

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KRONİK SİKLOSPORİN A NEFROTOKSİSİTESİNDE KEMİK İLİĞİ  
KAYNAKLI MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİN ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Arda BOZGÜL**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. İpek AKİL**

**Manisa, 2010**

**T.C**  
**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**KRONİK SİKLOSPORİN A NEFROTOKSİSİTESİNDE KEMİK İLİĞİ**  
**KAYNAKLI MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİN ETKİSİNİN**  
**ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Dr. Arda BOZGÜL**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. İpek AKİL**

**Manisa 2010**

## ÖNSÖZ

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince bana bilgi ve deneyimleri ile verdikleri katkılarından dolayı Anabilim Dalı başkanı hocam Prof. Dr. Ali ONAĞ' a ve başta tez danışmanı hocam Doç. Dr. İpek AKİL olmak üzere tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim. Beraber çalışma şansına sahip olmaktan onur duyduğum ve kendilerini hiçbir zaman unutmayacağım uzmanlarıma, başta eş kıdemlilerim olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, klinikte beraber keyifle çalıştığım hemşire, sekreter ve bütün klinik personeli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen, çalışmanın proje, deney ve analiz aşamalarında her türlü bilimsel ve deneysel yardımı veren Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' ndan hocam Doç. Dr. H. Seda VATANSEVER' e, çalışmanın deney bölümündeki destek ve emeklerinden dolayı için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi Bilim Dalı'na ve Bilim Dalı çalışanları İsmail Bey ile Halil Bey' e ve Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' ndan Mahmud M. Özkut' a teşekkür ederim.

Emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim anne-babama, sahip olunabilecek en iyi kardeş olan erkek kardeşime ve ayrıca hayatıma girdiği ilk andan itibaren hayatımı değiştiren, bana sabır, sevgi ve desteğini bir an olsun esirgemeyen ve varlığı ile yaşamıma anlam katan sevgili eşim Miray KILINÇER BOZGÜL' e sonsuz teşekkür ederim.

Arda BOZGÜL

Aralık 2010

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
RESİMLER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER ve TABLOLAR DİZİNİ	VI
KISALTMALAR	VII
I. GİRİS VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Siklosporin A	3
2.1.1. Etki mekanizması	4
2.1.2. Farmakokinetiği ve Farmakodinamiği	5
2.1.3. İlaç etkileşimi ve monitörizasyonu	6
2.1.4. Siklosporin A'nın klinik kullanımı	7
2.1.4.1 Nefrotik sendromda kullanımı	7
2.1.4.2 Allojenik solid organ ve hematopoetik kök hücre transplantasyonunda kullanımı	8
2.1.4.3 Diğer otoimmün hastalıklarda kullanımı	10
2.1.5. Siklosporin A'nın yan etkileri	10
2.1.5.1. Metabolik komplikasyonlar ve istenmeyen etkiler	10
2.1.5.2.Önemli yan etkiler	11
a) Enfeksiyonlara eğilim	11
b) Malignite gelişimi	12
c) Nörotoksisite	12
d) Hepatotoksisite	12
e) Nefrotoksisite	13

2.2. Kök hücreler ve klinik kullanımı	17
III. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Hayvanlar ve Çalışma Grupları	21
3.2. Çalışma Tasarımı	21
3.3. Mezenşimal Kök Hücre Eldesi	22
3.4. Mezenşimal Kök Hücrelerin Brd-U İle İşaretlenmesi	23
3.5. Mezenşimal kök hücrelerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile İncelenmesi	23
3.6. Işık Mikroskopik İnceleme	24
3.7. Parafin Doku Takibi	24
3.8. Hematoksilen-Eozin Boyaması	25
3.9. Masson Trikrom Boyaması	26
3.10. TUNEL Boyaması	28
3.11. İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi	29
3.12. İstatistiksel analiz	31
IV. BULGULAR	32
4.1. Mezenşimal kök hücre kültürü	32
4.2. Hematoksilen-Eozin ve Mason-Trikrom Boyama	34
4.3. Tunel incelemesi	41
4.4. İmmunohistokimyasal analiz	43
4.4.1 TGF- $\beta$ 1 Dağılımı	43
4.4.2 TGF- $\beta$ 3 Dağılımı	44
4.4.3 Kollajen-1 Dağılımı	45
4.4.4 Brd-U ve CD-4 Dağılımı	46
V. TARTIŞMA	48
VI. SONUÇ ve ÖNERİLER	53
VII. ÖZET	54
VIII. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	56
IX. KAYNAKLAR	58

## RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Resim 2.1:</b> Steroid bağımlı nefrotik sendromlu bir hastada siklosporin A kullanımına bağlı arteriolopati (Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama)	15
<b>Resim 2.2:</b> Steroid bağımlı nefrotik sendromlu hastada siklosporin A kullanımı ile ilişkili arteriolopatiye eşlik eden karakteristik çizgili tübüler atrofi ve intersitisyel fibrozis (Hematoksilen –Eozin boyama)	15
<b>Resim 4.1:</b> Mezenşimal kök hücre kültürü 3. gün (A), 6. gün (B), 9. gün (C). A: X100, B-C: X200.	32
<b>Resim 4.2:</b> Kültürün 10. gününde mezenşimal kök hücrelerde CD4 (A,B) ve Brd-U (C,D) immunoreaktiviteleri ve negatif kontrol boyama (E). X400.	33
<b>Resim 4.3:</b> Grup1’de görülen korteks ve medüller histopatolojik değişiklikler Hematoksilen-eozin ve Masson Trikrom boyama . Tübüler dilatasyon (Td), Bowman kapsülünde genişleme (G), Tübülointersitisyel fibrozis (TF). X400.	37
<b>Resim 4.4:</b> Grup 2’ de görülen histolojik değişiklikler. Hematoksilen-eozin(A,B) ve Masson- Trikrom boyama(C,D). X400. Tübülointeristisyel alanda hücre artışı ok ile gösterilmiştir	38
<b>Resim 4.5:</b> Grup 3’ te görülen histolojik değişiklikler. Hematoksilen-eozin (A,B) ve Masson-Trikrom(C,D) boyama. X400.	39
<b>Resim 4.6:</b> Grup 4’te görülen histolojik değişiklikler. Hematoksilen-eozin(A,B) ve Masson Trikrom(C,D) boyamalar. X400.	40
<b>Resim 4.7:</b> Grup 1, 2, 3 ve 4 ‘e ait böbrek kesitlerinde TUNEL boyaması. X400.	42

<b>Resim 4.8:</b> Grup 1, 2, 3 ve 4 'e ait böbrek kesitlerinde TGF- $\beta$ 1 dağılımı. X400	44
<b>Resim 4.9:</b> Grup 1, 2, 3 ve 4 'e ait böbrek kesitlerinde TGF- $\beta$ 3 dağılımı. X400.	45
<b>Resim 4.10:</b> Grup 1, 2, 3 ve 4 'e ait böbrek kesitlerinde kollajen-1 dağılımı. X400.	46
<b>Resim 4.11:</b> Grup 1, 2, 3 ve 4 'e ait böbrek kesitlerinde Brd-U ve CD-4 Dağılımı. X400.	47

## ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekiller:</b>	
<b>Şekil 1:</b> Siklosporin' in biyokimyasal yapısı	4
<b>Tablolar:</b>	
<b>Tablo 2.1:</b> Siklosporin ile etkileşime giren ilaçlar	7
<b>Tablo 2.2:</b> Allojenik solid organ ve kemik iliği transplantasyonunda kullanılan CsA dozları	9
<b>Tablo 3.1:</b> Parafin Doku Takibi	24
<b>Tablo 3.2:</b> Hematoksilen-Eozin Boyaması	25
<b>Tablo 3.3:</b> Masson Trikrom Boyaması	27
<b>Tablo 3.4:</b> TUNEL boyaması	28
<b>Tablo 3.5:</b> İndirek İmmunoperoksidaz Boyaması	30
<b>Tablo 4.1:</b> Nefrotoksik histopatolojik bulguların skorlaması	34
<b>Tablo 4.2:</b> CsA nefrotoksitesine ilişkin histopatolojik bulguların gruplara göre skor ortalamaları	35
<b>Tablo 4. 3:</b> TUNEL skorlaması	41
<b>Tablo 4.4:</b> TUNEL skorlarının gruplara göre ortalamaları	41
<b>Tablo 4.5:</b> İmmunohistokimyasal skorlama	43
<b>Tablo 4.6:</b> İmmunohistokimyasal bulguları ortalamaları	43



## KISALTMALAR

- ALP: Alkalen fosfataz  
Brd-U: Bromodeoksiüridin  
CD: Cluster of Diferantation (Farklılaşma Yığılım Kümesi)  
CFU-F: Fibroblast kolonisi yapan ünite  
CMV: Sitomegalovirus  
CO<sub>2</sub>: Karbondioksit  
CsA: Siklosporin A  
CYP 450: Sitokrom P 450  
C0: Siklosporin sıfırncı saat değeri  
C2: Siklosporin ikinci saat değeri  
DAB: diamimobenzidine  
dk: dakika  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
EBV: Ebstein Barr Virus  
EDTA: Etilendiamintetraasetik asit  
FCS: Fetal Buzağı Serumu  
GABA: Gama Amino Bütirik Asit  
GFR : Glomeruler Filtrasyon Hızı  
GGT: Gama Glutamil Transpeptidaz  
HKHT: Hematopoetik kök hücre transplantasyonu  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hidrojen peroksit  
IFN  $\gamma$ : İnterferon-gama  
IL-1: İnterlökin 1  
IL-2R: İnterlökin 2 Reseptörü

KNİ: Kalsinörün İnhibitörü  
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein  
mTOR: Mammalian target of rapamycine  
NF-AT: Aktive T Hücre Nükleer Faktör  
NK: Natural Killer(Doğal Öldürücü)  
NO: Nitrik oksit  
OP: Osteopontin  
PAH: Paraaminohippürik asit  
PAS: Periyodik Asit Shift  
PBS: Fosfat tampon solüsyonu  
PGE2: Prostaglandin E2  
PGI 2: Prostaglandin I2(Prostosiklin)  
RAAS: Renin-Anjiotensin-Aldosteron Sistemi  
SC: Subkutan  
SDF-1: Stroma kaynaklı faktör-1  
SMX-TMP: Trimetoprim Sülfometoksazol  
TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz  
TGF- $\beta$ : Trasnsforming Growth Faktör Beta  
TNF  $\alpha$  : Tümör nekrozis faktör-alfa  
TXA2: Tromboksan A2  
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü  
 $\alpha$ -MEM: Modified Eagle Medium

## GİRİŞ

Siklosporin A (CsA) çocukluk çağında allojenik transplantasyon sonrası gelişen doku reddini önleme, nefrotik sendrom ve bazı otoimmün hatalıkların tedavilerinde son dönemde artarak kullanılan, etkin bir ajandır.

CsA'nın klinik kullanıma girmesinden sonra allojenik transplantasyonu izleyen doku reddini önlemede ve bu hastalarda hastanede kalım sürelerinde azalma, yaşam süresi ve kalitesinde artış sağlanmasında önemli oranda başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (1).

Steroide duyarlı nefrotik sendrom tedavisinde kullanma girmesi ile kullanılan steroid dozları ve sürelerinde azalma sağlanmış ve böylelikle steroid kullanımına bağlı yan etkilerde azalma sağlanmıştır. Steroide dirençli nefrotik sendromda tedavi protokollerine girmesiyle hastaların mortalite ve morbiditesinde anlamlı azalmalar sağlanmıştır (2).

Etkin bir ajan olmasına rağmen CsA'nın bazı minör yan etkileri olabildiği gibi geri dönüşümsüz nefrotoksisite gelişmesi gibi önemli yan etkileri de bulunmaktadır. Nefrotoksik yan etkileri akut ve kronik olarak sınıflandırılmakta ve her iki durumda da ilacın kullanımı kısıtlanabilmektedir. Akut nefrotoksisite doz bağımlı olup, doz ayarlanması yapıldıktan sonra geri dönüşüm göstermektedir. Kronik nefrotoksik etkiler uzun süreli kullanımlarda kan ilaç düzeyi normal sınırlar içinde olsa dahi görülebilmekte ve geri dönüşümsüz olmaktadır (3, 4).

Kök hücre tedavileri, günümüzde tıbbın birçok alanında deneysel olarak veya bazı alanlarda klinik uygulamaya girmiş önemli tedavi yöntemleridir. Kök hücreler embriyodan veya embriyo dışı olmak üzere başlıca iki temel kaynaktan elde edilir. Kaynak ne olursa olsun kök hücreler

hedefe yönelik olarak farklılaştırılabilmekte ve böylelikle amaca uygun olarak tedavide kullanılabilir (5, 6).

Mezenşimal kök hücreler kararlı genetik geçmişleri olan, malign transformasyona dönüşüm riskinin daha az olduğu, embriyonik kök hücrelere oranla daha kolay elde edilebilen ve buna bağlı olarak sonuç almanın daha kolay olduğu ve etik sorunların daha az yaşandığı, diğer kök hücre kaynaklarına göre avantajlı olan gruptur (6).

Bu çalışmada tedavi dozunda CsA verilen sıçanlarda gelişen kronik nefrotoksik histopatolojik değişiklikler üzerinde, kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre uygulamasının etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Siklosporin A:

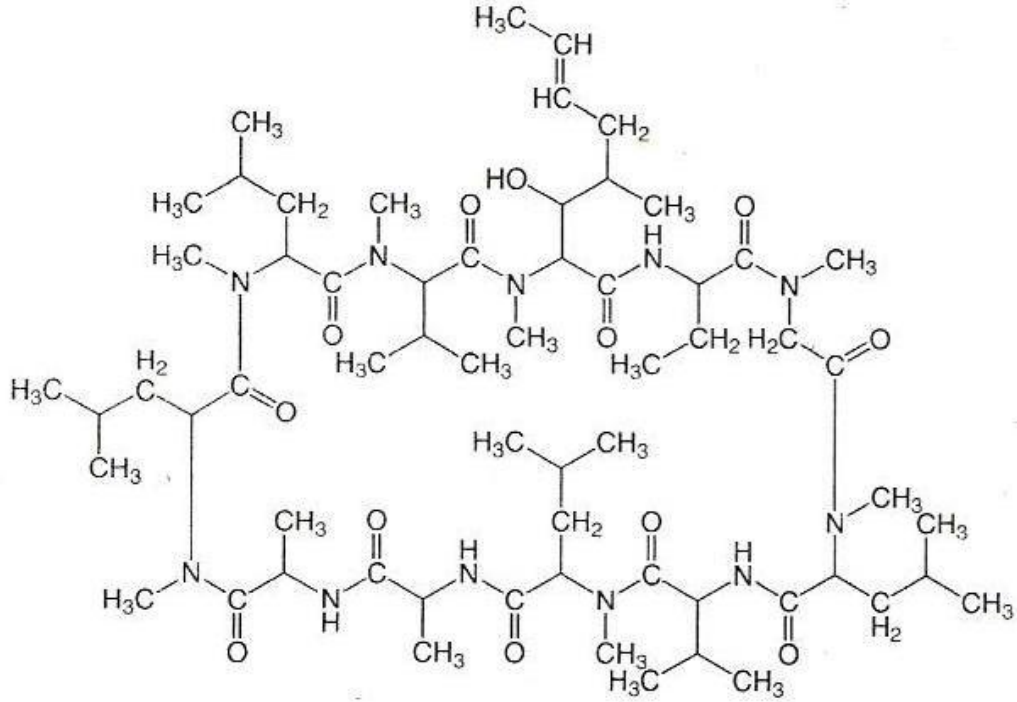
CsA, 1971 yılında Borel ve ark. tarafından keşfedilmiş ve 1976 yılında yine aynı grup ilacın immunosupresif etikisini tanımlamıştır. 1980'li yıllarda klinik uygulamada yerini almış ve sonraki dönemde kullanım sıklığı giderek artmıştır (3,7) .

CsA, takrolimus (FK506) ve pimekrolimus (FK520) ile birlikte kalsinörin inhibitörleri (KNİ) olarak bilinen immunosupresif etkili ilaçlar grubunda yer almaktadır (8).

*Tolypocladium inflatum* cinsi mantardan çıkartılan lipofilik, 1206.6 dalton molekül ağırlığında olan, 11 aminoasitli (undekapeptid) siklik non-ribozomal bir polipeptiddir (C<sub>62</sub>H<sub>111</sub>N<sub>11</sub>O<sub>12</sub>) (1,9,10). (Şekil 1)

*Tolypocladium inflatum*, CsA ile birlikte küçük değişiklikler içeren toplam 25 doğal siklosporin oluşturur. Bunların içinde biyolojik olarak en aktif olan CsA'dır (1,11). İmmunosupresif etkinliğinin yüksek olması nedeniyle allojenik solid organ transplantasyonu sonrası doku reddinin önlenmesi, Graft versus Host (Kİ transplantasyonu sonrası) reaksiyonu, steroide duyarlı ve dirençli nefrotik sendrom ve birçok otoimmün hastalığın (Crohn Hastalığı ve ülseratif kolit, romatoid artrit, dermatomyozit, polimiyozit, sistemik lupus eritematozus, Behçet hastalığı, pemfigus, psöriasis, atopik dermatit) tedavisinde kullanılmaktadır.

**Şekil 1:** Siklosporin' in biyokimyasal yapısı



### 2.1.1 Etki mekanizması :

CsA etkisini sitozolik bir reseptör olan sitofiline bağlanarak başlatır. Oluşan ilaç-protein kompleksi, kalsinörine bağlanarak onu seçici olarak inhibe eder. Kalsinörin bir defosfataz enzimidir. Antijenik uyarı sonrasında hücre içi kalsiyum kalmodulin sistemi ile bağlantılı etki gösterir. İnaktif durumda bulunan NF-AT'dan (Aktive T Hücre Nükleer Faktörü) bir fosfat grubu koparak onu aktive eder ve hücre çekirdeğine girmesini sağlar. NF-AT çekirdeğe girdikten sonra interlökin 2 (IL-2) geninin promotor bölgesine bağlanarak gen transkripsiyonunu ve böylelikle IL-2 üretimini artırır. CsA bu zinciri kalsinörin düzeyinde engelleyerek IL-2 sentezini ve salınımını azaltır. Bunun dışında interlökin 4 (IL-4), interferon-gama (IFN $\gamma$ ), tümör nekrozis faktör-alfanın (TNF $\alpha$ ) gen transkripsiyonu ve IL-2 reseptör (IL-2R) ekspresyonunu engeller. Böylelikle yardımcı ve sitotoksik T hücre proliferasyonu ve aktivasyonu durur (3, 8, 12-14).

B hücrelerine direk etkisi olmasa da T hücre bağımlı antikor üretimini azaltarak hücrel immun yanıtı da etkiler. Ayrıca in vitro çalışmalarda insan

bazofil ve derideki mast hücrelerinden histamin salınımını inhibe ettiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (1). Ancak makrofajlar üzerine inhibitör etkisi yetersiz olduğundan bu hücreleri baskılamak için steroid ile birlikte kullanılır. Natural killer (NK) hücrelere ve supressor T hücrelere etkisi yoktur (15). CsA immunsupresif tedavi için kullanılan diğer ilaçların aksine kemik iliği supresyonu yapmaz (12,16).

### **2.1.2. Farmakokinetiği ve Farmakodinamiği:**

CsA oral yolla alındıktan sonra gastrointestinal kanalın üst kısımlarından % 30-35 oranında emilir. Suda çözünürlüğünün çok düşük olması nedeniyle ilacın biyoyararlanımını arttırmak amacıyla oral formları zeytinyağı ve etanolden oluşan mikroemülsiyon şeklinde (solüsyonlarda ya da jelatin kapsül şeklinde) hazırlanmıştır (1). CsA'nın oral biyoyararlanımı oldukça değişken olup % 8-60 arasında olup safra akımı, safra içeriği, yiyecekler, birlikte alınan diğer ilaçlar ve bağırsak motilitesi ile yakından ilgilidir. Yağ içeriği fazla olan yemekler ve plazma lipoprotein miktarı CsA'nın farmakokinetiğini ve metabolizmasını etkiler. Bazı çalışmalarda, yağ içeriği fazla olan yemek yedikten sonra oral CsA'nın biyoyararlanımının arttığı gösterilmiştir (17).

CsA kanda % 60 oranında eritrosit içinde, % 8-10 lenfosit ve granülositer içinde, % 30 oranında da plazmada bulunur. Plazmada proteinlere bağlı olarak taşınır. Bunların büyük çoğunluğu lipoproteinler olmakla birlikte % 10-20 oranında albümin ve globuline bağlanarak taşınır. Lipoproteinlere bağlı olanların büyük kısmı LDL'ye (low density lipoprotein - düşük yoğunluklu lipoprotein) bağlanır. Dokular arası dağılımını araştıran çalışmalar, CsA'nın dağılımının LDL reseptörlerinin dağılımına uyduğunu gösterir. En çok yağ dokusu, karaciğer, pankreas ve böbreklerde biriktiğini göstermiştir. Bağırsak ve beyinde çok az bulunur (1, 8, 18).

CsA'nın bağırsaktan emilimi P- glikoprotein ve sitokrom p450(CYP450 3A4) aktivitesi ile ilişkilidir. CsA metabolizması karaciğer, gastrointestinal sistem ve az miktarda da böbrek tarafından gerçekleştirilir. Mikrozomal enzim sisteminde bulunan CYP450 3A4 enzimi CsA metabolizmasının temel enzimidir. Gastrointestinal sistemde metabolizması en çok ince bağırsakta ve

P-glikoprotein ve CYP450 3A etkisiyle olmaktadır. Karaciğerdeki metabolizması CYP450 3A4 etkili oksidasyon ve konjugasyon reaksiyonu ile gerçekleştirilen iki tip metabolik reaksiyon ile olur (19). En önemli atılım yeri inaktif metabolitlerinin safra yoluyla atılımıdır. Bu nedenle karaciğer ve safra sistemi bozukluklarında atılımı azalır. CYP450 3A4 enzim sistemini etkileyen ilaçlar CsA'nın metabolizmasını etkiler. CsA'nın biyoyararlanım ve metabolizmasında CYP450 3A gen polimorfizminin etkisiyle farklılıklar olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (20). Eliminasyon yarı ömrü bireysel farklılıklar göstermekle birlikte ortalama 19-40 saattir. İdrarla atılımı çok az olup alınan CsA'nın 96 saat içinde ancak % 0,1' i idrarla değişmeden atılır. Fazlalığı durumunda hemodiyalizle iyi temizlenemez. Çünkü damar dışı dağılım oranı yüksek, proteinlere ilgisi fazladır (1, 21, 22).

