



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
Çocuk Nefrolojisi Bilim Dalı

**PEDİATRİK RENAL TRANSPLANT ALICILARINDA  
ENDOTEL HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YANDAL UZMANLIK TEZİ**

**Uz.Dr. Arife USLU GÖKCEOĞLU**

**Antalya, 2012**



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
Çocuk Nefrolojisi Bilim Dalı

**PEDİATRİK RENAL TRANSPLANT ALICILARINDA  
ENDOTEL HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

**YANDAL UZMANLIK TEZİ**

**Uz.Dr. Arife USLU GÖKCEOĞLU**

**Tez Danışmanı: Prof.Dr. Sema AKMAN**

*“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”*

**Antalya, 2012**

## TEŐEKKÜR

Tezimin her aŐamasında ve yan dal uzmanlık eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen tez danışmanı hocam Prof. Dr. Sema Akman'a,

Tezime desteklerinden dolayı Türk Nefroloji Derneği'ne,

Tezimin laboratuvar ölçümlerinin yapılmasında katkısı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Prof.Dr. S.Halide AkbaŐ'a, akış-sitometri analizi ve değerlendirmesinde katkısı olan Doç.Dr. Sadi Kőksoy'a ve Emel Őahin'e, eğitim hayatım boyunca yardımcı olan Doç.Dr. Mustafa Koyun'a, Biyoistatistik analizinde katkısı olan Deniz Özel'e, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarım ve sevgili aileme yardımlarından dolayı teŐekkür ederim

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Simgeler ve Kısaltmalar Dizini</b>	<b>iii</b>
<b>Şekiller Dizini</b>	<b>iv</b>
<b>Tablolar Dizini</b>	<b>v</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Renal Transplantasyon	4
2.2. Renal Transplant Alıcılarında Kardiyovaskuler Hastalıklar	6
2.3. D vitamini ve Kardiyovaskuler Hastalıklar	8
2.4. Kardiyovaskuler Hastalıkların Patogenezinde Endotel Hasarı	10
2.5. Renal Transplantasyonda Endotel Hücreleri ve Endotel Hasarı	11
2.6. Hasarlı Endotel Hücreleri ve Belirteçler	12
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>15</b>
3.1. Olgular	15
3.2. Laboratuvar Ölçümleri	16
3.3. İstatistiksel Analiz	17
<b>4. BULGULAR</b>	<b>18</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>24</b>
<b>6. SONUÇLAR</b>	<b>29</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>30</b>
<b>8. ABSTRACT</b>	<b>32</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>34</b>

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

DEH	Dolaşımdaki endotel hücre
DKB	Diastolik kan basıncı
DKH	Düz kas hücreleri
EH	Endotel hücresi
GFR	Glomerular Filtrasyon Hızı
IEL	İnternal elastik lamina
KBY	Kronik böbrek yetmezliği
KNİ	Kalsinörin inhibitörü
KVH	Kardiyovasküler hastalık
MGA	Matriks g1a protein
PMN	Polimorfonükleer nötrofiller
PTH	Paratiroid hormon
SDBY	Son dönem böbrek yetmezliği
SKB	Sistolik kan basıncı
VKİ	Vücut kitle indeksi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Ateroskleroz patogenezi	7
2.2. D vitamini eksikliği ve KVH arasındaki ilişki	10
4.1. Hasta ve kontrol grubunun DEH sayıları	19
4.2. GFH değerine göre hastaların DEH sayıları ve karşılaştırılması	20
4.3. Sikloprin ve takrolimus kullanan hastaların DEH sayıları	21
4.4. Hasta ve kontrol grubunun D vitamini düzeyleri	23
4.5. Güncel bakılan siklosporin sıfırncı saat kandüzeyi ile DEH sayısı arasındaki ilişki	23

## TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablo</u></b>		<b><u>Sayfa</u></b>
2.1.	Kronik böbrek yetmezliği hastalarında kardiyovasküler hastalık risk faktörleri	6
2.2.	Kronik böbrek yetmezliği hastalarında 25(OH)D <sub>3</sub> düzeyine göre yapılan tanımlamalar	8
2.3.	Endotel hücrelerindeki hücre yüzey antijenleri	14
4.1.	Hastaların primer böbrek hastalık nedenleri	19
4.2.	Hasta ve kontrol grubunun özelliklerinin karşılaştırılması	19
4.3.	Hasta grubunun KBY evreleme ve DEH sayıları	20
4.4.	Hasta özelliklerine göre DEH sayılarının karşılaştırılması	21
4.5.	D vitamini eksiklik/yetersizlik olanlar ile D vitamini normal olan hastaların demografik ve laboratuvar özellikleri	22

# 1. GİRİŞ

Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) gelişmiş hastalar için renal replasman seçenekleri diyaliz veya renal transplantasyondur. Diyaliz ile karşılaştırıldığında renal transplantasyon hastalara daha iyi bir yaşam kalitesi sunmaktadır (1-3). Cerrahi teknik ve immünespresif tedavilerdeki gelişmeler başarılı renal transplantasyon imkanı vermektedir (4,5).

Renal transplant alıcılarının uzun dönem izlemlerinde, hastaların yaşam kalitesini ve greft fonksiyonunu etkileyen medikal komplikasyonlar görülmektedir. Hastalarda uzun dönemde enfeksiyon, malignansi, kemik hastalıkları ve kardiyovaskuler hastalıklar gelişebilmektedir. Ek olarak; hipertansiyon, posttransplant diabet gelişimi, katarakt, posttransplant eritrositoz, kronik rejeksiyon ve primer hastalık rekürensisi de transplant alıcılarında artmış morbidite nedeni olarak görülmektedir (6). Son otuz yılda pediatrik renal transplant alıcılarının uzun dönem izleminde dramatik bir şekilde daha iyi sonuçlar alınmıştır. Yine de; bu hastaların yaş uyumlu genel popülasyona göre yaşam süreleri kardiyovaskuler hastalıkların (KVH) artışı nedeni ile daha kısadır (7).

KVH için tanımlanan risk faktörleri geleneksel olan ve kronik böbrek yetmezliği ile ilişkili risk faktörleri olarak iki grupta incelenmektedir. Geleneksel risk faktörleri arasında; hipertansiyon, obesite, diabet, sigara, hiperlipidemi, sol ventrikül hipertrofisi ve fiziksel aktivite azlığı bulunmaktadır. Kronik böbrek yetmezliği ilişkili risk faktörleri arasında ise; albuminüri, anemi, kalsiyum-fosfor metabolizma bozukluğu, elektrolit imbalansı, oksidatif stres, inflamasyon, malnutrisyon, trombojenik faktörler, uyku bozuklukları, nitrik oksit/endotelin denge değişiklikleri yer almaktadır (8,9). Renal transplant alıcılarında da; KVH için bahsedilen risk faktörleri sıklıkla görülmektedir. Bu riskler transplantasyon öncesindeki klinik durum, azalmış glomerül filtrasyon hızı (GFH) kaynaklı veya immünespresif tedavi kullanımı sonrasında gelişebilmektedir (1,7). Transplantasyona özgü faktörlerden immünespresif tedavi, rejeksiyon ve posttransplant diabetes mellitus (DM) gelişimi de KVH riskini arttırmaktadır (8). Kullanılan immünespresif ilaçların KVH riskinde artışa neden olduğu daha önceki yayınlarda bildirilmiştir (6). Özellikle kalsinörin inhibitörleri (KNİ) immünespresif tedavinin temelinde yer aldıkları için bu ilaçların KVH riski arttırmadaki etkisi de önem kazanmaktadır (10).



Son yapılan çalışmalarda D vitamininin sadece kemik dokusunda değil vücutta pek çok doku ve organda (böbrek, barsak, kemik, paratiroid bezi, kolon vaskuler doku ve myokard) fonksiyonunun gösterilmesi sonucunda yeni etkileri tanımlanmıştır (4). Hipertansiyon, artmış vaskuler direnç ve artmış sol ventrikül indeksi gibi KVH'ların düşük 25(OH)D<sub>3</sub> vitamini düzeyi ile ilişkili bulunması nedenleri ile D vitamini eksikliğinin KVH için risk faktörü olduğu yönünde görüşler mevcuttur (11-14). Renal transplant alıcıları da D vitamini eksikliği veya yetersizliği açısından risklidir (15). Bu nedenle bu hasta grubunda D vitamini eksiklik veya yetersizliği bu hasta grubu için de KVH için ek bir risk faktörü olarak rol oynayabilir.

KVH'nın başlangıcında ve ilerlemesinde endotel bütünlüğünün bozulması ve endotel fizyolojik fonksiyonlarının kaybı anahtar rol oynamaktadır (16,17). Yaşlılık, oksidatif stres, inflamasyon nedeni ile endotel hasarlanması olmaktadır. Endotel hücrelerinin, inflamatuvar durumlarda etkilenmesine bağlı olarak endotel hücre apoptozisinde artış görülmektedir (18).

Endotel hücreleri; vericinin dokusu ile alıcının dolaşımdaki immün hücreleri arasında bariyer oluşturmaktadır. Reperfüzyon sırasında, alıcının immünokompetan hücreleri ilk olarak verici endotel hücreleri üzerinde bulunan HLA antijenleri ile karşılaşmaktadır. Vasküler rejeksiyonda, verici endotel hücreleri immün reaksiyonun başlamasında temel rol oynamaktadır. Endotel hasarlanması ise uzun dönemde greft kaybının en sık nedeni olan kronik allograft nefropatisinin önemli bir özelliğidir (19).

Son dönemlerde endotel hasarlanmasını göstermede dolaşımdaki endotel hücreleri (DEH) ve endotel mikro partikülleri gibi yeni belirteçler üzerinde çalışılmaktadır. DEH, endotel hasarı sonucunda endotelden kopan matür endotel hücreleridir (20-22). Bu hücreler, heterojen büyüklükte (10-50 µm), endotel hücre belirteçlerini (Vwf, CD31,CD144, CD146) taşıyan ve lökosit belirteçleri (CD45 veya CD 33) negatif olan hücre grubudur (23).

Sağlıklı kişilerde DEH sayısı oldukça düşük düzeydedir ve DEH sayısındaki artışlar endotel hasarının göstergesi olarak kabul edilmektedir. KVH'da, DEH sayısındaki artışın prognostik önemi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (24). Böbrek hastalıklarında ise; hemodiyaliz hastalarında, ANCA ilişkili vaskuliti olan hastalarda, erişkin renal transplant alıcılarında ve allograft rejeksiyon dönemlerinde DEH sayısında artış olduğu gösterilmiştir (25-29).

Çocuk renal transplant alıcılarında DEH sayısının değerlendirildiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışmadaki amacımız, çocuk ve adolesan renal transplant alıcılarının endotel hasarlanma durumunu DEH sayısı ile değerlendirmek ve D vitamini düzeyleri ile ilişkisini araştırmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Renal Transplantasyon

Renal transplantasyon, SDBY hastalarında uygulanan renal replasman seçeneklerinden biridir (30). Diyaliz ile karşılaştırıldığında renal transplantasyon hastalara daha iyi bir yaşam kalitesi sunmaktadır (1-3). Renal transplantasyon ile hastaların yaşam süresi 25-30 yıl kadar uzamaktadır. Fonksiyon gören grefti olan çocukların büyüme ve gelişmeleri normal ya da normale yakındır. Renal transplantasyonun diyalize göre olumlu yönleri nedeni ile SDBY gelişmiş çocuklarla ilgilenen hekimler için bu hastaların renal transplantasyonu birincil hedef olarak görülmektedir (3).

Renal transplantasyon öncesinde alıcı ve vericinin immünolojik olarak değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, kan grubu antijenleri, insan lökosit antijenleri (HLA) ve alıcıda var olan anti-HLA antikorları olmak üzere birçok immünolojik değerlendirme yapılmaktadır. Günümüzde kan grubu uyumsuz ve doku grubu uyumsuz nakiller özel şartlarda yapılabilmektedir, ancak başarılı bir böbrek naklinde kan grubu ve doku grubu uyumu aranmaktadır. ABO kan grubu antijenleri eritrositlerden başka endotel hücrelerin yüzeyinde de bulunur. Bu antijenlere karşı oluşan antikorlar endotele bağlanarak hiperakut rejeksiyon ve greft kaybına yol açar. Rh kan grubu antijenlerinin uyumu başarılı bir renal transplantasyon için gerekli değildir. Alıcı ve vericinin genetik farklılıkları major histokompetibilite kompleksi (MHC) olarak bilinen sistemle saptanmaktadır. MHC antijenleri klas1 ve klas 2 olarak ikiye ayrılmaktadır. Klas 1'de HLA A, B, C ve klas 2'de HLA DR, DQ ve DP tanımlanmıştır. HLA klas 1 antijenleri tüm nükleuslu hücrelerde bulunur. Eritrositlerde ise HLA antijeni bulunmaz. HLA klas 2 antijenleri ise makrofaj, dendritik hücre, endotel hücre ve B hücreleri üzerinde bulunur. IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin stimülasyonu ile T hücreleri, renal tübül epitelyal hücreler ve endotel hücreleri klas 2 moleküllerinin yapımını artırır. Transplantasyon için bakıldığında sadece altı antijenin (HLA A, B, DR) klinik önemi bulunmaktadır (5).

Doğal immün sistemde rol alan hücreler ve sitokinler hasar ya da patojenlere karşı savunmada ilk basamakta yer almaktadır. Transplantasyonun erken dönemlerinde sitokin üretimindeki artış ile birlikte endotel aktivasyonu da gerçekleşmektedir. Sitokin

üretimindeki artış ile birlikte vasküler endotel adezyon moleküllerindeki artış makrofaj gibi inflamatuvar hücrelerin grefte göç etmesine neden olmaktadır. Erken inflamatuvar yanıt ise dendritik hücrelerin grefte göç etmesine neden olur. Başlangıç hasarlanmanın şiddeti ve oluşan inflamatuvar yanıt, antijen spesifik immünitinin uyarılmasında merkez rol oynamaktadır. Başlangıç hasar ne kadar büyük ise sinyal de o kadar kuvvetli olacak ve antijen spesifik immün sistem o kadar fazla uyarılacaktır. Antijen spesifik immün sistemin uyarılması da rejeksiyona yol açacaktır. Bu durumda alıcı ve verici arasındaki antijenik farklılıklar önem kazanmaktadır (30).

