T. C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
PEDİATRİK NEFROLOJİ BİLİM DALI

KRONİK PERİTON DİYALİZ MODELİNDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONUNUN ULTRAFİLTRASYON YETERSİZLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Funda BAŞTUĞ

Proje kodu: TSU-10-3057 olan bu araştırma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir

KAYSERİ-2011

T. C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
PEDİATRİK NEFROLOJİ BİLİM DALI

KRONİK PERİTON DİYALİZ MODELİNDE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONUNUN ULTRAFİLTRASYON YETERSİZLİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Funda BAŞTUĞ

Danışman
Prof.Dr. Zübeyde GÜNDÜZ

KAYSERİ-2011

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....i
KISALTMALAR ii
TABLO LİSTESİ iii
ŞEKİL LİSTESİ
.....
……iv
ÖZET
.....
…….v
ABSTRACT.....vi
GİRİŞ VE AMAÇ 1
GENEL BİLGİLER.....4
Periton zarının yapısal ve fizyolojik özellikleri 5
Kronik periton diyalizinin fizyolojisi 8
Kronik periton diyalizinde periton zarında meydana gelen değişiklikler...9
Periton geçirgenliğinin değerlendirilmesi.....13
Periton eşitleme testi.....13
Farklı periton eşitleme testi yöntemleri 14
Mezotel hücreleri ve mezenkimal kök hücre……..15
Periton diyalizi deneysel hayvan modelleri……18
GEREÇ VE YÖNTEM.....21
İSTATİSTİKSEL ANALİZ……30
BULGULAR.....31
TARTIŞMA 51
SONUÇLAR 59

KAYNAKLAR .....……61
TEZ ONAY SAYFASI.....……..69

TEŞEKKÜR

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık ve ardından Çocuk Nefroloji yandal eğitimim süresince Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nin mensubu olmaktan onur duydum.

Eğitimim sürecinde tıbbi bilgileri yanında farklı pek çok konuda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, örnek aldığım başta tez danışmanım Prof. Dr. Zübeyde Gündüz'e, değerli hocalarım Prof. Dr. Ruhan Düşünsel'e, bizlere abi yakınlığında olan ve eğitimimizin her aşamasında değerli desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Hakan Poyrazoğlu'na ve Doç. Dr. İsmail Dursun'a çok teşekkür ederim.

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa Öztürk başta olmak üzere tüm öğretim üyelerinden değerli bilgiler öğrendim. Değerli hocalarımın hepsine ve tezimde katkıları bulunan Doç. Dr. Hülya Akgün'e teşekkür ederim.

Üst ihtisas sürecini paylaştığımız sevgili arkadaşım Uz. Dr. Sebahat Tülpar'a, diğer uzman arkadaşlarıma, tüm asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tezimin farklı aşamalarında emeği geçen patoloji laboratuvarı çalışanlarına, DEKAM'da çalışan güleryüzlü ve yardım sever personele çok teşekkür ediyorum.

Yaşam boyu destekçim, sevgili anne ve babama ve kardeşim Hakan'a çok teşekkür ederim.

Sevgili eşim Osman, en büyük desteğimdi, çok teşekkür ediyorum. Ve sevgili yavrularım Ahmet ve Mehmet, sizlere ayırmam gereken vakti sayısız çocukla paylaştınız, esirgemediğiniz sevginiz için sonsuz teşekkürler.

Saygı ve Sevgilerimle.

Uzm. Dr. Funda Baştuğ

10 Haziran 2011

KISALTMALAR

AGE : İleri glikasyon ürünleri

AQP-1 : Aquaporin-1

Cr : Kreatinin

D/P : Diyalizat/plazma

D0 : 0. dakikadaki diyalizat

DEKAM : Deneysel klinik ve araştırma merkezi

GFP : Gren floresan protein

FGF : Fibroblast growth factor

IFN : İnterferon

IL-1 β : İnterlökin-1 beta

IL-10 : İnterlökin 10

MKH : Mezenkimal kök hücre

Na : Sodyum

P : Plasebo

PBS : Fosfat buffer solüsyon

PD : Periton diyalizi

PET : Periton eşitleme testi

SDBY : Son dönem böbrek yetmezliği

TGF-β1 : Transforming growth factor

TNF-α : Tümör nekroz faktör alfa

UF : Ultrafiltrasyon

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo I : Ratların gruplara göre dağılımı…… **31**

Tablo II : PD ve kontrol gruplarında peritonda histopatolojik değişiklikler…. **32**

Tablo III : Çalışma gruplarının 1.hafta histopatolojik değerlendirmeleri…… **35**

Tablo IV : Çalışma gruplarının 2.hafta histopatolojik değerlendirmeleri…… **38**

Tablo V : Çalışma gruplarının 3.hafta histopatolojik değerlendirmeleri…… **39**

Tablo VI : MKH gruplarının histopatolojik değerlendirmeleri…….. **41**

Tablo VII : Plasebo gruplarının histopatolojik değerlendirmeleri…….. **42**

Tablo VIII : PD ve kontrol gruplarında periton geçirgenliği…….. **43**

Tablo IX : Çalışma gruplarının 1.hafta periton geçirgenliği…… **44**

Tablo X : Çalışma gruplarının 2.hafta periton geçirgenliği…… **46**

Tablo XI : Çalışma gruplarının 3.hafta periton geçirgenliğinin değerlendirilmesi **47**

Tablo XII : MKH gruplarının1.hafta, 2.hafta ve 3.hafta periton geçirgenlikleri **48**

Tablo XIII : Plasebo gruplarının 1.hafta, 2.hafta ve 3.hafta periton geçirgenlikleri **49**

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1 : Normal periton zarı…….. **2**

Şekil 2 : Kronik PD hastasının periton zarı……. **2**

Şekil 3 : Periton diyalizi uygulama yöntemi…… **4**

Şekil 4 : Periton zarının yapısı……. **6**

Şekil 5 : Üç por modeli……. **7**

Şekil 6 : a- Normal periton zarı, b- Kronik PD'den altı yıl sonra periton zarı... **11**

Şekil 7 : UF kaybının oluşum basamakları…….. **12**

Şekil 8 : Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştığı hücre tipleri……... **16**

Şekil 9 : Çalışma grupları ve çalışma metodunun özeti…….. **23**

Şekil 10 : İntra-peritoneal enjeksiyon yapılışı……... **24**

Şekil 11 : Thoma lamının esası…….. **29**

Şekil 12 : Kontrol grubunun periton dokusunun histolojik görünümü…….. **33**

Şekil 13 : PD grubunun periton dokusunun patolojik görünümü……... **33**

Şekil 14 : Mezotel hattı boyunca floresan veren MKH'ler…… **34**

Şekil 15 : P-1 grubunun periton dokusunun patolojik görünümü…….. **36**

Şekil 16 : MKH-1 grubunun periton dokusunun patolojik görünümü..... **36**

Şekil 17 : P-2 grubunun periton dokusunun histopatolojik görünümü…….. **37**

Şekil 18 : MKH-2 grubunun periton dokusunun histopatolojik görünümü... **37**

Şekil 19 : P-3 grubunun periton dokusunun patolojik görünümü…….. **40**

Şekil 20 : MKH-3 grubunun periton dokusunun patolojik görünümü…….. **40**

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kronik periton diyalizi rat modelinde intraperitoneal mezenkimal kök hücre (MKH) naklinin ultrafiltrasyon yetersizliği üzerine iyileştirici etkisinin olup olmadığını araştırmaktır.

Yöntem: Yetmişyedi wistar-albino rat çalışma (n=67) ve kontrol (n=10) grubu olarak 2 gruba ayrıldı. Çalışma grubu'ndaki ratlara 6 hafta boyunca günlük 20 ml %3,86 glukozlu ticari periton diyaliz sıvısı intraperitoneal enjekte edildi. Kontrol grubuna ise 6 hafta boyunca herhangi bir enjeksiyon yapılmadı. Altı haftanın sonunda çalışma grubunda 7, kontrol grubunda ise 2 rat çalışma dışı kaldı ve çalışma grubu; PD grubu (n=8), MKH grubu; intraperitoneal olarak 1,5 milyon ünite/kg dozunda MKH verilen ve P grubu: İP olarak plasebo verilen grup olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Kontrol ve PD gruplarına 6 haftanın sonunda, MKH ve P gruplarına ise MKH ve plasebo verilmesini takiben; 1.hafta, 2. hafta ve 3. hafta PET yapılarak peritoneal geçirgenlikteki değişiklikler değerlendirildi ve periton biyopsisi alındı.

Bulgular: Kontrol grubu ile kıyaslandığında, PD ve P gruplarında (P-1,P-2,P-3) ultrafiltrasyon miktarı azalmışken submezotelyal kalınlığın belirgin olarak artmış olduğu saptandı ($P<0.05$). MKH grubu 1. 2. ve 3. haftalarda ise ultrafiltrasyon miktarları ve submezotelyal kalınlık açısından kontrol grubu ile aralarında fark bulunmazken, PD ve P grupları'na (P1,P2,P3) göre ultrafiltrasyon belirgin artmış, submezotelyal kalınlık ise azalmıştı ($P<0.05$). PD grubunun $D/D0_{glukoz}$ oranları kontrol grubuna göre düşük, D/P_{Cr} (diyalizat/plazmaCr) oranları ise yüksek saptandı. MKH-2 ve MKH-3 gruplarının $D/D0_{glukoz}$ oranı PD, P-2 ve P-3 gruplarına göre yüksek, D/P_{Cr} oranı ise düşük saptandı ($P<0.05$).

Tartışma: PD grubunda yüksek geçirgenlikli bir ultrafiltrasyon yetersizliğinin olduğu belirlendi. Sonuçlarımıza göre, MKH transplantasyonu kronik periton diyaliz rat modelinde yetersiz ultrafiltrasyon üzerine olumlu etkiler göstermiştir. Bu çalışma intraperitoneal olarak verilen MKH naklinin ultrafiltrasyon yetersizliği üzerine etkisini araştıran ilk çalışmadır ve ultrafiltrasyon yetersizliği gelişmiş kronik PD hastalarında MKH transplantasyonun peritonun yenilenmesi için bir umut olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Kronik periton diyalizi, Mezenkimal kök hücre transplantasyonu, Ultrafiltrasyon yetersizliği

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

ABSTRACT

Aim: The purpose of this study was to investigate the healing effect on ultrafiltration failure of intraperitoneal mesenchymal stem cell (MSC) transplantation in chronic peritoneal dialysis (PD) rat model.

Methods: Seventy-seven male wistar-albino rats were divided into two groups: Study group (n=67) received once-daily intraperitoneal injection of 20 ml 3.86% glucose PD solution for 6 weeks and control group (n=10) did not receive any injection. Two rats in C group and 7 rats in study group were excluded from study at the end of 6 weeks. Then, study group divided on three groups; PD group (n=8), MSC group (n=26): MSC's were administered intraperitoneal injection dose of 1.5 million unit/kg and placebo (P) group (n=26): plasebo were injected equal amount with MSC at the end of 6 weeks. PET and peritoneal biopsy were performed to control and PD groups at the end of 6 weeks and to MSC and P groups at first (n=8), second (n=9) and third (n=9) week after receiving MSC and placebo.

Results: When compared with the control group, ultrafiltration significantly decreased and submesothelial thickness increased in PD and P groups (P-1,P-2,P-3) ($P<0.05$) but no difference between control group and MSC groups (MSC-1, MSC-2, MSC-3). Rate of glucose transport was high in PD, P-2 and P-3 groups compared with the control group and D/P_{Cr} (dialysate/plasmaCr) rates of PD, P-2 and P-3 groups was lower than control group ($P<0.05$). However, in MSC-2 and MSC-3 groups $D/D0_{glucose}$ was higher and D/P_{Cr} was lower than PD, P-2 and P-3 groups ($P<0.05$).

Conclusion: PD group had high permeability ultrafiltration failure. Our results showed that MSC transplantation has positive effects on ultrafiltration failure in chronic PD rat model. As our knowledge, this is the first study, aimed to investigate effect on ultrafiltration failure of MSCs transplantation in chronic PD rat model. MSCs transplantation may be a hope for the renewal of the peritoneum in chronic PD patients with ultrafiltration failure.

Keywords: Chronic Peritoneal dialysis, Mesenchymal stem cell transplantation, Ultrafiltration failure

GİRİŞ VE AMAÇ

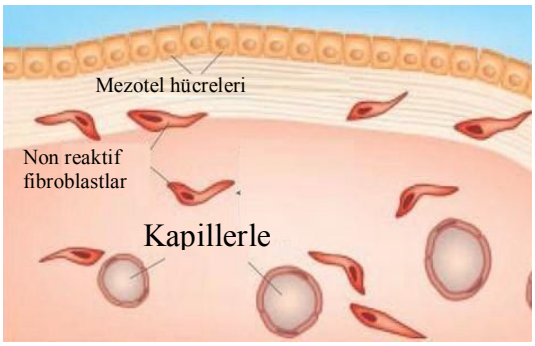
Çocuklarda, özellikle de erken çocukluk döneminde, son dönem böbrek yetmezliğinde (SDBY) periton diyalizi (PD) bir renal replasman tedavisi olarak büyük önem taşımaktadır.

Periton diyalizinde en önemli zorluk, periton zarının bütünlüğünün uzun süreli korunamamasıdır. Kronik periton diyalizi sırasında, periton zarının fizyolojik olmayan PD sıvılarına uzun süreli maruz kalması ve sık geçirilen peritonit atakları nedeniyle periton zarında mezotel hücre hasarı, peritoneal yapışıklık ve fibrozis meydana gelmekte ve bunların sonucunda 5-10 yıl içerisinde periton zarı bütünlüğü bozulmakta ve yeterli ultrafiltrasyon (UF) sağlanamamaktadır (1).

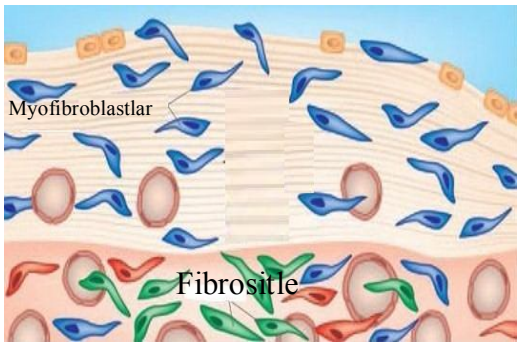
Periton zarı geçirgenliği bozulan ve yeterli vücut kitlesine sahip olamayan küçük çocuklarda hemodiyaliz de birçok merkezde teknik nedenlerden dolayı yapılamamaktadır. Bu nedenle bu çocuklarda peritonun korunması daha büyük önem arz etmektedir.

Periton zarı tek tabakalı mezotel hücreleri ile kaplıdır. Mezotelyum peritoneal zarının önemli bir komponentidir ve fibrin homeostazı, mikrosirkülasyon ve inflamatuar cevabın düzenlenmesinde görev alır. Kronik PD sırasında mezotelyal hücreler sürekli olarak hiperosmotik, hiperglisemik ve asidik periton diyaliz sıvısına maruz kalır. Periton zarının biyouyumu iyi olmayan sıvılara uzun süre maruz kalmasının mezotel hücrelerinin dökülmesine, dolayısıyla periton zarının fonksiyonunun azalmasına yol açtığı bildirilmiştir (2).

Şekil 1'de normal periton zarı ve Şekil 2'de kronik PD hastasının periton zarının mikroskopik görünümü resmedilmiştir.



Şekil 1: Normal periton zarı



Şekil 2: Kronik PD hastasının periton zarı

Mezotel hücreleri geniş bir yenilenme kapasitesine sahiptir. Periton hasarı gerek cerrahi işlem, gerekse peritonit ya da periton diyalizi nedeniyle gelişmiş olsun, yenilenme süreci hasarın oluşmasından sonraki 24 saat içinde başlar ve hasarlanmış bölgede bazı hücreler birikir. Bu hücreler;

1) Doku hasarı olan bölgedeki hücrelerin proliferasyonu
2) Karşı periton yüzeyindeki mezotel hücreleri,
3) Seröz periton sıvısındaki olgunlaşmamış mezotel hücreleri,
4) Periton dokusundaki makrofajların transformasyonu
5) Peritonun interstisyel tabakasındaki **mezankimal ön hücreler** dir.

Hasarlı yüzeyin iyileşmesi 7-10 gün alır. İyileşirken mezotel hücreleri epitel hücrelere dönüşür (3,4). Bertram ve ark (5) hayvan modelinde intraperitoneal mezotel hücre transplantasyonu ile periton yüzeyinin soyulmuş bölgelerinde verilen hücrelerin biriktiğini göstermişler ve adhezyonu önlediğini ileri sürmüşlerdir. Cabrera ve ark (6) ex vivo çalışmalarında hasarlanmış periton dokusuna periton sıvısından derive edilmiş mezotel hücrelerin uygulanması ile doku hasarını tamir ettiği ve dolayısı ile periton zarı yetersizliğinin ortadan kaldırdığını savunmuşlardır.

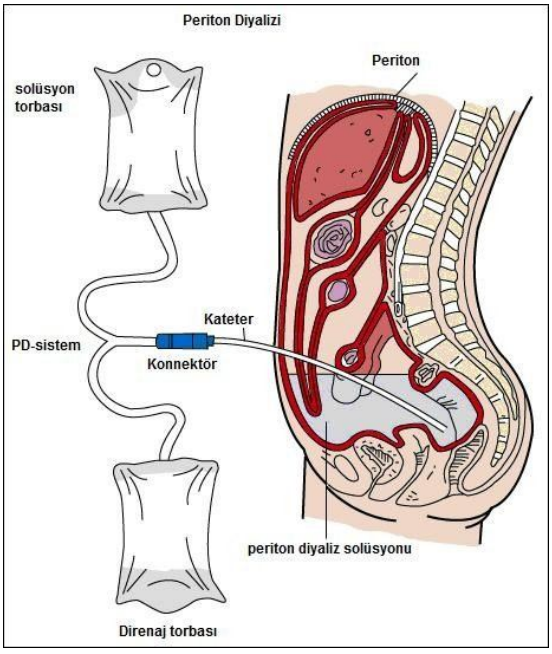
Mezenkimal kök hücreler kemik iliği kaynaklı, her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokuları oluşturan bir multipotent hücre kaynağı olarak bilinmektedir. Önceleri, kemik iliği kökenli stromal hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girerken daha 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 (7).

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak ultrafiltrasyon yetersizliği geliştirilmiş ratlarda intraperitoneal olarak uygulanan mezenkimal kök hücre transplantasyonu ile yeterli ultrafiltrasyonun sağlanıp sağlanamayacağını belirlemektir. Bu çalışma intraperitoneal mezenkimal kök hücre transplantasyonu ile mezotel hücre hasarının ve UF yetersizliğinin düzelip düzelmediğini göstermeyi amaçlayan, bilinen ilk çalışmadır.

GENEL BİLGİLER

Kronik PD, SDBY'li hastalarda ilk uygulandığı yıllardan bu yana giderek artan sıklıkta kullanılan ve çocukluk döneminde en çok tercih edilen renal replasman tedavisi yöntemidir (8).

Periton diyalizi, periton boşluğu ve periton zarından yararlanılarak gerçekleştirilen bir diyaliz yöntemidir. Periton diyalizinde, karın boşluğuna yerleştirilen kateter aracılığı ile steril diyaliz solüsyonunun periton boşluğuna verilmesi ve yarı geçirgen periton zarı ile peritoneal kapiller kan arasında solüt ve sıvı değişimi sonucunda toksinlerin plazmadan diyaliz sıvısına geçmesi sağlanır. Şekil 3'te periton diyaliz işlemi gösterilmiştir.



Şekil 3: Periton diyalizi uygulama yöntemi

Periton diyalizi hemodiyalize göre daha fizyolojik bir yöntemdir. Periton diyalizi uygulama kolaylığı, hemodiyaliz kadar yoğun alet ve ekip gerektirmemesi ve teknik olarak küçük çocuklara hemodiyaliz yönteminin uygulanmasının zor olması gibi nedenlerden dolayı;

- 2 yaşından küçük çocukların tümünde,
- 5 yaşından küçük çocukların %80'inde ve
- 5 yaş üzeri çocuklarda medikal ya da psikososyal bir neden yoksa ilk

seçilen diyaliz yöntemidir (9).

.

A- PERİTON ZARININ YAPISAL VE FİZYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

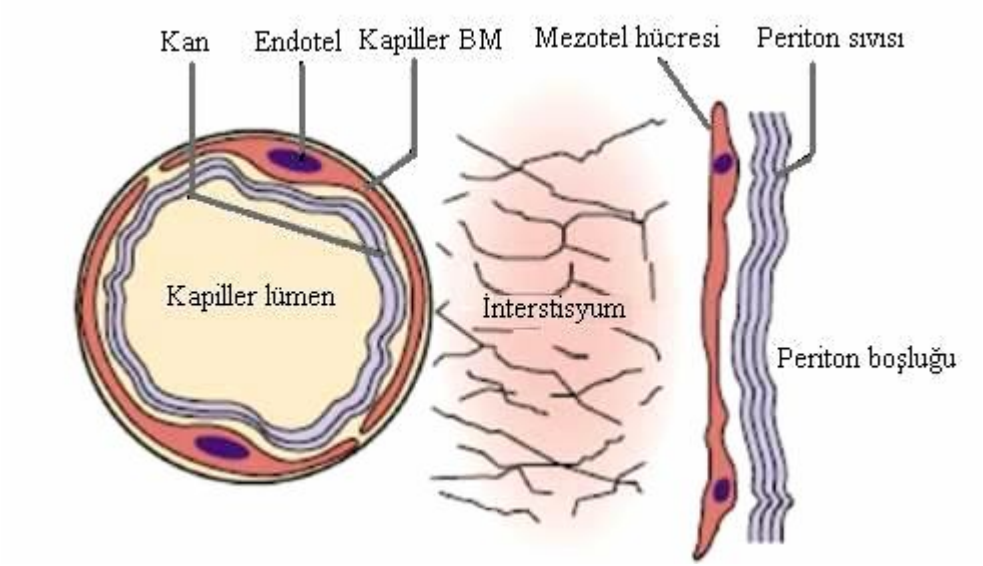
a) Periton zarının anatomi ve histolojisi:

Karın boşluğu veya periton boşluğu insan vücudundaki en büyük boşluktur. Bu boşluk yukarda diyaframla, arkada sırt kasları ve kaburgalar ile, yanlarda yan karın kasları ile, önde ise yine ön karın kasları ile sınırlanmıştır (10).

