.82* (5.62-27.76)	1.69 ^b (0.90-17.39)
* $P<0.05$; kontrol grubu ile kıyaslandığında a $P<0.05$ PD grubu ile kıyaslandığında, b $P<0.05$ Plasebo-2 grubu ile kıyaslandığında Veriler ortanca (minimum-maksimum) veya ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verildi.				

Üçüncü hafta TNF- α , IL-6, VEGF VE TGF- β sonuçlarının karşılaştırılması

Gruplar VEGF açısından karşılaştırıldığında plasebo-3 ve MKH-3 gruplarının değerlerinin PD grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($P<0.05$, Tablo 10). Hem IL-6 hem de TNF- α değerlerinin plasebo-3 ve MKH-3 gruplarında kontrol ve PD gruplarına göre istatistiksel olarak düşüktü ($P<0.05$, Tablo 10).

Gruplar arasında TGF- β düzeyi açısından istatistiksel olarak fark tespit edilmedi ($P>0.05$, Tablo 10).

Tablo 10. Grupların VEGF, TNF- α , IL-6 ve TGF- β düzeylerinin karşılaştırılması (Üçüncü hafta)

Parametreler	Gruplar			
	K	PD	Plasebo-3	MKH-3
VEGF (pg/g yaş doku)	260 $\pm$ 130	279 $\pm$ 184	111 $\pm$ 88 ^a	116 $\pm$ 41 ^a
TNF- α (pg/g yaş doku)	674 (497-1147)	759 (548-1550)	308*, ^a (205-539)	263*, ^a (185-370)
IL-6 (pg/mg yaş doku)	10.2 $\pm$ 1.3	10.4 $\pm$ 2	6.9 $\pm$ 1.6*, ^a	6.4 $\pm$ 1.6*, ^a
TGF- β (pg/mg yaş doku)	2.58 (0.86-9.56)	6.13 (0.60-14.26)	8.15 (1.13-99.65)	6.25 (2.44-16.02)
[*] P<0.05; kontrol grubu ile kıyaslandığında ^a P<0.05 PD grubu ile kıyaslandığında, ^b P<0.05 Plasebo-3 grubu ile kıyaslandığında Veriler ortanca (minimum-maksimum) veya ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verildi.				

Plasebo grubunun birinci, ikinci ve üçüncü hafta TNF- α , IL-6, VEGF VE TGF- β sonuçlarının karşılaştırılması

Vasküler endotelyal büyüme faktörü düzeyi plasebo-3 grubunda plasebo-1 ve plasebo-2 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düşük tespit edildi ($P<0.05$, Tablo 11). TNF- α düzeyi plasebo-2 grubunda plasebo-1 grubundan, plasebo-3 grubunda ise plasebo-2 ve plasebo-1 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ($P<0.05$, Tablo 11). Plasebo-3 grubunun IL-6 düzeyi plasebo-2 ve plasebo-1 gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü ($P<0.05$, Tablo 11). Gruplar arasında TGF- β düzeyi açısından istatistiksel olarak fark tespit edilmedi ($P>0.05$, Tablo 11).

Tablo 11. Plasebo gruplarının VEGF, IL-6, TNF- α ve TGF- β düzeylerinin karşılaştırılması

Parametreler	Gruplar		
	Plasebo-1	Plasebo-2	Plasebo-3
VEGF (pg/g yaş doku)	280 (135-675)	270 (90-368)	98*, ^a (8.3-303)
TNF- α (pg/g yaş doku)	1044 $\pm$ 219	805 $\pm$ 238*	341 $\pm$ 103*, ^a
IL-6 (pg/mg yaş doku)	11.8 (7-17)	10.8 (6.6-18.4)	6.9*, ^a (4.3-9.4)
TGF- β (pg/mg yaş doku)	7.02 (0.17-14.57)	8.82 (5.62-27.76)	8.15 (1.13-99.65)
* P<0.05 Plasebo-1 ile kıyaslandığında ^a P<0.05 Plasebo-2 ile kıyaslandığında Veriler ortanca (minimum-maksimum) veya ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verildi.			

Mezenkimal kök hücre grubunun birinci, ikinci ve üçüncü hafta TNF- α , IL-6, VEGF VE TGF- β sonuçlarının karşılaştırılması

İnterlökin-6, TNF- α ve VEGF düzeyi MKH-3 grubunda MKH-2 ve MKH-1 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düşük tespit edilirken, IL-6 düzeyi MKH-2 grubunda MKH-1 grubundan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (P<0.05, Tablo 12). Transforming büyüme faktörü-beta1 düzeyi MKH-3 grubunda MKH-2 grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti (P<0.05, Tablo 12).