### **2.1.3. İlaç etkileşimi ve monitörizasyonu**

CsA, CYP 450 mikrozomal enzim sistemi ile metabolize edildiği için enzim indüksiyonu veya inhibisyonu yapan birçok ilaçla etkileşime girmektedir (Tablo 1). Karaciğerde CYP450 3A4 enzim indüksiyonu yapan steroidler, karbamazepin, fenobarbital, rifampisin, fenitoin gibi ilaçlar CsA'nın kan seviyesini azaltarak etkinliğini azaltır. CsA'nın intestinal metabolizmasını etkileyen bir diğer faktör olan P-glikoproteini indükleyen karbamazepin, rifampisin, fenitoin gibi ilaçlar da CsA kan düzeyini azaltır.

Ketokonazol, flukonazol gibi azol türevi antifungaller, klaritromisin, eritromisin gibi makrolidler, verapamil, diltiazem gibi kalsiyum kanal blokerleri, sertralin, fluvoxamin, ergotamin, etinil östradiol, allopurinol, atorvastatin, simvastatin ve losartanın CYP450 3A4'ü inhibe ederek CsA seviyelerini ve toksisite riskini arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca greyfurt suyu gibi kimyasal olmayan bazı maddeler de enzim inhibisyonu yapabilir. Digoksin de P-glikoproteinini inhibe ederek serum CsA seviyesini arttırabilir (1, 23-27).

Bununla birlikte aminoglikozidler, amfoterisin B, florokinolonlar gibi nefrotoksik ilaçlar CsA'nın nefrotoksik etkilerine sinerjistik etki gösterebilirler.



**Tablo 1:** CsA ile etkileşime giren ilaçlar

<b>CYP450 3A inhibisyonu yapanlar</b>	<b>CYP450 3A indüksiyonu yapanlar</b>	<b>P-glikoprotein inhibitörleri</b>	<b>P-likoprotein indüktörleri</b>	<b>Nefrotoksik sinerjistik etkili ilaçlar</b>
Ketokonazol	Karbamazepin	Digoksin	Karbamazepin	aminoglikozidler
Klaritromisin	Fenobarbital		Fenobarbital	amfoterisin B
Eritromisin	Rifampisin		Rifampisin	Florokinolonlar
Verapamil	Fenitoin		Fenitoin	Melfalan
Diltiazem	Sülfipirazon		Sülfipirazon	Antiinflamatuvar ilaçlar
Sertralin	Mayasıl otu		Mayasıl otu	
Fluvoxamin	Steroidler			
Ergotamin				
Dihidroergotamin				
Etinil Östradiol				
Progesteron				
Allopurinol				
Atorvastatin				
Losartan				
Greyfurt Suyu				

CsA'nın terapötik indeksinin dar olması ve birçok ilaçla etkileşime girerek subterapötik ve toksik düzeylere gelebilmesi nedeniyle kan düzeyinin monitörizasyonu önemlidir. Uygulandıktan sonra yüksek konsantrasyona ulaşma süresi 0-4 saat arasındadır (1, 8). Erişkin ve çocuklarda yapılmış birçok çalışmada C<sub>2</sub>'nin (CsA ikinci saat değeri) CsA kan düzeyinin monitörize edilmesinde ortalama değer olarak C<sub>0</sub>'dan (CsA sıfırıncı saat değeri) daha yararlı olabileceği belirtilmiştir (8, 28-31).

#### **2.1.4. Siklosporin A'nın klinik kullanımı:**

##### **2.1.4.1. Nefrotik sendromda kullanımı:**

CsA'nın, çocuklar ve yetişkinlerde nefrotik sendrom tedavi protokollerine girmesinden bu yana, özellikle sık relaps gösteren nefrotik sendrom ve steroide dirençli nefrotik sendrom olgularında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedavide steroidlerle kombine kullanım ile yüksek remisyon

oranlarının sağlanmasında ve steroid kullanımına bağlı yan etkilerin azaltılmasında önemli rol oynamaktadır (2, 32-34).

Anti-proteinürik etkisini, lenfokin sekresyonunun inhibisyonu yoluyla sağladığı immunolojik etki, renal vazokonstrüksiyon ve buna bağlı glomerüler filtrasyon oranında azalma, elektrokimyasal bariyeri etkileyerek glomerül bazal membran geçirgenliğini azaltarak gösterdiğini belirten çalışmalar mevcuttur (35).

Oral form erişkinlerde 2- 5 mg/kg/G olarak ve çocuklarda 3-6 mg/kg/G olarak kullanılır. Çocuklarda klirens erişkinlere oranla daha çok olduğundan kullanılan doz daha yüksektir (2, 32, 36-38).

Steroide dirençli fokal segmental glomerülosklerozlu hastalarda yapılan bir çalışmada, CsA verilen grupta % 33 hastada tam remisyon sağlanırken, % 67 hastada kısmi remisyon sağlanmıştır. Plasebo verilen grupta ise hiçbir hastada tam remisyon gözlenmezken % 17 hastada kısmi remisyon sağlanmıştır (36).

Bir diğer çalışmada 45 çocuk ve erişkin hasta, CsA tedavisi alanlar ve destek tedavisi alanlar olarak iki gruba ayrılmış; izlem sonrasında erişkinlerde % 59 tam remisyon sağlanmıştır. Kontrol grubunda ise % 16 tam remisyon sağlanmıştır. Çalışmaya katılan çocuklarda ise % 40 tam remisyon sağlanırken % 20 kısmi remisyon sağlanmıştır (37).

Bilinen nefrotoksik etkilerinin olması nedeniyle, tedavide CsA kullanılacak olan nefrotik sendromlu hastalarda tedavi öncesinde renal biyopsi yapılması gereklidir. Böylelikle ileride olabilecek bozuklukların CsA'ya bağlı olup olmadığı izlenebilir.

#### **2.1.4.2. Allojenik solid organ ve kemik iliği transplantasyonunda kullanımı:**

CsA'nın ilk olarak 1976 yılında allojenik böbrek transplantasyonunda kullanılmaya başlanmasını izleyerek karaciğer, kalp, akciğer ve pankreas gibi solid organ transplantasyonlarında greft reddinin önlenmesi ve oluşmuş greft reddinin tedavisinde kullanılması hızla artmıştır (1, 39). CsA, hematopoetik kök hücre transplantasyonu (HKHT) yapılan hastalarda greft reddinin ve greft versus host reaksiyonu gelişiminin önlenmesi veya tedavisinde

kullanılmaktadır. Özellikle erken dönemde kullanılması (antijenik uyarım gelmeden) transplantasyon reddini önlemedeki başarısını artırır. Bu nedenle perioperatif olarak parenteral olarak CsA kullanılmaya başlanmakta ve post-transplantasyon döneminde 6 ay ile 1 yıl arası değişen sürelerde ve azalan dozlarda oral olarak devam edilmesi gerekmektedir. Tedavi için gereken kan düzeyleri nefrotik sendromda kullanılan dozlardan daha yüksektir ve bu dozlar tablo 2.2'de gösterilmiştir (40- 48).

**Tablo 2.2:** Allojenik solid organ ve kemik iliği transplantasyonunda kullanılan CsA dozları(43). C0: vadi düzeyi, C2: ilacın ikinci saat değeri, mTOR: Mammalian target of rapamycine

Post-transplant zaman	İndüksiyon Tedavisi olmaksızın	IL-2 Reseptör Antikor tedavisi ile beraber	Timoglobulin ile indüksiyon halinde	mTOR inhibitörü ile birlikte
0-3 ay	<b>5. günde;</b> C2>1700 ng/ml <b>1. ayda;</b> C2:1600-2000 ng/ml <b>2. ayda;</b> C2:1400-1600 ng/ml <b>3. ayda;</b> C2:1200-1400 ng/ml	<b>İlk 2 ay için</b> C2>1500 ng/ml <b>3. ayda</b> C2:1200-1400ng/ml	C2:1000-1200ng/ml	<b>1-2.aylarda</b> C0:75-125ng/ml C2 hedefi %50-75 azaltılabilir
>3-12 ay	<b>4-6. aylarda</b> C2:800-1000 ng/ml <b>7-12. aylarda</b> C2:600-800 ng/ml	C2: 600-1000 ng/ml	C2:600-1000 ng/ml	<b>3-6.aylarda</b> C0:50-100ng/ml C2 hedefi %50-75 azaltılabilir
>12 ay	C2:Yaklaşık olarak 800 ng/ml civarında	C2:Yaklaşık olarak 800 ng/ml civarında	C2:Yaklaşık olarak 800 ng/ml civarında	C0:50-100 ng/ml; C2 hedefi %50-75 azaltılabilir

### **2.1.4.3. Diğer otoimmün hastalıklarda kullanımı:**

CsA klasik, yavaş etkili anti romatizmal ilaçlarla sonuç alınamayan şiddetli romatoid artritli hastaların tedavisinde etkilidir (49, 50).

Otoimmün inflamatuvar dermatozlarda da CsA'nın yeri vardır. CsA'nın psöriazis, atopik dermatit, pyoderma gangrenozum, subkorneal püstüler dermatozis, liken planus, otoimmün büllöz hastalıklar (kortikosteroidlerle kombine olarak), skleroderma, kronik idiopatik ürtiker, el ve ayaklardaki kronik dermatitlerde CsA'nın etkinliği gösterilmiştir (51, 52).

CsA'nın otoimmün hepatitler, primer biliyer sirozda da kullanılabileceğini belirten çalışmalar bulunmaktadır (53).

CsA, konvansiyonel tedavi ile sonuç alınamayan Crohn hastalığı ve ülseratif kolit gibi otoimmün kökenli inflamatuvar bağırsak hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır (54, 55) .

Konvansiyonel tedavinin başarısız olduğu veya istenmeyen yan etkilere yol açtığı, non enfeksiyöz orijinli aktif üveit, posterior blefaritis, oküler rosasea, kuru göz, kontakt lens intoleransı, atopik keratokonjunktivit, astım, makrofaj aktivasyonu sendromu gibi immün disregülasyon ile giden hastalıkların tedavisinde CsA kullanılmaktadır (56-60).

### **2.1.5. Siklosporin A'nın yan etkileri:**

Etkin tedavi sağlayan bir ilaç olmasına rağmen CsA tedavisi alan hastalarda bulantı-kusma, karın ağrısı, baş ağrısı, diş eti hipertrofisi, tremor, parestezi, hipertrikoz, akne, jinekomasti, dislipidemi, hiperürisemi ve hiperkalemi gibi kısmen tolere edilebilir metabolik komplikasyonlar ve istenmeyen etkilerinin yanı sıra; enfeksiyonlara eğilim, hipertansiyon, malignite gelişimi, hepatotoksisite, nörotoksisite, ve nefrotoksisite gibi yaşamı tehdit edebilen önemli yan etkiler de görülebilmektedir (1, 2, 4, 61).

#### **2.1.5.1 Metabolik komplikasyonlar ve istenmeyen etkiler:**

CsA'nın biyokimyasal ve metabolik parametreler üzerine çeşitli etkileri vardır. Bu nedenle tedavi alan hastaların bu parametreler açısından yakın takibi önemlidir. Bu etkiler arasında böbrek ve karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma, hipomagnezemi, hipokalsemi, hipofosfatemi ve hiperpotasemi gibi iyon dengesizlikleri ve hiperkolesterolemi ve diyabet gelişim riski

bulunmaktadır (62-65). Özellikle CsA kullanılan transplant hastalarında LDL oksidasyonunun fazla olduğu bildirilmektedir (66). CsA pankreasta birikim yapmasından dolayı glukokortikoidlerle beraber kullanıldığında veya altta yatan obezite ve ileri yaş gibi durumların varlığında diyabetojenik etki gösterebilmektedir (67). Diğer bir metabolik komplikasyon ise yüksek dönüşümlü kemik hastalığı ve osteoporozdur (68).

CsA'nın pansitopeniye yol açmaması özellikle ilacın HKHT`de kullanımı için önemli bir avantajı olarak görülse de nadiren damar endotelinde prostaglandin yapımında azalma, tromboxan A2 üretiminde artış ile karakterize olan trombotik mikroanjiopatiye yol açtığı için trombositopeni nedeni olabilir (69).

CsA'ya bağlı oluşan ve klinik olarak daha az önemi olan istenmeyen etkiler arasında, el ve ayaklarda uyuşma ve karıncalanma, titreme ve kas krampları, tinnitus, hipertrikozis, gingival hipertrofi, jinekomasti, menstrual sikluslarda düzensizlik, ağızda metalik tat, iştah azalması, kendini kötü hissetme duygusu yer almaktadır (1, 2, 70). Bu etkiler arasında sık görülen gingival hipertrofi, TGF- $\beta$ 'ya bağlı gingivada kollajen birikimi sonucu gerçekleşir. CYP450 3A4 inhibisyonu yapan ilaçlarla bu durum belirginleşebilir (71, 72). Sık görülen bir diğer etki olan CsA'ya bağlı hirsutizm, androjen bağımsız olarak her iki cinste de görülebilmekte ve tedavi kesilince düzelmektedir. Bu etki CsA tarafından uyarılan IL-1, TGF- $\beta$  gibi sitokinlere bağlıdır (1, 70). CsA'nın hipotalamo-hipofizer aks yoluyla serum prolaktin seviyesinde artışa yol açması jinekomastiye neden olur. Özellikle transplantasyon hastalarında ilk 1-2 ay içinde belirgin olan bu durum doz azaltılması ile kaybolur (69).

#### **2.1.5.2 Önemli yan etkileri:**

##### **a) Enfeksiyonlara Eğilim**

CsA özellikle allojenik transplantasyon hastalarında immunsupresyona bağlı olarak enfeksiyon riskinde artışa yol açar. EBV (*Ebstein Barr virüs*), CMV (*Sitomegalovirüs*), *herpes simplex* ve *herpes zoster* gibi virüsler, *listeria monositogenezis*, *pnömosistis carinii* gibi bakteriler ve *nokardiya spp.* gibi fırsatçı mantar enfeksiyonları sık görülür. Antiviral (3-6 ay) ve SMX-TMP ile

(Trimetoprim Sulfometoksazol) (6- 12 ay) yapılan profilaksi önleyicidir. Altı ayın sonunda immunsupresyonun azaltılmasından sonra enfeksiyon riski genel popülasyonla benzerdir (73, 74).

#### **b) Malignite Gelişimi**

Renal transplantasyon alıcılarında genel popülasyona göre kanser (kaposi sarkomu, vulva veya vajina, serviks, non-hodgkin lenfoma, karaciğer, böbrek, kolon kanseri gibi) insidansında artış görülmüştür. Malignite gelişiminde onkogenik virüslerin immunsupresyon altında kontrolsüz çoğalması ve bununla ilişkili TGF- $\beta$  üretimi rol oynamaktadır. CsA malign transformasyonu kolaylaştıran transkripsiyon faktörlerin ekspresyonunu artırır. CsA pek çok malign hücrenin daha invaziv seyreden fenotipe değişimine neden olur (1, 73, 75).

#### **c) Nörotoksisite:**

CsA'ya bağlı nörolojik yan etkiler çocuklarda erişkinlere oranla daha nadir görülür. Nörotoksisite patofizyolojisinde, normalde beyin dokusuna az geçebildiği halde altta yatan primer hastalık nedeniyle açığa çıkan nitrik oksit (NO) gibi bazı maddelerin kan beyin bariyerinin yapısını bozması sonucu CsA'ya karşı geçirgenliğin artması bir etkidir. Beyin dokusuna geçtikten sonra CsA'ya bağlı gamma amino bütirik asitin (GABA) inhibisyonu nörotoksik etkilerden sorumludur. Baş ağrısı, uykusuzluk, ekstremitelerde tremor, periferik nöropati gibi bulgular sık görülür, bazen daha ağır nörolojik komplikasyonlar da görülebilir. Posterior reversibl ensefalopati sendromu olarak adlandırılan ve genellikle baş ağrısı, kusma, tansiyon düşüklüğü, hızlı mental bozukluk ve bazen de nöbetler ile seyreden nadiren status epileptikus ve koma tablosuna gidebilen olgular bildirilmiştir (2, 76, 77).

#### **d) Hepatotoksisite:**

CsA'ya bağlı hepatotoksik etkiler serum bilirubin, ALP (Alkalen fosfataz), GGT (Gama Glutamil Transpeptidaz) ve transaminazlarda artış ile seyreder. Bu değişiklikler genellikle tedavinin ilk iki ayında görülür ve ilaç dozunun azaltılması ile düzelir (1, 78, 79).

#### **d) Nefrotoksisite:**

CsA'nın bilinen en ciddi yan etkisi nefrotoksisitedir. İlk kez Sir Roy Calne tarafından gösterilmiş olan bu durum ilacın kullanılabilirliğini kısıtlayan en önemli faktördür (1, 39). Allojenik böbrek transplantasyonu olan hastalarda nefrotoksik etkiler transplante edilen böbrekte olabilirken, diğer allojenik organ ya da kemik iliği transplantasyonu hastaları ve otoimmün hastalıklar için CsA kullanılan hastaların böbreklerinde de görülebilir (80).

CsA'ya bağlı nefrotoksik etkiler ilaç kan düzeyi normal sınırlarda olsa dahi görülebilir. Nefrotoksik etkiler akut ve kronik olarak sınıflandırılmaktadır. CsA'nın nefrotoksik etkisi çoğunlukla nonspesifiktir ve tanı için renal biyopsi gerekebilir. Oligo-anüri şeklinde hızlı seyir gösterebildiği gibi bazen de böbrek fonksiyonlarında yavaş fakat ilerleyici bozulma ile de seyredebilir.

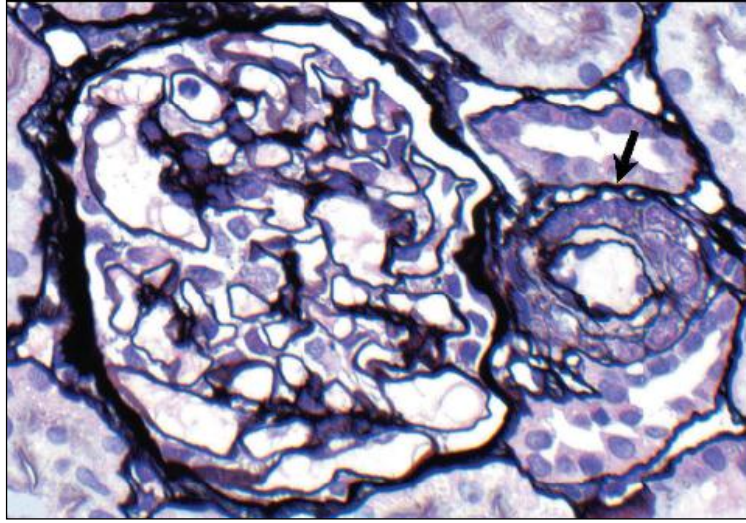
Akut nefrotoksisite doz bağımlı olup, doz ayarlanması yapıldıktan sonra geri dönüşüm göstermektedir. Akut toksisite başlangıçta fonksiyonel olup tedavinin ilk haftalarında ortaya çıkar. Fonksiyonel toksisite, preglomerüler afferent arterioller vazokonstriksiyon sonucu renal kan akımında ve glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalma ile karakterizedir ve histolojik olarak yapısal değişiklikler yoktur. GFR'deki azalma potasyum ve sodyum retansiyonuna yol açar. CsA'ya bağlı araziidonik asid metabolizmasında vazodilatör (PGE2 ve PGI2) ve vazokonstriktör eikosanoidler arasındaki dengeyi değiştirerek (özellikle tromboksan A2 [TXA2] düzeylerini artırarak) proinflatuvar ve vazokonstriktör etki gösterirler (81, 82). CsA ayrıca renin-anjiotensin-aldosteron sistemini (RAAS) aktive ederek nefrotoksik etkili olur. RAAS'ni jukstaglomerüler hücrelere direkt etki ederek veya vazodilatatör faktörlerin azalması ve endotelin seviyesinin artışına sekonder oluşan arterioller vazokonstrüksiyondan dolayı indirekt olarak etkili olur (83, 84). CsA ayrıca serbest radikal salınımını artırır. Oluşan serbest radikaller pek çok hücre içi moleküle (fosfolipid, glikolipid, gliserid, steroller gibi) reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu ve membran poliansature yağ asitlerinin hasarını artırarak

iyonik gradiyenti ve membran geçirgenliğini artırır. Dolayısıyla çeşitli membran fonksiyonlarını ve metabolik süreci bozar (85-90).

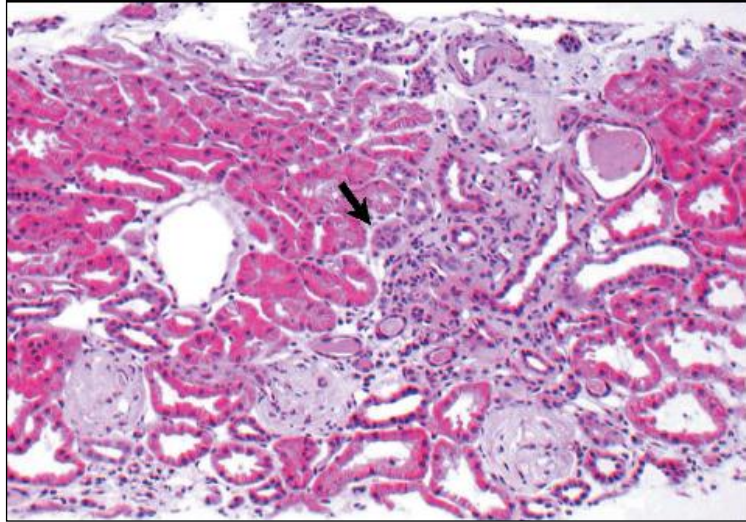
Serum ilaç seviyesindeki fazlalığa bağlı gelişen toksik tübülopati, nefrotoksisitenin bir diğer nedenidir. Proksimal tübülopati morfolojik olarak endoplazmik retikulumdaki genişlemeye ve lizozom sayısındaki artışa bağlı gelişir. Bununla birlikte afferent arteriollerin etkilenmesi sonucu oluşan akut arteriolopati gelişimi akut allograft disfonksiyonuna yol açar. Serum CsA düzeyi genel olarak yüksektir. Endotelial hücrelerde şişme ve vakuolizasyon, nekrozis ve miyosit hasarı sonrası hyalinozisle karakterizedir. Akut arteriolopati ve toksik tübulopati birlikte olabilir (3, 91).