Periton boşluğu özel bir örtüye sahip olup; seröz bir zar olan peritonun yüzey alanının yaklaşık olarak vücut yüzey alanına eşit olduğu kabul edilir. Periton zarı, iç organları kaplayan ve visseral mezanter ile omentumu oluşturan **visseral periton** ile karın duvarının iç yüzünü kaplayan **paryetal peritondan** oluşur. Peritonun yaklaşık % 80'ini visseral, % 20'sini paryetal periton oluşturur. Visseral periton mezenterik arterden beslenir ve venleri portal dolaşıma boşalır. Paryetal peritonun kan dolaşımını ise karın duvarı arter ve venleri sağlar. 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. Ayrıca visseral periton anatomik periton yüzey alanının % 80'ini oluşturmasına rağmen total PD değişiminin sadece % 30'una katkıda bulunmaktadır Periton boşluğunun lenfatik boşaltımı ise başlıca diyafragmatik açıklıkta bulunan lenfatik kanallardan sağlanır. Periton boşluğundan sıvının ve molekül ağırlığı 20.000 daltonun üzerinde olan solütlerin emilimi lenfatikler aracılığıyla gerçekleşir. Bu zengin damarlanma sayesinde yüksek bir salgı yapma ve emme potansiyeline sahiptir (10-12).

Periton boşluğunu oluşturan periton zarı, basit bir histolojik yapıya sahip olup; visseral yüzeyinde mikrovilluslar bulunan tek katlı mezengial kaynaklı skuamöz epitelyum tabakası olan mezotel tabakası ile bunun altında uzanan interstisyumdan oluşur. Jele benzeyen yapıdaki interstisyum içinde birkaç fibroblast, mast hücreleri, makrofajlar ve damarlardan

oluşan bir bağ doku olan submezotelyal alan, lifler, lenfatikler ve kapillerler bulunur. Bunlar içinde en önemlisi kapillerlerdir. Çünkü, diyaliz için oldukça önemli olan etkin periton zarının yüzey alanının başlıca belirleyicisi kapillerlerin sayısıdır (3,13,14). Şekil 4'te periton zarının yapısı şematize edilmiştir.



Şekil 4: Periton zarının yapısı

Mezotel tabakası periton zarının önemli bir bileşenidir ve inflamatuar cevabın düzenlenmesinde, mikrosirkülasyonda ve fibrin homeostazında görev alır (15). Mezotelin birçok işlevi vardır; sürtünme ile organ ve dokuların hasarlanmasını önler, periton boşluğundan sıvı ve solutlerin taşınmasını sağlar, periton içi dengenin korunmasında anahtar rol oynar, sitokin, büyüme faktörleri ve matriks proteinlerini, hücre içi adezyon moleküllerini yapar, peritonun immun savunmasına aktif olarak katılır, peritondaki yangıyı başlatır, düzenler ve mikro organizmaların yayılmasını önler (12-16). Diyaliz peritonun esas işlevi olmamakla beraber, periton membranı diyaliz için şaşılacak derecede uygundur (17).

b) Periton zarının fizyolojisi:

Peritonun fizyolojik morfolojisi uzun zamandır bilinmesine rağmen son zamanlarda yapılan araştırmalar, küçük solutlerin peritondan transport ve ultrafiltrasyon mekanizmalarını daha iyi anlamamızı sağlamıştır (18).

Periton diyalizinde temel su ve solüt bariyeri, mezotel hücre tabakası ve altındaki damarsız doku olarak tanımlanan anatomik peritondan ziyade, kan kapiller endoteli ve interstisyel matrikstir. Su ve solüt taşınması endotelden olur. Protein ve diğer büyük moleküller

konveksiyon ile, küçük solütler diffüzyon ile, su, kollolid ve kristaloidler ise ozmosis ile taşınır (19,20).

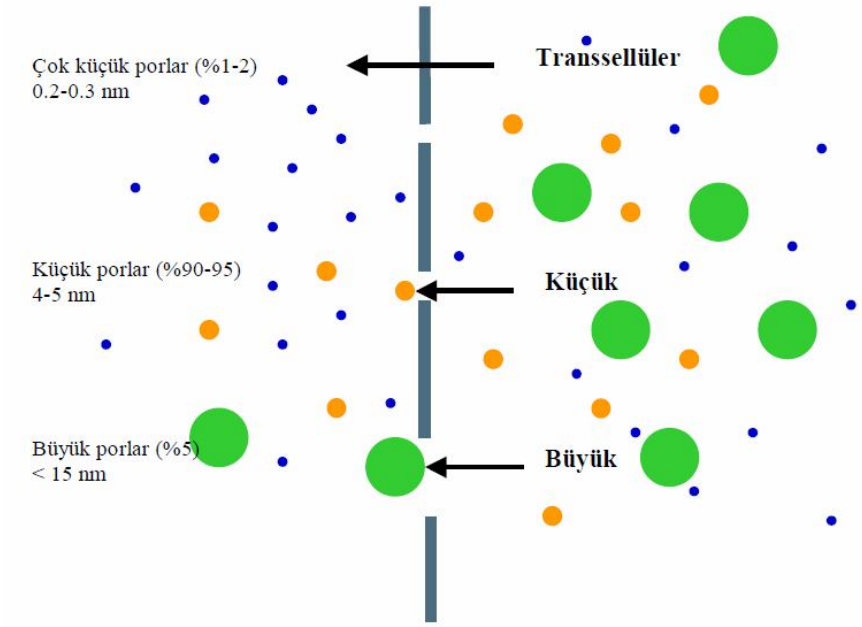
Peritonun taşıma mekanizması, su ve solüt taşınmasını açıklamak için başlangıçta bir bilgisayar modeli olan **üç por modeli** oluşturulmuştur. Su ve solüt taşınmasının kapiller endoteli üzerinde bulunan 3 farklı por ile oluştuğu düşünülmektedir.

Büyük porların (<15 nm) endotel hücreleri arasındaki aralıklara tekabül ettiğine inanılır. Makromoleküller büyük porlar yolu ile membranı geçerler. Büyük porlar ayrıca, sıvı konveksiyonu yolu ile ultrafiltrasyonu sağlar.

Küçük porlar (4 nm) hücrelerarası endotelial yarıklardır ve sıvı geçişinin %95'i ile, efektif ultrafiltrasyonun %50'si bu porlardan gerçekleşir.

Ultra-küçük porlar (<0.5 nm) olarak da adlandırılan su selektif intrasellüler porlardır. Ultra-küçük porlar aquaporin-1'e (AQP-1) uyan ve moleküler olarak tanımlanan tek por tipidir. AQP-1 aracılı su transportu, sodyumun geçişi ile birlikte olur ve ultrafiltrasyonun yaklaşık % 40-50 kadarını oluşturur (21,22).

Periton diyalizinde glukoz tipik osmotik ajan olarak kullanılır ve AQP-1 kanalları ve küçük porlar yolu ile ultrafiltrasyonu sağlar. Periton diyalizinde diffüz membran transportu büyük oranda efektif periton yüzey alanı olarak tanımlanan küçük porların sayısı ve perfüzyonuna bağlıdır (23). Üç por modeli Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: Üç por modeli

Periton diyalizi uygulanan hastalarda, periton zarının yapı ve fonksiyonlarında zamanla birtakım değişiklikler ortaya çıkmaktadır.

B- KRONİK PERİTON DİYALİZİNİN FİZYOLOJİSİ

Periton diyalizinde temel amaç yeterli üremik toksin ve sıvı atılımının sağlanmasıdır. Solütlerin transportu diffüzyon ve konveksiyon olmak üzere iki mekanizma ile gerçekleşir. Hakim mekanizma olan diffüzyonun belirleyicileri konsantrasyon gradienti ile kütle transfer alan katsayısıdır. Kütle transfer alan katsayısı, efektif periton zarının yüzey alanı ile periton zarının solüt için yapısal geçirgenlik özelliğinin bir ürünüdür. Peritonun geçirgenlik özelliği kişiler arasında farklılık gösterir. Solütlerin kütle transfer alan katsayıları karmaşık formüller kullanılarak hesaplanabilirse de, pratikte peritonun geçirgenlik özelliğini belirlemek için periton eşitleme testi (PET) ile hesaplanan diyalizat/plazma (D/P) oranları kullanılmaktadır (24).

Üre ve kreatinin gibi küçük molekül ağırlıklı solütler için difüzyon, değişimin ilk saati içinde en fazladır. Daha sonra kan ile diyalizat arasındaki konsantrasyon gradienti azaldıkça

diffüzyon giderek yavaşlar. Dört saatlik bekletme sonunda ürenin % 90'dan fazlası, kreatininin ise yaklaşık 2/3'ü dengelenir.

Diffüzyonu arttırabilmek için değişim sıklığını veya değişim hacmini arttırmak gerekir. Konveksiyon ise en basit şekliyle "su hareketine eşlik eden solüt hareketi" olarak tanımlanabilir, dolayısıyla konvektif transport ultrafiltrasyon miktarı ile doğru orantılıdır. Konvektif transportun toplam solüt transportuna katkısı diffüzyona göre daha azdır, özellikle büyük molekül ağırlıklı toksinlerin temizlenmesi için daha önemli olabilir (24,25).

Ultrafiltrasyon

Net ultrafiltrasyon transkapiller ultrafiltrasyon ile peritondan sıvı emiliminin bir ürünüdür. Transkapiller ultrafiltrasyonunu membran yüzey alanı, membranın suya karşı geçirgenliği ve transmembranöz basınç gradienti belirler. Hidrostatik, kristaloid ozmotik ve kolloid ozmotik basınç gradientleri transmembranöz basınç gradientinin belirleyicileridir (22). Hemodiyalizde ultrafiltrasyon esas olarak hidrostatik basınç gradienti ile gerçekleşirken, periton diyalizinde ultrafiltrasyonun temel belirleyicisi ozmotik basınç gradientidir. Böyle bir basınç gradientinin oluşturulması için ise diyaliz solüsyonuna ozmotik bir ajanın eklenmesi gerekir (22,23).

Ultrafiltrasyon için en önemli faktör ozmotik gradienttir. Ozmotik ajanların gücü refleksiyon katsayısı ile belirlenir. Kapiller membranın değişik solütlere permeabilitesini belirten refleksiyon katsayısı "0" olduğunda solütlerin serbestçe geçtiği "1,0" olduğunda ise hiç geçmediği anlamını taşır. İdeal bir ozmotik ajanın refleksiyon katsayısı 1'e eşit olmalıdır. Bunun anlamı ozmotik ajanın periton boşluğundan kana emilmemesi ve bu şekilde bekletme süresi boyunca ozmotik gradientin korunmasıdır. Periton diyalizinde en yaygın kullanılan ozmotik ajan glukozdur. Ancak refleksiyon katsayısı 0.02 olan glukoz ideal bir ozmotik ajan değildir. Dört saatlik bir bekletme sırasında glukozun yaklaşık % 40'ı kana absorbe olur ve ozmotik gradient kayboldukça transkapiller ultrafiltrasyon giderek azalır. Refleksiyon katsayısı 1'e yakın olan icodextrin ise ideale yakın bir ozmotik ajandır (26).

Peritoneal sıvı absorpsiyonu ise net ultrafiltrasyonu azaltan bir işlevdir. Sıvı peritoneal lenfatiklerle direkt olarak emildiği gibi, aynı zamanda daha sonra lenfatiklere ve kapillerlere geçmek üzere karın ön duvarındaki dokular içine de absorbe olabilir. Peritoneal sıvı

emiliminin miktarını hesaplamak güçtür, ancak 1-2 ml/sn olduğu tahmin edilmektedir. Bu şekilde, 4 saatlik bir bekletme sırasında yaklaşık 250-500 ml sıvı bu yolla emilebilir ve net ultrafiltrasyonu ve klirensi anlamlı olarak azaltabilir. İntraperitoneal basınç artışı, peritoneal sıvı emilimini arttırabilir (18-22).

Pratik olarak ozmotik ajan veya ozmotik gradient değiştirilerek net ultrafiltrasyon arttırılabilir (20).

C- KRONİK PERİTON DİYALİZİ'NDE PERİTON ZARINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLER

a) Yapısal değişiklikler:

Kronik PD hastalarında üremi, tekrarlayan peritonit atakları ve uzun süre PD sıvılarına maruz kalma sonucunda periton zarında bir takım yapısal değişiklikler olur (23). 1980'lerin başında yapılan morfolojik çalışmalarda periton diyalizi tedavisi sonrası periton zarında mezotelyal, vasküler ve interstisyel değişiklikler meydana geldiği gösterilmiştir. Mezotelyumun kaybı, mezotel altı fibrozis, anjiogenez, vaskülopati ve bazal membran kalınlaşması PD sırasında meydana gelen tipik morfolojik değişikliklerdir (2,27).

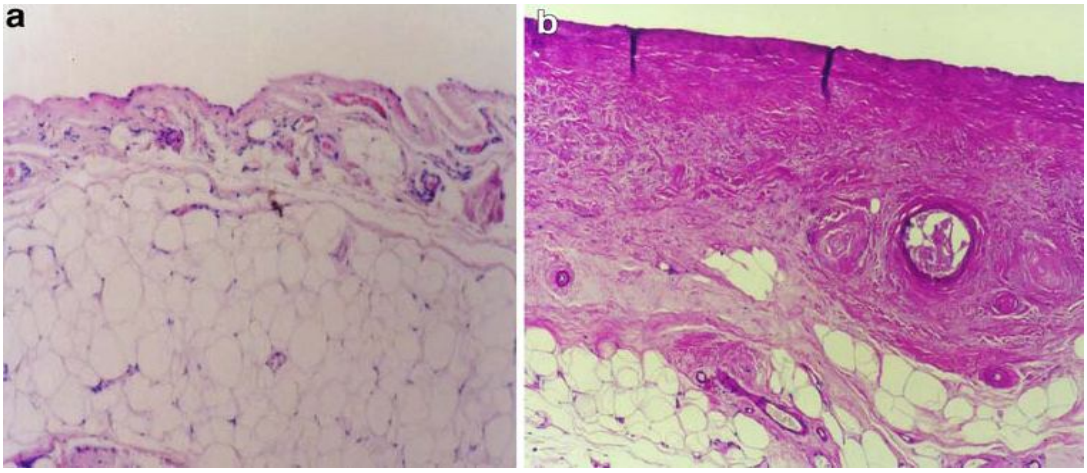
Periton diyalizi öncesi ve sonrasında periton zarında meydana gelen değişikliklerle ilgili en kapsamlı çalışma Williams (28) tarafından erişkin hastalarda yapılan bir çalışmadır. Bir uluslararası kayıt sisteminde 130'dan fazla uzun dönem PD hastasının biyopsileri ile sağlıklı ve PD yapılmayan üremik hastaların biyopsileri karşılaştırılmış; üremik hastalarda sub-mezotelyal zonun sağlıklı bireylerden 3 kat daha kalın olduğu, PD hastalarında ise 5 kat daha kalın olduğu gösterilmiştir ve vaskülopatinin derecesi PD'nin süresi ile korele bulunmuştur. Çocuklarda benzer bir kayıt sistemi olmamasına rağmen çocuklarda da uzun dönem PD sonrasında periton zarında benzer değişiklikler olduğuna şüphe yoktur.

Kullanılan PD sıvılarının çoğunda ozmotik ajan olarak glukoz ve tampon olarak laktat kullanılmaktadır. Birçok çalışmada hiperozmotik ve asidik yapıya sahip biyouyumlu olmayan PD sıvılarının kullanımı sonucunda glukoz yıkım ürünlerinin oluştuğu ve bunun da periton hasarını başlatan tetikleyici rol aldığı gösterilmiştir. Fizyolojik olmayan diyaliz sıvılarına maruz kalma, hastaların üremik durumu veya peritonit atakları gibi durumlar, periton zarında hasara ve kronik inflamasyona neden olarak fibrozis ve anjiogenez ile sonuçlanır (29). Son

yıllarda daha fizyolojik PD sıvıları üretilmeye başlanmış ve böylece periton hasarını azaltmak amaçlanmıştır (30).

Kronik PD sırasında periton zarında çok sayıda morfolojik değişiklikler gelişebilmektedir. Asidik ve hiperozmotik yapıda olan PD sıvılarına uzun süreli maruz kalma sonucunda ileri glikasyon ürünleri ve oksidatif stres meydana gelir ve bunun sonucunda mezotelden ve makrofajlardan salınan sitokinler ve büyüme faktörleri kronik inflamasyonu başlatır. Böylece, periton zarının mezotel hücrelerinde mikrovillüslerin sayısı azalmakta, bazen dejeneratif değişiklikler ve mezotel hücrelerinin dökülmesi, interstisyel fibrozis, yeni damarlanmalar ve damarsal değişiklikler meydana gelmektedir (31).

Histokimyasal incelemelerde hücre zarı ve sitoplazmasında enzim aktivitelerinde artış saptanmıştır. İnterstisyel alanda tip III kollojen ve tip VI kollojen depolanması artmakta ve sonuçta interstisyel fibrozis gelişmektedir. Periton zarında damar sayısı artmakta ve kapiller duvarı endotel bazal membranında kalınlaşma ortaya çıkmaktadır. Damar duvarlarında tip IV kollojen birikimine bağlı fibrotik kalınlaşma ve hiyalinozis gelişmektedir (1,12,13,31). Şekil 6'te normal periton zarı ve 6 yıl kronik PD sonrası periton zarının mikroskopik görünümü gösterilmiştir.



Şekil 6: a- Normal periton zarı, b- Kronik PD'den Altı yıl sonra periton zarı (1)

Altta yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, peritondaki fibrozisin nedeni mezotel hücreleri ve makrofajlardan sekrete edilen transforming growth faktör-β1 (TGF- β1) gibi büyüme faktörleri, interlökin-1 gibi sitokinler ve proteoglikanlar, fibronektin, laminin ve kollajen gibi ekstrasellüler matriks makromolekülleri ile ilişkilendirilmiştir (32).

Bu değişiklikler PD tedavisini sonlandırmada en önemli faktörlerden biri olan, UF yetmezliğine neden olmaktadır. Periton diyalizinde UF kaybına yol açan diğer önemli bir neden, vasküler endotelyal büyüme faktörlerinin (VEGF) üretimindeki artışa bağlı neovaskülarizasyon ve vazodilatasyona ikincil peritoneal yüzey alanı artışıdır (23,32)

Son zamanlardaki veriler, sıvı atılımının ve volüm durumunun periton diyalizi hastalarında prognozun en önemli belirleyicilerinden birisi olduğunu göstermiştir. Periton diyalizinin sürekli doğası nedeniyle, hemodiyalize göre daha iyi volüm kontrolü sağlaması beklenir. Ancak, gerçekte periton diyalizi hastalarında volüm kontrolü sağlanması sorunludur ve hipervolemi nispeten sık görülen bir durumdur. Hipervoleminin en önemli sebebi ise ultrafiltrasyon yetersizliğidir (33).

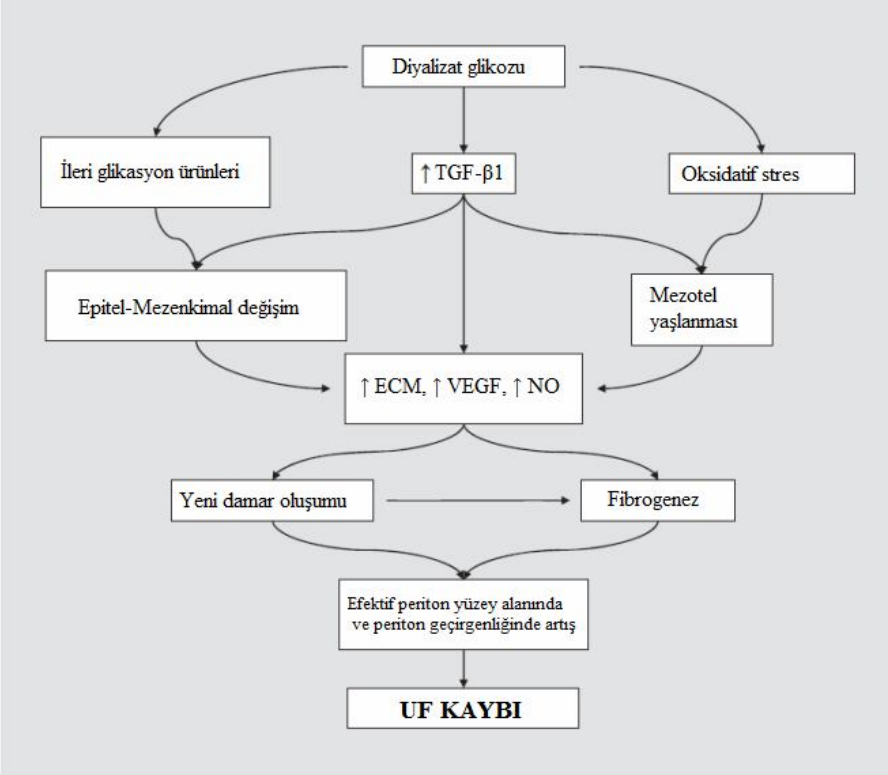
b) Fonksiyonel değişiklikler (Ultrafiltrasyon yetersizliği)

Periton boşluğunda bulunan hiperozmotik PD sıvısının oluşturduğu ozmotik basınca bağlı olarak suyun periton zarı aracılığıyla kapillerlerden periton boşluğuna sızmasına ultrafiltrasyon denir (34). Periton diyalizi sırasında solütlerin değişimi, peritoneal kapillerlerdeki kan ve periton boşluğuna doldurulan diyaliz sıvısı arasında gerçekleşir. Dolayısıyla, peritonun mikrodamarlarının sayısı bir diyaliz membranı olarak kullanılan peritonun transport kapasitesinin bir belirleyicisi olabilir (35).