Tablo 12. MKH gruplarının VEGF, IL-6, TNF- α ve TGF- β düzeylerinin karşılaştırılması

Parametreler	Gruplar		
	MKH-1	MKH-2	MKH-3
VEGF (pg/g yaş doku)	289 $\pm$ 61	355 $\pm$ 83	116 $\pm$ 41 ^{*, a}
TNF- α (pg/g yaş doku)	884 $\pm$ 195	1200 $\pm$ 484	271 $\pm$ 72 ^{*, a}
IL-6 (pg/mg yaş doku)	11.6 $\pm$ 6.1	16.2 $\pm$ 3.8*	6.4 $\pm$ 1.6 ^{*, a}
TGF- β (pg/mg yaş doku)	-	1.69 (0.90-17.39)	6.25 ^a (2.44-16.02)
[*] P<0.05 MKH-1 ile kıyaslandığında ^a P<0.05 MKH-2 ile kıyaslandığında Veriler ortanca (minimum-maksimum) veya ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verildi.			

TARTIŞMA

Uzun süreli PD sırasında üremi, tekrarlayan peritonitler, biyoyumsuz 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).

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). Bunun sonucunda yukarıdaki paragrafta bahsedilen değişiklikler oluşmaktadır. 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 (61)'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 (62) 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.

Kronik periton diyalizinde biyoyumsuz PD sıvıları ve çeşitli faktörler inflamasyona sebep olmakta, mezotel hücreleri ve makrofajlar aktive olmaktadır. Büyüme faktörleri ve inflamatuvar sitokinlerin yapımı başlamaktadır. Bu faktörler fibroblastları, endotel hücrelerini ve mast hücrelerini aktive etmektedir. Anjiogenik ve fibrotik sitokinler, büyüme faktörleri salgılanmaktadır (19, 27). Maksic ve ark (63) PD hastalarında sistemik ve intraperitoneal proinflamatuvar sitokin profilini karşılaştırdıkları çalışmalarında kronik periton diyaliz hastalarının serum TNF- α seviyelerinin evre IV-V KBY'li hastalarına kıyasla yüksek olduğunu, bir yıldan uzun süredir PD yapılanlarda PD sıvısındaki IL-6 düzeyinin bir yıldan az süredir PD yapılanlara kıyasla yüksek olduğunu bulmuşlardır. Yazarlar kronik inflamasyonu arttırmada PD süresinin önemli olduğuna vurgu yapmışlardır (63). Çalışmamızda kronik periton diyalizi ile inflamatuvar hücrelerde belirgin artış görüldü, proinflamatuvar sitokinler ve VEGF, TGF- β artma eğilimindeydi.

Mezenkimal kök hücreler ilk kez periton zarında Lucas ve ark (64) tarafından cerrahi sonrası gelişen yapışıkları önleyici etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla kullanılmıştır. Cerrahiden hemen sonra verilen İP MKH'nin yapışıklığı anlamlı

olarak azalttığı, cerrahiden 4-6 saat sonra verilen MKH'in ise yapışıklığı anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir (64).

Kök hücre tedavisinde dokunun yenilenmesinin eksojen verilen bu kök hücreler etkisiyle olup olmadığını saptayabilmek için çeşitli işaretleme yöntemleri kullanılmaktadır (56-58). Çok yakın zamanda yapılan bir rat çalışmasında intraplevral yolla verilen MKH'in plevraya yapıştığı gösterilmiştir ve plevral hastalıklarda MKH'nin yeni bir tedavi yöntemi olabileceği belirtilmiştir (65). Çalışmamızda işaretleme GFP ile yapıldı ve immunfloresan mikroskobunda yapılan incelemede mezenkimal kök hücrelerin periton zarı tarafından tutulduğu görüldü ve çalışma süresince bu durumun devam ettiği gözlemlendi. İmmunfloresan mikroskopta GFP boyamasının olması, MKH grubunda görülen değişikliklerin verilen MKH'nin etkisi ile olduğunu destekleyen bir bulguydu. Plevra peritonla aynı embriyonik kökendir ve yapıları benzerdir.