Renal transplantasyonda kullanılan immünsupresif tedaviler indüksiyon tedavisi ve idame tedavi olarak iki gruba ayrılmaktadır. İndüksiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar; poliklonal ve monoklonal antikorlardır. Bu ilaçların hedefi immün hücrelerin yüzey molekülleridir. Antitimosit globulin atlardan (ATG) ve tavşanlardan (timoglobulin) elde edilen poliklonal antikorlardır. Her iki ilaç T hücre yüzey antijenlerine (CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11, CD18, CD28, CD45 ve T hücre reseptörü) karşı antikor bulundurur ve T hücre yıkımına yol açar. Monoklonal antikorlar fare monoklonal anti CD3 (OKT3) ve anti IL-2R antikorlarıdır (daclizumab ve basiliximab). OKT3, T hücre reseptör kompleksini tüm T hücre reseptör yüzeyinden kaldırarak alloantijenlerini tanıma yeteneğini yok eder. OKT3, yan etkilerinin fazla olması nedeni ile indüksiyon ilacı olarak nadiren kullanılır. Anti-IL-2R antikorları, IL-2 reseptörünün alfa zincirine bağlanarak hücrenin IL-2 ile bağlanıp bölünmesini engeller. İdame tedavide kullanılan ilaçlar ise; T hücrelerinin içindeki hedefler üzerine etki ederek allograftın uzun yaşamasını sağlayan immünosupresyonu sağlar. Bu ilaçlar siklosporin A ve takrolimus gibi kalsinörin inhibitörleri (KNI) ve mikofenolat mofetil (MMF), azatiyopurin ve sirolimus gibi antiproliferatif ajanlar ve korikosteroidlerdir (5).

İmmünsupresif tedavideki gelişmeler ile uzun dönemde greft kayıpları azalmıştır. Renal transplantasyon sonrasında yaşam süresindeki uzama ve başarılı sonuçlar transplantasyon sonrasındaki dönemde renal transplantasyon ile ilişkili uzun dönem komplikasyonları önleme çabasını gündeme getirmiştir (31). Uzun dönem komplikasyonlar, cerrahi işlemde üç ay sonraki dönemi kapsamaktadır. Renal transplantasyon sonrasında görülen en önemli uzun dönem komplikasyonlar ise enfeksiyonlar, malignansi, kemik hastalıkları ve kardiyovasküler hastalıklardır (KVH) (6). Çocuk yaş grubunda renal transplantasyon sonrasında en sık mortalite nedeni enfeksiyonlar, ikinci sırada ise KVH yer almaktadır (7).

## 2.2. Renal Transplant Alıcılarında Kardiyovaskuler Hastalıklar

KVH, transplantasyonun uzun dönem sonuçlarını etkileyen en önemli komplikasyondur. Çocuk renal transplant alıcılarında KVH kaynaklı ölüm nedenleri sık görülmemektedir. Ancak bu hasta grubunda KVH risk faktörleri olduğu için yaşamlarının ileri dönemlerinde KVH yaşama olasılıkları yüksektir. KVH'a yol açan vaskuler değişikliklerden katotis intima-media kalınlığındaki değişikliklerin renal transplant alıcılarında 8 yaş gibi erken bir yaşta da olabileceği gösterilmiştir (3).

Pediyatrik renal transplant alıcılarının uzun dönem sonuçları immunsupresif tedavideki yenilikler ve enfeksiyon kaynaklı mortalitede azalma nedeni ile oldukça iyi bulunmuştur. Bu çocukların yaşam kalitesi diyaliz ile kıyaslandığında daha iyi olmasına rağmen yaşitlarına göre KVH riski 10 kat artış göstermektedir (1,7).

Literatürde yetişkin renal transplant alıcılarında KVH nedeni ölüm oranı %40 olarak bildirilmektedir (32). Çocuklarda ise bu oran %15.4 olarak verilmektedir ki; bu oran sağlıklı çocuklara göre yüksek bir orandır (3).

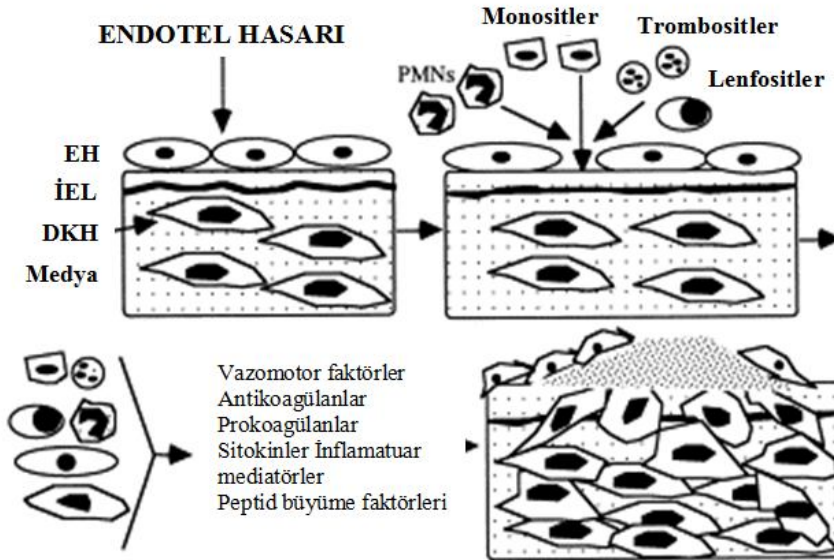
Kronik böbrek hastalarında geleneksel risk faktörleri ve üremi ilişkili faktörler nedeni ile KVH riskleri artmaktadır (8,33,34). Tablo 2.1'de kronik böbrek yetmezliği hastalarında tanımlanan KVH risk faktörleri gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Kronik böbrek yetmezliği hastalarında KVH risk faktörleri (34).

Geleneksel risk faktörleri	Üremi ilişkili risk faktörleri
1. İleri yaş	1. Albüminüri
2. Erkek cinsiyet	2. Hiperhomosisteinemi
3. Hipertansiyon	3. Yüksek lipoprotein a düzeyleri
4. Dislipidemi	4. Anemi
5. Diabet	5. Kalsiyum-fosfor metabolizma bozuklukları
6. Sigara	6. Hipervolemi
7. Fiziksel hareketsizlik	7. Elektrolit bozuklukları
8. Obesite	8. Oksidatif stres
9. Ailede KVH öyküsü	9. İnflamasyon (CRP)
10. Sol ventrikül hipertrofisi	10. Malnutrisyon
	11. Trombojenik faktörler
	12. Uyku bozuklukları
	13. Nitrik oksit / endotelin denge değişiklikleri

Renal transplant alıcılarında görülmekte olan kardiyovaskuler olaylar klinik bulgular ortaya çıkmadan önce başlamaktadır. Hipertansiyon, diabet, dislipidemi ve obesite gibi KVH için geleneksel risk faktörlerinin prevalansı transplant

populasyonunda yüksek orandadır (3). Bu durum pretransplant dönem kaynaklı problemlerden, renal yetmezlikten ya da immüsupresif tedaviler sonucunda gelişebilmektedir (7). KVH'a yol açan ateroskleroz ve koroner arter hastalıkları kan damar duvarındaki değişiklikler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Ateroskleroz patogenezi Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Damar duvarındaki bu değişiklikler kronik böbrek yetmezliğinin erken dönemlerinde ortaya çıkmaktadır ve kronik böbrek yetmezliği ve diyaliz süresi ile doğrudan ilişkilidir (3). Transplantasyona özgü faktörlerden immüsupresif tedaviler, akut rejeksiyon atakları ve posttransplant DM gelişimi KVH'da artışa neden olmaktadır. İmmunosupresif tedavilerden kortikosteroidler ve siklosporin hiperlipidemi yapıcı etkileri ile KVH riskini arttırmaktadır (6). Siklosporin ve takrolimus tedavilerinin yan etkisi olarak gelişen hiperglisemi / DM nedeni ile KVH risklerinde artış görülmektedir (7). Siklosporinin endotel hücreleri üzerindeki hasar yapıcı etkisi de gösterilmiştir (27). Son yayınlarda, D vitamini eksikliğinin de KVH riskinde artış yaptığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (4). Renal transplant alıcılarında da D vitamini eksikliği yüksek oranda görülmektedir (15).



(EH = endotel hücresi; İEL = internal elastik lamina; PMNs=polimorfonükleer nötrofiller, DKH = düz kas hücresi)

**Şekil 2.1.** Ateroskleroz patogenezi: Ateroskleroz patogenezinde ilk olarak endotel hasarı görülmektedir ('response to injury' hipotezi) (51).

### 2.3. D Vitamini ve Kardiyovaskuler Hastalıklar

Son yıllarda kronik böbrek yetmezliği hastalarında vitamin D eksiklik ve yetersizliğinin sık olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur. Diyaliz hastalarının %80'inde vitamin D eksiklik ve yetersizliği olduğu ve D vitamini düzeylerinde mevsimsel farklılıkların olduğu bildirilmiştir (35,36). Bireylerin D vitamini düzeyi değerlendirilirken, 25(OH)D<sub>3</sub> formu kanda düzeyi ölçülerek değerlendirilmektedir (37). D vitamini düzeyine göre yapılan tanımlamalar Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** Kronik böbrek yetmezliği hastalarında 25(OH)D<sub>3</sub> vitamin düzeyine göre yapılan tanımlamalar (3).

Tanımlamalar	25(OH)D <sub>3</sub> düzeyi (ng/ml)
1- D vitamini eksikliği	
-Ciddi	<5
-Hafif	5-15
2- D vitamini yetersizliği	16-30

D vitamini, vitamin D reseptörü (VDR) üzerinden etki etmektedir. Günümüzde VDR'nün böbrekte, barsakta, kemikte, paratiroid bezinde, kolonda, vaskuler dokuda ve myokarda olduğu gösterilmiştir (4). D vitamini, farklı organlarda bulunan VDR aracılığı ile kardiyovaskuler sistem, epitelyum ve immün sistemde fonksiyon göstermektedir (38).

Deneysel çalışmalarda ise, vitamin D'nin endotel ve immün sistem fonksiyonları üzerinde düzenleyici rolü olduğu; fibrozis, ateroskleroz, myokard hipertrofisi, epitelyal kanserler, renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAS), vaskuler kalsifikasyon ve renal hastalığın ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (39-41). Renal transplant alıcılarında da diyalizde izlenen hastalarda olduğu gibi D vitamini eksiklik ve yetersizliğinin sık olduğu gösterilmiştir (15).

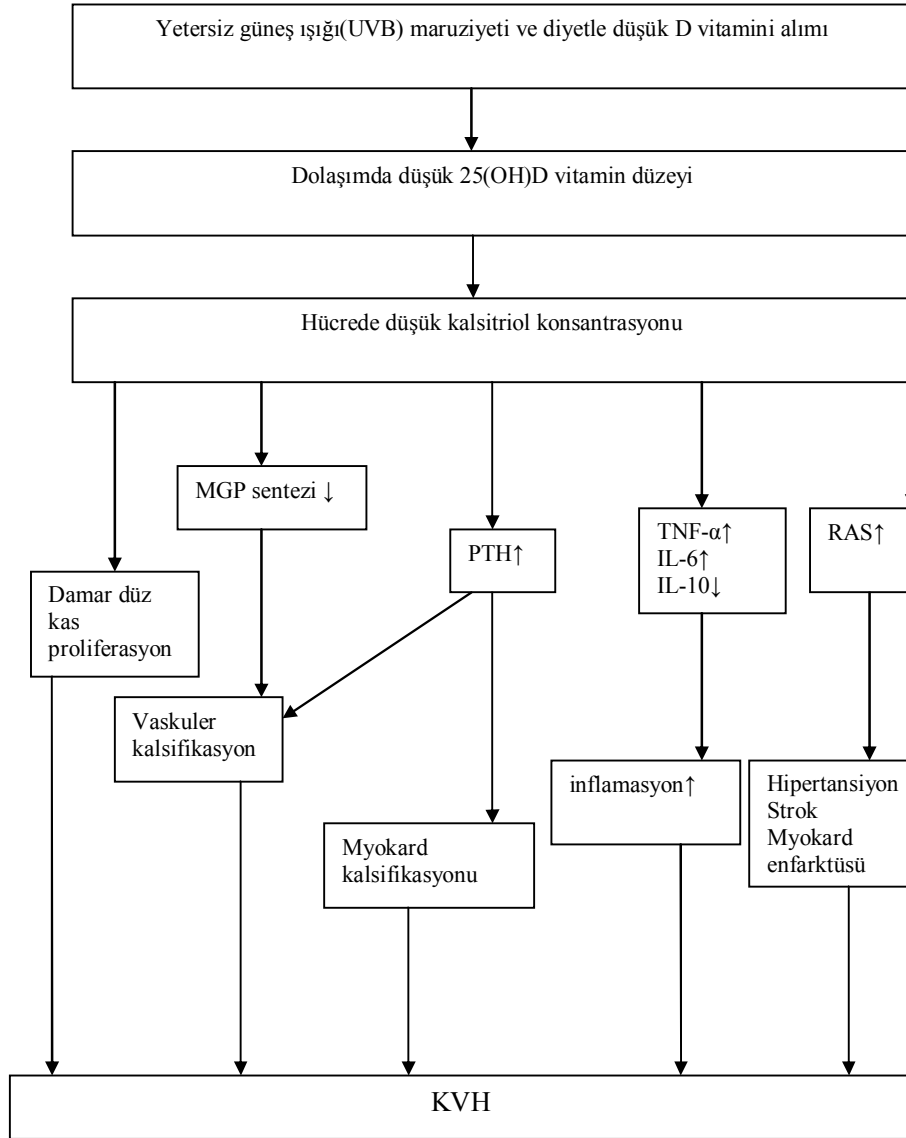
D vitamini, ciltte fotolitik bir yol ile kolesterolden üretilmektedir (42). Posttransplant dönemde gelişen D vitamini eksikliği sadece daha önceden var olan paratiroid hastalığı veya kemik tutulumu ile açıklanamamaktadır. Posttransplant dönemde bu hastaların güneş maruziyeti cilt kanserlerine yatkın olmaları nedeni ile azalmaktadır (43). Ayrıca, diyet ile D vitamini alımları kısıtlı olabilmekte ve immüno-supresif tedavilerin yan etkisi sonucunda D vitamini eksiklik veya yetersizliği

gelişebilmektedir. İmmunosupresif tedavilerden özellikle steroidler kalsiyum ve D vitamini homeostazisini etkilemektedir (44,45).