Mezotel tabakası muhtemelen transport bariyeri için önemli değildir. Yapılan invivo ve invitro çalışmalarda intraperitoneal olarak verilen makromoleküllerin mezotelyal tabakayı kolayca geçtiği gösterilmiştir . Bu bulguların ışığında, peritonun vasküler yüzey alanının, yani peritoneal kapillerlerin sayısının, peritonun diyaliz kapasitesinin önemli bir göstergesi olduğu söylenebilir (36).

Kronik periton diyalizinin en önemli sorunlarından biri, zaman içinde UF yetersizliğinin gelişmesidir (1). Ultrafiltrasyon yetersizliği en önemli fonksiyonel transport anormalliği olup, periton diyalizinin sonlandırılmasını gerektiren en yaygın nedendir. Ultrafiltrasyon yetersizliğine kronik PD'nin birinci yılı sonunda %3, altıncı yılı sonunda ise %31 sıklığında rastlanmaktadır (2).

Periton diyaliz sıvılarının ısı ile sterilizasyonu, glukozun oksidasyonu, dehidrasyonu ve fragmantasyonu glukoz yıkım ürünlerinin oluşmasına neden olur (GDP). Glukozun otooksidasyonu ile oluşan peroksit, proteinlerin yıkımına neden olur. Glukoz ve diğer monosakkaridler lizin residüleri ile reaksiyona girer. Bunlar daha ileri yıkıma uğrar ve ileri glikasyon ürünleri (AGE: advanced glication end product) oluşur. Protein yıkımı protein yapısının ve işlevinin bozulmasına, mezotel hücrelerinin yaşam yeteneğinin azalmasına ve endotel hücrelerinin vasküler ekstrasellüler matriksten ayrılmasına neden olur (32,36). Şekil 7'de UF kaybının oluşum basamakları gösterilmiştir.



Şekil 7: UF kaybının oluşum basamakları (32)

Kronik PD yapılan bir hastada yüksek glukoz konsantrasyonu içeren sıvılar kullanılmasına rağmen kuru ağırlığa ve normal kan basıncına ulaşılamaması, kan üre ve kreatin değerlerinin istenilen düzeylere düşmemesi, daha objektif bir tanımla PET ile periton zar geçirgenliğinin bozulduğunun gösterilmesi UF yetersizliğinin olduğunu gösterir (36).

Sıvı dengesini korumak için günde ikiden fazla hipertonik diyalizat kullanılması gereken olgularda UF yetersizliğinden şüphelenilmelidir. Periton diyalizi hastalarında başlıca 4 tip UF yetersizliği görülür;

Tip I: Yüksek periton geçirgenliği nedeniyle ozmotik gradiyentin erken kaybolması, (peritonit sırasında geçici olarak da meydana gelebilir)

Tip II: Yetersiz periton yüzey alanı veya membran sklerozu

Tip III: Aşırı lenfatik emilim

Tip IV: Aquaporinlerin fonksiyon bozukluğu veya kaybı (36).

D- PERİTON GEÇİRGENLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

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

a) Periton eşitleme testi (PET)

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

Testin Yapılışı

1. Bir gece önce hasta normal periton diyalizi değişimini gerçekleştirir ve 8-12 satlik bekletme zamanını takiben geceki diyalizatı boşaltmadan hastaneye gelir.
2. Geceki diyalizat hasta oturur pozisyonda iken 20 dakikada boşaltılır ve volümü kayıt edilir.
3. Hasta yatar pozisyonda iken 1100 ml/m^2 % 2.27'lik diyaliz solüsyonu 10 dakikada periton boşluğuna verilir. Bu sırada her 2 dakikada bir hasta sağ ve sola çevrilerek verilen çözeltinin karında bulunan diyalizat ile karışması sağlanır. İnfüzyon tamamlandıktan hemen sonra 10 ml'lik bir diyalizat örneği alınır.
4. Test süresince hastanın dolaşması sağlanır.
5. Bekletmenin 2. ve 4. saatinde tekrar 10 ml diyalizat örneği alınır. Aynı anda kan örneği alınır.
6. Direnaj volümü ölçülür ve alınmış örnek sıvılar (30 ml) volüme ilave edilir.
7. Kan ve diyalizat örneklerinde kreatinin ve glukoz konsantrasyonu ölçülür.
8. Dördüncü saat diyalizat kreatinin konsantrasyonunun plazma kreatinin konsantrasyonuna oranı (D/P_{Cr}) ve 4. saat diyalizat glukoz konsantrasyonunun 0. saat diyalizat glukoz

konsantrasyonuna oranı ($D/D0_{glukoz}$) hesaplanır. Bu sonuçlara göre hastanın peritonun geçirgenlik özelliği belirlenir (34).

D/P kreatinin <0.50	Düşük geçirgenlik
D/P kreatinin 0.50-0.65	Düşük-orta geçirgenlik
D/P kreatinin 0.66-0.81	Yüksek-orta geçirgenlik
D/P kreatinin >0.81	Yüksek geçirgenlik

Düşük peritoneal geçirgenliği olan olgularda ozmotik gradientin değişim süresince korunması nedeniyle mükemmel ultrafiltrasyon sağlanır, ancak üremik toksin atılımı yetersiz olabilir. Yüksek periton geçirgenliği olan olgularda ise yeterli solüt klirensi sağlanmasına karşın, ozmotik gradientin hızlı kaybolması sonucu ultrafiltrasyon yetersizliği görülebilir(34,36).

Yüksek periton geçirgenlik durumu kötü prognostik bir göstergedir. Test sonucuna göre hasta için en uygun periton diyalizi rejimi belirlenir. PET verileri diyaliz dozunun reçetelendirilmesi, membran fonksiyonunun uzun süreli izlenmesi, solüt klirensi ve ultrafiltrasyon yetersizliklerinin ayırıcı tanısında da kullanılabilir. İlk testin periton diyalizine başlandıktan sonra 2-4 hafta içinde yapılması ve daha sonra 6 aylık aralıklarla veya klinik bir sorunla karşılaşıldığında tekrarlanması önerilmektedir (22,23,34,36).

b) Farklı PET yöntemleri:

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

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

Hızlı PET: Sadece 4. saat ölçümleri yapılır

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

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

Çift mini-PET: mini PET 1kez 3.86, 1kez 1.36 ile yapılır, 1. saatte Na ve volum ölçülür. Solut transportu, UF ve serbest su transportu hakkında bilgi verir (37-39).

c) Kronik periton diyalizi hayvan modellerinde yapılan farklı PET yöntemleri

Bir saatlik PET: Ratlara 20 ml %2.27 veya %1.5 glukozlu PD solüsyonu İP olarak yavaş bir şekilde verilir. Enjeksiyon sonrası 1. saatte periton sıvısı ve kan örnekleri alınır (40).

Doksan dakikalık PET: Ratlara 25-35 ml %3,86 glukozlu PD solüsyonu İP olarak verilir. Enjeksiyon sonrası 90. dakikada PD sıvısı ve kan örnekleri alınır (41).

İki saatlik PET: Ratlara 25-30 ml %2.27 glukozlu PD solüsyonu İP olarak verilir. Enjeksiyon sonrası 2. saatte PD sıvısı ve kan örnekleri alınır (42).

E- MEZOTEL HÜCRELERİ VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE

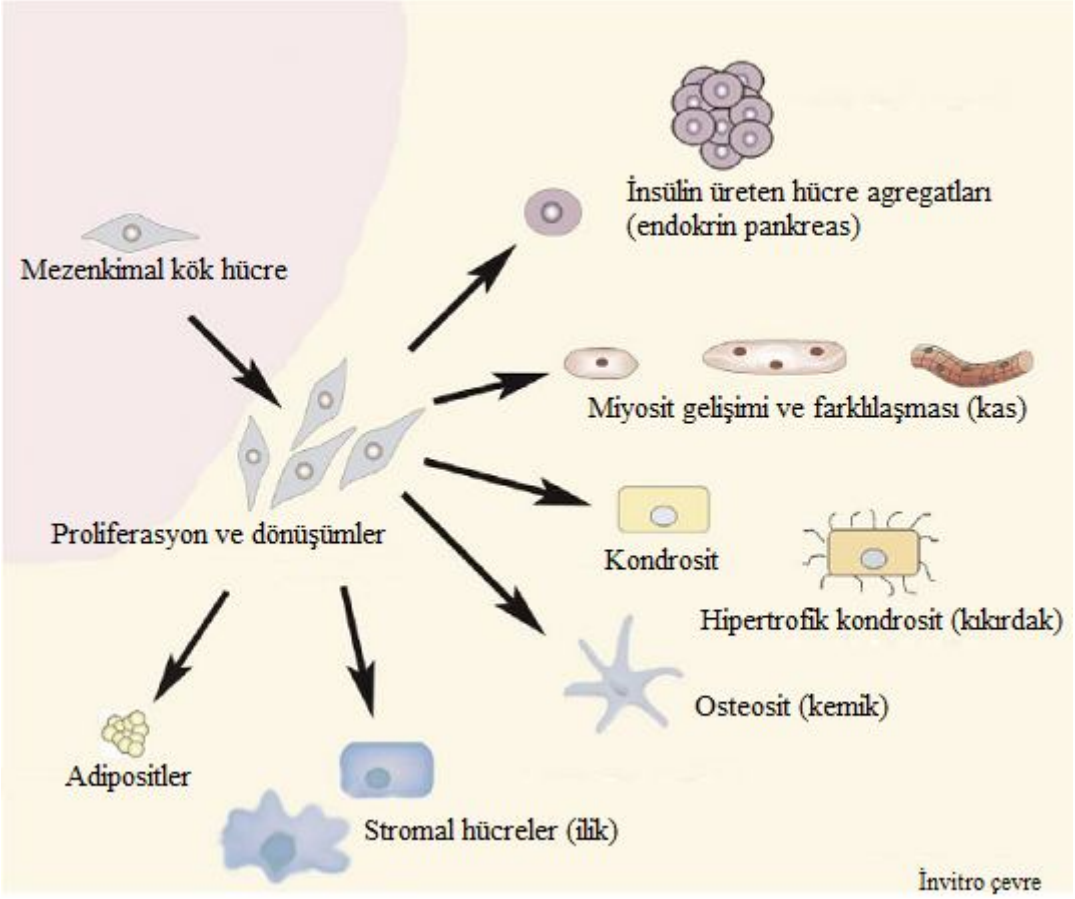
Mezotel hücreleri geniş bir yenilenme kapasitesine sahiptir. Periton hasarı gerek cerrahi işlem gerekse peritonit ya da periton diyalizi nedeniyle gelişmiş olsun, yenilenme süreci hasarın oluşmasından sonraki 24 saat içinde başlar, hasarlanmış bölgeye hücreler dolar. Bu hücreler;

1) Doku hasarı olan bölgedeki hücrelerin proliferasyonu
2) Karşı periton yüzeyindeki mezotel hücreleri,
3) Seröz periton sıvısındaki immatür mezotel hücreleri,
4) Periton dokusundaki makrofajların transformasyonu
5) Peritonun interstisiyel tabakasındaki **mezankimal prekürsör hücreler** dir.

Hasarlı yüzeyin iyileşmesi 7-10 gün alır. İyileşirken mezotel hücreleri epitel hücrelerine dönüşür (3,4). Bertram ve ark (5) hayvan modelinde intraperitoneal mezotel hücre transplantasyonu ile periton yüzeyinin soyulmuş bölgelerinde verilen hücrelerin biriktiğini göstermişler ve adezyonu önlediğini ileri sürmüşlerdir. Cabrera ve ark (6) çalışmalarında hasarlanmış periton dokusuna periton sıvısından elde edilmiş mezotel hücrelerin uygulanması ile doku hasarını tamir ettiği ve dolayısı ile periton zarı yetersizliğinin ortadan kaldırdığını savunmuşlardır.

Kemik iliği hücreleri kültür kaplarında kültüre edildikleri zaman hızla plastik kültür kabına yapışan (adhere olan) hücrelerin kemik iliği stromal hücreleri olduğu, yapışmayan (non-adherent) hücrelerin ise hematopoietik hücreler olduğu 1966'lı yıllardan beri bilinmektedir. Son yıllarda ise, stromal hücre sistemine duyulan ilgi giderek artmaktadır. Önceleri, kemik iliği kökenli stromal hücreler, özellikle mezenkimal kök hücreler hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girerken daha sonraları in vivo ve in vitro çalışmalarla aralarında kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, yağ dokusu, böbrek, akciğer ve bağırsakların da olduğu çeşitli hematopoietik olmayan dokuların parankimal hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir (7). Şekil 8'de mezenkimal kök hücrelerin farklılaştığı hücre tipleri gösterilmektedir.

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 Fridenshtein tarafından tanımlandı.
Mezenkimal kök hücreler kemik iliği kaynaklı, her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokuları oluşturan bir multipotent hücre kaynağı olarak bilinmektedir (43,44).



Şekil 8: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştığı hücre tipleri (44)

Mezenkimal kök hücreler dolaşan kan, fetus ve erişkin kemik iliği, dalak, amniotik sıvı, kıkırdak, kas tendonları, plasenta, yağ dokusu, fetal dokular, periost, sinovyal sıvı, timus, trabeküler kemik, dermis, diş pulpası ve akciğer gibi çok çeşitli organ ve dokularda bulunur. Mezenkimal kök hücreler sadece osteojenik, kondrojenik ve adipojenik dokuların kökeni olmakla kalmaz aynı zamanda mezodermal (miyosit, osteosit, endotel, adiposit, kardiomiyosit), ektodermal (nöronal) ve endodermal (hepatik, pankreatik, solunum epiteli) dokuların da kökenini oluşturur (44,45,46,47).

Mezenkimal kök hücrelerin farklı hücre tiplerine dönüşmesini sağlayan spesifik büyüme ve farklılaşma faktörlerine maruz kalması gerekir. Mezenkimal kök hücrelerin mezotel hücresine dönüşümü için büyüme ve farklılaşma faktörü gerekmemektedir (48).

Kök hücrelerin hasarlanmış ve dejenere olmuş doku ve hücrelerin yerini alarak yenilenme sürecini başlattığı düşünülmektedir (46). Bazı hastalıklar, mesela Parkinson hastalığı, bir veya daha fazla hücre tipinin ilerleyici bozulması sonucu oluşur. Bazı vakalarda kök hücreler yaşam uzatma tedavisi de denilebilen bir yerine koyma tedavisi olarak kullanılır (örneğin; kalp krizlerinde hasarlanan kalp hücreleri yerine ya da sirozda hasarlanmış karaciğer hücreleri yenilemek amacıyla izole edilmiş kök hücreler kullanılabilir). İmplante edilen kök hücreler etrafındaki mikroçevre ile etkileşime girer ve komşu dokudan salgılanan belirli faktörler ve yenileyici biyolojik fonksiyonların etkisiyle dokunun yenilenmesini kolaylaştırır (43).

Çeşitli invitro çalışmalarda ve hayvan deneylerinde, nakledilen MKH' nın uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Bir sonraki basamak klinik çalışmalar için MKH naklinin etkinliği, güvenilirliği ve uygulanabilirliğini değerlendirmektir. İnvivo modeller karaciğer, kemik, akciğer ve böbrek gibi organlarda nakledilen MKH'ların organlara tutunduğu ve fonksiyon görmeye başladığı gösterilmiştir (44-47).

Mezenkimal kök hücre naklinin bir takım olası negatif etkileri de rapor edilmiştir. Fare ve insan embriyonik kök hücrelerinin tersine, kemik iliği kaynaklı farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler 3 germ tabakasından meydana gelen teratom oluşturma riskini taşımamaktadır. Bununla birlikte MKH'lar tümörün büyümesine, invaziv olmasına ve metastaz yapmasına yol açan karsinom ilişkili fibroblastların bir kaynağı olabilirler (49-51).

Mezenkimal kök hücre çalışmalarında nakledilen mezenkimal kök hücreleri endojen hücrelerden ayırt etmek ilk ve en önemli basamaktır. Bu nedenle farklı işaretleme teknikleri kullanılmıştır. Bunlar bromodeoksiuridin, floresan boya, manyetik ve izotop işaretleme teknikleri ve green floresan protein (GFP) ile işaretlemedir (52).

Green floresan protein, 27 KD ağırlığında denizanası *Aequorea victoria'*dan elde edilen bir proteindir. Günümüzde hücre biyolojisi çalışmalarında tanımlayıcı gen ve hücre işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Green floresan proteinin oldukça önemli kullanım alanları vardır. Green floresan proteini, farklı genlerin içerisine eklenerek bu genlerin farklı organizmalardaki ekspresyonlarının miktar tayininde kullanılması ve canlı hücreler içerisinde işaretleyici olarak kullanılabilmektedir (53).

Green floresan protein teorik olarak eklendiği hücre tarafından reddedilmeyen bir proteindir ve transplantasyonda immünolojik olarak rejeksiyon olmaz (54,55). Green floresan proteinin floresan aktivitesi substrat, kofaktör veya ilave gen ürünleri gerektirmediği için intrasellüler GFP işaretleyicisi antikor boyaması gerektirmeksizin direkt olarak floresan mikroskopi ve/veya flow sitometri ile skorlanabilir (56).

F- PERİTON DİYALİZİ DENEYSEL HAYVAN MODELLERİ

İnvivo hayvan modelleri insanlardakine benzer olarak tasarlanmış olup; periton boşluğuna sıvı verilir, belirli bir süre beklenir, periton zarında farklı hücre tipleri arasında etkileşim olur ve peritonun mikrosirkülasyonu ile sıvı-elektrolit değişimi olur. Böylece invivo modeller peritonun taşıma patofizyolojisi, peritonda yapısal değişiklikler ve bölgesel savunma mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlar (14).

Hayvan modelleri ile çalışan araştırma gruplarının büyük çoğunluğunda deney hayvanlarının türü ve cinsi, peritona ulaşım metodu, çalışma süresi, solüt transportunun ölçümü ve histoloji için örnekleme oldukça farklılıklar göstermektedir.

Kronik PD modelleri esas olarak periton içi diyalizatın periton zarı yapısı ve fonksiyonu üzerine uzun dönem etkilerini araştırmak için geliştirilmiştir. Sıçanlarla çalışmak kolay ve maliyeti uygun olduğu için çoğu araştırmacının tercihi olmaktadır. Sıçanları kullanmanın bir olumsuz yönü icodextrin içeren diyaliz sıvılarının değerlendirilememesidir. Çünkü diyalizat ozmolalitesinde artış nedeniyle oluşan yüksek intraperitoneal amilaz seviyesi icodextrinin yıkılmasına sebep olmaktadır. Serum amilaz seviyeleri sıçanlarda olduğu gibi tüm kemiricilerde yüksektir (57).

Tavşan ve fareler de PD çalışmalarında kullanılmaktadır. Tavşan modelleri, periton yüzey alanı ve değişim volümleri açısından insan PD modeline daha benzer olmasına rağmen tavşanlar çok hassas hayvanlar oldukları için onlarla çalışmak zordur. Fareler de çok küçük olduklarından üzerlerinde işlem yapılması güçtür (58).

Peritona sıvı verilmesinin yolları oldukça çeşitlidir. Bazı araştırıcılar, test sıvısını doğrudan 22 gauge iğne ile periton boşluğuna enjekte etmişlerdir. Direnaj mümkün olmadığından enjekte edilen sıvı emilir (59). Bazı araştırmacılar kaslara, mesaneye ya da bağırsaklara zarar vermemek için intraperitoneal enjeksiyonları anestezi altında yapmışlardır. Yirmi haftaya kadar enjeksiyonları sürdürülen ratlar olmasına rağmen asıl kaygı, tekrarlayan iğnelerin intraperitoneal kanama veya enfeksiyona yol açarak deneyin sonuçlarını

karıştırmasıdır. Ek olarak anestezinin lenfatik direnaj üzerinden etki göstererek peritonun taşıma kinetiklerini etkilediği ve peritonun geçirgenliğini değiştirdiği gösterilmiştir. Alternatif olarak, ticari üretilen minyatür peritoneal kateterler periton boşluğuna kolaylıkla sıvı verilip alınmasını mümkün kılan sürekli açık bir sistemdir. Böylece insanlardaki klinik durum daha iyi taklit edilmiş olur (14,60-62).