İnflamasyon kronik periton diyalizinde periton zarının hasarında önemli rol oynamaktadır. Birçok inflamasyon modelinde MKH kullanımının yararlı etkileri gözlenmiştir. Maggini ve ark (66) peritondan elde ettikleri makrofajları kültür ortamında lipopolisakkarid ile aktive ettiklerinde proinflamatuvar sitokinlerde artış olduğunu, kültüre MKH eklediklerinde proinflamatuvar sitokinlerde anlamlı baskılanma olduğunu gözlemlemişlerdir. Akut miyokard infarktüsü (AMİ) modelinde MKH naklinin inflamasyon ve kardiyak fonksiyon üzerine etkisinin değerlendirildiği deneysel bir çalışmada AMİ oluşturulmasının hemen ardından MKH intrakardiyak olarak verilmiştir. Dört hafta sonra yapılan değerlendirmede proinflamatuvar sitokinlerde (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) Mİ grubuna göre düşüş gözlenmiş, fakat kontrol grubuna göre yüksek veya benzer bulunmuş ve infarkt alanında da azalma görülmüştür (12). Bleomisin ile akut akciğer hasarı modelinde sistemik yolla hemen verilen MKH'nin inflamasyon, kollagen birikimi ve matriks metalloproteinaz aktivasyonunda anlamlı azalmaya yol açtığı, bleomisinin sebep olduğu akciğer hasarını önlediği görülürken bleomisin 1 hafta sonra MKH verildiğinde bu olumlu etkiler görülmemiştir (67). Çalışmamızda MKH verilen ratlarda morfolojik değişiklikler kontrollerden anlamlı farklı olmadığı için MKH'nin periton üzerine düzeltici/ koruyucu etkisi olduğu düşünülebilir. İntraperitoneal MKH tedavisinin ikinci haftasında proinflamatuvar sitokinlerde belirgin artış görülürken,

üçüncü haftada proinflatuar sitokinlerde baskılanma olduğu gözlemlendi. Erken dönemde inflamatuvar sitokinlerdeki artış MKH naklini takiben gelişen etkileşimlere bağlı olabilir. Mezenkimal kök hücrelerin nakli sonrası erken dönemde inflamatuvar sitokinlerin yüksek tespit edilirken, geç dönemde düşük tespit edilmesi MKH'in inflamasyonu belirli bir süre sonra baskıladığı düşüncesine yol açmaktadır. Çalışmamıza benzer şekilde akut serebral inme modelinde iskemiye takip eden 2. haftada TNF- α ve IL-6 düzeyleri İV MKH grubunda kontrole göre yüksek bulunmuştur, serebral hasar üzerine ise MKH'nin düzeltici etkileri gözlenmiştir (68). Semedo ve ark (69) da akut böbrek hasarı rat modelinde iskemiden altı saat sonra ratlara İV yolla MKH vermişler ve iki farklı zamanda yaptıkları değerlendirmede sitokin profilinde değişikliklik olduğunu, reperfüzyonun 24. saatinde proinflatuar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6, TNF) ekspresyonu düşüken, 48. saatte ise IL-6 ekspresyonunda artış olduğunu gözlemlemişlerdir, IL-6 ekspresyonundaki artışın kısmen MKH'nin kendi IL-6 ekspresyonundan kaynaklanabileceği yorumunda bulunmuşlardır.

Çalışmamızda plasebo grubunu peritonun dinlendirilmesi olarak düşünebiliriz. Peritonun dinlendirilmesi ile inflamasyon üzerine olumlu etkiler gözlenirken 2. haftada fibroze yol açan TGF- β yüksekti ve özellikle 3. haftada submezotelyal kalınlıkta ve fibroziste artış belgindi. Dinlenme sonrası kötüleşme görülmesi etken ortadan kalksa bile başlamış olan hasarın bir süre daha devam ediyor olmasıyla ilişkili olabilir. Bu kötüleşmenin görülmesinde TGF- β 'nın artışının sorumlu olduğunu düşündük. Bakteriyel peritonit sırasında PD sıvısında hücre sayısında 400 kat artış olduğu ve bu artışın klinik düzelmeye rağmen 3 haftaya kadar devam ettiği, proinflatuvar sitokinlerin ve sklerozan büyüme faktörlerindeki artışın ise en az 6 hafta devam ettiği gösterilmiştir (28). Zareie ve ark (61) ratlarda yaptıkları çalışmada peritonu dinlendirmenin etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmalarında 5 hafta süresince günlük %3.86'lık ticari glukoz sıvısı verdikten sonra PD sıvısı verilmesi kesilmiş, ratlar PD sıvısına ara verdikten 12 hafta sonra değerlendirilmiştir. Peritonu dinlendirmenin olumlu etkilerini gözlemlemişlerdir. Submezotelyal kalınlık ve hücresel değişiklikler ve damar sayısında kontrole göre farklı olmakla birlikte düzelmeye yönünde bulgular görülmüştür (61). Kim YL ve ark (70)'nin peritonu dinlendirmenin etkisini değerlendirdikleri çalışmada 3 hafta süresince günde 2 kez PD sıvısı verilmiş, devamında periton 4 hafta dinlendirilmiştir. Dinlendirme sonrası