Aktif D vitamini (kalsitriol) ateroskleroz ve vasküler kalsifikasyon oluşumu üzerinde koruyucu etkisi Şekil 2.2’de gösterilen mekanizmalarla açıklanmaktadır. Birincisi; damar düz kas hücrelerinde vitamin D reseptörü yer almaktadır ve kalsitriol hücre içine kalsiyum geçişini sağlayarak bu hücrelerin proliferasyonunu inhibe etmektedir. İkincisi ise, matriks gla proteini vasküler kalsifikasyon için güçlü bir inhibitördür. Matriks gla proteini kondrositlerde ve damar düz kas hücrelerinde sentezlenir. Kalsitriol ise matriks gla protein sentezini arttırmaktadır. Üçüncüsü ise kalsitriol eksikliği paratiroid hormon (PTH) düzeyinde artışa neden olacaktır. Artmış PTH düzeyleri de kardiyak kontraktilitede artış, insülin direnci sonucunda kronik ateroskleroz, damar duvarında kalsiyum ve fosfor depolanması, kronik myokardiyal kalsifikasyon ve kronik kalp kapak kalsifikasyonuna neden olmaktadır. Dördüncüsü, kalsitriol proinflamatuar sitokinlerden olan TNF- $\alpha$  ve IL-6 üretimini baskılamakta, dolayısıyla inflamasyonu azaltmaktadır. Aynı zamanda kalsitriol antiinflamatuar sitokinlerden olan IL-10 üretimini arttırmaktadır. Beşinci olarak ise, kalsitriolün RAS üzerinde düzenleyici etkisi vardır. Nöroendokrin mekanizmalardan RAS iskemik kalp hastalıklarının progresyonunda rol oynamaktadır (11). Kalsitriol tedavisi ile kan basıncı, plasma renin aktivitesi ve anjiyotensin II düzeylerinde azalma olduğu gösterilmiştir (46).

D vitamini düzeyi ve endotel fonksiyon arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalar mevcuttur. DM hastalarında yapılan bir çalışmada düşük D vitamini düzeyi olan DM hastalarında D vitamini replasmanı ile endotel fonksiyonlarının düzeldiği gösterilmiştir. Vitamin D tedavisi ile hastaların endotel fonksiyonlarındaki düzelme D vitamini kan basıncını azaltıcı etkisi ve vasküler direnci düşürücü etkisinden kaynaklanabilmektedir (47). Renal transplant alıcılarında ise; vitamin D düzeyi ile endotel fonksiyonu arasında bir ilişki bulunamamıştır (4). Farklı sonuçlar nedeni ile D vitamini endotel fonksiyon ve bütünlüğü üzerindeki etkisi net olarak bilinmemektedir.





MGP: matriks Gla protein, PTH: paratiroid hormon, RAS: Renin anjiotensin sistemi, TNF- $\alpha$ : tümör nekrozant faktör-alfa, IL-6: interlökin-6, IL-10: interlökin-10, KVVH: kardiyovasküler hastalık

**Şekil 2.2.** D vitamini eksikliği ve KVVH arasındaki ilişki (11).

#### 2.4. Kardiyovasküler Hastalıkların Patogeneğinde Endotel Hasarı

Normal endotel, bütün damar düz kaslarında bulunan, damar duvarını kaplayan ince bir skuamoz epitel tabakasıdır. Vazodilatatör ve vasokonstriktör substratların yapımında etkili olarak, vasküler homeostazın sağlanmasında temel rol oynayan en küçük endokrin organdır (48). Normal endotel kan akımına karşı hem tromborezistans bir yüzey görevi görürken, hem de kan ve damar duvarı arasında makromoleküler bir bariyer vazifesi yapar. Endotel hücreleri morfolojik yapıları ve stratejik anatomik

pozisyonları dolayısı ile vasküler düz kas hücreleri ile kan dolaşımının komponentleri arasında (trombosit, monosit, enzimler, hormonlar v.d) selektif geçirgen bir bariyer oluşturur (49).

Endotel bütünlüğünün bozulması ve endotel fizyolojik fonksiyonlarının kaybı, KVH'nın başlangıcında ve ilerlemesinde anahtar rol oynamaktadır (50). Yapılan çalışmalarda başta ateroskleroz olmak üzere birçok hastalıkta endotelin rolü daha iyi anlaşılmış ve "endotel ateroskleroza karşı birinci derecede (en önemli) savunma sistemidir" düşüncesi oluşmuştur (49). Aterosklerotik hastalıklarda başlangıç olayın endotel hasarı olduğu, hasarlanma sonucunda makrofaj infiltrasyonu, düz kas hücre proliferasyonu ve fibröz yapı gibi lokal inflamatuvar yanıt olduğu gösterilmiştir (25,51) (Bkz Şekil 2.1). Arteriyopati, çocukluk çağında başlamaktadır ve aterosklerozun komplikasyonlarından olan kalp yetmezliği, serebrovaskular hastalıklar, koroner arter hastalıkları, myokard enfarktüsü ve periferik vasküler hastalıklar gibi olayların gelişiminden önce görülmektedir (52).

Endotel hasarının ateroskleroz ve vasküler hastalıklarda erken dönemde ve temel rol oynaması nedeni ile endotel hasarı ve endotel disfonksiyon belirteçleri KVH'nın erken bulgusu olarak kullanılabilir (4).

## **2.5. Renal Transplantasyonda Endotel Hücreleri ve Endotel Hasarlanması**

Vericinin endotel hücreleri, reperfüzyon sırasında alıcının immün hücreleri temasta olan ilk hücreler olması nedeni ile transplantasyon immünolojisinde kilit rol oynamaktadır. Endotel hasarlanması, uzun dönemde greft kaybının en sık nedeni olan kronik allograft nefropatisinin önemli bir özelliğidir (19).

1962 yılında Medawar (53) vericinin endotel hücreleri alıcının endotel hücreleri ile yer değiştirdiğinde adaptasyonun gerçekleşebileceğini öne sürmüştür. Greft adaptasyonu transplante edilen organ daha az immünojenik olduğunda olmaktadır ve bu durumda greft rejeksiyonuna daha rezistan olmaktadır. Yapılan deri greft çalışmalarında, endotel hücrelerindeki bu değişim gösterilmiştir (54). Pek çok çalışma solid organ transplantasyonunda endotel hücre değişimi ile ilgili sorulara yanıt bulmaya çalışmıştır. Çalışmaların erken dönemlerinde çelişkili bulgular vardır. Çoğunlukla endotelin donor kaynaklı olarak kaldığı düşünülmesine karşın daha sonraki yapılan çalışmalarda endotelin alıcı kaynaklı olan parçalarının olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler özellikle hasar fazla olan ve az çalışan grefte gösterilmiştir. Lagaij ve

arkadaşları (55) transplante edilen böbreğin damarlarında alıcının MHC antijenlerini göstermiştir. Alıcının endotel hücrelerinin verici endotel hücreleri ile yer değiştirdiği ve bu durumun da greft rejeksiyonu ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada, vasküler rejeksiyonu olan hastalarda endotel hasarının alıcı endotel hücreleri ile onarıldığı, donör böbreğindeki endotel hücrelerinin alıcının HLA antijeni ve kan grubu antijenlerini taşıdığını göstermişlerdir. Medawar (53) endotel hücrelerinin değişiminin adaptasyonla sonuçlanacağı düşüncesinde olmasına rağmen yapılan bu çalışmada endotel hücre değişiminin greft için prognozu kötüleştirdiği bulunmuştur.

İmmüsupresif tedavideki gelişmelere rağmen renal greft uzun dönem prognozunda belirgin değişiklikler olmamıştır. Kronik greft disfonksiyonunda özellikle KNİ grubundaki ilaçlar sorumlu tutulmaktadır. Kronik allogreft nefropati ya da histopatolojik olarak siklosporin toksisitesi gelişmiş olan hastalarda KNİ doz azaltımı ya da kesilmesi böbrek fonksiyonlarında düzelmeye neden olmaktadır. KNİ kullanılmayan tedavi protokollerinde ise posttransplant 6. ayda daha düşük serum kreatinin değerleri olduğu da gösterilmiştir. İn vitro, KNİ kullanımında intrarenal vazo-konstrüksiyon ve fibrojenik sitokinlerin uyarısı gibi pek çok etki gösterilmiştir. Bu çalışmalar; KNİ kullanımının endotel hücreler üzerindeki hasar verici etkisini düşündürmektedir (27). Endotel hücreleri, özellikle KNİ gibi ilaçların toksisitesinde de zarar görmektedir. Biopsi örnekleri vasküler hasarlanmayı göstermede yeterli değildir. Literatürde, DEH'nin renal transplant alıcılarında endotel hasarının bir belirteci olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (29).

## **2.6. Hasarlı Endotel Hücreleri ve Belirteçleri**

Damar duvarında hasarlanma olduğu zaman; damar duvarından kopan endotel hücreleri dolaşımda artış göstermektedir. Normal şartlarda kanda ml başına 1-3 tane damar duvarından kopmuş endotel hücre (DEH) bulunur (56).

Dolaşımdaki endotel hücreleri pek çok klinik olay için prognostik özellik kazanmaktadır. Endotel hasarlanmasında dolaşımdaki endotel hücrelerinin kantitasyonu endotel ilişkili fizyolojik ve patolojik durumların gösterilmesinde basit bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Endotel hücrelerin kantite edilmesinde akış-sitometri kullanılan yöntemlerden birisidir (57-59). Vasküler homeostasisin devamı için endotelin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü gereklidir. Kan ve dokular arasında, vasküler endotel oldukça dinamik hücre popülasyonunu içermektedir. Özel

fonksiyonel ihtiyaçlara göre, endotel hücreleri patofizyolojik uyarılara veya proinflatuar sitokin, büyüme faktörü, enfeksiyon ajanları, lipoproteinler ve oksidatif stres gibi agonistlere yanıt verirler. Uzamış ya da abartılı endotel aktivasyonu endotel disfonksiyonuna, vasküler hastalıkların prelinik dönemine, apoptoz, hücre ayrılması ve hücre nekrozu gibi kalıcı hücre kayıplarına neden olmaktadır (60). Endotel hasar belirteci olarak DEH sayısının değerlendirildiği pek çok çalışma vardır. Hipertansiyon, diabet ve hemodiyaliz hastalarında DEH sayısı yüksek bulunmuş ve bu hastalarda endotel hasarlanması artmış olarak değerlendirilmiştir (25). Erişkin hemodiyaliz hastalarında yapılan bir başka çalışmada da yüksek saptanan DEH sayısının kardiyovasküler olaylar için bağımsız prediktör olarak değerlendirilebileceği görüşü öne sürülmüştür (61).

DEH sayısının vasküler hasarlanma, orak hücreli anemi, riketsiya ve CMV enfeksiyonları, trombotik trombositopenik purpura, akut koroner sendrom ve Behçet hastalığında artış gösterdiği bildirilmiştir (62-69).

DEH sayıları, vasküler hasarlanmanın şiddeti ile orantılı olarak artış göstermektedir. Yaygın damar hasarlanması durumunda örneğin riketsiya enfeksiyonu, orak hücre krizi veya CMV enfeksiyonu durumlarında dolaşımda artmış endotel hücreler gösterilmiştir. Koroner anjioplasti gibi lokalize damar hasarlanmasında ise normalden biraz yüksek endotel hücre sayısı gösterilmiştir (60). 1990'ın başlarında endotel hücrelerine özgü belirteçlerin bulunması ile bu hücreler daha kolay tanımlanmaya başladı. S-Endo monoklonal antikoru ile endotel hücresinde bulunan hem iskelet yapısında olan hem de sinyalde görevli CD146 molekülü tespit edildi (70-73).