Açık PD sistemin 2 çeşidi tanımlanmıştır. Her ikisinde de periton boşluğu ile boyun arasında cilt altından tünel oluşturularak kateter buradan geçirilir. Birinci sistemde kalıcı bir tüp vasıtasıyla steril kateter kullanılarak PD sıvısı doldurulur. Bunu takiben kateter çekilir ve tüpün dışardaki ucu kapatılır. Belirli bir süre bekledikten sonra ucunda delikleri olan kateter tüpün içinden girdirilerek bekleyen sıvının pasif olarak boşalması ya da hafif bir karın masajı ile boşaltılması sağlanır. Diğer sistemde cilt altından kateterin kendisi geçirilir sıvı doğrudan kateter ile verilir ve pasif olarak boşaltılması sağlanır (63). Bu açık sistemlerin avantajı uyanık ve su ve yiyeceğe ulaşımın serbest olduğu hayvanlarda, onları rahatsız etmeksizin kronik PD'ye olanak sağlamasıdır. Böylece anestezinin potansiyel yan etkileri dışlanmış olur. Bununla birlikte PD modelinin bu tipini kullanan araştırmacılar %10 ila %60 arasında diyalize son verme oranları ile karşı karşıya geldiklerini rapor etmişlerdir. Diyalize son vermenin başlıca sebebi omentumun kateteri sarması, fibrozis ve adezyon sonucu kateterin çalışmamasıdır. Kullanılan bu sistemlerde direnaj ve dolum sırasında dış çevre ile direkt temas olduğu için enfeksiyon riski yüksektir (14).

Günümüzde kapalı sistem olarak da adlandırılan üçüncü bir kronik PD hayvan modeli oluşturulmuştur. Kalıcı kateter deri altı tünelle periton boşluğu ve boyun arasında yerleştirilir ve deri altına konulan port ile bağlanır. Verilen sıvıyı boşaltmak bu yöntemle mümkün olmaz, sıvı peritondan emilir. Sıvı verilmesi sırasında herhangi bir bağlantı olmadığı için port enfeksiyon riskini azaltır. Bu sistemde de kateter blokajına bağlı olarak periton diyalizine son verme oranları %30-40 arasındadır (64).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma 8 Kasım 2010- 10 Ocak 2011 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne bağlı Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) yapıldı. Çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Etik Kurul Karar No: 10/16) ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklendi (Proje No: TSU-10-3057).

RATLAR

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

GRUPLAR

Ratlar öncelikle kontrol ve çalışma grupları olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Çalışma grubunda 67, kontrol grubunda 10 rat olacak şekilde ayrıldılar.

Kontrol grubu (n=10): Çalışma grubuna, yaş ve ağırlık olarak denk grup. Bu gruba 6 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. Yiyecek ve su serbest bırakıldı. Çalışmaya başlamadan önce ve 6 haftanın sonunda ratlar tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi. Kontrol grubuna 6 haftanın sonunda ratların normal peritoneal geçirgenliğini değerlendirmek için PET yapıldı ve normal periton dokusunu görmek için abdominal ve visseral peritondan biyopsi

alındı. Kontrol grubundaki 10 ratın 2'sine PET yapılmak için İP olarak PD sıvısı verilirken, biri PD sıvısı cilt altına verildiği için, ikincisi ise disseksiyon yapıldığında bağırsak perforasyonu gelişmiş olduğu görüldüğünden çalışmadan çıkarıldı ve kontrol grubunda 8 rat kalmış oldu

Çalışma grubu: Bu gruba 6 hafta boyunca günde 1 kez olmak üzere İP olarak ticari %3,86 glukozlu PD solüsyonu enjekte edildi. Solüsyonun miktarı 10 ml'den 3 günde 20 ml'ye çıkıldı ve peritonit profilaksisi için 125mg/L dozunda seftazidim eklendi. Altı hafta süresince 7 rat öldü ve çalışma grubunda 60 rat kaldı. Altı haftanın sonunda çalışma grubu;

1) **PD grubu (n=8):** Altı hafta İP olarak PD solüsyonu verildikten sonra peritoneal geçirgenlikte meydana gelen değişiklikleri görmek için PET yapıldı ve histolojik değişiklikleri görmek için peritondan biyopsi alındı.

2) **Plasebo (P) grubu (n=26):** Altı hafta İP olarak PD solüsyonu verildikten sonra, İP olarak MKH ile eşit miktarda fosfat buffer solüsyon (PBS) verilen grup. Bu gruba PBS verildikten sonra İP PD sıvısı enjeksiyonlarına devam edilmedi ve peritonun dinlendirilmesinin etkilerini görmek için;

1. hafta **P-1 (n=8)**
2. hafta **P-2 (n=9)**
3. hafta **P-3 (n=9)**

PET yapıldı ve ratlar sakrifiye edilerek periton biyopsisi alındı.

3) **MKH grubu (n=26):** Altı hafta İP olarak PD solüsyonu verildikten sonra İP olarak 1.5 milyon u /kg dozunda MKH verilen grup. Bu gruba MKH verildikten sonra İP PD sıvısı enjeksiyonlarına devam edilmedi ve MKH'nin etkilerini görmek amacıyla MKH verildikten sonra;

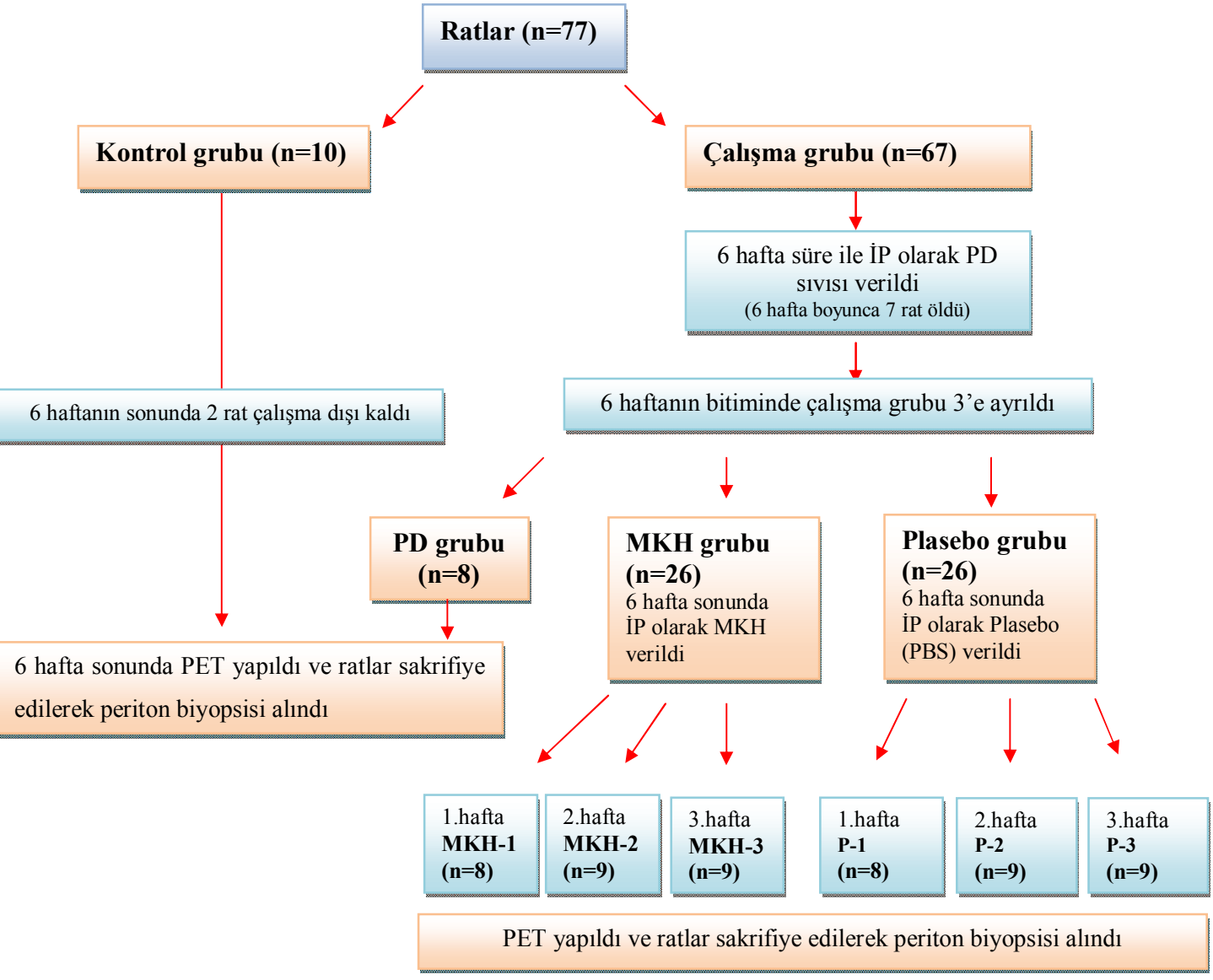
1. hafta **MKH-1 (n=8)**,

2. hafta **MKH-2 (n=9)**

3.hafta **MKH-3 (n=9)**

PET yapıldı ve ratlar sakrifiye edilerek periton biyopsisi alındı.

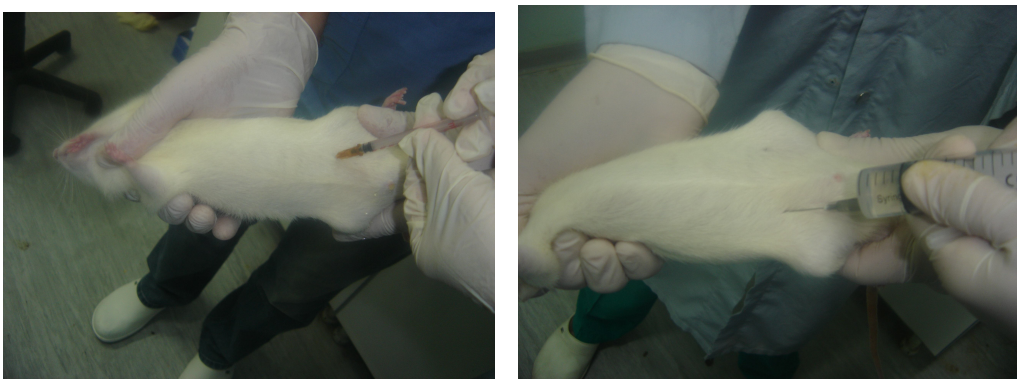
Şekil 9'da çalışma grupları ve çalışma metodunun özeti şematik olarak verilmiştir.



Şekil 9: Çalışma grupları ve çalışma metodunun özeti

İNTRAPERİTONEAL ENJEKSİYON

Çalışma grubu'ndaki ratlara günde bir kez 20 ml ticari %3,86 glukozlu PD solusyonu (Dianeal 3.36%; Eczacibasi-Baxter Healthcare, Istanbul, Turkey) intraperitoneal enjeksiyon ile verildi. Enjeksiyon için 22 gauge iğne ucu ile plastik tek kullanımlık enjektörler kullanıldı. Enjeksiyon karın duvarının bir gün sağ ve diğer gün sol alt kadranı olacak şekilde, 45^{o} lik eğimle girilerek yapıldı. Şekil 10'da enjeksiyonun yapılışı gösterilmiştir.



Şekil 10: İntra-peritoneal enjeksiyon yapılışı

PERİTON EŞİTLEME TEST (PET)'İNİN YAPILIŞI

Doksan dakikalık PET: Ratların alt karın duvarı lateralinden 22 gauge iğne ile periton içine 35 ml %3,86 glukozlu PD solusyonu (2000 ml 3.86% w/v 38.6 mg/ml Dianeal PD4 glucose solo spectrum) karın içi organlara (bağırsak, mesane vb) zarar vermemeye dikkat edilerek yavaş bir şekilde enjekte edildi. Ratlar enjeksiyon tamamlandıktan sonra kafeslerine koyuldu, su ve yiyecek kısıtlaması yapılmadı. PD sıvısı karına verilmeden önce 0.dakika diyalizat örneği için ayrıldı (D_0).

Doksan dakika tamamlanmadan yaklaşık 10 dakika önce ratlara intraperitoneal olarak ketamin (80 mg/kg) ve ksilazin (40 mg/kg) verilerek anestezi sağlandıktan sonra karınları tıraşlandı. Ratlar tespit tahtasına bağlandı karınları batikonla silindikten sonra orta hattan insizyon ile açıldı, enjektör ile mevcut PD sıvısı boşaltıldı. Boşaltılan PD sıvısının miktarı her rat için ayrı ayrı kaydedildi, 10 ml diyalizat örneği ayrıldı ve net UF'leri aşağıdaki formülle hesaplandı;

Ultrafiltrasyon (UF) = Boşaltılan diyalizat miktarı (ml) – İP verilen 35 ml PD sıvısı

Kan örneği direkt olarak kalpten alındı. Yeterli kan gelmeyen bazı ratlarda vena kava dan da kan örneği alındı. Böylece diyalizat örnekleri 0. ve 90. dakikada, kan örneği ise 90.

dakikada alınmış oldu. Kan ve diyalizat örnekleri 5000 devirde 3 dk çevrildikten sonra serum ve diyalizat, epandorf tüplere alınarak –80 ^{o}C dondurucuda muhafaza edildi.

Diyalizat örneğinde ve kanda glukoz konsantrasyonu glukoz oksidaz yöntemi kullanılarak ölçüldü. Kan ve diyalizat üre, Na ve Cr enzimatik kinetik metod (Randox Laboratories, San Francisci, CA, U.S.A) ile, diyalizat proteini turbudimetrik yöntemle ölçüldü. Transport edilen üre azotu, Cr ve protein oranları diyalizat değerlerinin, plazma değerlerine bölünmesiyle (D/P) hesaplandı. $D/P_{protein}$ değerleri 1000 ile çarpılarak ifade edildi. Glukoz transport oranı $D/D0_{glukoz}$ hesaplanarak ölçüldü. D, diyalizattaki glukoz konsantrasyonu, D0 ise peritoneal kaviteye vermeden önceki diyaliz sıvısında bulunan glukoz konsantrasyonudur. Glukoz kitle transferi = İP verilen 35 ml PD sıvısı x D_0 glukoz - Boşaltılan diyalizat miktarı (ml) x D_{glukoz} formülü ile hesaplandı. D/P sodyum oranı (D/P_{Na}) peritoneal su transportu ve aquaporin fonksiyonunu değerlendirmek için hesaplandı.

- $D/D0_{glukoz}$ oranı, kontrol grubuna göre düşük, glukoz kitle transferi kontrol grubuna göre yüksek ise ve
- D/P_{Cr}, $D/P_{üre}$ ve $D/P_{protein}$ oranı, kontrol grubuna göre yüksek ise yüksek geçirgen periton zarı olarak kabul edildi.

HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Ratlar anestezi ile uyutulup PET için diyalizat ve kan örneği alındıktan sonra, abdominal duvarın ön sol yarısından parietal periton dokusu alındı. Periton dokusu alındıktan sonra ratlara ötenazi uygulandı. Periton dokusu alınırken enjeksiyon yerlerinden alınmamaya özen gösterildi. Histolojik değerlendirme için alınan periton dokusu hemen oda ısısındaki %10 formalin solüsyonu içinde fixe edildi. Işık mikroskobi için rutin doku takip işlemleri izlenerek periton parafin bloklar haline getirildi. Parafin bloklardan hemotoksilen-eozin boyama için 5 □ kalınlığında kesitler lam üzerine alındı, immünohistokimyasal boyama için 5 □ kalınlığında kesitler lizinli lamlar üzerine alındı. Ayrıca alınan yaklaşık 0,5x0,3 mm ebadında periton dokusu immünfloresan mikroskobunda değerlendirmek için 0,7x0,7 mm ebadındaki demir kasetlere konularak özel bir dondurucu olan tissue freezing medium içine gömüldü ve hemen –20 ^{o}C soğutucuya kaldırıldı. Donduktan sonra demir kasetlerden çıkarılıp aluminyum folyolara sarılan dokulardan frozen mikrotomunda 0.7 □kalınlığında kesitler alınarak lizinli camlara doku aktarıldı. Hazırlanan preparatlar güneş ışığından korumak için kapaklı plastik mape içinde saklandı.

a) Işık mikroskobu ile değerlendirme

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

- Fibrozis ödem ve kollajen yoğunluğunun değerlendirmesi ile var-yok olarak skorlandı .
- Mezotel hücreleri 40'lık büyütmede 5 farklı alanın ortalaması alınarak sayıldı ve normal ve azalmış olarak sınıflandırıldı.
- Mezotel hücreleri normal (düz hücreler) ve reaktif (düz hücrelerin kübik hale gelmesi) olarak
- Bazal lamina normal (eritrositlerin boyutu kadar) ve kalın olarak,
- Fibroblastik aktivite yok ve var olarak sınıflandırıldı.

Peritonun interstisyel kalınlığı mezotel tabakası ve kasın arasında kalan iç yüzeyinden ölçüldü. Peritonun interstisyel kalınlığı 2 araştırmacı tarafından farklı 14 alanın ortalaması alınarak hesaplandı.

b) İmmünfloresan mikroskop ile değerlendirme

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

c) İmmunohistokimyasal inceleme

Parafine gömülü dokulardan 5 μm kalınlığında kesitler alındı. Lama alınmış dokular 60 °C etüvde 1 saat bekletildi. Etüvden çıkarılan dokular 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 (H_2O_2) uygulaması: Dokulara % 3'lük H_2O_2 damlatılıp 10 dk bekletildi. Distile suda 5 dk yıkandı. Ardından 5 dk PBS'de yıkandı.

4) Primer antikor uygulaması: Pre-blocking solusyonu damlatılıp 10 dk bekletildi. Lam silkelendi.

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

5) Biotin uygulaması: Sekonder antikor damlatıldı, 10 dk bekletildi. Ardından 10 dk PBS'de yıkandı.

6) Streptavidin uygulaması: Peroksidaz strepavidin 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.

Boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile kollajen-III ve kollajen-IV antikorları pozitifliği yönünden negatif, 1 pozitif, 2 pozitif, 3 pozitif olarak skorlandı.

MEZENKİMAL KÖK HÜCRE PASAJLANMASI

Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)'nde rat kemik iliğinden elde edilen GFP işaretli MKH'ler -80^oC'de azot tankında saklandı. Pasajlama işleminden önce çözdürme işlemi yapıldı.

Çözdürme işlemi:

Daha önceden dondurulan hücrelerin kültür ortamına almak 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.

İşleme başlamadan önce;

- Medium önceden hazırlandı.
- Su banyosu 37 ^{o}C ye ısınmış hale getirildi

Bütün bu hazırlıklardan sonra çözdürme işlemine geçilebilir, aksi takdirde yapılacak her gecikme ve manipulasyon hatası hücrelerin canlılık yüzdelerini bir o kadar riske sokar hatta hücrelerin tamamen yitirilmesine neden olabilir.

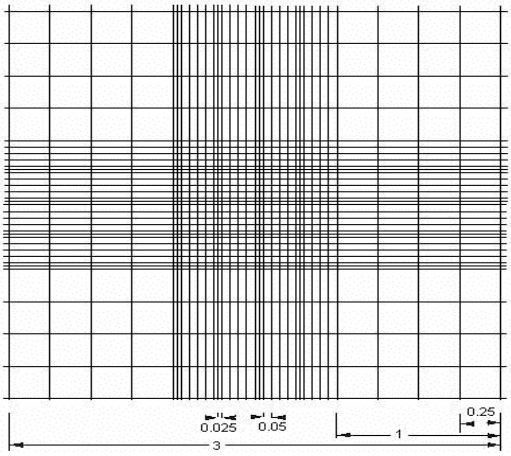
Çözdürme işleminde mümkün mertebe hızlı ve nazik olmak gereklidir. Çünkü hücreler oldukça frajildirler.

Çözdürme ve pasajlama işleminin basamakları:

- Azottan çıkarılan kriyotüp son derece hızlı bir şekilde 37^{o}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 (15ml) aktarıldı ve içerisine 5-6 ml normal medium yavaşca kondu.
- 800 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı. Bu devirde yapılmasının sebebi hücrelerin son derece frajil olmasından dolayıdır.
- Santrifüjden alınan falkondaki süpernatant nazik şekilde çekildi.
- Üzerine normal mediumdan 3-4 ml eklendi ve hafif şekilde pipetaj yapıldı.
- Tekrar 800 rpm de 5dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
- Daha sonra 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 solusyon (PBS) ile 1-2 kez yıkandı. Sonra 3 güne bir yıkama yapıldı ve medium değiştirildi. Takibi ise günlük yapıldı.
- %70-80 konfluense erişmiş hücreler pasajlama için ideal olarak kabul edildi.
- Hücreler tripsinzasyon öncesi Ca, Mg Free PBS ile yıkandı.
- Daha sonra 2 ml tripsin (%0.25) flaska eklendi ve inkübatöre kaldırıdı, 2-3 dk süreyle beklendi ve eğer hücreler kalkmamışsa inkubatörden alınan flaska hafif hafif vuruldu. Bu işlem, hücrelerin kalkması için fiziki destek sağlanması için yapıldı.
- 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 5cc taze medium eklendi ve vortexlendi.
- Tekrar santrifüj yapıldı (1200 rpm- 5 dk) ve süpernatant atıldı. Sonra 2ml medium ilave edildi ve pipetaj yapılarak hücre sayımı ve canlılığı için 100 mikrolitre alınarak ependorfa kondu. Geri kalan kısmı flaksa 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 demektir. Biz ölmemiş hücreler üzerinden hesap yaptık.

Hücre sayısı = Sayılan hücre x Dilüsyon oranı (2ml) x 10.000 olarak hesap yapıldı. Yani 50 hücre sayıldı ise 2,5x 10^6 hücre olacaktır. Şekil 11'de thoma lamının mikroskobik görünümü şematize edilmiştir.



Şekil 11: Thoma lamının esası, 0,1 mm3 hacimde sayım yapılmasıdır. 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi = 0,05 mm X 0,05 mm X 0,1 mm = 0,00025 mm^3 = 1/4.000 mm^3'dür. Bir sayım alanında 16 X 25 = 400 küçük kare olduğuna göre toplam sayım hacmi = 0,00025 mm3 X 400 = 0,1 mm^3'dür.