submezotelyal kalınlığın kontrole göre fazla olmakla birlikte azaldığı görülmüştür (70). Çalışmamızda dinlendirme grubumuzda kalınlığın PD grubuna göre artmış olması PD sıvısı verme süresinin uzun, dinlendirme süresinin ise daha kısa olmasından kaynaklanıyor olabilir. Daha uzun dinlendirme süresi sonrası bakılsaydı belki de submezotelyal kalınlıkta azalma tespit edilecekti.

Ülkemizde son dönem böbrek yetmezlikli hastaların yaklaşık olarak bir yılda sadece yaklaşık % 3'ne renal transplantasyon yapılmaktadır (22). Periton diyalizi ve hemodiyalizden renal transplantasyona geçiş süresinin ülkemizde uzun olduğu ve yenidoğan döneminden itibaren diyalize başlanan hastalar olduğu düşünüldüğünde periton membran bütünlüğünün korunması oldukça önem kazanmaktadır.

Özetle alışmamızda kronik periton diyaliz modelinde MKH naklinin proinflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve histolojik değişiklikler üzerine etkisi değerlendirildi. 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. Kronik PD'nde MKH'nin tedavi edici etkisinde mekanizmalardan biri inflamatuvar cevabın düzenlenmesi olabilir.

Mezenkimal kök hücre nakli periton membranının korunmasında ve mevcut hasarın geriye döndürülmesinde mit verici bir tedavi yöntemi olabilir. Fakat mezenkimal kök hücreler periton diyalizine devam edilirken uygulandığında yine düzeltici etki gösterebilecek mi, doz arttırmak mı gerekecek, tekrarlayan dozlara ihtiyaç olursa ne kadar süre aralıklarla vermek gerekecek, periton membranının fonksiyonu üzerine de MKH tedavisinin düzeltici etkisinin olup olmadığı cevaplanmayı bekleyen sorulardır. Sonuç olarak mezenkimal kök hücre naklinin periton membranının korunması ve hasarının düzeltilmesindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bulgularımız bu alanda öncül sonuçlar olup, MKH naklinin umut verici olduğuna dair ipuçları içermektedir.

SONUÇLAR

- 1) Periton diyaliz modeliyle periton diyaliz sıvısının periton zarı morfolojisi üzerinde olumsuz etkileri olduğu ve bazı morfolojik değişiklikler olduğu gösterilmiştir.
- 2) Periton diyalizinin periton zarı üzerinde inflamatuvar olayları tetikleyici etkisi gösterilmiştir.
- 3) İntraperitoneal olarak verilen mezenkimal kök hücreleri periton zarı tarafından tutulmuştur. Periton zarında GFP boyanmasının olması bunu kanıtlamaktadır.
- 4) MKH nakli yapılan ratlarda morfolojik bulgular kontrol grubuyla benzer olduğundan MKH'nın koruyucu etkisinin olduğu düşünülebilir.
- 5) MKH nakli yapılan ratlarda erken dönemde inflamatuvar sitokinler, kontrol, MKH verilmeyen ve PD yapılan ratlara göre, yüksek olarak tespit edilirken, geç dönemde MKH nakli yapılan ratlarda inflamatuvar sitokin düzeyleri düşük tespit edilmiştir. Bu durum MKH'nın inflamasyonu belirli bir süre sonra baskıladığı düşüncesine yol açmaktadır.
- 6) Plasebo grubunda inflamatuvar sitokinler zamanla azalmaktadır. Ancak TGF- β azalmamaktadır. Plasebo grubunun submezotelyal kalınlığının zamanla azalmaması TGF- β ile ilişkili olabilir.