Kronik nefrotoksisite ilacın kullanımını sınırlayan ana unsur olarak görülmektedir. İmmünolojik ve non-immünolojik hasara bağlıdır ve böbrek fonksiyonlarında ilerleyici bozuklukla karakterizedir. Histolojik olarak üç kompartmanın geri dönüşümsüz olarak etkilendiği görülmüştür. Vasküler hasar (arterioller hyalinozis), tübülointerstisyel (tübüler atrofi, interstisyel hücre artışı ve fibrozis) ve glomerüler hasar (Bowman kapsülünde kalınlaşma ve fokal veya global sklerozis) görülür (92, 93). Kesin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da kronik nefrotoksisite patofizyolojisinde birçok farklı mekanizma öne sürülmüştür. Düşük dereceli iskemi, RAAS aktivasyonu, nitrik oksit etkisi, peroksidatif hasar, TGF- $\beta$  etkisi, apoptozis artışı, toll-like reseptör uyarımı, üriner kalsiyum atılımının artışı, idrar konsantrasyon kapasitesinde bozulma, osteopontin gen ekspresyonunun artışı CsA nefrotoksisitesi gelişiminde sorumlu tutulmuştur (61, 94).





**Resim 1:** Steroide bağımlı nefrotik sendromlu bir hastada CsA kullanımına bağılı arteriopatı (4), (Periyodik Asit Shiff-PAS boyama), X 400.



**Resim 2:** Steroide bağımlı nefrotik sendromlu hastada CsA kullanımı ile ilişkili arteriopatıye eşlik eden karakteristik tübüler atrofi ve intersitisyel fibrozis (4), (Hematoksilen–Eosin boyama), X400.

Hyalin arteriopatı olarak adlandırılan vasküler hasarlanma kronik CsA nefrotoksitesinin temel değişikliklerinden biridir. Afferent arterioller ve küçük interlobüler arterlerin distal kısımları etkilenir. Düz kas hücre hasarı ve bu hücrelerin hyalin depositlerle replasmanı sonucu adventisyaya doğru

şişkinlikler görülür. İleri vakalarda, hyalin materyal birikimine bağlı vasküler lümende ciddi darlık olabilir (3, 61, 93).

Kronik CsA kullanımına bağlı interstisyel fibrozis, tübüler atrofi ve glomerüler skleroz gelişiminin başlıca sebebi arteriolopati ve daralmış arterioler lümendir. Uzun süre CsA kullanımına bağlı vazokonstriksiyon ve intrarenal vasküler direncin artması renal kan akımını azaltır. Bunun sonucu oluşan serbest radikaller tübülointesitisyel kompartmanda lokal hipoksi ve iskemiye neden olur (61). Vazokonstriksiyona neden olan mekanizmalar arasında PGE-PGI ile TXA2 imbalansı, endotelin-1 hipersekresyonu gösterilmektedir (95-97). Renal hipoperfüzyon ve hipoksi sonucu hipoksi-reoksijenasyon hasarı, apoptozisin artması ve hücre ölümü meydana gelir (98, 99). CsA' nın tetiklediği renal hücre apoptozisi Bcl 2, p53, Caspase, Fas ve Fas-ligand genleri ile ilişkilidir (100).

CsA tedavisi doz bağımlı olmakla birlikte uzun süreli kullanım sonrası tübüler epitelyal hücreler tarafından TGF- $\beta$  ekspresyonunun artması da kronik CsA nefrotoksitesinde fibrozisi arttıran önemli faktörlerden biridir (101, 102).

CsA NO sentezini ve endotel bağımlı NO-ilişkili renal vazodilatasyonu inhibe eder, vazokonstriksiyona sekonder serbest radikal ve süperoksid ürünlerinin artmasına sebep olur. CsA nitrik oksit sentaz'ın (NOS) böbrekte bulunan izoformlarını etkileyerek NO sentezinin bozulmasına ayrıca TGF- $\beta$ 1 artışına neden olur. TGF- $\beta$  ekstraselüler matriks protein artışı yaparak interstisyel fibrozisi artırır (103,104).

RAAS aktivasyonu kronik CsA nefrotoksitesine katkıda bulunan diğer önemli bir faktördür. Anjiotensin II sadece hemodinamik etkilerle akut nefrotoksiteye yol açmaz bununla beraber serbest radikal, TGF- $\beta$  ve vasküler endoteliyal büyüme faktörü (VEGF) üretimini artırarak ve ekstraselüler matriks yıkımını inhibe ederek interstisyel fibrozis gelişimine katkıda bulunur (105, 106). Son yıllarda yapılan çalışmalar RAAS'ın son ürünü olan aldosteronun CsA tokisitesinde önemli bir rol aldığını göstermiştir (107).

Nefrotoksisite patogenezinde önemli rolü olan inflamasyon ve takibeden fibrozis nedeniyle inflamatuvar mediyatörler önemlidir. Bunlardan biri olan osteopontin (OP) integrin, fibronektin, tip-1 kollajen gibi ligandlara bağlanarak makrofaj ve monositler için kemotaktik etki gösterir. CsA tedavisi ile normalde OP bulunmayan bowman kapsülü ve renal kortekste OP saptanması patogeneizde rolü olduğunu düşündürmektedir (108, 109).

CsA doğal immun sistemin bir üyesi olan toll-like reseptörlerin uyarılmasını arttırarak immun aracılı renal hasara neden olur (110,111). Bununla beraber, CsA'nın kalbindin sentezini azaltarak üriner kalsiyum atılımını arttırması, bunun tubulopatiye katkıda bulunması ve aquaporin sentezini etkileyerek böbreğin idrar konsantrasyon yeteneğini bozması diğer patofizyolojik faktörlerdir (112,113).

### **2.1.2 Kök hücreler ve klinik kullanımı:**

Kök hücre tedavileri günümüzde birçok hastalık için umut verici tedavi yöntemlerinin başında gelmektedir (114).

Kök hücreler, henüz farklılaşmamış hücreler olup, kendi kendilerini yenileme yeteneğine sahiptir, kaynaklandıkları dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabildikleri gibi özel biyolojik sinyallerle fenotipik olarak prekürsöründen farklı özel hücrelere de farklılaşabilirler. Bir hücreyi kök hücre olarak tanımlamak için; uzun süre bölünebilme ve kendi kendini yenileme yeteneği olması, özelleşmemiş olması, özelleşmemiş hücrelere kaynaklık edebilmesi, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilmesi, in vivo koşullarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilmesi gibi ölçütleri karşılaması gereklidir (115, 116).

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, multipotent ve pluripotent olarak, kaynaklandıkları yerlere göre embriyonik veya embriyonik olmayan olarak sınıflandırılırlar (117). Totipotent ve pluripotent kök hücreler embriyonik kaynaklardan, multipotent kök hücreler ise özelleşmiş kaynaklardan elde edilir.

Totipotent hücreler sınırsız farklılaşma ve farklı dokulara yönlenebilmelerinden dolayı vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek ve hatta

organizmayı tümüyle yapabilecek potansiyele sahip olan konsepsiyon sonrasında oluşan zigottaki embriyonik blastomer hücreleridir. Pluripotent hücreler, totipotent hücreler gibi vücudun bütün hücrelerine olmasa da vücudun birçok hücrelerine dönüşebilecek yetenekte olan, blastokist evresinden itibaren embriyoda ve fetüste bulunabilen hücrelerdir. Multipotent hücreler gelişmenin daha ileri evresine ait hücrelerdir ve farklılaşma kapasiteleri sınırlıdır. Kemik iliği stromal ve mezenşimal kök hücreler gibi erişkin kök hücreleri multipotent hücrelerdir (118, 119).

Embriyonik kök hücreler blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen ve her üç germ yaprağına da farklılaşabilen hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelerin spesifik bir yöne farklılaşmasını sağlamak için belli büyüme faktörlerine gereksinim vardır (120). Embriyonik kök hücreler kendini yenileyebilme ve farklılaşma yeteneği nedeniyle günümüzde tedavi olanakları sınırlı hastalıkların iyileştirilmesi için yapılan birçok çalışmaya konu olmaktadır (121). Embriyonik kök hücreler teratojen ilaçların etkilerinin araştırılması, rejeneratif potansiyellerinden dolayı miyokard hasarlanması, nörodejeneratif hastalıklar ve medulla spinalis zedelenmesi gibi durumlarda hasarlı doku yerine kullanılabilmesi ve doku uyumsuzluğu sorunu yaşanmadan organ yaratılarak trasplante edilmesi gibi alanlarda kullanılabilmesi ön görülmektedir (5, 6, 122, 123).

Embriyo dışı kök hücreler ise hematopoetik, kemik iliği mezenşimal, periferik kan, beyin, karaciğer, göbek kordonu, plasenta, kadavra kaynaklı olabilmektedir. Embriyonik olmayan kök hücreler erişkin kök hücrelerdir ve multipotent özelliktedir. Yani farklılaşma kapasiteleri embriyonik kök hücrelere göre daha sınırlıdır ve tüm hücre tiplerine farklılaşamazlar. Bu hücreler organizmanın olgunlaşması ile sayısal olarak azalır ve sınırlı bölgelerde organ ya da doku içindeki farklılaşmış hücreler arasına yerleşir. Bu hücrelere hasarlanma veya doku kaybı sonrasında yenilenen karaciğer ve deri epitel hücreleri örnek olabilir. Ayrıca kemik iliği kökenli hematopoetik hücrelerin yaşam döngüsü biten kan hücrelerinin yerine geçmesi bir diğer örnektir (114, 118, 119, 124). Ancak ilginç olarak erişkin kök hücrelerden farklı embriyonik kökenli hücrelere dönüşüm olabildiği de gösterilmiştir. Erişkin

kök hücrelerinin farklı bir doku veya organa dönüşmesi plastisite olarak adlandırılır (125, 126). Bu dönüşüm uygun deneysel şartlarda oluşturulan dediferansiyasyon, transdeterminasyon, transdiferansiyasyon ve hücre füzyonu gibi farklı mekanizmalarla açıklanır. Bu dönüşümü kanıtlayan birçok çalışma yapılmıştır. Deneysel olarak karaciğer yetmezliği yaratılan dişi sıçanlara erkek sıçandan kemik iliği nakli yapılması sonrasında dişi sıçanların hepatositlerinde Y kromozomu saptanmış ve hepatosit rejenerasyonu sağlandığı gösterilmiştir (126). Deneysel olarak hipoksik iskremik ensefalopati yaratılan neonatal ratlarda mezenşimal kök hücre verilmesi sonrası kök hücrelerin hasarlı hücrelerin yerini aldığı ve total beyin kitlesinin arttığı saptanmıştır (127). Deneysel olarak miyokard infarktüsü sonrası infarktüslü alana direk enjekte edilen kök hücrelerin çoğaldığı ve miyokard fonksiyonlarında düzelme gösterilmiştir (128).

Kemik iliğinde hem erişkin hematopoetik hem mezenşimal kök hücreleri bulunur (129). Mezenşimal kök hücreler ilk kez 1970'lerde Friedenstein ve arkadaşlarının fibroblast kolonisi yapan ünite (CFU-F) olarak tanımlanmıştır. Morfolojik olarak fibroblastlara benzer hücrelerdir. Mezenşimal kök hücreleri; CD105, SH3 ve CD13 eksprese ederler ancak hematopoietik kök hücre yüzey belirteçleri olan CD4, CD14, CD34, CD45 ve CD11b negatiftir. Bu hücreler kemik iliğindeki tüm hücrelerinin yaklaşık % 0.01' ini temsil eder (130, 131).

Mezenşimal kök hücreler genetik geçmişi daha kararlı ve malign formasyona dönüşüm riskinin daha az olması, embriyonik kök hücrelere oranla daha kolay elde edilmesi ve daha kolay sonuç alınması ve etik sorunların daha az yaşanması nedeniyle diğer kök hücre kaynaklarına göre kullanım avantajlarına sahiptir (132, 133). Mezenşimal kök hücreler adiposit, kondroblast, fibroblast, osteoblast, miyoblast, nöronlara, hepatositler ve renal hücrelere farklılaşabilirler (114, 134). Mezenşimal kök hücrelerin uygun yöntemlerle saflaştırılması ile yağ veya kas dokusu gibi diğer mezenşimal hücrelere dönüşüm riski azaltılmakta ve hedef hücreye dönüşüm oranı arttırılmaktadır (133, 135).

Kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerinin önemli kullanım alanlarından biri de akut ve kronik böbrek yetmezliğidir. Tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olan bu hastalıklar için birçok tedavi yöntemleri mevcut olmakla birlikte hasta sayısındaki artışın tedavi seçeneklerinden fazla olması kök hücre tedavileri gibi yeni seçeneklerin gerekliliğini doğurmaktadır (136).

Mezenşimal kök hücrelerin renal hasarlı hücrelere dönüşümü ile ilgili iskemik hasarlanma ve nefrotoksik kimyasallarla oluşturulan akut tübüler hasar ve akut glomerülo nefrit modelleri ile diyabetik nefropati, 5/6 nefrektomi ve Alport Sendromu gibi kronik böbrek yetmezliği modelleri kullanılarak çalışmalar yapılmıştır (132, 137, 138). Mezenşimal kök hücrelerin biyokimyasal düzelmenin sağlanması, fibrozisin azaltılmasında ve morfolojik düzelmenin sağlanmasında etkili oldukları gösterilmiştir (133, 139, 140).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Kronik siklosporin nefrotoksisitesinde kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin etkilerini araştırdığımız çalışmamız, üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: 2009-125) tarafından desteklenmiştir. Çalışmamız için Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Onay no: 2009-147).

#### 3.1 Hayvanlar ve Çalışma Grupları:

Çalışmaya Wistar cinsi genç erişkin 45 adet sıçan alındı. Sıçanlar 10-14 haftalık ( $200\pm 50$ gr) olduktan sonra, her grupta 10 sıçan olacak şekilde, aşağıda belirtildiği gibi, dört çalışma grubuna ayrıldı ve çalışma başlatıldı. Diğer sıçanlarla aynı yaş grubundaki 5 adet sıçan kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre alınmak için kullanıldı.

Grup 1: CsA verilen grup

Grup 2: CsA + Kök hücre verilen grup

Grup 3: Sadece kök hücre verilen grup

Grup 4: Kontrol grubu

Tüm sıçanlar aynı laboratuvar ortamında (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi Bilim Dalı Laboratuvarı, İzmir), 12 saat gece - 12 saat gündüz olacak şekilde uygun kafeslerde tutuldu. Deney süresince beslenmeleri standart sıçan yemi (Yem Kurumu Standart Sıçan Yemi) ve istediği kadar su (ad libitum) alacak şekilde ayarlandı.

#### 3.2 Çalışma Tasarımı:

Grup 1 ve Grup 2' deki sıçanlara 60 gün boyunca tedavi dozunda (15 mg/kg/d) CsA (Sandimmun 50mg/ml amp.®, Novartis, İsviçre) subkutan olarak verildi; diğer gruptaki denekler bu süreç içerisinde aynı laboratuvar ortamında tutuldu.

Grup 2 ve grup 3 deki sıçanlara 60 günden sonra Brd-U ile işaretli kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreler femoral venden verildi. Femoral venden kök hücre transferi öncesinde, denekler intraperitoneal 60 mg/kg ketamin (Eczacbaşı/ Türkiye) ve 10mg/kg Xylazine (Eczacbaşı/Türkiye) uygulandı. Sonrasında cilt-cilt altı geçilerek femoral ven açıldı ve kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreler steril ortamda enjektör ile verildi. Transferden sonra damar ve cilt-cilt altı kapatılarak pansuman yapıldı ve bölge kapatıldı.

Kök hücre transfer edilen sıçanlar (Grup 2 ve grup 3) diğer sıçanlarla beraber bir hafta daha aynı laboratuvar ortamında tutulduktan sonra, tüm gruplardaki denekler servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edildikten sonra sağ ve sol böbrekleri alınarak histolojik incelemeleri başlatıldı.

### **3.3 Mezenşimal Kök Hücre Eldesi:**

Wistar cinsi genç erişkin 5 adet sıçan genel anestezi altında, intraperitoneal 60 mg/kg ketamin (Eczacbaşı/ Türkiye) ve 9mg/kg Xylazine (Eczacbaşı/Türkiye) ile asepti-antisepti kurallarına uyularak, steril koşullar altında, femur ve tibialar çıkartılarak steril PBS ( Biochrom L-1815) içine alındı. Femur ve tibialar steril hava kabini içinde, çevrelerindeki kas dokusundan dikkatlice temizlendi. Metafizler uçları kesildi, insülin enjektörü ile kemik iliği boşluğuna primer besi ortamı ( $\alpha$ -MEM [sigma M-4526], %15 FCS [Biochrom S-O115], % 0,4 penisilin [Biochrom A-2213], % 0,4 streptomisin [Biochrom A-2213, % 0,1 amfoterisin B [Biochrom A-2612], % 1 gentamisin [Biochrom A-2712]) verildi ve kemik iliği besi ortamı içinde toplandı. Santrifüj tüpü içindeki kemik iliği pipetlenerek hücre süspansiyonu haline getirildi. Kemik iliği, primer besi ortamı içinde 5 dk.(dakika) süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilerek iki kez yıkandı. Santrifüj sonunda süpernatant dökülerek hücreler primer besi ortamı ile süspansiyon edildi ve 25 cm<sup>2</sup>lik hücre kültür kabında, 37°C'de ve % 5 CO<sub>2</sub> koşulunda inkübasyona kaldırıldı. Üç gün sonra, hematopoyetik hücreler ve yüzeye tutunmayan hücreler besi ortamının alınmasıyla uzaklaştırıldı ve hücre kültür kabının yüzeyine tutunmuş olan hücreler primer besi ortamı eklenerek inkübasyona kaldırıldı. Kültüre 10 gün devam edildi ve 10. gün hücreler Brd-U ile işaretlendi.



### **3.4 Mezenşimal Kök Hücrelerin Brd-U İle İşaretlenmesi:**

Bromodeoksiüridin (Brd-U), bir timidin analogudur. Brd-U genellikle canlı dokulardaki çoğalan hücrelerin saptanmasında kullanılır. Brd-U, yeni sentezlenen DNA'ya hücre siklusunun S fazında bağlanır. Böylelikle S-fazında işaretlenen hücreleri daha sonra incelenme olanağı sağlar.

Mezenşimal kök hücreleri Brd-U ile işaretlemek amacı ile hücreler Brd-U işaretleme seti (2750, Milipore, California, USA) içerisindeki 1:1000 oranında dilüe Brd-U ile 37° C' de 1 saat inkübe edildi. Uygulamadan sonra kültür vasatı ile 3 defa 5'er dk yıkanan hücreler, kültür vasatı aspire edildikten sonra tripsin/EDTA solüsyonu ile hücrelerin kültür kabından kalkmaları sağlandı. Bir kısım hücre kültür kabından kaldırılmadan immunohistokimyasal boyama için saklandı. Diğer toplanan hücreler santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı atılarak alttaki hücre peleti üzerine kültür vasatı ilavesi yapılarak her bir deneğe verilmek üzere steril enjektörler içine alındı. Hücre miktarı  $25 \times 10^5$  hücre/ml idi.

### **3.5 Mezenşimal kök hücrelerin İndirekt İmmunohistokimya Yöntemi ile İncelenmesi:**

Mezenşimal kök hücrelerin CD4 ve Brd-U incelemeleri için hücrelerin bir kısmında kültür vasatı uzaklaştırılarak bir defa steril PBS ile yıkandıktan sonra % 4'lük paraformaldehit ile 30 dk. tespit edildi. Tespit işleminden sonra 3 kez 5 dk. PBS ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için 10 dk. % 3'lük hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ , K31355100, Merck, Darmstadt, Germany) uygulandıktan sonra, hücreler 3 defa PBS ile yıkandı. Permeabilizasyon için hücreler % 0,1 Triton-X 100 (A4975,0100, Applichem, Darmstadt, Germany) ile 15 dk. buz üstünde inkübe edildi ve 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra 1 saat bloklama solüsyonu (K023, DBS, California, USA) konarak bekletildi. 1/50 dilüsyonda anti-CD4 (CBL1506, Milipore, California, USA) ve anti-Brd-U (MAB3424, Milipore, California, USA) antikoları ile bir gece +4 C ° de inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkanan hücreler anti-mouse ve anti-rabbit biotinlenmiş ikincil antikor (KP500, DBS, California, USA) ile 30 dk. inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5' er dk. yıkanan hücreler streptavidin hidrojen peroksidaz (KP500, DBS, California, USA) ile 30 dk.

bekletildikten sonra tekrar PBS ile 3 defa yıkanarak immunoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak üzere diaminobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) kromojeni 5 dk. uygulandı ve distile su ile 15 dk. yıkandı. Mayer's Hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile 5 dk. boyama yapıldıktan sonra hücreler distile su ile 15 dk. yıkanarak direkt olarak kapatma medyumunu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı ve Olympus marka BX 40 mikroskop ile incelendi.

### 3.6 Işık Mikroskopik İnceleme

Deneklerden alınan örnekler % 10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24-48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu ve dokular bloklanarak rotary mikrotom (RM 2135, Leica) ile 5 µm' lik kesitler alındı. Dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilen-eozin (H-E) ve Masson Trikrom boyamaları yapıldı. Mezenimal kök hücrelerin analizi için anti-CD4 ve anti-Brd-U ile anti-TGF-β1 ve anti-TGF-β3 immunohistokimyası ve apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL yöntemi uygulandı.

### 3.7 Parafin Doku Takibi:

Tespit edilen böbrek örnekleri, tespit solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 30'ar dk % 60'dan % 80'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. % 95 alkol içerisinde 1' er saat iki değişim sağlanarak tutulan örnekler 30 dk 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 1'er saat iki değişim ksilene tabi tutuldu. 1:1 ksilen:parafin içerisinde 30 dk 60° C' lik etüvde tutulan örnekler birer saat 2 değişim parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra blok kaplarına alınarak parafin içerisinde gömüldü (Tablo 3.1). Alınan 5 µm'lik kesitlere histokimyasal inceleme için hematoksilen-eozin ve Mason Trikrom boyaları, immunohistokimyasal inceleme için indirek immunohistokimya boyaması yapıldı.