- Daha sonra hücreler inkubatöre kaldırıldı, 24 saat sonunda kontrol edildi. Pasaj zamanına kadar mediumda bırakıldı.
- 3. pasajda hücreler tripsinizasyondan sonra iki kere yıkanarak kullanıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Araştırma verilerinin değerlendirilmesinde SPSS 17.0 istatistik paket programından yararlanıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine Shapiro-Wilk Normallik Testi ile bakıldı. Normal dağılım gösteren parametreler ortalama ± SD, anormal dağılım gösteren parametreler ise ortanca (minimum-maksimum) olarak ifade edildi.

Normal dağılım gösteren değişkenlerde iki grup için karşılaştırmalarda Bağımsız iki örnek t testi, 3 ve daha fazla grup için karşılaştırmalarda Tek Yönlü Varyans Analizi kullanılmıştır. Tek Yönlü Varyans Analizi sonucu fark çıkan grupların karşılaştırılması Tukey Testi ile yapıldı.

Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde ise iki grup için karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi, 3 ve daha fazla grup için karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis H Testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis H Testi sonucu fark çıkan grupların karşılaştırılması Dunn's Yöntemi ile yapıldı.

Gruplar arası oranların karşılaştırılmasında Ki kare testi kullanıldı. Parametreler arası ilişki araştırılırken normal dağılım gösteren parametrelerede Pearson korelasyon katsayısı, anormal dağılım gösteren parametrelerde Spearman korelasyon katsayısı kullanıldı. Tüm istatistiksel analizlerde $p<0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya, kontrol grubunda 10, çalışma grubunda 67 rat olmak üzere toplam 77 rat alındı.

- Çalışma grubundaki ratlardan 7'si intraperitoneal PD sıvısının uygulandığı 6 haftalık süreçte öldü ve çalışmada 60 rat değerlendirildi.
- Kontrol grubundaki ratlara 6 hafta sonunda PET yapılırken ratlardan biri PD sıvısı cilt altına verildiği için, ikincisi ise disseksiyon yapıldığında bağırsak perforasyonu gelişmiş olduğu görüldüğünden çalışmadan çıkarıldı ve kontrol grubunda 8 rat kalmış oldu.

Ratların gruplara göre dağılımı Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I: Ratların gruplara göre dağılımı

Gruplar	Sayı
Kontrol	8
PD	8
MKH-1	8
P-1	8
MKH-2	9
P-2	9
MKH-3	9
P-3	9
Toplam	68

1- PERİTON ZARINDA GELİŞEN HİSTO-PATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

a) Işık mikroskobu ile değerlendirme

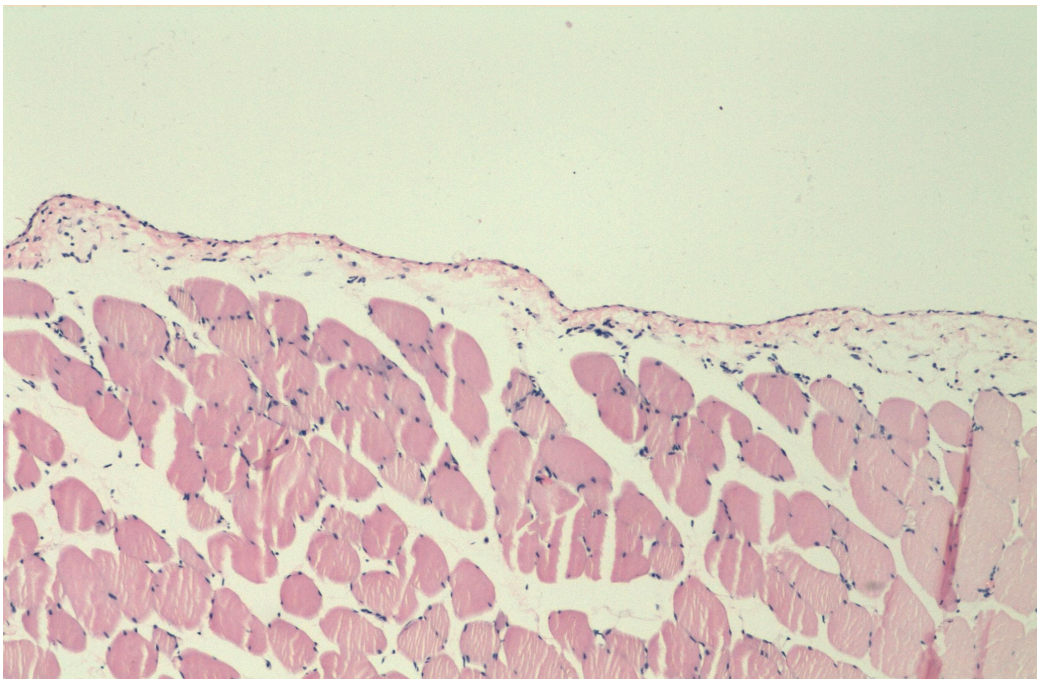
Periton boşluğuna %3.86 glukozlu PD sıvısının 6 hafta süre ile verilmesi sonucunda peritonun yapısında PD grubunda, kontrol grubuna göre önemli değişiklikler olduğu görüldü.

- PD grubunun submezotelyal alan kalınlığı, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek tespit edildi. (P=0,01, Tablo II).
- Periton zarında meydana gelen diğer histopatolojik değişiklikler semi kantitatif olarak değerlendirildiğinde;
    - Mezotel hücre sayısı, PD grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı (P<0.05, Tablo II).
    - PD grubunda, periton zarında inflamasyon ve neovaskülarizasyon kontrol grubuna göre daha fazlaydı (P<0.05, Tablo II)

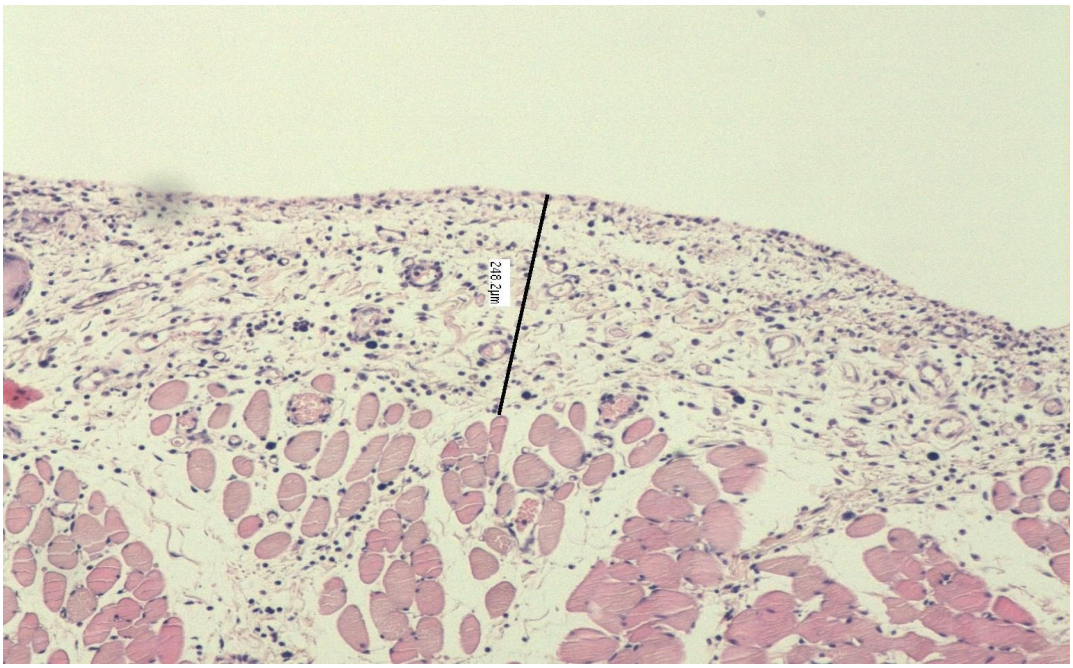
Tablo II: PD ve kontrol gruplarında peritonda histopatolojik değişiklikler

Değişken	**Çalışma grupları**		
	Kontrol (n=8)	**PD** (n=8)	**P**
Submezotelyal kalınlık (µm)	66.3 ± 24.8	132,9 ± 40,1	P=0.01
Hücre morfolojisi			P>0,05
Normal	8	5	
Reaktif	0	3	
Bazal lamina			P>0,05
Normal	8	5	
Kalın	0	3	
Fibrozis			P>0,05
Var	1	2	
Yok	7	6	
Fibroblastik aktivite			P>0,05
Var	2	3	
Yok	6	5	
İnflamasyon			P<0,05
Var	0	4	
Yok	8	4	
Neovaskülarizasyon			0,059
Var	1	5	
Yok	7	3	

Şekil 12 ve Şekil 13'de PD ve kontrol gruplarının histopatolojik görünümleri arasındaki farklar görülmektedir.



Şekil 12: Kontrol grubunun periton dokusunun histolojik görünümü (x10)



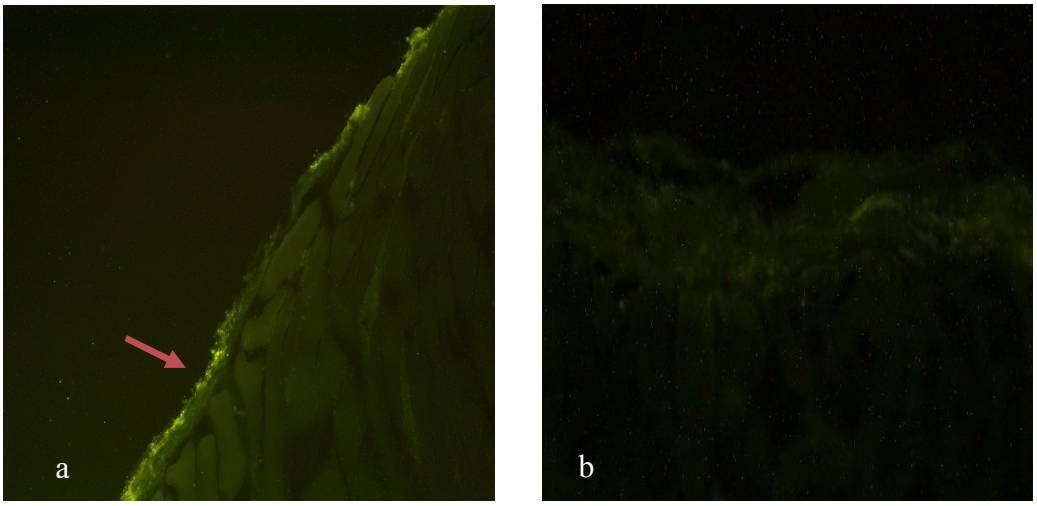
Şekil 13: PD grubunun periton dokusunun patolojik görünümü, submezotelyal kalınlıkta kontrol grubuna göre artış ve periton dokusunda artmış inflamatuar hücreler görünmektedir. (x10)

b) İmmünfloresan mikroskop ile değerlendirme

Green flourescent protein ile işaretli MKH verildikten 1, 2, ve 3 hafta sonra özel yöntemle dondurulmuş periton dokusundan alınan kesitler direkt olarak immünfloresan mikroskopta incelendi.

- GFP işaretli MKH'lerin mezotel hattı boyunca floresan verdiği görüldü.
- Plasebo gruplarında ise mezotel hattı boyunca floresan parlama görülmedi.

Şekil 14'de MKH grubunda MKH'lerin yapıştığı ve floresan verdiği, plasebo grubunun ise floresan vermediği görülmektedir.



Şekil 14: a) Mezotel hattı boyunca floresan veren MKH'ler
b) Plasebo grubunda florasan veren görünüm yok

c) İmmün histokimyasal değerlendirme

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

d) Mezenkimal kök hücrenin bozulmuş peritona etkileri

1.hafta: MKH-1, P-1, PD ve kontrol gruplarının submezotelyal kalınlıkları kıyaslandığında;

- MKH-1 grubunun submezotelyal kalınlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yok iken, PD ve P-1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($P<0.05$, Tablo III).

- Yine P-1 grubunun submezotelyal kalınlık değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek iken ($P<0.05$, Tablo III), PD grubu ile arasında anlamlı farklılık belirlenmedi.
- MKH-1 grubu ile PD grubu arasında inflamasyon varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var iken MKH-1 ile P-1 ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık yoktu. Yine inflamasyon açısından P-1 grubunun, kontrol ve PD grupları ile arasında önemli bir fark bulunmadı.
- Histopatolojik olarak hücre morfolojisi, bazal lamina kalınlığı, fibrozis, fibroblastik aktivite ve neovaskülarizasyon değerlendirildiğinde gruplar arasında fark bulunmadı.

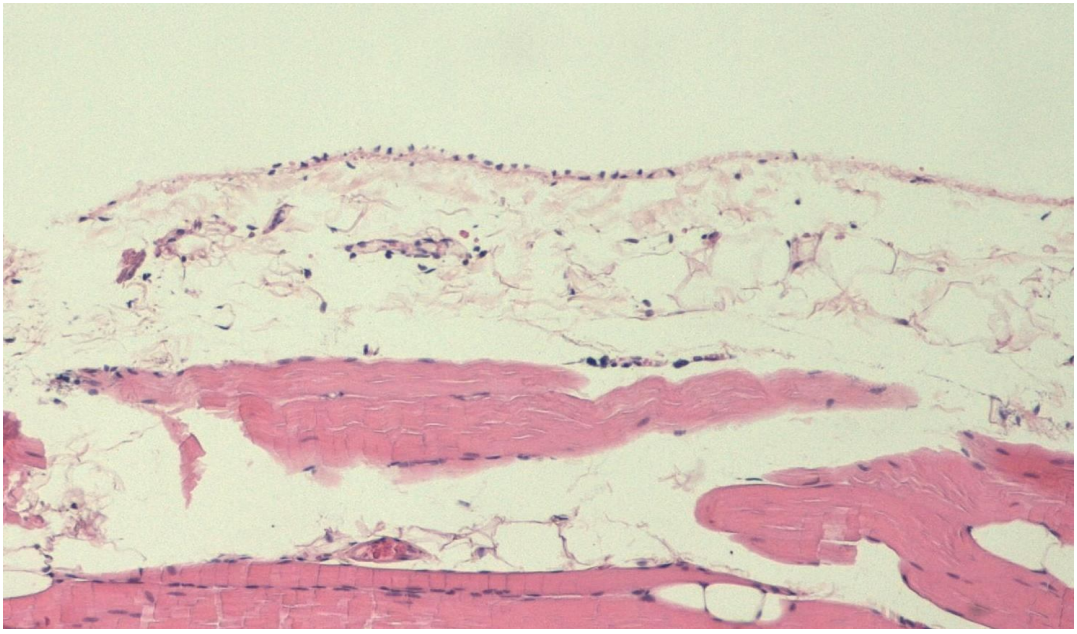
Tablo III'de çalışma gruplarının 1.hafta histopatolojik değerlendirmeleri, Şekil 15 ve Şekil 16'da 1. hafta MKH ve plasebo gruplarının patolojik görünümleri verilmiştir.

Tablo III: Çalışma gruplarının 1.hafta histopatolojik değerlendirmeleri

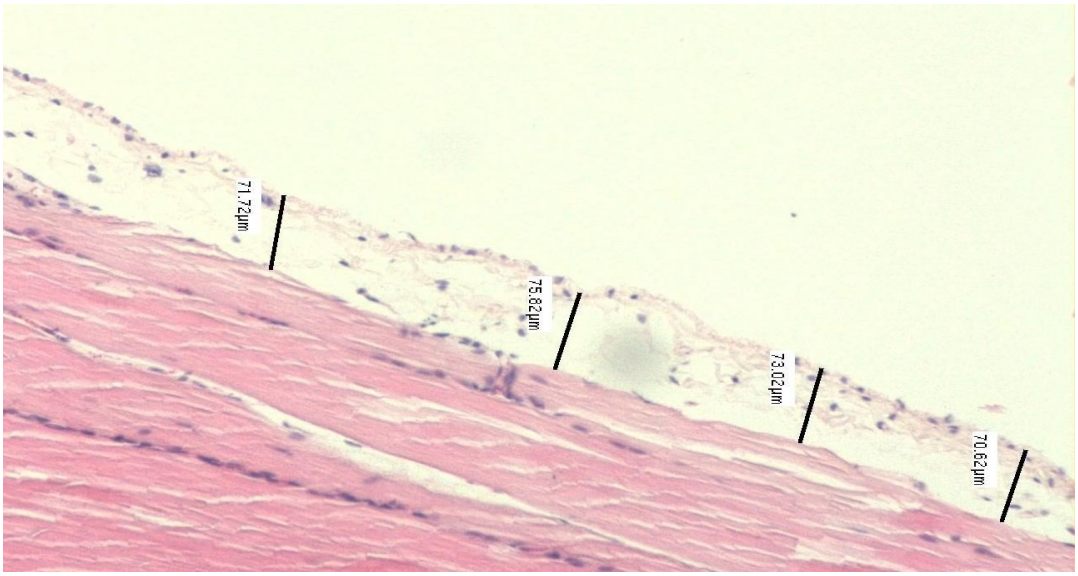
Değişken	**Çalışma grupları**			
	Kontrol n=8	**PD n=8**	**MKH-1 n=8**	**P-1 n=8**
Submezotelyal kalınlık (µm)	66.3 ± 24.8	132,9 ± 40,1[a,b]	84,9 ± 15,1	153,7 ± 85,3[a,b]
Hücre morfolojisi				
Normal	8	5	7	6
Reaktif	0	3	1	2
Bazal lamina				
Normal	8	5	7	7
Kalın	0	3	1	1
Fibrozis				
Var	1	2	2	1
Yok	7	6	6	7
Fibroblastik aktivite				
Var	2	3	2	4
Yok	6	5	6	4
İnflamasyon				
Var	0	4[a,b]	0	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] $p<0.05$, MKH-1 grubu ile kıyaslandığında



Şekil 15: P-1 grubunun periton dokusunun patolojik görünümü



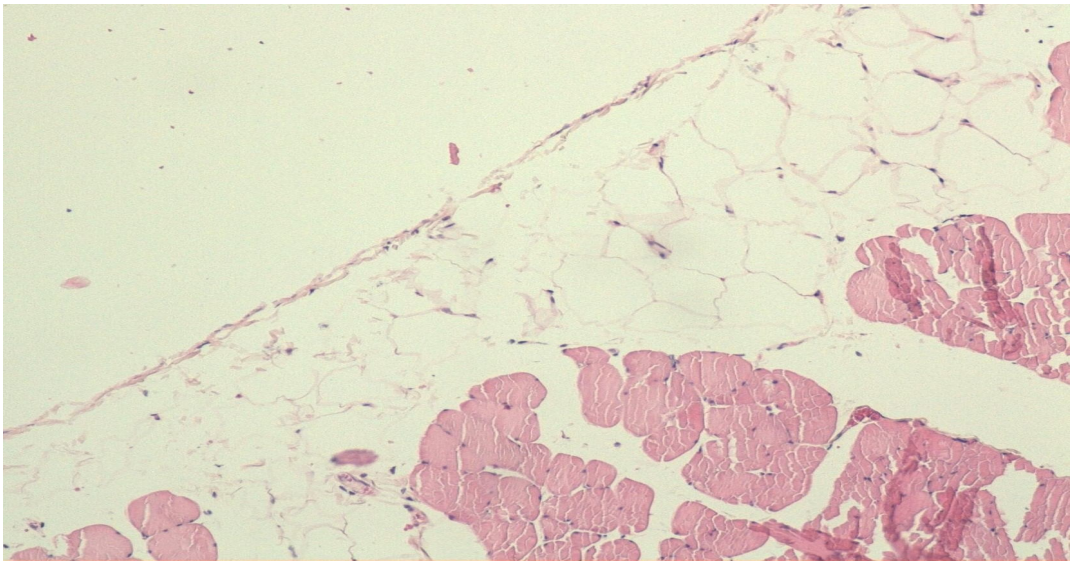
Şekil 16: MKH-1 grubunun periton dokusunun patolojik görünümü

2.hafta: MKH-2, P-2, PD ve kontrol gruplarının submezotelyal kalınlıkları kıyaslandığında;

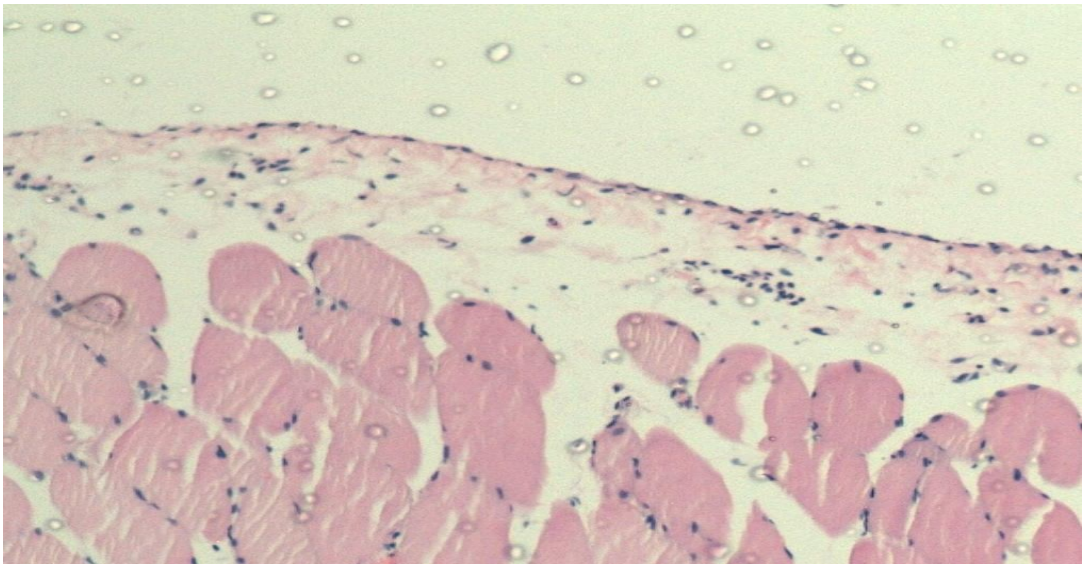
- MKH-2 grubunun submezotelyal kalınlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yok iken, PD ve P-2 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($P<0.05$, Tablo IV).