ANCA ilişkili vaskulitlerde CD146, vWF, CD31 ve ulex europaeus lectin-1 (UEA-1) pozitif hücrelerin hastalık aktivitesinde kullanılabilecek yeni bir belirteç olabileceği bildirilmiştir (26). 2007 yılında yapılan bir çalışmada CD146 molekülünün sadece damar endoteline özgü olmadığı bildirilmiş, melanoma hücrelerinde, perisitler, kemik iliğindeki fibroblastlar, sinir hücrelerinin lifleri ve T hücre alt gruplarında da CD146 molekülü tanımlanmıştır. Ancak endotel hücre yüzeyinde bulunan bu belirteç lenfositlerdekenden 1000 kat daha fazla yoğunlukta eksprese edilmektedir. CD146 molekülü, klinik açıdan endotelial hücre aktivasyonunun ve hasarlanmasının belirteci olarak tanımlanabilir (74). Periferik kanda dolaşan endotel hücreleri (DEH) spesifik endotelial belirteçlerle (CD144 yada CD146) tesbit edilirler. DEH'ler endotelial hasar

sonucunda damar intimasından koştukları düşünölen hücrelerdir. En çok kullanılan DEH belirteci olan CD146; ayrıca melanom hücrelerini, düz kas hücrelerini, trofoblastları da işaretler. CD144 ise endotel hücrelerin dışında fetal karaciğer, hematopoetik doku hücrelerini de işaretler (58). DEH, heterojen büyüklükte (10-50 µm) olan, endotel hücre belirteçlerini (Vwf, CD31, CD144, CD146) taşıyan ve lökosit belirteçleri (CD45 veya CD 33) negatif olan hücre grubudur (23). DEH, iki farklı teknikle çalışılabilmektedir. Magnetik bead separasyon ve akış sitometri yöntemi. Akış sitometri yönteminde farklı endotel hücre belirteçleri kullanılarak tanımlamalar yapılabilmektedir (59). Tablo 2.3'de akış-sitometri yönteminde kullanılan belirteçler ve bu belirteçlerin periferik kanda hangi hücrelerden eksprese edildiği gösterilmiştir.

**Tablo 2.3.** Endotel hücrelerindeki hücre yüzey antijenleri (59).

CD/antijen ismi	Diğer isimleri	Eksprese edilen diğer hücreler
CD31	PECAM-1	Trombositler, monositler, nötrofiller, T hücre alt grupları
CD34	-	Hematopoetik kök hücreler
CD62e	E-selectin	Aktive cilt/sinovyal endotel
CD54	ICAM-1	Aktive B ve T lenfositleri, monositler
CD105	Endoglin	Aktive monositler, doku makrofajları, eritroid öncü hücreler
CD106	VCAM-1	Aktive endotel, stromal hücreler,
CD141	Trombomodulin	Keratinositler, trombositler, monositler, nötrofiller
CD144	VE-cadherin	Hematopoetik kök hücre
CD146	P1H1, S-Endo-1	Aktive T lenfositleri
CD202b	Tie-2	Hematopoetik kök hücre
VEGFR-2	KDR, Flk-1	Hematopoetik kök hücre

\*ICAM-1, intraselüler hücre adezyon molekülü-1, KDR, kinaz insert domain reseptör (VEGFR2), PECAM-1, trombosit endotelyum hücre adezyon molekülü; VCAM-1, vasküler hücre adezyon molekülü-1; VE, vasküler endotel; VEGFR2, vasküler endotel büyüme faktör reseptörü 2

Tabloda görüldüğü gibi, akış-sitometri yönteminde CD146 belirteci kullanılıyorsa, aynı belirteç aktive T lenfositlerinde de olabileceği için endotel hücresi ve T lenfositlerini ayırt edici olarak CD45 ya da CD3 belirteçlerinden biri kullanılabilir. CD45 ya da CD3 belirteci T lenfositlerinde pozitif olan ancak endotel hücrelerinde negatif olan belirteçlerdir(59).

Özetle diyebiliriz ki; CD146 endotel hücrelerinde yer alan bir adezyon molekülüdür ve klinik açıdan endotel hücre aktivasyonunun ve hasarlanmasının belirteci olarak tanımlanabilir(72, 74). Hasar gören vasküler yapılardan kaynaklanan dolaşan endotel hücreleri tarafından eksprese edilirler (75).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Olgular

Ağustos 2000 - Şubat 2012 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde renal transplantasyon yapılan ve sonrasında düzenli olarak Pediatrik Nefroloji Bilim Dalı tarafından takip ve tedavisi düzenlenen hastalar çalışmaya alındı. Çalışma öncesi hastalar ve kontrol grubu sözlü ve yazılı olarak bilgilendirilerek yazılı onamları ve etik kurul onayı alındı.

Çalışmadan dışlanma kriterleri: Posttransplant izlem süresi 3 aydan kısa olanlar, çalışma sırasında aktif enfeksiyonu olanlar, çalışma öncesinde son 3 ay içinde KNİ tedavi değişikliği yapılan, plazmaferez tedavisi alan, eritrosit transfüzyonu yapılmış hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Hasta grubunun yaş, cinsiyet, verici tipi, renal transplant tarihi, kullanmakta oldukları immünesupresif tedaviler, boy, kilo, sistolik ve diyastolik kan basınç ölçümleri kayıt edildi. Hastaların vücut kitle indeksi (VKİ)  $\text{vücut ağırlığı/boy(m)}^2$  formülüne göre hesaplandı. VKİ hastaların yaş ve cinsiyetine göre değerlendirildi (76). İzlem süresince geçirilmiş olan akut rejeksiyon sayısı ve aldıkları tedaviler dosya bilgilerinden incelendi. Hastalarda izlem süresince saptanmış hipertansiyon ve almakta oldukları antihipertansif tedaviler kayıt edildi. Hasta grubunun hemogram, kan üre azotu (BUN), serum kreatinin, sistatin c, kalsiyum, fosfor, ürik asit, total kolesterol, trigliserid, KNİ (takrolimus ya da siklosporin) kan düzeyleri ve 25(OH)D3 düzeyleri ölçüldü. Schwartz formülüne göre glomerül filtrasyon hızı (GFH) hesaplandı (77). GFH değerlerine göre hastaların evrelendirmeleri yapıldı (78). Hastaların izlem süresince olan KNİ kan düzeyi ortalamaları alındı. İki yıldan daha uzun süreli izlemi olan hastaların ise son iki yıldaki KNİ kan düzeyi ortalamaları alındı. Hastaların D vitamini düzeyi ölçümlerine göre D vitamini düzeyi eksiklik, yetersizlik ve normal olarak Tablo 2.2'deki değerlere göre sınıflandırıldı (3).

Hasta grubu ile yaş ve cinsiyeti uyumlu, böbrek yetmezliği olmayan, hipertansiyon ve kalp hastalığı öyküsü olmayan, enüresis nokturna nedeni ile Pediatrik Nefroloji Polikliniği'ne başvuran 20 gönüllü kontrol grubu olarak alındı. Kontrol grubunun, boy, kilo, kan basınç ölçümleri, BUN, serum kreatinin, sistatin c, 25(OH)D3

düzeyleri ölçüldü. Schwartz formülüne göre GFH hesaplandı (77), VKİ'leri yukarıda bahsedilen formüle göre hesaplandı.

### 3.2. Laboratuvar Ölçümleri

Rutin klinik kontrollerinde hastalar ve kontrol grubundan damar girişimi nedeni ile oluşabilecek endotel hasarının çalışmayı etkilememesi için rutin tetkikleri alındıktan sonra 5 ml heparinli tüpe ek kan örneği alındı. Dolaşımdaki hasarlı endotel hücrelerin belirlenmesi için akış-sitometri yöntemi kullanıldı. Akış-sitometri yönteminde; anti-CD-146 ve anti-CD-45 monoklonal antikoları kullanıldı. Dolaşımdaki hasarlı endotel hücreleri; CD-146 (+) CD45(-) olan hücreler olarak tanımlandı. Çalışma öncesinde örnekler taze kan ve işlem sonrasında dondurulup bekletildikten sonra çalışıldı ve sonuçlar arasında fark görülmedi. Bu nedenle çalışma öncesinde örnekler aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

Hücre yüzey boyaması ile akış-sitometrisinde endotel hasarı tayininde; aşağıdaki reaktifler kullanıldı.

1. PBS:  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  içermeyen PBS (Sigma P4417): 5 tablet PBS 1 l distile su ile çözüldü.
2. Histopaque (Ficoll) (Biochrom, Germany)
3. Lenfosit saklama solüsyonu: %70 RPMI 1640 + %20 FBS (serum) + %10 DMSO
4. PE Mouse Anti-human CD146 (BD Pharmingen)
5. FITC Mouse Anti-human CD45 (BD Pharmingen)

Mononükleer hücrelerin izolasyonu için; heparinli tüplerde gelen kan örnekleri 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra 15 ml'lik falcon tüpüne alındı. Üzerlerine, toplam hacim 5 ml olacak kadar 1x PBS eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. Beş ml'lik Histopaque (Ficoll) çözeltisi bulunan başka bir falcon tüpü üzerine elde edilen karışımın tamamı yavaşça eklendi. Daha sonra tüpü sarsmadan 1800 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. İki faz arasında kalan beyaz kısım lenfositler ve diğer mononükleer hücreler olarak steril bir falcona alındı. Hücrelerin üzerine hacim 12 ml'ye tamamlanacak şekilde 1xPBS eklendi ve alt üst edilip karıştırıldı. 2500 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp, dipte kalan pellet üzerine 600-1000 µl (genelde 600) lenfosit saklama solüsyonu konulup resüspanse edildi ve cryotüplere alındı. -80°C'de %70'lik alkol içeren kapaklı dondurma kabında 1 gece

bekletilip, ertesi gün azot tankına konuldu. Hücre yüzey boyaması için; azot tankında bulunan örnekler deneyin yapıldığı gün, çıkarılıp 37°C'lik su banyosunda hızlıca çözüldü ve üzerlerine 1 ml fetal bovine serum (FBS) eklendi. Birkaç dakika sonra, minispinde (400xg) (Eppendorf) santrifüj edildi ve süpernatantlar atıldı. Hücre pelleti, hücrenin miktarına göre 300-500 µl hücre yıkama solusyonu ile resüspanse edildi ve 3 farklı ependorfa bölündü. İlgili antikora ait izotipik kontrol (IgG1-κ isotype control) veya CD-45 ve CD-146 ile 30 dakika inkübe edilen hücreler, hücre yıkama solusyonu ile yıkama işleminden sonra flow tüplerine aktarıldı. Hücrelerin akım-sitometri analizi FACSCantoII (BD Biosciences, CA, USA) ve FACSDiva yazılımı (BD Biosciences, CA, USA) kullanılarak yapıldı.

Kan üre azotu (BUN), kreatinin, kalsiyum, fosfor, trigliserid, total kolesterol, kan şekeri ve CRP'i içeren rutin serum biyokimyasal değerleri ile 25(OH)D3 vitamin düzeyi standart laboratuvar metodları kullanılarak COBAS-8000 cihazında, sistatin c ise nefelometrik yöntem ile BNII nefelometre cihazında analiz edildi. İlaç düzeylerinden takrolimus (COBAS-integra, Roche) ve siklosporin (Twinn, Siemens) EMIT yöntemi ile analiz edildi.

### **3.3. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler, SPSS 16 (versiyon 16.0, SPSS Inc., Chicago, USA) programı ile yapıldı. Sayısal değerler ortalama ve standart sapma ve sıklık yüzde değer olarak ifade edildi. Kategorik değişkenlerin farklılık analizinde Mann Whitney U testi kullanıldı. Ölçümler arasındaki korelasyonların analizinde Spearman korelasyon testleri kullanıldı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



#### 4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 50 hastanın 27'si erkek (%54), 23'ü kız (%46) ve ortalama yaşları  $14.7 \pm 3.7$  yılıdır. Kontrol grubunda ise 9 erkek (%45) ve 11 kız (%55) yer aldı ve yaş ortalaması  $13.1 \pm 3.4$  yıl bulundu. Kronik böbrek yetmezliğine neden olan primer hastalıkları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Hastalarda en sık kronik böbrek yetmezliği nedeni olarak ürolojik anomaliler saptandı. Oniki hastaya kadavradan, 38 hastaya canlı vericiden nakil yapılmıştı. Hastaların 38'i (%76) takrolimus ve 12'si (%24) CsA kullanmaktaydı. Yedi hasta KNİ tedavisine ek olarak sadece mikofenolat mofetil almaktaydı. Diğer 43 hasta ise KNİ'e ek olarak prednisolon ve mikofenolat tedavileri almaktaydı. Hastaların 37'sinde (%54) posttransplant izlemleri süresince hiç akut rejeksiyon atağı gözlenmemişti. Hastaların 13'ünde (%26) ise bir ya da daha fazla akut rejeksiyon atağı posttransplant izlem süresinde gözlenmişti. Hastaların 16'sında hipertansiyon öyküsü vardı. 15 hastada hipertrigliseridemi ve 9 hastada hiperkolesterolemi saptandı. Hastaların hiçbirinde posttransplant DM gelişimi yoktu. 37 hastanın VKİ yaşa göre normal sınırdadır, 11 hastada fazla tartı ve 2 hastada obesite mevcuttu.

Hasta grubunun ortalama serum kreatinin  $1.13 \pm 0.82$  mg/dl, sistatin c  $1.58 \pm 0.73$  mg/dl ve GFH  $61 \pm 23$  ml/dak/1.73 m<sup>2</sup> bulundu. Kontrol grubunun ortalama serum kreatinin  $0.55 \pm 0.16$  mg/dl, sistatin c  $0.75 \pm 0.10$  mg/dl ve GFH  $107 \pm 15$  ml/dak/1.73 m<sup>2</sup> bulundu. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri Tablo 4.2'de belirtilmektedir. Hasta grubunun DEH sayısı  $128 \pm 89$  hücre/ml (42-468 hücre/ml), kontrol grubunun ise  $82 \pm 33$  hücre/ml (32-137 hücre/ml) bulundu. Hasta ve kontrol grubunun DEH sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ( $p = 0,024$ , Şekil 4.1).

Hasta grubunun GFH değerlerine göre KBY evrelemesi ve DEH sayıları Tablo 4.3'de gösterilmektedir. GFH değerlerine göre hastalar iki gruba ayrıldı: Grup 1, GFH  $< 60$  ml/dak/1.73 m<sup>2</sup>, grup 2 ise GFH  $\geq 60$  ml/dak/1.73 m<sup>2</sup>. Grup 2'nin DEH sayısı grup 1'e göre daha düşük saptandı ancak istatistiksel anlam kazanmadı [sırasıyla  $105 \pm 46$  hücre/ml (52-241 hücre/ml) ve  $153 \pm 115$  hücre/ml (42-468 hücre/ml),  $p = 0.290$ , Şekil 4.2].