**Tablo 3.1:** Parafin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	% 10 formalin	24- 48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	30 dk

	% 70 etil alkol	30 dk
	% 80 etil alkol	30 dk
	% 95 etil alkol	1 saat
	% 95 etil alkol	1 saat
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen-Alkol	30 dk
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
<b>Emdirme 60° C etüvde</b>	Ksilen-Parafin	30 dk
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
<b>Gömme</b>	Parafin	

### 3.8 Hematoksilen-Eozin Boyaması:

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5 µm' lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60° C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dk iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için % 95'den % 60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dk akar su altında yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 30 dk boyandıktan sonra, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için asit alkole batırılıp çıkarılan kesitler 5 dk akar su altında yıkandı. Daha sonra kesitler 2 dk eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dk akar su altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla % 80 ve % 95'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dk iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2:** Hematoksilen-Eozin Boyaması

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Deparafinizasyon</b>	60° C etüvde	1 gece
<b>Deparafinizasyon</b>	Ksilen	30 dk
	Ksilen	30 dk

<b>Rehidratasyon</b>	% 95 alkol	2 dk
	% 80 alkol	2 dk
	% 70 alkol	2 dk
	% 60 alkol	2 dk
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dk
<b>Boyama</b>	Hematoksilen	30 dk
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dk
<b>Diferansiyasyon</b>	Asit alkol	2-3 saniye
<b>Boyama</b>	Eosin	2 dk
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dk
<b>Dehidratasyon</b>	% 80 alkol	1 dk
<b>Dehidratasyon</b>	% 95 alkol	1 dk
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen	1 saat
<b>Kapama</b>	Entellan	

### 3.9 Masson Trikrom Boyaması:

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60 C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dklık iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidrasyon işlemi için % 95'den % 60'a azalan oranlarda alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dk akarsu altında yıkandı. Kesitler distile su içinde 10 dk yıkandıktan sonra 56 °C de 15 dk bouin solüsyonu içinde bırakıldı. Çeşme suyunda 5 dk yıkanan kesitler sarı renk kayboluncaya kadar bekletildi. Daha sonra boyama için Masson Trikrom boyama kiti (HT15-3, Sigma) kullanıldı. Wright Hematoksilen ile 5 dk muamele edildi. Çeşme suyunda 5 dk yıkandıktan sonra distile su ile çalkalandı. Kesitler 5 dk asit fuksin ile muamele edildi ve tekrar distile su ile yıkandı. Fosfomoliptik asit ve fosfotungustik asit 1/2 oranında karıştırıldı ve 5 dk uygulama yapıldı. Daha sonra Anilin mavisi ile 5 dk boyanan kesitler, 2 dk asitik asit ile muamele edildi. Çeşme suyunda 5dk yıkandıktan sonra ardından % 80 ve % 95'lik alkol şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dk iki serilerinde geçirilip havada kurutulan kesitler değişim ksilende

tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3:** Masson Trikrom Boyaması

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Deparafinizasyon</b>	60° C etüvde	1 gece
<b>Deparafinizasyon</b>	Ksilen	30 dk
	Ksilen	30 dk
<b>Rehidratasyon</b>	% 95 alkol	2 dk
	% 80 alkol	2 dk
	% 70 alkol	2 dk
	% 60 alkol	2 dk
<b>Yıkama</b>	Distile su	10 dk
<b>Akselerasyon</b>	Bouin solüsyonu (56° C)	15 dk
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dk
<b>Boyama</b>	Weigert Demirli Hematoksilen	5 dk
<b>Yıkama</b>	Akar su	5 dk
<b>Yıkama</b>	Distile su	5 dk
<b>Boyama</b>	Biebrich Scarlet Acid Fuchsin	5 dk
<b>Yıkama</b>	Distile su	5 dk
<b>Boyama</b>	Fosfotungstik asit, fosfomolibdik asit karışımı (2:1 oranında)	5 dk
<b>Boyama</b>	Anilin mavisi	5 dk
<b>Yıkama</b>	% 1 asetik asit	2 dk
<b>Yıkama</b>	Distile su	5 dk
<b>Dehidratasyon</b>	% 80 ve % 95'lik alkol	2'şer dk
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen	30 dk (2 değişim)
<b>Kapama</b>	Entellan	

### 3.10 TUNEL Boyaması:

Bu teknik için Dead-End Colorimetric TUNEL system kiti (Insitu Detection Kit, S7107, Chemicon, California, USA) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dk iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak fosfat tampon solüsyonunda (PBS: Phosphate buffer solution) 5 dk yıkandı. Daha sonra oda sıcaklığında 15 dk 20 µg/ml proteinase K ile inkübe edilen kesitler 3 defa 5'er dk PBS ile yıkandı. Endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TA-015-HP, Lab vision, Fremont, CA) uygulanan kesitler PBS ile oda sıcaklığında 10 dk yıkandı. Daha sonra PBS ile 3 defa 5'er dk yıkandı. Equilibration tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilen kesitler, TdT enzimi ile 37 °C de 1 saat bekletildi. Kontrol boyama kesitleri TdT enzimi konmayıp, sadece reaksiyon solüsyonunda bekletildi. Daha sonra kesitler oda sıcaklığında 10 dk stop wash yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra 3 defa 5' er dk PBS ile yıkanan kesitlere Anti-digoxigenin konjugat solüsyonu ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Kesitler 4 defa 5'er dakıda PBS ile yıkandı. TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacı ile kesitler 5 dk diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilin ile artalan boyaması sağlanan kesitler % 80 ve % 95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dk ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı. TUNEL pozitif hücre sayımı iki histolog tarafından ayrı zamanlarda Image-Pro Plus 5.1.2 hücre sayım programında her gruptan her bir denkten alınan kesitlerde en az 5 farklı alanda boyalı ve boyanmayan hücreler belirlenerek sayım yapıldı (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4:** TUNEL boyaması

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Deparafinizasyon</b>	60 °C etüvde	1 gece
<b>Deparafinizasyon</b>	Ksilen	30 dk
	Ksilen	30 dk
<b>Rehidratasyon</b>	% 95 alkol	2 dk
	% 80 alkol	2 dk

	% 70 alkol	2 dk
	% 60 alkol	2 dk
<b>Yıkama</b>	Distile su	10 dk
<b>Dokuların etrafını çizme</b>	Dakopen	
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dk
	Proteinaz K solusyonu	10 dk
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dk
	% 3'lük hidrojen peroksit	5 dk
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dk
<b>Tamponlama</b>	Equilibration tampon sol.	5 dk
<b>Primer antikor</b>	Enzim solusyonu	37 °C 1 saat
<b>Yıkama</b>	Stop wash solüsyonu	10 dk
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dk
	Anti-digoxigenin konjugat	30 dk
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dk
<b>Boyama</b>	DAB boyası	10 dk
<b>Yıkama</b>	Distile su	10 dk
<b>Zıt boyama</b>	Mayer hematoksilen	4 dk
<b>Dehidratasyon</b>	% 80- % 90'lık alkol serileri	2 dk
<b>Şeffaflaştırma</b>	Ksilen	30 dk
<b>Kapama</b>	Entellan	

### 3.11 İndirekt İmmünoperoksidaz Yöntemi:

Alınan böbrek kesitleri immunohistokimyasal boyama için bir gece 60° C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dk iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95 ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 10 dk bekletildi. Pap pen (IM3580, Immunotech, Marseille, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin (EK001-10K, Biogenex, San Ramon, USA) solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dk tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. 3 defa 5'er dk PBS ile yıkanan kesitler 10 dk bloklama solüsyonu (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco,

USA) ile muamele edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar anti-CD-4 (CBL1506, Milipore, California, USA), anti-Brd-U (MAB3424, California, USA), anti-TGF- $\beta$ 1 (sc-146, Santa Cruz, California, USA), anti-TGF- $\beta$ 3 (sc-82, Santa Cruz, California, USA) ve anti-kollajen-1 (ab6308, Abcam, Cambridge, MA, USA) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-6543, Histostain plus kit, Zymed, San Francisco, USA) ile 30'ar dk boyandı. Yine üç defa 5'er dk PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB, K007, DBS, California, USA) ile 5 dk. boyandı. Mayer's hematoksilen (02274390059, J.T.Barker, Deventer, Holland) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk. yıkanan kesitler kapatma medyumunu (K002, DBS, California, USA) ile kapatıldı (Tablo 3.5)

İndirekt immunohistokimya işleminden sonra örnekler iki histolog tarafından farklı zamanlarda değerlendirilerek, immunoreaktiviteler negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi.

**Tablo 3.5:** İndirek İmmunoperoksidaz Boyaması

<b>İşlem</b>	<b>Madde</b>	<b>Süre</b>
<b>Deparafinizasyon</b>	60 °C etüvde	1 gece
<b>Deparafinizasyon</b>	Ksilen	30 dk
	Ksilen	30 dk
<b>Rehidratasyon</b>	% 95 alkol	2 dk
	% 80 alkol	2 dk
	% 70 alkol	2 dk
	% 60 alkol	2 dk
<b>Yıkama</b>	Distile su	10 dk
<b>Dokuların etrafını çizme</b>	Dakopen	
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dk
	Tripsin	15 dk
	% 3' lük hidrojen peroksit	5 dk
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dk



<b>Bloklama</b>	Blok solüsyonu	10 dk
<b>Antikor ile inkübasyon</b>	Anti-CD-4, anti-Brd-U, anti-TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, kollajen-1	1 gece, 4 °C de
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dk
	İkincil antikor	30 dk
	Avidin-biotin kompleksi	30 dk
<b>Yıkama</b>	PBS	3x5 dk
<b>Boyama</b>	AEC	5 dk.
<b>Yıkama</b>	Distile su	3x5 dk
<b>Zıt Boyama</b>	Mayer' s hematoksilen	15 dk
<b>Yıkama</b>	Distile su	3x5 dk
<b>Kapama</b>	Kapatma mediumu	

### 3.12. İstatistiksel analiz:

Verilerin analizi SPSS 11. 5 paket programında gösterildi. Doku histopatolojik değerlendirilmesi sonucunda elde edilen veriler direkt olarak programa girilerek ortalama değerleri elde edildi.

TUNEL boyaması sonucunda kahverengi çekirdekli olarak tanımlanan TUNEL pozitif hücreler sayımı, her bir alanda 100 hücre olacak şekilde sayım yapıldıktan sonra TUNEL pozitif hücreler sayılarak % olarak elde edildi. Her bir örnekten alınan kesitlerde 5 alanda sayım yapılarak değerlendirildi.

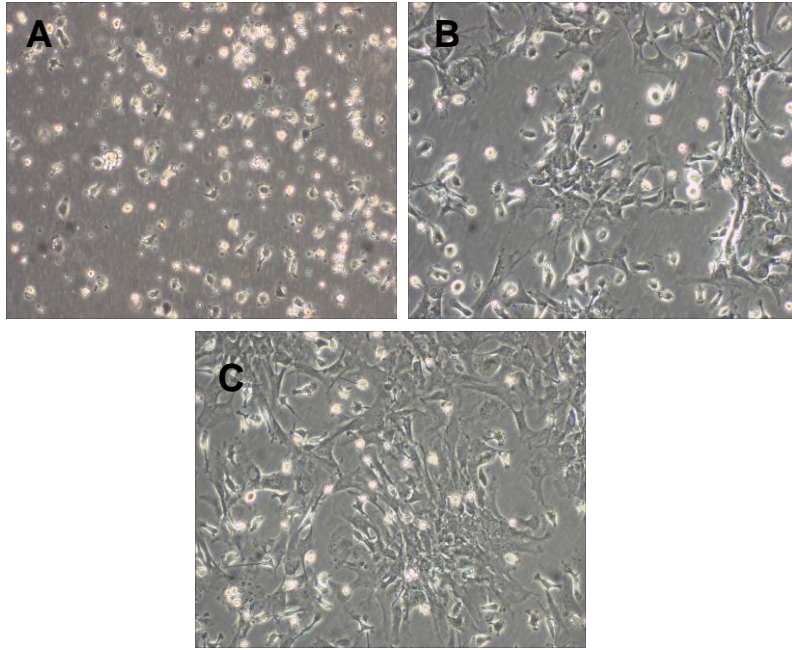
İmmunohistokimyasal analiz sonucunda elde edilen intensite yoğunlukları negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) pozitif olarak değerlendirildi. Tüm örneklerin incelenmesinden sonra veriler istatistiksel olarak analiz edildi.

Tüm verilerin istatistiksel olarak anlamlılığı Kruskal Wallis testiyle incelendi.  $p < 0, 05$  olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Mezenşimal kök hücre kültürü:

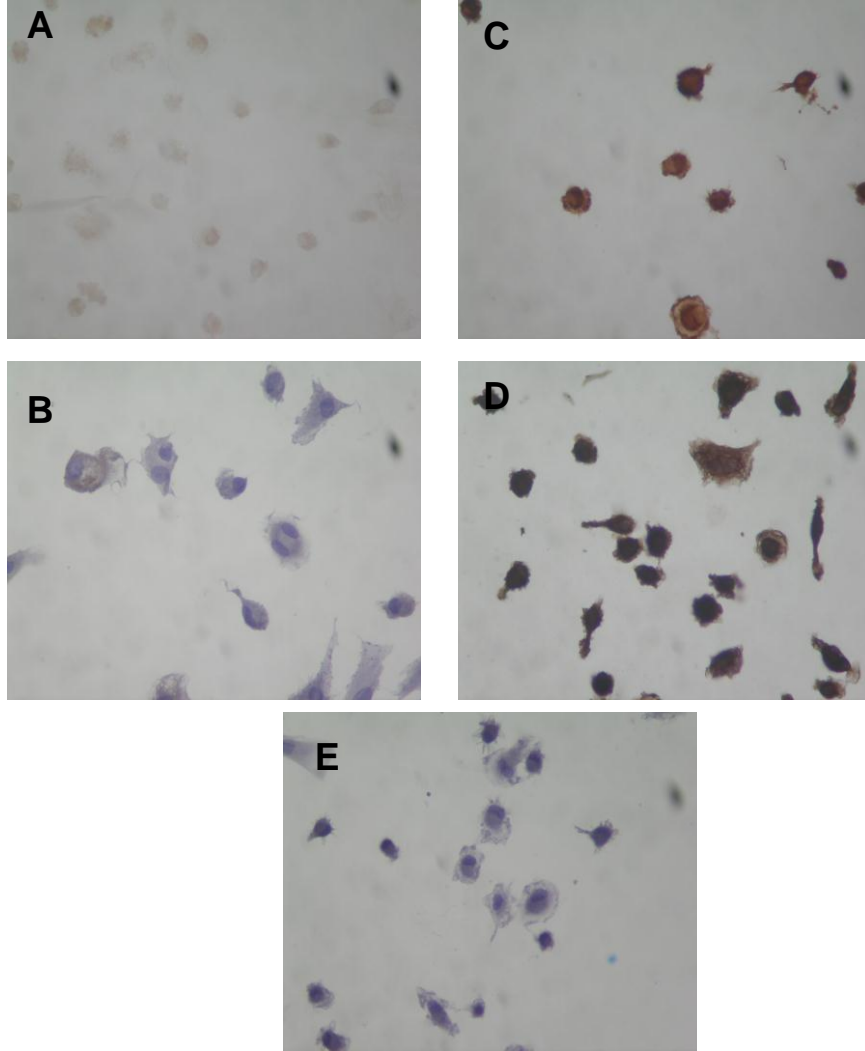
Sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenşimal kök hücreler kültür vasatı içerisine alınarak kültüre edildi. Kültürün 3. gününde hücrelerin kültür kabına yapışmaya başladıkları gözlenirken (Resim 4.1 A), kültür kabına yapışmayan hücrelerin de olduğu saptandı. Kültür kabına yapışmayan hücrelerin özellikle eritrositer seriye ait hücreler oldukları gözlemlendi. Kültür vasatının iki günde bir değiştirilmesi ile yapılan kültür sonrasında, kültürün 6. gününde kültür kabına yapışan hücreleri sayısının arttığı ve yüzen hücrelerin azaldığı izlendi (Resim 4.1 B).



**Resim 4.1:** Mezenşimal kök hücre kültürü 3. gün (A), 6. gün (B), 9. gün (C).

A: X100, B-C: X200

Kültür kabına yapışan hücrelerin epiteloid karakterde oldukları görüldü. Kültürün 9. gününde kültür kabına yapışmış hücrelerin sayısının daha da arttığı ve yer yer confluent (kültür kabının kaplanması) oldukları izlendi. Hücreler konfluent olduktan sonra hücreler kaldırılarak bir kısmı immunohistokimyasal analiz için pasajlandı. Kalan hücreler ise steril enjektörlere alınarak deneklere verilmek üzere hazırlandı.



**Resim 4.2:** Kültürün 10. gününde mezenşimal kök hücrelerde CD4 (A,B) ve Brd-U (C,D) immunoreaktiviteleri. Negatif kontrol boyama (E) boyanma izlenmemektedir. X400.

Kültürün 9. gününde pasaj yapılan hücreler ertesi günü (kültürün 10. günü) immunohistokimyasal analiz için tespit edildi. Uygun immunohistokimyasal protokol uygulamasından sonra, hücrelerde CD-4 ve

Brd-U dağılımları incelendi. Kültüre edilen hücrelerde CD-4 immunoreaktivitesi çok az hücrede zayıf şiddette (+) pozitif olduğunun gözlenmesi bu hücrelerin çoğunun kemik iliği stromal mezenşimal kök hücreler olduğunu düşündürdü. Brd-U işaretlemesi yapıldıktan sonra, hücrelerin Brd-U ile işaretlendiklerinin analizi için yapılan immunohistokimyasal boyama sonucunda ise, tüm hücrelerin Brd-U ile şiddetli pozitif (+++) olarak boyandığı izlendi (Resim 4.2 C,D). İmmunohistokimyasal boyanmaların artalan boyamasında kullanılan hematoksilen ile görünürlülüğünün azalmış olabileceği düşünüldüğünden, boyanma analizleri artalan boyaması kullanılmamış (Resim 4.2 A,C) ve kullanılmış (Resim 4.2 B,D) örneklerde incelendi. Negatif kontrol boyaması sonucunda ise hiç bir boyanmaya rastlanmadı (Resim 4.2 E).

#### 4.2. Hematoksilen-Eozin ve Mason-Trikrom Boyama:

Çalışmanın histolojik incelemelerinde kronik nefrotoksisite bulguları olarak tübüler atrofiye ikincil gelişen tübüler lümende genişleme, interstisyel mononükleer hücre infiltrasyonu, interstisyel fibrozis skorlaması ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo 4.1 ve 4.2).

**Tablo 4.1:** Nefrotoksik histopatolojik bulguların skorlaması

- A. Tübüler atrofi (0- 3)  
B. Tübülointerstisyel mononükleer hücre infiltrasyonu (0- 3)  
C. İnterstisyel fibrozis (0- 3)

Skor Grup	A			B			C		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>Grup 1 (n=6)</b>	0	2	4	1	2	4	0	2	4
<b>Grup 2 (n=7)</b>	5	2	0	1	3	3	2	4	1
<b>Grup 3 (n=8)</b>	0	0	0	8	0	0	0	0	0
<b>Grup 4 (n=8)</b>	0	0	0	8	0	0	0	0	0

**Tablo 4.2:** CsA nefrotoksitesine ilişkin histopatolojik bulguların gruplara göre skor ortalamaları

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Grup 1 (n=6)</b>	2.66±0.21*	2.33±0.33	2.66±0.21
<b>Grup 2 (n=7)</b>	1.28±0.18	2.28±0.28	1.85±0.26
<b>Grup 3 (n=8)</b>	0	1.00±0.00	0
<b>Grup 4 (n=8)</b>	0	0	0

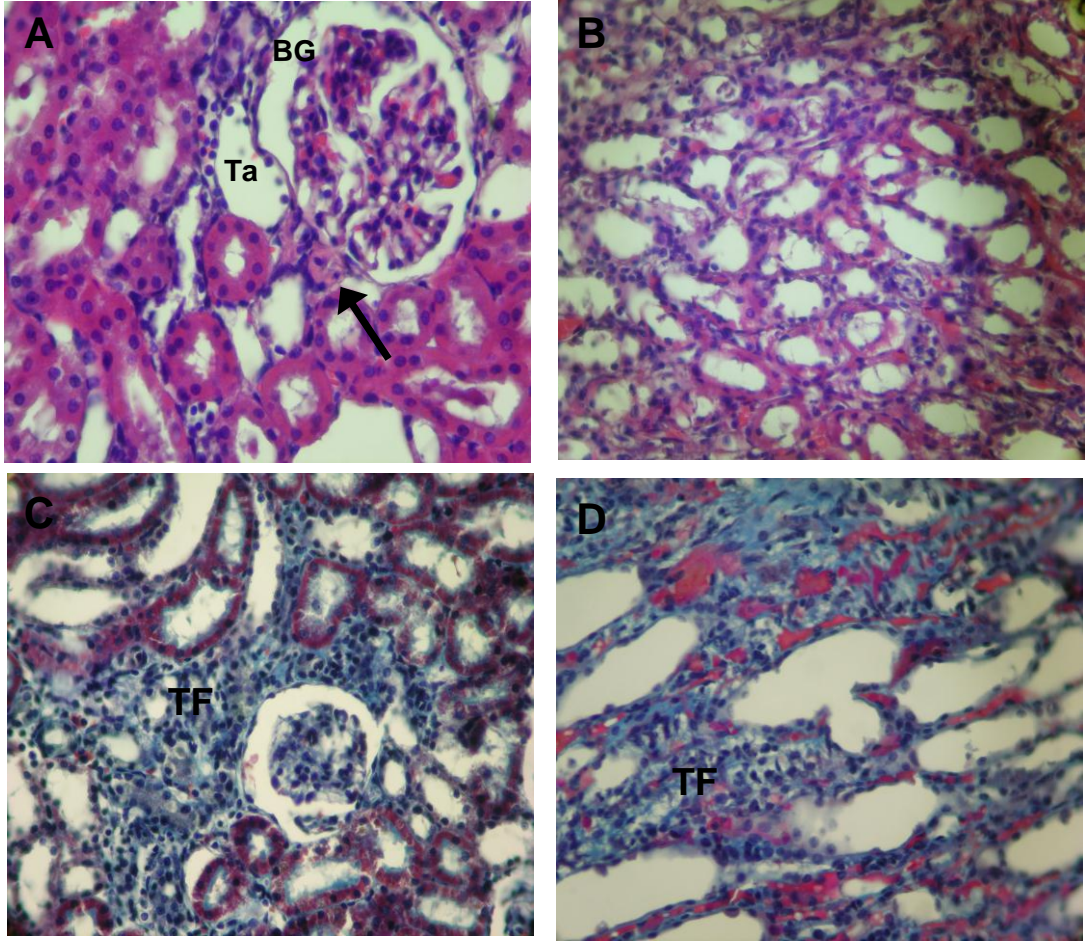
Sadece CsA verilen gruptaki (Grup 1) sıçanların böbrek dokularında kronik CsA nefrotoksitesine ait tipik değişiklikler gözlemlendi. Hematoksilen-eozin ile yapılan boyamada renal kortekste tübüler atrofiye sekonder tübüler lümende genişleme diğer gruplara oranla artmış saptandı (Resim 4.3 A-B). Sırasıyla grup 1’de tübüler atrofi skoru 2.66±0.21, grup 2’de 1.28±0.18’di, grup 3 ve 4’de tübüler atrofi yoktu, grup 1 ve 2 arasında istatistiksel farklılık saptandı ( $p<0.001$ ).

Grup 1’deki sıçanlarda tübülointersitisyel mononükleer hücre infiltrasyonu artmış olarak görüldü. Sırasıyla tübülointersitisyel mononükleer hücre infiltrasyonu skorları, grup 1’de 2.33±0.33, grup 2’de 2.28±0.28. Grup 3 ve grup 4’de tübülointersitisyel mononükleer hücre infiltrasyonu yoktu.