KAYNAKLAR

1. Kim YI. Update on mechanisms of ultrafiltration failure. *Perit Dial Int* 2009; 29:123-127.
2. Yung S, Chan TM. Mesothelial Cells *Perit Dial Int* 2007; 27:110–115.
3. Hjelle JT, Miller-Hjelle MA, Dobbie JW. The biology of the mesothel 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. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004; 22:487-500.
6. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells du extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Bioch* 1997; 64: 278-294.
7. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992; 13: 81-88.
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of a human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.

9. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; 95: 9-20.
10. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284:1168-1170.
11. Rastegar F, Shenag D, Huang J, et al. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells* 2010; 2:67-80.
12. Guo J, Lin GS, Bao CY, Hu ZM, Hu MY. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation* 2007; 30: 97-104.
13. Lee JW, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Potential application of mesenchymal stem cells in acute lung injury. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 1259-1270.
14. Abrams MB, Dominguez C, Pernold K, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells attenuate chronic inflammation and injury-induced sensitivity to mechanical stimuli in experimental spinal cord injury. *Restor Neurol Neurosci* 2009, 27: 307-321.
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. 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.
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. 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. 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. Bussolati B, Camussi G. Adult stem cells and renal repair. *J Nephrol* 2006; 19:706-709.
53. Strauer BE, Kornowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 2003; 107: 929-934.
54. Frangioni JV, Hajjar RJ. In vivo tracking of stem cells for clinical trials in cardiovascular disease. *Circulation* 2004; 110:3378-3383.
55. Hoshino K, Ly HQ, Frangioni JV, Hajjar RJ. In vivo tracking in cardiac stem cell-based therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 49:414-420.

56. Himmelreich U, Dresselaers T. Cell labeling and tracking for experimental models using magnetic resonance imaging. *Methods* 2009; 48: 112–124.
57. Hoehn M, Wiedermann D, Justicia C, et al. Cell tracking using magnetic resonance imaging. *J Physiol* 2007; 584: 25–30.
58. Arbab AS, Janic B, Haller J, Pawelczyk E, Liu W, Frank JA. In vivo cellular imaging for translational medical research. *Curr Med Imaging Rev* 2009; 5:19–38.
59. Prendergast F, Mann K. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskålea*. *Biochemistry* 1978; 17: 3448–3453.
60. Tsien R . The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 509–544.
61. 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.
62. 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.
63. Maksic D, Vasilijic S, Colic M, Stankovic-Popovic V, Bokonjic D. Systemic and intraperitoneal proinflammatory cytokine profiles in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial* 2009; 25: 50-55.
64. Lucas PA, Warejcka DJ, Young HE, Lee BY. Formation of abdominal adhesions is inhibited by antibodies to transforming growth factor-beta1. *J Surg Res* 1996 ; 65: 135-138.
65. Qin ZH, Qu JM, Xu JF, et al. Intrapleural delivery of mesenchymal stem cells: a novel potential treatment for pleural diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2011; 32: 581-590.
66. Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 2010; 5:e9252.

67. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8407-8411.
68. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Alvarez-Grech J, et al. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience* 2011; 175: 394-405.
69. Semedo P, Palasio CG, Oliveira CD, et al. Early modulation of inflammation by mesenchymal stem cell after acute kidney injury. *Int Immunopharmacol* 2009; 9: 677-682.
70. Kim YL, Kim SH, Kim JH, et al. Effects of peritoneal rest on peritoneal transport and peritoneal membrane thickening in continuous ambulatory peritoneal dialysis rats. *Perit Dial Int* 1999; 19: 384-387.

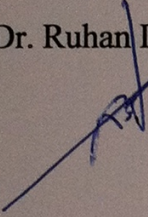
TC.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Uzm. Dr. Sebahat TÜLPAR'a ait "Kronik Peritoneal Diyaliz Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Transplantasyonunun İnflamasyon Üzerine Etkisi" adlı çalışma, jürimiz tarafından **Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'**nda Pediatri Nefroloji Yan Dal Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 10.06.2011

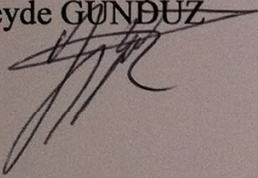
İmza

Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL



İmza

Prof Dr. Zübeyde GÜNDÜZ



İmza

Prof. Dr. M. Hakan POYRAZOĞLU (Danışman)