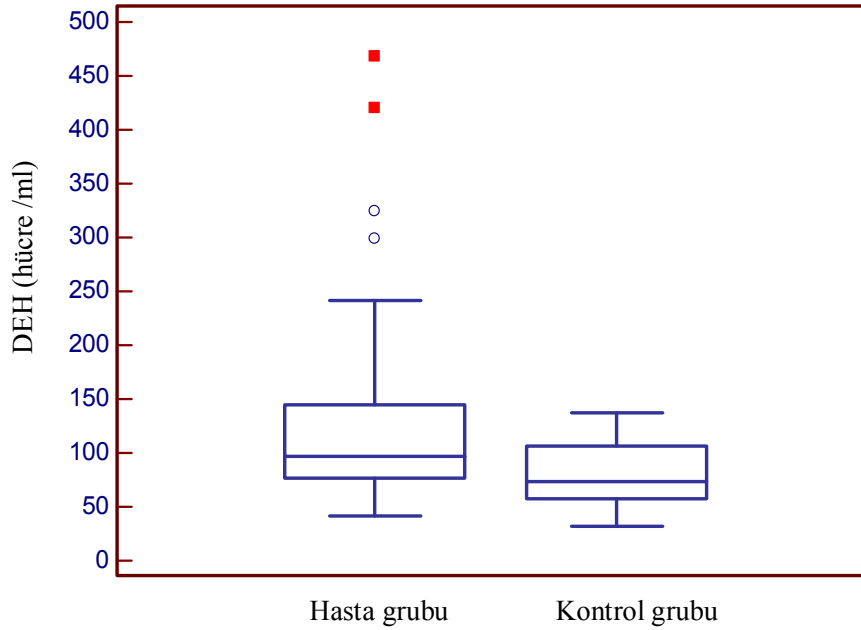
**Tablo 4.1.** Hastaların primer böbrek hastalık nedenleri.

Böbrek hastalıkları	Sayı (yüzde değer)
1. Ürolojik anomali	30 (%60)
2. Kistik böbrek hastalığı	3 (%6)
3. Glomerulonefrit	2(%4)
4. Bardet Biedl Sendromu	2 (%4)
5. Nefrotik sendrom	5 (%10)
6. Nefronoftizi	5 (%10)
7. Sistinozis	1 (%2)
8. Nedeni bilinmeyen	2 (%4)

**Tablo 4.2.** Hasta ve kontrol grubunun özelliklerinin karşılaştırılması.

Değişkenler	Hasta grubu n=50	Kontrol grubu n=20	p değeri
SKB <sup>1</sup> (mmHg)	109±12	107±13	0.913
DKB <sup>2</sup> (mmHg)	65±6	62±7	0.447
Serum kreatinin (mg/dl)	1.13±0,82	0.55±0.16	0.000*
Sistatin c (mg/dl)	1.58±0.73	0.73±0.10	0.000*
GFH <sup>3</sup> (ml/dak/1.73m <sup>2</sup> )	61±23	107±15	0.000*
25(OH)D3 (ng/ml)	15±8	23±9	0.010*
VKİ <sup>4</sup>	21±4.7	17.9±3.6	0.017*
DEH <sup>5</sup> (hücre/ml)	128±89 (42-468)	82±33 (32-137)	0.024*

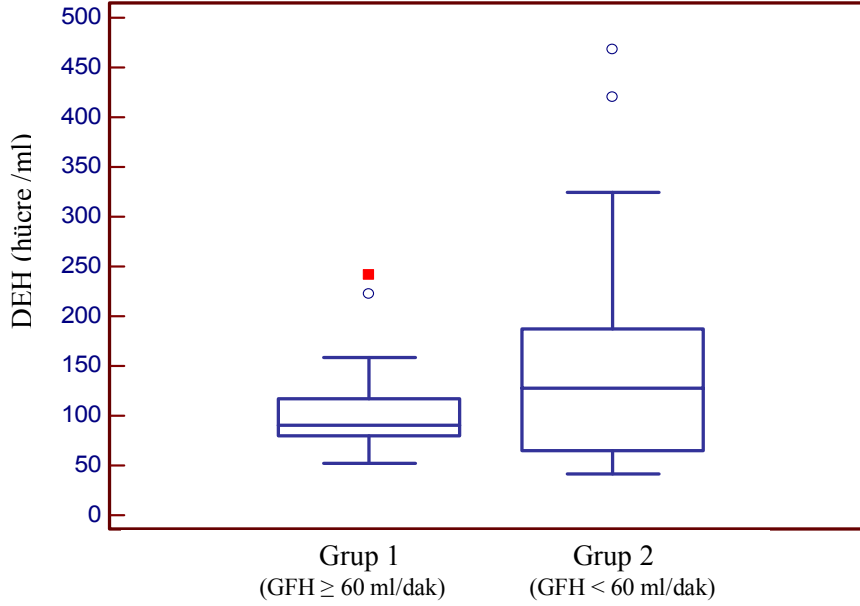
<sup>1</sup>SKB= sistolik kan basıncı, <sup>2</sup>DKB=Diastolik Kan Basıncı, <sup>3</sup>GFH= Glomerül Filtrasyon Hızı, <sup>4</sup>VKİ= vücut kitle indeksi, <sup>5</sup>DEH= Dolaşımdaki hasarlı endotel hücreler, \*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı



**Şekil 4.1.** Hasta ve kontrol grubunun DEH sayıları (p= 0.024).

**Tablo 4.3.** Hasta grubunun KBY evrelemesi ve DEH sayıları.

KBY evrelemesi	Hasta sayısı (n=50)	DEH sayısı (hücre/ml)
Evre 1	4 (%8)	84.5±30 (55-127)
Evre 2	22 (%44)	109±48 (52-241)
Evre 3	19 (%38)	155±122 (42-468)
Evre 4	5 (%10)	146±96 (62-299)



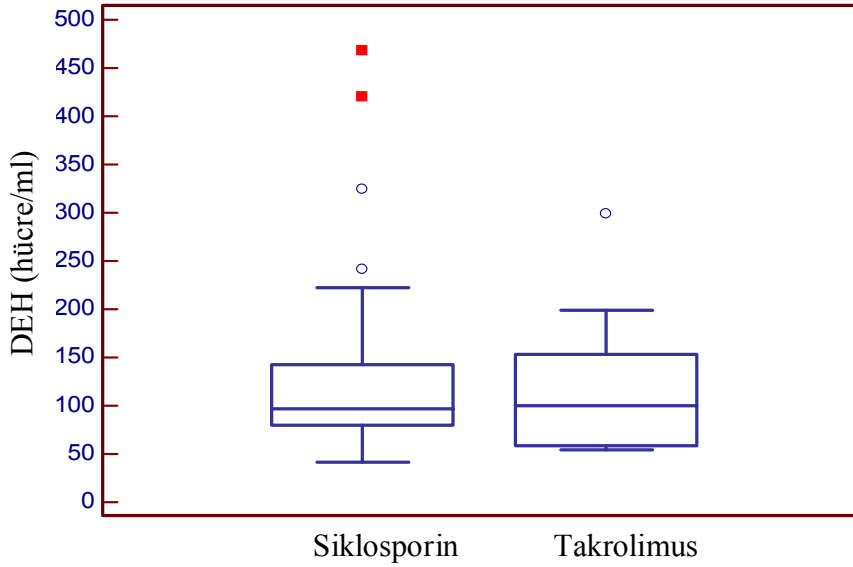
**Şekil 4.2.** GFH değerine göre hastaların DEH sayıları ve karşılaştırılması (p= 0.290).

Hasta grubunun güncel ilaç kan düzeyleri; CsA sıfıncı ve 2. saat kan düzeyi ortalama değeri sırasıyla 119±44 ng/ml ve 338±156 ng/ml ve takrolimus kan düzeyi ortalama değeri 5.6±2.5 ng/ml. Son iki yılda bakılmış tüm CsA kan düzeyi ortalaması 298±159 ng/ml, takrolimus kan düzeyi ortalaması 7.5±3.1 ng/ml saptandı. Takrolimus kullanan hastaların DEH sayıları 130±94 hücre/ml, siklosporin kullanan hastaların DEH sayıları ise 121±74 hücre/ml saptandı (Şekil 4.3, p= 0.716).

KNİ tipi, donör tipi, akut rejeksiyon öyküsü, hipertansiyon varlığı, hipertrigliseridemi ve hiperkolesterolemi özelliklerine göre hastalar değerlendirildiğinde DEH sayılarında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı (sırasıyla p değerleri; p=0.716, p=0.658, p=0.573, p=0.460, p= 0.385, p=0.843, Bkz, Tablo 4.4).

D vitamini düzeyi hasta grubunda 15±8 ng /ml bulundu. Kontrol grubunda 23±9 ng/ml bulundu. Hasta grubunda D vitamini düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı (p=0.010, Şekil 4.4).

Hasta grubunda 25(OH)D<sub>3</sub> vitamin düzeylerine göre eksiklik ve yetersizlik olan hastalar ve D vitamini düzeyi normal olan hastalar olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hasta grubunda; 5 hastada D vitamini düzeyi normal, 14 hastada ise D vitamini düzeyi yetersiz ve 31 hastada D vitamini düzeyi eksik olarak saptandı. Tablo 4.5’de D vitamini normal olan grup ile D vitamini eksiklik / yetersizlik olan grubun demografik ve laboratuvar değerleri verilmektedir. Her iki grubunun DEH sayılarında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı (p=0.296). Diyastolik kan basıncı D vitamini düzeyi eksiklik / yetersizlik olan grupta istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (p=0.005).



Şekil 4.3. Siklosporin ve takrolimus kullanan hastaların DEH sayıları (p=0.716).

Tablo 4.4. Hasta özelliklerine göre DEH sayılarının karşılaştırılması.

Hasta özellikleri	DEH sayıları (hücre/ml)	p değeri
1-KNİ tipi -Takrolimus/ Siklosporin	30±94 / 121±74	0.716
2- Donor tipi -Kadavra/ Canlı	133±87 / 126±74	0.658
3-Akut rejeksiyon öyküsü -Evet/ Hayır	148±111 / 121±83	0.573
4- Hipertansiyon öyküsü -Evet/Hayır	143±101 / 121±83	0.460
5-Hipertrigliseridemi -Evet/Hayır	128±69 / 128±94	0.385
6-Hiperkolesterolemi -Evet /Hayır	138±117 /126±83	0.843

DEH sayısı ile renal transplant süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ( $p=0.004$ ,  $r=0.397$ ). DEH sayısı ile GFH arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı ( $p= 0.012$ ,  $r= -0.300$ ). DEH sayısı ile yaş, serum kreatinin, sistatin c ve D vitamini düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptanmadı (sırasıyla  $p=0.692$ ,  $p= 0,572$ ,  $p= 0,877$ ,  $p= 0.840$ ). DEH sayısı ile serum kalsiyum, fosfor, ürik asit, trigliserid, total kolesterol, açlık kan şekeri, CRP, sedimentasyon arasında korelasyon saptanmadı (sırasıyla  $p= 0.213$ ,  $p= 0,655$ ,  $p=0,219$ ,  $p= 0,574$ ,  $p= 0,273$ ,  $p= 0,547$ ,  $p= 0,690$ ,  $p= 0,582$ ).

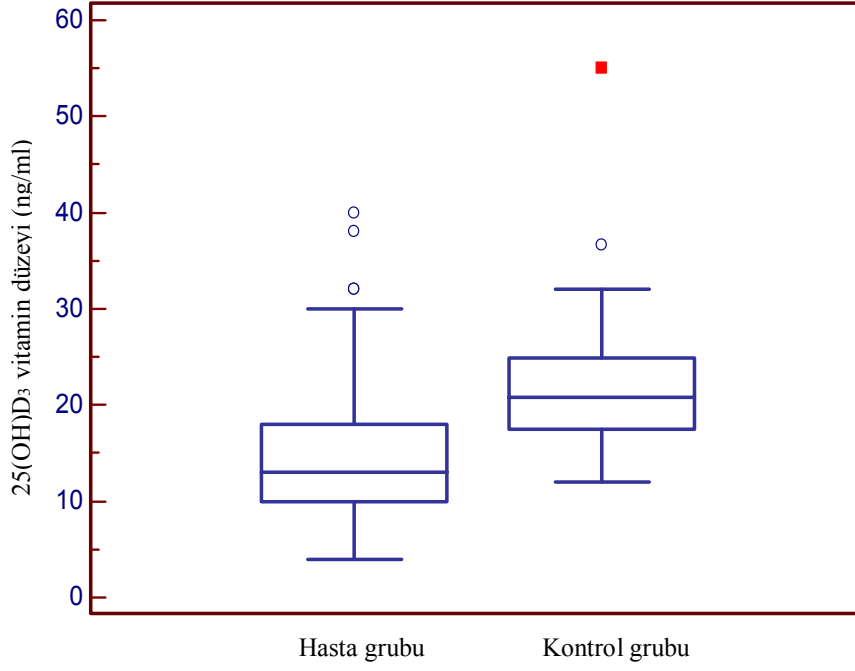
DEH sayısı ile hastaların güncel CsA sıfırncı saat kan düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı ( $p= 0.004$ ,  $r= 0.714$ , Bkz; Şekil 4.4).

DEH sayısı ile güncel bakılan CsA 2. saat kan düzeyi, takrolimus kan düzeyi, son iki yıllık CsA ve takrolimus kan düzeyi ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ( $p= 0,840$ ,  $p= 0,259$ ,  $p= 0,198$ ,  $p= 0,403$ ).