- Yine P-2 grubunun submezotelyal kalınlık değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek iken (P<0.05, Tablo IV), PD grubu ile arasında anlamlı farklılık belirlenmedi.
- MKH-2 grubu ile PD, kontrol ve P-2 grupları arasında diğer histopatolojik değerlendirmeler açısından farklılık yok iken, aynı şekilde P-2 grubu ile PD ve kontrol grupları arasında da fark yoktu (p>0,05).

Şekil 17 ve Şekil 18'de 2. hafta MKH ve plasebo gruplarının patolojik görünümleri, Tablo IV'de çalışma gruplarının 2.hafta histopatolojik değerlendirmeleri, verilmiştir.



Şekil 17: P-2 grubunun periton dokusunun histopatolojik görünümü (x10)



Şekil 18: MKH-2 grubunun periton dokusunun histopatolojik görünümü (x10)

Tablo IV: Çalışma gruplarının 2.hafta histopatolojik değerlendirmeleri

Değişken	Çalışma grupları			
	Kontrol n=8	**PD n=8**	**MKH-2 n=9**	**P-2 n=9**
Submezotelyal Kalınlık (µm)	66.3 ± 24.8	132,9 ± 40,1[a,b]	69,7 ± 9,3	140,7 ± 30,1[a,b]
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] $p<0.05$, MKH-2 grubu ile kıyaslandığında

3.hafta: MKH-3, P-3, PD ve kontrol gruplarının submezotelyal kalınlıkları kıyaslandığında;

- MKH-3 grubunun submezotelyal kalınlığının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılığı yok iken, PD ve P-3 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($P<0.05$, Tablo V).
- Yine P-3 grubunun submezotelyal kalınlık değerleri, kontrol grubuna göre ve PD grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştı ($P<0.05$, Tablo V).
- MKH-3 grubu ile PD, kontrol ve P-3 grupları arasında diğer histopatolojik değerlendirmeler açısından farklılık yok iken, P-3 grubunda kotrol ve MKH-3 grupları ile kıyasla fibrozisde anlamlı artış bulundu, ayrıca kontrol grubuna göre

neovaskülarizasyonda da anlamlı artış vardı (P<0.05), PD grubu ile ise arasında fark yoktu (p>0,05).

Tablo V'de çalışma gruplarının 3.hafta histopatolojik değerlendirmeleri, Şekil 19 ve Şekil 20'da 3. hafta MKH ve Plasebo gruplarının patolojik görünümleri verilmiştir.

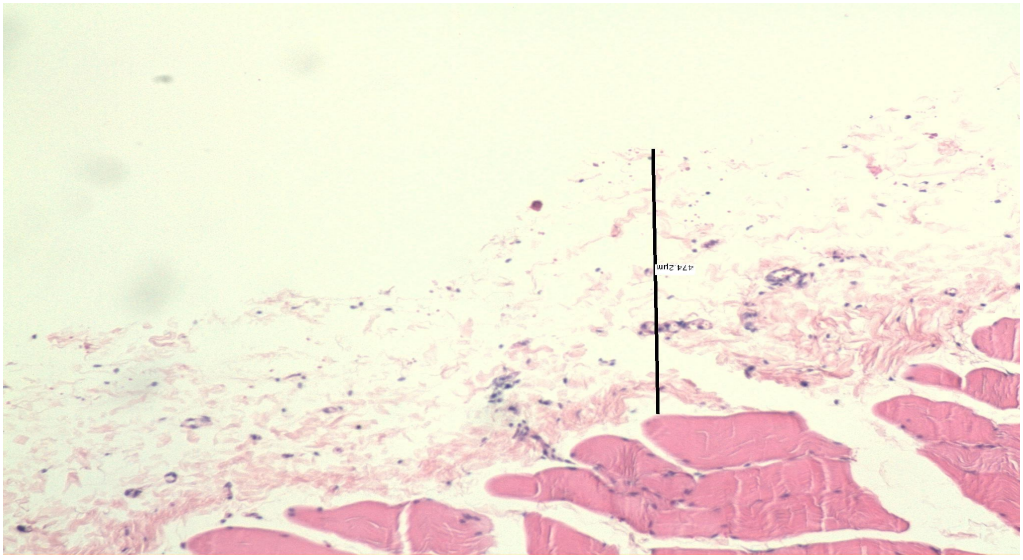
Tablo V: Çalışma gruplarının 3.hafta histopatolojik değerlendirmeleri

Değişken	**Çalışma grupları**			
	Kontrol n=8	**PD n=8**	**MKH-3 n=9**	**P-3 n=9**
Submezotelyal Kalınlık (µm)	66.3 ± 24.8	132,9 ± 40,1[a,b]	99,0 ± 57,1	308,3 ± 114,8[a,b,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,b]
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

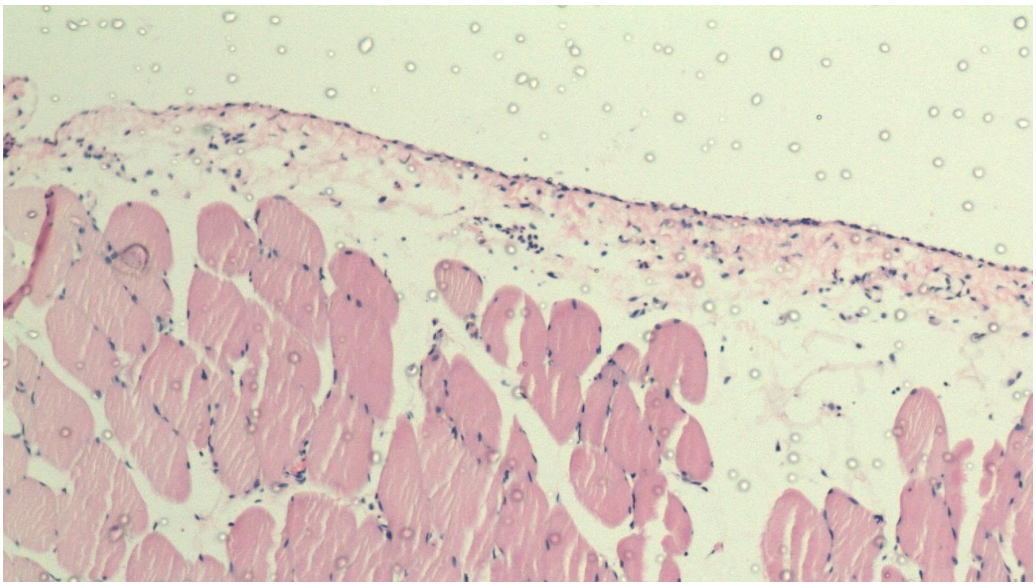
[a] p<0.05, kontrol grubu ile kıyaslandığında

[b] p<0.05, MKH-3 grubu ile kıyaslandığında

[c]P<0.05, PD grubu ile kıyaslandığında



Şekil 19: P-3 grubunun periton dokusunun patolojik görünümü



Şekil 120: MKH-3 grubunun periton dokusunun patolojik görünümü

e) Plasebo ve MKH gruplarının 1.hafta, 2.hafta ve 3. haftalarında patolojik değişikliklerin değerlendirmesi

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 VI).

Tablo VI: MKH gruplarının histopatolojik değerlendirmeleri

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,b]	84,9 ± 15,1	69,7 ± 9,3	99,0 ± 57,1
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[c]	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, MKH-1,MKH-2 ve MKH-3 grupları ile kıyaslandığında

[c]P<0.05, PD grubu ile kıyaslandığında

- P-3 grubunun submezotelyal kalınlığı, kontrol, PD, P-1 ve P-2 grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmıştı (P<0.05)
- P-3 grubunda, P-1'e kıyasla fibroziste artış bulundu (P<0,05, Tablo VII). Plasebo grupları arasında diğer histopatolojik özellikler yönünden farklılık bulunmadı.

Tablo VII: Plasebo gruplarının histopatolojik değerlendirmeleri

Değişken	Çalışma grupları				
	Kontrol n=8	**PD n=8**	**P-1 n=8**	**P-2 n=9**	**P-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, PD, P-2 ve P-3 grupları ile kıyaslandığında

[b] $p<0.05$, P-1 grubu ile kıyaslandığında

2- PERİTON ZARINDA GELİŞEN FONKSİYONEL DEĞİŞİKLİKLER

a) Peritonun geçirgenliğinde meydana gelen değişiklikler

Periton boşluğuna %3.86 glukozlu PD sıvısının 6 hafta süre ile verilmesi sonucunda peritonunun geçirgenliğinde PD grubunda, kontrol grubuna göre önemli değişiklikler olduğu görüldü.

Ultrafiltrasyon:

- PD grubunda UF miktarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($P<0.05$, Tablo VIII).

$D/D0_{glukoz}$, $D/P_{üre}$, D/P_{Na}, $D/P_{Cr,}$ oranları ile glukoz kitle transferi değerleri:

- PD grubunun $D/D0_{glukoz}$, oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük, $D/P_{üre}$, D/P_{Na}, $D/P_{Cr,}$ oranları ile glukoz kitle transferi değerleri ise anlamlı olarak yüksek saptandı ($P<0,05$, Tablo VIII).

Bu bulgular PD grubunun peritonunda yüksek geçirgenliğin olduğunu göstermekteydi.

b) Mezenkimal kök hücrenin periton geçirgenliği üzerine etkisi

Tablo VIII: PD ve kontrol gruplarında peritonda geçirgenliğin değerlendirilmesi

Değişken	**Çalışma grupları**		
	Kontrol (n=8)	**PD** (n=8)	**P**
UF (ml) median (min – max)	4 (-2 – 10)	-3 (-24 – 6)	0.01
$D/P_{üre}$ **(mean ± SD)**	0,40±0,05	0,59±0,14	0.03
D/P_{Cr} (mean ± SD)	0,65±0,07	0,88±0,15	0.02
$D/P_{protein}$(mean ± SD)	114,8±6,9	125,38±37,5	>0.05
D/P_{Na} (mean ± SD)	0,78±0,02	0,84±0,03	0.03
$D/D0_{glukoz}$(mean ± SD)	1,45±0,22	0,65±0,35	<0.001
Glukoz kitle transferi (mean ± SE)	-9649.3 ± 7985.6	12005.2 ± 5911.5	0.047

1.hafta:

MKH ve plasebo gruplarının 1.hafta UF miktarları ve diğer periton geçirgenlik parametreleri ($D/D0_{glukoz}$, $D/P_{üre}$, D/P_{Na}, $D/P_{Cr,}$ oranları ile glukoz kitle transferi) PD ve kontrol grubu ile kıyaslandığında;

Ultrafiltrasyon:

- MKH-1 grubunun UF miktarlarının, kontrol, PD ve P-1 grubuna göre artmış olduğu belirlendi ($P<0.05$). P-1 grubunun UF miktarları ise kontrol grubuna göre azalmış ve PD grubuna göre artmış görünse de aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($P>0.05$)

$D/D0_{glukoz}$ oranı ve glukoz kitle transferi:

- MKH-1 grubunda, P-1 ve PD grubuna kıyasla; $D/D0_{glukoz}$ oranının yüksek, glukoz kitle transferinin ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük olduğu belirlendi (P<0,05).
- P-1 grubunun $D/D0_{glukoz}$ oranı kontrol ve MKH-1 gruplarına kıyasla yüksek iken, PD grubu ile aralarında fark yoktu.

$D/P_{üre}$ oranı:

- MKH-1 ve P-1 gruplarının her ikisinde de $D/P_{üre}$ oranı, kontrol grubuna göre yüksekti (P<0.05), PD grubu ile ise aralarında fark yoktu (P>0.05)

D/P_{Na}, $D/_{Pprotein}$ ve D/P_{Cr} oranları:

- MKH-1 ve P-1 grupları, PD ve kontrol grupları ile kıyaslandığında D/P_{Na}, $D/_{Pprotein}$ ve D/P_{Cr} oranları açısından aralarında istatistiksel fark yoktu (P>0.05)

Bu bulgular MKH verilmesini takiben 1.haftada, periton geçirgenliğinin kontrol grubu ile önemli farklılığının olmadığını, plasebo verilen grupta ise PD grubu ile benzer olarak yüksek geçirgenliğin devam ettiğini göstermektedir. Çalışma gruplarının 1.hafta periton geçirgenliğinin değerlendirilmesi Tablo IX'da gösterilmiştir.

Tablo IX : Çalışma gruplarının 1.hafta periton geçirgenliğinin değerlendirilmesi

Değişken	**Çalışma grupları**			
	Kontrol (n=8)	**PD (n=8)**	**MKH-1 (n=8)**	**P-1 (n=8)**
UF (ml) median (min-max)	4 (-2 – 10)	-3 (-24 – 6)[a]	10,8 (8 – 13)[a,b,c]	1.5 (-11 – 9)
$D/P_{üre}$ (mean ± SD)	0,40±0,1	0,59±0,1[a]	0,49±0,1[a]	0,51±0,4[a]
D/P_{Cr} (mean ± SD)	0,65±0,1	0,88±0,2[a]	0,77±0,23	0,74±0,2
$D/P_{protein}$ (mean ± SD)	114,8±7	125,38±38	124,01±10,7	114,97±8
D/P_{Na} (mean ± SD)	0,78±0,1	0,84±0,1[a]	0,72±0,26	0,73±0,1
$D/D0_{glukoz}$ (mean ± SD)	1,45±0,2	0,65±0,4[a]	1,26±0,31[b,c]	0,87±0,2[a]
Glukoz kitle transferi (mean ± SE)	-9649 ± 7986	12005 ± 5911[a]	-20542±6404[b,c]	7335 ±3648

[a] p<0.05, kontrol ile kıyaslandığında
[b] p<0.05, PD grubu ile kıyaslandığında
[c]P<0.05, P-1 grubu ile kıyaslandığında

2.hafta:

MKH ve plasebo gruplarının 2.hafta UF miktarları ve diğer periton geçirgenlik parametreleri ($D/D0_{glukoz}$, $D/P_{üre}$, D/P_{Na}, $D/P_{Cr,}$ oranları ile glukoz kitle transferi) PD ve kontrol grubu ile kıyaslandığında;

Ultrafiltrasyon:

- MKH-2 grubunun UF miktarlarının, PD ve P-2 grubuna göre artmış olduğu belirlendi ($P<0.05$), kontrol grubu ile ise aralarında fark bulunmadı ($P>0.05$)
- P-2 grubunun UF miktarları kontrol grubuna kıyasla belirgin azalmıştı ve PD grubu ile ise aralarında anlamlı farklılık bulunmadı ($P>0.05$)

$D/D0_{glukoz}$ oranı ve glukoz kitle transferi:

- MKH-2 grubunda, P-2 ve PD grubuna kıyasla; $D/D0_{glukoz}$ oranının yüksek, glukoz kitle transferinin ise istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmış olduğu belirlendi ($P<0,05$).
- P-2 grubunun $D/D0_{glukoz}$ oranı kontrol grubuna kıyasla düşük iken, glukoz kitle transferi belirgin yüksekti ($P<0.05$), PD grubu ile aralarında fark yoktu.

$D/P_{üre}$ oranı:

- MKH-2 ve P-2 gruplarının her ikisinde de $D/P_{üre}$ oranı, kontrol grubuna göre yüksekti ($P<0.05$), PD grubu ile ise aralarında fark yoktu ($P>0.05$)

D/P_{Cr} oranı:

- MKH-2 grubunda D/P_{Cr} oranı, P-2 ve PD grupları ile kıyaslandığında anlamlı ölçüde azalmıştı ($P<0.05$), kontrol grubu ile ise aralarında fark yoktu ($P>0.05$)**.**
- P-2 ve PD gruplarında D/P_{Cr} oranı açısından anlamlı farklılık yoktu.

D/P_{Na} oranı:

- MKH-2 ve P-2 gruplarında, PD grubuna kıyasla D/P_{Na} oranında azalma bulunurken ($P<0.05$), kontrol grubuna kıyasla fark bulunmadı ($P>0,05$)

$D/P_{protein}$ oranı:

- P-2 grubunda $D/P_{protein}$ oranı, kontrol grubuna göre anlamlı yüksek iken ($P<0.05$), PD ve MKH-2 grupları ile kıyaslandığında anlamlı farklılık bulunmadı.

Bu bulgular MKH verilmesini takiben 2.haftada, periton geçirgenliğinin kontrol grubu ile önemli farklılığının olmadığını, plasebo verilen grupta ise PD grubu ile benzer olarak yüksek geçirgenliğin devam ettiğini göstermektedir. Çalışma gruplarının 2.hafta periton geçirgenliğinin değerlendirilmesi Tablo X'da gösterilmiştir.

Tablo X: Çalışma gruplarının 2.hafta periton geçirgenliğinin değerlendirilmesi

Değişken	Çalışma grupları			
	Kontrol (n=8)	**PD (n=8)**	**MKH-2 (n=9)**	**P-2 (n=9)**
UF (ml) median (min-max)	4 (-2 – 10)	-3 (-24 – 6)[a]	4.1 (-10– 14)[b,c]	-4.2 (-18 – 7)[a]
D/P $_{üre}$ (mean ± SD)	0,40±0,1	0,59±0,1[a]	0,53±0,13[a]	0,49±0,09[a]
D/P$_{Cr}$ (mean ± SD)	0,65±0,1	0,88±0,2[a]	0,63±0,14 [b,c]	0,83±0,14[a]
D/P$_{protein}$ (mean ± SD)	114,8±7	125,38±38[a]	120,2±13,1	125,1±7,3[a]
D/P$_{Na}$ (mean ± SD)	0,78±0,1	0,84±0,1[a]	0,76±0,05[b]	0,76±0,06[b]
D/D0$_{glukoz}$ (mean ± SD)	1,45±0,2	0,65±0,4[a]	1,33±0,33 [b,c]	0,64±0,2[a]
Glukoz kitle transferi (mean ± SE)	-9649 ± 7986	12005 ± 5911[a]	-5556±2375 [b,c]	17724±3650[a]

[a] p<0.05, kontrol ile kıyaslandığında
[b] p<0.05, PD grubu ile kıyaslandığında
[c]P<0.05, P-2 grubu ile kıyaslandığında

3.hafta:

MKH ve plasebo gruplarının 3.hafta UF miktarları ve diğer periton geçirgenlik parametreleri ($D/D0_{glukoz}$, $D/P_{üre}$, D/P_{Na}, D/P_{Cr}, oranları ile glukoz kitle transferi) PD ve kontrol grubu ile kıyaslandığında;

Ultrafiltrasyon:

- MKH-3 grubunun UF miktarlarının, PD ve P-3 grubuna göre artmış olduğu belirlendi (P<0.05), kontrol grubu ile ise aralarında fark bulunmadı (P>0.05)
- P-3 grubunun UF miktarları kontrol grubuna kıyasla azalmış ve PD grubuna kıyasla artmış ise de aralarında anlamlı farklılık bulunmadı (P>0.05)

$D/D0_{glukoz}$ oranı ve glukoz kitle transferi:

- MKH-3 grubunda, P-3 ve PD grubuna kıyasla; $D/D0_{glukoz}$ oranı anlamlı ölçüde yüksek olarak bulundu. Glukoz kitle transferinde ise PD grubuna kıyasla azalma bulunmuş iken, P-3 grubu ile istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (P<0,05).
- P-3 grubunun $D/D0_{glukoz}$ oranı kontrol grubuna kıyasla düşük iken, belirgin fark yoktu (P>0.05), PD grubuna kıyasla ile ise $D/D0_{glukoz}$ oranı ve glukoz kitle transferi açısından aralarında anlamlı fark yoktu.

$D/P_{üre}$ oranı:

- MKH-3 ve P-3 gruplarının her ikisinde de $D/P_{üre}$ oranı, kontrol grubuna göre yüksekti ($P<0.05$), PD grubu ile ise aralarında fark yoktu ($P>0.05$)

D/P_{Cr} oranı:

- MKH-3 grubunda D/P_{Cr} oranı, P-3 ve PD grupları ile kıyaslandığında anlamlı ölçüde azalmıştı ($P<0.05$), kontrol grubu ile ise aralarında fark yoktu**.**
- P-2 grubu, PD grubu ile kıyaslandığında D/P_{Cr} oranı açısından anlamlı farklılık yok iken, kontrol grubu ile anlamlı farklılık vardı ($P<0.05$).

D/P_{Na} oranı:

- MKH-3 grubunun, D/P_{Na} oranı kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde artmış iken, PD ve P-3 grupları ile kıyaslandığında fark bulunmadı.

$D/P_{protein}$ oranı:

- MKH-3 grubunda $D/P_{protein}$ oranı, P-3 grubuna göre düşük bulundu ($P<0.05$), PD ve kontrol grubu ile ise arada fark bulunmadı.

Çalışma gruplarının 3.hafta periton geçirgenliğinin değerlendirilmesi Tablo XI'de gösterilmiştir.