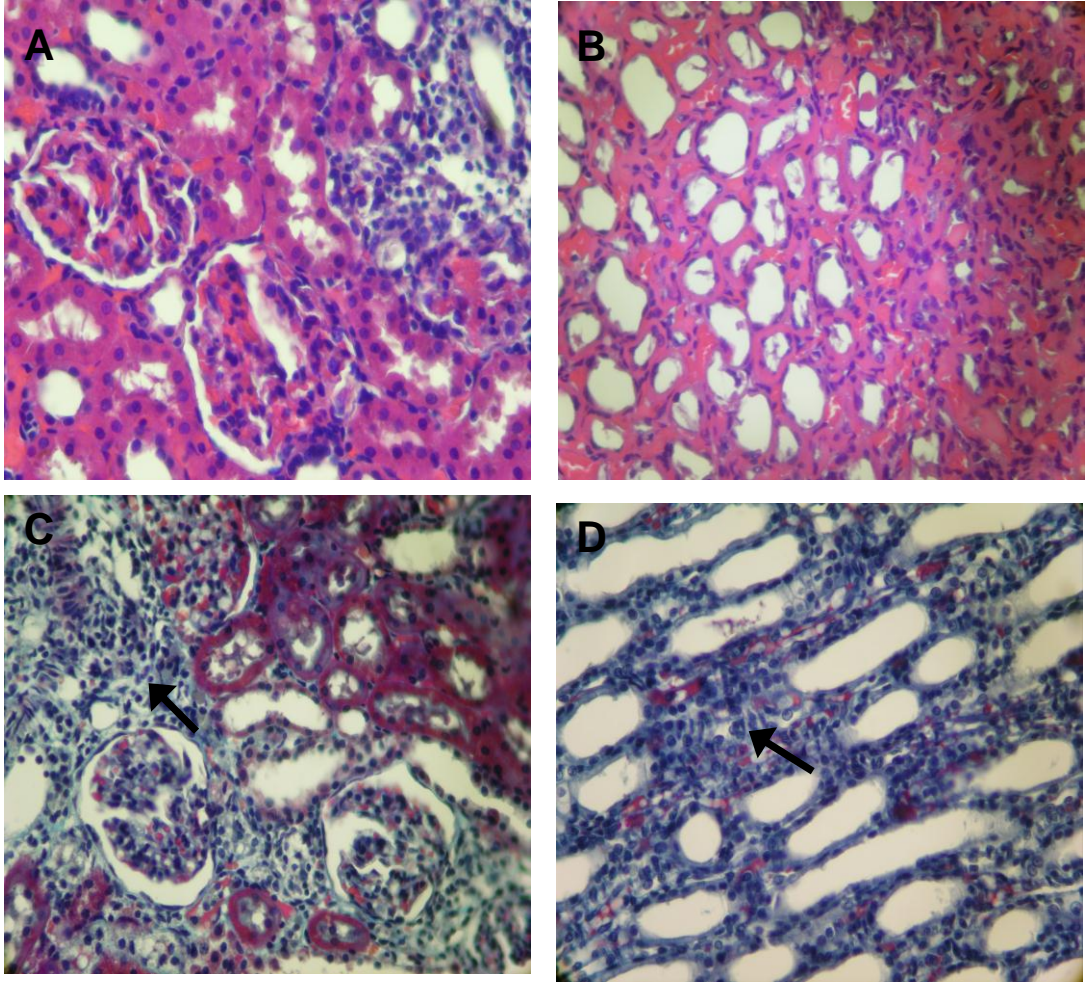
Tübülointersitisyel mononükleer hücre infiltrasyonu açısından grup 1 ile grup 3 ve grup 4 arasında ve grup 2 ile grup 3 ve grup 4 arasında anlamlı farklılık saptanırken ( $p<0.001$ ), Grup 1 ile grup 2 arasında anlamlı fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). Grup 2’de tübülointersitisyel alanda gözlenen hücre varlığının hem bu gruba verilmiş olan kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerden hem de inflamatuvar hücrelerden kaynaklanabileceği düşünüldü ki Brd-U ile bunların pozitif işaretlenmesi bunu desteklemekteydi. Sadece mezenşimal kök hücre uygulanan grupta (Grup 3) ve kontrol grubunda (Grup 4) kortekste tübüler ve glomerüler yapıların normal histolojik özellikte olduğu, tübüler atrofisinin ve glomerüler dilatasyonların olmadığı gözlemlendi (Resim 4.5 A-B ve Resim 4.6 A-B).

Grup 1'deki sıçanlarda diğer değişikliklere ek olarak arterioller hyalin depolanması ve Bowman kapsülünde genişleme, bazı glomerüllerde yapışıklıklar gözlenirken grup 2'deki sıçanlarda yer yer Bowman kapsülünde genişleme, bazı glomerüllerde yapışıklıklar gözlendi, arterioller hyalin depolanması daha az olarak görüldü. Renal medullada ise toplayıcı tübüler epitel hücrelerin arasında piknotik çekirdekli hücrelere rastlandı. Grup 2'de de renal medullada toplayıcı tübüler epitel hücrelerinin piknotik çekirdekli hücrelere rastlandı. Ayrıca intersitisyel alanda yer yer hücre infiltrasyonu ile birlikte fibrosizin olduğu görüldü.

Masson-Trikrom boyamasında glomerüler ve tübüler dilatasyon yanı sıra kollajen depolanmasındaki artış bulguları tübülointersitisyel fibrozis olarak değerlendirildi. Tübülointersitisyel fibrozis skorları sırasıyla grup 1'de  $2.66 \pm 0.21$ , grup 2'de  $1.85 \pm 0.26$ 'dı, grup 3 ve 4'de tübülointersitisyel fibrozis yoktu. Grup 1'de renal medullada Masson- Trikröm ile kollajen depolanmasının artmış olarak değerlendirildi (Resim 4.3 C-D). Grup 2'de de Masson-Trikrom boyamasında kollajen depolanmasının daha az (Resim 4.4 C-D) ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlendi ( $p < 0.05$ ). Grup 3 ve grup 4'de renal medullada yapıların normal histolojik özelliklerini koruduğu, tübülointersitisyel fibrozisin olmadığı saptandı (Resim 4.5 C-D ve Resim 4.6 C-D).

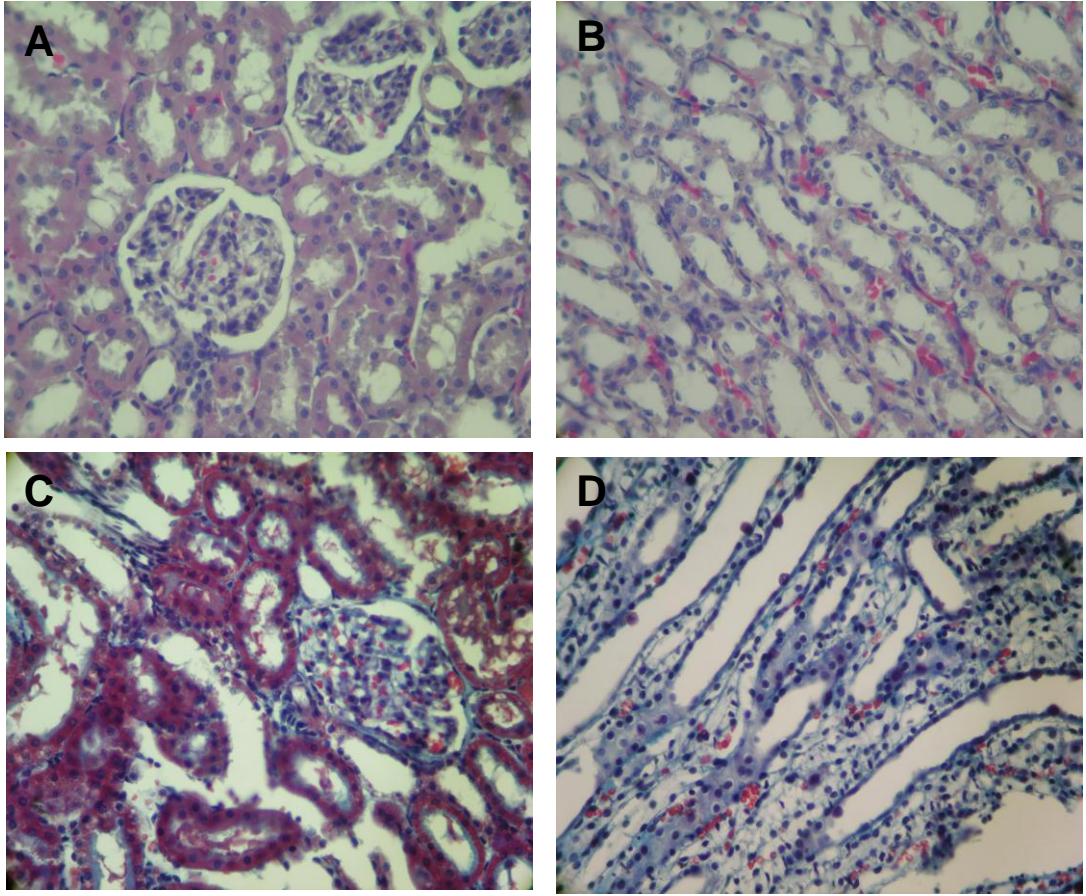


**Resim 4.3:** Grup 1'deki sıçanlarda görülen kortikal ve medüller histopatolojik değişiklikler. Hematoksilen-eozin (A, B) ve Masson Trikrom (C, D) boyama, X 400. Tübüler atrofi (Ta), Bowman kapsülünde genişleme (BG), Tübülointersitisyel inflamatuvar hücre artışı ve fibrozis (TF), arterioller hyalin birikimi (ok ile) gösterilmiştir.

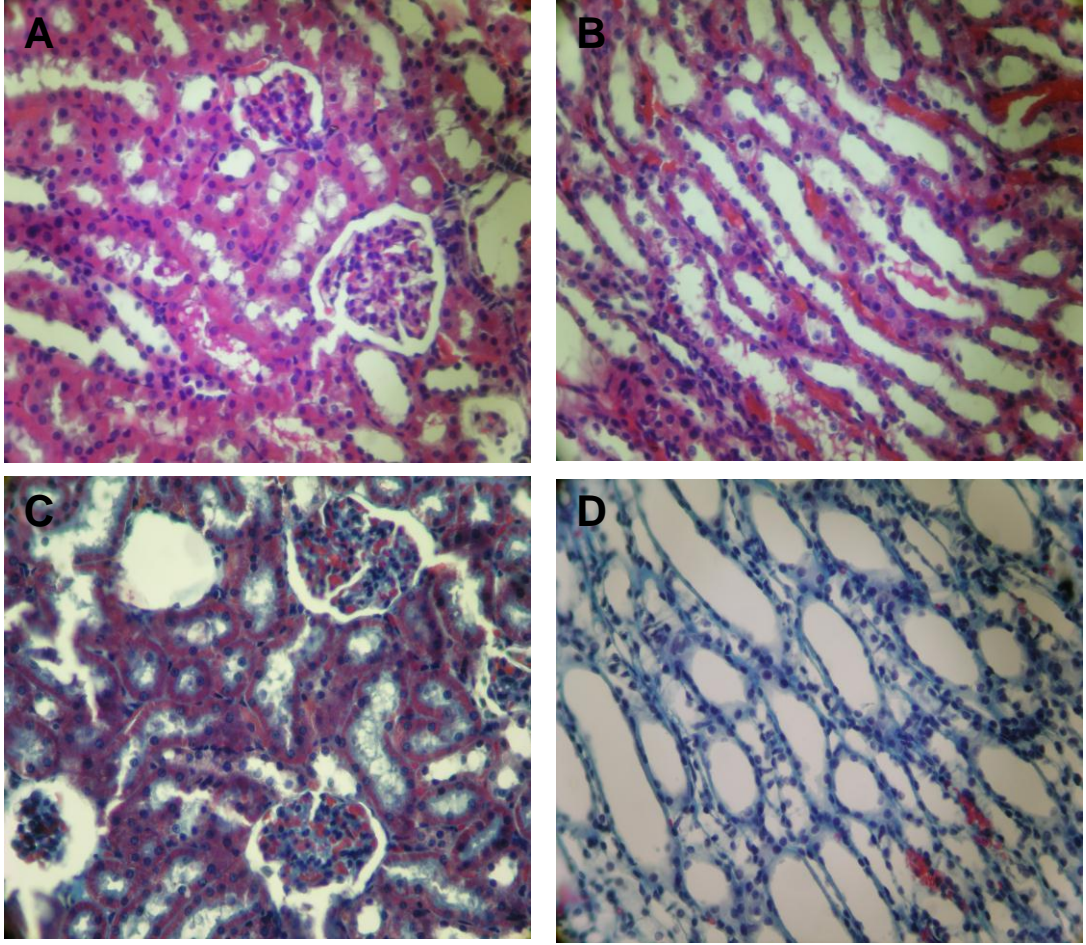


**Resim 4.4:** Grup 2' deki sıçanlarda görülen histolojik değişikliklerin Hematoksilen- eozin (A-B) ve Masson- Trikrom boyamaları (C-D). X 400. Tübülointeristisyel alanda hücre artışı ok ile gösterilmiştir.





**Resim 4.5:** Grup 3'teki sıçanlarda görülen histolojik değişiklikler.  
Hematoksilen- eozin (A-B) ve Masson- Trikrom (C-D) boyamalar. X 400.



**Resim 4.6:** Grup 4'teki sıçanlarda görülen histolojik değişiklikler.  
Hematoksilen-eozin (A-B) ve Masson Trikrom (C-D) boyamalar, X 400.

### 4.3. Tunel incelemesi:

TUNEL incelemesinde kullanılan skorlama tablo 4.3'de, inceleme sonuçları tablo 4.4'de gösterilmiştir.

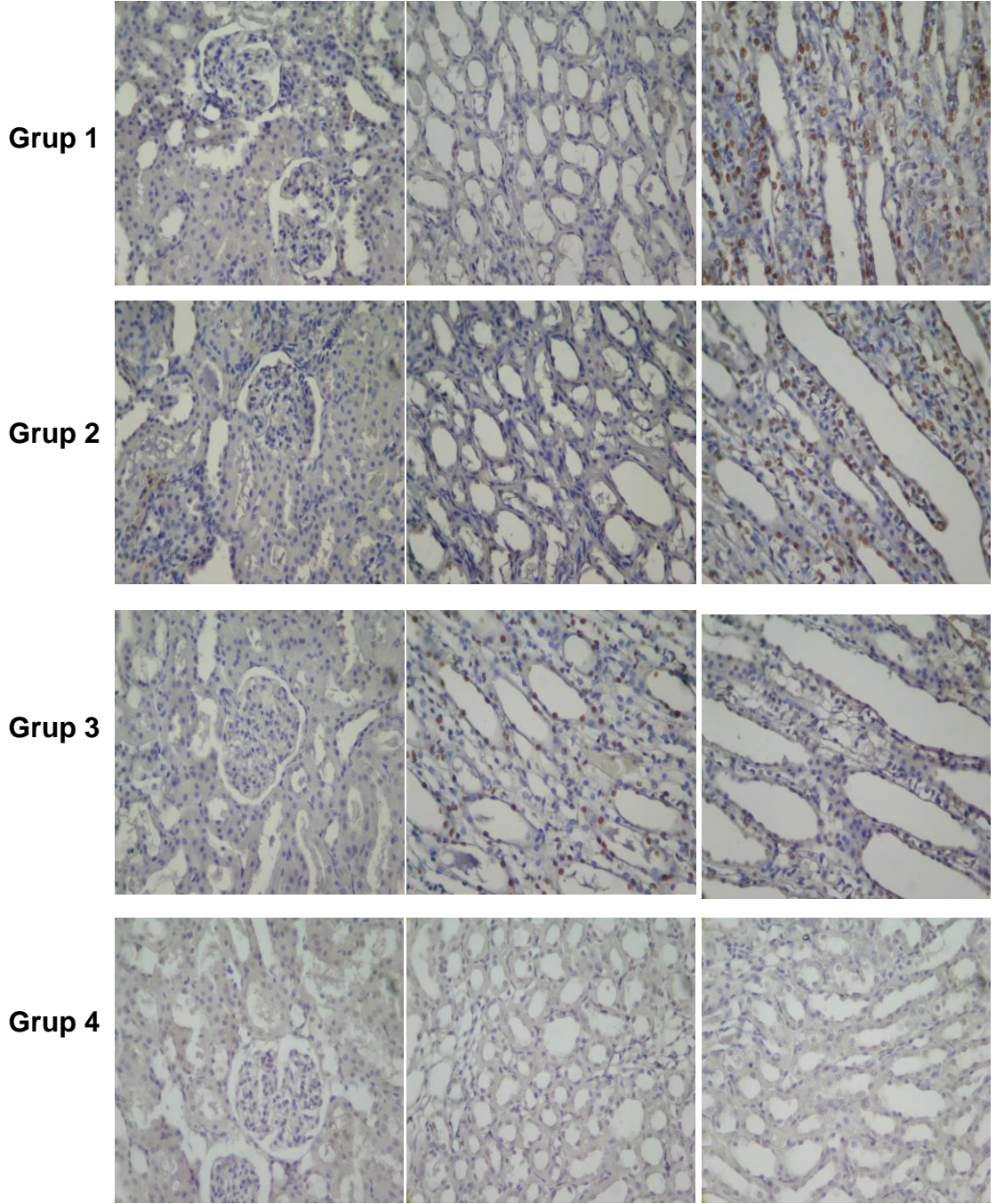
**Tablo 4. 3:** TUNEL skorlaması

	TUNEL	
	Korteks	Medulla
<b>Grup 1 (n=6)</b>	Nadir +	+
<b>Grup 2 (n=7)</b>	-	++
<b>Grup 3 (n=8)</b>	-	Nadir +
<b>Grup 4 (n=8)</b>	-	Nadir +

**Tablo 4.4:** TUNEL skorlarının gruplara göre ortalamaları

	TUNEL	
	Korteks	Medulla
<b>Grup 1 (n=6)</b>	%3.1±0.69	% 23.7±1.66
<b>Grup 2 (n=7)</b>	0	% 31.1±1.88
<b>Grup 3 (n=8)</b>	0	% 0.75±0.37
<b>Grup 4 (n=8)</b>	0	% 0.63±0.32

TUNEL boyaması sonucunda grup 1'de TUNEL pozitif hücreler kortekste % 3.1±0.69 oranında gözlenirken, medullada özellikle toplayıcı tübülüslerde daha yoğun olmak üzere TUNEL pozitif hücreler % 23.7±1.66 düzeyinde izlendi ( $p<0.001$ ). Grup 2'de sıçanlarda renal kortekste TUNEL pozitif hücreye rastlanmazken, medullada TUNEL pozitif hücrelerin hem intersitisyel alanda hem de toplayıcı tübülüslerde % 31.1±1.88 olduğu ve grup 1'e göre anlamlı olarak artmış olduğu gözlemlendi ( $p<0.001$ ). TUNEL pozitif hücreler grup 3 ve grup 4'de kortekste gözlenmezken ve medullada grup 3'de % 0.75±0.37 ve grup 4'de % 0.63±0.32 olduğu izlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ) (Resim 4.7).



**Resim 4.7:** Grup 1, 2, 3 ve 4 'e ait böbrek kesitlerinde TUNEL boyaması. Boyama sonucunda TUNEL pozitif hücreler kahverengi çekirdekli olarak görülmektedir. X400.

#### 4.4. İmmunohistokimyasal analiz:

İmmunohistokimyasal incelemede kullanılan skora tablo 4.5’de, analiz sonuçları tablo 4.6’da verilmiştir.

**Tablo 4.5:** İmmunohistokimyasal skora

	TGF-β1		TGF-β3		Kollajen-1	
	Korteks	Medulla	Korteks	Medulla	Korteks	Medulla
<b>Grup 1 (n=6)</b>	(+) yer yer (-)	(+)	(++)	(++)	(+)	(+)
<b>Grup 2 (n=7)</b>	(+)	(++)	(+)	(++)	(+)	(+) yer yer (++)
<b>Grup 3 (n=8)</b>	(±)	(±)	Yer yer (+)	Yer yer (+)	(+)	(+)
<b>Grup 4 (n=8)</b>	(±)	(±)	Yer yer (+)	Yer yer (+)	(+)	(+)

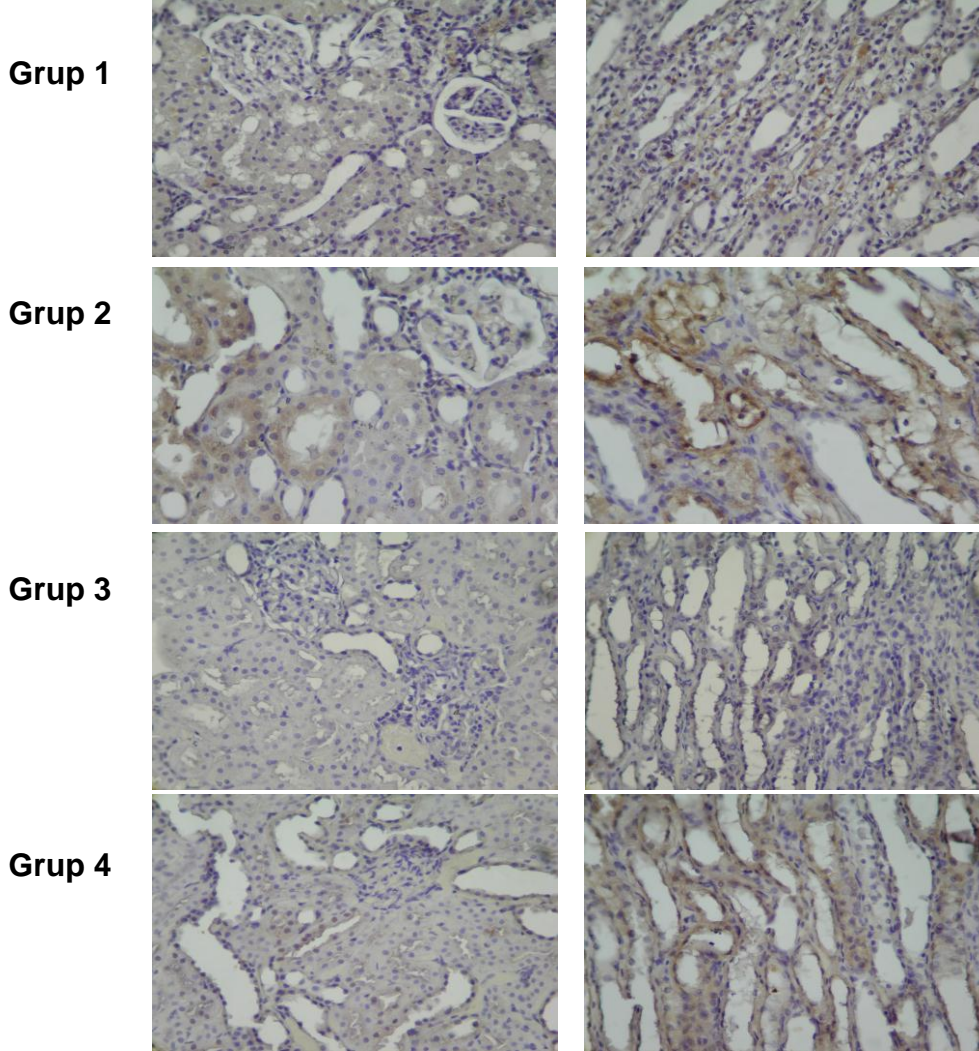
**Tablo 4.6:** İmmunohistokimyasal bulguları ortalamaları

	TGF-β1		TGF-β3		Kollajen-1	
	Korteks	Medulla	Korteks	Medulla	Korteks	Medulla
<b>Grup 1 (n=6)</b>	0.5±0.19	0.88±0.13	1.88±0.1	2.00±0.04	0.88±0.1	1.00±0.04
<b>Grup 2 (n=7)</b>	1.0±0.02	0.49±0.13	1.13±0.1	1.88±0.13	0.75±0.16	1.38±0.18
<b>Grup 3 (n=8)</b>	0.38±0.18	0.38±0.18	0.63±0.2	0.38±0.18	0.75±0.16	0.63±0.18
<b>Grup 4 (n=8)</b>	0.25±0.16	0.25±0.16	0.5±0.19	0.25±0.16	0.75±0.16	0.38±0.18

##### 4.4.1. TGF-β1 Dağılımı:

Çalışmada TGF-β1 immunoreaktiviteleri, kortekste sırasıyla grup 1’de 0.5±0.19, grup 2’de 1.0±0.02, grup 3’de 0.38±0.18 ve grup 4’de 0.25±0.16 ve medullada sırasıyla grup 1’de 0.88±0.13, grup 2’de 0.49±0.13, grup 3’de 0.38±0.18 ve grup 4’de 0.25±0.16 olarak bulundu. Kortikal TGF β1 immunoreaktivitelerinde gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p>0.05). Medullada ise grup 1’deki immunoreaktivite diğer gruplara göre

anlamli olarak fazla saptandi ( $p < 0.01$ ). Grup 3 ve 4'de immunoreaktivitelerinin zayıf olduğu görüldü ve grup 2'deki immunoreaktiviteyle anlamlı farklılık saptanmadı ( $p > 0.05$ ).