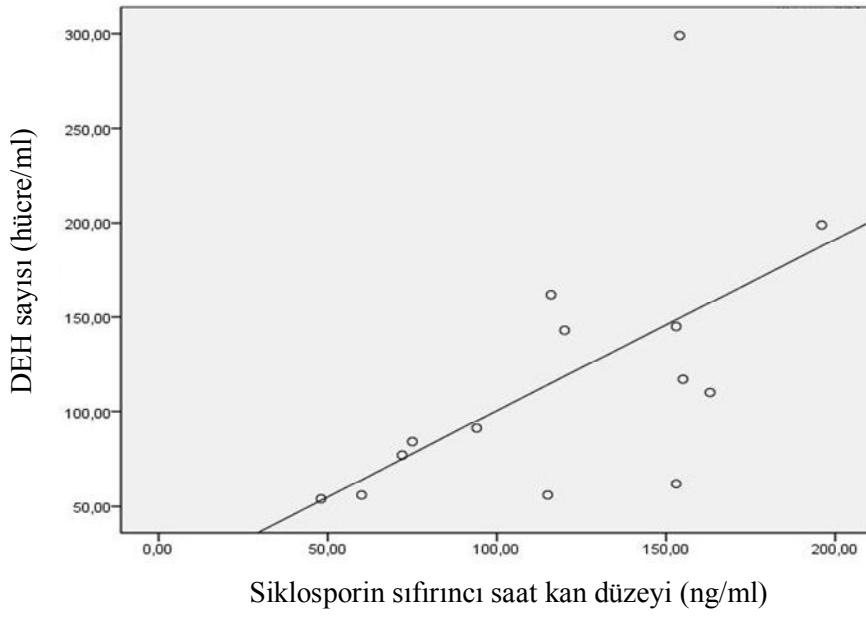
**Tablo 4.5.** D vitamini eksiklik/yetersizlik olanlar ile D vitamini normal olan hastaların demografik ve laboratuvar özellikleri.

Değişkenler	Vitamin D eksiklik/yetersizlik (n=45)	Vitamin D normal (n= 5)	P değeri
Yaş	14.8±3.6	13.3±5.3	0.593
Cinsiyet (Erkek / Kız)	22 / 23	5 / 0	-
Kadavra/ canlı verici	12/ 33	0 / 5	-
Sistolik kan basıncı (mmHg)	107±8	124±27	0.108
Diyastolik kan basıncı (mmHg)	63±6	80±22	0.005*
25(OH)Vitamin D (ng/ml)	13.8±5.7	34.4± 4.3	0.000*
DEH (hücre/ml)	121±77	188±163	0.296
Serum kreatinin (mg/dl)	1.13±0.85	1.08±0.37	0.660
Sistatin c (mg/dl)	1.59±0.72	1.50±0.41	0.683
eGFR (ml/dak/1.73m <sup>2</sup> )	62±24	58±13	0.754
Total kolesterol (mg/dl)	173±31	170±19	0.950
Trigliserid (mg/dl)	133±58	105±56	0.227
Serum kalsiyum (mg/dl)	9.93 ± 0.50	10.14±0.15	0.170
Serum fosfor (mg/dl)	4.47 ±0.78	4.30 ±1.08	0.488
Serum ürik asit (mg/dl)	5.77±1.47	5.98±1.14	0.800
VKİ (kg/m <sup>2</sup> )	21±4.9	21.1±2.9	0.660
Renal transplantasyon süresi (ay)	30±21	55±49	0.227
Hipertansiyon (E/H)	12 /33	4 / 1	-
Akut rejeksiyon öyküsü (E/H)	12 / 33	1 / 4	-

E=evet, H= hayır, DEH= dolaşımdaki endotel hücreler, VKİ= vücut kitle indeksi \* $p<0.05$  istatistiksel olarak anlamlı



Şekil 4.4. Hasta ve kontrol grubunun D vitamini düzeyleri (p=0.010).



Şekil 4.5. Güncel bakılan siklosporin sıfırncı saat kandüzeyi ile DEH sayısı arasındaki ilişki (p= 0.004, r= 0.714).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma çocuk ve adolesan renal transplant alıcılarında, endotel hasarını DEH sayısı ile değerlendiren ve endotel hasarı ile 25(OH)D<sub>3</sub> vitamin düzeyleri arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır. Hasta grubunda DEH sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptandı. Bu sonuç, pediatrik renal transplant alıcılarında sağlıklı çocuklara göre endotel hasarının arttığını göstermektedir. Transplant süresi ve CsA sıfırncı saat kan düzeyi endotel hasarını arttırıcı risk faktörü olarak dikkati çekmektedir. D vitamini pediatrik renal transplant alıcılarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. D vitamini düzeyi ve DEH sayısı arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Renal transplant alıcılarında KVH görülme sıklığı diyaliz tedavisinde izlenen hastalara göre daha az olmasına rağmen yine de genel populasyon ile karşılaştırıldığında daha fazla sıklıkta görülmektedir (79-82). Endotel bütünlüğünün bozulması ve fizyolojik fonksiyonlarının kaybı KVH başlangıcında ve gelişiminde temel mekanizmadır (16). Bu nedenle, literatürde endotel hasarı ve endotel disfonksiyonunu değerlendiren çalışmalar bulunmaktadır. Vasküler değişiklikleri değerlendirilirken ultrasonografi, bilgisayarlı tomografi, magnetik rezonans ve anjiyografi gibi pek çok metod kullanılabilir (52). Vasküler katılaşmanın KBY erken dönemlerinde başladığı gösterilmiştir (83). Yapılan bir çalışmada erken çocukluk döneminde KBY tanısı almış genç yetişkin hastaların karotis intima media kalınlıklarının kontrol grubuna göre artmış olduğu gösterilmiştir (84). Genel pediatrik populasyonda arteriyel değişiklikler ile KVH risk faktörleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (85,86). Renal transplant alıcılarında Briese ve arkadaşları (87) arteriyel fonksiyondaki değişiklikleri nabız dalga hızı ve augmentasyon indeksi ölçümleri ile değerlendirmişler ve 36 hastada subklinik arteriopati ile uyumlu bulgular elde etmişlerdir. Mitsnefes (88) ve Bilginer (89) genç renal transplant alıcılarında karotid arterde morfolojik değişiklikleri göstermişlerdir. Erişkin renal transplant alıcılarında endotel hasarı değerlendirilirken Eliza yöntemi ile CD146 belirteci kullanılarak değerlendirilmiş ve koroner arter hastalığı olan grup ile GFH daha düşük olanlarda endotel hasarının belirgin olarak arttığını göstermiştir (90). Tüm bu çalışmalar asemptomatik renal transplant alıcılarında fonksiyonel ve yapısal olarak arteriyel değişikliklerin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda da endotel hasarının belirteci

olarak DEH sayısının kontrol grubuna göre artmış olması literatür ile uyumludur. Hastaların GFH ile DEH sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif ilişki saptanması da literatürle uyumlu olarak bulunmuştur.

Renal transplant alıcılarında immünsupresif tedavi olarak siklosporinin kullanıma girmesinden sonra yan etkilerine yönelik çalışmalar yapılmıştır. İn vitro, siklosporinin endotel hücre replikasyonunu inhibe ettiği ve sitoplazmik vezikül ve nükleer değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (91). Yapılan bir başka çalışmada ise in vitro olarak KNİ'nin intrarenal vazokonstrüksiyon ve fibrojenik sitokinleri stimüle ettiği, sikloporine yanıt olarak vasküler geçirgenliğin arttığı ve mitokondriyal enzimlerin inhibisyonu gösterilmiştir (92-94). Hayvan ve insan çalışmalarında ise siklosporinin nitrik oksit üretimini bozduğu saptanmıştır (95,96). Bu gözlemler sonucunda KNİ, endotel hücre fonksiyonu üzerinde hasar verici etkisi olduğu düşünülmüştür. Ancak KNİ'nin neden olduğu endotel hasarını gösteren bir belirteç literatürde tanımlanmamıştır. Renal biopsilerde, siklosporin toksisite özellikleri nonspesifiktir. Woywodt ve arkadaşlarının (27) 57 renal transplant alıcısında yaptığı bir çalışmada hasta grubundaki CsA kullanan 38 kişide DEH sayısı ve KNİ kullanmayan 19 renal transplant alıcısı ve 21 sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucuna dayanarak yazarlar, DEH sayısının renal transplant alıcılarında KNİ kaynaklı endotel hasarının bir belirteci olarak kullanılabileceği görüşündedirler (27). Çalışmamızda tüm hastalar KNİ kullanmaktaydı ve CsA kullanan 12 hasta ile takrolimus kullanan 38 hastanın DEH sayıları arasında fark bulunmadı. Literatürde takrolimus'un CsA gibi endotel hücreleri üzerindeki etkisi net bilinmemektedir. Çalışmamızda hasta grubunun sağlıklı kontrol grubuna göre DEH sayılarındaki istatistiksel olarak anlamlı yüksek olması takrolimus'un da CsA'a benzer şekilde endotel hasarına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

Literatürde CsA kan düzeyi ve DEH arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Woywodt ve arkadaşlarının (27) erişkin renal transplant alıcılarında yapmış olduğu çalışmada CsA kan düzeyi ile DEH sayısı arasında ilişki bulunmamıştır. Yüzyirmidokuz erişkin renal transplant alıcısında yapılan bir başka çalışmada ise CsA sıfırıncı saat kan düzeyi ile DEH sayısı arasında anlamlı ilişki saptanmış, ancak takrolimus kan düzeyi ile ilişki saptanmamıştır (29). Çalışmamızda ise hastaların çoğunluğu takrolimus kullanmaktaydı. CsA kullanan hastalar ile takrolimus kullanan



hastalarda endotel hasar beliteci olarak kullanılan DEH sayısı benzer bulundu. İlaç kan düzeyleri güncel ve son iki yıldaki tüm kan düzeyleri olarak iki şekilde değerlendirildi. Çalışmamızda güncel CsA sıfıncı saat kan düzeyi (C0) ile DEH sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı. CsA ikinci saat kandüzeyi, son iki yıldaki siklosporin kan düzeyi ortalama değeri, takrolimus kan düzeyi ve son iki yıldaki takrolimus kandüzeyi ortalama değeri ile endotel hasarı arasında ilişki saptanmadı.

DEH sayısı ile yaş, cinsiyet, serum kreatinin, sistatin c arasında ilişki saptanmadı. Literatürdeki çalışmalarda da benzer şekilde DEH sayısı ile yaş ve cinsiyet arasında ilişki saptanmamıştır (27,29). Literatürde erişkin renal transplant alıcılarında yapılan çalışmada DEH sayısı ile transplant süresi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptanmış (29). Çalışmamızda da literatürle benzer şekilde, renal transplant süresi ile endotel hasarı arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon saptandı. Hastaların hiç birisinde güncel başvuruda akut rejeksiyon atağı saptanmadığı için akut rejeksiyon öyküsü dosya kayıtlarından incelendi. Akut rejeksiyon öyküsü olan ve olmayan grup arasında DEH sayısında fark saptanmadı. Literatürde özellikle histopatolojik olarak vasküler rejeksiyon gösterilmiş olan renal transplant alıcılarında DEH sayısı yüksek saptanmıştır (29). Çalışmaya alınan hastalarda akut rejeksiyon atağı saptanmadığı için histopatolojik değerlendirmeleri yapılmadı. Akut rejeksiyon atağı sırasında bu hastalarda değerlendirme yapılması durumunda farklı sonuçlar elde edilebilir.

Kronik allograft nefropatisi, posttransplant üç aydan sonraki dönemde böbrek fonksiyonlarının yavaş ve progresif olarak azalmasıdır. Histopatolojik bulguları spesifik değildir. Ateroskleroz, glomerüler lezyonlar ve glomerüler skleroz, peritübüler kapillerlerde olan değişiklikler, interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi görülmektedir. Greft aterosklerozu, arter ve arteriollerde intimal kalınlaşma ile birlikte damar duvarında makrofaj, lenfosit ve köpük hücrelerinin infiltrasyonu ile karakterizedir. İntimal kalınlaşma myofibroblastların mediadan intimaya göç etmesi ve lokal proliferasyonu, ardından da ekstraselüler matriks proteinlerinin depolanması sonucunda da olmaktadır (97). KNİ toksisitesinin kronik greft disfonksiyonunda anahtar rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (98). DEH sayısının siklosporin sıfıncı saat kan düzeyi ile ilişkisi DEH sayısının KNİ yan etkilerini değerlendirmede yol gösterici olabileceğini düşündürmektedir. DEH sayısında artışın nedeni peritubuler

kapiller kaynaklı olabilir ve kronik greft kaybını gösterebilir. Greft dışındaki endotel hasarlanması nedeni ile de DEH sayısı artış gösterebilir. DEH sayısındaki artış ile gösterilen siklosporin toksisitesi, renal transplant alıcılarında arteroskleroz ve vasküler hastalıkların belirteci olabilir (99).

Renal transplant alıcılarında greft fonksiyonu göstergesi olarak serum kreatinin düzeyi ile değerlendirilmektedir. Ancak serum kreatinin değerindeki artışlar greftteki immünojenik ve nonimmünojenik nedenli gelişen olayların sonucu olarak gelişmektedir. Oysa ki; ilk gelişen olaylardan olan endotel hasarı gibi durumlar erken dönemde değerlendirilir ise greft fonksiyonu serum kreatinin değerinde artış olmadan çok önce değerlendirilebilir. Bu açıdan bakıldığında endotel hasar belirteci olan DEH sayısının değerlendirilmesi sonucunda renal transplant alıcısının izleminde tedavisi ile ilgili erken yapılacak müdahaleler ile greft ömrü daha uzun olabilir.