Tablo XI: Çalışma gruplarının 3.hafta periton geçirgenliğinin değerlendirilmesi

Değişken	**Çalışma grupları**			
	Kontrol (n=8)	**PD (n=8)**	**MKH-3 (n=9)**	**P-3 (n=9)**
UF (ml) median (min-max)	4 (-2 – 10)	-3 (-24 – 6)[a]	7.8 (5 – 10)[b,c]	1 (-17 – 12)
$D/P_{üre}$ (mean ± SD)	0,40±0,1	0,59±0,1[a]	0,57±0,11[a]	0,58±0,09[a]
D/P_{Cr} (mean ± SD)	0,65±0,1	0,88±0,2[a]	0,73±0,15[b,c]	0,85±0,12[a]
$D/P_{protein}$ (mean ± SD)	114,8±7	125,38±38[a]	119,4±8,4[c]	129,9±10,6[a]
D/P_{Na} (mean ± SD)	0,78±0,1	0,84±0,1[a]	0,82±0,03[a]	0,81±0,03
$D/D0_{glukoz}$ (mean ± SD)	1,45±0,2	0,65±0,4[a]	1,31±0,41[b,c]	0,90±0,12[a]
Glukoz kitle transferi (mean ± SE)	-9649 ± 7986	12005 ± 5911[a]	-5170±2759[b]	1752±4006

[a] $p<0.05$, kontrol ile kıyaslandığında,
[b] $p<0.05$, PD grubu ile kıyaslandığında,
[c] $P<0.05$, P-3 grubu ile kıyaslandığında

c) Plasebo ve MKH gruplarının 1.hafta, 2.hafta ve 3. haftalarında periton geçirgenliklerinin karşılaştırması

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

- MKH grubunun 1.hafta UF miktarı, 2.hafta ve 3.hafta UF miktarlarına göre anlamlı yüksek bulundu ($P<0.05$).
- Yine MKH grubunun 1.hafta glukoz kitle transferi, 2.hafta ve 3.hafta değerlerine göre anlamlı ölçüde düşüktü ($P<0.05$)

MKH gruplarının, 1.hafta, 2.hafta ve 3.hafta periton geçirgenliklerinin değerlendirilmeleri Tablo XII'de verilmiştir.

Tablo XII: MKH gruplarının1.hafta, 2.hafta ve 3.hafta periton geçirgenliklerinin değerlendirilmeleri

Değişken	**Çalışma grupları**		
	MKH-1 (n=8)	**MKH-2 (n=9)**	**MKH-3 (n=9)**
UF (ml) median (min-max)	10,8 (8- 13)	4.1 (-10– 14)[a]	7.8 (5 – 10)[a]
$D/P_{üre}$ (mean ± SD)	0,49±0,1	0,53±0,13[a]	0,57±0,11
D/P_{Cr} (mean ± SD)	0,77±0,23	0,63±0,14	0,73±0,15
$D/P_{protein}$ (mean ± SD)	124,01±10,7	120,2±13,1	119,4±8,4
D/P_{Na} (mean ± SD)	0,72±0,26	0,76±0,05	0,82±0,03
$D/D0_{glukoz}$ (mean ± SD)	1,26±0,31	1,33±0,33	1,31±0,41
Glukoz kitle transferi (mean ± SE)	-20542±6404	-5556±2375[a]	-5170±2759[a]

[a] $P<0.05$, MKH-1 grubu ile kıyaslandığında

- Plasebo grubunun 1.hafta, 2.hafta ve 3.hafta UF miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı
- P-1 grubu ile kıyaslandığında, P-2 grubunda $D/P_{protein}$ ve glukoz kitle transferinde anlamlı yükseklik, $D/D0_{glukoz}$ oranı ise anlamlı düşük bulunurken, P-3 grubunda $D/P_{üre}$, D/P_{Na} ve $D/P_{protein}$ oranlarında anlamlı yükseklik bulundu ($P<0.05$, Tablo XIII).
- P-2 grubu ile kıyaslandığında ise, P-3 grubunda $D/D0_{glukoz}$ yüksek, glukoz kitle transferi ise anlamlı düşük bulundu ($P<0.05$, Tablo XIII).

Plasebo gruplarının, 1.hafta, 2.hafta ve 3.hafta periton geçirgenliklerinin değerlendirilmeleri Tablo XIII'de verilmiştir.

Tablo XIII: Plasebo gruplarının 1.hafta, 2.hafta ve 3.hafta periton geçirgenliklerinin değerlendirilmeleri

Değişken	Çalışma grupları		
	P-1 (n=8)	P-2 (n=9)	P-3 (n=9)
UF (ml) median (min-max)	1.5 (-11 – 9)	-4.2 (-18 – 7)	1 (-17 – 12)
D/P $_{üre}$ (mean ± SD)	0,51±0,4	0,49±0,09	0,58±0,09 [a]
D/P$_{Cr}$ (mean ± SD)	0,74±0,2	0,83±0,14	0,85±0,12
D/P$_{protein}$ (mean ± SD)	114,97±8	125,1±7,3[a]	129,9±10,6 [a]
D/P$_{Na}$ (mean ± SD)	0,73±0,1	0,76±0,06	0,81±0,03[a]
D/D0$_{glukoz}$ (mean ± SD)	0,87±0,2	0,64±0,2[a]	0,90±0,12 [b]
Glukoz kitle transferi (mean ± SE)	7335 ±3648	17724±3650[a]	1752±4006[b]

[a] P<0.05, P-1 ile kıyaslandığında

[b] P<0.05, P-2 ile kıyaslandığında

3-HİSTOPATOLOJİK BULGULAR VE PERİTON GEÇİRGENLİĞİ ARASINDAKİ KORELASYONLAR

a) Tüm çalışma gruplarında histopatolojik bulgular ve periton geçirgenlik parametreleri arasındaki ilişkiye bakıldığında,

- Submezotelyal kalınlık ile UF ve D/D0$_{glukoz}$ arasında anlamlı negatif ilişki bulundu (P=0.03).
- Yine submezotelyal kalınlık ile glukoz kitle transferi, D/P$_{Cr}$ ve D/P$_{üre}$ arasında anlamlı pozitif ilişki,
- Fibroblastik aktivite ile UF arasında anlamlı negatif ilişki,
- Fibrozis ve D/P$_{protein}$ arasında anlamlı pozitif ilişki,
- İnflamasyon ile D/P$_{üre}$ arasında pozitif ilişki bulundu (P<0.05).

b) Periton geçirgenlik parametrelerinin kendi aralarındaki ilişkiye bakıldığında;

- UF ile $D/D0_{glukoz}$ oranı ile pozitif ilişki, glukoz kitle transferi ile negatif ilişki bulundu ($P<0.01$).
- $D/D0_{glukoz}$ ile D/P_{Cr} ve glukoz kitle transferi arasında anlamlı negatif ilişki,
- D/P_{Na} ile $D/P_{üre}$ arasında anlamlı pozitif, glukoz kitle transferi ile arasında anlamlı negatif ilişki bulundu ($P<0.05$)

c) Histopatolojik bulguların kendi aralarındaki ilişkiye bakıldığında;

- Submezotelyal kalınlık ile fibroblastik aktivite, fibrozis, neovaskülarizasyon arasında anlamlı pozitif ilişki bulundu ($P<0.05$).
- Fibrozis ile ayrıca fibroblastik aktivite, neovaskülarizasyon ve inflamasyon arasında pozitif, mezotel hücre sayısı ile negatif ilişki bulundu ($P<0.05$).
- Neovaskülarizasyon ile ayrıca fibroblastik aktivite ve inflamasyon arasında pozitif, mezotel hücre sayısı ile negatif ilişki bulundu ($P<0.05$).

TARTIŞMA

Son dönem böbrek yetmezliği olan çocuklarda, özellikle de erken çocukluk ve bebeklik dönemlerinde, PD çoğunlukla ilk seçilen renal replasman tedavisi olmaktadır. En iyi renal replasman tedavi şekli olan böbrek nakli, verici azlığından dolayı sınırlı sayıda hastaya uygulanabilmektedir. Hemodiyaliz ise küçük çocuklar ve bebeklerde damar yapısının uygun olmaması, teknik yetersizlikler veya hemodinamik olarak olumsuz etkilerinden dolayı uygulanamayabilmektedir. Bu durumda, bu çocuklar için PD yegane seçenek olmaktadır.

Kronik PD' de en önemli zorluğun, yıllar içinde periton zarının yapısı ve fonksiyonunun bozulması ve bunun sonucunda yeterli diyalizin sağlanamaması olduğu bilinmektedir (1).

Fizyolojik olmayan diyaliz sıvılarına maruz kalma, hastaların üremik durumu veya peritonit atakları gibi durumlar, periton zarında hasara ve kronik inflamasyona neden olarak fibrozis ve anjiogenez ile sonuçlanmaktadır (29). Periton diyalizi öncesi ve sonrasında periton zarında meydana gelen değişikliklerle ilgili en kapsamlı çalışma Williams (28) tarafından erişkin hastalarda yapılan bir çalışmadır. Bu çalışmada uluslararası kayıt sisteminde 130'dan

fazla uzun dönem PD hastalarının biyopsileri ile sağlıklı ve PD yapılmayan üremik hastaların biyopsileri karşılaştırılmış, üremik hastalarda sub-mezotelial zonun sağlıklı bireylerden 3 kat daha kalın olduğu, PD hastalarında ise 5 kat daha kalın olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda bu bulgulara benzer olarak, periton içine 6 hafta süre ile %3,86 glukoz içeren PD sıvısı verilmesini takiben alınan periton biyopsilerinde (PD grubu) submezotelial kalınlığın PD sıvısı verilmeyen kontrol grubuna göre belirgin olarak kalınlaşmış olduğu, inflamasyon ve yeni damar oluşumunun artmış, mezotel hücre sayısının ise azalmış olduğu görüldü.

Kronik periton diyalizinin en önemli sorunlarından biri, zaman içinde UF yetersizliğinin gelişmesidir (1). Ultrafiltrasyon yetersizliği en önemli fonksiyonel transport anormalliği olup, periton diyalizinin sonlandırılmasını gerektiren en yaygın nedendir. Ultrafiltrasyon yetersizliğine kronik PD'nin birinci yılı sonunda %3, altıncı yılı sonunda ise %31 sıklığında rastlanmaktadır (2). Çalışmamızda da PD grubunun UF miktarlarının kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı görülmüştür.

Periton zarında meydana gelen mezotel hasarını azaltmaya, dolayısıyla UF yetersizliğini önlemeye yönelik daha fizyolojik ve biyouyumluluğu arttırılmış PD sıvıları üretilse de bu sorun hala önemini korumaktadır.

Periton diyalizinden başka renal replasman seçeneği olmayan bir hasta için periton zarının korunması ya da hasarlanan periton zarının iyileştirilmesi ve fonksiyon görebilmesi hayati önem taşımaktadır. Bu düşünceden yola çıkarak peritonun korunması, fibrozisin engellenmesi ya da hasarlanmış periton dokusunun iyileştirilmesini hedefleyen birçok klinik ve deneysel araştırma yapılmıştır (4,5,16,41,65-67).

Peritonun korunması için bazı ilaçlar kullanılmıştır fakat bunlar büyük ölçekli çalışmalar değildir. İlaç tedavisi hala deneysel aşamadadır ve bazılarının sonuçları hayal kırıklığı ile sonuçlanmıştır.

Kronik PD sırasında intraperitoneal olarak fosfatidilkolin verilmiş ve UF yetersizliği olan ve normal UF' ye sahip olan hastalarda UF miktarında artış bulunmuştur. Bu çalışmalarda fosfatidil kolinin büyük olasılıkla lenfatik absorbsiyonu etkileyerek UF 'yi arttırdığı ileri sürülmüştür (68,69). Zareie ve ark. (65) PD sıvısına aminoguanidin eklenmesinin, glukoz yıkım ürünlerini azaltarak ileri glikasyon ürünlerinin oluşumunu

engellediğini ve böylece PD sıvısının oluşturduğu periton zarı hasarını azalttığını ileri sürmüşlerdir.

Duman ve ark.(67) ise PD uygulanmaya başlandığında beraberinde oral enalapril verilmesinin peritonun yapısı ve fonksiyonunu koruduğunu iddia etmişlerdir. Ratlar ile yapılan bu çalışmada UF' de azalma, submezotelyal kalınlıkta artış ve protein kaybı enalapril verilmeyen grupta belirgin iken enalapril alan grupta bu olumsuz etkilerin minimal düzeyde olduğunu görmüşlerdir.

Sun ve ark.(66) deneysel olarak periton diyaliz modeli oluşturulmuş ratlarda PD sıvısı ile periton zarında fibrozis geliştirmişler ve bu ratlara TGFβ1 sinyalinin blokajını sağlayan Smad7 genini intraperitoneal olarak verdiklerinde peritonda gelişen fibrozisin iyileştiğini göstermişler ve Smad7 geninin PD ilişkili periton fibrozis tedavisinde bir seçenek olabileceğini rapor etmişlerdir.

Hür ve ark.(70) peritonit oluşturulmuş ratlara intraperitoneal ve sistemik olarak antiproliferatif etkisi olan oktreotid verilmesinin UF yetersizliğini önlediğini bildirmişler ve uzun dönemde peritonda oluşabilecek fibrozisi azaltabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Periton diyaliz hastalarında intraperitoneal olarak verilen hyaluronan, glikozaminoglikanlar, N-asetilglikozamin, deksametazon, tamoksifen, pentoksifilin ve heparinin gibi maddelerin de periton zarının yapısal ve fonksiyonel özelliklerini koruyucu etkilerini araştıran çalışmalar yayınlanmıştır (71-74).

Mezotel tabakası periton zarının önemli bir bileşenidir ve inflamatuar cevabın düzenlenmesinde, mikrosirkülasyonda ve fibrin homeostazında görev alır (12-16). Mezotel hücre tabakasının gerek kronik PD sürecinde dökülmesi gerekse cerrahi işlem sonucunda hasarlanmasının, submezotelial bağ dokuda değişikliklere yol açarak, periton zarının fonksiyonlarında kayıp oluşturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (2,23,27-29). Bu bilgiden yola çıkarak mezotel hücre nakli denenmiş ve nakledilen mezotel hücrelerinin periton yüzeyinin dökülen bölgelerinde toplandığı bir kaç çalışmada gösterilmiştir (5,75,76). Bu çalışmaların çoğu cerrahi işlem sonrası mezotel hasarını iyileştirmek için yapılmıştır.

Hekking ve ark (16) deneysel olarak akut inflamasyon (peritonit) ve kronik PD modeli oluşturmuş ve intraperitoneal enjeksiyon ile genetik olarak modifiye edilmiş mezotel hücrelerini vermişler ve nakilden 2 gün sonra hasarlanmış periton yüzey alanlarında nakledilen mezotel hücrelerinin biriktiğini göstermişlerdir. Aynı prosedürün uygulandığı diğer

bir çalışmada mezotel hücre nakli sonrası 3. ve 6. gün periton biyopsisi alınmış ve nakledilen mezotel hücrelerinin hasarlı periton yüzeyine yapıştığı gösterilmiştir (6).

Nakledilen mezotel hücrelerinin proinflamatuar faktörlerin salınımını arttırarak inflamasyonu arttırırmaları ve nakil için gerekli olan mezotel hücrelerinin elde edilmesinin oldukça güç olması ve bu tür hücre nakillerinde optimal uygulama zamanının henüz kesin olarak tanımlanmaması gibi nedenlerden dolayı mezotel hücre nakli hasarlanmış peritonun iyileştirilmesi için henüz tedavi yöntemi olarak kabul görmemiştir (3).

Raftery 1973'te visseral ve paryetal peritonda oluşan hasarın iyileşme sürecini elektron mikroskop ile incelemiş ve bulgularını yayınlamıştır. İyileşme sürecinin erken evrelerinde makrofajların yara yüzeyinde baskın olan hücreler olduğunu, bununla birlikte birlikte primitif mezenkimal hücrelere benzeyen hücrelerin de görüldüğünü rapor etmiştir. Kademeli olarak yara yüzeyinde makrofajların sayısı azalırken, primitif mezenkimal hücrelerin ve prolifere olan fibroblast benzeri hücrelerin yara yüzeyinde sayısının arttığını gözlemlemiştir. Yenilenen mezotel tabakasının subperitoneal bağ dokudan oluştuğunu fakat primitif mezenkimal hücrelerden mi yoksa fibroblastlardan mı oluştuğunu belirlemenin o dönemde henüz mümkün olmadığını yayınlamıştır (77).

Yakın zamanda yayınlanan bir derlemede mezotel hücrelerinin geniş bir yenilenme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (3). Periton hasarı gerek cerrahi işlem gerekse peritonit ya da periton diyalizi nedeniyle gelişmiş olsun, yenilenme sürecinin hasarın oluşmasından sonraki 24 saat içinde başladığı ve hasarlanmış bölgeye bazı hücrelerin biriktiği görülmüştür. Bu hücrelerin; doku hasarının kenarında bulunan hücreler ve bunların proliferasyonu, karşı periton yüzeyindeki mezotel hücreleri, seröz periton sıvısındaki immatür mezotel hücreleri, periton dokusundaki makrofajların transformasyonu ve peritonun interstisiyel tabakasındaki mezenkimal prekürsör hücreler olduğu gösterilmiştir (3,4).

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği kaynaklı, her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokuları oluşturan bir multipotent hücre kaynağı olarak bilinmektedir (43,44). İlk olarak kemik iliğinden derive edilse de MKH ve MKH benzeri hücrelerin yağ doku, periost, sinovyal sıvı, sinovyal zar, iskelet kası, dermis, süt dişleri, trabeküler kemik, patelladaki yağ yastıkçığı, eklem kıkırdağı, göbek kordon kanı, plasenta, karaciğer, dalak ve timus gibi birçok doku ve organda bulunduğu gösterilmiştir (78-80).

Mezenkimal kök hücrelerin hasarlanmış doku ve hücrelerin yerini alarak yenilenme sürecini başlattığı düşünülmektedir (46). Bazı vakalarda kök hücreler yaşam uzatma tedavisi

de denilebilen bir yerine koyma tedavisi olarak kullanılır örneğin; kalp krizlerinde hasarlanan kalp hücrelerinin yenilenmesi ya da sirozda hasarlı karaciğer hücrelerinin yenilenmesi için izole edilmiş kök hücreler kullanılabilir. İmplante edilen kök hücreler etrafındaki mikroçevre ile etkileşime girer ve komşu dokudan salgılanan belirli faktörler ve yenileyici biyolojik fonksiyonların etkisiyle dokunun yenilenmesini kolaylaştırır (43).

Çeşitli invitro çalışmalarda ve hayvan deneylerinde, nakledilen MKH' nin uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Bir sonraki basamak, klinik çalışmalar için MKH naklinin etkinliği, güvenilirliği ve uygulanabilirliğini değerlendirmektir. Mezenkimal kök hücrelerin invitro ortamda belirli bir hücre tipine dönüştürülmesi için dönüştürücü faktörlere ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulmasına karşılık invivo ortamda verildiği dokudan salınan faktörler yardımı ile kendisine en yakın dokunun hücre tipine dönüştüğü bildirilmektedir (81,82). Sistemik uygulamalarda ise hasarlı bölgeye gidip yapıştığı ve o dokunun hücre tipine dönüştüğü çalışmalarla gösterilmiştir. İnvivo modellerde karaciğer, kemik, kıkırdak, akciğer, kalp, spinal kord ve böbrek gibi organlarda nakledilen MKH'lerin organlara tutunduğu ve nakledildiği dokuların hücrelerine dönüşerek fonksiyon görmeye başladığı gösterilmiştir (44-47, 81-92).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda PD sıvısının periton zarında oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel bozukluklar üzerine intraperitoneal olarak verilen MKH' lerin etkisini araştırdık. Nakledilen MKH' lerin peritonun hasarlanmış bölgesinde birikerek mezotel hücresine dönüşüm gösterebileceğini ve hasarlanmış bölgeyi iyileştirerek fonksiyon kazandırabileceğini, dolayısıyla yetersiz olan UF yeteneğinin yeterli hale gelebileceğini öngörerek bu çalışmayı planladık. Bilgilerimize göre bu çalışma, peritonda gelişen yapısal ve fonksiyonel bozukluklar üzerine MKH'lerin etkisini araştıran ilk çalışmadır. Bu nedenle bulgularımızı literatür ile karşılaştıramadık.

Çalışmamızda 6 hafta süre ile İP olarak PD sıvısı verilen PD grubunda periton zarında gelişen histopatolojik hasarın yansıması olarak UF miktarlarında da kontrol grubuna göre belirgin azalma olduğu görüldü. Periton eşitleme testinde PD grubunun $D/D0_{glukoz}$ oranları kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük, $D/P_{üre}$, D/P_{Na}, D/P_{Cr} oranları ile glukoz kitle transferi değerleri ise anlamlı olarak yüksek saptandı. Bu bulgular PD grubunun periton zarında yüksek geçirgenliğin olduğunu göstermekteydi. Yüksek geçirgenliğin olması glukozun hızla periton boşluğundan kana emilmesi ve periton boşluğunda yüksek ozmolariteyi sağlayan glukozun azalması anlamına gelmektedir. Böylece yeterli sıvı

çekilemediğinden UF'de azalma olmaktadır. Solüt transferi ise, bizim çalışmamızda da gösterildiği gibi, yüksek geçirgenlikli peritonda yeterli ve yüksek düzeydedir. Periton eşitleme testinde yüksek geçirgenlik saptanan hastalarda periton diyalizinde bekleme süresi kısa tutularak UF arttırılmaya çalışılmalıdır (34).

Ultrafiltrasyon yetersizliği oluşturulan ratların bir grubuna İP olarak MKH, diğer gruba plasebo verilerek 1., 2. ve 3. hafta etkinlikleri değerlendirildi.

Öncelikle verilen GFP işaretli MKH 'lerin mezotelin hasarlı bölgelerine yapışıp yapışmadığını göstermek için taze dokudan alınan kesitler direkt olarak immünfloresan mikroskopta değerlendirildi ve MKH'lerin 1. hafta, 2. hafta ve 3. haftalarda mezotel hattı boyunca floresan verdiği görüldü. Plasebo grubundan alınan kesitlerde ise floresan hattı izlenmedi.