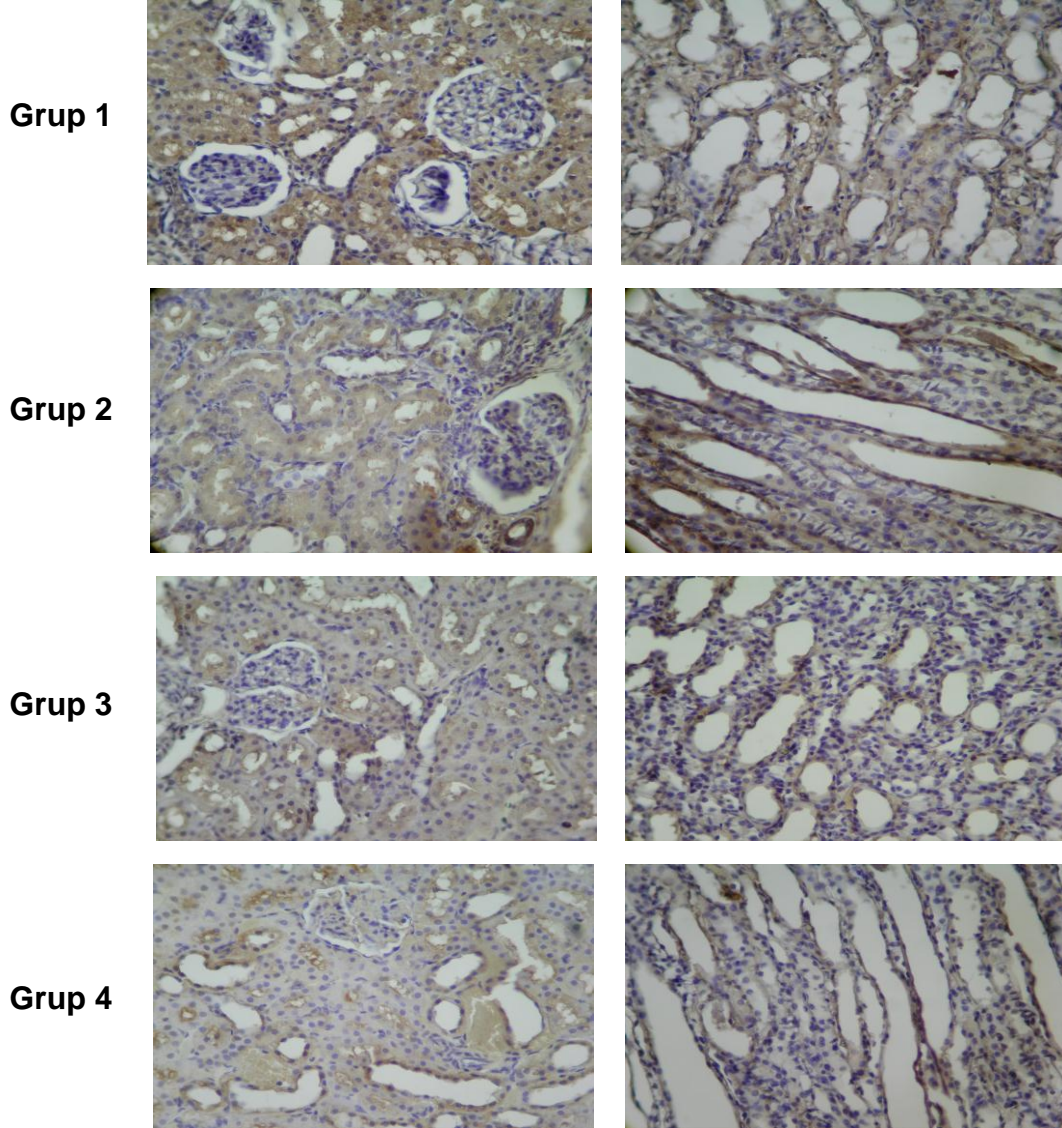
**Resim 4.8:** Grup 1, 2, 3 ve 4'e ait böbrek kesitlerinde TGF- $\beta$ 1 dağılımı. İmmunohistokimyasal boyama sonucunda immunoreaktiviteler kahverengi olarak görülmektedir. X400.

#### 4.4.2. TGF- $\beta$ 3 Dağılımı:

TGF- $\beta$ 3 immunoreaktiviteleri kortekste grup 1'de  $1.88 \pm 0.1$ , grup 2'de  $1.13 \pm 0.1$ , grup 3'de  $0.63 \pm 0.2$  ve grup 4'de  $0.5 \pm 0.19$ 'du. Medullada TGF- $\beta$ 3 immunoreaktiviteleri sırasıyla grup 1'de  $2.00 \pm 0.04$ , grup 2'de  $1.88 \pm 0.13$ , grup 3'de  $0.38 \pm 0.18$  ve grup 4'de  $0.25 \pm 0.16$ 'dı.

TGF- $\beta$ 3 immunoreaktivitesi kortekste grup 1 ve grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermese de ( $p > 0.05$ ) grup 3 ve grup 4'e

göre anlamlı olarak artmış saptandı ( $p<0.001$ ). Grup 2'deki TGF- $\beta$ 3 immunoreaktivitesinde kortekste grup 3 ve grup 4 ile anlamlı farklılık saptanmazken, medullada grup 3 ve grup 4'e göre anlamlı oranda fazla saptandı ( $p<0.001$ ).

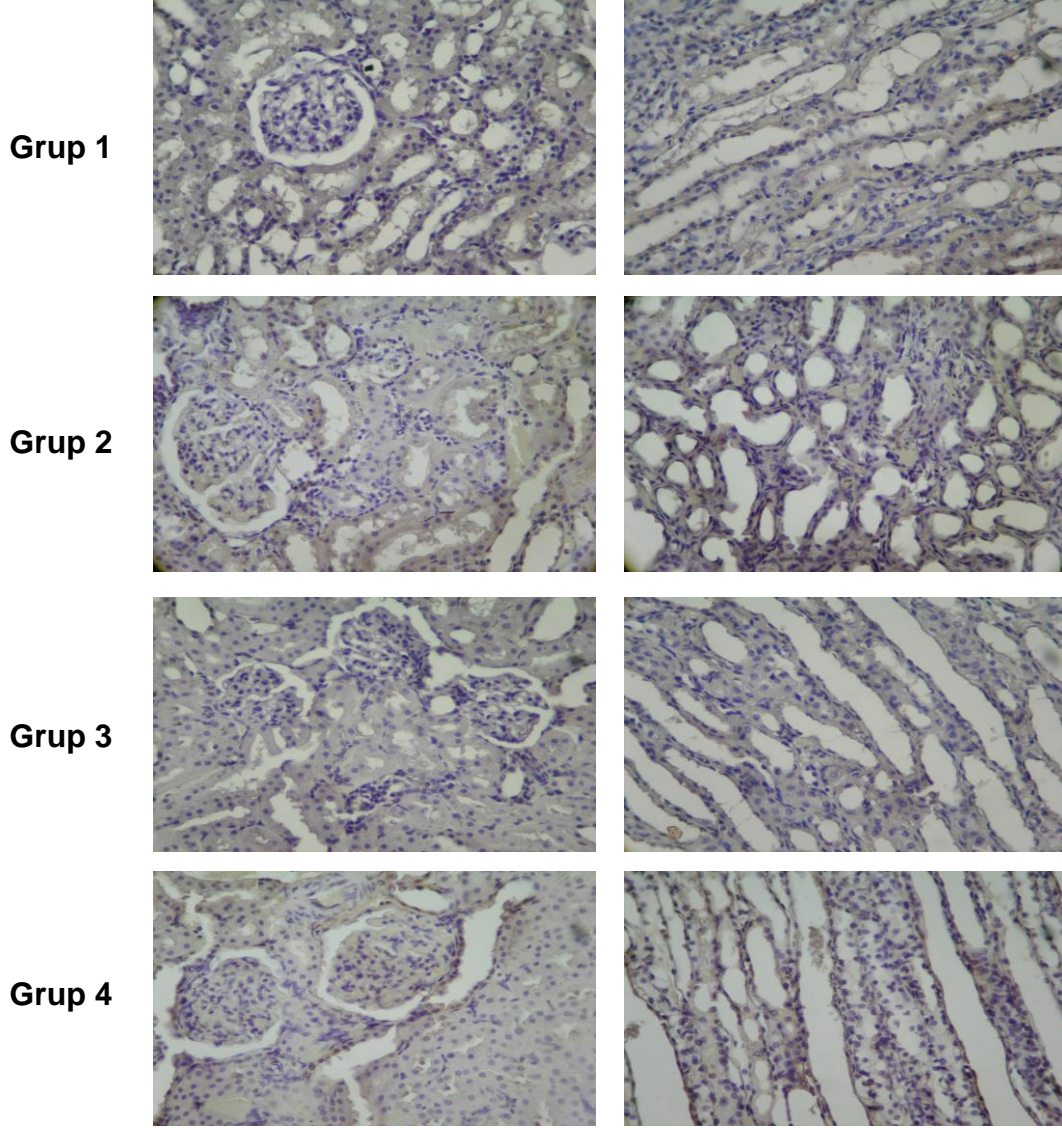


**Resim 4.9:** Grup 1, 2, 3 ve 4 'e ait böbrek kesitlerinde TGF- $\beta$ 3 dağılımı. İmmunohistokimyasal boyama sonucunda immunoreaktiviteler kahverengi olarak görülmektedir. X400.

#### 4.4.3. Kollajen-1 Dağılımı:

Kollajen-1 immunoreaktivitesi kortekste, sırasıyla grup 1'de  $0.88\pm 0.1$ , grup 2'de  $0.75\pm 0.16$ , grup 3'de  $0.75\pm 0.16$  ve grup 4'de  $0.75\pm 0.16$ 'di. Medullada kollajen-1 immunoreaktiviteleri sırasıyla grup 1'de  $1.00\pm 0.04$ , grup

2'de  $1.38 \pm 0.18$ , grup 3'de  $0.63 \pm 0.18$  ve grup 4'de  $0.38 \pm 0.18$ 'di. Tüm gruplarda kollajen-1 immunoreaktivitesi korteks ve medullada anlamlı farklılık göstermedi ( $p > 0.05$ ).



**Resim 4.10:** Grup 1, 2, 3 ve 4 'e ait böbrek kesitlerinde kollajen-1 dağılımı. İmmunohistokimyasal boyama ile immunoreaktiviteler kahverengi olarak görülmektedir. X400.

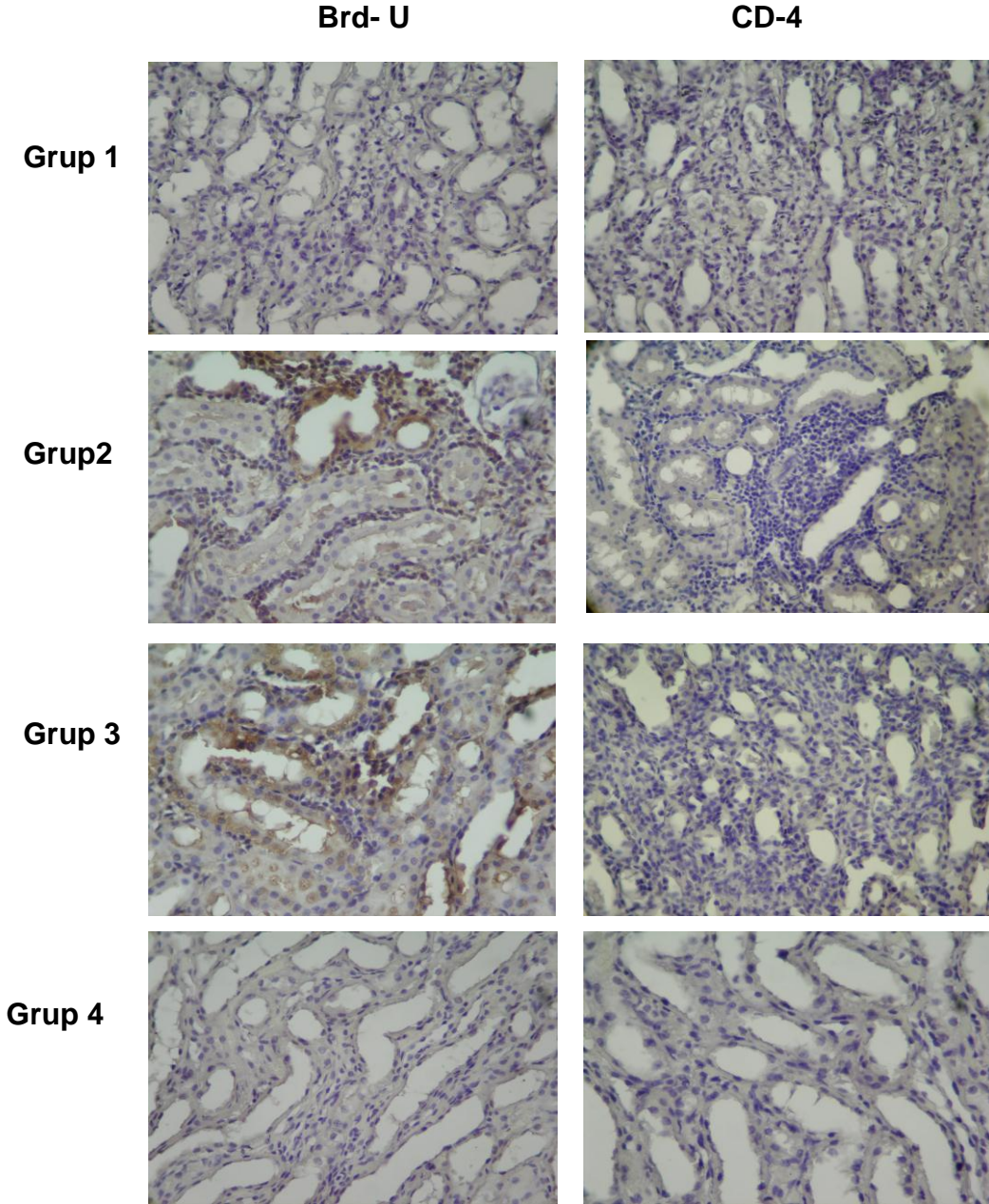
#### 4.4.4. Brd-U ve CD-4 Dağılımı:

Brd-U boyaması sonucunda Grup 1 ve Grup 4'de hücre uygulanmadığından dolayı immunoreaktivite bulgusu yoktu. Grup 2'de Brd-U pozitif hücreler tübülointersitisyel alanda çekirdeklerinin pozitif boyanması



sonucunda ayırt edildi. Grup 3'de yine tübülointersitisyel alanda hücrelerin olduğu ancak grup 2'deki pozitif hücrelerden daha az olduğu saptandı.

CD-4 immunoreaktivitesinin tüm gruplarda negatif olması nedeniyle kullanılan kök hücrelerin mezenşimal kök hücreler olduğu düşünüldü.



**Resim 4.11:** Grup 1, 2, 3 ve 4'e ait böbrek kesitlerinde Brd-U ve CD-4 Dağılımı. İmmunohistokimyasal boyama sonucunda immunoreaktiviteler kahverengi olarak görülmektedir. X400.

## 5. TARTIŞMA

CsA'nın 1970'li yıllarda tanımlanmasını izleyerek önemli bir immunsupresif olduğunun anlaşılması yaygın olarak klinik kullanıma girmesine yol açmıştır. Başlıca kullanım alanlarından biri allojenik solid organ ve HKHT'dur. Bu amaçla kullanımı sırasında birçok çalışmada CsA'nın etkin bir immunsupresyon sağladığı ve greft reddini azalttığı gösterilmiştir (47, 141). Etkisini yardımcı T hücreleri etkileyerek immun sistemde IL-2, IL-6, TNF, IFN gibi birçok düzenleyici sitokinin yapımını azaltması yolu ile göstermektedir (8, 142).

CsA'nın nefrotik sendrom tedavisinde kullanımı ile ilgili erişkin ve çocuklarda yapılan çalışmalar yüksek başarı oranı göstermektedir. Tejani ve arkadaşları CsA kullanan grupta, kontrol grubuna göre anlamlı oranda proteinürinin gerilediği ve serum albümin düzeylerinin yükseldiği gözlemiştir (36). Hamasaki ve arkadaşları CsA ile pulse metilprednisolon tedavisi kombinasyonunun tekli steroid tedavi rejimlerine göre anlamlı olarak daha başarılı olduğunu belirtmiştir (2).

CsA'nın etkinliği ve yaygın kullanımına rağmen gastrointestinal intolerans, hipertrikozis, diş eti hipertrofisi, iyon dengesizliği, jinekomasti, enfeksiyonlara eğilim, sekonder malignite gelişimi riski, nörotoksisite, hepatotoksisite ve nefrotoksisite gibi yan etkileri mevcuttur (63, 70, 143). Diğer yan etkilerle kıyaslandığında, kronik nefrotoksisite ilacın kullanımını sınırlayan başlıca yan etkidir (61).

Nankivell ve arkadaşları renal transplantasyonlu hastalarda yaklaşık on yıl sonra yapılan renal biyopside CsA'ya bağlı nefrotoksisite bulgularının tüm vakalarda olduğunu bildirmiştir (144).

Klinik önemi bu kadar fazla olan ve yaygın kullanılan CsA'nın nefrotoksisitesinden korunmak amacıyla farklı nefrotoksisite mekanizmalarına yönelik çok çeşitli ilaç ile deneysel çalışmalar yapılmıştır. CsA nefrotoksisitesinde antioksidan tedavinin etkinliğini araştıran çalışmalarda Ural ve arkadaşları E vitamini, Duru ve arkadaşları N-asetil sistein ve Buffoli ve arkadaşları provinol gibi antioksidanların kullanımıyla böbrek fonksiyon testleri ve glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzim aktivitelerinde düzelme olduğunu göstermiştir (85, 88, 145). Antiinflamatuvar tedaviler ile inflamatuvar süreçlerin yavaşlatılması veya durdurulması, böylelikle fibrozisin azaltılması amacıyla Atakan ve arkadaşları lökotrien reseptör antagonistleri, Pereria ve arkadaşları pioglitazon kullanarak böbrek fonksiyon testlerinde düzelme, GFR, proteinüri ve TGF  $\beta$  ekspresyonunda azalma olduğunu göstermiştir (87, 146). RAAS aktivasyonunun önlenmesi ile ilgili olarak Macuncuoğlu ve arkadaşları ile Silva ve arkadaşları spironolaktonun CsA nefrotoksisitesinde GFR'yi arttırdığını göstermiştir (83, 84). Tanaka ve arkadaşları ile Li ve arkadaşları ise çalışmalarında CsA doz azaltılması ile nefrotoksik etkilerden korunmaya çalışmış ve serum kreatinin düzeyi ve proteinürinin azaldığını göstermiştir (34, 147).

Yapılan deneysel çalışmalarda nefrotoksisite gelişmeden, yani CsA tedavisi ile birlikte başlanan antiinflamatuvar, antioksidan tedaviler ve RAAS blokajı ile histopatolojik ve biyokimyasal düzelme sağlanmış ancak oluşmuş nefrotoksisitenin tedavisine yönelik çalışma literatürde bulunamamıştır.

Bu çalışmada deneysel olarak CsA nefrotoksisitesi yaratılan sıçanlara kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre verilerek oluşmuş nefrotoksisitenin histopatolojik bulgularının düzelip düzelmeyeceğinin araştırılması amaçlandı. Kök hücre tedavisi son yıllarda kullanım alanı genişleyen ve kullanım sıklığı artan en önemli yeni nesil tedavi yöntemidir. Kaynağına göre embriyonik ve embriyo dışı kökenli olan kök hücreler, kendi içlerinde farklılık göstermekle birlikte, üstün farklılaşma yeteneğine sahiptir (119). Kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreler, kemik iliğinde non-hematopoetik stroma kaynaklı multipotent hücrelerdir. Erişkin tip kök hücreler oldukları için plastisite yoluyla

mezenşimal dokular dışındaki dokulara da dönüşebilir. Bu özellikleri sayesinde deneysel çalışmalara konu olmuşlardır (114).