Endotel hasarının renal transplant alıcılarındaki bir başka faktörü greft kaynaklı endotel hasarı sonucunda alıcıda kemik iliği kaynaklı endotel progenitör hücrelerin endotelde oluşan hasarı onarıcı etkisi sonucunda greft immünojenik yapısında değişikliktir. Greftte oluşan kimerizm literatürde gösterilmiştir. Greftte ne kadar fazla endotel hasarı olur ise greft o kadar immünojenik özellikte olacak ve rejeksiyon riski artış gösterecektir. Non immünojenik nedenli oluşan KNI kaynaklı endotel hasarı hem direkt endotel üzerindeki etkisi hem de endotel hasar ve onarımı sonucunda gelişen greftin immünojenik özelliklerinin değişimi nedeni ile greft ömrünün kısalmasına neden olabilmektedir. Böylece greftin rejeksiyon riski de artış gösterecektir (18).

KVH, renal transplant alıcılarında enfeksiyondan sonra görülen ikinci sıklıktaki uzun dönem komplikasyonlarından (7). Geleneksel ve geleneksel olmayan faktörler ile transplantasyona özgü faktörler renal transplant alıcılarında KVH insidansını arttırmaktadır (1,9). Yapılan son çalışmalarda kalsiyum ve fosfor metabolizması, D vitamini eksikliğinin KVH riskinde artış yaptığını göstermektedir (11-14). Klinik, epidemiyolojik ve hayvan çalışmaları sonucunda D vitamininin sadece kalsiyum bir hormon olmadığı KVH önlenmesinde, kemik sağlığında, immün yanıtta, otoimmün hastalıklarda, böbrek koruyucu etki, glisemik kontrolün sağlanmasında ve bazı kanser türlerinin önlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (100). Beslenme ile alınan D vitamini eksikliği oldukça sık görülmektedir ve D vitamini düzeyi sıklıkla kronik böbrek yetmezliği ve transplant hastalarında daha ciddi seviyede düşüktür (101). Çalışmamızda da renal transplant alıcılarında vitamin D eksiklik ve yetersizliği

oldukça yüksek oranda saptandı. Literatürde erişkin renal transplant alıcılarında endotel fonksiyonu ve D vitamini ilişkisini değerlendirilmiş ancak bir ilişki saptanmamış (4). DEH sayısı ve D vitamini arasında ilişkiyi değerlendiren çalışma ise literatürde yoktur. Çalışmamızda DEH sayısı ile D vitamini düzeyi arasında ilişki saptanmadı. D vitamin düzeyi normal olan ve D vitamini eksiklik/ yetersizliği olan grup arasında DEH sayıları arasında farklılık saptanmadı. Renal transplant alıcılarında uzun dönem izlem ve D vitamini tedavisi ile DEH sayılarının değişiminin gösterilebileceği ileri çalışmalar bu konuda daha aydınlatıcı olabilir.

Çalışmamızda, pediatrik renal transplant alıcılarında endotel hasarının göstergesi olan DEH sayısı sağlıklı çocuklara göre yüksek saptanmıştır. CsA sıfırncı saat kan düzeyi ve transplant süresi endotel hasarını etkileyen faktörlerdir. Takrolimus kan düzeyinin endotel hasarı üzerinde benzer etkisi bulunmamıştır. CsA kullanan ve takrolimus kullanan hastalarda endotel hasarı benzer bulunmuştur. Vitamin D eksiklik ve/veya yetersizliği renal transplant alıcılarında sık görülen bir bulgudur. D vitamini düzeyi ile endotel hasar göstergesi olan DEH sayısı arasında ilişki saptanmamıştır.

Sonuç olarak; pediatrik renal transplant alıcılarında endotel hasarını DEH sayısı ile göstermek ve izlemek mümkündür. CsA sıfırncı saat düzeyleri ve posttransplant izlem süresi uzun olan hastalar endotel hasarı riski nedeniyle dikkatli izlenmelidir.

## 6. SONUÇLAR

1. Pediatrik renal transplant alıcılarında endotel hasar göstergesi olan DEH sayısı sağlıklı kontrollere göre daha yüksek saptandı.
2. Takrolimus ve siklosporin kullanan hastaların DEH sayısı benzer bulundu.
3. Akut rejeksiyon öyküsü olan hastalar ile akut rejeksiyon öyküsü olmayan hastaların DEH sayısı benzer bulundu.
4. Endotel hasarı ile ilişkili diğer faktörlerden, hipertansiyon, hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi olan hastalar ile olmayan hastaların DEH sayısı benzer bulundu.
5. Kadavradan ve canlı vericiden renal transplantasyon yapılan hastaların DEH sayısı benzer bulundu.
6. Siklosporin sıfırncı saat kan düzeyi ile CEC sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptandı.
7. Renal transplantasyon süresi uzadıkça endotel hasarı artmış bulundu.
8. GFH ile endotel hasarı arasında negatif ilişki bulundu.
9. D vitamini düzeyi renal transplant alıcılarında sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı.
10. D vitamini eksiklik/yetersizliği renal transplant alıcılarında yüksek prevalansta saptandı.
11. D vitamini düzeyi ile DEH sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.
12. D vitamini eksik/yetersiz olan hastalar ile D vitamini düzeyi normal olan hastaların DEH sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

## 7. ÖZET

### PEDİATRİK RENAL TRANSPLANT ALICILARINDA ENDOTEL HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Dolaşımdaki endotel hücrelerinin (DEH) kardiyovasküler hastalıklarda endotel hasarını değerlendirmek için kullanılmasının değerli olduğu bildirilmiştir. Amacımız, en önemli morbidite ve mortalite nedeni kardiyovasküler hastalık olan pediatrik renal transplant hasta grubunda endotel hasarını değerlendirmek ve D vitamini düzeyleri ile endotel hasarı arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir.

Elli pediatrik renal transplant alıcısı ve 20 sağlıklı kontrol grubunda anti-CD146 ve anti-CD45 monoklonal antikoları kullanılarak akış-sitometri yöntemi ile DEH çalışıldı. DEH'i, CD146(+) CD45(-) hücreler olarak tanımlandı. Hastaların demografik bilgileri dosyadan kaydedildi. Böbrek fonksiyon testleri, kan şekeri, serum kolesterol ve trigliserid ve 25(OH)D<sub>3</sub> vitamin düzeyleri çalışıldı. Hastaların glomerül filtrasyon hızları (GFH) Schwartz formülüne göre hesaplandı. Hasta grubunda 25(OH)D<sub>3</sub> vitamin düzeylerine göre eksiklik ve yetersizlik olan hastalar ve D vitamini düzeyi normal olan hastalar olmak üzere iki gruba ayrıldı. Gruplar arasında DEH sayıları karşılaştırıldı.

Hasta grubunun 27'si erkek (%54), ortalama yaşları 14.7±3.7 yıldır. Kontrol grubunun ise 9'u erkek (%45) ve ortalama yaşları 13.1±3.4 yıldır. Renal transplant alıcılarında DEH sayısı sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (128±89 hücre/ml (42-468 hücre/ml), 82±33 hücre/ml (32-137 hücre/ml), p=0.024). DEH sayısı ile GFH arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon saptandı (r =-0.300, p=0.012). DEH sayısı ile transplant süresi ve siklosporin sıfırncı saat kan düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla; r=0.397, p=0.004 ve r= 0,714, p=0,004). Takrolimus ve siklosporin kullanan hastaların DEH sayıları benzer bulundu (p=0.716). Donor tipi, akut rejeksiyon öyküsü, hipertansiyon varlığı, hipertrigliseridemi ve hiperkolesterolemi özelliklerine göre hastalar değerlendirildiğinde DEH sayılarında istatistiksel olarak farklılık saptanmadı. DEH sayısı ile serum kalsiyum, fosfor, ürik asit, trigliserid, total kolesterol, açlık kan şekeri, CRP, sedimentasyon değerleri arasında korelasyon saptanmadı. Hasta grubunda; beş hastada D vitamini düzeyi normal, 14 hastada ise D vitamini düzeyi

yetersiz ve 31 hastada D vitamini düzeyi eksik olarak saptandı. DEH sayısı ile D vitamini düzeyleri arasında korelasyon yoktu ( $p=0,867$ ).

Pediyatrik renal transplant alıcılarında endotel hasarı sağlam kontrol grubuna göre daha yüksektir. Transplantasyon sonrası süre ve siklosporin sıfırncı saat kan düzeyi endotel hasarını arttırıcı risk faktörleri olarak dikkat çekmektedir. Pediyatrik renal transplant alıcılarında D vitamini eksikliği ve yetersizliği yüksek oranda bulundu. D vitamini düzeyi ile endotel hasarı arasında ilişki saptanmadı.

**Anahtar kelimeler:** Dolaşımdaki endotel hücreleri, kardiyovaskuler hastalık, pediyatrik renal transplantasyon, endotel hasarı, D vitamini.

## 8. ABSTRACT

### THE EVALUATION OF ENDOTHELIAL DAMAGE IN PEDIATRIC RENAL TRANSPLANT RECIPIENTS

Circulating Endothelial Cells (CEC) were reported to be important for the evaluation of endothelial damage in cardiovascular disease. The aim of the study was evaluation of endothelial damage in pediatric renal transplant recipients with CEC numbers and the correlation between D vitamin levels and endothelial damage.

CEC were studied by flow-cytometry at 50 pediatric renal transplant recipients and 20 healthy controls with the use of anti-CD146 ve anti-CD45 monoclonal antibodies. CEC were defined as CD146(+) CD45(-) cells in peripheric blood. Demographic features of patients were reported from the medical records. Renal function tests, fasting blood glucose, serum cholesterol, triglyceride and 25(OH)D3 vitamin levels were studied. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated with Schwartz formula. Patient group was categorised according to the 25(OH)D3 vitamin levels as normal and deficient /insufficient. CEC numbers were compared between groups.

Twenty patients were boys (54%) and mean ages of all patients were  $14.7\pm 3.7$  years. Nine of the control group were boys (45%) ,mean ages of control group were  $13.1\pm 3.4$  years. CEC numbers of patient group were higher than controls (respectively;  $128\pm 89$  cells/ml (42-468 cells/ml),  $82\pm 33$  cells/ml (32-137 cells/ml),  $p=0.024$ ). There was statistically significant negative correlation between CEC numbers and GFR ( $r = -0.300$ ,  $p=0.012$ ). There was statistically possitive correlation between CEC numbers and transplant duration, cyclosporine through level (respectively;  $r=0.397$ ,  $p=0.004$  ve  $r= 0,714$ ,  $p=0,004$ ). CEC numbers of patients on tacrolimus and cyclosporine were similar ( $p=0.716$ ). There was no statistically significant difference according to donor type, acute rejection history, hypertension occurance, hypertriglyceridemia and hypercholesterolemima. There was no statistically significant correlation between CEC numbers and serum calcium, phosphorus, uric acid, triglyceride, chlosterol, fasting blood glucose, CRP, sedimentation.

Five patients had normal vitamin D levels. Fourteen of patients had vitamin D insufficiency and 31 had deficiency. There was no correlation between CEC numbers and vitamin D levels ( $p=0,867$ ).

Endothelial damage is higher in pediatric renal transplant recipients than control group. Posttransplant duration and cyclosporine trough level were risk factors for endothelial damage. Vitamin D deficiency/ insufficiency is high in pediatric renal transplant recipients. There was no correlation between endothelial damage and D vitamin levels.

**Key words:** Circulating endothelial cells, cardiovascular disease, pediatric renal transplantation, endothelial damage, vitamin D.



## 9. KAYNAKLAR

1. Silverstein DM, Mitchell M, LeBalnc P, Boudreaux JP. Assesment of risk factors for cardiovascular disease in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Transpl* 2007; 11: 721-9.
2. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ, Port FK. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation and recipients of a first cadaveric transplant. *N Eng J Med* 1999; 341(23): 1725-30.
3. Harmon WE. Pediatric Renal Transplantation. In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa, editors. *Pediatric Nephrology*, 6th edition. Heidelberg, Springer 2009; 1897-8.
4. Altan M, Keven K, Şengül Ş, Dinçer İ, Ongun A, Tolunay C, Akar N, Egin Y, Ertürk S. Endothelial dysfunction and Vitamin D Levels in Kidney Allograft Recipients. *Turk Neph Dial Transpl* 2012; 21(1): 53-9.
5. Modgil A, Jordan SC. Renal Transplantation. In: Kher KK, Schnaper HW, Makker SP, editors. *Clinical Pediatric Nephrology*; 2nd edition, London, Informa Healthcare 2007; 425-30.
6. Silkensen JR. Long-term complications in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 582–8.
7. Becker-Cohen R, Nir A, Rinat C, Feinstein S, Algur N, Farber B, Frishberg Y. Risk Factors for Cardiovascular Disease in Children and Young Adults after Renal Transplantation. *Clin J Soc Nephrol* 2006; 1: 1284-92.
8. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Pafrey P, Pfeffer M, Leopold R, Spinosa DJ, Wilson PW. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: A statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003; 108(17): 2154–69.
9. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2000; 58: 353-62.
10. Al-Massarini G, Vacher-Coponat H, Paul P, Widemann A, Arnaud L, Loundau A, Robert S, Berland Y, Dignat-George F, Camoin-Jau L. Impact of immunosuppressive treatment on endothelial biomarkers after kidney transplantation. *Am J of Transpl* 2008; 8: 2360-7.
11. Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R. Putting cardiovascular disease and vitamin D insufficiency into perspective. *Br J Nutr* 2005; 94: 483-92.
12. Lind L, Hanni A, Lithell H, Hvarfner A, Sorenson OH, Ljunghall S. Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-age men. *Am J Hypertens* 1995; 8: 894-901.