Acaba mezotel hattı boyunca yapışan MKH'ler hasarlı peritonun yenilenmesini ve geçirgenliğinin düzelmesini sağlayacak mıydı?

Bu sorunun cevabı için MKH ve plasebo verilmesini takiben 1, 2 ve 3 hafta sonra grupların peritonları histopatolojik olarak ve fonksiyonları bakımından değerlendirildiler.

Mezenkimal kök hücre verilmesini takiben 1.haftada; MKH-1 grubunun submezotelyal kalınlığı PD ve P-1 grubuna göre belirgin olarak azalmıştı. Yine MKH-1 grubunda inflamasyon PD grubuna göre belirgin azalmışken P-1 ve PD grubu arasında inflamasyon açısından anlamlı fark bulunmaması 1.haftada MKH'nın submezotelyal ödemi ve inflamasyonu azaltıcı etkisinin olduğu gösteriyor olabilir. Togel ve ark. (84) bizim bulgularımızı destekler nitelikte MKH'lerin antiinflamatuar sitokinlerin (IL-10, FGF, TGF-β) üretimini arttırdığını, proinflamatuar sitokinlerin (IL-1β, TNF-α, IFN) ve nitrikoksid'in ise ekspresyonunu azalttığını, dolayısıyla MKH'lerin antiinflamatuar etkilerinin olduğunu göstermişlerdir.

Birinci haftada gelişen bu histopatolojik değişikliklerin peritonun geçirgenliği üzerine etkisine baktığımızda; MKH-1 grubunda UF miktarının P-1, PD ve kontrol gruplarına göre belirgin olarak arttığı görüldü. Ayrıca MKH-1 grubunun glukoz transfer oranının PD ve P-1 gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı görüldü. Bununla birlikte, D/P_{Cr}, $D/P_{üre}$, $D/P_{protein}$ oranlarında PD grubuna göre farklılık yoktu. Bu bulgularla MKH verilmesini takiben 1.haftada MKH'nın glukoz transferini azaltarak UF miktarını arttırıcı etkisinin olduğu fakat üre, Cr, protein ve Na geçirgenliğinde olumsuz bir değişiklik yapmadığı belirlenmiştir. Özetle, bu bulgular 1.haftada P-1 grubunda yüksek geçirgenliğin devam ettiği, MKH-1

grubunda ise periton geçirgenliğinin kontrol grubu ile benzer olduğu yani MKH'nın periton geçirgenliğini düzeltici etki gösterdiği yorumu yapılabilir.

Mezenkimal kök hücre verilmesini takiben 2.haftada; MKH-2 grubunun submezotelyal kalınlığı PD ve P-2 grubuna göre belirgin olarak azalmıştı. İnflamasyon ve diğer histopatolojik değişiklikler açısından MKH-2 ve P-2 grupları arasında anlamlı fark bulunmaması, peritonun dinlendirilmesi ile zamanla inflamatuar hücrelerin azaldığı anlamına gelebilir. Bununla birlikte submezotelyal kalınlığın MKH-2 grubunda daha ince olması 2. haftada halen submezotelyal ödemin devam ettiğini gösteriyor olabilir.

Kim ve ark (93) periton diyaliz modeli oluşturdukları ratlarda 3 hafta periton diyalizi sonrası periton kalınlığının arttığını ve yüksek geçirgenlikli periton zarı yetersizliği geliştirdiklerini yayınlamışlar ve 4 hafta periton diyalizine ara vererek peritonun dinlendirilmesinden sonra periton zarının histopatolojik ve fonksiyonel olarak iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir.

İkinci hafta periton geçirgenliğini değerlendirdiğimizde MKH-2 grubunun UF miktarlarının, PD ve P-2 grubuna göre artmış olduğunu ve PD grubundaki artmış Cr klirensinin ve glukoz transportunun MKH-2 grubunda normale döndüğünü, P-2 grubunda ise halen artmış Cr klirensinin ve yüksek glukoz transport oranının sebat ettiğini belirledik. Bu bulgular ile PD sıvısına maruziyet sonrası peritonda meydana gelen yüksek geçirgenliğin MKH nakli ile normale yaklaştığı ileri sürülebilir.

Mezenkimal kök hücre verilmesini takiben 3.haftada; MKH-3 grubunun submezotelyal kalınlığı PD ve P-3 grubuna göre belirgin olarak azalmıştı. P-3 grubunda fibrozis ve yeni damar oluşumu MKH-3 ve kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunması ve submezotelyal kalınlığın 3. hafta P grubunda hala devam ediyor olması peritonun dinlendirilse de 3 hafta sonra fibrozisin ve submezotelyal ödemin devam ettiğini göstermektedir

Üçüncü hafta periton geçirgenliğini değerlendirdiğimizde MKH-3 grubunun UF miktarlarının, PD ve P-3 grubuna göre artmış olduğunu ve PD grubundaki artmış Cr klirensi ile protein ve glukoz transportunun MKH-3 grubunda normale döndüğünü, P-3 grubunda ise halen artmış Cr klirensinin, yüksek protein ve glukoz transport oranının sebat ettiğini belirlemiş olmamız 3. haftada MKH naklinin periton geçirgenliğine olumlu katkısının devam ettiğini göstermektedir.

Bu çalışmada submezotelyal kalınlık arttıkça UF miktarının azaldığı, glukoz transportunun, Cr ve üre klirensinin ise arttığı belirlendi. Yine fibroblastik aktivite arttıkça UF nin azaldığı, inflamasyon arttıkça da üre klirensinin arttığı belirlendi. Yine beklendiği gibi glukoz transfer oranı arttıkça kreatinin klirensinin de arttığı tespit edildi. Bu bulgular yüksek geçirgenlikli periton zarı yetersizliğinin bir göstergesi idi ve literatür ile uyumlu bulundu (1,8,11,15).

Bu çalışma ile hasarlanmış ve UF yetersizliği oluşturulmuş periton zarını iyileştireceği öngörülerek MKH naklinin etkisi araştırılmıştır ve önemli sonuçlara ulaşıldığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda MKH'nın hasarlı periton zarına mezotel hattı boyunca yapıştığını göstermiş bulunmaktayız. Biz, bu mezotel hattı boyunca yapışan MKH'lerin hem antiniflamatuar etki göstererek hem de mezotel hücrelerine dönüşerek kronik PD sıvısına maruz kalma sırasında dökülen mezotel hücrelerinin yerini aldığını ve periton hasarını iyileştirdiğini düşünmekteyiz.

Sonuçlarımıza göre, MKH verilen grupta kontrol grubuna benzer UF miktarları görülmüş ve PD grubuna göre de, plasebo gruplarına göre de anlamlı olumlu sonuçlar alınmıştır.

Bu çalışma intraperitoneal olarak verilen MKH naklinin UF yetersizliği üzerine etkisini araştıran ilk çalışmadır. Biz elde ettiğimiz sonuçlar ışığında, PD'den başka seçeneği olmayan, peritonu hasarlanmış ve UF yetersizliği gelişmiş olan kronik PD hastalarında MKH'nın intraperitoneal olarak naklinin peritonun yenilenmesi ve fonksiyon kazanması için bir umut olacağını düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1 Fusshoeller A. Histomorphological and functional changes of the

peritoneal membrane during long-term peritoneal dialysis. Pediatr Nephrol 2008, 23:19–25.

2 Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. Kidney international 1999, 55: 341-356.

3 Witkowicz J. Mesothelial cell transplantation. Pol Arch Med Wewn. 2008, 118(5):307-13.

4 Hekking LH, Zweers MM, Keuning ED, et al. Apparent successful mesothelial cell transplantation hampered by peritoneal activation. Kidney Int. 2005; 68: 2362−2367.

5 Bertram P, Tietze L, Hoopmann M, et al. Interperitoneal transplantation of isologous mesothelial cells for prevention of adhesions. Eur J Surg. 1999; 165: 705−708.

6 Cabrera ML, 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.

7 Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV et al. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. Cytotherapy 2009, 4; 377-391.

8 Verrina E. Peritoneal dialysis. In: Avner DE, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N (eds), Pediatric Nephrology 6 th ed. Springer-Verlag Berlin 2009, pp: 1785-1817.

9 Schröder CH, Geary DF. Dialysis modality choice and initiation in children. In: Geary FD, Schaefer F (eds), Comprehensive Pediatric Nephrology. Philedelphia, 2008, pp: 817-22.

10 Dere F. Periton anatomisi. Anatomi ders kitabı 2. baskı. Adana 1990. Pp:567-586

11 Leak LV, Rahil K. Permeability of the diaphragmatic mesotelium: the ultrastructural basis for stomata. Am J Anat 1978; 151: 557-594.

12 Di Paolo N, Sacchi G. Anatomy and physiology of the peritoneal membrane Contrib Nephrol. 1990; 84: 10−26.

13 Di Paolo N, Sacchi G. Atlas of peritoneal histology. Perit Dial Int. 2000;

20 (Suppl 3): 5−96.

14 Mortier S, Lameire NH, De Vriese AS. Animal models in peritoneal dialysis research: A need for consensus. Perit Dial Int 2005; 25:16–24.

15 Nagy JA, Jackman RW. Anatomy and physiology of the peritoneal membrane. Semin Dial 1998; 11:49–56.

16 Hekking LHP, Harvey VS, Havenith CEG et al. Mesothelial cell transplantation in models of acute inflammation and chronic peritoneal dialysis. Perit Dial Int. 2003;23(4):323-30.

17 Bernardini J, Price V, Figueiredo A. Peritoneal dialysis patient training, 2006. Perit Dial Int 2006;26:625-632.

18 Rippe B, Stelin G, Haraldsson B (1991) Computer simulations of peritoneal fluid transport in CAPD. Kidney Int 40:315–325

19 Schoenicke G, Diamant R, Donner A et al. Histochemical distribution and expression of aquaporin1 in the peritoneum of patients undergoing peritoneal dialysis: relation to peritoneal transport. Am J Kidney Dis 2004; 44:146–154.

20 Bouts AH, Davin JC, Groothoff JW et al. Standard peritoneal permeability analysis in children. J Am Soc Nephrol 2000; 11:943–950

21 Rusthoven E, Krediet RT, Willems HL et al. Sodium sieving in children. Perit Dial Int 2005; 25 (Suppl 3): 141-42

22 Smit W. Estimates of peritoneal membrane function—new insights. Nephrol Dial Transplant 2006; 21 (Suppl 2):16–19

23 Andreas Fusshoeller. Histomorphological and functional changes of the peritoneal membrane during long-term peritoneal dialysis. Pediatr Nephrol 2008; 23:19–25

24 Khanna R, Nolph KD. Principles of Peritoneal Dialysis: In R. W. Schrier (ed). Atlas of Disease of the Kidney. Blackwell Science Ltd, Oxford 2000, pp: 4.1-4.11

25 Twardowski ZJ, Nolph KD, Khanna R, et al. Peritoneal equilibration test. Peritoneal Dial Bull 1987, 7:138–47

26 TW Chen, R Khanna, H Moore et al. Sieving and reflection coefficients for sodium salts and glucose during peritoneal dialysis in rats. J Am Soc

Nephrol. 1991;6:1092-100

27 Hekking LHP, Zareie M, Driesprong BAJ. Better Preservation of Peritoneal Morphologic Features and Defense in Rats after Long-Term Exposure to a Bicarbonate/Lactate-Buffered Solution. J Am Soc Nephrol 2001; 12: 2775–2786

28 Williams JD, Craig KJ, von Ruhland C et al. Biopsy Registry Study Group. The natural course of peritoneal membrane biology during peritoneal dialysis. Kidney Int Suppl. 2003; 88:43-9.

29 Aroeira LS, Aguilera A, Sa´nchez-Tomero AJ, 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: 2004–13.

30 Woodrov G. Can biocompatible dialysis fluids improve outcomes in peritoneal dialysis patients? Perit Dial Int 2005; 25:230–233

31 Yung S, Chan TM. Mesothelial cells. Perit Dial Int 2007; Suppl 2: 110-15

32 Witowski J, Książek, Jörres A. New Insights into the Biology of Peritoneal Mesothelial Cells: The Roles of Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cellular Senescence. Nephron Exp Nephrol 2008;108:69–73

33 Kim YL. Update on mechanisms of ultrafiltration failure. Perit Dial Int 2009;29 Suppl 2: 123-27

34 Aksu N, Mir S. Çocuklarda sürekli ayaktan periton diyalizi. Akçiçek F (ed). Sürekli ayaktan periton diyalizi temel bilgiler kitabı. Ege Üniveristesi basımevi, Bornova, İzmir. 1997, pp: 189-204.

35 Smit W, Schouten N, van den Berg N. Analysis of the prevalence and causes of ultrafiltration failure during long-term peritoneal dialysis: a cross-sectional study. Perit Dial Int. 2004;6:562-70.

36 Saxena R. Pathogenesis and treatment of peritoneal membrane failure. Pediatr Nephrol 2008; 23:695–703

37 Fitzwater DS, Jones DP.Use of a modified peritoneal equilibration test to optimize solute and water clearance. Pediatr Nephrol. 1995;9:341-5.

38 Milia VL. Di Filipo S, Crepaldi M et al. Mini-peritoneal equilibration test: A simple and fast method to assess free water and small solute transport

across the peritoneal membrane. Kidney Int 2005; 68:840–46

39 Rodrigues AS, Silva S, Bravo F et al. Peritoneal membrane evaluation in routine clinical practice. Blood Purif 2007;25:497-504

40 Reddy DK, Moore HL, Lee JH et al. Chronic peritoneal dialysis in iron-deficient rats with solutions containing iron dextran. Kidney Int 2001;59:764–73

41 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

42 Pecoits-Filho RF, Twardowski ZJ, Kim YL et al. The absence of toxicity in intraperitoneal iron dextran administration: a functional and histological analysis. Perit Dial Int. 1998 Jan-Feb;18(1):64-70.

43 Horwitz EM, Dominici M. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? Cytotherapy 2008;8: 771-74.

44 Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. Cytotherapy 2009;11: 377-91.

45 Bang OY, Lee JS, Lee PH et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. Ann Neurol. 2005;57:874-82.

46 Fang D, Seo BM, Liu Y et al. Transplantation of mesenchymal stem cells is an optimal approach for plastic surgery. Stem Cells. 2007;25:1021-8.

47 Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for non-healing cutaneous wounds. Plast Reconstr Surg. 2010;125(2):510-6.

48 Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. Journal of Cell Science 2004;23:5655-64

49 Mishra PJ, Mishra PJ, Glod JW et al. Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. Cancer Res 2009;69:1255-8.

50 Hurst DR, Welch DR. A. MSC-ing link in metastasis? Nat Med 2007;13:1289-91.

51 Ramaswamy R, Lam EWF, Soeiro I et al. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. Leukemia 2007;21:304-10.

52 Yan L, Han Y, He Y et al. Cell tracing techniques in stem cell transplantation. Stem Cell Rev. 2007; 3:265-9

53 Tsien RY. The green fluorescent protein. Annu Rev Biochem 1998;67:509–544.

54 Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. FEBS Lett 407:313–319

55 Ito S, Nakanishi H, Ikehara Y et al. Real-time observation of micrometastasis formation in the living Mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carsinoma cell line. Int J Cancer 2001; 293:212-7.

56 Persons DA, Allay JA, Riberdy JM et al. Use of the green fluorescent protein as a marker to identify and track genetically modified hematopoietic cells. Nat Med. 1998; 4:1201-5.

57 de Waart DR, Zweers MM, Struijk DG et al. Icodextrin degradation products in spent dialysate of CAPD patients and the rat, and its relation with dialysate osmolality. Perit Dial Int 2001; 21:269–74.

58 Garosi G, Di Paolo N. The rabbit model in evaluating the biocompatibility in peritoneal dialysis. Nephrol Dial Transplant 2001; 16:664–5.

59 Jonasson P, Braide M. A commercially available PD fluid with high pH and low GDP induces different morphological changes of rat peritoneum in intermittent PD. Adv Perit Dial 1998; 14:48–53.

60 Wang T, Qureshi AR, Heimburger O et al. Daily exposure to dialysis fluid results in changes in peritoneal transport. Perit Dial Int 1997; 17:379–86

61 Wang T, Heimburger O, Qureshi AR, et al. Physiological saline is not a biocompatible peritoneal dialysis solution. Int J Artif Organs 1999; 22:88–93.

62 Peng WX, Guo QY, Liu SM, et al. Comparison of three chronic dialysis models. Adv Perit Dial 2000; 16:51–4

63 Musi B, Braide M, Wieslander A et al. Very high daily intraperitoneal doses of carbonyl compounds affect the morphology, but not the exchange characteristics, of rat peritoneum. Blood Purif 2001; 19:286–92.

64 Kim YL, Cho S, Kim JC et al. Effect in a rat model of heparinized peritoneal dialysis catheters on bacterial colonization and the healing of the exit site. Perit Dial Int 2001; 21(Suppl 3):357–8.

65 Zareie M, Tangelder GJ, ter Wee PM et al. Beneficial effects of aminoguanidine on peritoneal microcirculation and tissue remodelling in a rat model of PD. Nephrol Dial Transplant 2005;20:2783-92.

66 Sun Y, Zhu F, Yu X et al. Treatment of established peritoneal fibrosis by gene transfer of Smad7 in a rat model of peritoneal dialysis. Am J Nephrol. 2009;30:84-94.

67 Duman S, Günal Aİ, Sen S et al. Does enalapril prevent peritoneal fibrosis induced by hypertonic (3.86%) peritoneal dialysis solution? Perit Dial Int. 2001;21:219-224

68 Di Paolo N, Buoncristiani U, Capotondo L et al. Phosphatidylcholine and peritoneal transport during peritoneal dialysis. Nephron, 1986;44:365-70

69 Struijk DG, van der Reijden HJ, Kreidet RT et al. Effect of phosphatidylcholine on in peritoneal transport and lymphatic absorbtion in a CAPD patient with sclerosing peritonitis. Nephron, 1989;51:577-8.

70 Hür E, Bozkurt D, Sipahi S. Deneysel peritonit modelinde oktreotid ultrafiltrasyon yetersizliğini engelleyebilir. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 2011; 20:46-52.

71 Guo QY, Peng WX, Cheng HH et al. Hyaluronan preserves peritoneal membrane transport properties. Perit Dial Int. 2001;21:136-42.

72 Schilte MN, Loureiro J, Keuning ED. Long-term intervention with heparins in a rat model of peritoneal dialysis.

73 Grzogorzewska AE. Protecting the peritoneal membrane in dialyzed patients. Adv Med Sci 2006;51:191-6.

74 Nolph KD, Moore HL, Khanna R et al. Pentoxifylline does not influence maximum ultrafiltration rates and peritoneal transport in rats. Perit Dial Int 1989;9:131-4.

75 Di Paolo N, Sacchi G, Vanni L et al. Autologous peritoneal mesothelial cell implant in rabbits and peritoneal dialysis patients. Nephron 1999;57:323-31.

76 Mutsaers S, Di Paolo N. Future directions in mesothelial transplantation research. Int J Artif Organs 2007;30:557-61

77 Raftery AT. Regeneration of parietal and visceral peritoneum: an electron microscopical study. J.Anat. 1973;115:375-92

78 Chen J, Horan RL, Bramono D et al. Monitoring mesenchymal stromal cell developmental stage to apply on-time mechanical stimulation for ligament tissue engineering.Tissue Eng. 2006;12(11):3085-95.

79 Bianco P, Robey PG, Simmons PJ et al. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell. 2008; 2(4):313-9.

80 Mimeault M, Batra SK. Interplay of distinct growth factors during epithelial mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies. Ann Oncol. 2007;18(10):1605-19.

81 Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OJ. Trafficking an differantiation of mesenchymal stem cells. J Cell Biochem. 2009;106:984-91

82 McTaggart SJ, Atkinson K. Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. Nephrology (Carlton). 2007;12:44-52.

83 Izuta Y, Ochi M, Adachi N et al. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. The Knee 2005;12:217-23.

84 Togel F, Hu Z, Weiss K et al. Administered mesenchymal stem cell protect against ischemic acute renal failure through differantiation-independent mechanisms. Am J Physiol 2005;289:31-42.

85 Wu Y, Chen L, Scott PG et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesisStem Cells. 2007;25:2648-59.

86 Horwitz EM, Dominici M..How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? Cytotherapy 2008;10:771-4.

87 Hackett TL, Knight DA, Sin DD. Potential role of stem cells in management of COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2010;5:81-88.

88 Rojas M, Xu Jianguo, Woods CR et al. Bone marrow-derived

mesenchymal stem cells in repair of the injured lung.Am J Respir Cell mol Biol 2005;33:145-52..

89 Zhou CY. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for heart diseases: mechanisms and applications. Cell Research 2008;18:119.

90 Bang OY, Lee JS, Lee PH et al. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. Ann Neurol 2005;57:874-82.

91 Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2003.

92 Choi SJ, Kim JK, Hwang SD. Mesenchymal stem cell therapy for chronic renal failure. Expert Opin. Biol. Ther. 2010; 10(8): 1217-26

93 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,Suppl 2

TC.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Uzm.Dr.Funda BAŞTUĞ'a ait "Kronik Peritoneal Diyaliz Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Transplantasyonunun Ultrafiltrasyon Yetersizliği Üzerine Etkisi" adlı çalışma, jürimiz tarafından Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda Pediatri Nefroloji Yandal Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih : 10.06.2011

Prof.Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL ..... İmza

Prof.Dr. Zübeyde GÜNDÜZ ..... İmza

Prof.Dr. Hakan POYRAZOĞLU ..... İmza