Nagaya ve arkadaşlarının dilate kardiyomyopati sığıçanlarda (148), Rojas ve arkadaşlarının bleomisin ile akciğer hasarı yaratılan sığıçanlarda (149) mezenşimal kök hücreleri kullanmış ve hasarlı hücrelerin yerini alarak fonksiyonel ve yapısal iyileşme sağladıklarını göstermişlerdir. Mezenşimal kök hücrelerin literatürde başarılı olarak kullanılmış olması nedeniyle bu deneysel çalışmada CsA'nın kronik nefrotoksitesinde mezenşimal kök hücrelerin etkisinin araştırılmasına karar verildi.

CsA nefrotoksitesi yaratılan sığıçanlara kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre verilerek yapılan bu çalışmada CsA uygulanan tüm sığıçanlarda (grup 1 ve grup 2) literatüre benzer şekilde kronik nefrotoksititeye ait histopatolojik bulgular gözlemlendi. Bunlar ışık mikroskopide hematoksilen-eozin boyaması ile arterioller değişiklikler, tubuler atrofi, tübülointerstisyel hücre inflamasyonu, glomerüllerde genişleme ve yer yer yapışıklıklardı. Grup 2'de yani CsA ve kök hücre uygulanan grupta tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis grup 1'e göre daha azdı. Bu arada arteriolopati derecelendirilmesi çalışmada elektron mikroskopi kullanılmadığı için niceliksel olarak yapılamadı, ancak arteriolopati grup 1'de grup 2'ye göre daha belirgindi. Tübüler atrofinin grup 2'de grup 1'e göre anlamlı olarak daha az saptanmasının nedeninin verilen mezenşimal kök hücrelerin hasarlı tübül hücrelerinin yerini alarak iyileşmeyi sağlamasına bağlı olabileceği düşünöldü. Bir diğeri ışık mikroskopik değişiklik olan tübülointerstisyel mononökleer hücre artışı grup 1 ve grup 2'de grup 3 ve grup 4'e göre anlamlı olarak artmış olarak göröldü. Ancak grup 2'de grup 1 ile benzer saptandı. Bunun CsA nefrotoksitesi nedeniyle tübülointerstisyel alana infiltre olan inflamatuvar hücrelerden ve/ veya buraya göç eden mezenşimal kök hücrelerden kaynaklanabileceği düşünöldü. Brd-U boyaması ile bu bölgelerde pozitif işaretlenme de artış bu hücrelerin bir kısmının verilen mezenşimal kök hücreler olduğu görüşünü desteklemekteydi. Masson Trikrom ile yapılan incelemede grup 3 ve grup 4'e oranla grup 1 ve grup 2'de kollajen artışı ve inflamatuvar hücre artışının istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olması

da kronik nefrotoksisite ile uyumludur. Grup 2'de grup 1 ile benzer oranda fibrozis varlığının bu bulgunun gerilemesi için daha uzun bir süre gerekmesine bağlı olabileceği düşünüldü.

Deneysel olarak oluşturulan bazı renal hasarlanma modellerinde mezenşimal kök hücrelerin iyileştirici etkileri gösterilmiştir. Qian ve arkadaşları gliserol ile ve Lin ve arkadaşları ise iskemi-reperfüzyon hasarı yoluyla akut böbrek yetmezliği oluşturdukları modellerde mezenşimal kök hücre uygulanması ile histolojik olarak kök hücrelerin hasarlı bölgeye göç ettiğini, biyokimyasal olarak böbrek fonksiyon testlerinin düzeldiği göstermiştir (133, 150). Kronik böbrek yetmezliği modellerinde Hong ve arkadaşları (137) streptozosin vererek diyabetik nefropati geliştirdikleri sıçanlarda Brd-U ile işaretli mezenşimal kök hücre vererek renal hücre kitlesinde artma ve proteinüride azalma sağlamıştır. LeBleu ve arkadaşları deneysel olarak Alport sendromu yaratılan sıçanlarda mezenşimal kök hücre uygulamasından üç hafta sonra normal glomerüler bazal membran hücrelerini saptamıştır (151). Cavaglieri ve arkadaşları 5/6 nefrektomili sıçanlarda (152) yaptığı çalışmada lokal (intrakapsüler) mezenşimal kök hücre uygulanması sonrasında kök hücrelerin renal kortekse göçtüğünü ve sıçanlarda hipertansiyon, proteinüri ve glomerülosklerozda azalma olduğunu göstermiştir.

TUNEL yöntemi kullanılarak incelenen apoptozis artışının Grup 1 ve grup 2'de belirgin olduğu halde diğer gruplarda az olması, CsA nefrotoksisite mekanizmalarından birinin apoptozis olduğunu desteklemektedir. Benzer şekilde Thomas ve arkadaşları da CsA nefrotoksisitesindeki renal fibrozis gelişimi ile apoptozisin yakın ilişkili olduğunu belirtmiştir (153). TUNEL yöntemi ile grup 1 ve grup 2'de medulladaki etkilenmenin kortekse göre anlamlı şekilde fazla olduğu görüldü. Tübül hücrelerinde piknotik çekirdekli hücrelerin daha çok görülmesi ile medulladaki etkilenmenin korteksten anlamlı olarak fazla olduğunu gösterdi. Etkilenmenin bu bölgede daha fazla olması Venkatachalam ve arkadaşları'nın deneysel olarak gösterdiği gibi bu bölgenin iskemik hasara en hassas bölge olması (154) ve ayrıca CsA'nın çok lipofilik olması nedeniyle hücre duvarını kolaylıkla etkileyerek tübüllere direk

veya tübül hücresinin içinde organellere toksik etki göstermesi ile açıklanabilir (85). Grup 2'de TUNEL pozitif hücrelerin grup 1'e göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artmış olması apopitoza giden hücrelerin hem CsA'nın etki ettiği intrensek renal hücreler hem de verilen mezenşimal kök hücrelerden olabileceğini düşündürdü.

Bu çalışmada immunohistokimyasal olarak incelenen ve fibrozis göstergeleri olarak bilinen TGF  $\beta$ 1 ve TGF  $\beta$ 3 aktiviteleri Grup 1 ve grup 2'de grup 3 ve grup 4'e göre daha fazlaydı. TGF  $\beta$ 3'teki artış grup 1'de grup 2'ye göre anlamlı oranda daha fazlaydı. Bunun verilen kök hücrelerin etkisi ile hasarlı dokuda iyileşme ve dolayısıyla fibrozise gidişte azalmanın bir göstergesi olabileceği dşnld. TGF ekspresyonu ile fibrozis arasındaki ilişkiyi Shihab ve arkadaşları CsA tedavisinin TGF-  $\beta$  düzeyi artışı ile extraselller matriks artışı üzerine yaptığı çalışmada göstermiştir (155). Kollagen-1 immunoaktivitesinde gruplar arasında belirgin farklılık olmadığı izlendi. Bu durumun kollagen-1'in daha geç değişen ekstrasellüler bir matriks elemanı olması ve kök hücre uygulamasından sonra henüz düzelme gösterecek zaman olmadan çalışmanın bitmesinden kaynaklanabileceği dşnld.

Brd-U ile işaretli mezenşimal kök hücrelerin grup 2'de grup 3'e göre daha fazla olduğu gözlenmişti. Bu durum Wynn ve arkadaşlarının (156) tübüler hasarlanma sonucunda ortaya çıkan SDF-1 (Stroma kaynaklı faktör) adlı kemokin ve Herrera ve arkadaşlarının (157) akut tübüler nekrozlu sıçanlarda hasarlı tübüllerden salınan CD44'n kök hücre göçünü kontrol ettiğini ne srdğu çalışmalar ile uyumlu olarak grld. Grup 2'de özellikle tübüller arasında Brd-U ile işaretli mezenşimal kök hücrelerin grup 3'e göre daha fazla saptanması kök hücrelerin rejenerasyon için hasar olan bölgelere gittiğini düşündürmektedir.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Siklosporin A halen kullanımdaki immunsupresan ilaçlar arasındaki en etkili ajanlardandır. Hem organ naklinde hem nefrotik sendrom başta olmak üzere yaygın kullanımına rağmen nefrotoksikite gibi ciddi yan etkileri kullanımını sınırlamaktadır. Bu çalışmada kronik CsA nefrotoksitesinde kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin etkisi araştırıldı. Sonuç olarak kök hücrelerin hasarlı alana göç ettikleri ve CsA'nın neden olduğu hyalin arteriopati, tübüler atrofi ve tübülointerstisyel fibrozisin azalmasını sağladığı bulundu.

İleriki çalışmalarda mezenşimal kök hücrelerin uygun sinyaller verilerek spesifik renal hücrelere farklılaştırıldıktan sonra kullanımı, mezenşimal hücrelerin farklılaşma potansiyeli olan adiposit ve benzeri hücrelere dönüşme riskini azaltacak ve kök hücre tedavisinin başarısını arttırabilecektir. Kök hücreler ile ilgili çalışmalarının artması ileride yeni ve daha etkili tedavi alternatifleri yaratılabilmesi ve hatta insan çalışmalarının yapılabilmesi için öncül olabilecektir.

## ÖZET

### **Kronik siklosporin nefrotoksisitesinde kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin etkisinin araştırılması**

Siklosporin A (CsA) son yıllarda allojenik transplantasyon ve nefrotik sendrom tedavisinde yaygın olarak kullanılan immunsupresif bir ajandır. Bu ilacın kullanımın kısıtlayan en önemli yan etkisi dozdan bağımsız gelişebilen kronik nefrotoksisitedir. Mezenşimal kök hücreler otolog kullanılabilmesi, etik sorunlara yol açmaması ve daha çok kaynaktan elde edilebilmesi gibi avantajları nedeniyle daha sık kullanılmaktadır. Bu çalışmada mezenşimal kök hücrelerin deneysel olarak kronik CsA nefrotoksisitesi üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya 40 adet Wistar cinsi genç erişkin sıçan alındı. Bir gruba 60 gün boyunca SC yolla gün 15 mg/kg/g CsA, ikinci gruba aynı şekilde CsA ve 60. günde kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre, üçüncü gruba sadece kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre verildi. Dördüncü grup kontrol grubuydu. Sıçanlar 67. günün sonunda sakrifiye edilerek böbrek dokuları histopatolojik ve immunohistokimyasal (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, Kollajen-1, Brd-U, CD4) olarak incelendi.

Grup 2'de Grup 1'e göre arteriolopati, tubuler atrofi ve tübülointerstisyel fibrozis daha azdı. Tübülointerstisyel mononükleer hücre artışı grup 1 ve grup 2'de grup 3 ve grup 4'e göre anlamlı olarak artmış bulundu, ancak grup 2 ile grup 1 arasında farklılık yoktu. Bunun CsA'ya bağlı tübülointerstisyel alana infiltre olan inflamatuvar hücrelerden ve/veya buraya göç eden mezenşimal kök hücrelerden kaynaklanabileceği düşünüldü. Brd-U boyaması ile bu bölgelerde pozitif işaretlenme de artış bu hücrelerin bir kısmının verilen mezenşimal kök hücreler olduğu görüşünü



desteklemekteydi. Mezenşimal kök hücrelerin hasarlı dokulara göç ettikten sonra tübüler rejenerasyona katkı sağladığı düşünöldü. Grup 3 ve grup 4'te tübüler atrofi, fibrozis, arteriopati bulguları yoktu. İmmunohistokimyasal olarak TGF-β1 ve TGF-β3 ile boyanma grup 2'de grup 1'e göre anlamlı olarak azalmıştı. Bu da tübülointerstisyel fibrozise kök hücrelerin olumlu etkisini göstermekteydi.

Sonuç olarak deneysel kronik CsA nefrotoksisitesindeki histopatolojik bulguların kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerle geriletilebileceği gösterildi.

**Anahtar sözcükler:** Siklosporin A, deneysel, nefrotoksisite, kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre

## SUMMARY

### **Investigation of the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the chronic cyclosporine nephrotoxicity**

Cyclosporine A (CsA) is a powerful immunosuppressant which is used for allogenic transplantation and nephrotic syndrome treatment. Idiosyncratic chronic nephrotoxicity is the most important side effect limiting use of CsA. Mesenchymal stem cells are often used because they have the advantage of being able to be used autologous, not causing ethical problems and being able to be got from more sources. In this study the aim was to evaluate the effects of experimental mesenchymal stem cells on chronic CsA nephrotoxicity.

In this study 40 young adult Wistar rats were included. Rats in the group 1 had 15mg/kg/d subcutaneous cyclosporine for 60 days. Rats in the group 2 had cyclosporine by the same way and 60 days later were administered bone marrow derived mesenchymal stem cells. Rats in the group 3 had only bone marrow derived mesenchymal stem cells. Rats in the Group 4 were controls. All the rats were sacrificed at the end of the 67. day and all the renal tissues were examined histologically and immunohistochemically (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, Collagen-1, Brd-U, CD4).

Arteriopathy and tubular atrophy in group 2 were less than group 1. Increase in tubulointerstitial mononuclear cells was higher in both group 1 and 2 compared to other two groups, but there were no significant difference between group 1 and 2. This was thought to be due to inflammatory cells infiltrating tubulointerstitial area caused by CsA and/or mesenchymal stem cells migrating here. Increase in positive marking with Brd-U staining supports our thought of some of these cells were administered mesenchymal stem cells. We suggested mesenchymal stem cells contributed to tubular

regeneration following migration to injured area. In group 3 and 4 there was no finding suggesting tubular atrophy, fibrosis and arteriopathy.

Immunohistochemically, in group 2, staining with TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3 were significantly decreased compared to group 1. This in turn was showing favorable effects of mesenchymal stem cells on tubulointerstitial fibrosis.

In conclusion, we showed that histopathologic findings caused by experimental chronic CsA nephrotoxicity can be reversed by bone marrow-derived mesenchymal stem cells

**Keywords:** Cyclosporine A, experimental, nephrotoxicity, bone marrow derived mesenchymal stem cell

## KAYNAKLAR

1. Gölbaşı Z, Aydoğdu S. Siklosporin A. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri 1991; 11: 171- 176
2. Hamasaki Y, Yoshikawa N, Hattori S, Sasaki S, Iijima K, Nakanishi K, Matsuyama T, Ishikura K, Yata N, Kaneko T, Honda M. Cyclosporine and steroid therapy in children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatric Nephrology* 2009; 24: 2177–2185
3. Young BA, Burdmann EA, Johnson RJ, Andoh T, Bennett W, Couser W, Alpers CE. Cyclosporine A induced arteriopathy in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney International* 1995; 48: 431-438
4. Fujinaga S, Kaneko K, Muto T, Ohtomo Y, Murakami H, Yamashiro Y. Independent risk factors for chronic cyclosporine induced nephropathy in children with nephrotic syndrome. *Archives and Diseases in Childhood* 2006; 91: 666–670
5. Valeo T. Transplanted Stem Cells Become Healthy Functioning Neurons After Exposure to Brain's Signaling Molecules. *Neurology Today* 2010; 10(1): 14–15
6. Karamehmetoğlu Ş. Medulla Spinalis Yaralanması ve Kök Hücre Tedavisi. *Türkiye Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Dergisi* 2006; 52: 10-11
7. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 1994; 43: 179-186.
8. Ayna T, Çiftçi H, Tozkır H, Gürtekin M, Çarın M. İmmunosupresif ilaçların etki mekanizmaları. *Gaziantep Tıp Dergisi* 2009; 15(3): 42-

9. Christians U, Sewing KF, Cyclosporine metabolism in transplant patients. *Pharmacology and Therapeutics* 1993; 57: 291-345
10. Laupacis A, Keown PA, Ulan RA, Mckenzie N, Stiller CR. Cyclosporin A: a powerful immunosuppressant. *Canadian Medical Association Journal* 1982; 126: 1041-1046
11. Büber E, Açan NL. Ribozom dışı yolla sentezlenen biyoaktif peptidler *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004; 35: 43-48
12. Lorber MI, Paul K, Harding MW, Handschumacher RE, Marks WH. Cyclophilin binding: a receptor-mediated approach to monitoring cyclosporine immunosuppressive activity following organ transplantation. *Transplantation Proceedings* 1990; 22: 1240-1244.
13. Friedman J, Weissman I, Friedmant J, Alpert S. An analysis of the expression of cyclophilin C reveals tissue restriction and an intriguing pattern in the mouse kidney. *American Journal of Pathology* 1994; 144(6): 1247-1256
14. Shaw KT, Hot AM, Raghavan A, Kim J, Jain J, Park J, Sharma S, Rao A, Hogan PG. Cell Biology Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proceedings of the National Academy of Science*. 1995; 92: 11205-11209
15. Christians U, Spiekermann K, Bader A, Schottmann R, Linck A, Wonigeit K, Sewing KF, Link H. Cyclosporine metabolite pattern in blood from patients with acute GVHD after BMT. *Bone Marrow Transplantation* 1993; 12: 27-33
16. Starzl TE, Göran BG, Weil R, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GPJ, Bueno CF, MacHugh N. Cyclosporin A And Steroid Therapy In Sixty-Six Cadaver Kidney Recipients. *Surgery Gynecology Obstetrics* 1981; 153(4): 486–494
17. Duncan N, Craddock C. Optimizing the use of cyclosporin in allogenic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 38: 169-174

18. Lemaire M, Tillement JP. Role of lipoproteins and erythrocytes in the in vitro binding and distribution of cyclosporin A in the blood. *Journal of Pharmacology* 1982; 34: 715-718
19. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of Calcineurin Antagonists *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 25-32
20. Min DI, Ellingrod VL, Marsh S, McLeod H. CYP3A5 polymorphism and the ethnic differences in cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects. *Therapeutic Drug Monitoring* 2004; 26: 524
21. Tostivint I, du Montcel ST, Mallet A, Le Hoang P, Bodaghi B, Deray G, Bagnis CI. Renal outcome after cyclosporin –induced nephrotoxicity. *Neopology Dialysis Transplantation* 2007; 22: 880-885
22. Lindholm G, Dahlqvist R, Groth G, Sjoqvist F. A prospective study of cyclosporine concentration in relation to its therapeutic effect and toxicity after renal transplantation *British Journal of Clinical Pharmacology* 1990; 30: 443- 452
23. Levy GA. Long-term immunosuppression and drug interactions. *Liver Transplantation* 2001; 7: 53-59
24. Vella JP, Sayegh MH. Interactions between cyclosporine and newer antidepressant medications. *American Journal of Kidney Disease* 1998; 31(2): 320-323
25. Lill J, Bauer LA, Horn JR, Hansten PD: Cyclosporine-drug interactions and the influence of patient age. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2000; 57(17): 1579-1584
26. Freeman DJ, Grant DR, Carruthers SG. The cyclosporin-erythromycin interaction: impaired first pass metabolism in the pig. *British Journal of Pharmacology* 1991; 103: 1709- 1712
27. Spicer ST, Liddle C, Chapman JR, Barclay P, Nankivell BJ, Thomas P, O'Connell PJ. The mechanism of cyclosporine toxicity induced by clarithromycin. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1997; 43: 194–196

28. Oellerich M, Armstrong VW, Streit F, Weber L, Tönshoff B. Immunosuppressive drug monitoring of sirolimus and cyclosporine in pediatric patients. *Clinical Biochemistry* 2004; 37: 424- 428
29. Özatik MA, Küçüker Ş, Tarcan O, Bardakçı H, Balcı M, Küçükaksu DS, Şener E, Taşdemir O. Kalp Transplantasyonu Sonrası immunsupressif Tedavide Siklosporin Düzeyinin Monitorizasyonu ve Önemi. *Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2002; 10: 211-215
30. Kavukçu S, Soylu A, Türkmen M, Kasap B, Gümüştekin M, Gülay H. Two-hour post-dose cyclosporin A levels in adolescent renal transplant recipients in the late post-transplant period. *Pediatric Nephrology* 2004; 19: 667–671
31. Raymond G Morris Cyclosporine. *Therapeutic Drug Monitoring in Clinical Biochemistry Reviews* 2003;24:33-46
32. Çalışkan S. Nefrotik sendrom. *Türkiye Klinikleri* 2008; 4(1): 67- 71
33. Hayashi T, Saito N, Shoji T, Togawa M, Okada N, Tsubakihara Y. Cyclosporin A mono-therapy in nephrotic syndrome with contra-indication of steroid therapy. *Internal Medicine* 1999; 8(3): 272-275
34. Tanaka H, Tsugawa K, Suzuki K, Ito E. Renal biopsy findings in children receiving long-term treatment with Cyclosporine A given as a single daily dose. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2006; 209: 191-196
35. Bensman A, Niaudet P. Non-immunologic mechanisms of calcineurin inhibitors explain its antiproteinuric effects in genetic glomerulopathies. *Pediatric Nephrology* 2010; 25: 1197–1199
36. Lieberman KV, Tejani A. Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Cyclosporine in Steroid-Resistant Idiopathic Focal Segmental Glomerulosclerosis in Children. *Journal of American Society of Nephrology* 1996; 7: 56-63
37. Ponticelli C, Rizzoni G, Edefonti A, Altieri P, Rivolta E, Rinaldi S, Ghio L, Lusvarghi E, Gusmano R, Locatelli F, Pasquali S, Castellani A, Casa-Alberighi OD. A randomized trial of cyclosporine in steroid-

- resistant idiopathic nephrotic syndrome. *Kidney International* 1993; 43: 1377-1384
38. Dalkılıç E, Dilek K, Yavuz M, Ersoy A, Karakoç Y, Gönüllü G, Usta M, Yurtkuran M. Konvansiyonel İmmunosupresif Tedaviye Yanıtsız Primer Glomerulonefrit Olgularında Siklosporin A Tedavisinin Etkinliği. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon dergisi* 1999; 1: 19- 22
  39. Mohapatra N, Vanikar AV, Patel RD, Trivedi H. Modifying Cyclosporine Associated Renal Allograft Dysfunction. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* 2009; 20(5): 770-774
  40. De Jonge H, Kuypers DR. Pharmacogenetics in solid organ transplantation: current status and future directions. *Transplantation Reviews* 2008; 22(1): 6-20
  41. Duncan N, Craddock C. Optimizing the use of cyclosporin in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 38(3): 169-174
  42. Koga Y, Nagatoshi Y, Kawano Y, Okamura J. Methotrexate vs Cyclosporin A as a single agent for graft-versus-host disease prophylaxis in pediatric patients with hematological malignancies undergoing allogeneic bone marrow transplantation from HLA-identical siblings: a single-center analysis in Japan. *Bone Marrow Transplantation* 2003; 32: 171-176
  43. Schiff J, Cole E, Cantarovich M. Therapeutic Monitoring of Calcineurin Inhibitors for the Nephrologist. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 2: 374–384
  44. Deeg HJ, Storb R, Thomas ED, Flournoy N, Kennedy MS, Banaji M, Appelbaum FR, Bensinger WI, Buckner CD, Clift RA. Cyclosporine as prophylaxis for graft-versus-host disease: a randomized study in” patients undergoing marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia. *Blood* 1985; 65: 1325-1134
  45. Tokgöz B, Koçyiğit İ, Polat G, Eser B, Ünal A, Kaynar L, Sipahioğlu M, Oymak O, Utaş C, Çetin, M. Hematopoyetik Kök Hücre Nakli