13. Duprez D, De Buyzere M, De Backer T, Clement D. Relationship between vitamin D and the regional blood flow and vascular resistance in moderate hypertension. *J Hypertens* 1993; 11: 304-5.
14. Hollick MF. Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases and some cancers. *South Med J* 2005; 98: 1024-7.
15. Ewers B, Gasbjerg A, Moelgaard C, Fredericsoen AM, Marckmann P. Vitamin D status in kidney transplant patients: Need for intensified routine supplementation. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 431-7.
16. Drexler H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 51-60.
17. Rosenzweig A. Circulating endothelial progenitors-Cells as biomarkers. *N Engl J Med* 2005; 353; 10: 1055-7.
18. Reinders MEJ, Rabelink TJ, Briscoe DM. Angiogenesis and Endothelial Cell Repair in Renal Disease and Allograft Rejection. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 932-42.
19. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Rubin NT, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346: 580-90.
20. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, Haubitz M, Hebbel RP, Lip GY, Mancuso P, Sampol J, Solovey A, Dignat-George F. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost* 2005; 93: 228-35.
21. Dignat-George F, Sampol J, Lip G, Blann AD. Circulating endothelial cells: Realities and promises in vascular disorders. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33: 495-9.
22. Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: New insights into an old concept. *Eur J Haematol* 2000; 65: 215-20.
23. Boos CJ, Lip GY, Blann AD. Circulating endothelial cells in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1538-47.
24. Woywodt A, Blann AD, Kirsch T. Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: Proposal of a definition and a consensus protocol. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 671-7.
25. Koc M, Bihorac A, Segal MS. Circulating endothelial cells as potential markers of the state of the endothelium in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42: 704-12.
26. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet* 2003; 361: 206-10.
27. Woywodt A, Schroeder M, Mengel M, Schwarz A, Gwinner W, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells are a novel marker of cyclosporine-induced endothelial damage. *Hypertension* 2003; 41(part 2): 720-3.

28. Mohamed AS, Thomson J, McDonald KJ, Hillyard DZ, Mark PB, Elliott HL, Jardine AG. Circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005; 37: 2387–90.
29. Woywodt A, Schroeder M, Gwinner W, Mengel M, Jaeger M, Schwarz A, Haller H, Haubitz M. Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; 76: 1-4.
30. Dallman MJ. Immunology of graft rejection. In: Scheidt S, Buckholtz B, editors. *Kidney transplantation: Principles and Practice*, Saunders, Philadelphia 2008; 6th edition; 9-25.
31. Shroff R, Knott C, Gullett A, Wells D, Marks SD, Rees L. Vitamin D deficiency is associated with short stature and may influence blood pressure control in paediatric renal transplant recipient. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 2227-33.
32. Lindholm A, Albrechtsen D, Frödin L, Tufveson G, Persson NH, Lundgren G. Ischemic heart disease-major cause of death and graft loss after renal transplantation in Scandinavia. *Transplantation* 1995; 60: 451-7.
33. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2000; 58: 353-62.
34. Parfrey PS. Cardiac disease in dialysis patients: Diagnosis, burden of disease, prognosis, risk factors and management. *Nephrol Dial Transpl* 2000; 15: 58-68.
35. Blair D, Byrham-Gray L, Lewis E, McCaffrey S. Prevalance of vitamin D(25OHD) Deficiency and effects of supplementation with ergocalciferol (vitamin D2) in stage 5 chronic kidney disease patients. *J Ren Nutr* 2008; 18: 375-82.
36. Cheng S, Coyne D. Vitamin D and outcomes in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 77-82.
37. De Luca HF. Overview of general physiological features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1689-96.
38. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1678-88.
39. Wolff AE, Jones AN, Hansen KE. Vitamin D and musculoskeletal health. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4: 580-8.
40. McCarty MF. Poor vitamin D status may contribute to high risk for insulin resistance, obesity and cardiovascular disease in Asian Indians. *Med Hypotheses* 2009; 72: 647-51.
41. Freundlich M, Quiroz Y, Zhang Z, Zhang Y, Bravo Y, Weisinger JR, Li YC, Rodriguez-Iturbe B. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney Int* 2008; 74: 1394-402.
42. De Luca HF. Overview of general physiological features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1689-96.

43. Ewers B, Gasbjerg A, Moelgaard C, Fredericsoen AM, Marckmann P. Vitamin D status in kidney transplant patients: Need for intensified routine supplementation. *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 431-7.
44. Shroff R, Knott C, Rees L. The virtues of vitamin D-but how much is too much? *Pediatr Nephrol* 2010; 25: 1607-20.
- 45- Avioli LV, Birge SJ, Lee SW. Effects of prednisone on vitamin D metabolism in man. 1968; 28: 1341-6.
- 46- Kimura Y, Kawamura M, Owada M, Oshima T, Murooka M, Fujiwara T, Hiramori K. Effectiveness of 1.25 –dihydroxyvitamin D supplementation on blood pressure reduction in a pseudohypoparathyroidism patients with high renin activity. *Intern Med* 1999; 38: 31-5.
47. Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD. Vitamin D improves endothelial function in patients with type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabetic Medicine* 2008; 25: 320-5.
48. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions on the vascular endothelium. *N Eng J Med* 1990; 323: 27-36.
49. Lüscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118: 81-90.
50. Dreer H, Hornig B. Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 51–60.
51. Selzman CH, Whitehill TA, Shames BD, Pulido EJ, Cain BC, Harken AH. The Biology of estrogen mediated repair of cardiovascular injury. *The Annals of Thoracic Injury* 1998; 65(3): 868-74.
52. Basiratinia M, Fazel M, Lotfi M, Al-Hashemi GH, Fallahzadeh MH, Derakhshan A. Subclinical atherosclerosis and related risk factors in renal transplant recipients. *Pediatric Nephrol* 2010; 25: 343-8.
53. Medawar PB. Transplantation of tissues and organs: introduction. *Br Med Bull* 1965; 21: 97-9.
54. Jooste SV, Colvin RB, Winn HJ. The vascular bed as the primary target in the destruction of skin grafts by antiserum. *J Exp Med* 1981; 154: 1332-41.
55. Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, Kemenade FJ, Van Es LA, Bruijin JA, Krieken J. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection *Lancet* 2001; 357: 33-7.
56. Tekeli SÖ, Emerk K. Endotel progenitör hücreler. *Marmara Medical Journal* 2001; 20(1): 59-65.
57. Özdoğu H, Sozer O, Boga C, Kozanoglu I, Maytalman E, Guzey M. Flow cytometric evaluation of circulating endothelial cells: A new protocol for identifying endothelial cells at several stages of differentiation. *Am J. Hematol* 2007; 82: 706-11.
58. Erdbruegger U, Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells: a novel markers of endothelial damage. *Clinica Chimica Acta* 2006; 373: 17-26.

59. Khan SS, Soloman MA, McCoy JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 64(1): 1-8.
60. Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: New insights into an old concept. *Eur J Haematol* 2000; 65: 215–20.
61. Koç M, Richards HB, Bihorac A, Ross EA, Schold JD, Segal MS. Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in hemodialysis patients. *Kidney Intern* 2005; 67: 1078-83.
62. George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Ambrosi P, Klein-Soyer C, Cazenave JP, Sampol J. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost* 1992; 67: 147.
63. Sbarbati R, Boer M, Scarlattini M, Rossi G, Van-Mourik JA. Immunologic detection of endothelial cells in human whole blood. *Blood* 1991; 77: 764-80.
64. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel R. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med* 1997; 337: 1584.
65. George F, Brouqui P, Boffa MC, Mutin M, Drancourt M, Brisson C, Raoult D, Sampol J. Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever. *Blood* 1993; 82: 2109-16.
66. Grefte A, Giessen MV, Van-Son W. Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis* 1993; 167: 270-7.
67. Lefevre P, George F, Durand JM, Sampol J. Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenia purpura. *Thromb Haemost* 1993; 69: 522.
68. Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood* 1999; 9: 2951-3.
69. Camoin-Jau L, Kone-Pau I, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells in Behcet's disease with cerebral thrombophlebitis. *Thromb Haemost* 2000; 83(4): 631-2.
70. George F, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Lequeux N, Ambrosi P, Chicheportiche C, Sampol J. Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody. *J Immunol Meth* 1991; 139: 65-75.
71. Bardin N, George F, Mutin M. S-Endo 1, a panendothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens* 1996; 48(5): 531-9.
72. Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsosis F, Desouches C, et al. Presence of endothelial progenitor cells, distinct mature endothelial cells, within CD146 blood cells. *Tromb Haemost* 2005; 94(6): 1270-9.
73. Bardin N, Anfosso F, Masse JM, Cramer E, Sabatier F, Le-Bivic A, et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction in the control of cell-cell cohesion. *Blood* 2001; 98: 3677-84.

74. Saito T, Saito O, Kawana T, Tamemoto H, Kusano E, Kawakami M, Ishikawa SE. Elevation of serum adiponectin and CD146 levels in diabetic nephropathy 2007; 78(1): 85-92.
75. Bardin N, Moal V, Anfosso F, Daniel L, Brunet P, Sampol J, Dignat-George F. Soluble CD146, a novel endothelial junctional marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. *Thromb Haemost* 2003; 90: 915–20.
76. Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a Standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 6; 320(7244): 1240-3.
77. Schwartz GJ, Munoz A, Schneider MF, Mak RH, Kaskel F, Warady BA, Furth SL. New equations to estimate GFR in children with CKD. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(3): 629-37.
78. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002; 39: 1-266.
79. Kasiske BL. Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med* 1988; 84: 985-92.
80. Barbagallo CM, Pinto A, Gallo S, Parrinello G, Caputo F, Sparacino V, et al. Carotid atherosclerosis in renal transplant recipients: Relationships with cardiovascular risk factors and plasma lipoproteins. *Transplantation* 1999; 67: 366–71.
81. Suwelack B, Witta J, Hausberg M, Muller S, Rahn KH, Barenbrock M. Studies on structural changes of the carotid arteries and their heart in asymptomatic renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 160–5.
82. Zoungas S, Kerr PG, Chadban S, Muske C, Ristevski S, Atkins RC, McNeil JJ, McGrath BP. Arterial function after successful renal transplantation. *Kidney Int* 2004; 65: 1882–9.
83. Litwin M, Wühl E, Jourdan C, Trelewicz J, Niemirska A, Fahr K, et al. Altered morphologic properties of large arteries in children with chronic renal failure and after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1494-500.
84. Oh J, Wunsch R, Turzer M, Bahner M, Raggi P, Querfeld U, Mehls O, Schaefer F. Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood onset chronic renal failure. *Circulation* 2002; 106: 100-5.
85. Litwin M, Trelewicz J, Wawer Z, Antoniewicz J, Wierzbicka A, Rajszyk P, Grenda R. Intima-media thickness and arterial elasticity in hypertensive children: controlled study. *Pediatr Nephrol* 2004; 19: 767-74.
86. Davis PH, Dawson JD, Riley WA, Laurer RM. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured from childhood through middle age: the Muscatine study. *Circulation* 2001; 104: 2815-9.
87. Briese S, Claus M, Querfeld U. Arterial stiffness in children after renal transplantation. *Pediatr Nephrol* 2008; 23: 2241-5.
88. Mitsnefes MM, Kimball TR, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Daniels SR. Abnormal carotid artery structure and function in children and adolescents with successful renal transplantation. *Circulation* 2004; 110: 97-101.

89. Bilginer Y, Ozaltın F, Basaran C, Aki TF, Karabulut E, Duzova A, et al. Carotid intima-media thickness in children and young adult with renal transplant internal carotid artery vs common carotid artery. *Pediatr Transpl* 2007; 11: 888-94.
90. Malyszko J, Malyszko JS, Brosko S, Wolczynski S, Mysliwiec M. Markers for endothelial cell activation / injury: CD146 and thrombomodulin are related to adiponectin in kidney allograft recipients. *Am J Nephrol* 2005; 25: 203-10.
91. Lau DC, Wong KL, Hwang WS. Cyclosporine toxicity on cultured rat microvascular endothelial cells. *Kidney Int* 1989; 35:604-13.
92. Cuhaci B, Kumar MS, Bloom RD, Pratt B, Haussman G, Laskow DA, et al. Transforming growth factor –beta levels in human allograft chronic fibrosis correlate with rate of decline in renal function. *Transplantation* 1999; 68: 785-90.
93. Iurlaro M, Vacca A, Minischetti M, Ribatti D, Pellegrino A, Sardanelli A, Giacchetta F, Dammacco F. Antiangiogenesis by cyclosporine. *Exp Hematol* 1998; 26: 1215-22.
94. Collins P, Wilkie M, Razak K, Abbot S, Harley S, Bax C, et al. Cyclosporine and cremaphor modulate von Willebrand factor release from cultured human endothelial cells. *Transplantation* 1993; 56(5): 1218-23.
95. Sudhir K, MacGregor JS, DeMarco T, De Groot CJ, Taylor RN, Chou TM, et al. Cyclosporine impairs release of endothelium –derived relaxing factors in epicardial and resistance coronary arteries. *Circulation* 1994; 90: 3018-23.
96. Morris ST, McMurray JJ, Rodger RS, Farmer R, Jardine AG. Endothelial dysfunction in renal transplant recipients maintained on cyclosporine. *Kidney Int* 2000; 57: 1100-6.
97. Paul LC. Chronic allograft nephropathy: an update. *Kidney International* 1999; 56: 783-93.
98. Houde I, Isenring P, Boucher D, Noel R, Lanchanche JG. Mycophenolate mofetil, an alternative to cyclosporine A for long term immunosuppression in kidney transplantation. *Transplantation* 2000; 70: 1251-3.
99. Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Leichtman AB, Agodo LY, Port FK. Long term survival in renal transplant recipients with graft function. *Kidney Int* 2000; 57: 307-13.
100. Shroff R, Knott C, Gulet A, Wells D, Marks SD, Rees L. Vitamin D deficiency is associated with short stature and may influence blood pressure control in pediatric renal transplant recipients. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 2227-33.
101. Hollick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-81.