- Yapılan Hastalarda Akut Böbrek Hasarı Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 2010; 19(2): 102-107
46. Duman S, Ok E, Önder G, Töz H, Özkahya M, Çelik A, Aşçı G, Atabay G. Siklosporin Kullanan Renal Transplant Hastalarında Antihipertansif Tedavi. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 2000; 1: 37-40
  47. Khosroshahi HT, Badroglu N, Jahannavard N, Oskui R, Bahluli A, Azar SA, Ardalani M. Safety of Low-Dose Cyclosporine Therapy Before Transplantation in. Kidney Allograft Recipients Transplantation Proceedings 2009; 41: 2757–2760
  48. İhtiyar E, Kiper H, Şahin A, Erkasap S, Ateş E. Kliniğimizde Böbrek Transplantasyonundan Sonra Yapılan İmmünsüpresif Tedavinin Değerlendirilmesi. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1993;1: 19-22
  49. Kitahara K, Kawai S. Cyclosporine and tacrolimus for the treatment of rheumatoid arthritis. Current Opinion of Rheumatology 2007;19:238-245
  50. Langford CA, Klippel JH, Balow JE, James SP, Sneller MC. Use of Cytotoxic Agents and Cyclosporine in the Treatment of Autoimmune Disease. Annals of Internal Medicine 1998; 128(12): 1021-1028
  51. Madan V, Griffiths CE. Systemic cyclosporine and tacrolimus in dermatology. Dermatologic Therapy 2007; 20(4): 239-250
  52. Griffiths C, Voorhees J. Cyclosporine a in in the treatment of psoriasis: a clinical and mechanistic prospective. The journal of investigate dermatology 1990; 95: 53-55
  53. Czaja AJ. Progress in the diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. Minerva Medical 2008; 99(6): 549-568
  54. Çat H, Sophani I, Lemann M, Modigliani R, Solue JC. Cyclosporin treatment of anal and perianal lesions associated with Crohn's disease. Turkish Journal of Gastroenterology 2003; 14(2): 121-127
  55. Danalıglu A, Kaymakglu S, Mungan Z, Karaca Ç, Demir K, Durakglu Z, Beşışık F, Boztaş G, Cakalglu Y, Ökten A. Ciddi Ülseratif Kolit

- Ataklarında Siklosporinin Etkinliği. Turkish Journal of Gastroenterology 2002; 13(3): 130-133
56. Donnenfeld E, Pflugfelder SC. Topical ophthalmic cyclosporine: pharmacology and clinical uses. Survey of Ophthalmology. 2009; 54(3): 321-338
57. Kymionis GD, Bouzoukis DI, Diakonis VF, Siganos C. Treatment of chronic dry eye: focus on cyclosporine. Clinical Ophthalmology 2008;2(4):829-836
58. Roberts CW, Carniglia PE, Brazzo BG. Comparison of topical cyclosporine, punctal occlusion, and a combination for the treatment of dry eye. Cornea 2007; 26(7): 805–809
59. Uslu A, Özdemir T. Zor Astım. Dicle Tıp Dergisi 2003; 30(1): 45-49
60. Mouy R, Stephan JL, Pillet P, Haddad E, Hubert P, Prieyu AM. Efficacy of cyclosporine A in the treatment of macrophage activation syndrome in juvenile arthritis: Report of five cases. Journal of Pediatrics 1996: 129(5): 750-754
61. Yoon HE, Yang CW. Established and Newly Proposed Mechanisms of Chronic Cyclosporine Nephropathy. Korean Journal of Internal Medicine 2009; 24: 81-92
62. Güvence N, Duranay M, Altay M, Üre M, Abuşoğlu C, Ecemiş ZA. Siklosporin-A'ya bağlı ciddi hiperpotasemi: bir olgu sunumu. Tıp Araştırmaları Dergisi 2009; 7(1): 54 -56
63. Heering PJ, Klein-Vehne N, Fehsel K. Decreased mineralocorticoid receptorexpression in blood cells of kidney transplant recipients undergoing immunosuppressive treatment: Cost efficient determination by quantitative PCR. Journal of Clinical Pathology 2004; 57: 33–36
64. Chang CT, Hung CC, Tian YC, Yang CW, Wu MS. Cyclosporine reduces paracellin-1 expression and magnesium transport in thick ascending limb cells. Nephrology Dialysis and Transplantation 2007; 22: 1033-1040
65. Sabbagh F, El Tawil Z, Lecerf F, Hulin A, Maurois P, Dartevelle P,

- Bac P, Fattal MG. Impact of Cyclosporine A on Magnesium Homeostasis: Clinical Observation in Lung Transplant Recipients and Experimental Study in Mice. *Transplantation* 2008; 86(3): 436-444
66. Varghese Z, Fernando R, Turakhia G, Psimenou E, Fernando O, Sweny P, Powis S, Moorhead JF. Calcineurin inhibitors enhance low-density lipoprotein oxidation in transplant patients. *Kidney international* 1999; 56(71): 137-140
67. Gönenç F, Dalva İ, Güneş Z, Akbay E, Dalva K, Çetin S. Siklosporinin Diabetojenik Etkisi. *Türkiye Klinik Araştırmalar Dergisi* 1991; 9: 439-42
68. Bozkaya G, Nart A, Uslu A ve ark. Impact of calcineurin inhibitors on bone metabolism in primary kidney transplant recipients. *Transplantation Proceedings* 2008; 40: 151-155
69. Zakarija A, Bennett C. Drug-induced thrombotic microangiopathy. *Seminars in Thrombosis Hemostasis* 2005; 31: 681-90
70. Taylor AL, Watson JC, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2005; 56: 23–46
71. Hood KA. Drug-induced gingival hyperplasia in transplant recipients. *Progress in Transplantation* 2002; 12(1): 17-21
72. Radwan-Oczkom M, Boratynska M, Klinger M, Zietek M. Risk Factors of Gingival Overtgrowth in Kidney Transplant Recipients Threatened With CyclosporinA. *Annals of Transplantation*. 2003; 8: 57-62
73. Magee CC, Pascual M. Update in Renal Transplantation. *Archives of Internal Medicine*.2004; 164: 1373-1388
74. İhtiyar E, Kiper H, Şahin A, Erkasap S, Ateş E. Kliniğimizde Böbrek Transplantasyonundan Sonra Yapılan İmmünsüpresif Tedavinin Değerlendirilmesi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1992; 2: 108-111
75. Berber İ, Aydın Ç, Yiğit B, Titiz İ, Altaca G. Böbrek Nakli Yapılan

- Hastalarda Siklosporin A Kullanımının Meme Hastalığı Gelişme Riskine Etkisi. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2003;12(2): 93-95
76. Magnasco A, Rossi A, Catarsi P, Gusmano R, Ginevri F, Perfumo F, Ghiggeri GM. Cyclosporin and Organ Specific Toxicity: Clinical Aspects. *Pharmacogenetics and Perspectives Current Clinical Pharmacology* 2008; 3:166-173
77. Serkova NJ, Christians U, Benet LZ. Biochemical mechanisms of cyclosporine neurotoxicity. *Molecular Interventions* 2004; 4: 97-107
78. Mehta MU, Venkataramanan R, Burckart GJ, Ptachcinski RJ, Delamos B, Stachak S, Van Thiel DH, Iwatsuki S, Starzl TE. Effect of bile on cyclosporin absorption in liver transplant patients. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1988; 25: 579-584
79. Tredger JM, Brown NW, Dhawan A. Calcineurin inhibitor sparing in paediatric solid organ transplantation: managing the efficacy/toxicity conundrum. *Drugs* 2008; 68(10): 1385-1414
80. Bączkowska T, Durlik M. Calcineurin inhibitor sparing immunosuppressive regimens in kidney allograft recipients. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2009; 119(5): 318-324
81. Parra Cid T, Conejo García JR, Carballo Alvarez F, de Arriba G. Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A nephrotoxicity. *Toxicology* 2003; 15(189): 99-111
82. Solez K, Racusen LC, Marcussen N, Slatnik I, Keown P, Buiwicz JF, Olsen S. Morphology of ischemic acute renal failure, normal function, and cyclosporine toxicity in cyclosporine-treated renal allograft recipients. *Kidney International* 1993; 43: 1058-1067
83. Silva FM, Miorin LA, dos Santos YA. The Effect of Aldosterone Antagonist in Experimental Nephropathy Induced by Cyclosporine A. *Renal Failure* 2008; 30: 439-442
84. Macunluoglu B, Arıkan H, Atakan A, Tuğlular S, Üfler G, Çakalağaoğlu F, Özener C, Akoğlu E. Effects of Spironolactone in an Experimental Model of Chronic Cyclosporine Nephrotoxicity.

- Transplantation Proceedings 2008; 40: 273–278
85. Ural M, Özgüner M, Şenal D, Sütçü R, Delibaş N. Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E'nin ve verapamilin etkilerinin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 12(4): 28-35
86. Comparison of the Effects Of Vitamin E and/or Quercetin in Attenuating Chronic Cyclosporine A-Induced Nephrotoxicity In Male Rats. Zal F, Mostafavi-Pour Z, Vessal M. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2007; 34: 720–724
87. Atakan A, Arikan H, Macunluoğlu B, Tuğlular S, Ülfer G, Çakalağaoğlu F, Özener C, Akoğlu E. Renal Protective Effects of Leukotriene Receptor Blockers in an Experimental Model of Cyclosporine Nephrotoxicity Transplantation Proceedings 2008; 40: 279–284
88. Duru M, Nacar A, Yönden Z, Kuvandik G, Helvacı MR, Koç A, Akaydın Y, Öksüz H, Sögüt S. Protective Effects of N-Acetylcysteine on Cyclosporine-A-Induced Nephrotoxicity. Renal Failure 2008; 30: 453–459
89. Busauschina A, Schnuelle P, van der Woude FJ. Cyclosporine nephrotoxicity. Transplantation Proceedings 2004; 36: 229-233
90. Inselmann G, Blank M, Baumann K. Cyclosporine induced lipid peroxidation in microsomes of rat kidney. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology. 1988; 62: 207-220
91. Charney DA, Bhaskaran M, Molmenti E. Calcineurin inhibitor toxicity in a renal transplant recipient. Neoprolgy Dialysis Transplantation Plus 2009; 2: 175–176
92. Liptak P, Ivanyi B. Primer: histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts Nature Clinical Practice Nephrology 2006; 2(7): 398-404
93. Morozumi K, Thiel G, Albert FW. Studies on morphological outcome of cyclosporine- associated arteriopathy after discontinuation of

- cyclosporine in renal allografts. *Clinical Nephrology* 1992; 38: 1–8
94. Caramelo C, Alvarez-Arroyo MV, Yagu S, Suzuki Y, Castilla A, Velasco L, Gonzalez-Pacheco FR, Tejedor A. Cyclosporin A toxicity, and more: vascular endothelial growth factor (VEGF) steps forward. *Nephrology Dialysis and Transplantation* 2004; 19: 285–288
  95. Padi SS, Chopra K. Salvage of cyclosporine A-induced oxidative stress and renal dysfunction by carvedilol. *Nephron*. 2002;92(3):685-692
  96. Waiser J, Dell K, Böhler T, Doğu E, Gaedeke J, Budde K, Neumayer HH. Cyclosporine A up-regulates the expression of TGF- $\beta$ 1 and its receptors type I and type II in rat mesangial cells *Nephrology Dialysis Transplantation* 2002; 17: 1568–1577
  97. Ramirez C, Olmo A, O'Valle F. Role of intrarenal endothelin 1, endothelin 3, and angiotensin II expression in chronic cyclosporin A nephrotoxicity in rats. *Experimental Nephrology* 2000; 8: 161-172.
  98. Djamali A: Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts. *American Journal of Physiology and Renal Physiology* 2007; 293: 445–455
  99. Shihab FS, Andoh TF, Tanner AM, Yi H, Bennett WM. Expression of apoptosis regulatory genes in chronic cyclosporine nephrotoxicity favors apoptosis. *Kidney International* 1999; 56: 2147-2159
  100. Yanga CW, Faulknerb GR, Wahbac IM, Christiansonb TA, Bagbyb GC, Jind DC, Abboudd HE, Andohc TF, Bennett WM. Expression of Apoptosis-related Genes in Chronic Cyclosporine Nephrotoxicity in Mice. *American Journal of Transplantation* 2002; 2: 391–399
  101. Border WA, Noble NA. Interactions of transforming growth factor- $\beta$  and angiotensin II in renal fibrosis. *Hypertension* 1998; 31: 181-188
  102. Ling H, Li X, Jha S. Therapeutic role of TGF- $\beta$  neutralizing antibody in mouse cyclosporin A nephropathy: morphologic improvement associated with functional preservation. *Journal of American Society of Nephrology* 2003; 14: 377-388

103. Bobadilla NA, Gamba G, Tapia E. Role of NO in cyclosporine nephrotoxicity: effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. *American Journal of Physiology* 1998; 274: 791-798
104. Stroes ES, Luscher TF, de Groot FG, Koomans HA, Rabelink TJ. Cyclosporine A increases nitric oxide activity in vivo. *Hypertension* 1997; 29: 570-575
105. Remuzzi G, Cattaneo D, Perico N: The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis. *Journal of American Society of Nephrology* 2008; 19: 1459–1462
106. Ming-hua S, Wei-jie Y, Shu-jian Z, Yu F, Zheng Z. Intrarenal activation of renin angiotensin system in the development of cyclosporine A induced chronic nephrotoxicity. *Chinese Medical Journal* 2008; 121(11): 983-988
107. Bobadilla NA, Gamba G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 2007; 293: 2–9
108. Hoyer JR. Osteopontin in cyclosporine toxicity. *Kidney International* 2002; 62: 348
109. Mazzali M, Hughes J, Dantas M, Liaw L, Steitz S, Alpers CE, Pichler RH, Lan HY, Giachelli CM, Shankland SJ, Couser WG, Johnson RJ. Effects of cyclosporine in osteopontin null mice. *Kidney International* 2002; 62: 78–85
110. Anders HJ, Banas B, Schlondorff D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *Journal of American Society of Nephrology* 2004; 15: 854-867
111. Kumaraguru U, Pack CD, Rouse BT. Toll-like receptor ligand links innate and adaptive immune responses by the production of heat-shock proteins. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 73: 574-583
112. Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM, Promeneur D, Frokiaer J, Marples D. Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *Journal of American Society of Nephrology* 1999; 10: 647-663

113. Yang CW, Kim J, Kim YH. Inhibition of calbindin D28K expression by cyclosporin A in rat kidney: the possible pathogenesis of cyclosporin A-induced hypercalciuria. *Journal of American Society of Nephrology* 1998; 9: 1416-1426
114. Özmen S, Fındıkçioğlu F, Siemionow M. Kök Hücreler. *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi* 2006; 14(3): 187-196
115. Ural A. Kök Hücreler. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi* 2006; 3(5): 140-145
116. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *American Society of Hematology Education Program* 2002: 369-391
117. Montoya FU, Verfaillie CM. Culture Systems for Pluripotent Stem Cells. *Journal Of Bioscience and Bioengineering* 2005; 100: 12- 27
118. Brignier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010; 125(2): 336-344
119. Güneş AM. Kök Hücre Plastisitesi ve Tıptaki Kullanım Alanları. *Güncel Pediatri Dergisi* 2005; 3(1): 36-42
120. Passier R, Mummery C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovascular Research* 2003; 58: 324-335
121. Christopher RC, Steven MG, Ronald CS. An overview of stem cell research and regulatory issues. *Mayo Clinic Proceedings* 2003; 78: 993-1003
122. Caspi O, Gepstein L. Stem cells for myocardial repair. *European Heart Journal Supplements* 2006; 8: 43–54
123. Baran ÖP, Nergiz Y, Bahçeci S. Göbek Kordonu Kan ve Stromal Kökenli Hücrelerin Sinir Hücrelerine Farklılaşması. *Dicle Tıp Dergisi* 2007; 34(3): 233-238
124. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keenek D, Ortiz-Gonzalez X, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Lowk W, Largaespada D, Verfaillie C. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49



125. Rendon-Martin E, Watt SM. Exploitation of stem cell plasticity. *Transfusion Medicine* 2003;13: 325-49
126. Forbes SJ, Vig P, Poulsom R, Wright NA, Alison MR. Adult Stem Cell Plasticity: New Pathways Of Tissue Regeneration Become Visible. *Clinical Science* 2002; 103: 355–369
127. Lee JA, Kim BI, Jo CH, Choi CW, Kim EK, Kim HS, Yoon KS, Choi JH. Mesenchymal stem-cell transplantation for hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rat model. *Pediatric Research*. 2010; 67(1): 42-46.
128. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D.M., Leri, A. & Anversa, P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Annals of New York Academy of Science* 2001; 938: 229–230
129. Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *American Journal of Physiology and Renal Physiology* 2005; 289: 31-42
130. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P.G. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology and Potential Applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-192
131. Ovalı E. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları ve Üretimi. *Türk Hematoloji Derneği Mezenkimal Kök Hücre Kursu Kitabı. Çeşme*. 2008: 7-11
132. Bussolati B, Hauser PV, Carvalhosa R, Camussi G. Contribution Of Stem Cells To Kidney Repair. *Current Stem Cell Research and Therapy* 2009; 4: 2-8
133. Qlian H, Yang H, Xu W, Yan Y, Chen Q, Zhu W, Cao H, Yin Q, Zhou H, Mao F, Chen YC. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *International Journal Of Molecular Medicine* 2008; 22: 325-332
134. Gadue P, Huber TL, Nostro MC. Germ layer induction from

- embryonic stem cells. *Experimental Hematology* 2005;33:955- 964
135. Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Newen G, Djuric Z, van Roeyen C.R, Konieczny A, Ostendorf T, Villa L, Popovsk M, Kerjaschki D, Floege J. Mesenchymal Stem Cells Prevent Progressive Experimental Renal Failure but Maldifferentiate into Glomerular Adipocytes. *Journal of American Society of Nephrology* 2007;18: 1754–1764
136. Perin L, Giuliani S, Sedrakyan S, Da Sacco S, De Filippo RE. Stem Cell and Regenerative Science Applications in the Development of Bioengineering of Renal Tissue *Pediatric Research* 2008; 63: 467-71
137. Hong Z, Hao-ming T, Yang L, Xiang-xun Z, Li Z, Li D, Xiao-he C, Xiu-qun L. Mesenchymal stem cells transplantation mildly ameliorates experimental diabetic nephropathy in rats. *Chinese Medical Journal* 2009; 122(21): 2573-2579
138. Humphreys B.D, Bonventre J.V. Mesenchymal Stem Cells in Acute Kidney Injury. *Annual Review of Medicine* 2008; 59: 311–25
139. Gross O, Kashtan C. E. Treatment of Alport syndrome: beyond animal models. *Kidney International* 2009; 1: 1-4
140. Prodromidi EI, Poulosom R, Jeffery R, Roufosse CA, Pollard PJ, Pusey CD, Cook HT. Bone Marrow-Derived Cells Contribute to Podocyte Regeneration and Amelioration of Renal Disease in a Mouse Model of Alport Syndrome. *Stem Cells* 2006; 24: 2448–2455
141. Ertem M. Talasemide hematopoetik kök hücre nakli. 4. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi Kitabı 2007: 112-118
142. Kang HG, Zhang D, Degauque N, Mariat C, Alexopoulos S, Zheng XX. Effects of Cyclosporine on transplant tolerance: The role of IL-2. *American Journal of Transplantation* 2007 ;7: 1907-1916
143. Ciavarella D, Guiglia R, Guiseppina C, Di Cosola M, Di Liberto C, Sabatucci A, Escudero N, Bascones A, Lo Muzio L. Update on gingival overgrowth by cyclosporine A in renal transplants. *Medicina Oral, Patología Oral, Cirugía Bucal* 2009; 5: 19-25

144. Nankivell BJ, Borrows RJ, Caroline L, Fung S, O'Connell PJ, Allen RDM, Chapman JR. The Natural History of Chronic Allograft Nephropathy. *The New England Journal of Medicine* 2003; 349: 2326-2333
145. Buffoli B, Pechánová O, Kojsová S, Andriantsitohaina R, Giugno L, Bianchi R, Rezzani R. Provinol Prevents CsA-induced Nephrotoxicity by Reducing Reactive Oxygen Species, iNOS, and NF- $\kappa$ B Expression. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2005; 53(12): 1459-1468
146. Pereira MG, Câmara NOS, Campaholle G, Cenedeze MA, de Paula V, Teixeira A, dos Reis MA, Pacheco-Silva A. Pioglitazone limits cyclosporine nephrotoxicity in rats. *International immunopharmacology* 2006; 6: 1943-1951
147. Li C, Yang CW, Kim WY, Jung JY, Cha JH, Kim YS, Jin K, Bennet WM, Bang BK. Reversibility of chronic cyclosporine nephropathy in rats after withdrawal of cyclosporine. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 2003; 284: 389-398
148. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Improves Cardiac Function in a Rat Model of Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 2005; 112: 1128-1135
149. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Repair of the Injured Lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2005; 33: 145-152
150. Lin F, Cordes K, Li L, Hood Leroy L, Couser WG, Shankland SJ, Igarashi P. Hematopoietic Stem Cells Contribute to the Regeneration of Renal Tubules after Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *Journal of American Society of Nephrology* 2003; 14: 1188-1199
151. LeBleu V, Sugimoto H, Mundel TM, Gerami-Naini B, Finan E,

- MillerCA, Gattone VH, Lu L, Shield CF, Folkman J, Kalluri R. Stem Cell Therapies Benefit Alport Syndrome. *Journal of American Society of Nephrology* 2009; 20: 2359–2370
152. Cavaglieri RC, Martini D, Sogayar MC, Noronha IL. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41(3): 947-951
153. Thomas SE, Andoh TF, Pichler RH, Shankland SJ, Couser WG, Bennet WM, Johnson RJ. Accelerated apoptosis characterized cyclosporine-associated interstitial fibrosis. *Kidney International* 1998; 53: 897-908
154. Venkatachalam MA, Bernard DB, Donohoe JF, Levinsky NG. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: Differences among the S1, S2, and S3 segments *Kidney International* 1978; 14: 31-49
155. Shihab FS, Yi H, Bennett WM, Andoh TF. Effect of nitric oxide modulation on TGF- $\beta$ 1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney International* 2000; 58: 1174–1185
156. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono L. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004; 104: 2643-2645
157. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello- Romanazzi G, Sanavio F, Stamenkovic I, Biancone L, Camussi G. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney International* 2007; 72: 430-441